

Parakristalline, intracytoplasmatische Einschlußkörper in menschlichem Leberparenchym

Eine strukturanalytische Studie

Hedi Nemetschek-Gansler und Th. Nemetschek
(Unter Mitarbeit von Ch. Greiner* und R. Bowitz **)

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie (Prof. Dr. W. Doerr)
der Universität Heidelberg, Abt. für Ultrastrukturforschung

Eingegangen am 13. August 1975

Paracrystalline, Intraplasmatic Inclusion Bodies in Human Hepatocytes

A Structural Analytic Study

Summary. Electron micrographs from intraplastic inclusion bodies of human hepatocytes are described; these paracrystalline aggregations consist of helically arranged filaments. All the observed periodic structures within these bodies can be indicated as originating from the same compound by the use of the Frauenhofer diffraction pattern. Concerning the genesis of these characteristically structured bodies two possibilities are discussed: 1. A special polymeric form of fibrinogen and fibrin built up *in vivo*. 2. Polymerization of a monomeric enzyme, for example, glutamate dehydrogenase, to paracrystalline bodies by fixation-dependent cross-linkages.

Key words: Human Hepatocytes — Paracrystals — Frauenhofer Pattern — Fibrinogen-Fibrin — L-Glutamat dehydrogenase.

Zusammenfassung. In menschlichen Hepatocyten wurden elektronenmikroskopisch intracytoplasmatische Einschlußkörper verschiedenen Aussehens beobachtet, die parakristalline Aggregate aus schraubenartig gewundenen Filamenten darstellen. Mit Hilfe der Frauenhofer-schen Beugung konnten diese als eine einheitliche Stoffkomponente identifiziert werden. Aufgrund ihrer strukturellen Merkmale werden für ihre Art und Entstehung zwei Mechanismen zur Diskussion gestellt: 1. Die *in situ* Bildung einer besonderen Polymerform von Fibrinogen oder Fibrin. 2. Eine fixierungsbedingte Vernetzungspolymerisation eines monomeren Enzyms, z.B. Glutamat-Dehydrogenase, zu parakristallinen Gebilden.

Parakristalline, d.h. dem kristallinen Ordnungszustand nahestehende Einschlußkörper in auffällig vergrößerten Mitochondrien menschlicher Hepatocyten sind keine Seltenheit und wurden sowohl im Leberparenchym gesunder als auch kranker Probanden sehr oft beobachtet. Eindeutige Beziehungen zwischen dem Auftreten dieser intramitochondrialen Einschlüsse und bestimmten klinischen und pathologischen Befunden bestehen somit nicht (Themann und v. Bassewitz, 1969). Eine weitere Eigentümlichkeit dieser inzwischen elektronenmikroskopisch und auch strukturanalytisch gründlich untersuchten Einschlußkörper (Sternlieb und Berger, 1969) besteht darin, daß noch keine Aussagen über Art und Entstehungsmechanismus gemacht werden können.

* Teilweise aus Dissertation Ch. Greiner, Heidelberg 1970.

** Frau B. Moraw danken wir für photographische Arbeiten.

Über das Vorliegen parakristalliner Einschlußkörper im Cytoplasma menschlicher Hepatocyten liegen, soweit aus der Literatur ersichtlich, keine Angaben vor. Im folgenden soll deshalb über eine solche erste Beobachtung berichtet werden, die an einem Leberpunktat von insgesamt 82 Leberbiopsien erhoben werden konnte¹.

Material und Methode

Das Lebergewebe stammt von einem 67jährigen Patienten mit chronischer intrahepatischer Cholangitis und Pericholangitis und wurde durch Blindpunktion gewonnen. Der in Tyrodelösung entnommene Zylinder wurde sofort in mit Phosphatpuffer auf pH 7,2 eingestellter 4%iger Glutaraldehydlösung, die mit Glukoselösung isoosmotisch gemacht war, eine Stunde bei Zimmertemperatur fixiert. Nach Waschen in isoosmotisch eingestelltem Phosphatpuffer pH 7,2 erfolgte Nachfixierung mit entsprechend eingestellter 1%iger OsO₄-Lösung bei +4° C. Nach Entwässerung über aufsteigende Alkoholreihe und Propylenoxid, Einbettung in Epoxiharz. Anfertigung der Semi- und Ultradünnschnitte mit einem Porter-Blum-Ultramikrotom MT II. Nachkontrastierung der Schnitte mit UO₂²⁺- und Bleihydroxo-Ionen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen mit dem Siemens Elmiskop Ia bei 21000 und 41000facher Primärvergrößerung.

Anfertigung der Frauenhoferschen Beugungsaufnahmen (Klug und Berger, 1964) an Filmabzügen von Elmi-Platten (Vergrößerung 21000:1) mit Hilfe des optischen Diffraktometers der Firma LWU-Kontron GmbH Eching bei München unter Verwendung eines He/Ne-Lasers. Bis auf den eckigen Bildausschnitt in Abb. 4a wurden alle anderen Bildbereiche rund ausgeblendet. Der Maschinenfaktor betrug 2,25 und der reziproke Wert bei 21000facher Vergrößerung 1.071 Å⁻¹. Zur Rücktransformation wurden Masken von den Hauptmaxima angefertigt².

Befunde und Diskussion

Lichtmikroskopisch sind an mit Toluidinblau gefärbten Semidünnschnitten sowohl im Zentrum als auch in der Peripherie der Leberbälkchen zwei verschiedene Formen von Hepatocyten (Abb. 1) zu erkennen:

- a) Intensiv blau-gefärbte Zellen mit Lipidtropfen in unterschiedlicher Größe und Menge sowie zahlreichen Gallepigment-Lysosomen;
- b) Zellen mit relativ hellem Cytoplasma und leicht meta-chromatischer Tönung.

RES und Periportalfeld sind normal.

Elektronenmikroskopisch zeichnen sich lichtopt. blau gefärbte Zellen durch größere Areale parallel angeordneter Ergastoplasmalamellen (rauhes endoplasmatisches Retikulum) aus, während die hellen Zellen durch größere Glykogenansammlungen auffallen. Riesenmitochondrien fehlten ebenso wie parakristalline Einlagerungen in diesen. Nur gelegentlich waren in normal großen Mitochondrien lamelläre Einschlüsse angedeutet.

Vielmehr findet man bei Durchmusterung der Schnitte bei ~20000facher Vergrößerung in zahlreichen Hepatocyten intracytoplasmatisch gelegene parakristalline Einschlüsse unterschiedlicher Form und Größe. So ist in Abb. 2 ein ovoider Einschlußkörper wiedergegeben mit einer Flächenausdehnung von ca.

1 Unter 230 von Themann *et al.* (1969) untersuchten menschlichen Leberpunktaten wurden keine vergleichbaren intracytoplasmatischen Einschlußkörper beobachtet (persönliche Mitteilung).

2 Für die Anfertigung der Beugungsdiagramme danken wir den Herren Dr. R. Schmitt, Erlangen und K. Wehner, Eching bei München.

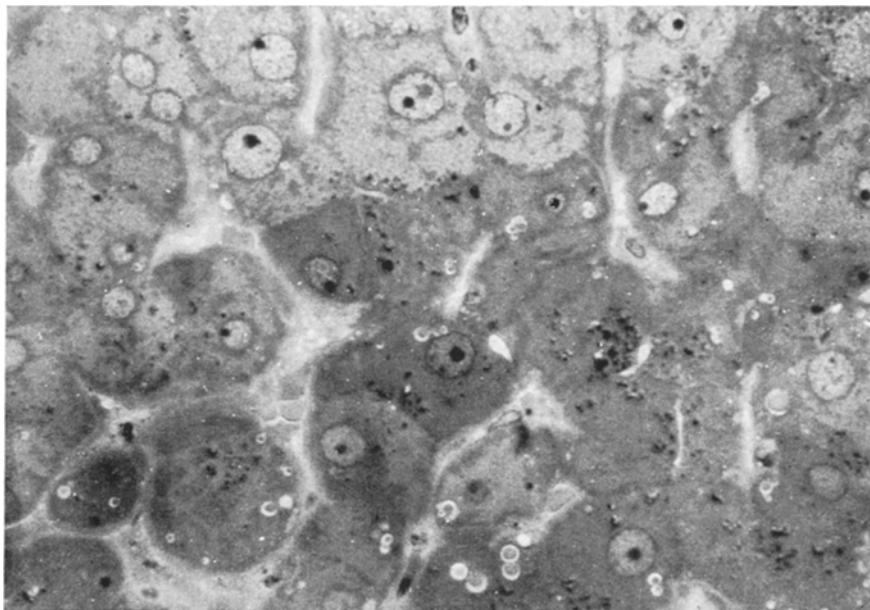


Abb. 1. Ausschnitt aus der Läppchenperipherie des Punktatzyinders: Den „hellen“ Hepatozyten im oberen, mittleren Bildteil entsprechen elektronenmikroskopisch glykogenreiche Zellen; daneben intensiv blau-gefärbte Zellen (Toluidinblau) mit zahlreichen Gallepigment-Lysosomen an den Gallepolen; elektronenmikroskopisch findet man in diesen Zellen reichlich Ergastoplasm. Semidünner Epon-Schnitt 500:1; (36/75)

$1,8 \times 4 \mu$ und einer periodischen Struktur quer zur Längsachse des Körpers. Man könnte aber auch meinen, daß die laterale Struktur bedingt ist durch in dieser Richtung verlaufende Filamente. Bei höherer Auflösung und anhand der Frauenhoferschen Beugung (Abb. 3) ergibt sich jedoch eindeutig, daß dieser ovoide Einschluß aus $\sim 45 \text{ \AA}$ dicken längsverlaufenden (s. Pfeilanzeige), schraubenartig gewundenen Filamenten mit einem lateralen Abstand von $\sim 170 \text{ \AA}$ besteht.

In Abhängigkeit der jeweiligen Schnittebenen findet man ähnlich geformte Einschlußkörper, jedoch, wie zu erwarten, auch mit anders aussehenden parakristallinen Mustern. Das Streifenmuster in Abb. 3 ist also das Ergebnis parallel zueinander angeordneter schraubenartig gewundener Filamente (s. Pfeil), die mit ihren Windungen in Register stehen. Die auf diese Weise entstandene Streifung scheint auf den ersten Blick keine Periodizität aufzuweisen. Jedoch läßt das rücktransformierte Bild in Abb. 3c deutlich eine periodisch wiederkehrende Streifung im Abstand von $\sim 260 \text{ \AA}$ erkennen.

Neben solchen großflächigen Einschlußkörpern findet man relativ oft auch kleinere stäbchen- oder bandartige Anordnungen, wie z.B. in Abb. 4 (s. auch Abb. 3d) wiedergegeben, die — offenbar infolge einer schräg zu der in Abb. 2 und 3 getroffenen Filamentenschicht verlaufenden Schnittebene — eine periodisch wiederkehrende Überstruktur deutlicher hervortreten lassen. Entsprechend führt auch die Rücktransformation aus der Frauenhoferschen Beugung zu einer Axialperiode im Abstand von $\sim 270 \text{ \AA}$ (Abb. 4c). Der laterale Zwischenraum beträgt

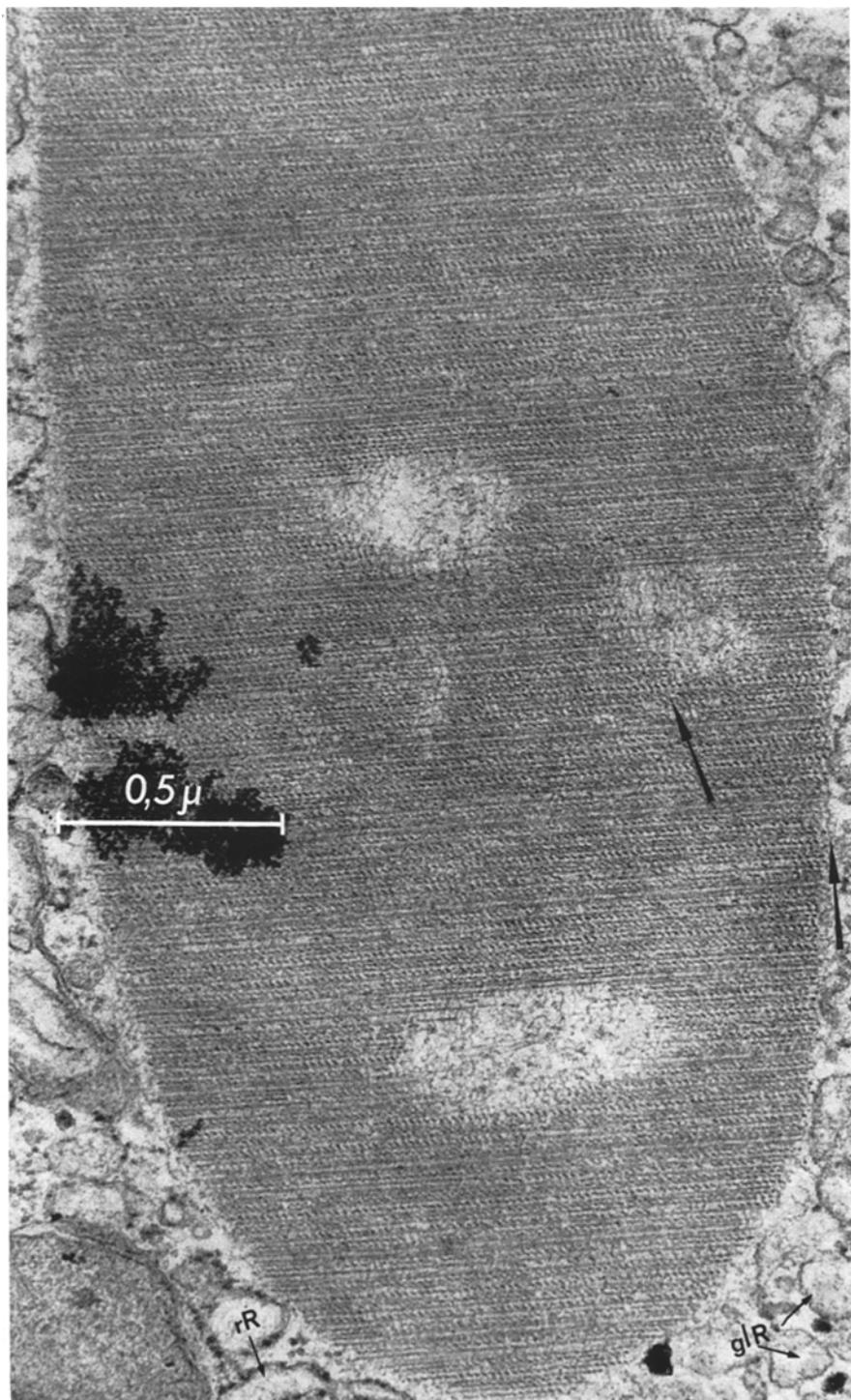


Abb. 2. Übersichtsbild eines parakristallinen Einschlusßkörpers in menschlichem Hepatocyt. Schraubenartig gewundene, ~ 45 Å dicke Filamente (s. Pfeile), die infolge synchroner Lateral-ausrichtung ein Streifenmuster ergeben. Cysternenartige Erweiterungen von rauhem (rR) und glattem (g/R) endoplasmatischem Retikulum. 2908/68; el. opt. 21000:1

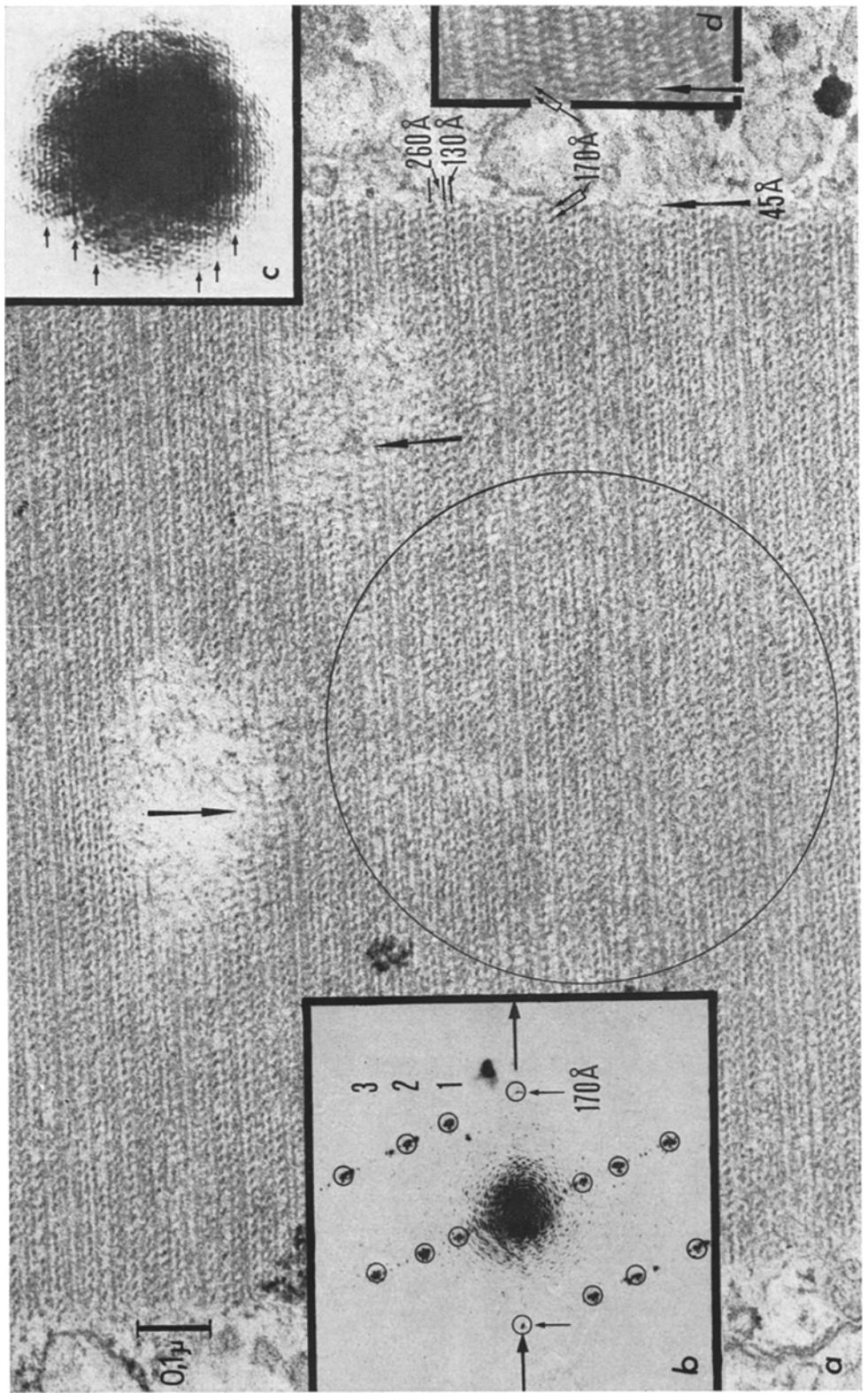


Abb. 3. (a) Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 2 mit dazugehöriger Frauenhofenscher Beugung an dem kreisförmig ausgeblendeten Bereich. (b) Die äquatorialen Beugungspunkte bei 170 Å geben den lateralen Abstand an zwischen in einem Winkel von 24° schräg zum Äquator verlaufenden schraubenartig gewundenen Filamenten. (c) Rücktransformiertes Bild aus den als Schablonen verwandten eingeckten Beugungspunkten; man beachte das deutliche Hervortreten einer Überperiode. (d) Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4 mit gewundenen verlaufenden parallel angeordneten Filamenten. Die Beugungspunkte liegen bei:
 1) 260, 2) 162, 3) 102 Å

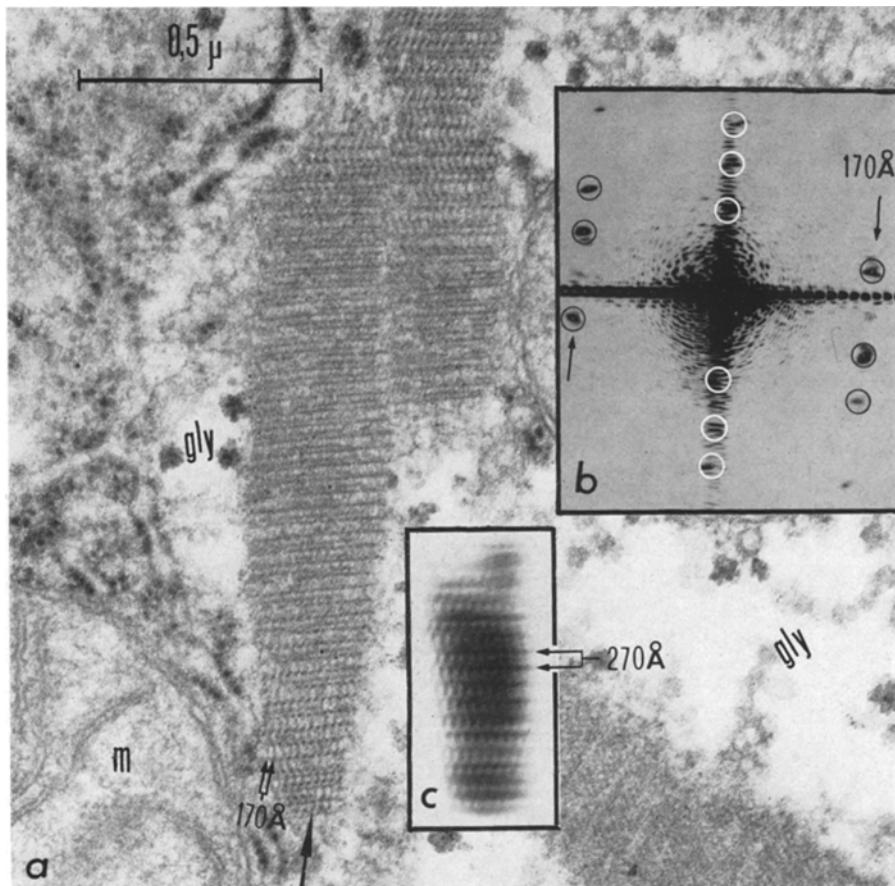


Abb. 4a u. b. Kleine stäbchen- bis bandförmige parakristalline Einschlüsse im Cytoplasma eines Hepatocyten mit reichlich Glykogen (gly). Man beachte die schraubenartig gewundenen Filamente, die bei der Parallelaggregation ein deutliches Streifenmuster hervorrufen, das entsprechend auch im rücktransformierten Abbild in (c) hervortritt; (b) das dazugehörige Frauenhofersche Beugungsbild mit den zur Rücktransformation verwandten Reflexen.
5063/68; 21 000:1

auch hier wie in Abb. 3 $\sim 170 \text{ \AA}$. Eine erste Analyse dieser Befunde würde somit wegen der axialen Periodizität einen Vergleich dieser parakristallinen Körper mit Fibrin nahelegen. Allerdings findet man nur *in vitro* und auch da nur unter besonderen Bedingungen (Tonney und Cohen, 1972) vergleichbar regelmäßig aufgebaute Polymerformen von Fibrinogen und Fibrin. Somit spricht gerade das auffällige Hervortreten filamentärer Einheiten gegen obigen Deutungsversuch, insbesondere auch da in vivo Fibrin oftmals wegen eines schlechten Ordnungszustandes nur mit Mühe und stets lediglich gestützt auf eine mehr oder weniger deutliche Querstreifung, identifiziert werden kann.

Diese Bedenken können andererseits auch entkräftet werden, da, wie aus Abb. 5a und c hervorgeht, infolge einer offenbar kompakteren Aggregatform nunmehr

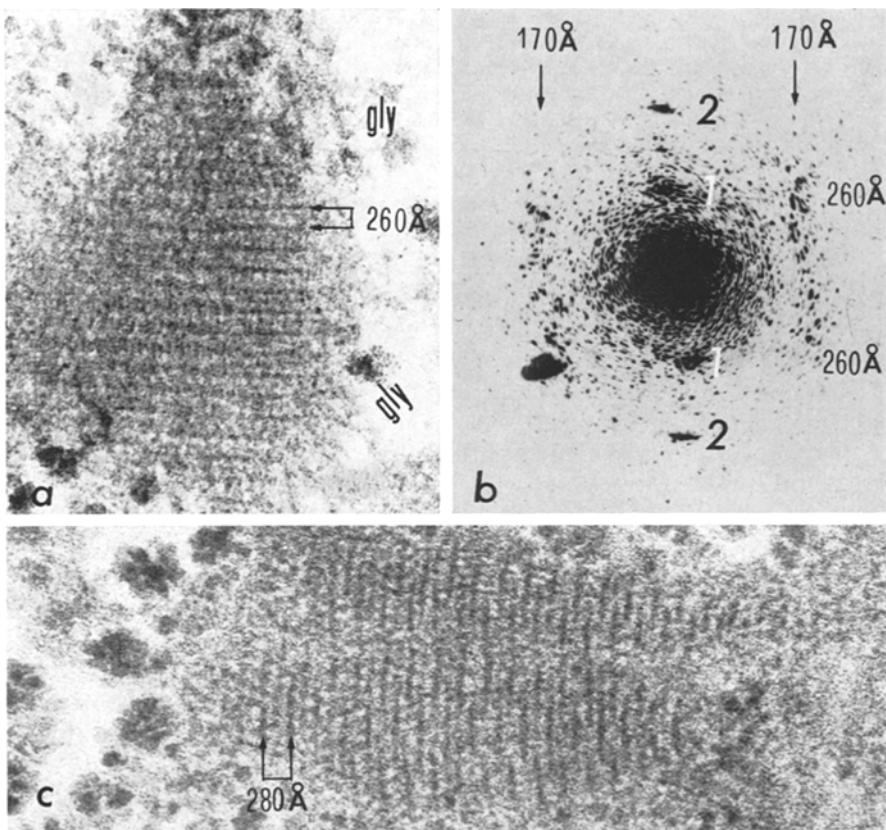


Abb. 5. (a) Parakristalliner Einschluß mit Identitätsperiode von 260 Å und einem Mittelstreifen bei 130 Å. (b) Dazugehöriges Frauenhofersches Beugungsbild mit meridionalen Reflexen bei 260 Å und 130 Å, sowie am Äquator mit Beugungspunkten bei 170 Å entsprechend dem mittleren Abstand parallel verlaufender Filamente. (c) Dicht von Glykogen umgebener Einschlußkörper mit 280 Å Periode. 4339/68 und 1866/75 el. opt. 21000:1

keine schraubenartig gewundenen Filamente zu sehen sind, wiewohl diese mit Hilfe der Frauenhoferschen Beugung (Abb. 5b) durch den mittleren Lateralabstand von 170 Å dennoch angezeigt sind. Trotz aller Vorbehalte stellt somit die in Abb. 5a und c wiedergegebene Aggregatform des Einschlußkörpers ein plausibles Bindeglied zwischen diesen parakristallinen Gebilden und den Polymerformen von Fibrinogen und Fibrin dar.

Für das Vorkommen von Fibrin in Lebergewebe gibt es bereits einige Beispiele. So beschreibt z.B. Hübner (1965) bei mit Allylalkohol vergifteten Ratten Vakuolen im Lebergewebe, die neben anderen Blutbestandteilen auch bandartige Gebilde enthalten, die aufgrund einer axialen Periodizität von 250 Å als Fibrin angesehen werden. In vergleichbaren Vakuolen im Lebergewebe von mit Phalloidin vergifteten Mäusen und Ratten fanden Miller *et al.* (1967, 1970) gleichfalls bandförmige Anteile, die ebenso allein aufgrund einer axialen Periodizität von ~210 Å als Fibrin identifiziert wurden. Das Vorkommen dieser Ablagerungen wurde auf eine sekundäre Verbindung dieser Vakuolen mit der Blutbahn zurückgeführt, ohne daß allerdings eine solche Verbindungsstelle elektronenmikroskopisch hätte nachgewiesen werden können.

In ähnlicher Weise interpretieren schließlich David *et al.* (1965) das Vorkommen von Fibrin in vakuolisiertem Lebergewebe nach Drosselung des venösen Abflusses. Parry und Ghadially (1967) berichten schließlich über das Vorkommen von Fibrin im Cytoplasma von Hepatocyten nach Teilhepatektomie und nehmen hingegen eine *in situ* Bildung an. Im Sinne einer *in situ* Bildung der hier besprochenen mutmaßlichen Fibrinogen-Fibrin-Polymeren ließe sich der elektrophoretisch erbrachte Fibrinogen-Nachweis in Leberzellkulturen anführen (Crane *et al.*, 1974).

Der Vorzug einer strukturanalytischen Untermauerung elektronenmikroskopischer Befunde durch Anwendung der Frauenhoferschen Beugung besteht somit darin, parakristalline Aggregate auf etwaige strukturelle Gemeinsamkeiten prüfen zu können. Periodisch wiederkehrende Merkmale sind dabei von besonderem Nutzen und wie im vorliegenden Fall geeignet, die stoffliche Übereinstimmung der Einschlußkörper sicherzustellen. Weiterhin besteht, wie gezeigt werden konnte, die Möglichkeit, charakteristische Strukturmerkmale, wie z.B. die 260 Å-Axialperiode als einen artspezifischen „Fingerabdruck“ anzusehen, worauf schließlich der Deutungsversuch in Richtung einer besonderen Polymerform von Fibrinogen oder Fibrin beruht. Der histologische Befund einer intrahepatischen Cholangitis läßt die Vermutung einer bestehenden Gerinnungsstörung zu; allerdings wurde im klinischen Labor nur der Quick-Test durchgeführt, dessen Werte noch innerhalb der Norm waren.

Eine andere Deutungsmöglichkeit für das Zustandekommen dieser bislang unbekannten und allem Anschein nach auch *seltenen* parakristallinen Ablagerungen ergibt sich, trotz des Vorbehaltes, der bei einer überwiegend morphologisch ausgerichteten Studie angezeigt ist, unter Zugrundelegung folgenden Ablaufes:

Durch die Fixierung mit Glutaraldehyd eingeleitete Vernetzungsreaktionen zwischen monomeren Komponenten führen zu Linearpolymeren, die unter dem Einfluß ausrichtender zwischenmolekularer Kräfte parakristallin aggregieren. Auf diese Weise könnten innerhalb der üblichen Fixierungszeiten Aggregate der beobachteten Abmessungen entstanden sein, die jedoch stets größer sind als z.B. normalerweise vorkommende Enzymassoziationen. Dieser Mechanismus könnte nicht nur das Vorkommen der intracytoplasmatischen Einschlußkörper, sondern nahe liegenderweise auch das Zustandekommen der intramitochondrialen parakristallinen Gebilde verständlich machen³. Es wäre demnach denkbar, daß Einschlüsse dieser Art fixierungsbedingte Vernetzungspolymeren darstellen, als Hinweis auf besonders hohe oder sogar pathologische Stoffkonzentrationen am Ort ihres Nachweises. Im Sinne dieses Deutungsversuches spricht der von Munn (1972) experimentell erbrachte Beweis einer von der Art des einwirkenden Mediums abhängigen Polymerisation der Glutamat-Dehydrogenase aus Ochsenlebern. Und zwar konnte elektronenmikroskopisch gezeigt werden, daß unter dem Einfluß von auf pH 7,1 eingestellter Phosphorwolframsäure globuläre Einheiten des Enzyms vorliegen, hingegen nach Glutaraldehyd oder/und Ammoniummolybdat pH 6,9 Einwirkung u.a. auch bandartig aggregierte Linearpolymere mit einer lateralen Periodizität von 115 Å anfallen. Vom gleichen Autor stammt auch die Feststellung, daß unter ähnlichen Bedingungen in den Mitochondrien von Ochsenlebern keine Polymerformen des Enzyms zu beobachten waren, wiewohl die dort vorhandene

³ Die von Ekholm und Edlind 1958 erstmals beschriebenen intramitochondrialen Einschlußkörper sind zwar an damals üblichen OsO₄ fixiertem Material beobachtet worden, auch hier könnte es sich jedoch um Vernetzungsprodukte gehandelt haben.

Enzymkonzentration der unter experimentellen Bedingungen gleichkam. Hierfür fehlt zunächst ebenso wie für das alleinige Vorkommen parakristalliner Einschlüsse in den Mitochondrien menschlicher Hepatocyten eine plausible Erklärung.

Da im vorliegenden Fall Laborwerte über den Serum-Gehalt an Glutamat-Dehydrogenase fehlen, kann der naheliegenden Frage, ob es sich bei den beobachteten Einschlußkörpern um eine Polymerform dieses Enzyms handelt, nicht nachgegangen werden. Die unterschiedlichen Axialperioden wären freilich kein Hindernisgrund, einen solchen Deutungsversuch zu unternehmen. Der Versuch, parakristalline Ablagerungen mit Enzymassoziationen in Zusammenhang zu bringen, ist keineswegs neu und wurde z.B. an den intramitochondrialen Einschlußkörpern von Themann *et al.* (1969) bereits unternommen.

Literatur

- Crane, L. J., Miller, D. L.: Synthesis and secretion of fibrinogen by isolated rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* **63**, 73a (1974)
- David, H., Hecht, A., Uerlings, I.: Elektronenmikroskopische Befunde an der experimentellen Stauungsleber. *Acta biol. med. germ.* **15**, 513 (1965)
- Ekholm, R., Edlind, Y.: The mitochondria in human normal and cholestatic liver. In: IV. Internat. Kongress f. Elektr. Mikr. Berlin, 1958, **2**, 273–275. Herausg. W. Bargmann *et al.* Springer: Berlin-Göttingen-Heidelberg 1960
- Heimburger, N., Trobisch, H.: Blutgerinnung und Fibrinolyse. *Angew. Chem.* **83**, 89–120 (1971)
- Hübner, G.: Zur Genese der großen, cytoplasmatischen Einschlußvakuolen. *Naturwissenschaften* **52**, 136 (1965)
- Klug, A., Berger, J. E.: An optical method for the analysis of periodicites in electron micrographs, and some observation on the mechanism of negative staining. *J. Mol. Biol.* **10**, 565–569 (1964)
- Miller, F., Palade, G. E.: Lytic activities in renal protein absorption droplets. *J. Cell Biol.* **23**, 519–552 (1964)
- Miller, F., Wieland, O.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Leber von Maus und Ratte bei akuter Phalloidin-Vergiftung. *Virch. Arch. path. Anat.* **343**, 83–99 (1967)
- Munn, E. A.: Structure of oligomeric and polymeric forms of ox liver glutamat dehydrogenase examined by electron microscopy. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **285**, 301–313 (1972)
- Parry, E. W., Ghadially, F. N.: Fibrin in hepatocytes. *Naturwissenschaften* **54**, 541 (1967)
- Siess, E., Wieland, O., Miller, F.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Phalloidintoleranz neugeborener Ratten, Mäuse und Kaninchen. *Virch. Arch. Abt. B* **6**, 151–165 (1970)
- Sternlieb, I., Berger, J. E.: Optical diffraction studies of cristalline structures in electron micrographs. *J. Cell Biol.* **43**, 448–455 (1969)
- Themann, H., v. Bassewitz, D. B.: Parakristalline Einschlußkörper der Mitochondrien des menschlichen Leberparenchyms. *Cytobiol.* **1**, 135–151 (1969)
- Tooney, N. M., Cohen, C.: Microcristals of a modified fibrinogen. *Nature (Lond.)* **237**, 23–25 (1972)

Professor Dr. Th. Nemetschek
Pathologisches Institut der Universität
D-6900 Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 220–221
Bundesrepublik Deutschland