

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Köln
(Direktor: Prof. Dr. ERNST LEUPOLD).

Über das Verhalten der histochemisch nachweisbaren alkalischen Phosphatase und 5-Nucleotidase im Sauerstoffmangel und im Niereninfarkt*.

Von

A. GOEBEL und H. PUCHTLER.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. Juni 1954.)

Bei den bekannten Schwierigkeiten, Sauerstoffmangelwirkungen auf den Stoffwechsel und die Strukturen zu erklären, ist die Vermutung geäußert worden (OPITZ und SCHNEIDER 1950), daß diese bei O₂-Spannungen, die noch nicht zu einer Herabsetzung der Atmung führen, durch Wirkungen des O₂-Mangels auf sauerstoffdruckempfindliche Fermente zustande kommen. Von OPITZ und SCHNEIDER werden einige Fermentreaktionen angeführt, für die eine Abhängigkeit vom Sauerstoffteildruck besteht, z. B. die PASTEUR-MEYERHOFSche Reaktion, die Hydrolyse von Arginin u. ä. In eigenen Untersuchungen (1954) war auf die Möglichkeit hingewiesen worden, daß als Vermittler zwischen Sauerstoffmangel und seinen Wirkungen auf den Stoffwechsel die Drüsen mit innerer Sekretion, insbesondere die Schilddrüse, eingeschaltet seien, wobei an eine Wirkung der Inkrete auf Fermentprozesse gedacht wurde.

Auf die Bedeutung von Fermentprozessen und ihren Störungen für das Zustandekommen bestimmter morphologischer Zustandsbilder ist namentlich von DOERR und BECKER (1951) und BECKER und RIEKEN (1954) hingewiesen worden. Für manche morphologische Änderungen bei der Entwicklung der Nekrose werden neben physikalisch-chemischen Zustandsänderungen im nekrotischen Gebiet Fermente angeschuldigt. Von GROLL (1949) wird den Proteinasen, von LETTERER (1948) den Amidasen und Polynucleotidasen eine besondere Bedeutung beigemessen. Das Verhalten dieser Fermente würde daher besonders interessieren.

In der Absicht, solchen Fermentreaktionen im Sauerstoffmangel und bei den Absterbevorgängen im Gewebe nachzugehen, interessieren vom Standpunkt der Morphologie besonders die histochemisch darstellbaren. Bei Durchsicht der Literatur konnten nur vereinzelte hierhin gehörige Beobachtungen festgestellt werden (CHESSICK 1954, GOMORI, persönliche Mitteilung, HERLANT und TIMIRAS 1950, KRITZLER und BEAUBIN 1949,

* Herrn Prof. Dr. ERNST LEUPOLD zum 70. Geburtstag in Dankbarkeit und Verehrung.

MELLORS und SUGIURA 1948, STOWELL, LEE und TSUBOI 1950). Es standen unter anderem die Methoden zum Nachweis der alkalischen Phosphatase und der 5-Nucleotidase zur Verfügung. Gleichzeitig durchgeführte Untersuchungen des Glykogengehaltes, der Temperatur und des Sauerstoffverbrauchs geben gewisse Anhaltspunkte dafür, ob, in welchem Maße und an welchen Stoffwechselteilvergängen Umstellungen erfolgt sind. Im Zusammenhang mit diesen Stoffwechseländerungen, an denen die verschiedenartigsten Fermente beteiligt sein dürften, könnte namentlich der Phosphatase eine besondere Bedeutung zukommen. Es war also festzustellen, ob und gegebenenfalls in welchem Sinne und Ausmaße histochemisch nachweisbare Fermentaktivitäten sich änderten und dadurch ihre Wirksamkeit bei den entstehenden Strukturveränderungen zu erkennen geben würden. Da nach den Untersuchungen über die physikalische Chemie des Infarkts (BAYERLE und BORGER 1939, KOLLER und LEUTHARDT 1934) bei der Nekrose eine alkalische Reaktion herrscht, besteht für die bei dieser Reaktion wirksamen Fermente ein besonderes Interesse.

Material und Methodik.

Die Versuche wurden an Ratten und Fröschen durchgeführt. Die 1. Versuchsreihe bestand aus Ratten, die einem Sauerstoffmangel bis zu 7% in dem früher mitgeteilten (GOEBEL und KLANTKE 1953) geschlossenen Respirationssystem unterworfen wurden, das die Einstellung eines beliebig wählbaren Sauerstoffpartialdrucks bei einem dem normalen Luftdruck entsprechenden Gesamtdruck gestattet. Da frühere Arbeiten bei einem Sauerstoffgehalt von 7% eindeutige Stoffwechselminderung sowie deutliche morphologische Veränderungen — Entglykogenisierung, Verfettung und Vacuolenbildung der Leber u. a. — ergeben hatten, wurde für die Untersuchung der alkalischen Phosphatase im Sauerstoffmangel die gleiche Sauerstoffspannung gewählt.

In einer Serie wurde der O_2 -Gehalt der Atemluft innerhalb 30 min von 21% auf 7% gesenkt, in einer 2. Serie erfolgte der Übergang von 21% auf 7% stufenweise, wobei die Ratten jeweils 3 Std 15%, 13%, 11% und 9% Sauerstoff bei normalem atmosphärischem Druck erhielten. Die Tiere beider Serien wurden 1—7 Std bei einem Sauerstoffpartialdruck von 7% gehalten und wurden entweder sofort nach Öffnen des Respirationsapparates oder nach 6stündiger Erholungszeit in normalem Luftgemisch durch Dekapitation getötet.

Die 2. Versuchsreihe bestand aus Fröschen. Für die Sauerstoffmangelversuche wurde ein vereinfachtes Modell der oben angegebenen Apparatur verwandt, da eine O_2 -Zufuhr während des Versuchs nicht erforderlich war. Als Atmungsgemisch diente Bombenstickstoff mit weniger als 0,1% O_2 , der vor dem Einstromen in die Apparatur durch 3 Waschflaschen mit alkalischer Pyrogallollösung geleitet wurde. Der Gasdruck in der Apparatur entsprach dem normalen atmosphärischen Druck. Die Temperatur betrug $15 \pm 1^\circ C$ bzw. $5 \pm 1^\circ C$. Um Austrocknungserscheinungen zu vermeiden, war der Boden des Tierkäfigs mit Wasser bedeckt. Es wurden jeweils 3—5 Tiere gleichzeitig in den Respirationsapparat gebracht, um völlig identische Versuchsbedingungen zu haben. Die Tiere wurden innerhalb von 5 min in Bombenstickstoff mit weniger als 0,1% O_2 eingeschleust, die Versuchsdauer betrug $\frac{1}{2}$, 1, 2, 4, 8 und 13 Std. Ein Teil der Tiere wurde sofort nach Öffnen des Respirationsapparates durch Dekapitation getötet; bei einigen Tieren wurde bei

normaler Atmosphäre eine Erholungszeit verschiedener Dauer angeschlossen und die Tiere dann durch Dekapitation getötet.

Bei der 3. Versuchsreihe wurde eine KCN-Vergiftung an Ratten durchgeführt. In Anlehnung an frühere Versuche (GOEBEL und Mitarbeiter 1952) wurde eine 1‰ige KCN-Lösung verwandt. Die unmittelbar vor Versuchsbeginn frisch zubereitete Lösung wurde subcutan injiziert. In einer 1. Serie wurde nach Feststellung der Rectaltemperatur 0,5—1 cm³ der KCN-Lösung injiziert. Weitere Injektionen von 0,5—0,75 cm³ KCN-Lösung erfolgten in Abständen von 20—30 min nach vorheriger Messung der Körpertemperatur. Zeitpunkt der Injektion und Höhe der Dosis richteten sich nach dem Verhalten der Tiere und der Rectaltemperatur, wobei versucht wurde, die Körpertemperatur auf möglichst niedrigen Werten zu halten. Die Versuchsdauer betrug 3—9 Std, die Gesamtmenge der injizierten KCN-Lösung 5,75—8,75 cm³ = 5,75—8,75 mg KCN. — In einer 2. Serie wurden wiederholt größere Dosen von 1—1,75 cm³ der 1‰igen KCN-Lösung verabreicht. Versuchsdauer 1—4 Std, Gesamtmenge der injizierten KCN-Lösung 4—5,5 cm³ = 4—5,5 mg KCN. — In einer 3. Serie wurden die Tiere nach Injektion der KCN-Lösung im Thermostaten bei 37° C gehalten.

In einer weiteren (4.) Versuchsreihe wurde lediglich die Niere von Ratten, und zwar nach verschieden lange Zeit dauernder Ligatur des Hauptstammes der Nierenarterie am Hilus einer Niere untersucht.

Die Organe der Tiere wurden teilweise in Formol und CARNOYScher Lösung fixiert und an Gefrierschnitten und an in Paraffin eingebettetem Material H.E.-Färbung, Fettfärbung, Glykogennachweis (Best, PAS), Azanfärbung nach HEIDENHAIN, Trichromfärbung nach GOMORI und Nuclealreaktion nach FEULGEN durchgeführt.

Vom gleichen Material (Herz, Leber und Nieren) wurden Stücke in eiskaltem Aceton fixiert und histochemisch auf alkalische Phosphatase und 5-Nucleotidase entsprechend den von GOMORI (1949, 1951, 1952) angegebenen Methoden untersucht.

Ergebnisse.

Serie I: Sauerstoffmangel 7% in verschiedener Methodik bei Ratten.

Eine Untersuchung der alkalischen Phosphatase erbrachte keine Unterschiede gegenüber dem Verhalten bei Normaltieren an Herz, Leber und Nieren. Soweit das histochemische Bild eine mengenmäßige Beurteilung der Phosphataseaktivität zuläßt, war die Aktivität bei Versuchs- und Kontrolltieren die gleiche. Dazu ist einschränkend zu sagen, daß Leber und Herz, die Organe der wesentlichsten Sauerstoffmangelwirkungen, schon normalerweise nicht sehr reich an alkalischer Phosphatase sind (GOMORI 1941, BOURNE 1943, MAENGWYN-DAVIES und FRIEDENWALD 1950). Andererseits sind wesentliche Sauerstoffmangelwirkungen an der Niere, wo die alkalische Phosphatase sehr eindrucksvoll nachweisbar ist, nicht zu erwarten.

Das Ergebnis stimmt überein mit den Versuchsergebnissen von CHESSICK (1954) und GOMORI (persönliche Mitteilung). Diese konnten weder bei chemischer noch histochemischer Untersuchung im bis zum Tode führenden Sauerstoffmangel an Ratten Veränderungen der Aktivität der alkalischen Phosphatase und der 5-Nucleotidase beobachten. In gleicher Weise konnte von HERLANT und TIMIRAS (1950) bei 48stündigem O₂-Mangel mit 235—245 mm Hg Gesamtdruck = etwas niedriger

als 7% O_2 keine Abnahme der Aktivität der alkalischen Phosphatase in der Niere, jedoch eine geringe Zunahme in der Leber festgestellt werden.

Das negative Resultat läßt folgende Deutungen zu: Der Sauerstoffmangel ruft an der alkalischen Phosphatase überhaupt keine Verände-

rung hervor und hat keine Wirkung auf dieses Ferment, oder die angewandte Intensität des O_2 -Mangels und Dauer des Versuchs sind nicht ausreichend gewesen. Eine Entscheidung dieser Frage ist auf Grund der hier mitgeteilten Versuche an der Ratte nicht möglich, da ein intensiver durchgeführter O_2 -Mangel bei Ratten nur kurze Zeit überstanden wird.

Serie II: Versuche am Frosch.

Es erschien aussichtsreich, am Frosch ähnliche Versuche durchzuführen. Dabei ergab sich die Möglichkeit, unter extremen Bedingungen zu arbeiten, da der Frosch in absoluten O_2 -Mangel gebracht werden konnte.

Versuche bei 15° C: Im Sauerstoffmangel fand sich im histochemischen Bild in Herz, Leber und Nieren der Frösche eine Abnahme der Aktivität der alkalischen Phosphatase. Sie war bereits sehr frühzeitig — schon nach $\frac{1}{2}$ stündigem Sauerstoffmangel — sicher nachweisbar, besonders deutlich an Herz und Leber. Mit zunehmender Versuchsdauer wurde die Phosphataseaktivität immer geringer. Nach 2 und 4 Std war

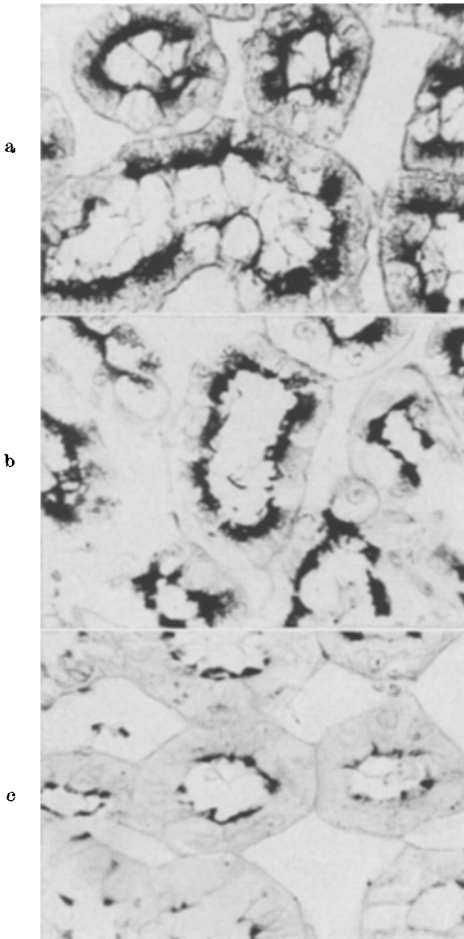


Abb. 1a — c. Niere. Frosch, alkalische Phosphatase nach GOMORI 1951. Vergr. 450fach. a Normal. b Nach $\frac{1}{2}$ Std Sauerstoffmangel bei 15° C. c Nach 2 Std Sauerstoffmangel bei 15° C.

nur noch bei wenigen Tieren eine geringe Reaktion der Bürstensäume der Tubulusepithelien in der Niere und einiger Capillarendothelien in Leber und Herz vorhanden; die meisten Präparate blieben auch bei $2\frac{1}{2}$ stündiger Bebrütung völlig negativ. Eine Verlängerung der Bebrü-

tungszeit schien wegen der Gefahr des Auftretens von Diffusionsartefakten in den Schnitten der unbehandelten Kontrolltiere unzumutbar. Nach 8 und 13 Std Sauerstoffmangel war im gesamten untersuchten Material keine Phosphataseaktivität mehr nachweisbar.

Versuche bei 5° C: Wurden die Tiere während des Sauerstoffmangels bei einer Umgebungstemperatur von 5° C gehalten, so war die Abnahme der Aktivität der alkalischen Phosphatase in den ersten Stunden weniger stark ausgeprägt. Nach 8stündiger Versuchsdauer kam es aber auch in dieser Serie zu einem völligen Verschwinden der histochemisch nachweisbaren Fermentaktivität in allen untersuchten Organen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Frösche nach einem 13stündigem Sauerstoffmangel und anschließender 11stündiger Erholung in normalem Luftgemisch getötet. Unter diesen Bedingungen zeigten Leber und Niere wieder deutliche Phosphataseaktivität, während bei den sofort nach Beendigung des Sauerstoffmangels getöteten Tieren in keinem Fall Fermentaktivität nachweisbar war. Dies stimmt überein mit Ergebnissen aus früheren Versuchsreihen, die ebenfalls mit der oben angegebenen Methodik durchgeführt wurden. Bei Tieren, die 1—7 Tage nach Beendigung des Sauerstoff-

mangels getötet worden waren, fand sich gegenüber den sofort nach Öffnen des Respirationsapparates dekapitierten Fröschen eine weitgehende bis völlige Rückbildung der morphologischen Veränderungen in Gehirn, Leber, Niere und Herz (GOEBEL und PUCHTLER, unveröffentlicht).

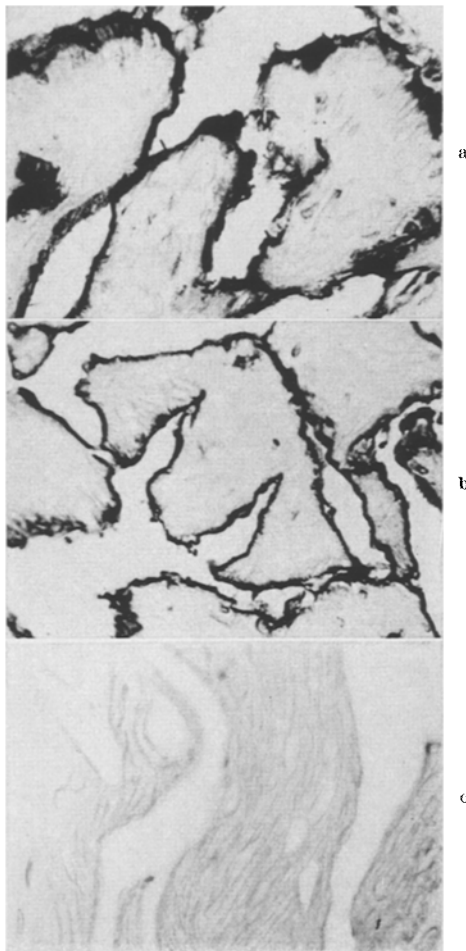


Abb. 2a—c. Herz. Frosch, alkalische Phosphatase nach GOMORI 1951. Vergr. 450fach. a Normal. b Nach $\frac{1}{2}$ Std Sauerstoffmangel bei 15° C. c Nach 2 Std Sauerstoffmangel bei 15° C.

Diese Versuche scheinen demnach eine Bestätigung dafür zu sein, daß der Sauerstoffmangel bei höheren Intensitätsgraden sehr wohl Wirkungen an der alkalischen Phosphatase entfaltet. Besonders wesentlich sind die Ergebnisse an Leber und Herzmuskel. An diesen Organen

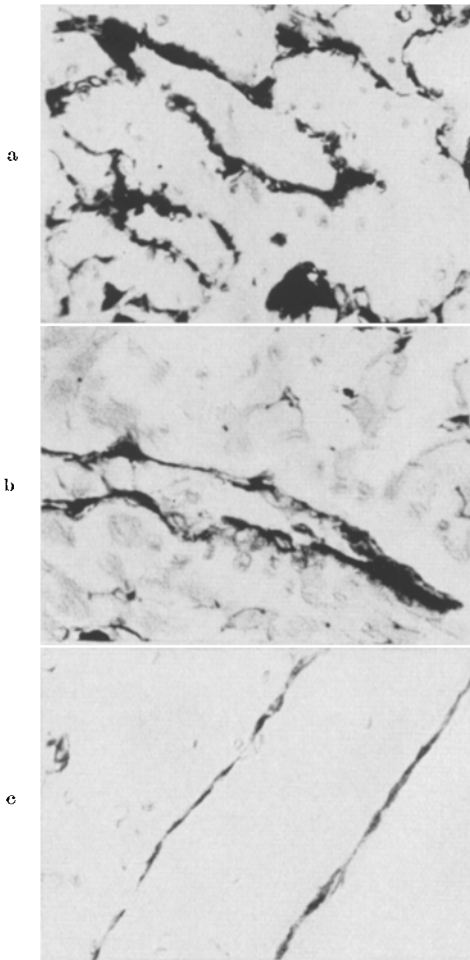


Abb. 3a—c. Leber. Frosch, alkalische Phosphatase nach GOMORI 1951. Vergr. 450fach.
a Normal. b Nach $\frac{1}{2}$ Std Sauerstoffmangel bei 15° C. c Nach 2 Std Sauerstoffmangel bei 15° C.

ist beim Frosch die Capillarmembran durch die Phosphatasemethode dargestellt. Die Aktivität der Capillarmembran nimmt mit zunehmender Dauer des O₂-Mangels ab. Aus zahlreichen Versuchen, insbesondere der BÜCHNERSCHEN Schule (BÜCHNER 1944, ALTMANN 1944, 1949) ist eine Veränderung der Permeabilität im O₂-Mangel bekannt. Mit den beschriebenen Versuchen ist ein weiterer Hinweis dafür erbracht, daß der O₂-Mangel neben Wirkungen auf die Parenchyme auch solche an der Blut-Gewebsschranke hat. Inwieweit diese Resultate am Frosch auf den Warmblüter übertragbar sind, sei dahingestellt.

Von wesentlicher Bedeutung ist offensichtlich der Temperaturfaktor. Steigerung der Temperatur führt zu wesentlich stärkerem und rascherem Verlust der Fermentaktivität. Die Bedeutung der Temperatur geht aus eigenen früheren Beobachtungen bei O₂-Mangelversuchen an Kaninchen und Katzen (GOEBEL und KLANTKE 1953) und bei CO-Vergiftung an Ratten (GOEBEL, unveröffentlicht) hervor. In diesen Versuchen wurde

festgestellt, daß Konstanterhaltung der Körpertemperatur wesentlich rascher den Tod der Tiere zur Folge hat als niedrige Umgebungstemperatur, bei der die Körpertemperatur im O₂-Mangel sinkt. Diese Beobachtung deckt sich mit Erfahrungen an unterkühlten Extremitäten:

Die Gewebszeitreserve ist im abgekühlten Hundebein nach ESMARCH-scher Blutleere bedeutend länger als im erwärmten Bein (SCHWIEGK und SCHÖTTLER 1943).

Eine Ausdeutung der Resultate dürfte erst nach Kenntnis der weiteren Versuchsergebnisse möglich sein. Aus den Resultaten scheint zunächst der Schluß erlaubt, daß ein schwererer O_2 -Mangel zu Veränderungen der Fermentaktivität der alkalischen Phosphatase führt. Es war nun zu untersuchen, ob ein Sauerstoffmangel, dessen Angriffspunkt im Gewebsstoffwechsel nach unseren derzeitigen Kenntnissen genau bekannt ist, am Warmblüter eine Wirksamkeit an diesem Ferment zu entfalten vermag. Als eine solche Sauerstoffmangelform ist die Cyankaliumvergiftung bekannt.

Serie III: KCN-Vergiftung.

Das Verhalten der alkalischen Phosphatase nach KCN-Vergiftung war nicht ganz einheitlich. In der Leber war fast bei allen Tieren die Phosphataseaktivität nach 1—3 Std geschwunden. In einigen wenigen Fällen war noch an KUPFFERSchen Sternzellen ein geringes Maß an Aktivität nachzuweisen. Im Herzmuskel war gleichfalls fast überall, bis auf Spuren in den Capillaren, die alkalische Phosphatase geschwunden. An den Nieren war bei einigen Tieren, deren Körpertemperatur infolge der KCN-Vergiftung rasch sank, die Phosphataseaktivität noch verhältnismäßig gut erhalten. Bei den anderen Tieren mit langsamer Temperaturerniedrigung war dagegen nach etwa 3—4 Std die Aktivität entsprechend geschwunden. Das gilt in ganz besonderem Maße für diejenigen Tiere, die im Thermostaten bei 37° C gehalten worden waren.

Ein ähnliches Verhalten wies die 5-Nucleotidase auf. Auch hier war das konstanteste Versuchsergebnis an Leber und Herzmuskel vorhanden, mit einem im allgemeinen völligen Schwund des Ferments. An den Nieren war ebenso wie bei der alkalischen Phosphatase im allgemeinen eine starke Minderung, in wenigen Fällen, die mit der alkalischen Phosphatase übereinstimmen, nur eine geringe Abnahme der Aktivität nachweisbar.

Im übrigen war am Herzen eine weitgehende Entglykogenisierung, bis zum völligen Schwund des Glykogens, in der Leber gleichfalls eine Abnahme des Glykogens, beginnend im Läppchenzentrum, mit Übergreifen auf das ganze Läppchen vorhanden. Ferner konnten in Leberzellen vielfach vacuoläre Zellveränderungen beobachtet werden, namentlich bei den Versuchstieren, bei denen im Thermostaten die Temperatur konstant auf 37° C gehalten worden war. Weitere morphologische Feststellungen sollen in diesem Zusammenhang nicht erörtert werden.

Das Verhalten der alkalischen Phosphatase bei den mit KCN vergifteten Tieren steht in auffallendem Gegensatz zu dem Resultat bei allgemeinem atemluftbedingten O_2 -Mangel an der Ratte, über die oben berichtet wurde.

Zur Deutung des Resultats ist eine kurze Erörterung des Wirkungsmechanismus der KCN-Vergiftung notwendig. Nach unseren derzeitigen Kenntnissen greift das KCN an den eisenhaltigen Zellfermenten an und macht durch Bildung komplexer Salze an diesen die Sauerstoffanlagerung unmöglich. Bei in vitro-Versuchen konnte

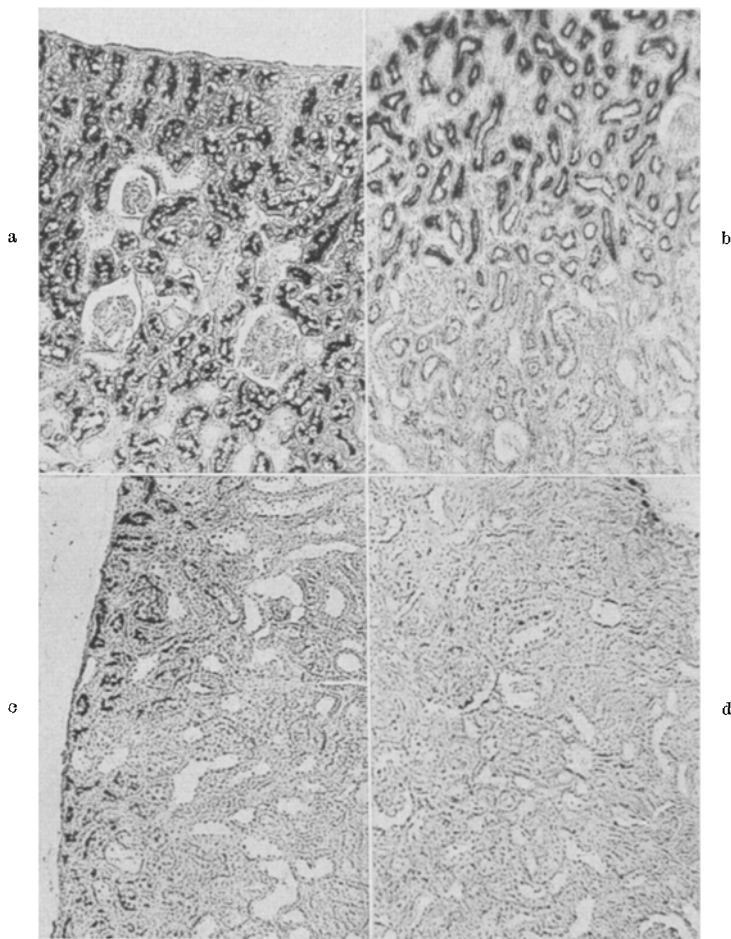


Abb. 4a—d. KCN-Vergiftung. Rattenniere, alkalische Phosphatase nach GOMORI 1951. Vergr. 100fach. a Normal. b 8 mg KCN in wiederholten Dosen von 0,5—0,75 mg injiziert, Versuchsdauer 4 Std, Körpertemperatur 25,2° C. c 5,5 mg KCN in wiederholten Dosen von 0,5—0,75 mg injiziert, Versuchsdauer 3 Std, Körpertemperatur 29,8° C. d 5 mg KCN in wiederholten Dosen von 0,75 mg injiziert, Versuchsdauer 3½ Std, Körpertemperatur im Thermostat bei 37° gehalten.

eine Phosphatasehemmung durch KCN festgestellt werden (ALBERS 1940, EMMEL 1946). Jedoch ist eine unmittelbare Hemmung der Phosphatase durch Blausäure unwahrscheinlich. Von BERSIN (1940) wird sogar eine Steigerung der Aktivität angegeben. Eine indirekte Wirkung der Blausäure auf die alkalische Phosphatase ist denkbar, und zwar auf einem ähnlichen Wege, wie er früher für die Wirkung

der verschiedenen Formen des O_2 -Mangels, unter anderem der KCN-Vergiftung, in der Phosphatidbildung angenommen wurde.

Die Resultate verlangen nicht zwingend den Schluß, daß ein unmittelbarer Angriff des Cyanids an diesen Fermenten vorliegt. Eine unmittelbare Wirkung ist deshalb schon unwahrscheinlich, weil entsprechend der raschen Blockade der eisenhaltigen Fermente durch das KCN eine schnellere Inaktivierung der Phosphatasen nachweisbar sein müßte. Eine mittelbare Beeinflussung wäre dagegen sehr wohl vorstellbar, etwa derart, daß infolge der Blockade eisenhaltiger Zellfermente eine mangelhafte Energielieferung für energiebedürftige Prozesse vorliegt, zu denen man die Phosphatasebereitstellung rechnen muß.

Das Verschwinden der Aktivität der alkalischen Phosphatase ist offensichtlich — in Parallele zu anderen energetischen Prozessen — temperaturabhängig; das geht aus dem rascheren Verschwinden der Aktivität bei Aufenthalt der vergifteten Tiere im Brutschrank wie aus der langsameren Abnahme der Aktivität bei raschem Temperatursturz nach KCN-Vergiftung hervor.

Die Resultate dieser Versuchsreihe können demnach als Hinweis darauf aufgefaßt werden, daß der O_2 -Mangel nicht unmittelbar an der alkalischen Phosphatase angreift, sondern möglicherweise über eine Hemmung der für die Phosphataseaktivität notwendigen Energielieferung, die aus der biologischen Oxydation gewonnen wird. Die Reaktivierung der Phosphatase in der Erholungszeit nach Aufhören des O_2 -Mangels kann durch Verbrennung der Schlacken und erneute Energiegewinnung erfolgen.

Serie IV: Unterbindung der Nierenarterie.

Nach dieser Auffassung müßte ein Verschwinden der Fermentaktivität auch bei totaler Anoxie nach Unterbindung einer Arterie nachweisbar sein. — Damit sollen keineswegs die bei der totalen Anoxie ablaufenden Prozesse mit denen bei relativem O_2 -Mangel identifiziert werden. — Es konnte nach Unterbindung der Nierenschlagader konstant festgestellt werden, daß nach 75 min ein erhebliche Abnahme der Aktivität nachweisbar ist. Nach 15 min fand sich kein Unterschied gegenüber der Norm. Nach 2 Std war nur noch wenig Aktivität vorhanden. Immer war ein schmaler Randsaum erhaltener Aktivität (subkapsulär, besonders stark an den Polen) vorhanden. Das gleiche Ergebnis konnte für die 5-Nucleotidase festgestellt werden.

Wird die Sauerstoffzufuhr zu einem Organ plötzlich unterbrochen, wie es bei der Unterbindung einer Arterie der Fall ist, so vergeht einige Zeit, bis infolge der gesetzten Hypoxie reproduzierbare Störungen der Organtätigkeit einsetzen. Diese Zeit ist bei einem Organ wie der Niere mit der hohen Sauerstoffzehrung sicherlich sehr kurz, und wenn eine

unmittelbare Abhängigkeit der Aktivität der hier untersuchten Fermente vom Sauerstoffdruck bestünde, so müßte wesentlich früher eine Abnahme der Fermentaktivität nachweisbar sein. Nach 15 min war noch kein

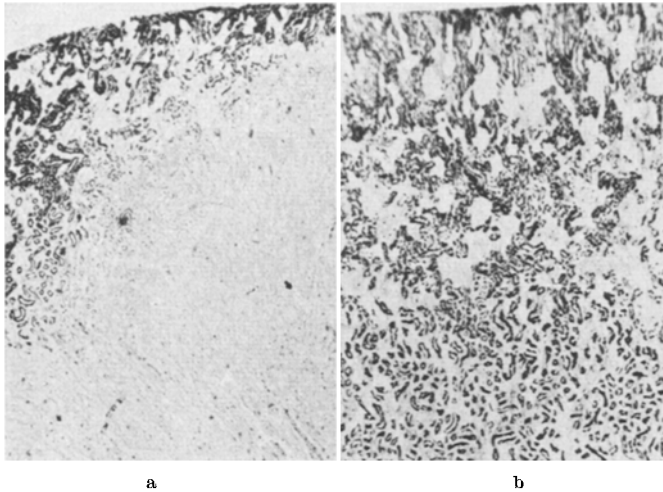


Abb. 5a u. b. Alkalische Phosphatase nach GOMORI 1951. Vergr. 30fach. a Nach Ligatur der Nierenarterie 75 min vor Tötung des Tieres. b Nicht unterbundene Niere des gleichen Tieres.

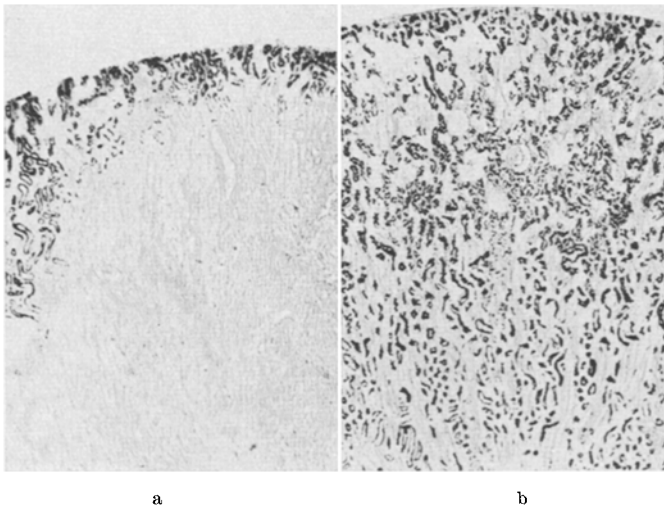


Abb. 6a u. b. 5-Nucleotidase nach GOMORI. Vergr. 30fach. a und b wie in Abb. 5.

deutlicher Unterschied festzustellen. Dieses Resultat spricht im Sinn der oben gegebenen Deutung, daß zwischen Sauerstoffmangel und Wirkung auf diese Fermente noch andere Prozesse zwischengeschaltet sind.

Zusammenfassende Erörterung.

Nach den Befunden ist als sicher anzunehmen, daß bei verschiedenen Sauerstoffmangelformen histochemisch Minderungen der Aktivität der alkalischen Phosphatase und 5-Nucleotidase auftreten. Die Deutung der Ergebnisse macht eine kurze Erörterung der hier vorliegenden pathologischen Zustandsbilder, der bei ihnen auftretenden Strukturveränderungen und der Aufgaben und des Wirkungsmechanismus der untersuchten Fermente erforderlich.

Man kann die Versuche nach der Art des durchgeführten O_2 -Mangels in 2 große Gruppen einteilen: In der 1. Gruppe ein relativer Sauerstoffmangel verschiedener Intensitätsgrade und Angriffspunkte, wie ihn BÜCHNER und seine Schule in vielfach abgewandelten Versuchen und praktischen Beobachtungen mit seinen Folgen auf die Strukturen dargestellt haben, in der 2. Gruppe, bei Unterbindung der Nierenarterie, die Versuche mit einer sich rasch entwickelnden völligen Anoxie. Bei den Versuchen in Gruppe 1 lag ein atemluftbedingter Sauerstoffmangel in Serie 1 und 2 vor. In der Serie 1 bestand bei Warmblütern ein als mittelschwer zu bezeichnender Sauerstoffmangel, bei dem wesentliche irreversible Strukturveränderungen an Herz, Leber und Niere in dieser Versuchsanordnung nicht beobachtet werden konnten. In Serie 2 lag sicher ein schwerer Sauerstoffmangel vor, der in einer Anzahl von Fällen den Tod der Frösche nach einigen Stunden zur Folge hatte. Bei der Deutung besteht insofern eine Schwierigkeit, als es sich hier um poikilotherme Lebewesen handelt, deren Verhalten im Sauerstoffmangel, wenigstens hinsichtlich der Strukturveränderungen, wenig untersucht ist. Bei den histologischen Untersuchungen konnten nur reversible Strukturveränderungen festgestellt werden (s. auch PFLÜGER 1875).

Im Falle der KCN-Vergiftung — Serie 3 — liegt eine histotoxische Hypoxydose vor, mit genau bekanntem Angriffspunkt des Giftes im Zellstoffwechsel. Daher sind die hier entstehenden Strukturveränderungen verhältnismäßig einfach zu deuten.

Bei der Unterbindung der Nierenarterie kommt zu dem sich rasch entwickelnden Sauerstoffmangel unter anderem noch eine Störung der Durchblutung; dieses Zustandsbild unterscheidet sich demnach von der 1. Gruppe durch den Grad des O_2 -Mangels, ferner durch die hier sicher vorhandene Durchblutungsstörung. Dabei treten die vom Infarkt her bekannten Nekrosen und Zonen auf. Die entstehenden morphologischen Strukturveränderungen wurden erstmalig von LETTERER (1934), als Folge dysorischer Einwirkung des umgebenden Blutes gedeutet. Das gilt besonders für die am frischen Infarkt zu beobachtende entkernte Randzone.

Es ist bekannt, daß sowohl bei atemluftbedingtem O_2 -Mangel, wie bei der KCN-Vergiftung, wie nach Unterbindung einer Arterie reversible und namentlich irreversible Strukturveränderungen auftreten können. Ob die bei absolutem und relativem Sauerstoffmangel entstehenden Gewebsschäden ursächlich und ihrer Entstehung nach gleich sind, kann hier unerörtert bleiben. In den hier mitgeteilten Untersuchungen kam es darauf an, festzustellen, ob und welche Fermentänderungen vor dem Manifestwerden der Strukturveränderungen histochemisch faßbar waren.

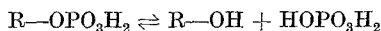
Für die beim Infarkt nachweisbaren Strukturveränderungen werden Fermente verantwortlich gemacht. Von CAIN (1943) wird angenommen, daß die Fermente von außen, mit dem Serum bzw. mit der Bauchhöhlenflüssigkeit einströmen. Demgegenüber betont LETTERER (1948) „...die Kernauflösung kann ebenso eine Wirkung zelleigener Fermente sein, die in einem an Alkali rasch zunehmenden Milieu ihre optimale Aktivität erlangen. Theoretisch könnten 2 Fermentgruppen in Frage kommen: Amidasen und Polynucleotidasen, beide im alkalischen wirksam. Es ist . . . wahrscheinlich, daß für die Kernverdauung im allgemeinen ein alkalisches Milieu Bedingung ist.“

Bei den hier nachgewiesenen Fermenten handelt es sich um im normalen Gewebe vorhandene Enzyme, für die ein Zustrom von außen kaum in Frage kommt. Ihre Aktivität nimmt im Infarkt ab. Es ist nun weiter die Frage, ob diese Fermente etwa durch aus der Blutbahn eingeströmtes Material inaktiviert werden oder durch Sauerstoffmangel mittelbar oder unmittelbar bedingt. Eine Inaktivierung durch aus der Blutbahn einströmendes Material ist unwahrscheinlich, weil dann die Abnahme in den peripheren Zonen früher einsetzen und stärker sein müßte als in den zentralen. Tatsächlich liegen die Verhältnisse umgekehrt.

Es bleibt also, nachdem die Zerstörung der Fermente durch von außen aus der Blutbahn einströmende Stoffe unwahrscheinlich ist, die Frage, wodurch die Hemmung der Fermentaktivität zustande kommt. Im wesentlichen stehen folgende Möglichkeiten zur Verfügung: durch Sauerstoffmangel; durch an Ort und Stelle infolge O_2 -Mangel entstehende Stoffwechselprodukte, die nicht abtransportiert werden und hemmend auf die Fermente wirken; ferner eine Hemmung der Fermentaktivität durch Abstrom bzw. Fehlen von Aktivatoren; Hemmung der Fermentwirksamkeit durch Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Substrat und Spaltprodukten nach der Seite der Spaltprodukte und schließlich da zur Resynthese der Phosphatase Energie notwendig ist, mangelhaft energetische Prozesse. Ob es möglich ist, die Inaktivierung der Ferment auf einen der genannten Faktoren zurückzuführen oder ob ein komplexer Vorgang mit Beteiligung mehrerer Bedingungen vorliegt, ist zunächst nicht zu entscheiden. Eine solche komplexe Wirkung von Fermente wird von EGER (1950) für wahrscheinlich gehalten.

Vor einer Diskussion dieser Fragen ist eine Darstellung der Eigenschaften der hier untersuchten Fermente notwendig.

Die alkalische Phosphatase spaltet Ester der allgemeinen Formel



bei einem p_H -Optimum um 9,3. Sie spaltet nur Monoester, z. B. Glycerophosphat, Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, Naphthylphosphat, Phenylphosphat, Hefeadenylsäure (GOMORI 1949, 1952, DANIELLI 1953). Für den Abbau der Muskeladenylsäure konnte ein besonderes Ferment, die 5-Nucleotidase nachgewiesen werden (REIS 1934, 1937/38, 1938/39, 1951, GULLAND und JACKSON 1938).

Etwa 5—10% der in den Zellen enthaltenen alkalischen Phosphatase befinden sich im Zellkern (NOVIKOFF 1951, LORCH 1947, YOKOYAMA, STOWELL und TSUBOI 1950). Beim Abbau der Nucleinsäuren sind die Polynucleotidase und die Nucleotidase von Bedeutung.

Polynucleotidasen haben die Aufgabe, aus den Polynucleotiden unter Sprengung der Zwischenbindungen die Nucleotide freizulegen. Die nativen hochmolekularen Polynucleotide werden von Polynucleotidase nicht angegriffen. Da die Auffassung besteht, daß in den Polynucleotiden die Bindungen zwischen den Nucleotiden über die Phosphorsäuregruppen verlaufen, so sind die Polynucleotidasen Phosphatasen. Die Polynucleotidase ist wahrscheinlich eine Phosphodiesterase mit Wirkungsoptima im alkalischen und im sauren Bereich (BREDERECK 1940). FRIEDENWALD und CROWELL (1949) gelang es, im nativen Gefrierschnitt bei Verwendung von depolymerisierter Desoxyribonucleinsäure als Substrat histochemisch das Vorhandensein dieses Ferments in verschiedenen Geweben nachzuweisen. ROSS und ELY (1949) kamen zu ähnlichen Ergebnissen.

Die Nucleotidasen haben die Aufgabe, in den Nucleotiden die am Zuckerhydroxyl haftende Phosphorsäure abzuspalten. Die Frage, ob die Nucleotidasen identisch sind mit der gewöhnlichen alkalischen Phosphatase, ist nicht eindeutig geklärt. Verschiedene Präparate spalten bei p_H 8,6—8,7 gleichmäßig Glycerinphosphorsäure und Hefeadenylsäure. REIS (1934, 1937/38, 1938/39, 1951) konnte neben dieser alkalischen Phosphatase eine für Muskeladenylsäure und Inosinsäure spezifische 5-Nucleotidase nachweisen. Das p_H -Optimum der 5-Nucleotidase liegt bei p_H 7—7,5.

Die alkalische Phosphatase wird durch anorganisches Phosphat stark gehemmt; das freigelegte anorganische Phosphat scheint die Phosphorsäureester vom Ferment verdrängen zu können. Nach SOSKIN und LEVINE (1952) kommt es im Sauerstoffmangel tatsächlich zu einer raschen Vermehrung des anorganischen Phosphats im Gewebe.

Für die Hemmung der Phosphatase sollen besonders die SH-SS-Systeme bedeutsam sein, wie sie für die Steuerung des Oxydo-Reduktionspotentials der Zellen eine Rolle spielen. Sulfhydrylkörper inaktivieren die Phosphatase in einer zeitlich langsamen Reaktion, Cystin als SS-Verbindung dagegen sehr rasch. Es wird angenommen, daß sie das gesamte Fermentmolekül durch eine chemische Reaktion derart beeinflussen, daß ein neues Molekül niedrigerer Aktivität entsteht (ALBERS 1940). Nach SOSKIN und LEVINE (1952) ist der Oxydations- bzw. Reduktionszustand der Sulfhydrylkörper sehr wahrscheinlich abhängig vom Sauerstoffpartialdruck. Hemmung der Phosphatasewirkung durch reduzierte Sulfhydrylkörper wird auch von anderen berichtet (MAJNO und ROULLIER 1951/52).

Enzyme sind wahrscheinlich amphotere Elektrolyte und eine Reihe von Versuchen deuten darauf hin, daß die ungeladenen Moleküle des Ampholyten die

kinetisch aktiven sind (MOELWYN-HUGHES 1940). — Von LAVES (1949) wird eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes der Gewebsweißkörper in der Nekrose angenommen.

Die Fermente sind Eiweißkörper, die in der Zelle einem dauernden Abbau und Neuaufbau unterliegen. Damit sind Möglichkeiten der Störung der Resynthese durch unzureichende Energiezufuhr im Sauerstoffmangel gegeben.

Der spezifische Aktivator für die im Alkalischen arbeitenden Phosphatasen ist das Magnesium. Mg-Ionen spielen eine wichtige Rolle bei allen physiologischen Vorgängen, die mit einer Phosphorsäureumesterung verknüpft sind (ALBERS 1940). Über das Verhalten des Magnesiums im Sauerstoffmangel sind keine Angaben zugänglich.

Nach diesen Darlegungen scheint folgende Deutung der Versuchsergebnisse denkbar: Eine unmittelbare Wirkung des O_2 -Mangels auf das Ferment ist, besonders nach den Ergebnissen bei Unterbindung der Nierenschlagader mit einer doch für diesen Eingriff langen Latenzzeit und bei der KCN-Vergiftung, unwahrscheinlich. Indirekte Wirkungen des O_2 -Mangels sind eher anzunehmen. Im vorliegenden Falle scheint sicher zu sein, daß die Wirkungen des O_2 -Mangels auf die Inaktivierung der Phosphatase und 5-Nucleotidase mittelbare sind. Von Bedeutung ist wahrscheinlich das infolge des Sauerstoffmangels entstehende Auftreten von Hemmstoffen: Vermehrung des anorganischen Phosphats, Auftreten reduzierter Sulfhydrylkörper, für die eine Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck angegeben wird. Ob und in welcher Form Störungen des Magnesiumstoffwechsels der Zelle und dadurch bedingte Inaktivierung des Ferments vorliegt, ist nicht zu entscheiden. Da im O_2 -Mangel Störungen des Elektrolytstoffwechsels, insbesondere des Kaliumstoffwechsels, und ein Abstrom von Kalium aus nekrotischem Gewebe (POPPEN, GREEN und WRENN 1953) bekannt sind, wäre eine derartige Möglichkeit vorstellbar. Von Bedeutung ist sicher die mangelnde Resynthese der Fermente durch unzureichende Energiezufuhr, für die im O_2 -Mangel hinreichend Anhaltspunkte vorliegen. Eine Entscheidung für die eine oder andere der vorhandenen Möglichkeiten ist nicht zu treffen. Es ist auch eher anzunehmen, daß bei so komplexen Vorgängen mehrere Faktoren eine Rolle spielen.

Zusammenfassung.

Bei Sauerstoffmangelversuchen durch Herabsetzung des O_2 -Gehaltes in der Atemluft konnte bei Fröschen eine Verminderung der Aktivität der alkalischen Phosphatase in Herz, Leber und Nieren festgestellt werden.

Das gleiche Ergebnis wurde bei Ratten nach subletaler KCN-Vergiftung beobachtet.

Nach Unterbindung der Nierenschlagader bei Ratten kam es gleichfalls zu einem weitgehenden Schwund der alkalischen Phosphatase und 5-Nucleotidase.

Die Verminderung der Aktivität der Fermente wird nicht als unmittelbare, sondern als mittelbare Wirkung des O_2 -Mangels aufgefaßt, wobei insbesondere auf das Auftreten von Hemmstoffen und mangelnde Energielieferung hingewiesen wird.

Herrn Prof. Dr. GOMORI sind wir für zahlreiche wertvolle Ratschläge und Hinweise zu großem Dank verpflichtet.

Literatur.

- ALBERS, H.: NORD u. WEIDENHAGENS Handbuch der Enzymologie. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft 1940. — ALTMANN, H. W.: (1) Frankf. Z. Path. **60**, 376 (1949). — (2) Verh. Dtsch. Path. Breslau 1944, S. 60. Stuttgart 1949. — BAYERLE, H., u. G. BORGER: Beitr. path. Anat. **103**, 215 (1939). — BECKER, V., u. E. RIEKEN: Virchows Arch. **325**, 1 (1954). — BERSIN, TH.: NORD u. WEIDENHAGENS Handbuch der Enzymologie, Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft 1940. — BOURNE, G.: Quart. J. Exp. Phys. **32**, 1 (1943). — BREDERECK, H.: NORD u. WEIDENHAGENS Handbuch der Enzymologie. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft 1940. — BÜCHNER, F.: Verh. Dtsch. Path. Breslau 1944, S. 20. Stuttgart 1949. — CAIN, H.: Frankf. Z. Path. **58**, 171 (1943). — CHESSICK, R. D.: J. Histochem. a. Cytochem. **2**, 122 (1954). — DANIELLI, J. F.: Cytochemistry. New York: John Wiley & Sons u. London: Chapman & Hall 1953. — DOERR, W., u. V. BECKER: Verh. dtsch. Ges. Path. **35**, 222 (1951). — EGER, W.: Ärztl. Forsch. **4**, 349 (1950). — EMMEL, V. M.: (1) Anat. Rec. **94**, 459 (1946). — (2) Anat. Rec. **96**, 423 (1946). — FRIEDENWALD, J. S., and J. E. CROWELL: Bull. Hopkins Hosp. **84**, 568 (1949). — GOEBEL, A., L. FRIEDERICI, H. K. FUKAS, W. MAURER u. W. NAGEL: Beitr. path. Anat. **112**, 36 (1952). — GOEBEL, A., u. W. KLANTKE: Z. exper. Med. **121**, 84 (1953). — GOEBEL, A., J. BORGHARD u. A. HUHN: Beitr. path. Anat. **114**, 117 (1954). — GOMORI, G.: (1) J. Cellul. a. Comp. Physiol. **17**, 71 (1941). — (2) Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **70**, 7 (1949). — (3) Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **72**, 449 (1949). — (4) J. Labor. a. Clin. Med. **37**, 526 (1951). — (5) Microscopic Histochemistry. Chicago: University Press 1952. — GROLL, H.: Virchows Arch. **316**, 384 (1949). — GULLAND, J. M., and E. M. JACKSON: Biochemic. J. **32**, 597 (1938). — HERLANT, M., and P. S. TIMIRAS: Endocrinology **46**, 243 (1950). — KOLLER, F., u. F. LEUTHARDT: Klin. Wschr. **1934**, 1527. — KRITZLER, R. A., and J. BEAUBIEN: Amer. J. Path. **25**, 1079 (1949). — LAVES, W.: Verh. dtsch. Ges. Path. **33**, 113 (1949). — LETTERER, E.: (1) Verh. dtsch. Ges. Path. **27**, 254 (1934). — (2) Naturforschung und Medizin in Deutschland 1939—1946, Bd. 70. Allgemeine Pathologie. 1948. — LORCH, I. J.: Quart. J. Microsc. Sci. **88**, 159 (1947). — MAENGWYN-DAVIES, G. D., and J. S. FRIEDENWALD: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **36**, 421 (1950). — MELLORS, R. C., and K. SUGIURA: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **67**, 242 (1948). — MOELWYN-HUGHES, E. A.: NORD u. WEIDENHAGENS Handbuch der Enzymologie. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft 1940. — NOVIKOFF, A. B.: Science (Lancaster, Pa.) **113**, 320 (1951). — OPITZ, E., u. M. SCHNEIDER: Erg. Physiol. **46**, 126 (1950). — PFLÜGER, E.: Arch. f. Physiol. **10**, 251 (1875). — POPPEN, K. J., D. M. GREEN and H. T. WRENN: J. Histochem. a. Cytochem. **1**, 160 (1953). — REIS, J.: (1) Bull. Soc. Chim. biol. Paris **16**, 385 (1934). —

(2) *Enzymologia* **2**, 110 (1937/38). — (3) *Enzymologia* **5**, 251 (1938/39). — (4) *Biochemic. J.* **48**, 548 (1951). — ROSS, M. H., and I. O. ELY: *J. Cellul. a. Comp. Physiol.* **34**, 71 (1949). — SCHWIEGK, H., u. W. SCHÖTTLER: *Klin. Wschr.* **22**, 477 (1943). — SOSKIN, S., and R. LEVINE: *Carbohydrate Metabolism*. Chicago: University Press 1952. — STOWELL, R. E., C. S. LEE and K. K. TSUBOI: *Amer. J. Path.* **26**, 687 (1950). — WACHSTEIN, M., and E. MEISEL: *J. Histochem. a. Cytochem.* **2**, 137 (1954). — YOKOYAMA, H. B., R. E. STOWELL and K. K. TSUBOI: *J. Nat. Canc. Inst.* **10**, 1367 (1950).

Dr. A. GOEBEL, Pathologisches Institut der Universität,
Köln-Lindenthal.
