

EXPERIMENTELLE BEITRÄGE ZUM PROBLEM DER ALKALISCHEN LEBERPHOSPHATASE

A. ROSENBERG, I. SCHÄCHTER und V. DAGHIE

(Eingegangen am 25. März 1959)

Die Bestimmung der alkalischen Phosphatase (AP) ist eine wertvolle Methode zur Beurteilung der Leberfunktion, besonders aber zur Differenzialdiagnose der verschiedenen Formen von Gelbsucht. Trotzdem wird sie seltener benützt als die anderen üblichen Leberfunktionsteste. Dies hat seinen Grund darin, dass weder der Ursprung der AP noch die diesbezügliche Rolle der Leberzellen völlig geklärt sind. Dasselbe trifft auch für die Bedeutung der histochemisch bestimmten AP der Leber zu.

Die AP ist das einzige Ferment, welches durch die Galle ausgeschieden wird. Nach einigen Autoren stammt es aus dem Blutserum und wird über die Leber bzw. Galle in den Darm ausgeschieden. Für diese Annahme sprechen mehrere Tatsachen: Normalerweise findet man AP nur in den Kupfferschen Sternzellen und im Epithel der Gallenwege. Nach intravenöser Verabreichung wird die AP mit der Galle ausgeschieden. Nach Choledochusligatur steigt ihre Menge in Leber und Serum an (FREEMAN). Die AP ist in der Leber bei epidemischer Hepatitis vermehrt. Sie fehlt im acholischen Stuhl während sie im normalen Stuhl vorhanden ist.

Andere Tatsachen dagegen sprechen für einen intrahepatischen Ursprung dieses Fermentes. So fand SULKIN nach Leberresektion ein Ansteigen der AP in der Regenerationsleber und KOCH—WESER und Mitarbeiter stellten AP in den Leberzellen von mit Tetrachlorkohlenstoff behandelten Tieren fest.

Schliesslich gibt es auch Beobachtungen, die weder mit der exkretorischen Theorie, noch mit der Annahme eines intrahepatischen Ursprunges des Fermentes in Einklang gebracht werden können: Z. B. dass die Menge der AP bei eiweissarmer Ernährung, bzw. Hungerzustand im Serum und in der Leber zunimmt, während in den normalen Leberzellen kein AP nachzuweisen ist.

Um einen weiteren Einblick in dieses Problem zu gewinnen, haben wir die AP bei einer Versuchsanordnung verfolgt, wo die normalen Zusammenhänge zwischen Blut und Gallenzirkulation blockiert wurden. In dieser Versuchsreihe wollten wir eine Antwort auf die Frage bekommen, ob die AP in den Leberzellen nachzuweisen ist oder nicht. In einer weiteren Versuchsreihe verwendeten wir nach der Technik von KOCH und Mitarbeiter Tetrachlor-

kohlenstoff, um das Erscheinen der AP in den Leberzellen hervorzurufen, und feststellen zu können, ob nach Leberzellenblockade die AP in den Zellen erscheint. Das erste Ergebnis würde für einen zellulären, das zweite für einen hämatogenen Ursprung des Fermentes sprechen.

Material und Methode

Im Experiment wurden insgesamt 50 weisse erwachsene Ratten von einem Körpergewicht von 100—250 g verwendet. Die Tiere wurden in drei Versuchsgruppen eingeteilt.

I. Gruppe: 20 Tiere mit Tetrachlorkohlenstoff-Hepatitis.

II. Gruppe: 10 Tiere mit Lithiumkarmin-Blockade.

III. Gruppe: 20 Tiere mit Tetrachlorkohlenstoff-Hepatitis und gleichzeitiger Lithiumkarmin-Blockade.

Um die Veränderungen der Leber dynamisch verfolgen zu können, wurden die Tiere je nach dem bei der jeweiligen Gruppe verfolgten Ziele, binnen 2—3 Wochen in Abständen von 1—2 Tagen durch Dekapitieren getötet.

Die AP wurde mit der von *Hoffmann—Epstein* modifizierten Methode von *Gomori* nachgewiesen. Daneben untersuchten wir auch Thymo- und Ribonukleinsäure, Eisen, Glykogen, die Kollagenen und die retikulären Phasern.

Befunde

Bei den Versuchstieren der ersten Gruppe haben wir wie *Koch* und Mitarbeiter mit einer einzigen subkutanen Dosis von 0,1 ml Tetrachlorkohlenstoff pro 20 g Körpergewicht eine experimentelle Hepatitis ausgelöst. Die für Hepatitis charakteristischen Veränderungen, d. h. periportale polyblastische Infiltrate, Auflockerung der lobulären Struktur, runde volle »Korbzellen«, zentrilobuläre Miniaturnekrosen wurden regelmässig vorgefunden. — In der dritten Woche erfolgte eine praktisch vollkommene Restitution in allen untersuchten Tieren mit der Ausnahme von zwei die noch periportale Infiltrate aufwiesen.

Ohne auf das Verhalten der anderen histologisch und histochemisch verfolgten Komponenten (Lipoide, Mukopolysaccharide, Nukleinsäure, Gitterfaser usw.) einzugehen, können wir die die AP betreffenden Befunde folgendermassen zusammenfassen. Im Gegensatz zu den normalen Tieren, bei denen die AP nur in den Kupfferschen Sternzellen und im Epithel der Gallenwege doch nie in den Leberzellen zu finden ist, fanden wir bei den Tieren unserer Versuchsreihe am zweiten bis vierten Tag, d. h. zur Zeit der stärksten Ausbildung der beschriebenen Veränderungen eine stark positive AP-Reaktion in den periportal und perizentrilobulären Leberzellen sowie auch in den portalen Gefässwänden. Eine Ausnahme bildeten nur die zwei erwähnten Tiere mit residualen Infiltraten. Bei diesen zeigten aber die Infiltratzellen eine intensive Reaktion. Unsere Feststellungen bestätigen also in grossen Zügen die Befunde von *Koch* und Mitarbeiter.

Bei den Tieren der zweiten Versuchsgruppe wurde mit der Methode von *Romeis* durch Lithiumkarmin eine praktisch vollkommene intravitale

Blockade erreicht. Die Tiere wurden innerhalb von 11 Tagen untersucht. Wir fanden, dass die Kupfferschen Sternzellen eine umso schwächere positive AP-Reaktion zeigten, je mehr Karmingranula sie enthielten. Dagegen zeigten die schwach oder nicht blockierten Sternzellen eine starke AP-Reaktion. Die phosphatase-positiven Zellen waren entweder an den Wänden der Sinusoide fixiert oder wurden mobil und gerieten in das Lumen der Kapillaren, wo sie eine ovale oder zackige Form annahmen. Sie waren auch merklich vergrößert. Wir möchten hervorheben, dass die Leberparenchymzellen zwar bedeutende Veränderungen (Glykogen, Nukleinsäuren, Eisen) aber niemals eine positive AP-Reaktion aufwiesen.

Die Tiere der dritten Versuchsgruppe wurden zuerst mit Lithiumkarmin blockiert und nachher mit Tetrachlorkohlenstoff behandelt. Trotz der Blockade erschienen die oben beschriebene für Hepatitis charakteristische Veränderungen. Diese Veränderungen waren bei den blockierten Tieren jedoch viel schwächer als bei den nicht blockierten. Anscheinend wurden weniger Leberzellen und auch diese in geringerem Masse geschädigt. Auch der Regenerationsprozess war dementsprechend weniger aktiv.

Die AP-Reaktion ergab dieselben Befunde wie bei den Tieren mit Blockade aber ohne Tetrachlorkohlenstoff-Behandlung. Die vollkommen blockierten Sternzellen gaben überhaupt keine Reaktion, die schwach blockierten Zellen eine schwache und die nicht blockierten fixen oder mobilisierten Kupfferzellen eine starke Reaktion. In den Leberzellen konnte keine AP nachgewiesen werden. Eine einzige Ausnahme bildete ein Tier, welches einen Tag nach der Tetrachlorkohlenstoff-Injektion untersucht wurde; bei diesem wiesen die peripheren Leberzellen eine ausgesprochene und das Epithel der Gallenwege eine im Vergleich zu den anderen Versuchstieren schwächere Reaktion auf.

Die histochemischen Veränderungen waren im grossen und ganzen dieselben wie bei den anderen Versuchsgruppen, nur war in den Leberzellen der Glykogenschwund geringer.

Besprechung

Der Vergleich der AP-Reaktion bei den beschriebenen Versuchsgruppen erlaubt gewisse Schlüsse zu ziehen hinsichtlich des Verhaltens der AP unter verschiedenen vaskulobilären Bedingungen. Aus der Tatsache, dass nach Blockade sowohl mit gleichzeitiger wie auch ohne Tetrachlorkohlenstoff-Verabreichung, d. h. im Falle einer sozusagen physiologischen Sperre zwischen Blut- und Gallenzirkulation, das Ferment in den Leberzellen nicht nachzuweisen war, schliessen wir, dass es nicht in den Leberzellen gebildet wird. Für diese Auffassung sprechen auch die klinischen Beobachtungen von MAGYAR und Mitarbeiter, die in einigen Fällen von hypertrophischer Leberzirrhose (HANOT)



Abb. 1. Leber einer mit Lithiumkarmin blockierten Ratte. (Romeische Methode) Die Kupfferschen Zellen gequollen, mobilisiert, intensiv Phosphatase-positiv (Obj. 7, ok. 9.)

Abb. 2. Leber einer mit Tetrachlorkohlenstoff behandelten Ratte. Intensiv positive AP in den peripheren Leberzellen. Gomorische Methode modifiziert nach Hoffmann—Epstein. (Obj. 20, ok. 9)

Abb. 3. Leber einer blockierten und mit Tetrachlorkohlenstoff behandelten Ratte. AP nur in den teils mobilisierten Kupfferschen Zellen positiv. In der Mitte zwei Artefakte. Gomorische Methode modifiziert nach Hoffmann—Epstein. Blockade mit Lithiumkarmin nach Romeis (Obj. 20, ok. 9)

ein Ansteigen des AP im Blut feststellten. Bekannterweise findet man bei diesem Typ der Leberzirrhose eine intralobuläre retikulär-bindegewebige Proliferation, welche innerhalb gewisser Grenzen an Bedeutung und Effekt unserer experimentellen Blockade ähnlich ist. In den stark blockierten Zellen, könnte das als ein Kompensations-Phänomen aufgefasst werden, indem die nicht blockierten Zellen die blockierten funktionell ersetzen würden.

Für die exkretorische Funktion der Leber spricht auch die schwach positive Reaktion des Gallengangepithels bei den Tieren der dritten Versuchsgruppe.

Bei allen untersuchten Tieren zeigten sich bedeutende Veränderungen im Nukleoproteidstoffwechsel und bei den Tieren der zweiten und dritten Versuchsgruppe auch im Glykogenstoffwechsel. Einen Zusammenhang zwischen diesen Stoffwechselveränderungen und der AP-Reaktion konnten wir aber nicht feststellen. Eine einzige Ausnahme bildete jenes Tier der dritten Versuchsgruppe, bei dem die peripheren Leberzellen eine positive Reaktion gaben. Dies könnte aber auch durch eine ungenügende Blockade zu erklären sein.

Wir erwähnten das Erscheinen von AP in den periportalen Rundzellinfiltraten. Dies dürfte wahrscheinlich mit den Zellteilungen in Zusammenhang stehen.

Zusammenfassung

1. Zur Klärung der Frage des intra- oder extrahepatischen Ursprunges der Leberphosphatase wurde die alkalische Phosphatase-Reaktion in drei verschiedenen Versuchsanordnungen untersucht. (Durch Tetrachlorkohlenstoff verursachte Hepatitis, Blockade durch Lithiumkarmin, Lithiumkarmin-Blockade mit nachträglicher Tetrachlorkohlenstoff-Intoxikation.)

2. Die mit Tetrachlorkohlenstoff behandelten Tiere zeigten eine positive alkalische Phosphatase-Reaktion der Leberzellen. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen von KOCH und Mitarbeitern überein.

3. Bei den mit Lithiumkarmin blockierten Tieren gaben weder die Leberzellen noch die Sternzellen eine positive Reaktion. In den wenig oder überhaupt nicht blockierten Sternzellen konnte aber alkalische Phosphatase nachgewiesen werden.

4. Die blockierten und nachher mit Tetrachlorkohlenstoff behandelten Tiere ergaben dasselbe Bild wie jene bei denen nur Lithiumkarmin aber kein Tetrachlorkohlenstoff angewandt wurde. Der einzige Unterschied war eine schwächere Reaktion des Gallenepithels bei den kombiniert behandelten Tieren.

5. Obige Befunde und die Tatsache, dass schwere histochemische Veränderungen aufweisende Leberzellen kein Ferment enthalten, scheinen die Auffassung zu bekräftigen, wonach die alkalische Phosphatase ein durch die Leber ausgeschiedenes aber nicht von den Leberzellen hergestelltes Ferment ist.

LITERATUR

1. FREEMAN, S. (1951): Comparison of Effects of Hepatectomy and of Common Bile Duct Obstruction on Serum Phosphatase of Adult Dogs. *Amer. J. Physiol.* 164, 792. —
2. KOCH-WESER, D., DE LA HUERGA, J. and POPPER, H. (1951): Relation between Serum and Hepatic Enzymes in Experimental Liver Damage. *J. Lab. clin. Med.* 328, 825. —
3. SULKIN: *Zit. nach Magyar, I.—Fischer, A.* (4). —
4. MAGYAR, I.—FISCHER, A. (1956): *A máj és epeutak. Akadémiai Kiadó Budapest.* —
5. ROMEIS, B. (1928): *Taschenbuch der mikroskopischen Technik.* Oldenburg, Berlin.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ О ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЕ ПЕЧЕНИ

А. РОЗЕНБЕРГ, И. ШЭХТЕР и В. ДАГИ

При различных экспериментальных условиях проводились исследования на белых крысах о роли и значении щелочной фосфатазы в печеночной дольке.

В обработанной четыреххлористым углеродом группе животных щелочная фосфатаза была обнаружена — в полном согласии с наблюдениями Коха и сотрудников — в перипортальных печеночных клетках:

В блокированной литиевым кармином второй группе животных, далее в третьей группе, где кроме блокирования животных давали им также четыреххлористый углерод, фермент появился в звездчатых, но отсутствовал в печеночных клетках. В случае сочетания блокирования с обработкой четыреххлористым углеродом реакция фермента ввиду отсутствия желчевыводящих каналов была гораздо слабее, чем у контрольных животных.

Отсутствие щелочной фосфатазы в печеночных клетках после блокады и после одновременного применения блокады и четыреххлористого углерода позволяет делать тот вывод, что в печени происходит не производство (секреция), а только выделение (экскреция) данного фермента.

DONNÉES EXPÉRIMENTALES CONCERNANTES LA PHOSPHATASE ALCALINE HÉPATIQUE

A. ROSENBERG, I. SCHÄCHTER et V. DAGHIE

Afin d'élucider le rôle et l'importance de la phosphatase alcaline dans les lobules du foie, des rats blancs ont été examinés dans différentes conditions expérimentales.

Dans le groupe d'animaux traités au carbottetrachlorure — conformément aux observations de Koch et de ses collaborateurs, — la phosphatase alcaline a été retrouvée dans les cellules periportales.

Dans le second groupe d'animaux bloqués par du lithine-carmin, ainsi que dans le troisième groupe, dans lequel le blocage a été accompagné d'administration simultanée de carbottetrachlorure, le ferment est apparu dans les cellules de Kupffer, mais manquait dans les cellules hépatiques. Lors du traitement simultané carbottetrachlorure - blocage — en l'absence des canaux déferents de la bile — la réaction du ferment est beaucoup plus faible, que dans les cas de contrôle.

L'absence de la phosphatase alcaline dans les cellules hépatiques après le blocage, ainsi qu'après l'application simultanée du blocage - carbottetrachlorure, permet de tirer la conclusion, que le ferment n'est pas produit par le foie, mais seulement excrété.

DR A. ROSENBERG
DR I. SCHÄCHTER
DR V. DAGHIE

} Cluj, Str. Mikó Nr 3. Rumänien