

zu erwarten ist und wie am Beispiel der Thyroxinwirkung gezeigt wurde<sup>1</sup>, der erhöhten Gewebeatmung auch ein erhöhter Cytochrom-c-Gehalt.

Es erhebt sich die Frage, ob auch die ernährungsbedingte Fettleber vermehrtes Cytochrom c aufweist und wie weit überhaupt die Atmungsfermente der Leberzelle von der Ernährung abhängig sind (vgl. auch die Arbeiten von AXELROD et al.<sup>2</sup>).

A. PRADER

Medizinische Poliklinik Lausanne, den 26. Juli 1947.

#### Summary

The fatty liver in phosphorus poisoning of rabbits shows a marked increase of cytochrome c.

<sup>1</sup> A. TISSIÈRES, Archives int. Phys. 54, 305 (1946).

<sup>2</sup> A. E. AXELROD, K. F. SWINGLE und C. A. ELVEHJEM, J. biol. Chem. 145, 297 (1942).

### Experimentelle Übertragungsversuche von Darmausscheidungen leberdystrophie- und hepatitis-epidemia-kranker Menschen auf Wellensittiche (*Melopsittacus undulatus*)<sup>1</sup>

FINDLAY und WILLCOX<sup>2</sup>, FINDLAY und MARTIN<sup>3</sup>, NEEFE und STOKES<sup>4</sup>, dann HAVENS<sup>5</sup> und seine Mitarbeiter, DORLAND und DAVIES, SAWYER und Mitarbeiter<sup>6</sup> u. a. haben an Menschen Hepatitis-Übertragungsversuche durchgeführt. Entweder wurde mit Nasen/Rachen-Spülwasser oder mit Duodenalsaft, auch mit Harn/Stuhl-Extrakten und mit Serum peroral oder parenteral versucht, eine Infektion zu erzeugen. Alle diese Experimente fielen mehr oder weniger positiv aus, zum mindesten konnten hepatitisähnliche Erkrankungen beobachtet werden.

Experimentell die Übertragbarkeit bei den Laboratoriumstieren zu beweisen, war nicht möglich. ENGEL<sup>7</sup> berichtet, daß es einzig ANDERSEN gelang, durch Verfütterung von Duodenalsaft hepatitiskranker Menschen bei Schweinen einen Ikterus zu erzeugen. Das gleiche hat er auch durch intravenöse Blutübertragung von Ikteruskranken erreicht.

Durch eine bestimmte Diät soll bei Ratten eine Leberdystrophie erzeugt werden können. Wie POPPER<sup>8</sup> berichtet,

<sup>1</sup> Diese Arbeit wurde durch Gewährleistung eines Stipendiums der Roche-Studien-Stiftung (Basel) ermöglicht.

<sup>2</sup> G. M. FINDLAY und R. R. WILLCOX, Lancet 1, 212 (1945).

<sup>3</sup> G. M. FINDLAY und N. H. MARTIN, Lancet 244, 678 (1943).

<sup>4</sup> J. R. NEEFE, J. STOKES und S. S. GELLIS, Am. J. med. Sci. 210, 561 (1945).

<sup>5</sup> W. P. HAVENS u. a., Lancet 248, 202 (1945).

<sup>6</sup> W. A. SAWYER und Mitarbeiter, Am. J. Hyg. 39, 332; 40, 35 (1944).

<sup>7</sup> M. ENGEL, Praxis 5, 53 (1942).

<sup>8</sup> H. POPPER, Z. klin. Med. 131, 160 (1937).

ist es gelungen, durch Verfütterung von Allylformiat ein dem Icterus catarrhalis bzw. der akuten Leberdystrophie verwandtes Krankheitsbild hervorzurufen.

Als wir im Herbst 1946 eine größere und sehr schwere Epidemie von Hepatitis und Leberdystrophie im pathologisch-anatomischen Institut der Universität Basel beobachten konnten und dieses Material systematisch untersucht haben (WERTHEMANN und BODOKY<sup>1</sup>), erhielten wir von einem Tierarzt einen Mönchssittich (*Myopsittacus monachus*) zur Untersuchung. Die pathologisch-anatomische Untersuchung dieses Tieres ergab, daß eine Leberdystrophie vorgelegen hatte, die mit dem Bild der menschlichen Leberdystrophie weitgehend übereinstimmte (Abb. 1). Dieser Zufallsbefund brachte uns auf den Gedanken, zu versuchen, diese Leberleiden experimentell auf Sittiche zu übertragen.

Nach verschiedenen Methoden wurde versucht, eine Übertragung des infektiösen Stoffes auf diese Vögel zu erzeugen. In erster Linie wurde Stuhlextrakt hergestellt, in ähnlicher Weise wie es von TRASK, VIGNÉE und PAUL<sup>2</sup> für die Übertragung des Poliomyelitisvirus angegeben worden ist.

**Technik.** Es wurde Stuhl von eben erkrankten Patienten im sogenannten präikterischen Stadium verwendet oder von solchen, bei denen der Ikterus erst aufgetreten war. Das Material wurde, soweit dies durchführbar war, steril verarbeitet, in steriler Schale im Eisschrank aufbewahrt. Am folgenden Tag wurden ca. 120 cm<sup>3</sup> physiologischer, steriler Kochsalzlösung beigelegt, die Masse umgerührt und die Suspension während 2 Stunden zur Sedimentierung im Eisschrank behalten. Mit einer Pipette wurden 90 cm<sup>3</sup> in ein Glas übertragen, als bakterizides Agens wurden 13 cm<sup>3</sup> Äther *pro narcosi* hinzugefügt und die Lösung nochmals über Nacht im Eisschrank aufbewahrt. Am folgenden Morgen wurde die Flüssigkeit während 2 Stunden bei 3000 Umdrehungen in der Minute zentrifugiert und zum Teil durch einen Chamberlain-Filter filtriert.

Je 2 Wellensittichen wurde entsprechend ihrem Körpergewicht eine Menge von 0,4—0,8 cm<sup>3</sup> dieses Filtrats

<sup>1</sup> A. WERTHEMANN und G. BODOKY, Schweiz. Z. path. Bakt. 10, Suppl. 176 (1947).

<sup>2</sup> J. D. TRASK, A. J. VIGNÉE und J. R. PAUL, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 38, 148 (1938).

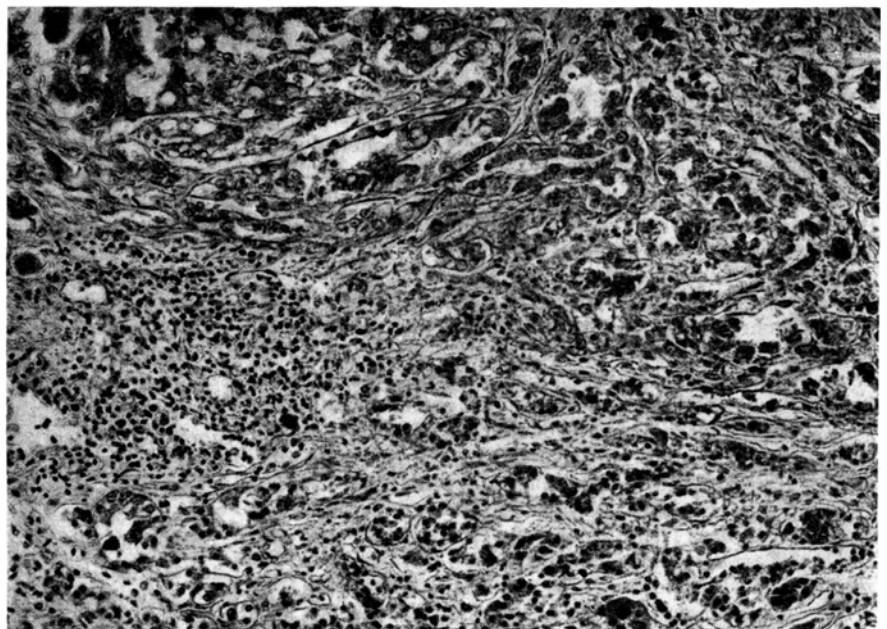


Abb. 1. Schwere Leberdystrophie bei einem Sittich. Starker Parenchymuntergang. Allgemeine entzündliche Infiltration. Geringe Neubildung von Bindegewebe. 250mal vergrößert. HE-Färbung. E.N. 6641/45.

in die Pektoralmuskulatur injiziert (Vögel Nrn. 26—38). In gleicher Weise wurde auch nichtfiltrierter Stuhlextrakt verwendet (Vögel Nrn. 8—20).

Gleichzeitig erhielt je ein anderer Wellensittich an 4 aufeinanderfolgenden Tagen *per os* 0,3—0,4 cm<sup>3</sup> des nichtfiltrierten Stuhlextraktes (Nrn. 40—46).

Wir konnten die Versuchstiere täglich 2—3mal längere Zeit beobachten. 7 Wochen lang zeigten sich bei keinem

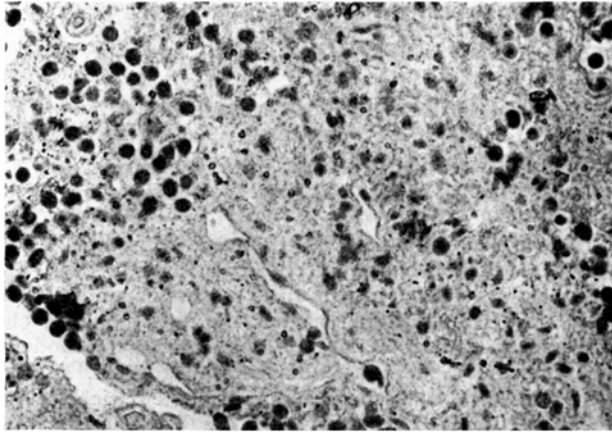


Abb. 2. Sittich mit frischen Leberzelldegeneraten und Kernverlust. Auflösung von Zellen in den zentralen Partien. 450mal vergrößert. HE-Färbung. E. N. 6641/45.

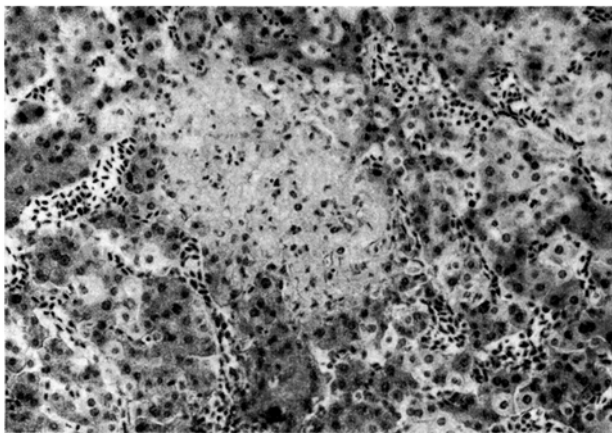


Abb. 3. Wellensittich. Fleckig verteilte Leberzellschwellungen mit Kerndegeneration. Umschriebene, z. T. bindegewebig umgeänderte Gewebseinkapselung. 250mal vergrößert. HE-Färbung. (Tier Nr. 40.)

der mit Stuhlextrakt behandelten Vögel irgendwelche Krankheitserscheinungen. In der 8. Woche waren zuerst bei einem, später noch bei mehreren Tieren, deutliche Krankheitserscheinungen zu beobachten: Nahrungsverweigerung, aufgeplustertes Gefieder, Bewegungseinschränkungen. Die Vögel saßen meistens in einer Ecke des Käfigs und steckten den Kopf unter die Flügel. Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung fanden sich in diesem Stadium keine wesentlichen Veränderungen; die Leber war makroskopisch vergrößert.

*Vogel Nr. 10, nicht filtrierter Stuhlextrakt, S.N. 12:*

Leber: Leberzellen degenerativ verändert, grob- und mittelgrobtropfige Verfettung, Vakuolenbildungen, Kernveränderungen. Stellenweise Retikulumzellen etwas vergrößert, eigentliche größere Ge-

biete ergreifende Zerfallsherde finden sich nicht. Hie und da kleine Zelluntergänge erkennbar mit schwacher und undeutlicher Färbbarkeit.

*Kontrolltier Nr. 10, S.N. 29:*

Leber: entspricht dem Bau des Versuchstiers weitgehend, starker Blutgehalt, einzelne Leberzellen etwas vakuolig verändert und verfettet, hauptsächlich feintropfiges Fett in Leberelementen eingelagert; selten in Glissonscher Kapsel, Ansammlungen von Rundzellen.

Nach 3, manchmal auch erst nach 4—5 Tagen, besserte sich der Zustand der erkrankten Tiere. Sie fingen von neuem an zu fressen und wurden wieder lebhaft. Manchmal traten Remissionen ein, die aber gewöhnlich nur 1—2 Tage dauerten.

3 Monate nachdem die letzten Tiere geimpft worden waren, wurden alle diejenigen, die einmal Krankheitserscheinungen gezeigt hatten, getötet und pathologisch-anatomisch untersucht, gleichzeitig auch ein nicht behandeltes Kontrolltier.

Makroskopisch waren nie irgendwelche Veränderungen festzustellen.

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Vögel, die mit nichtfiltriertem Stuhlextrakt injiziert wurden, konnten wir folgende Beobachtungen feststellen:

*Vogel Nr. 12, S.N. 28:*

Leber: Gewebe gleichmäßig angefärbt, blutreich. Elemente zum Teil mit Vakuolenbildungen, selten Kernveränderungen. Zellgrenzen etwas undeutlich.

*Vogel Nr. 11, S.N. 30:*

Leber: fleckweise Verfettung. Färbbarkeit der Zellen unterschiedlich, Kernstrukturen undeutlich.

Bei den mit filtriertem Stuhlextrakt behandelten Tieren haben wir makroskopisch folgende Befunde erhoben:

*Vogel Nr. 30, S.N. 15:*

Leber: sehr blutreich, Färbbarkeit der Zellen unterschiedlich. Einzelne Zellen blaß ohne deutliche Struktur. Größere Nekrosen fehlen. Hie und da Leberzellen mit leichten Kernumänderungen und Vakuolenbildungen.

Herzmuskel: ungleiche Färbung der Fasern, Muskelfasern fragmentiert mit Vakuolenbildungen.

*Vogel Nr. 31, S.N. 40:*

Leber: verfettet, selten Kernverlust. Zellkerne schlecht färbbar. Retikulumzellwucherungen.

*Kontrolltier Nr. 30, S.N. 16:*

Leber: ohne Nekrosen, Zellblähungen mit Verfettungen. Herzmuskel: blutreich ohne zellige Infiltrate.

*Tier Nr. 32, S.N. 42:*

Leber: Vakuolenbildungen, Färbbarkeit ungleich. Zellgrenzen undeutlich. In Epithelien feintropfig Fett eingelagert. Selten auch kleine Rundzellenansammlungen in der Kapsel.

*Tier Nr. 33, S.N. 43:*

Leber: Vakuolenbildungen, Kernstruktur undeutlich. Geringe Lipoid-einlagerungen.

*Tier Nr. 40, S.N. 52:*

Leber: starke Stauung mit Blutaustritten. Leberzellen eigenartig homogen. Zellgrenzen aufgehoben ohne eigentliche Kernstrukturen. Mehrfach kleine umschriebene nekrotische Herde mit Granulozytenansammlungen.

*Tier Nr. 41, S.N. 53:*

Leber: Stauung, stärkere Ödembildung. Epithel trüb geschwollen. Kernstruktur undeutlich, keine eigentlichen Lebernekrosen. Feine Verfettung.

*Kontrolltier Nr. 40, S.N. 54:*

Leber: Struktur überall gut erkennbar, weder Nekroseherde und Rundzellenansammlungen noch Verfettung.

Unabhängig von diesen Übertragungsversuchen mit Darmausscheidungen wurde bei den gleichen Tieren eine zweite Versuchsanordnung getroffen, indem diesen Vö-

geln nur ein besonderes Futter verabreicht wurde. Es ist angegeben worden, daß bei einer Verfütterung von Wickensamen bei diesen Tieren eine der Leberdystrophie entsprechende Leberschädigung entstehen soll. Es sollte also bei dieser zweiten Versuchsanordnung die Frage geprüft werden, ob durch eine besondere Nahrung eine Leberdystrophie erzeugt werden könne.

Bei der ersten Serie haben wir nach 2 Tagen bei 3 von 5 Tieren (Vögel Nrn. X—XV) eine leichte Plusterung des Gefieders beobachten können, die am folgenden Tag noch zunahm, am 4. Tag nach dem Beginn mit der Verfütterung sind 3 der 5 verwendeten Versuchstiere eingegangen. Bei der makroskopischen Untersuchung konnte man nichts Besonderes feststellen.

Spätere, unter gleichen Bedingungen durchgeführte Kontrollen ergaben außer Aufplustern des Gefieders in der 1. Woche keine pathologischen Reaktionen, obwohl diese Tiere die Nahrung während 3 Monaten erhalten haben (Vögel Nrn. XX—XXIII).

Fütterungsversuche mit Wickensamen:

*Tier Nr. X, S.N. 1:*

Lunge: stark gestaut, feine Blutungen in Alveolen.

Magen: intaktes Epithel, ohne entzündliche Infiltrate.

Myokard: blutreich, leicht fragmentiert.

Leber: umschriebene kleine Zelluntergänge, einzelne Elemente degenerativ verändert. Beinahe granulomartige Degenerationsherde.

*Tier Nr. XI, S.N. 2:*

Leber: starke Blutüberfüllung, Ausweitung der Kapillaren, teilweise Nekrose einzelner Elemente.

*Tier Nr. XII, S.N. 3:*

Leber: Vakuolenbildungen von Leberzellen. Dissoziation mit Zelluntergängen.

*Tier Nr. XX, S.N. 17:*

Leber: feine Vakuolenbildungen, zum Teil ausgesprochene Verfettung. Leberzelluntergänge mit Kernverlust und eigenartiger Homogenisierung größerer Gebiete, ohne zellige Reaktion.

*Tier Nr. XXI, S.N. 18:*

Leber: blutreich, geringe Zellverfettungen, keine Nekrosen.

Die Resultate unserer Experimente scheinen bescheiden. Die Epidemie von Leberdystrophie in Basel war insofern atypisch, als nur vereinzelte Infektionsketten bei den Erkrankten festzustellen waren, wie auch aus den Arbeiten von STAUB<sup>1</sup> und MÜLLER<sup>2</sup> hervorgeht. Es bleibt deshalb die Frage offen, ob nicht eine bis jetzt unbekannte exogene Noxe hier anzuschuldigen sei, vielleicht ein Stoff, der mit Nahrung aufgenommen wurde.

Bei der oben angegebenen Lebererkrankung ist nicht sicher erwiesen, ob tatsächlich eine Virusinfektion in Frage kommt. Die Verhältnisse sind darum nicht ohne weiteres mit den Untersuchungen über Poliomyelitis zu vergleichen, wie sie TRASK, VIGNÉE und PAUL<sup>3</sup> mit großem technischem Aufwand bei der Heine-Medinschen Krankheit durchgeführt haben. Der Befund von bestimmten Leberschädigungen mit kleinen Nekrosen läßt aber doch den Schluß zu, daß eine Leberschädigung durch Übertragung von infektiösem Material erzeugt werden kann. Die Experimente der Übertragung dieser Krankheit auf Wellensittiche fortzusetzen scheint berechtigt, da es sich hier um ein Tier zu handeln scheint, bei dem solche Lebererkrankungen erzeugbar sind.

G. BODOKY

Pathologisches Institut der Universität Basel, den 2. Oktober 1947.

<sup>1</sup> H. STAUB, Schweiz. med. Wschr. 28, 623 (1946); Helv. med. Acta 14, 334 (1947).

<sup>2</sup> Th. MÜLLER, Schweiz. med. Wschr. 77, 796 (1947).

<sup>3</sup> J. D. TRASK, A. J. VIGNÉE und J. R. PAUL, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 38, 148 (1938).

## Summary

Report on experiments in which parakeets (*Melopsittacus undulatus*) were inoculated with extracts from the stool of patients with hepatitis. Transitory disease symptoms could be found in some animals. Microscopically a certain degree of degeneration and necrosis of the liver cells could be demonstrated.

In another series the attempt was made to produce a hepatic dystrophia in parakeets by means of special feeding (sweet-pea seeds). The results varied; in some cases a slight necrosis of the liver occurred.

## PRO LABORATORIO

### Die spektrophotometrische Bestimmung von Cytochrom c im Gewebe

Im Laufe der in der Poliklinik Lausanne in den letzten Jahren durchgeführten Untersuchungen über das Vorkommen von Cytochrom c unter normalen und pathologischen Bedingungen wurden die bisher gebräuchlichen spektrophotometrischen Bestimmungsmethoden<sup>1</sup> auf ihre praktische Brauchbarkeit hin geprüft. Es hat sich dabei fast von selbst eine Methode entwickelt, die neben kleineren Verbesserungen die Vorteile der bisherigen Methoden in sich vereinigt, einfach durchzuführen ist und zufriedenstellende Resultate gibt.

#### Prinzip

Mechanische Eröffnung der Zellen, Extraktion des Cytochroms in saurer Lösung, Entfernung von störenden Pigmentproteinen mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Fällung des Cytochroms mit  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ , spektrophotometrische Bestimmung von Ferrocyclochrom c in alkalischer Lösung auf Grund der Extinktionsdifferenz zwischen den Wellenlängen 550  $\mu$  und 560  $\mu$ .

#### Praktische Durchführung

1. *Extraktion:* 0,2–30 g (a) gut zerkleinertes, frisches Gewebe wird mit einem bestimmten Volumen (z. B. 0,5–1  $\text{cm}^3$ ) feinsten Quarzsandes (es muß bekannt sein, wieviel Wasser er aufsaugen kann) und etwas destilliertem Wasser zu einer breiartigen, homogenen Masse zerrieben. Unter fortwährendem Mischen und Zerreiben wird pro g Frischgewebe zuerst 1,25  $\text{cm}^3$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  n/1 und dann 0,5  $\text{cm}^3$   $\text{NH}_4\text{OH}$  2n zugegeben. Bei Ausgangsmengen unter 2 g wird wie für 2 g verfahren. Die homogene Masse wird 20 Minuten stehengelassen, nochmals gut durchgemischt und zentrifugiert. Die Gesamtmenge (b) und die Menge der überstehenden Flüssigkeit (c) werden bestimmt.

2. *Ausfällung von Hämoglobin:* Der abgegossenen trüben Flüssigkeit wird das gleiche Volumen  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  50% zugefügt, und das Ganze während 10 Minuten bei einer Temperatur von 55° C gehalten. Nach dem Erkalten wird das Gemisch filtriert.

3. *Ausfällung von Cytochrom c:* Auf je 10  $\text{cm}^3$  des klaren Filtrates werden 1  $\text{cm}^3$   $\text{CCl}_3\text{COOH}$  90% zugegeben und gut durchgemischt. Beim Stehenlassen in der Kälte entsteht nach  $\frac{1}{2}$ –3 Stunden eine flockige Ausfällung, die das rotbraune Cytochrom c enthält. Bleibt aus-

<sup>1</sup> A. FUJITA, T. HATA, J. NUMATA und M. AJIKASA, Biochem. Z. 301, 376 (1939). – R. JUNOWICZ-KOCHOLATY und T. R. HOGNESS, J. biol. Chem. 129, 569 (1939). – V. R. POTTER und K. P. DUBOIS, J. biol. Chem. 142, 417 (1942). – A. GONELLA, Dissertation, Lausanne 1943. – O. ROSENTHAL und D. L. DRABKIN, J. biol. Chem. 143, 437 (1943).