

## Strukturelle und mikrozirkulatorische Veränderungen in der Rattenleber nach intermittierender Gabe von Alpha-Naphthyl-isothiocyanat (ANIT) über 12 Monate

N. STEFENELLI, J. H. HOLZNER, H. POINTNER und L. STOCKINGER

I. Medizinische Klinik (Vorstand: Prof. Dr. E. Deutsch),  
Pathologisches Institut (Vorstand: Prof. Dr. J. H. Holzner)  
und Lehrkanzel für Elektronenmikroskopie  
der medizinischen Fakultät (Vorstand: Prof. Dr. L. Stockinger)  
der Universität Wien

Eingegangen am 27. Februar 1971

### Changes in Structure and Microcirculation of the Rat Liver after Intermittent Application of Alpha-Naphthyl-Isothiocyanate (ANIT) for 12 Months

*Summary.* Long-Term intermittent intoxication of rats with ANIT was used to study the proliferation of connective tissue and its influence on the microvascularisation and microcirculation and the blood supply of the damaged liver. A single application of ANIT produces reversible lesions similar to intrahepatic cholestasis. Long-term and intermittent intoxication causes proliferation of bile ducts and consequently formation of connective tissue septa. That leads to a change in the architecture of the liver similar to primary biliary cirrhosis. These irreversible changes develop 6 to 8 months after the beginning of intoxication. Further development of the lesion is dependant on application of ANIT. There is no evidence of autonomous progression.

*Zusammenfassung.* Am Modell der chronisch-intermittierenden Intoxikation der Ratte mit ANIT werden die Bindegewebsneubildung und deren Einfluß auf die Leberstruktur, auf die Mikrovascularisation und Mikrozirkulation und damit die Blutversorgung der geschädigten Parenchymanteile verfolgt. Während eine einmalige Verabreichung von ANIT reversible Veränderungen wie bei intrahepatischer Cholestase hervorruft, bewirkt eine chronische oder chronisch-intermittierende Intoxikation eine Proliferation von Gallengängen und im Gefolge derselben die Bildung von Bindegewebssepten, die zu einem Umbau der Leberstruktur, ähnlich wie bei der primären biliären Cirrhose führt. Die irreversiblen Veränderungen entwickeln sich bei einer Versuchsdauer von 6—8 Monaten. Die Progredienz der Veränderungen ist an die Verabreichung von ANIT gebunden. Anzeichen eines eigenständigen Fortschreitens können nicht nachgewiesen werden.

Die pathologisch gesteigerte Bindegewebsvermehrung in der Leber scheint vorwiegend vom Gallengangssystem des Periportalfeldes auszugehen. Ihre Entstehung innerhalb des Leberlappchens ist ebenfalls in Betracht zu ziehen, tritt jedoch nicht so deutlich und so regelmäßig in Erscheinung. Am Modell der chronisch-intermittierenden Intoxikation mit Alpha-Naphthyl-isothiocyanat (ANIT) lassen sich bei der Ratte das allmähliche Vordringen von Bindegewebe vom Periportalfeld in das Leberlappchen, dessen Einfluß auf die Struktur, die Mikrovascularisation und -zirkulation und damit die Blutversorgung der gleichzeitig geschädigten Parenchymzelle verfolgen. Über frühe Stadien solcher Veränderungen ist bereits be-

richtet worden ((Holzner u. Mitarb., 1968); die folgenden Ausführungen behandeln ihre Entwicklung bis zu 12 Monaten. Im Vordergrund stand dabei die Frage, welche primär oder sekundär geschädigten Anteile der Leber in der Pathogenese chronischer Veränderungen eine führende Rolle übernehmen und vielleicht auch für die Irreversibilität und die Progredienz des Geschehens verantwortlich sind. Unter diesen Gesichtspunkten wurde auch das Verhalten der Mikrozirkulation intravitalmikroskopisch beurteilt.

### Methoden

Der Versuch wurde mit 70 Albinoratten (Wistar) beiderlei Geschlechts im Gewicht von 180—240 g begonnen. In Abständen von rund 40 Tagen erhielten die Tiere 7 Tage lang jeweils 100 mg ANIT pro kg Körpergewicht in 16 %iger ölgiger Lösung (Olivenöl) mittels Pipette in die Mundhöhle getropft. Die Nahrung bestand aus Rattenkeks (Lembeck) und Wasser ad libitum.

In unterschiedlichen Zeitabständen nach den Perioden der ANIT-Verabreichung erfolgten intravitale Untersuchung und Tötung verschieden großer Tiergruppen in Urethannarkose (0,7 ml 20 %ige Urethanlösung intraperitoneal). Die letzte Gruppe werteten wir 12 Monate nach Versuchsbeginn aus.

Zur intravitalmikroskopischen Beurteilung und photographischen Registrierung der Mikrovascularisation und -zirkulation wurde das Abdomen durch einen Medianschnitt mit Erweiterung am rechten Rippenbogen eröffnet, der Rand eines vorsichtig vorgelagerten Leberlappens auf einen Plexiglastisch gelagert. Die vitalmikroskopische Untersuchung erfolgte nach einer andersorts beschriebenen Methode (Stefenelli, 1969). Veränderungen der Leberoberfläche wurden bei seitlicher Beleuchtung mit einem Stereomikroskop erfaßt.

Anschließend wurde Blut durch Herzpunktion gewonnen und Lebergewebe in Scheibchen zur Fixierung in eiskalte Lösungen nach Carnoy, in Formol-Calcium (Baker) und Glutaraldehyd gebracht. Paraffin- bzw. Gefrierschnitte färbten wir wie folgt: Hämatoxylin-Eosin, Faserfärbung nach van Gieson, Mallory und Gomori, PAS-Färbung ohne und mit vorheriger Diastaseeinwirkung, ATPase-Aktivität nach Wachstein und Meisel (Holzner, 1960, Holzner u. Mitarb., 1962, Wachstein und Meisel, 1957) (Inkubationszeit: 45 min), saure Phosphatase-Aktivität (Gomori, 1952) (Inkubationszeit: 60 min). Nach Fixierung in Glutaraldehyd und Einbettung in Epon 812 kamen Semidünnschnitte nach Toluidinblaufärbung zur lichtmikroskopischen Auswertung; die elektronenmikroskopische Untersuchung führten wir an einem Siemens-Elmiskop I durch.

### Ergebnisse

Zwei Tage nach Abschluß der 1. Serie von ANIT-Gaben finden sich histologisch an unterschiedlichen Stellen des Leberläppchens herdförmige Nekrosen. Innerhalb dieser ist ein Schwund von Fasern und histochemisch ein Verlust der Aktivität von ATPase und saurer Phosphatase zu erkennen. Außerhalb der Nekrosen ist die ATPase mit pericanaliculärer Lokalisation gut erhalten und zeichnet stellenweise Erweiterungen der Canaliculi (Gallengangscapillaren) nach. Die Aktivität der sauren Phosphatase ist wie bei abnorm starker Lysosomenaktivität dargestellt. Außerdem fällt eine Glykogenverminderung auf.

Die Intravitalmikroskopie zeigt außer den ausgesparten Arealen der Nekrose, daß die Zahl der durchströmten Sinusoide vermindert, die Strömung durch diese jedoch deutlich verstärkt ist. Gut durchströmte Sinusoide reichen bis knapp an die Grenzen der Nekrose heran, biegen ab, verlaufen entlang dieser, kehren um und führen das Blut in gewundenem Verlauf zu der nächstliegenden Zentralvene (Abb. 1).

Die Periportalfelder sind durch Gallengangwucherung mit Bindegewebsvermehrung verbreitert (Abb. 2). In diesem Stadium der Intoxikation sind die Werte

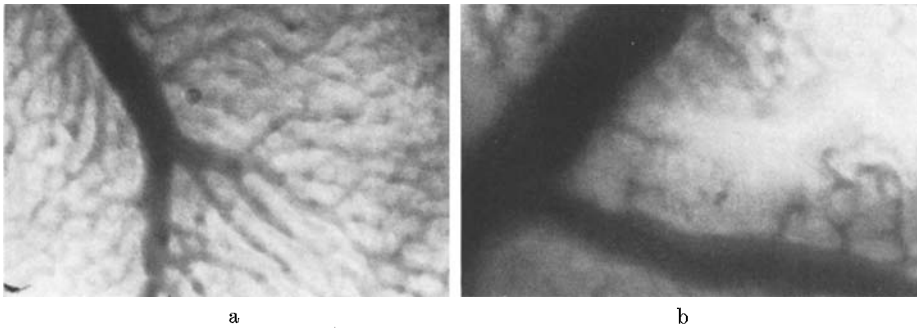


Abb. 1a u. b. Blutfüllung von Sinusoiden und Zentralvenen der Rattenleber. Intravitalmikroskopie, Durchlicht: a normale Leber; b 8 Monate nach intermittierender Gabe von ANIT

des Bilirubins, der alkalischen Phosphatase und der Transaminasen im Serum wie bei Cholestase mit Leberzellschädigung erhöht. 50 Tage nach Verabreichung einer einzigen ANIT-Serie entsprechen die morphologischen Befunde wieder der Norm und auch die durchgeführten Blutuntersuchungen sprechen für eine Reversibilität der Veränderungen.

Nach weiteren intermittierenden Gaben von ANIT treten neuerlich Veränderungen wie bei der ersten Fütterung auf, die jedoch — ab der 3. oder 4. Serie — durch persistierende Abweichungen von der Norm als Folge vorhergehender Intoxikation modifiziert sind. Die Periportalfelder weiten sich stufenweise durch Zunahme der Zell- und Bindegewebsmasse aus. Das Lumen der primär vorhandenen Gallengänge wird enger und ist vereinzelt nicht mehr zu erkennen (Abb. 2). Daneben bilden sich zahlreiche Gallengangregenerate mit offenbar normalem Wandaufbau. Ihr Lumen ist unterschiedlich weit, die Epitheloberfläche trägt Mikrovilli. Die Ultrastruktur der proliferierenden Epithelzellen der Ductuli ist die einer niedrigen Differenzierungsstufe. Sie enthalten wenige Organellen und Membranen, jedoch reichlich freie Ribosomen. Im periduktulären, vorwiegend kollagenen Fasermaterial liegen wenige Bindegewebszellen. Das angrenzende Leberparenchym läßt eine Basalmembran erkennen. Der Übergang der Gallengangregenerate in das Leberparenchym ist jedoch an den meisten Stellen unscharf begrenzt. Zwischen wenig differenzierten Epithelzellen liegen mitochondrienreiche typische Leberzellen mit reichlich endoplasmatischen Membransystemen und einzelnen Lysosomen. Auch Mitosen kommen im Bereiche dieses Epithelverbandes vor (Abb. 3).

Im Periportalfeld fallen deutlich erweiterte Lymphwege auf. Eine „Capillarisierung“ von Sinusoiden ist nicht zu erkennen. Es zeigt sich keine diffuse Bindegewebsneubildung innerhalb des Lobulus.

Die Randzonen der Periportalfelder schieben sich mit sternförmigen Ausläufern, die starke ATPaseaktivität besitzen, in das Leberläppchen vor. Von diesen strahlen zarte Septen aus, die nach der Färbung nach Mallory wie mit einem blauen Stift gezeichnet erscheinen und Büscheln von Gitterfasern entsprechen (Abb. 4). Sie durchqueren bisweilen den ganzen Acinus ohne erkennbare Bindung an eine bestimmte, hier vorhandene Struktur. Gleichzeitig mit der Bildung solcher Septen ist die proliferative Aktivität der intraacinären Leberzellen jedoch erhöht.

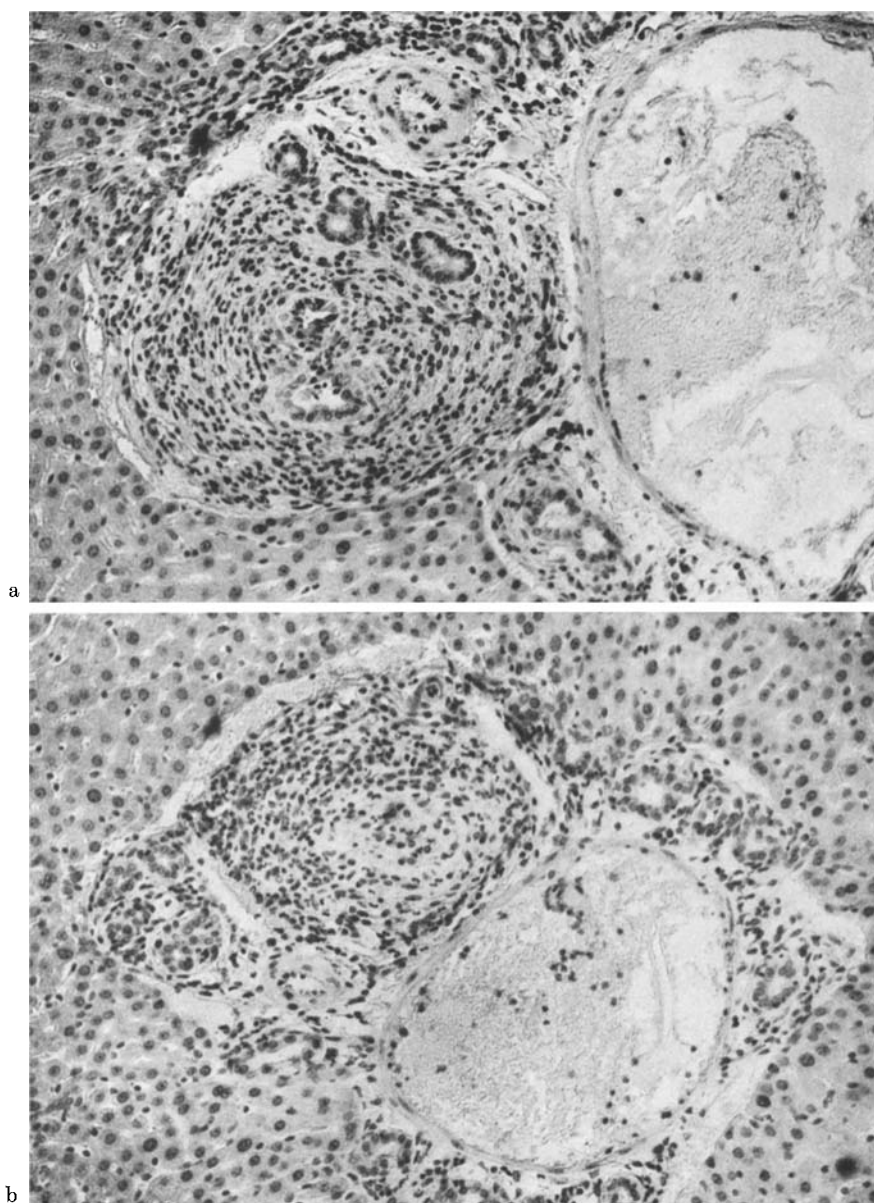


Abb. 2 a u. b. Periportalfelder nach wiederholter Verfütterung von ANIT: Zell- und Bindegewebsvermehrung im Bereiche des Gallenganges mit Verkleinerung (a) bis totaler (b) Obliteration des Lumens. Bildung zahlreicher Gallengangregenerate

Die beschriebenen Septen bilden sich nach Aussetzen der ANIT-Gaben zurück. In dem wiederholten „Vor“ während der Intoxikation und „Zurück“ in den Behandlungspausen schieben sich jedoch hinter den feinen Septen breitere Bindegewebskeile von verschiedenen Portalfeldern aus vor. Diese sind schließlich nicht

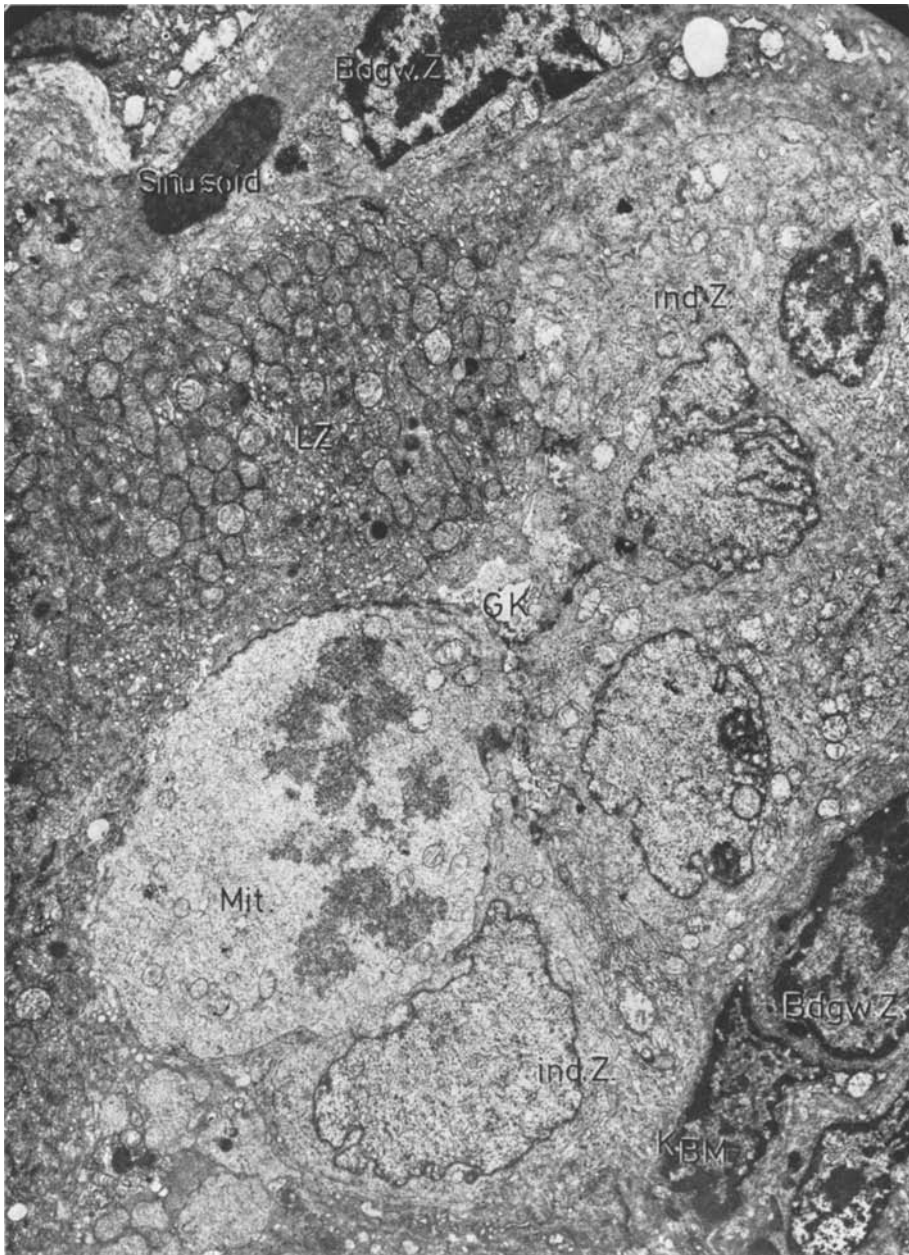


Abb. 3. Rattenleber 120 Tage nach erster Fütterung von Anit, 1 Tag nach der letzten Fütterung. Im Bereiche eines Gallengangregenerates indifferenten proliferierender Zellen (*ind. Z*). Darunter eine Zelle in mitotischer Teilung (*Mit.*) neben weitgehend ausdifferenzierten Leberzellen (*LZ*) an demselben Gallencanaliculum (*GK*). Die Epithelformation wird beiderseits von Bindegewebszellen (*Bdgw.Z*) begrenzt. Die Leberzellen bilden auf der einen Seite eine Basalmembran (*BM*), auf der anderen grenzen sie mit unregelmäßiger Oberfläche an ein Sinusoid.

Uranylacetat-Blei-Kontrastierung.  $\times 6,270$

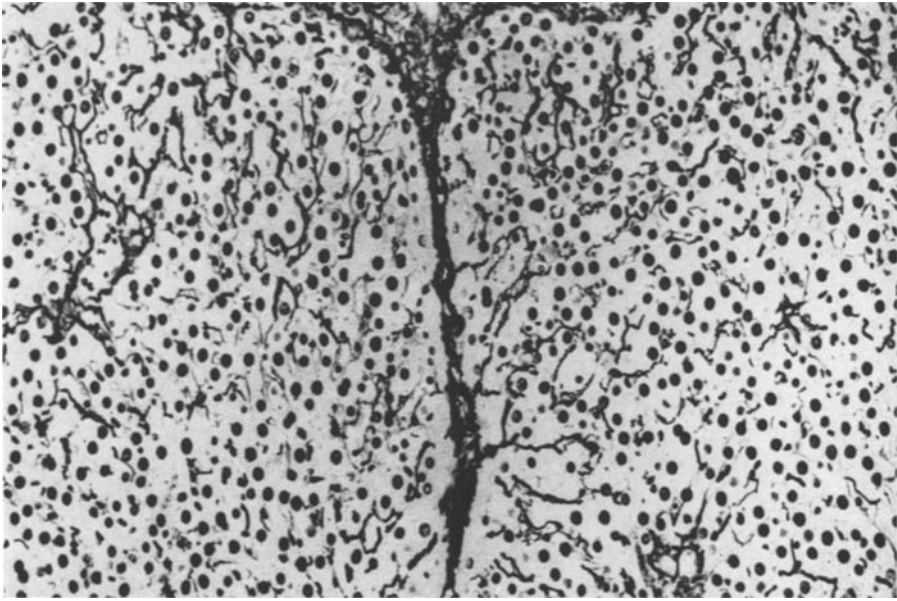


Abb. 4. Rückbildungsfähige Bindegewebssepten, unmittelbar nach der intermittierenden Verabreichung von ANIT entstehend. Gitterfaserfärbung nach Gomori

mehr rückbildungsfähig, vereinen sich und führen zu einem Umbau der Leberstruktur mit vereinzelt Pseudoacini. In diesem Stadium der intermittierenden Intoxikation, das im 6.—8. Versuchsmonat beginnt, zeigt die Leberoberfläche eine feine Granulierung. Ascites ist nicht nachzuweisen.

Die Progredienz der Veränderungen ist an die Fortsetzung der Verabreichung von ANIT gebunden. Zeichen eines eigenständigen Fortschreitens des Prozesses sind innerhalb einer Beobachtungszeit von 2 Monaten nach der letzten Verabreichung der Substanz nicht zu erkennen.

Der Verlauf der Sinusoide erscheint intravitalmikroskopisch nach Ausbildung von Bindegewebsfeldern in ähnlicher Art wie bei Auftreten von herdförmigen Nekrosen geändert (Abb. 1). Bei Behinderung ihres ursprünglichen Verlaufes passen sie sich vorerst ohne erkennbare Behinderung der Strömung den abnormen Gegebenheiten an. Eine verminderte Zahl von Sinusoiden mit reichlicher Blutfüllung führt Blut bis dicht an die Bindegewebsfelder und die benachbarten Leberzellbalken heran. Die Sinusoide sind nach intravitalmikroskopischen Messungen meist erweitert: Mit Schwankungen von 8,4—35,0  $\mu$  ergibt sich ein Durchschnitt der lichten Weite von 13,6  $\mu$  gegenüber 12,3  $\mu$  bei nicht vorbehandelten Ratten. Der Aufbau der Sinusoide innerhalb des erhaltenen Leberparenchyms ist weder histologisch, enzymhistochemisch noch elektronenoptisch erkennbar verändert.

Behinderungen der Blutströmung erkennt man lediglich an kleinen Venen und an Abschnitten der Sinusoide unmittelbar vor Einmündung in die Zentralvenen. Ein wirklicher Strömungsabbruch ist intravital nicht nachzuweisen. Die Strömung selbst ist wegen starker intravasaler Erythrocytenaggregation gut einzuschätzen. An umschriebener Stelle beschleunigte Strömung — durch Zufluß aus selbst

nicht sichtbaren arteriellen Gefäßchen — kommt häufiger als in der normalen Rattenleber vor. In Sinusoiden, in welche offenbar verstärkt arterielles Blut einströmt, kann man auch intermittierenden und pulsierenden Rückfluß von Blut in Richtung der Portalfelder beobachten.

### Besprechung der Ergebnisse

Während die einmalige Verabreichung von ANIT zu reversiblen Erscheinungen wie bei intrahepatischer Cholestase führt (Breitfellner u. Mitarb., 1966; Clodi und Stefenelli, 1967; Desment u. Mitarb., 1968; Eliakim u. Mitarb., 1969; Griffiths u. Mitarb., 1961; McLean und Rees, 1958; Moran u. Mitarb., 1961, 1965; Rüttner u. Mitarb., 1964; Seidlova u. Mitarb., 1967; Spycher und Rüttner, 1964; Stefenelli und Holzner, 1965; Steiner u. Mitarb., 1963; Ungar u. Mitarb., 1962), bewirkt die chronische oder chronisch-intermittierende Gabe der Substanz vor allem proliferative Veränderungen der Gallenwege der Periportalfelder mit einem Umbau der Leberstruktur, der ein ähnliches Bild wie bei der primär biliären Cirrhose ergibt (Cameron u. Mitarb., 1960; Eliakim u. Mitarb., 1959; Goldfarb u. Mitarb., 1963; Griffiths u. Mitarb., 1961; Holzner u. Mitarb., 1969; Lopez und Mazzanti, 1955; Mazzanti und Lopez, 1951, 1952; McLean und Rees, 1958; Seidlova u. Mitarb., 1967; Steiner u. Mitarb., 1963; Ungar u. Mitarb., 1962).

Aus diesen Grundlagen läßt sich bei der Ratte ein experimentelles Modell ableiten, in dem die intermittierende Gabe von ANIT bis zu einem Jahr wiederholt zu herdförmigen Nekrosen und Bindegewebsvermehrung mit Umbau der Leberstruktur führt. Die erzielten Veränderungen der Rattenleber sind denen der biliären Cirrhose des Menschen nicht unmittelbar gleichzusetzen. Sie geben jedoch Hinweise auf mögliche Beziehungen zwischen den einzelnen Arealen der Leber innerhalb und außerhalb des Leberläppchens, die offenbar nicht nur auf einen einzigen Typ der chronischen Leberveränderungen zu beziehen sind. Mit der Progredienz des pathologischen Geschehens verwischen sich auch bei der Lebercirrhose des Menschen manche Unterschiede, die in frühen Stadien je nach Ätiologie und Pathogenese deutlich gegeben sind. Als gemeinsamer Faktor der Pathogenese und des Fortschreitens chronischer Leberveränderungen kommt auch die Störung der Mikrozirkulation in Frage. Solche Überlegungen regten die Durchführung vorliegender Untersuchungen an.

Im Vordergrund der Veränderungen der Leber in der Folge wiederholter ANIT-Gaben steht die Gallengangsproliferation, bei der es sich um eine vergleichbare Reaktion auf verschiedene Noxen handelt (Popper u. Mitarb., 1962). Eine anschließende Faserbildung ist in ihrer Entstehung und in ihrer Rückbildung eng an die Gallengangsproliferation gebunden. Bei der chronisch intermittierenden Verabreichung von ANIT ergeben sich keine Anhaltspunkte dafür, daß einem periduktulären entzündlichen Geschehen eine Bedeutung zukommt. Innerhalb des Lobulus sind keine diffusen und einheitlichen Reaktionen auf die Intoxikation zu erkennen. Akut einsetzende Nekrosen bilden sich innerhalb von 2—3 Tagen zurück. Von den Bindegewebszellen des Disseschen Raumes (Schnack u. Mitarb., 1966) scheint keine wesentliche Bindegewebsneubildung auszugehen.

Bindegewebskeile, deren Spitzen durch Fasern gebildet werden, schieben sich von den Periportalfeldern aus wie durch vorgebildete Spalten in das Leberläpp-

chen ein. Sie gehen dabei mit dem Leberparenchym selbst keine erkennbaren Verbindungen ein. Eine sekundäre Schädigung von Leberzellen ist demnach nur als Folge der gestörten Blutversorgung durch Abdrängen der Sinusoide von den zugehörigen Leberzellbalken vorstellbar. Wegen der großen Anpassungsfähigkeit der Sinusoide (Stefenelli, 1969; Stefenelli und Gericke) und eines gesteigerten arteriellen Zustromes werden solche Behinderungen erst bei weitgehendem Umbau der Leberstruktur wirksam. Während der bei chronisch-intermittierender ANIT-Intoxikation beobachteten Entwicklungsphasen des Leberumbaus ergibt sich kein Anhalt dafür, daß Mikrozirkulationsstörungen für eine selbständige Progredienz des Geschehens verantwortlich sind. Eine relative Abflußbehinderung im Bereiche der Zentralvenen und der Einmündungsabschnitte der Sinusoide ist unabhängig von Störungen der Blutversorgung der Leberzellbalken im Intravitalmikroskop zu erkennen. Sie deutet einen vorwiegend postsinusoidalen Block an, zumindest eine postsinusoidale Strömungsbehinderung betrifft die Gefäßstrecken mit geringstem Widerstand und niedrigem Innendruck und kommt in ähnlicher Art auch bei experimentell von außen auf die Leber ausgeübtem Druck vor (Stefenelli, 1969).

Der Abfluß der Galle ist durch die beschriebenen Veränderungen nicht wesentlich behindert. Klinische Zeichen der Cholestase sind während des ganzen Versuches vorhanden, jedoch nicht besonders stark ausgeprägt. Auch bei einmaliger und niedrig dosierter Gabe von ANIT kommt es zu klinischen Erscheinungen der Cholestase, denen jedoch nach Art der sogenannten intrahepatalen Cholestase Veränderungen an den Canaliculi und nicht an den Gallenkanälchen der Periportalfelder zugrunde liegen (Breitfellner u. Mitarb., 1966; Clodi und Stefenelli, 1967; Stefenelli und Holzner, 1965). Die Canaliculi erscheinen auch bei der chronisch-intermittierenden Intoxikation erweitert, ein wesentlicher Gallenrückstau ist auch in diesem Abschnitt der Gallenwege nicht zu erkennen. Während das Lumen der ursprünglichen Gallengängen verengt oder auch verschlossen ist, haben sich zahlreiche neue kleinere Gallengänge mit normalem Wandaufbau ausgebildet. Letztere ergeben durch ihre gegenüber der Norm vergrößerte Zahl eine Gesamtlichtung, die eher größer als die des ursprünglichen Gallenganges ist. Nicht nur der Aufbau, sondern auch die Funktionen der neugebildeten Gänge haben sich — soweit sie geprüft wurden — als normal erwiesen (Goldfarb u. Mitarb., 1963). In den veränderten Periportalfeldern sind deutlich erweiterte Lymphwege zu erkennen. Die Bedeutung dieses Befundes ist nicht geklärt. Die engen räumlichen Beziehungen dieser Lymphwege zu den Gallengangregeneraten sprechen jedoch dafür, daß sie ein weiterer Hinweis für die Stoffwechselaktivität der neu gebildeten Gallengänge sind.

Ein wesentlicher Befund der angeführten Untersuchungen ist die Reversibilität der Leberveränderungen in den frühen Stadien der Intoxikation, die auch bei kontinuierlicher Gabe von ANIT und Unterbrechung dieser festgestellt worden war (Cameron u. Mitarb., 1960), sowie die fehlende Progredienz in den späten Stadien. Diese Feststellung zeigt einen wesentlichen Unterschied zwischen dem Umbau der Rattenleber bei ANIT-Intoxikation und dem der menschlichen Leber bei Cirrhose an. Sekundäre Störungen der Mikrozirkulation im Verlaufe der Veränderungen der Rattenleber sind auch nicht so ausgeprägt, daß sie als Ursache einer Progredienz des Geschehens in Frage kämen.



## Literatur

- Breitfellner, G., Holzner, J.H., Schumacher, A., Stefenelli, N.: Die elektronenoptischen und die nach enzymhistochemischer Darstellung der ATPase erkennbaren Veränderungen der Rattenleber bei experimenteller intrahepatischer Cholestase. *Beitr. path. Anat.* **134**, 267 (1966).
- Cameron, G.R., McLean, M.R., M. Prasad, L.B.: Recovery from the bile-duct hyperplasia induced by feeding alpha-naphthyl-isothiocyanate to rats. *J. Path. Bact.* **80**, 137 (1960).
- Clodi, P.H., Stefenelli, N.: Gallenfluß, Gallendruck und Bromsulphophthaleinausscheidung bei der experimentellen intrahepatischen Cholestase der Ratte. *Z. ges. exp. Med.* **142**, 1 (1967).
- Desmet, V.I., Krstulović, B., Damme, B. van: Histochemical study of rat liver in alpha-naphthyl-isothiocyanate (ANIT) induced cholestasis. *Amer. J. Path.* **52**, 401 (1968).
- Eliakim, M., Eisner, M., Ungar, H.: Experimental intrahepatic obstructive jaundice following ingestion of alpha-naphthyl-isothiocyanate. *Bull. Res. Coun. Israel E* **8**, 7 (1959).
- Goldfarb, S., Singer, E.J., Popper, H.: Biliary ductules and bile secretion. *J. Lab. clin. Med.* **62**, 608 (1963).
- Gomori, G.: *Microscopic histochemistry*. Chicago: Univ. Press 1952.
- Griffiths, D.B., Rees, K.R., Sinha, K.P.: Blood and bile composition in experimental biliary cirrhosis. *J. Path. Bact.* **82**, 109 (1961).
- Holzner, J.H.: Fermenthistochemische Untersuchungen an Leberbiopsien. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **44**, 233 (1960).
- Pointner, H., Stefenelli, N., Stockinger, L.: Pathogenetische Faktoren der Bindegewebsneubildung in der Rattenleber bei intermittierender Intoxikation mit Alpha-naphthyl-isothiocyanat (ANIT). 8. Internat. Kongr. Gastroenterologie, Prag 1968.
- Stefenelli, N., Wewalka, F.: Die Bedeutung enzymhistochemischer Methoden für die Unterscheidung verschiedener Formen der Cholestase, Band III, S. 208. II. Weltkongr. Gastroenterologie, München 1962.
- Lopez, M., Mazzanti, L.: Experimental investigations on alpha-naphthyl-isothiocyanate as a hyperplastic agent of the biliary ducts in the rat. *J. Path. Bact.* **69**, 243 (1955).
- Mazzanti, L., Lopez, M.: In tema die epatopatie sperimentali: Sui rapporti tra lesione epiteliale e proliferazione mesenchimale nelle fibrosi da alfa-naftil-isotiocianato. *Arch. De Vecchi Anat. path.* **17**, 825 (1951/52).
- McLean, M.R., Rees, K.R.: Hyperplasia of bile-ducts induced by alpha-naphthyl-isothiocyanate: Experimental biliary cirrhosis free from biliary obstruction. *J. Path. Bact.* **76**, 175 (1958).
- Moran, E., Eliakim, M., Suchowolski, A., Ungar, H.: Serum vitamin B 12 and glutaminic-oxalacetic transaminase in experimental intrahepatic obstructive jaundice. *Gastroenterology* **40**, 408 (1961).
- Ungar, H.: The effect of cortisone on cholangitis induced by naphthyl-isothiocyanate in rats. *Gastroenterology* **48**, 773 (1965).
- Popper, H., Schaffner, F., Barka, T.: Has proliferation of bile ductules clinical significance? *Acta hepato-splenol. (Stuttg.)* **9**, 129 (1962).
- Roberts, R.J., Plaa, G.L.: The effect of bile duct ligation, bile duct cannulation and hypothermia on alpha-naphthyl-isothiocyanate-induced hyperbilirubinemia and cholestasis in rats. *Gastroenterology* **50**, 768 (1966).
- Rüttner, J.R., Spycher, M.A., Kuenzle, C.: Der ANIT-induzierte Ikterus der Ratte, ein Modell einer durch Zellmembranschädigung bedingten toxischen Hepatose. *Path. et Microbiol. (Basel)* **27**, 403 (1964).
- Schnack, H., Stockinger, L., Wewalka, F.: Die Bindegewebszellen des Disseschen Raumes in der menschlichen Leber bei Normalfällen und pathologischen Zuständen. *Wien. klin. Wschr.* **78**, 715 (1966).
- Seidlová, V., Dušek, J., Pelikán, V., Vavrková, H., Kalab, M., Šefová, Z.: Enzymologische und histologische Veränderungen bei experimenteller Cholestase. *Dtsch. Z. Verdau.- u. Stoffwechselk.* **27**, 83 (1967).
- Spycher, M.A., Rüttner, J.R.: Zur Pathologie des Ikterus, elektronenoptische Untersuchungen über die Frühveränderungen der Leberparenchymzellen beim alpha-naphthyl-isothiocyanat induzierten Ikterus der Ratte. *Path. et Microbiol. (Basel)* **27**, 387 (1964).

- Stefenelli, N.: Beobachtungen an der terminalen Strombahn der Leber. Wien: Verl. Brüder Hollinek 1969.
- Gericke, A.: Microcirculation and necrosis in rat liver. Im Druck.
- Holzner, J.H.: Experimentelle Cholestase der Ratte durch einmalige Gabe von Alpha-Naphthyl-iso-thiocyanat (ANIT). Histologisch und enzymhistochemisch erfaßbare Veränderungen der Leber. Z. exp. Med. **139**, 762 (1965).
- Steiner, J.W., Phillips, M.J., Baglio, G.M.: Electron microscopy of the excretory pathways in the liver in alpha-naphthyl-isothiocyanate intoxication. Amer. J. Path. **43**, 677 (1963).
- Ungar, H., Moran, E., Eisner, M., Eliakim, M.: Rat intrahepatic biliary tract lesions from alpha-naphthyl-isothiocyanate. Arch. Path. **73**, 427 (1962).
- Wachstein, M., Meisel, E.: Histochemistry of hepatic phosphatases at physiologic pH. Amer. J. clin. Path. **27**, 13 (1957).

Prim. Doz. Dr. N. Stefenelli  
Interne Abteilung, Krankenhaus  
A-3500 Krems, Österreich

Prof. Dr. J. H. Holzner  
Pathologisches Institut der Universität  
A-1090 Wien, Österreich