

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. F. FEYRTER).

Das Verhalten der Phosphoamidase in der Leber bei Tetrachlorkohlenstoff- und Allylkoholvergiftung.

Von
W. EGER.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 3. April 1954.)

Während die alkalischen und sauren Phosphatasen in der Histochemie schon eine vielfältige Bearbeitung erfahren haben, fand der Nachweis der Phosphoamidase bisher wenig Beachtung. Das mag daran liegen, daß GOMORI in seiner diesbezüglichen Publikation angibt, der Ausfall der Reaktion wäre launenhaft und nicht zufriedenstellend. Lediglich die graue Substanz des Gehirns und die malignen epithelialen Tumoren besäßen einen gleichmäßigen, histochemisch nachweisbaren Gehalt an diesem Ferment.

Nachdem ich bei der histochemischen Darstellung der alkalischen und sauren Phosphatasen mit dem von FEYRTER für derartige Arbeiten empfohlenen nativen Gefrierschnitt gute Erfahrungen gemacht hatte und durch diese Anwendungsform das Verfahren erheblich vereinfachen und verbessern konnte (EGER und GELLER), wandte ich auch den nativen Gefrierschnitt zur Reaktion auf Phosphoamidase an. Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden an anderer Stelle mitgeteilt. Zur Methodik im einzelnen und den Änderungen, die von der Originalvorschrift GOMORIS abweichen, möchte ich auf die Veröffentlichung von EGER und SCHULTE verweisen und nur einige Punkte erwähnen.

In Versuchen mit den Phosphatasen hat es sich gezeigt, daß man native und nativ geschnittene, fixierte Präparate bis zu 10 Tagen lufttrocken ohne merkbare Änderung der histochemischen Fermentreaktion im Sinne eines Verlustes aufbewahren kann. Diese Erfahrung kommt beim Nachweis der Phosphoamidasen insofern zu statten, als die Reaktion auf dieses Ferment besser an Schnitten ausfällt, die 24 Std lufttrocken gelagert haben, als an solchen, die frisch verarbeitet werden.

Bei der Prüfung der Inkubationszeit zeigt es sich, daß Leber- und Nierengewebe viel länger bebrütet werden muß, um ein ausgereiftes histologisches Bild zu erhalten, als man es von den Arbeiten mit den alkalischen und sauren Phosphatasen her gewohnt ist. Unter Berücksichtigung dieser Momente erzielt man am Lebergewebe regelmäßige und schöne Bilder, die eine charakteristische Lokalisation der Phospho-

amidase aufweisen und sich deutlich von der alkalischen und sauren Phosphatase unterscheiden.

Eine Klärung dieses Punktes ist insofern wichtig, da GOMORI glaubt, mit dieser Methode ein besonderes Ferment zu erfassen, während PEARSE neuerdings in seinem Buch zur Histochemie angibt, nach dem histochemischen Bild bestünden keine Unterschiede zur sauren Phosphatase, nähere Einzelheiten aber weder in Bildern darstellt, noch beschreibt. Auf Grund meiner Ergebnisse ist die histochemisch darstellbare Phosphoamidase in Bestätigung der Angaben GOMORIS als eigene Fermentgruppe gegen die anderen Phosphatasen abzugrenzen.

Über die Bedeutung der Phosphoamidasen ist wenig bekannt. Sie spielen im Muskelstoffwechsel eine Rolle, indem sie unter anderem Phosphokreatinin und Phosphoarginin spalten. Welche Aufgabe ihnen in parenchymatösen Organen zukommt, ist ungeklärt. Auf Grund ihres Angriffspunktes kann man vermuten, daß sie sich hauptsächlich in den Eiweißstoffwechsel einschalten. Nach dem histologischen Bild sind sie vorwiegend an den Grenzflächen des Gewebes wie in den Zellkernen verankert, woraus man schließen kann, daß sie vor allem am Stoffaustausch der Blutgewebsschranke beteiligt sind.

Ich habe verschiedentlich darauf hingewiesen, welche Bedeutung dem Fermentsystem in Grenzmembranen zukommt und welche Rolle es in der Pathologie der Permeabilität spielt. Störungen der Fermente durch Gifte, die vorwiegend die Grenzflächen angreifen, werden die gerichtete Permeabilität solcher Grenzmembranen ändern, was wiederum am histochemisch darstellbaren Fermentbild solcher Grenzflächen zum Ausdruck kommen kann.

Zur Untersuchung derartiger Fragen ist die Leber mit ihren eigentümlichen Beziehungen ihres Parenchyms zur Blutgewebsschranke ein geeignetes Objekt. Durch Vergiftung des Organs mit Tetrachlorkohlenstoff oder Allylalkohol erreicht man nach bisher bekanntgewordenen Untersuchungen eine Schädigung der Grenzflächen, insbesondere der Capillarwände. Es war deshalb anzunehmen, daß sich diese Vergiftung auf das Fermentbild auswirkt. Die Prüfung einer solchen Schädigung an der Leber erscheint darüber hinaus von besonderem Interesse, da beide Gifte bezogen auf das Leberläppchen sich in ihrem Angriffsort unterscheiden, geradezu gegensätzlich verhalten. Bei Tetrachlorkohlenstoff geht die Schädigung vom Läppchenzentrum, bei Allylalkohol von den periportal Feldern und der Läppchenperipherie aus. Diese unterschiedliche Angriffsweise hat für die vorliegende Fermentuntersuchung insofern Bedeutung, als die Phosphoamidasen ebenso wie die Phosphatasen hinsichtlich ihrer Verankerung im Leberläppchen typisch gegliedert sind und die ersteren vorwiegend im zentralen Funktionsfeld

erscheinen, während die saure, ausgesprochen aber die alkalische Phosphatase, hauptsächlich in der Peripherie des Leberläppchens auftritt.

Für die Versuche benutzte ich Ratten, die 0,25 cm³/100 g Tetrachlorkohlenstoff oder 7,5 mg/100 g Allylalkohol mit der Schlundsonde erhielten und in zeitlichen Abständen von 1 Std bis zu 8 Std getötet wurden. Das gewonnene Lebermaterial wurde nach den bisherigen Erfahrungen aufgearbeitet (EGER und GELLER; EGER und SCHULTE).

*Die Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff und Allylalkohol
im allgemeinen.*

Die Allylalkoholvergiftung wurde von EPPINGER und seiner Schule (EPPINGER) ausgiebig benutzt, um die Vorgänge der Leberschädigung im einzelnen zu studieren. Er arbeitete allerdings mit Allylformiat, das mir nicht zugänglich war. Nach Angaben EPPINGERS hat aber der Allylalkohol dieselbe Wirkung.

In Vorversuchen stellte ich fest, daß es einen wesentlichen Unterschied bedeutet, ob der Allylalkohol subcutan oder oral zugeführt wird. Die Abweichung betrifft sowohl die Intensität und das Ausmaß, wie auch in gewisser Weise die Qualität der Wirkung auf den Gesamtorganismus und auf die Leber. Ich will darauf im einzelnen an anderer Stelle eingehen. Mir scheint jedenfalls die Wirkung vom Magen-Darmkanal aus mehr den natürlichen Verhältnissen angepaßt, wenn man überhaupt von dem Ergebnis solcher Versuche Rückschlüsse auf die menschliche Pathologie ziehen will. Ich applizierte deshalb nur in dieser Form den Allylalkohol und verfolgte die Wirkung im 8-Stundenversuch.

Zwischen der Schädigung mit Tetrachlorkohlenstoff und Allylalkohol bestehen grundsätzliche Unterschiede, wobei ich in beiden Fällen von der oralen Zufuhr ausgehe. Die Differenzen sind schon bezüglich der Ausbreitung der Schädigung bezogen auf das Gesamtorgan offensichtlich. Durch die Tetrachlorkohlenstoffvergiftung werden alle Leberlappen gleichmäßig befallen, durch Allylalkohol nur einzelne Lappen und von ihnen wiederum nur segmentförmige Abschnitte und Flecken betroffen. Die erstere Vergiftung beginnt im Läppchenzentrum und breitet sich nach der Peripherie aus. Die zweite nimmt ihren Ausgang von den Verzweigungen der Pfortader, befällt scharf abgegrenzte periportale Felder und greift auf die peripheren Läppchenbezirke über. Tetrachlorkohlenstoff führt zu Zellödemen, Zellkollaps, zu großtropfiger Verfettung und zum Untergang einzelner Leberzellen, Allylalkohol offensichtlich zu einer schweren Schädigung der betroffenen Gefäßwand mit erhöhter Durchlässigkeit, zu sofortigem Kollaps und Schädigung sämtlicher Zellen im befallenen Bereich, der bald von Leukocyten durchsetzt wird. Es kommt also hier wahrscheinlich unter Auflösung der Capillarwand zu einer primären Koagulation des Cytoplasmas mit

Isolierung der Zellen, die vom Blut umspült werden, während die Kerne histologisch zunächst keine eindrucksvollen Veränderungen zeigen. Auch diese Vorgänge will ich hier nicht näher beschreiben, sondern den Einfluß auf die Fermentreaktion betrachten.

*Der Einfluß des Tetrachlorkohlenstoffs auf das Fermentsystem
des Leberläppchens.*

Die Wirkung des Tetrachlorkohlenstoffs auf die alkalische und saure Phosphatase schilderte ich ausführlich an anderer Stelle (EGER). Gleichzeitig mit dem Zellödem, das um die Zentralvenen beginnt, schwindet die Phosphatase in den einzelnen Zellen und Zellmembranen. In größeren Komplexen nimmt andererseits die Reaktion im Cytoplasma der Zellen zu, während sich die scharfen Zellkonturen verlieren. Einzelne Zellen zeigen eine netzige Fermentverteilung im Zelleib. Intensiv geschwärzte klecksige Bezirke wechseln mit solchen einer weitgehend aufgehobenen Reaktion. Es herrscht ein Fermentchaos, das ich als Dysenzymie bezeichne.

Bei der Phosphoamidase sieht man im alkoholfixierten Präparat eine um die Zentralvenen beginnende Abnahme der Capillarreaktion, die schon in der 1. Stunde nach der Vergiftung bemerkbar wird. Die netzförmige Zeichnung des normalen Leberbildes dieses Enzyms schwindet allmählich von innen nach außen (s. Abb. 1). Die ödematös aufgeblähten Zellen sind daran erkennbar, daß sie auch im Fermentbild aufgetrieben und abgerundet erscheinen und die benachbarte Capillare bzw. Leberzelle verdrängen. Der Zelleib, der unter gewöhnlichen Umständen sich meist ein wenig schwärzt, ist optisch leer. Daneben liegen kollabierte Zellen mit einer ziemlich kräftigen Fermentreaktion, die in kleinsten Körnchen des Cytoplasmas zu erkennen ist. Die Gitterfasern und Grenzflächen sind nur noch als kurze Faserstümpfe zu sehen, ihre langen Ausläufer und Verzweigungen stellen sich nicht mehr dar. Es ändert sich also, wenn auch nicht so eindrucksvoll wie bei der alkalischen Phosphatase die Fermentreaktion im Zelleib der aufgeblähten und kollabierten Zelle. Im gesamten verschwindet die netzförmige Zeichnung des normalen Leberbildes. Das Läppchenzentrum nimmt etwa dasselbe Aussehen an wie unter normalen Umständen die periportalen und peripheren Läppchenbezirke.

Ich habe in der ausführlichen Darstellung der Phosphoamidase der Leber gezeigt (EGER und SCHULTE), daß das Enzym in ziemlich grober, netzförmiger Anordnung vorwiegend im Läppchenzentrum aufscheint und das Netz an die Capillarwände gebunden ist, bzw. durch sie gebildet wird, während das Cytoplasma der Leberzellen nur wenig an der Fermentreaktion beteiligt ist. Außerdem stellen sich feine und regelmäßig gekörnte Fasern dar, die wie zarte Perlschnüre entlang den

Capillaren ziehen, sich verzweigen, gelegentlich die Capillaren umspinnen und auch mit feinsten Ausläufern auf benachbarte Leberzellen übergreifen. Die Fasern berühren vielfach die Endothel- und KUPFFERschen Sternzellen und scheinen mitunter aus ihnen zu entspringen und sich von hier aus zu verzweigen. Trotz dieser innigen Berührung, die aus dem histologischen Bild zu entnehmen ist, bin ich nicht der Ansicht, daß es sich bei den Fasern um Zellbestandteile handelt, sondern um Anteile des Gitterfasersystems und um Grenzflächen, die besonders

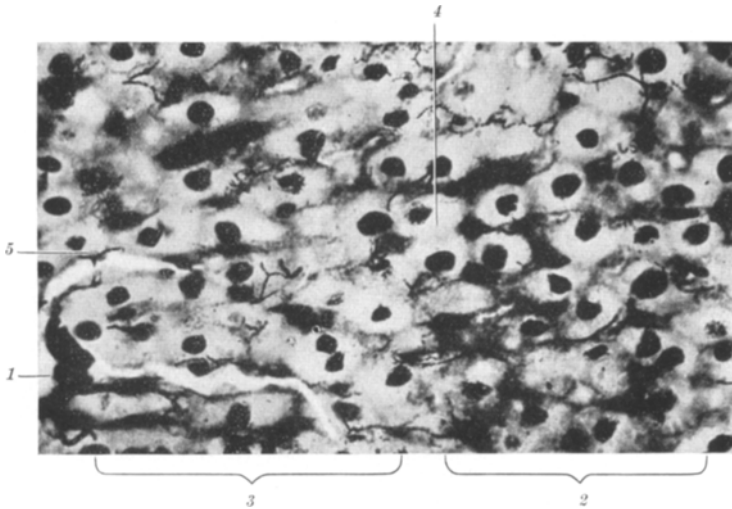


Abb. 1. Phosphoamidase der Leber nach 1stündiger Tetrachlorkohlenstoffvergiftung. 1 Zentralvene; 2 beginnender Schwund der Phosphoamidase im Läppchenzentrum, sich vorwiegend auf das Capillarnetz erstreckend; 3 noch erhaltene grobnetztige Enzymreaktion; 4 ödematös aufgetriebene, im Cytoplasma völlig fermentnegative Zelle; 5 kurze verzweigte Grenzflächen und Gitterfasern. 20stündige Inkubationszeit.

reich an diesen Fermenten sind. In der Läppchenperipherie fällt die kräftige Capillarreaktion weg. Man findet nur die geschwärzten Kerne mit ihrem Fermentreichtum, das zart angefärbte Cytoplasma und die eben erwähnten gekörnten Fasern.

Für meine Betrachtungsweise ist die Feststellung wichtig, daß sich die Enzymstörung bei der Tetrachlorkohlenstoffvergiftung in der Hauptsache im Läppchenzentrum an Grenzmembranen und Capillarwänden abspielt, während das Cytoplasma und die Kerne kaum merkbar beteiligt sind. Diese Fermentänderung an den Capillarwänden bzw. Grenzmembranen spricht für meine schon vielfach geäußerte und am Phosphatasepräparat demonstrierte Ansicht (EGGER), daß die Durchlässigkeit der Blutgewebsschranke auch von einem Fermentsystem gesteuert und dieses durch Vergiftung geschädigt, die Pathologie der Permeabilität der Grenzmembran zu einem wesentlichen Teil durch

dysenzymatische Vorgänge bestimmt wird. Im vorliegenden Fall demonstriert sich die Schädigung des Enzymapparates nicht so sehr in einer Abänderung der Fermentreaktion (Dysenzymie), als in einem zunehmenden Schwund im Bereich der Capillarwand.

*Der Einfluß des Allylkohols auf das Fermentsystem
des Leberläppchens.*

Die anders geartete Schädigung der Leber durch Allylkohol, die ich oben streifte, und der daraus entstehende Untergang des betroffenen

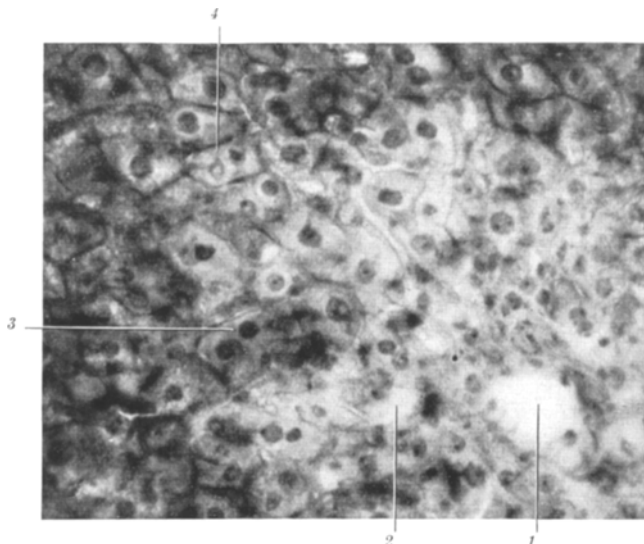


Abb. 2. Alkalische Phosphatase der Leber. Beginnende Schädigung eines periportalen Feldes durch Allylkoholvergiftung. Am linken und oberen Rand des Bildes noch normale Verteilung des Fermentes. 1 Pfortaderverzweigung. 2 fleckiger Verlust der Phosphatase, bei 3 verstärkte Kernreaktion, bei 4 abgeschwächte Kern- und Cytoplasmareaktion. 5tündige Inkubationszeit.

Leberparenchyms kommt auch im Fermentbild zum Ausdruck. Ich habe neben der Phosphoamidase auch das Verhalten der alkalischen Phosphatase untersucht und möchte das Ergebnis kurz beschreiben und abbilden. Ganz im Anfang der Giftwirkung steht die Störung des regelmäßigen Fermentbildes im Vordergrund. Verstärkte Kernreaktion einzelner Zellen wechselt mit Abnahme der Kernintensität anderer Parenchymzellen, fleckiger Schwund der Schwärzung mit stärkerer Reaktion von Zellgruppen. Die Zellgrenzen zeigen nicht mehr die scharfen Konturen des normalen Bildes. Sie verdämmern oder schwinden ganz. Die Grenzen gehen ineinander über (s. Abb. 2). Charakteristisch ist im Gegensatz zur Tetrachlorkohlenstoffvergiftung, daß sich der dysenzymatische Vorgang nur auf eine schmale Randzone zum

unbeteiligten Lebergewebe beschränkt, die Phosphatasen des betroffenen Parenchyms alsbald weitgehend und gleichmäßig gehemmt sind, sich nicht darstellen und auf diese Weise einen umschriebenen Ausfalls-

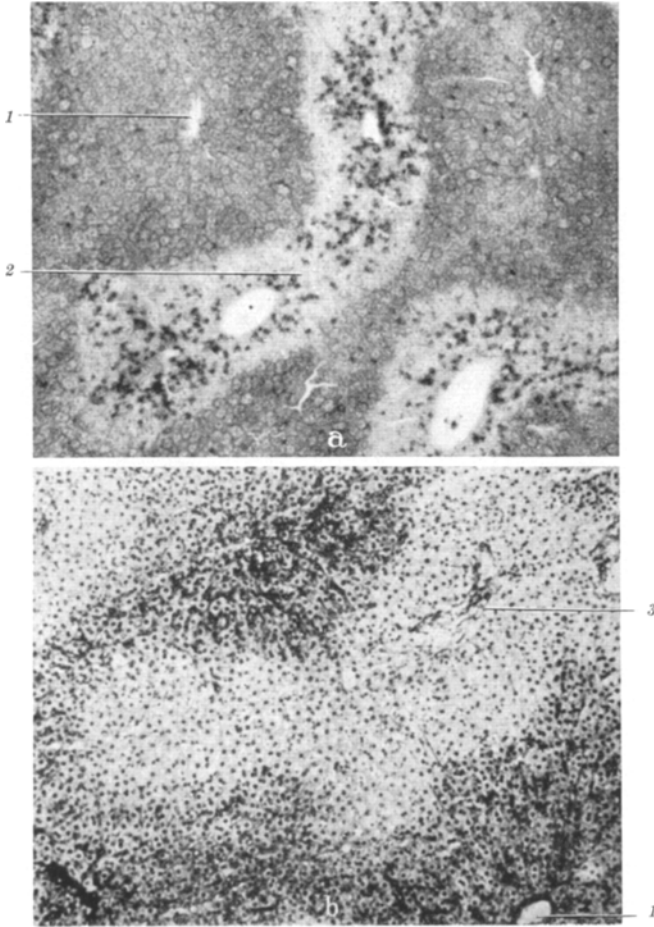


Abb. 3 a u. b. a Alkalische Phosphatase der Leber nach 8stündiger Allylalkoholvergiftung. Alkoholfixierter nativer Gefrierschnitt nach 5stündiger Inkubationszeit. b Phosphoramidase nach Alkoholfixierung und 20stündiger Inkubation. 1 Zentralvene, 2 Weitgehender Schwund der Fermentreaktion in scharf abgegrenzten periportal Feldern und in der Peripherie der Läppchen. Dichte Durchsetzung der geschädigten Bezirke mit fermentpositiven Leukocyten. 3 Entsprechender periportal Schwund der Phosphoramidase.

bezirk bilden, der sich ziemlich scharf gegen die unbeteiligte Umgebung abhebt.

Die herdförmige periportale Schädigung des Lebergewebes ist deshalb besonders gut im histologischen Bild der alkalischen Phosphatase zu sehen (s. Abb. 3a). Sie macht sich nicht so sehr in einer allmählichen

Verschiebung und Änderung des Fermentbildes eines größeren Parenchymkomplexes als Ausdruck dysenzymatischer Prozesse bemerkbar, wie man sie bei der Tetrachlorkohlenstoffvergiftung verfolgt, sondern setzt mit einer Fermenthemmung des gesamten geschädigten Zellbezirktes ein, wodurch sich der rasche Untergang der Zellen anzeigt. Auf die Weise kommen die abgebildeten Ausfallsherde an alkalischer Phosphatase zustande, während nur die eingewanderten Leukocyten

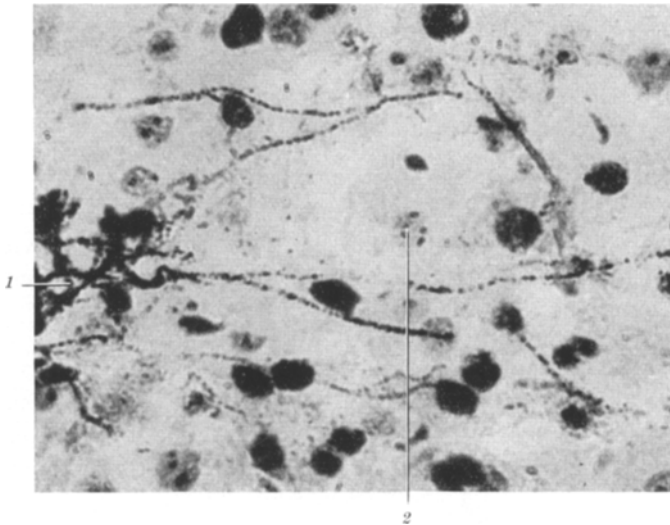


Abb. 4. Phosphoamidase der Leber. Peripherie eines Leberläppchens nach Allylalkoholvergiftung. Starke Vergrößerung. 1 Verzweigung der Pfortader. 2 Kernschwund und Schwund der feinfaserigen Strukturen im Fermentbild. 20stündige Inkubation.

mit einer kräftigen Reaktion ihre Lebensfähigkeit in diesem Gebiet beweisen. Bezeichnend für die Allylalkoholschädigung dürfte sein, daß in den betroffenen Bezirken das Glykogen völlig schwindet, in den erhaltenen Lebergeieten aber scharf abgesetzt noch nachweisbar ist und damit dieser feine Indicator besagt, daß die Leberschädigung sich im wesentlichen nur auf die befallenen Gebiete beschränkt, während man bei der Tetrachlorkohlenstoffvergiftung einen vollständigen Glykogenschwund des ganzen Leberläppchens sieht.

Bei der Phosphoamidasereaktion sind grobe Veränderungen auf den ersten Blick nicht zu erwarten, da das Ferment hauptsächlich an den Capillaren und Grenzflächen des Läppchenzentrums verankert ist, wo die Allylalkoholschädigung primär nicht angreift. Man findet auch hier einen fleckförmigen Ausfall der periportalten Felder (s. Abb. 3b), der sich hauptsächlich auf das Cytoplasma auswirkt, die Kerne nur teilweise betrifft. Sie sind bei genauerer Betrachtung im Vergleich zum Normal-

bild zu einem erheblichen Teil körnig aufgelockert oder nur schattenhaft angedeutet, wodurch sie ihre Schädigung ausdrücken. Die Kerne des Endothels und der KUPFFERSchen Sternzellen sind wohl am stärksten verändert und nur noch in geringer Zahl nachweisbar. Die feinsten gekörnten Fasern stellen sich nicht mehr dar oder nur noch zum Teil ihre groben Ausläufer (s. Abb. 4), was besagt, daß das Fermentsystem der Grenzfläche schwer getroffen ist.

Diese Störung der Enzyme weist erneut auf ihre Bedeutung für die Pathologie der Permeabilität und ergänzt und bestätigt die Ansicht EPPINGERS, daß der Allylalkohol hauptsächlich die Grenzmembranen angreift. Bemerkenswert ist, daß die tiefgreifende Schädigung der Zelle sich anfangs im Hämatoxylineosinpräparat nur in einem Zellkollaps mit Verdichtung und zunehmender Eosinophilie des Cytoplasmas demonstriert, die Kerne aber der Gestalt nach unverändert erscheinen, während die Glykogen- und Phosphatasereaktion im Plasma und im Kern schon weitgehend geschwunden ist, die Phosphoamidase aber die Kernschädigung bzw. den Zelluntergang erst in einem Teil der Zellkerne deutlich werden läßt.

Zusammenfassung.

1. Bei Vergiftung der Leber von Ratten mit Tetrachlorkohlenstoff tritt ein von der Zentralvene nach der Peripherie fortschreitender Schwund der Phosphoamidase ein, der vor allem die Capillarwände betrifft.

2. Nach Allylalkoholfütterung werden die periportaln Felder und die Läppchenperipherie geschädigt, die einen gegen das unbeteiligte Lebergewebe scharf abgegrenzten Verlust der alkalischen Phosphatase zeigen, während die Phosphoamidase im Cytoplasma der Zellen gänzlich, in den Kernen nur teilweise schwindet.

3. Die Befunde weisen erneut auf die Bedeutung dysenzymatischer Vorgänge, die die Permeabilität der Blutgewebsschranke und den funktionellen Ablauf innerhalb des Leberläppchens unter pathologischen Bedingungen wesentlich beeinflussen.

Literatur.

EGER, W.: Z. Path. **91**, 255 (1954). — EGER, W., u. H. F. GELLER: Virchows Arch. **322**, 645 (1952). — EGER, W., u. W. SCHULTE: Zum Nachweis der Phosphoamidase im Leber- und Nierengewebe. Acta histochem. **1**, 60 (1954). — EPPINGER, H.: Die Permeabilitätspathologie. Wien: Springer 1949. — FEYRTER, F.: Disk.-Bem. zum Vortrag GIGENSOHN. Verh. dtsch. path. Ges. **36**, 428 (1953). — GOMORI, G.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **69**, 407 (1948). — PEARSE, A.G.E.: Histochemistry, S. 250 u. 251. London: J. & A. Churchill Ltd. 1953.

Dr. W. EGER, Göttingen, Pathologisches Institut der Universität.