

Die Ultrastruktur der Rattenleber bei Tetrachlorkohlenstoffvergiftung und protrahiertter Hypothermie

REINHARD THOM und IRMGARD SCHLICHT* **

Hämatologische Abteilung (Leiter: Prof. Dr. H. Gerhartz)
der Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin im Klinikum Westend
(Direktor: Prof. Dr. G. Neuhaus)

Eingegangen am 18. Juli 1969

The Ultrastructure of Rat-Liver in Carbontetrachloride-Poisoning and Prolonged Hypothermia

Summary. During prolonged hypothermia at 25° C (rectal temperature) in rats, stasis occurs in the terminal vessels of the liver. Erythrophagocytosis of the Kupffer cells increases. In intensely phagocytizing cells are not only degenerative changes of the cytoplasmic organelles found, but also crystals. The protective effect of prolonged hypothermia on the ultrastructure of the epithelium during poisoning with carbon-tetrachloride can be shown to be dependent on the degree of temperature reduction.

Zusammenfassung. Während einer protrahierten Hypothermie von 25° C Rectaltemperatur kommt es bei Ratten zur Stase in der terminalen Strombahn der Leber. Die Erythrocytenphagocytose der Sternzellen ist gesteigert. In stark phagocytierenden Zellen finden sich neben degenerativen Veränderungen der Zellorganellen häufig Kristallbildungen. Die Schutzwirkung der protrahierten Hypothermie auf das Leberepithel bei Tetrachlorkohlenstoffvergiftung ist auch im Bereich der Ultrastruktur in Abhängigkeit vom Grade der Temperatursenkung nachweisbar.

Nach dem Ergebnis lichtmikroskopischer Untersuchungen lassen sich bei Ratten während einer protrahierten Hypothermie von 25° C Rectaltemperatur mit Tetrachlorkohlenstoff keine Lebernekrosen erzeugen (Plaa u. Larson, 1964; Schlicht, 1964). Matzander und Hoer konnten einen ähnlichen Einfluß der Hypothermie bei Meerschweinchen beobachten. Dieser Schutzeffekt beruht nicht auf einer verminderten Resorption des Giftes aus dem Darmtrakt. Mit Hilfe von radioaktivem Tetrachlorkohlenstoff wurde in der Leber während der Unterkühlung die gleiche Konzentration von Tetrachlorkohlenstoff wie bei normaler Körpertemperatur festgestellt (Larson und Plaa, 1965; Schlicht und Scholz, 1965). Die gleiche Schutzwirkung übt die Hypothermie während der Sublimatvergiftung aus (Scholz, Schlicht, Daugs und Schäfer).

Bei der histologischen Untersuchung der Leber der protrahiert unterkühlten Kontrolltiere fielen seinerzeit isolierte Nekrosen der Kupfferschen Sternzellen teilweise mit Speicherung eines homogenen eosinophilen Materials im Cytoplasma auf (Masshoff und Oehler, Schlicht). Die Ursache dieser Veränderungen war pathogenetisch unklar geblieben.

* Herrn Professor Dr. H. Frhr. von Kress in Dankbarkeit gewidmet.

** Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

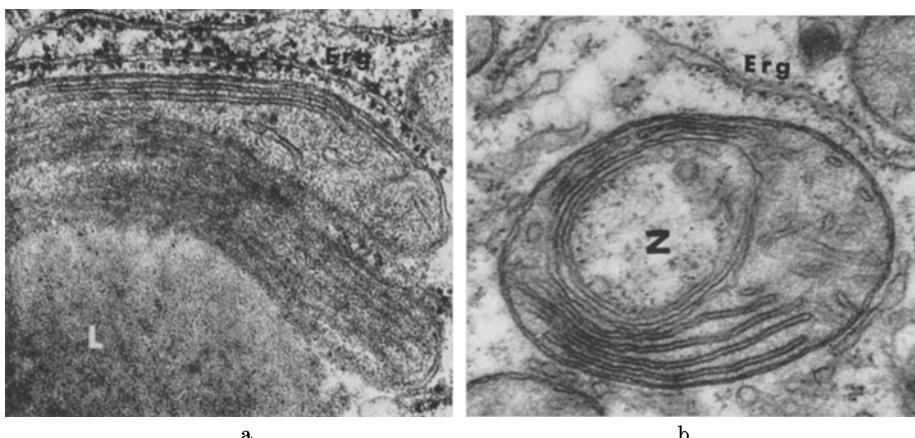


Abb. 1—3. Rattenleber nach 24stündiger Unterkühlung bei 25° C Rectaltemperatur. Glutaraldehydosmiumsäure-Fixierung, Nachkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat
 Abb. 1. a Vergr. 47500:1. Zwei einem Fetttröpfchen *L* aufgelagerte Mitochondrien mit parallel angeordneten Cristae in einer Epithelzelle. Normal ausgebildetes Ergastoplasma (*Erg.*).
 b Vergr. 47500:1. Konzentrisch um eine quergeschnittene Cytoplasmainvagination (*Z*) liegende Cristae mitochondriæ einer Leberepithelzelle mit etwas erweiterten Ergastoplasmalamellen (*Erg.*)

Mit den vorliegenden Befunden sollten die lichtmikroskopischen Beobachtungen durch elektronenmikroskopische Untersuchungen ergänzt werden. Über die Ultrastruktur der Leber nach protrahierter Hypothermie liegen unseres Wissens bisher noch keine Berichte vor.

Methodik

Es wurden 20 weibliche Albinoratten mit einem Gewicht von 94—280 g licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Wir verabfolgten 0,2 ml Tetrachlorkohlenstoff/100 g Körpergewicht per Schlundsonde. 1 Std nach der Vergiftung wurden die Tiere in Äthernarkose physikalisch unterkühlt. Die Narkose wurde mit wiederholten intraperitonealen Gaben von Numal (allylisopropylbarbitursaures Natrium in 1%iger Lösung) fortgesetzt. Bei einer Gruppe betrug die Rectaltemperatur 25° C (2 Tiere) und die Versuchsdauer 23—25 Std, bei der anderen (2 Tiere) 30° C bei 48stündiger Versuchsdauer. 7 Tiere wurden nur unterkühlt; 3 davon über 24 Std auf 25° und die restlichen 4 über 48 Std auf 30° C Colontemperatur.

Fixierung. Nach Öffnung der Bauchhöhle wurde auf den rechten Leberlappen eisgekühlte Fixierlösung aufgetropft. Der Leber wurden dann Blöckchen von 1 mm³ Größe entnommen und sofort für 1 Std in 1%ige Glutaraldehydlösung in Phosphatpuffer (pH 7,4, 360 mosm 4° C) gebracht. Nach 4stündiger Wässerung in Phosphatpuffer Nachfixierung 1 Std in 1% OsO₄ in Thyrodelösung. Nach 2 Zwischenbädern in Styrol Einbettung in Vestopal W. Die Schnitte zeigten silberweiße Interferenzfarben. Nachkontrastierung in Uranylacetat und Bleicitrat. Als Kontrollen dienten 5 in Normothermie vergiftete und 4 Normaltiere.

Ergebnisse

Bei allen auf 25° C *unterkühlten, jedoch nicht vergifteten* Tieren finden sich nach 24stündiger Versuchsdauer im Leberepithel feinere bis mittelgroße Fetttropfen. Die Mitochondrien sind in Bezug auf Matrixdichte und Struktur der Cristae gut erhalten. Ihre Anzahl erscheint vermehrt; auch die Cristae sind auffällig zahlreich und liegen vereinzelt in parallelen Lamellen (Abb. 1). Die Mehrzahl der Zellen besitzt ein mäßig erweitertes Ergastoplasma mit erhaltenem Ribosomenbesatz, das zu den Mitochondrien eine enge räumliche Beziehung aufgenommen hat. Die

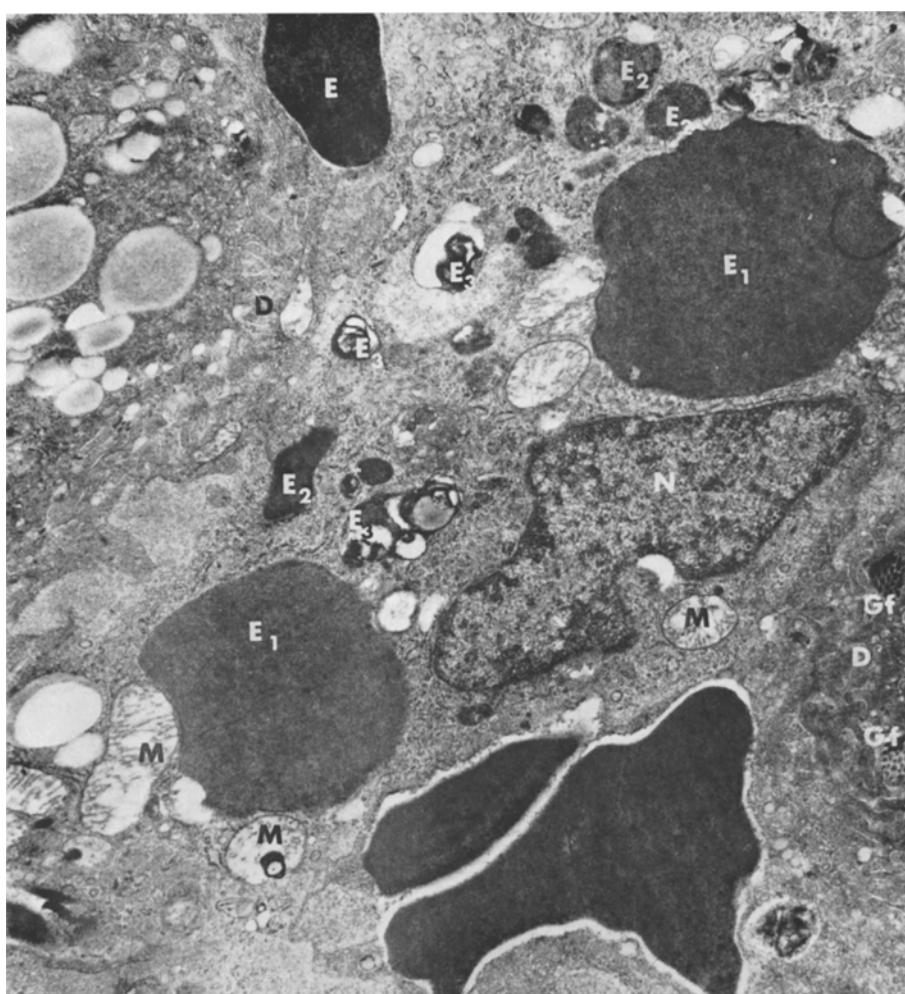
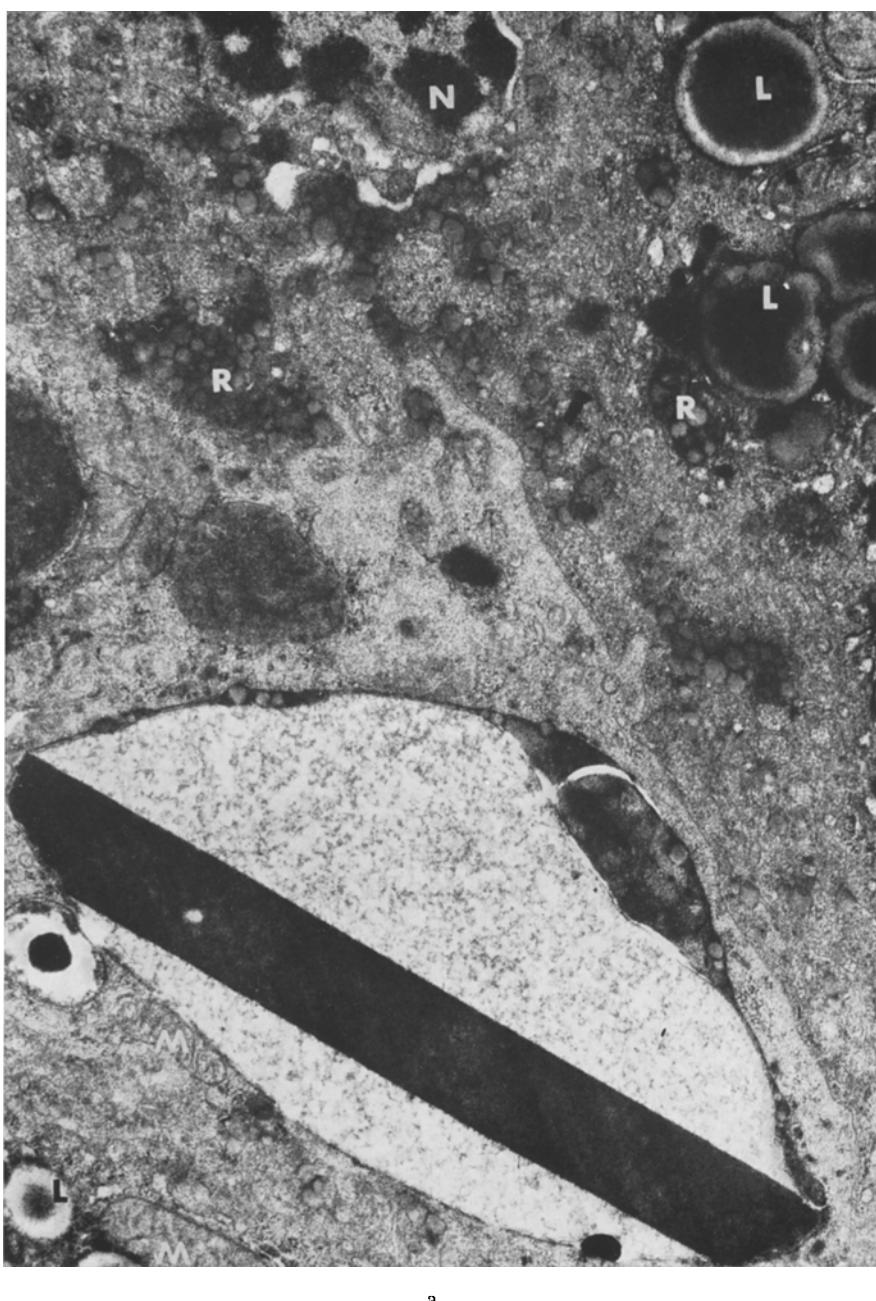


Abb. 2. Vergr. 19500:1. Sternzelle mit Erythrocytenfragmenten neben unterschiedlich großen homogenen Bruchstücken (E_1 und E_2). Myelinfiguren (E_3), Schwellung und Vacuolisierung der Mitochondrien (M). Disséscher Raum (D) mit Mikrovilli und zwei quergeschnittenen Gitterfasern (GF)

Zisternen liegen nicht mehr in Stapeln, sondern umscheiden größtenteils die Mitochondrien. Kernstruktur, Golgi-Apparat, Mikrovilli und Gallecapillaren zeigen keine Veränderungen. Die Anzahl der Mikrobodies ist reduziert. Die bei den unbehandelten Ratten ausgedehnten glykogenhaltigen Areale sind vollständig geschwunden. Vereinzelt finden sich Mitosen. Die Sinus sind meist prall mit Erythrocytenaggregaten gefüllt. Weitere Erythrocyten- und Thrombocytenaggregate erkennt man in kleinen venösen Gefäßen.

Im Vergleich zu den Normaltieren zeigen die unterkühlten Tiere wesentlich mehr phagocytierende Sternzellen, die vorwiegend Erythrocyten in verschiedenen Abbaustadien, aber auch kernhaltige Zellen enthalten (Abb. 2). Größere Zelleinschlüsse bewirken eine Randstellung und sichelförmige Abflachung des Kerns.



a

Abb. 3. a Vergr. 19500:1. Sternzelle mit zahlreichen teils in Vesikeln, teils einzeln liegenden Residualkörpern (R). In einer Cytoplasmavacuole liegendes ca. 5 μ nadelförmiges Kristalloid ohne Innenstruktur. Oben rechts und unten links angrenzend Anschnitte von Leberparenchymzellen mit Fetttropfen (L). b und c Vergr. 13100:1. Kristalline Einschlüsse in Kupfferschen Sternzellen, teils in unmittelbarer Nachbarschaft von Erythrocytenfragmenten, teils in Statu nascendi (b) in Cytoplasmavacuolen gelegen

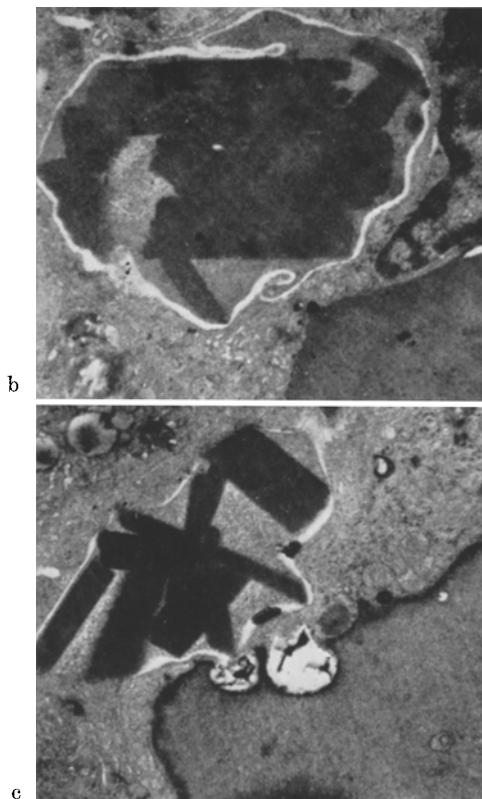


Abb. 3 b u. c

In zahlreichen Sternzellen finden sich Phagocytosevacuolen mit z. T. noch deutlich erkennbaren Zellbestandteilen wie Erythrocyten, pyknotischen Kernen, Membranfragmenten und Lysosomen. Als Folge der lebhaften Phagocytose sind auch die in vielen Zellen teils einzeln, teils in größeren Vesikeln gelagerten Residualkörper anzusehen. Einzelne Sternzellkerne zeigen Pyknose und Karyorrhexis. Andere lassen Schwellung des Ergastoplasmas und Erweiterung des Kern-Plasma-Spaltes erkennen.

Die Mitochondrienmatrix der Sternzellen weist im Gegensatz zu der der Epithelzellen auch beim Normaltier erhebliche Unterschiede in der Elektronendichte auf, wodurch eine qualitative Beurteilung erschwert wird. Uns erschienen dennoch die Mitochondrien mit einer transparenten oder teilweise vacuolisierten Matrix deutlich vermehrt; unabhängig von der Fixierung und Kontrastierungsart.

Auffällig ist das Vorkommen zahlreicher annähernd rhombischer und nadelförmiger Kristalle, die zum überwiegenden Teil in großen Cytoplasmavacuolen nekrobiotischer Sternzellen, teilweise aber auch im Sinuslumen erscheinen (Abb. 3). Sie besitzen unkontrastiert annähernd die gleiche Elektronendichte wie Erythrocyten. Nach Uranyl- und Bleikontrastierung überwiegt die Dichte der Kristalle ganz erheblich.

Bei Unterkühlung auf 30° C und einer Versuchsdauer von 2 Tagen sind die beschriebenen Veränderungen weniger stark ausgeprägt und beschränken sich im wesentlichen auf Glykogenschwund und Verfettung. Das Ergastoplasma ist noch zu einem kleinen Teil in Membranstapeln formiert — ohne Erweiterung der Zisternen. Kristallbildungen fehlen.

Nach *Vergiftung und Unterkühlung* auf 25° C finden sich überwiegend die für die alleinige Unterkühlung charakteristischen Veränderungen. Nur vereinzelte, vorwiegend subcapsulär gelegene Zellen und Zellgruppen zeigen eine erhebliche Erweiterung der Zisternen des Ergastoplasmas mit Dislokation der Ribosomen im Sinne der beginnenden blasigen Entartung. Die übrigen Zellorganellen zeigen lediglich die im Frühstadium der Intoxikation mit CCl_4 von Reynolds beschriebenen geringfügigen Veränderungen. Bei den vergifteten und anschließend 48 Std auf 30° C unterkühlten Ratten zeigen sich außer den oben beschriebenen Veränderungen am Ergastoplasma eine stärkere Verfettung, vermehrt Lysosomen sowie Alterationen der Mitochondrien in Form von Schwellung und Cristolyse. In einzelnen Zellen befinden sich größere Areale mit verfilzten Membranen des glatten endoplasmatischen Reticulum, wie sie von David u. Stenger bei chronischer CCl_4 -Vergiftung beschrieben worden sind.

Alle in Normothermie vergifteten Kontrolltiere zeigen demgegenüber die aus der Literatur nach Tetrachlorkohlenstoff bekannten Alterationen (Oberling, U. Roullier, Mölbert, Bassi u. Reynolds): Verfettung, hochgradige Erweiterung der Membranen des Ergastoplasmas, Reduzierung der Mikrovilli an den Gallecapillaren, aber auch im Disséschen Raum; Schwellung der Mitochondrien mit Reduzierung der Cristae und Aufhellung der Matrix. In den Kupferschen Sternzellen der in Normothermie vergifteten Kontrolltiere finden sich vermehrt phagocytierte Einschlußkörper und lamellar strukturierte Cytolysosomen, doch tritt die bei der Unterkühlung besonders auffällige Erythrocytenphagocytose in den Hintergrund. Verfilzte Membrananhäufungen des glatten endoplasmatischen Reticulums sahen wir bereits 24 Std nach Applikation des Tetrachlorkohlenstoffes. Die lichtmikroskopischen Bilder entsprachen den von uns früher erhobenen Befunden (Schlicht).

Diskussion

Die Schutzwirkung der protrahierten Hypothermie auf das Leberepithel bei Tetrachlorkohlenstoffvergiftung wird auch im Bereich der Ultrastruktur deutlich. Bei 25° C zeigen nur vereinzelte, subcapsulär gelegene Zellen eine stärkere Erweiterung des Ergastoplasmas mit teilweisem Verlust des Ribosomenbesatzes. Die übrigen Zellorganellen sind intakt. Nach Vergiftung bei 30° C ist der Schutzeffekt geringer. Stärkere Strukturveränderungen an Zellkernen, Ergastoplasma und Mitochondrien werden nachweisbar, ohne jedoch das Ausmaß wie in Normothermie zu erreichen. Die Hypothermie unterbricht bzw. verzögert demnach den zur Leberepithelnekrose führenden Prozeß bei Vergiftung in Abhängigkeit vom Grade der Temperatursenkung.

Als Ursache der enorm gesteigerten Erythrocytenphagocytose im Endothel müssen folgende Gegebenheiten in Betracht gezogen werden:

Unter einer protrahierten Hypothermie von 25° Rectaltemperatur entwickelt sich nach unseren elektronenmikroskopischen Beobachtungen in Übereinstimmung mit den vitalmikroskopischen Untersuchungen am Mesenterium in der terminalen Strombahn der Leber (s. Bond, Derrick u. Guest) eine hochgradige Stase mit Erythrocytenagglomeration in den Sinus. Zahlreiche in verschiedenen Abbau-

stadien befindliche, in den Kupfferschen Sternzellen intracytoplasmatisch liegende Erythrocyten lassen vermuten, daß der infolge der Stase verlängerte Kontakt der Erythrocyten mit der Sinuswand die Phagocytoseaktivität der Sternzellen begünstigt. Nach Weed u. Reed bewirken die Oberflächenpotentiale vitaler Erythrocyten und Phagocyten einen Abstand von über 20 Å, unter physiologischen Bedingungen sind daher Erythrocytenphagocytosen in Sternzellen nur selten zu finden (Masshoff).

Die unter den Bedingungen der Hypothermie mit Erythrocyten prall gefüllten Sinus zeigen zu einem erheblichen Prozentsatz einen breitflächigen Kontakt zwischen dem Plasmalemm von Erythrocyten und Endothelzelle mit einem Abstand von deutlich weniger als 20 Å. Auch ein verlangsamter Erythrocytenabbau unter den Bedingungen der Unterkühlung könnte die hohe Anzahl phagocytierender Sternzellen erklären. Doch spricht das gemeinsame häufige Vorkommen von ganzen, noch weitgehend intakten Zellen und Zellfragmenten in verschiedenen Abbaustadien bis zu optisch leeren großen Phagocytosevacuolen innerhalb einer Sternzelle für eine echte Steigerung der Phagocytose. Auch wissen wir aus kinetischen Untersuchungen über die Phagocytoseleistung von Leukocyten (Thom), daß selbst erhebliche Temperaturverminderungen (17° C) das Ausmaß der Phagocytose *in vitro* nicht wesentlich herabsetzen.

Bemerkenswerter Weise finden sich auch unter den physiologischen Bedingungen des natürlichen Winterschlafes (Fledermaus) vermehrt Erythrocytenphagocytosen (Cossel u. Wohlrab).

Die von Masshoff u. Oehler beschriebene Hemmung der Farbstoffgranulabildung in Sternzellen nach Trypanblauinjektion in Hypothermie läßt einen unterschiedlichen Einfluß der Temperatur auf Partialfunktionen wie die Segregation molekulardispers aufgenommener Farbstoffe einerseits und die Phagocytose andererseits vermuten.

Vornehmlich in phagocytierenden Sternzellen anzutreffende degenerative Veränderungen sprechen dafür, daß die lichtmikroskopisch beobachtete Sternzelldegeneration in Hypothermie (Masshoff u. Oehler, Schlicht) weniger auf einer selektiven Temperaturempfindlichkeit als vielmehr auf einer übersteigerten, zum Zelltod führenden Phagocytose beruht. Die nur in tiefer Hypothermie (25° C) vor allem in Bezirken mit hochgradiger Erythrocytenphagocytose vielfach beobachteten kristallinen Strukturen dürften Bilirubin bzw. Hämatoidin entsprechen. Sie gleichen z.T. den von Gieseking abgebildeten Zelleinschlüssen nach intravasaler Applikation von Hämatoidin. Doch sind die letzteren allseitig von einer vom Plasmalemm abgeschnürten Membran umgeben. Im Gegensatz dazu liegen die in Hypothermie autochthon entstandenen Kristalle stets ohne Membranumkleidung im Inneren einer größeren Vacuole.

So offensichtlich die Herkunft der kristallinen Einschlüsse von phagocytierten Erythrocyten erscheint, so hypothetisch ist gegenwärtig ihre chemische Zusammensetzung und die Ursache ihrer Entstehung. Ähnliche Einschlüsse wurden in den Reticulumzellen der Erythroblastennester des Knochenmarkes der Maus gefunden. Enge räumliche Beziehungen dieser Kristalloide zu Ferritinaggregaten und Hämosiderinablagerungen ließen auch hier nur allgemeine Rückschlüsse über die Abkunft von phagocytierten Erythrocyten zu (Berman). Zur Problematik der Deutung muß betont werden, daß weder in den umfangreichen elektronenoptischen

Studien über das menschliche Knochenmark noch in speziellen Untersuchungen über Erythrocytenphagozytose in Makrophagen der Ratte bzw. Phagozytosevorgängen nach exogener Eisenzufuhr über ähnliche Phänomene berichtet worden ist (Ball, Chapman u. Muir und Goldenberg, Essener, Pease).

Während der natürlichen Hibernation bleibt nach den Beobachtungen von Cossel u. Wohlrab das Leberglykogen erhalten. Während der artifiziellen Unterkühlung findet dagegen ein rascher und nahezu vollständiger Abbau statt, vermutlich weil das Kältezittern ohne Curarisierung nicht unterdrückt werden kann und die Temperatur unserer Tiere nur bis auf 25—30° C gesenkt wurde.

Für wertvolle Anregungen danken wir Herrn Privatdozent Dr. H. J. Merker (II. Anatomisches Institut der Freien Universität Berlin) und Herrn Dr. H. J. Stolpmann (Pathologisches Institut der Freien Universität Berlin) und für zuverlässige Assistenz Fräulein C. Merx und Fräulein C. Eulenstaedt.

Literatur

- Ball, J., Chapman, Muirden, K. D.: The uptake of iron in rabbit synovial tissue following intraarticular injection of iron-dextran. Light and electron-microscopy study. *J. Cell Biol.* **22**, 351 (1964).
- Bassi, M.: Electron microscopy of rat liver after carbon-tetrachloride poisoning. *Exp. Cell Res.* **20**, 323 (1960).
- Berman, J.: The ultrastructure of erythroblastic islands and reticular in mouse bone marrow. *J. Ultrastruct. Res.* **17**, 291 (1967).
- Bessis, M.: L'ilot erythroblastique, unite fonctionnelle de la moelle osseuse *Rev. Hémat.* **13**, 8 (1958).
- In: Stohlmann, The kinetics of cellular proliferation, p. 22. New York: Grune & Stratton 1959.
- In: Brachet and Mirsky, The cell, vol. 5, p. 163. New York: Acad. Press 1961.
- Bessis, M. C., Breton-Gorius, J.: Iron metabolissen in the bone marrow as seen by electron microscopy: A critical review. *Blood* **19**, II, 635 (1962).
- Cossels, L., Wohlrab, F.: Die Leber der Fledermaus in Hibernation. *Z. Zellforsch.* **62**, 608 (1964).
- David, H., Lunzenauer, K., Bartock, J.: Die Wirkung langdauernder Eiweißmangeldiät und chron. CCL₄-Intoxikation auf das submikroskopische Bild der Rattenleber. *Z. ges. inn. Med.* **17**, 993 (1963).
- Essener, E.: J. biophys. biochem. Cytol. **7**, 329 (1960).
- Gieseking, R.: In: Mesenchymale Gewebe und ihre Reaktionsformen im elektronenmikroskopischen Bild. Die Phagozytose, S. 72. Stuttgart: Gustav Fischer 1966.
- Larsson, R. E., Plaa, G. L.: Correlation of the effects of cervical cordotomy, hypothermia, and catecholamines on carbontetrachloride-induced hepatic necrosis. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **147**, 103 (1965).
- Masshoff, W.: Das Eisen im Gewebe und im Blutserum nach Transfusionen beim Menschen und im Tierexperiment und seine Bedeutung für das Schicksal des transfundierten Blutes. *Beitr. path. Anat.* **108**, 88 (1943).
- Oehler, K.: Der Einfluß der Hypothermie auf die Speicherung in der Leber. *Beitr. path. Anat.* **131**, 184 (1965).
- Matzander, U., Hoer, P. W.: Vergleichende tierexperimentelle Untersuchungen über die Auswirkungen des schweren akuten Leberparenchymzschadens bei normaler Körpertemperatur und unter kontrollierter Hypothermie. *Langenbecks Arch. klin. Chir.* **305**, 397 (1964).
- Mölbert, E.: Das elektronenmikroskopische Bild der Leber-Parenchymzelle nach histotoxischer Hypoxydose. *Beitr. path. Anat.* **118**, 203 (1957).
- Muir, A. R., Goldberg, L.: The tissue response to iron-dextran; an electron-microscope study. *J. Path. Bact.* **82**, 471 (1961).

- Oberling, Ch., Rouiller, Ch.: Les effects de l'intoxication aigue au tetrachlorure de carbone sur le foie du rat. Ann. path. Anat. **1**, 401 (1956).
- Pease, D. C.: An electron microscopic study of red bone marrow. Blood **11** (1956).
- Plaa, G. L., Larsson, R. E.: Role of body temperature in the protection afforded against CCl_4 hepatotoxicity by cervical cordotomy. Gastroenterology **46**, 302 (1964).
- Reynolds, E. S.: Liver parenchymal cell injury. I. Initial alterations of the cell following poisoning with carbon tetrachloride. J. Cell Biol. **19**, 139 (1963).
- Schlicht, I.: Der Einfluß der Hypothermie auf die Leber bei experimenteller Tetrachlorkohlenstoffvergiftung. Klin. Wschr. **42**, 806 (1964).
- Die Schutzwirkung der Hypothermie auf die Leberfunktion bei Tetrachlorkohlenstoffvergiftung. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **71**, 775 (1965).
- Scholz, A., Schlicht, I., Daugs, J., Schäfer, P.: Die Schutzwirkung der Hypothermie auf die Niere bei Sublimatvergiftung. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **71**, 935 (1965).
- Stenger, R. J.: Hepatic parenchymal cell alterations after long-term carbon tetrachloride administration. Amer. J. Path. **43**, 867 (1963).
- Thom, R.: Quantitative Untersuchungen über die Phagozytoseleistung der Granulocyten unter Cytostaticaeinfluß. Verh. V. Internat. Congr. Chemotherapie, Wien, 1967, vol. V, p. 399.
- Weed, R. J., Reed, C. F.: Membrane alternations leading to red cell destruction. Amer. J. Med. **41**, 681 (1966).

Dr. Reinhard Thom
Dr. Irmgard Schlicht
Hämatologische Abteilung der Medizinischen
Klinik der Freien Universität
Klinikum Westend
1 Berlin 19