

## Zur Histochemie der Lebercirrhose

J. HEINRICH HOLZNER

Pathologisch-Anatomisches Institut der Universität Wien  
(Vorstand: Prof. Dr. H. CHIARI)

Ein gegangen am 28. September 1965

Die oft mangelhafte Übereinstimmung zwischen dem histologischen Biopsiebefund einer Lebercirrhose einerseits und dem klinischen Bild bzw. den Ergebnissen der Leberfunktionsproben andererseits, führt zu einer gewissen Unsicherheit in der funktionellen und prognostischen Beurteilung einer Lebercirrhose aus dem histologischen Befund allein. Diese wird bedingt dadurch, daß eine einmalige Biopsie nur eine Momentaufnahme eines zeitlich ablaufenden Krankheitsprozesses darstellt, und daß mit den herkömmlichen histologischen Methoden nur relativ grobe morphologische Veränderungen der Zellen wahrgenommen werden können, während funktionelle Störungen mit eventuell schon folgenschweren Beeinträchtigungen des Gesamtstoffwechsels kaum erfassbar sind. Den morphologischen Veränderungen gehen funktionelle Störungen voraus, die durch biochemische und histochemische Gewebsuntersuchungen aufgedeckt werden können.

Der Zweck der vorliegenden Arbeit ist es, mit histochemischen Methoden für den speziellen Fall der Lebercirrhose an einem größeren menschlichen Untersuchungsmaterial Erfahrungen zu sammeln, die erhobenen histochemischen Befunde den histologischen Veränderungen, den Laborbefunden und den klinischen Symptomen gegenüberzustellen, und daraus Schlüsse für die praktische Anwendung dieser Methoden und die Beurteilung der erhobenen Befunde zu ziehen.

### Material

Zur Untersuchung gelangten 89 intravitale Leberbiopsien. Zum überwiegenden Teil waren es nach der Methode von MENGHINI blind gewonnene Nadelbiopsien, vereinzelt bei Laparotomien entnommene chirurgische Probeexcisionen. In Ergänzung dazu wurden die Lebern von 26 Obduktionsfällen untersucht.

Die Klassifizierung des Untersuchungsmaterials erfolgte im wesentlichen nach dem Vorschlag von POPPER auf Grund anatomischer Besonderheiten, die auf der Morphogenese des cirrhotischen Prozesses basieren, nicht jedoch die Ätiologie der Erkrankung berücksichtigen.

Das Untersuchungsmaterial ist in Tabelle 1 zusammengestellt. Beim Obduktionsmaterial war eine eindeutige Differenzierung zwischen septaler und postnekrotischer Cirrhose in allen Fällen möglich. Beim Biopsiematerial bereitet diese Unterscheidung immer wieder Schwierigkeiten, vor allem deshalb, weil der zur Untersuchung gelangende Gewebszylinder zu klein ist. Aus diesem Grund mußte hier neben der septalen und der postnekrotischen Cirrhose auch eine Gruppe ohne sichere Differenzierung zwischen den genannten zwei Cirrhoseformen eingeschoben werden. Innerhalb der einzelnen Gruppen wurde auch das Entwicklungsstadium des cirrhotischen Prozesses und das Vorliegen oder Fehlen einer funktionellen Dekompenstation berücksichtigt.

Tabelle I. Zusammenstellung des Untersuchungsmaterials

	Zahl der Fälle	Anmerkung
<i>Obduktionsfälle</i>		
Septale Cirrhose . . . . .	8	davon 2 Frühstadien 2 Fettcirrhosen
Postnekrotische Cirrhose . .	11	davon 5 Frühstadien 3 dekompensiert (akuter hepatischer Schub)
Biliäre Cirrhose . . . . .	4	
Hämochromatose . . . . .	1	
Cirrhosis carcinomatosa. . .	2	
<i>Biopsien</i>		
Septale Cirrhose . . . . .	18	davon 2 dekompensiert
Postnekrotische Cirrhose . .	27	davon 2 Frühstadien 7 dekompensiert (akuter hepatischer Schub)
Septal oder postnekrotisch (sichere Zuordnung nicht möglich)	25	davon 6 Frühstadien 4 dekompensiert
Biliäre Cirrhose . . . . .	4	
Hämochromatose . . . . .	5	
Morbus Wilson . . . . .	2	
Fibrosis hepatis . . . . .	8	davon 2 posthepatitisch 2 mit Fett

Beim Biopsiematerial sind acht Fälle von Leberfibrose enthalten. Die Diagnose einer Fibrose erfolgte dann, wenn lediglich eine Verbreiterung des portalen Bindegewebes vorlag, jedoch keine Anhaltspunkte für eine cirrhotische Strukturänderung des Leberparenchyms gefunden werden konnten.

## Methoden

### A. Obduktionsfälle

Leberstücke der Obduktionsfälle wurden nach Formolfixierung in Paraffin eingebettet und neben Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Bindegewebefärbung nach VAN GIESON, MALLORY und GÖMÖRI (Versilberung), sowie Berlinerblau-Reaktion zum Eisennachweis folgende Reaktionen durchgeführt:

1. Perjodsäure-Schiff-(PAS-)Reaktion ohne Vorbehandlung.

2. PAS-Reaktion nach vorheriger Einwirkung von a) Diastase (60 min, Zimmertemperatur, 0,5% in 0,12 m Phosphatpuffer, pH 6,0); b) Glucuronidase (2 Std, 37° C, 25 mg-% in 0,12 m Acetatpuffer, pH 4,5); c) Hyaluronidase (5 Std, 37° C, 0,5 mg/ml in 0,12 m Phosphatpuffer, pH 6,0); d) und Trypsin (3 Std, 37° C, 0,5% in 0,06 m Phosphatpuffer, pH 8,0).

3. PAS-Reaktion nach Acetylierung und Deacetylierung (BARKA).

4. Astrablauauffärbung nach PROCH.

5. Toluidinblauauffärbung (5% in Michaelis-Pufferlösung von pH 4,1; 5,6 und 6,5).

6. Dihydroxy-dinaphthyl-disulfid-(DDD-)Reaktion zum Nachweis proteingebundener Sulfhydrylgruppen nach BARRNETT und SELIGMAN.

7. Ninhydrin-Schiff-Reaktion nach YASUMA und ITCHIKAWA (BARKA).

An Gefrierschnitten wurden Lipidfärbungen mit Sudan III und Sudan-Schwarz B durchgeführt.

Bei positiver Lipidreaktion wurden Parallelschnitte vor der Färbung sowohl nach der Methode von KEILIG mit heißem Chloroform/Methanol und nach BAKER mit Pyridin extrahiert (Dauer der Extraktion 24 Std). Soweit unfixiertes Material vorhanden war, wurden gleichartige Extraktionen auch an unfixierten Schnitten vorgenommen.

Reaktionen zum Nachweis von Fermentaktivitäten wurden am Obduktionsmaterial nicht angestellt, da eine einheitliche Verarbeitung des Materials (konstante Zeit zwischen Tod und Gewebsentnahme) nicht gewährleistet war.

### B. Nadelbiopsien

Die Nadelbiopsien wurden unmittelbar nach der Entnahme nach Möglichkeit in drei, mindestens jedoch in zwei annähernd gleichgroße Stücke geteilt. Von diesen wurde eines nach der Formolfixierung in Paraffin eingebettet und in der üblichen Weise weiter histologisch verarbeitet.

Ein zweites Leberstückchen wurde 20—24 Std bei Eiskastentemperatur (0—4° C) in neutralem (pH 7,0—7,2) Formol-Calcium nach BAKER fixiert. An 5—10  $\mu$  dicken Gefrierschnitten wurden die nachstehenden Reaktionen angestellt:

1. Unspezifische saure Phosphatase: Metallsalz-(Blei-)Methode nach GÖMÖRI (Substrat: Na- $\alpha$ -Glycerophosphat, Inkubation 60 min bei 37° C, pH 5,0); Diazo-Methode nach BARKA (Substrat:  $\alpha$ -Naphthylphosphat, Azofarbstoff: diazotiertes Pararosanilin, Inkubation 20 min bei 37° C, pH 5,0).

2. Unspezifische alkalische Phosphatase: Metallsalz-(Calcium-Cobalt-)Methode nach GÖMÖRI (Substrat: Na- $\alpha$ -Glycerophosphat, Inkubation 60 min bei 37° C, pH 8,3—8,6). Diazomethode nach BURSTONE (Substrat: Naphtol-AS-Phosphat; Azofarbstoff: Red-Violet-LB; Inkubation 60 min bei 37° C, pH 8,3—8,6).

3. Adenosintriphosphatase (ATP-ase) nach WACHSTEIN und MEISEL (Inkubation 45 min bei 37° C, pH 7,2—7,4).

4. Unspezifische Esterase: Indoxyl-Aacetat-Methode nach PEARSON und DEFENDI (Substrat: 5-Bromo-indoxyl-acetat, Inkubationszeit 20 min bei Zimmertemperatur, pH 5,3).

5. 5-Nucleotidase nach WACHSTEIN und MEISEL (Inkubationszeit 45 min bei 37° C, pH 7,2—7,4).

Bei genügend Material wurde ein drittes Gewebsstückchen sofort nach der Entnahme in einem vorbereiteten, mit Kohlensäureschnee gefüllten Dewargefäß eingefroren. Innerhalb von 24 Std wurden 5—8  $\mu$  dicke Kryostatschnitte (Kryostat-System DITTES-DUSPIVA) angefertigt, dieselben auf Deckgläser montiert und für folgende Fermentreaktionen inkubiert:

1. Bernsteinsäure-Dehydrogenase: Nitro-BT-Methode nach NACHLAS u. Mitarb. (Inkubationszeit: 60 min bei 37° C, pH 7,6).

2. Diphosphopyridinucleotid-(DPN-)Diaphorase nach NACHLAS, WALKER, SELIGMAN (Inkubationszeit: 20 min bei Zimmertemperatur).

Um vergleichbare Resultate zu erhalten, wurden die Schnitte für die enzymhistochemischen Reaktionen unter konstanten Bedingungen (sofortige Fixierung, konstante Fixationszeit und Temperatur, konstante Inkubationszeit und Temperatur etc.) verarbeitet. Zum Ausschluß unspezifischer Reaktionen wurden Kontrollen mit inaktivierten Schnitten (Vorbehandlung mit 10% Trichloressigsäure, Hitzeinaktivierung), bzw. Inkubation aktiver Schnitte in substratfreiem Inkubationsmedium durchgeführt.

### Ergebnisse

#### A. Kohlenhydrate

Bei *septaler Cirrhose* wechselt der Glykogengehalt der Zellen außerordentlich stark. Bei starker Fettablagerung im Cytoplasma ist kein Glykogen nachweisbar. Ebenso ist die Glykogenreaktion bei degenerativ veränderten Zellen mehr oder weniger stark reduziert, und es fehlt in nekrobiotischen Elementen völlig. Innerhalb eines Pseudolobulus besteht keine gleichmäßige Verteilung. Die zentralen Abschnitte sind zumeist glykogenreicher, die den Septen benachbarten Zellgruppen glykogenfrei.

*Postnekrotische Cirrhosen* sind durch eine besondere Glykogenarmut ausgezeichnet. Fälle, bei denen Anzeichen eines frischen hepatischen Schubes weder klinisch noch bioptisch nachweisbar sind, enthalten geringe Mengen hepatocellulären Glykogens. Bei frischen hepatischen Schüben ist der Glykogengehalt in der überwiegenden Mehrzahl der Leberzellen hochgradig vermindert.

Bei *biliarer Cirrhose* enthalten nur vereinzelte Leberzellen und Zellgruppen Glykogen. In der Mehrzahl der Zellen sind keine diastaseempfindlichen PAS-positiven Substanzen nachweisbar.

Das neoplastische Gewebe bei *Cirrhosis carcinomatosa* erweist sich stets als glykogenfrei, während das erhaltene Lebergewebe eine geringe, doch deutlich positive Glykogenreaktion ergibt.

*Diastaseresistente PAS-positive Substanzen* sind nach den Untersuchungen von POPPER u. Mitarb. in der normalen Leber an drei Lokalisationen nachweisbar: in den Leberzellen pericanalicular und an der sinusoidalen Oberfläche, in einzelnen Kupfferschen Sternzellen und im portalen Bindegewebe.

Die PAS-Reaktion im *portalen Bindegewebe* einer cirrhotisch veränderten Leber ist wesentlich stärker wie in einer normalen Leber. Diese verstärkte Reaktion ist einerseits durch eine intensivere Anfärbung der Bindegewebsfasern und Zellen, andererseits durch ein vermehrtes Auftreten von mit PAS-Material beladenen histiocytairen Elementen bedingt.

Die feinen PAS-positiven Granula in der *Nachbarschaft der Gallencanaliculi* sind bei Cirrhosen, die mehr oder weniger starke Zeichen einer Cholestase aufweisen, vermehrt und oft zu unregelmäßigen Klumpen und Schollen vergrößert. Zum Teil zeigen diese Gebilde eine bräunliche Eigenfarbe (Gallepigment?), zum Teil scheinen sie identisch mit Organellen zu sein, die sich durch eine starke saure Phosphataseaktivität auszeichnen (s. unten). Bei schwerer Cholestase ist die pericanalikuläre Anordnung dieser Granula nicht mehr erkennbar. Sie sind irregulär über das Cytoplasma der Leberzellen verstreut. In zugrunde gehenden Leberzellen konfluieren die PAS-Schollen zu einer diffusen Anfärbung der Zellen. Reichlich diastaseresistente PAS-positive Substanzen sind manchmal in neoplastischen Zellen bei carcinomatöser Cirrhose nachweisbar.

Die PAS-Reaktion an der *sinusoidalen Oberfläche der Leberzellen* ist bei regressiven Veränderungen an den Zellen verstärkt, zeigt aber im übrigen kein einheitliches Verhalten innerhalb eines Schnittes.

Bei postnekrotischer Cirrhose mit frischem hepatitischem Schub fällt eine beträchtlich intensivierte PAS-Färbung der *Kupfferschen Sternzellen* sowie *reticuloendothelialer Zellen* in den portalen Feldern auf. Sie erscheinen teils diffus PAS-positiv, teils enthalten sie grobscholliges PAS-Material. Besonders deutlich tritt dies in der Nachbarschaft nekrobiotischer und nekrotischer Leberzellen in Erscheinung.

Die weitere histochemische Analyse der PAS-positiven Substanzen ergibt Unterschiede bei den verschiedenen Lokalisationen (Tabelle 2). Während einheitlich eine Resistenz gegenüber Diastase und Hyaluronidase besteht, sind ein Teil der pericanalikulären PAS-Granula glucuronidaseempfindlich, während die cytoplasmatische PAS-Positivität nekrobiotischer Leberzellen und die PAS-positiven Ablagerungen in benachbarten Kupfferschen Sternzellen teilweise durch Trypsin zerstört werden. Diese diffus positiven Leberzellen lassen manchmal eine schwache Anfärbbarkeit mit Astrablau und Alcianblau, sowie eine leichte Metachromasie mit Toluidinblau bei einem pH von über fünf erkennen. Eiweißreaktionen sind durchwegs positiv, allerdings lassen sich die pericanalikulären Granula und sinusoidalen Leberzellgrenzen mit diesen Methoden nicht signifikant

Tabelle 2. *Histochemische Analyse der PAS-positiven Substanzen*

	Leberzellen				
	pericanalicular (granulär)	cytoplasmatisch (diffus)	sinusoidale Oberfläche	sinusoidale Endothelzellen	periportal
Diastase . . . . .	R	R	R	R	R
Glucuronidase . . .	teils S	R	R	R	R
Hyaluronidase . . .	R	R	R	R	R
Trypsin . . . . .	R	teils S	R	teils S	R
Astrablau . . . . .	—	+	—	— (+)	—
Alcianblau . . . . .	—	+	—	—	—
Metachromasie . . .	—	+	—	—	—
Sudan-Schwarz B . .	Teils +	— (+)	—	—	—

R = resistent, S = sensibel.

darstellen. Die pericanaliculären Granula zeigen dagegen öfters eine Anfärbarkeit mit Sudan-Schwarz B, die vergrößerten Granula bei Cholestase sind dagegen Sudan-Schwarz B negativ.

### B. Lipide

Die verschiedenen Formen und Grade von Fettablagerungen im Rahmen einer Cirrhose (Fettcirrhose), sind in der Literatur eingehend beschrieben.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen werden Lipid- und Lipoidablagerungen nur soweit besprochen als sie in direktem Zusammenhang mit anderen histologischen Beobachtungen stehen. Wesentliche Unterschiede sind bei den verschiedenen Cirrhoseformen nicht zu beobachten.

Bei Cirrhose ohne schwere dystrophische Leberzellveränderungen zeigen einzelne der PAS-positiven Granula längs der Gallenkanalikuli eine positive Sudan-Schwarz B-Reaktion. Die bei Cholestase auftretenden größeren Schollen geben keine Anfärbung mit diesem Farbstoff. Schwer geschädigte (nekrobiotische) Leberzellen enthalten zahlreiche irregulär im Cytoplasma verteilte Sudan-Schwarz B positive Körnchen, manchmal eine diffuse bräunliche Färbung des Cytoplasmas.

Diese Sudan-Schwarz B positiven Substanzen können mit Ausnahme der peribiliären Granula durch Behandlung mit heißem Chloroform/Methanol (KEILIG), bzw. mit Pyridin (BAKER) extrahiert werden, vorausgesetzt, daß die Extraktion am unfixierten Material erfolgt. Nach Fixation erscheint eine Extraktion auf gleiche Weise nicht möglich.

### C. Eiweißsubstanzen

Eiweißreaktionen ergeben keine charakteristischen Befunde. Eiweißgebundene Sulfhydrylgruppen sind im Cytoplasma intakter Leberzellen nachweisbar, während sie bei dystrophisch veränderten Zellen vermindert, bei nekrobiotischen und nekrotischen Zellen nicht mehr darstellbar sind. Spezielle Unterschiede bei verschiedenen Cirrhoseformen bestehen nicht.

## Fermenthistochemische Untersuchungen

### A. Unspezifische alkalische Phosphatase

Unabhängig von der Art der Cirrhose findet sich eine verstärkte alkalische Phosphatasereaktion im portalen Bindegewebe. Auch bei den Leberfibrosen ist eine diffuse verstärkte Fermentaktivität in den portalen Bindegewebzellen zu erkennen. Die Reaktion in den Gefäßen erscheint gegenüber den Vergleichsfällen nicht verändert.

Die Aktivität in der Sinusoidwand zeigt eine gewisse Korrelation mit dem Ausfall der Leberfunktionsproben. Bei klinisch dekompensierten Cirrhosen (bei

postnekrotischer Cirrhose mit frischem hepatitischem Schub) ist sie verstärkt, während die klinisch stationären Cirrhosen mit nur geringgradigen pathologischen Leberfunktionsproben diese Veränderung nicht bieten. Die alkalische Phosphataseaktivität in der Wand der Canaliculi verhält sich analog wie die dort nachweisbare ATP-ase- und 5-Nucleotidase-Aktivität, lediglich die Intensität der Reaktion ist bei Normalfällen unter den angewandten Bedingungen geringer, als jene der genannten spezifischen Phosphatasen, und dementsprechend treten die Intensitätsveränderungen nicht so deutlich in Erscheinung. Im übrigen wird auf den Abschnitt ATP-ase verwiesen.

Die alkalische Phosphataseaktivität in der Canaliculuswand kommt nur bei Anwendung der Schwermetallmethode zur Darstellung, während die Veränderungen an den Sinusoidzellen durch die Azofarbstoffmethode besser erkennbar sind. Signifikante Unterschiede bei den verschiedenen Cirrhoseformen bestehen nicht.

#### *B. Unspezifische saure Phosphatase*

Bei Cirrhose treten zwei Arten von Veränderungen auf: 1. Abweichungen in der Lokalisation der Fermentaktivität. 2. Veränderung in der Intensität der Reaktion.

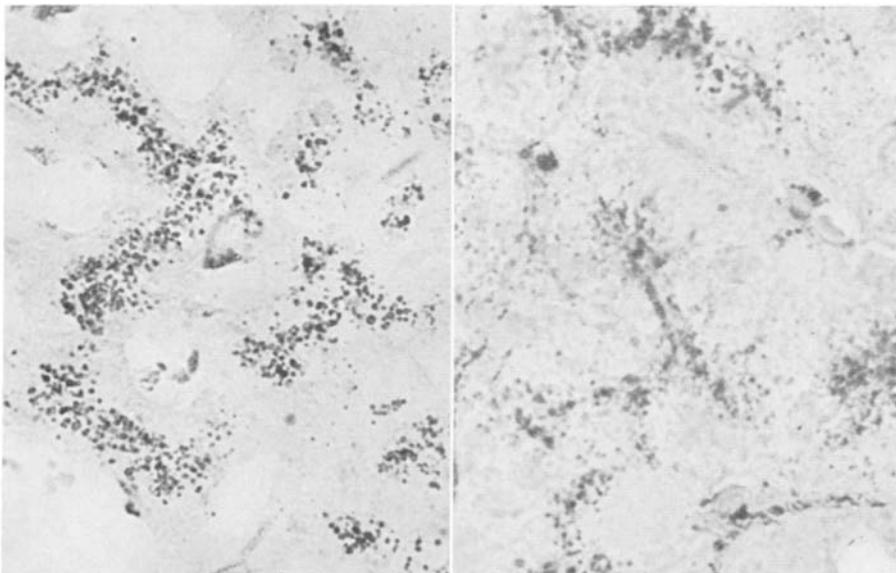


Abb. 1

Abb. 1. Unspezifische saure Phosphataseaktivität (Vergr. 8 × 25). Septale Cirrhose: vergrößerte pericanaliculäre Granula

Abb. 2

Abb. 2. Postnekrotische Cirrhose: undeutlich begrenzte Granula, geringere Intensität der Reaktion

Bei der *septalen Cirrhose* ist die peribiliäre Lokalisation auch innerhalb der Pseudolobuli an vielen Stellen noch erhalten, wenn auch eine gewisse Streuung der Granula gegen die tieferen Schichten des Cytoplasmas der Zellen auftritt (Abb. 1). Durch Veränderungen der Form des Kanälchensystems (s. ATP-ase) wird vielfach eine atypische Lokalisation der Phosphatasegranula vorgetäuscht. In Leberbezirken mit stärkeren dystrophischen Veränderungen der Zellen, die

durch einen Verlust anderer Enzymaktivitäten (ATP-ase, 5-Nucleotidase) in der Wand der Gallenkanälchen gekennzeichnet sind, erscheinen die sauren Phosphatasegranula vergrößert und oft unregelmäßig geformt („polymorph“). Ihre Verteilung im Cytoplasma der Leberzellen ist völlig irregulär. Eine peribiliäre Anordnung ist nicht mehr erkennbar.

Bei vielen *postnekrotischen Cirrhosen* fehlt in größeren Leberzellbezirken eine Darstellung der sauren Phosphataseaktivität in Form von distinkten Granula fast völlig. Diese Leberzellen zeigen in Vergleichsschnitten schwerste Schädigungen im Sinne einer Nekrobiose. Ein Vergleich mit den klinischen Daten zeigt,

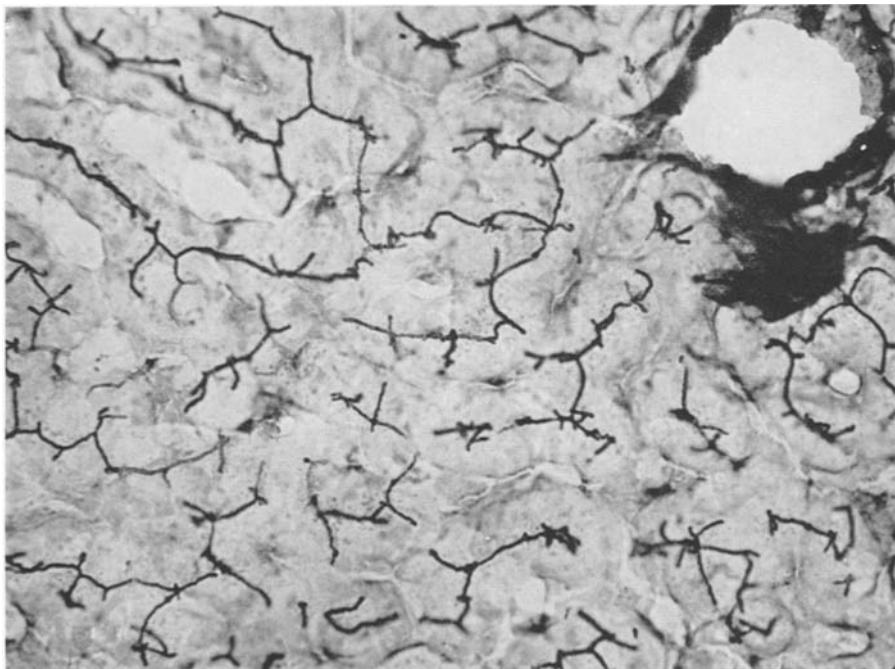


Abb. 3. Normale Leber, ATP-ase-Aktivität (8 × 25). Gleichmäßige Darstellung der Gallenkanälchen, Sinusendothelien zumeist inaktiv

dass es sich durchwegs um Fälle mit hochpathologischen Funktionsproben und mehr oder weniger stark ausgeprägtem Ikterus handelt. Dort, wo saurephosphataseaktive Granula zu erkennen sind, steht die andere Lokalisation und Größe der Reaktionsprodukte, sowie ihre weniger scharfe Begrenzung im Vordergrund (Abb. 2). Die fermentaktiven Körnchen sind vergrößert, und nicht nur auf die unmittelbare Umgebung der Gallenkanälchen beschränkt, sondern finden sich auch etwas weiter entfernt im Cytoplasma der Leberzellen. Eine rein peribiliäre Lokalisation findet sich nur andeutungsweise in umschriebenen Bezirken mit besser erhaltenen Leberzellen.

Bei einer anderen Gruppe postnekrotischer Cirrhosen, die auffallenderweise nur wenig pathologische Leberfunktionsproben zeigen, verhält sich die saure Phosphataseaktivität wie bei den septalen Cirrhosen.

Besonders auffallend ist die Vergrößerung und die Unregelmäßigkeit der fermentaktiven Körnchen bei der *biliären Cirrhose*. Sie sind groß, bizar geformt,

unregelmäßig im Cytoplasma verteilt, und oft am sinusoidalen Pol der Zellen angereichert. Die peribiliäre Lokalisation ist völlig aufgehoben, oft erscheint ein direkter Zusammenhang mit Pigmentablagerungen im Cytoplasma zu bestehen. Stellenweise erscheinen die fermentaktiven Organellen infolge einer diffusen Reaktion im Cytoplasma nur undeutlich erkennbar. Auch die Reaktion in den Sinusoidalzellen ist verstärkt. Wesentliche Unterschiede bei Anwendung der Schwermetallmethode oder der Azofarbstoffmethode bestehen nicht.

Bei *Leberfibrose* entspricht die Verteilung der saurephosphataseaktiven Granula weitgehend dem Bild der normalen Leber, nur ist die peribiliäre Anordnung gegen das Cytoplasma der Leberzellen hier nicht so scharf begrenzt.

### C. Spezifische Phosphatasen

1. *Adenosintriphosphatase (ATP-ase)*. In der *normalen Leber* (Abb.3) zeigt die ATP-ase-Reaktion ein regelmäßiges Gerüst von verzweigten Kanälchen. In den Periportalfeldern ist eine Anfärbung der Bindegewebelemente und der Gefäßwände erkennbar. Nur vereinzelte Sinusendothelzellen zeigen eine schwache diffuse Reaktion im Cytoplasma.

Bei der *septalen Cirrhose* entstehen durch stark gekrümmte und vielfach verzweigte, von einem oft sackartig erweiterten Mittelpunkt sternförmig nach allen Richtungen ausstrahlende Kanälchen, eigentümliche korallenartige Bildungen (Abb. 4), die untereinander nur selten canaliculäre Verbindungen aufweisen. Die Weite der Kanälchen wechselt oft stark. Neben dieser Veränderung findet sich besonders bei beginnenden Cirrhosen, auch eine Umwandlung des unvollkommen geschlossenen Netzes der Gallenkanälchen zu einem unregelmäßigen Maschenwerk mit ungleicher Weite der Maschen, und starker Krümmung und Verästelung der einzelnen Kanälchen.

Die Intensität der Enzymreaktion in der Wand der Canaliculi zeigt eine auffallende Korrelation zum Ausfall der Funktionsproben. Bei kompensierten Fällen erscheint die Fermentaktivität unabhängig vom Grad des cirrhotischen Umbaues besonders stark, wobei die Intensität der normalen Leber noch wesentlich überschritten wird. Bei Cirrhosen, bei denen die pathologischen Leberfunktionsproben wie die klinischen Symptome auf eine Dekompensation hinweisen, ist die Darstellung der Kanälchen unvollkommen und undeutlich (Abb.5). Das Fehlen der ATP-ase-Reaktion in der Wand des Gallenkanälchens ist meist mit einer mehr oder weniger starken Pigmentablagerung im Cytoplasma der Zellen vergesellschaftet.

In den Endothelzellen der Sinusoide findet sich eine verstärkte, innerhalb eines Pseudolobulus jedoch stark wechselnde ATP-ase-Reaktion (Abb.5). Zumeist sind die Sinusoide in der Peripherie des Pseudolobulus kontinuierlich dargestellt und stehen in direktem Zusammenhang mit den ebenfalls mehr oder weniger stark angefärbten Bindegewebssepten.

Bei Cirrhosen mit starker Verfettung der Leberzellen (*Fettcirrhose*) kommt zu den beschriebenen Veränderungen noch eine Verdrängung und teilweise Kompression der Canaliculi durch die intracellulären Fettablagerungen (Abb.6).

Einen besonders charakteristischen Canaliculusverlauf zeigen *beginnende Cirrhosen*. Die Kanälchen sind auffallend stark und irregulär geschlängelt und

weisen zahlreiche oft dicht aufeinander folgende Seitenästchen auf, die Übergänge zu den beschriebenen korallenartigen Bildungen zeigen (Abb. 7). Das Bild gewinnt dadurch einen eigentümlichen „unruhigen“ Eindruck. Die Aktivitätssteigerung der Endothelzellen tritt nur herdförmig in Erscheinung.

Bei der *postnekrotischen Cirrhose* treten die oben beschriebenen korallenartigen Bildungen nicht so in Erscheinung. Auf weite Strecken erscheint die gröbere Struktur des Gallenkanälchensystems erhalten (Abb. 8). Lediglich die Regelmäßig-

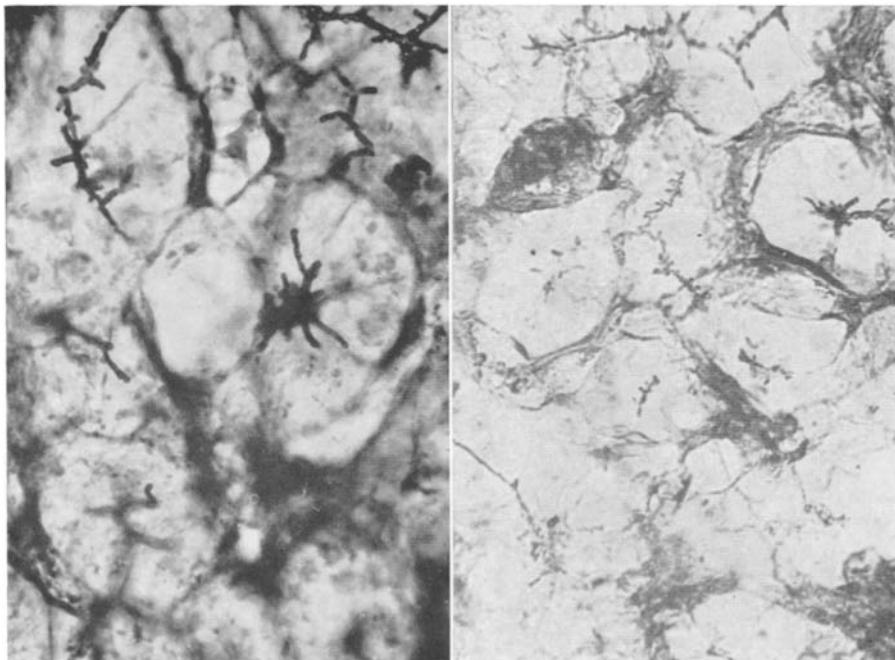


Abb. 4

Abb. 5

Abb. 4. Septale Cirrhosen, ATP-ase-Aktivität ( $8 \times 40$ ). Korallenartige Verformung der Canaliculi  
 Abb. 5. Verminderung der Aktivität der Canaliculi bei pathologischen Leberfunktionsproben, starke Aktivität der Endothelzellen

keit des Netzwerkes ist verschwunden. Die Kanälchen zeigen verstärkte Krümmungen und Verzweigungen, die gelegentlich auch in sternförmige Verästelungen übergehen.

Die Intensität der Gallencanaliculusdarstellung ist fast immer, zumindest herdförmig, vermindert. Postnekrotische Cirrhosen mit frischen hepatitischen Schüben zeigen auf weite Strecken nur kümmerliche Reste der Canaliculi dargestellt, oft gleichzeitig mit einer intensiven Pigmentablagerung im Cytoplasma (Abb. 9).

Aus Abb. 10 geht die Parallelität zwischen Leberfunktion und Intensität der canaliculären ATP-ase-Aktivität bei wiederholten Leberpunktionen bei einer postnekrotischen Cirrhose hervor.

Während am Höhepunkt der Erkrankung bei einem Serumbilirubingehalt von 16,5 mg-% und einer Serum-Transaminase (SGOT) von 525 E die ATP-ase-Aktivität der Gallenkanälchen hochgradig vermindert ist, so daß dieselben kaum

Abb. 6

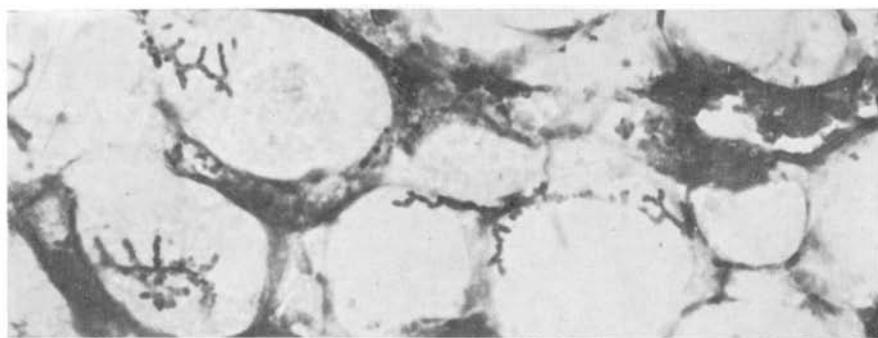


Abb. 7

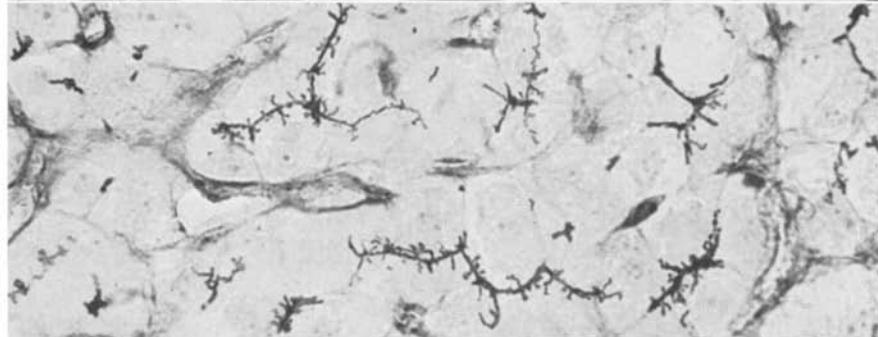


Abb. 8

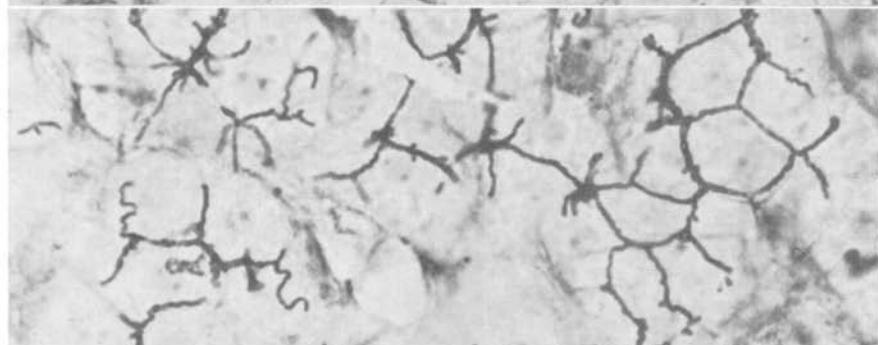


Abb. 9

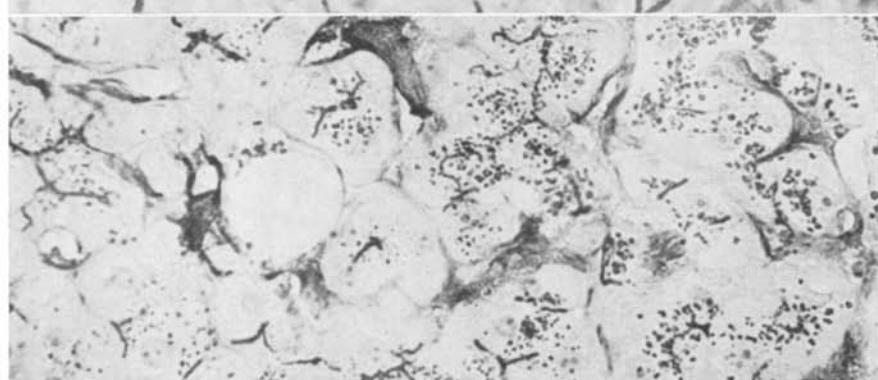


Abb. 6. ATP-ase-Aktivität (Abb. 6:  $8 \times 40$ ; Abb. 7—9:  $8 \times 25$ ). Fettcirrhose, Verdrängung und Kompression der Canaliculi durch Fetttröpfen

Abb. 7. Beginnende Cirrhose (postnekrotisch ?): vermehrte Verästelung der Canaliculi

Abb. 8. Postnekrotische Cirrhose: vergrößertes unregelmäßiges Maschenwerk der Kanälchen

Abb. 9. Postnekrotische Cirrhose: verminderte Aktivität der Kanälchen und Pigment im Cytoplasma der Leberzellen bei hochpathologischen Funktionsproben

zur Darstellung gelangen, so findet sich bei einer Biopsie, die 5 Wochen später durchgeführt wurde, wieder eine deutliche Darstellung der Canaliculi. Die klinischen Funktionsproben hatten sich wieder den normalen Werten genähert (Serumbilirubin 2,6 mg-%, SGOT 65 E). Lediglich die Fermentaktivität in den Endothelzellen ist weiterhin erhöht.

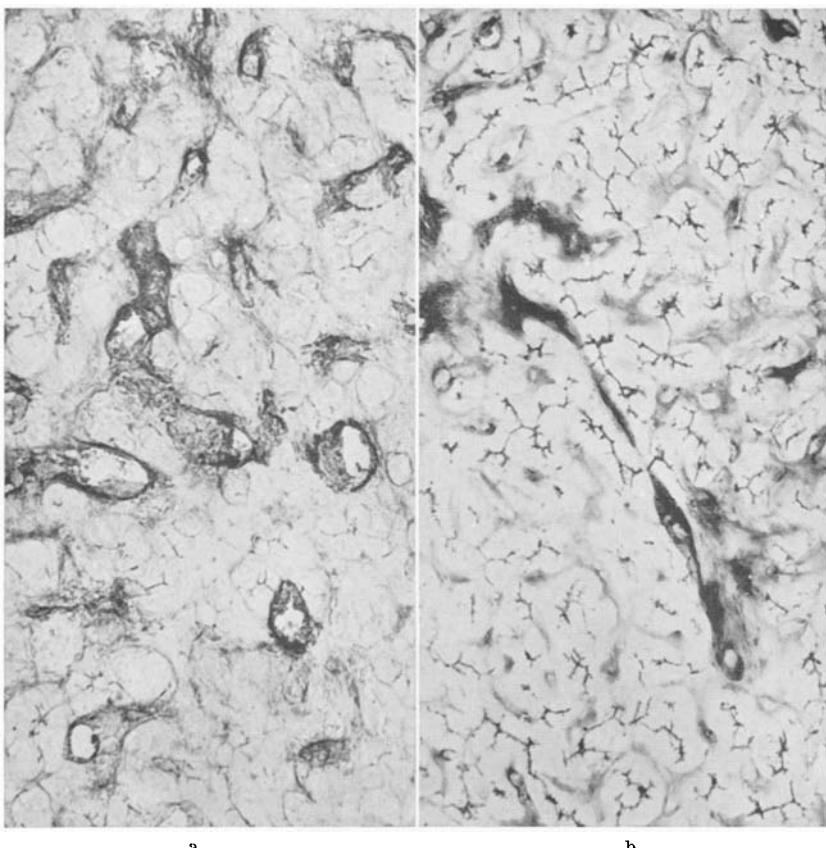


Abb. 10 a. b. Postnekrotische Cirrhose (rezidivierende Hepatitis mit Übergang in Cirrhose, ATP-ase-Aktivität, 8  $\times$  10). a Während des akuten Schubes: Verminderung der Kanälchenaktivität, starke Endothelzellenaktivität. b 5 Wochen später bei weitgehend normalisierten Funktionsproben: Canaliculi wieder deutlich dargestellt

Die Endothelien der Sinusoide weisen eine besonders starke ATP-ase-Reaktion auf (Abb. 11), die zu einer kontinuierlichen Darstellung des Gefäßnetzes führt. Die Aktivität in den portalen Feldern und Septen ist durch die Anwesenheit zahlreicher aktiver Entzündungszellen durchwegs vermehrt.

Bei *biliärer Cirrhose* stehen neben den korallenartigen Verzweigungen, wie sie bereits bei der septalen Cirrhose beschrieben wurden, vor allem zahlreiche und ausgeprägte teils sackförmige, teils zylindrische Erweiterungen der Kanälchen im Vordergrund (Abb. 12). Die Intensität der ATP-ase-Aktivität ist im Bereich dieser Erweiterungen zumeist intensiv, in unmittelbar benachbarten Bezirken jedoch oft vermindert, so daß die Canaliculi hier nur angedeutet sind. Die Sinusendothelzellen lassen durchwegs eine starke ATP-ase-Aktivität erkennen, oft mit

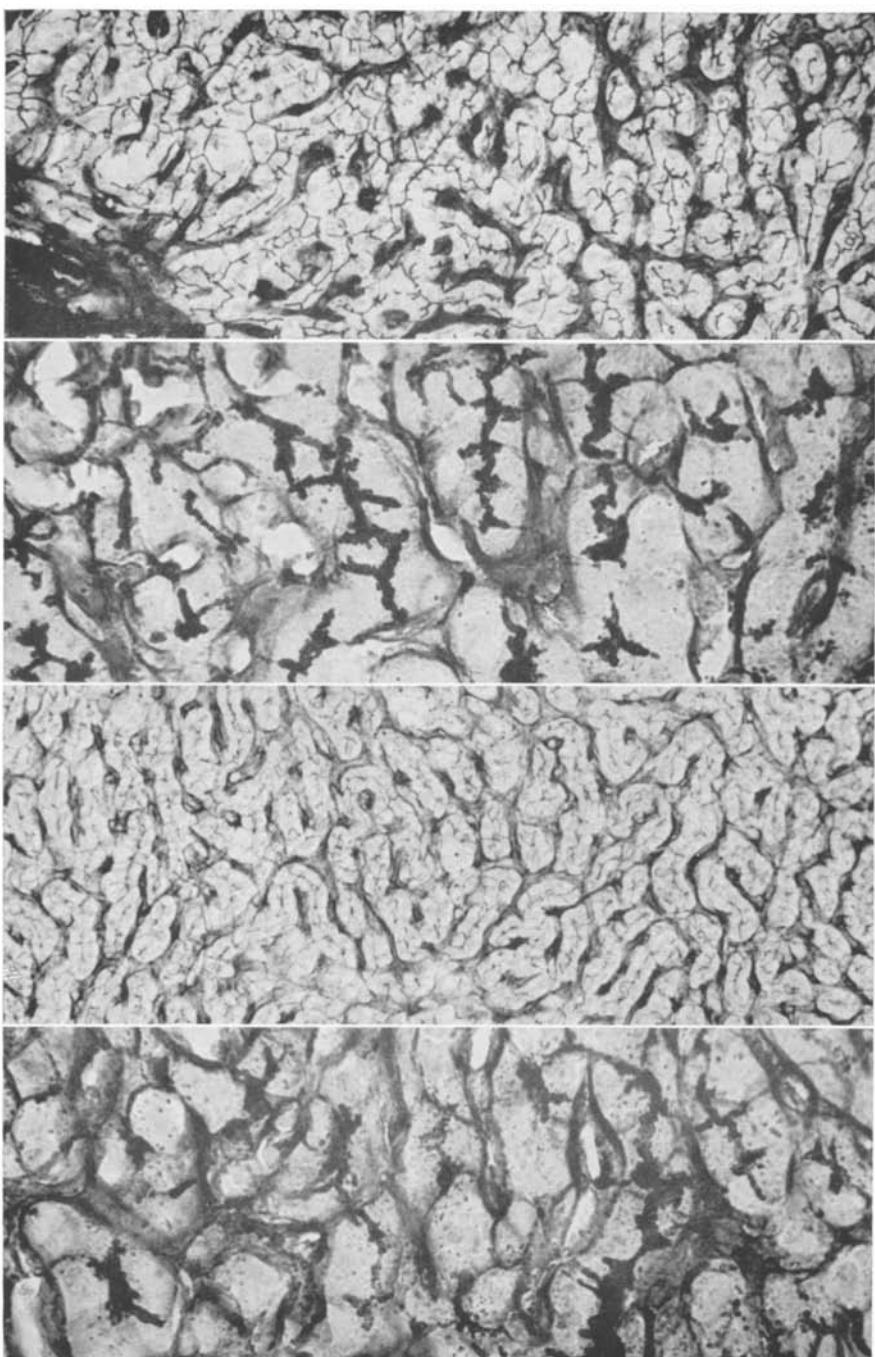


Abb. 11. Postnekrotische Cirrhose, ATP-ase-Aktivität ( $8 \times 10$ ): starke Aktivität der Endothelzellen  
Abb. 12. Biliäre Cirrhose, ATP-ase-Aktivität ( $8 \times 25$ ): sackförmige Erweiterungen der Canaliculi

Abb. 13. Normale Leber, 5-Nucleotidase-Aktivität ( $8 \times 10$ )

Abb. 14. Biliäre Cirrhose, 5-Nucleotidase-Aktivität ( $8 \times 25$ ): cholestatische Erweiterung der Canaliculi

besonderer Intensität in der Nachbarschaft cholestaticischer Veränderungen. Die Aktivität in den periportalen Feldern und Septen ist in gleicher Weise wie bei den anderen Cirrhoseformen vermehrt.

Die Fälle von *hämochromatotischer Cirrhose* zeigen im wesentlichen das Bild der septalen Cirrhose.

Die epithelialen Tumorzellen bei *carcinomatösen Cirrhosen* lassen keine ATP-ase-Aktivität erkennen, auch sind im Tumorbereich keine Gebilde darstellbar, die Gallenkanälchen entsprechen könnten.

*Fibrosen* bei Fettlebern zeigen das typische Bild der letzteren. Fibrosen nach Hepatitiden lassen Veränderungen, wie sie im allgemeinen bei posthepatitischen Zuständen beobachtet werden können (stärkere Schlängelung der Canaliculi, Intensivierung der Endothelzellenaktivität) erkennen.

**2. 5-Nucleotidase.** Bei den verschiedenen Formen der Lebercirrhose verhält sich die 5-Nucleotidase-Aktivität im Bereich der Canaliculi weitgehend analog der ATP-ase-Aktivität. So können morphologische Veränderungen der Kanälchen wie die sternförmigen, korallenartigen Verzweigungen bei der septalen Cirrhose, die sackförmigen Erweiterungen bei der biliären Cirrhose (Abb. 14), wie auch Veränderungen der Intensität der Reaktion bei dystrophischen Zellveränderungen, wie sie besonders bei postnekrotischen Cirrhosen im Vordergrund stehen, beobachtet werden. Im übrigen gilt für die Canaliculi das bei der ATP-ase Gesagte.

Die 5-Nucleotidase-Aktivität der *Sinusoidzellen* zeigt bei Cirrhose nicht die Gleichmäßigkeit der normalen Leber, sondern die Aktivität der Endothelzellen variiert überaus stark, so daß daraus ein ziemlich unregelmäßiges Bild resultiert (Abb. 14). Zwischen den verschiedenen Cirrhoseformen bestehen dabei keine qualitativen, sondern lediglich gewisse quantitative Unterschiede. Die stärksten Veränderungen finden sich bei postnekrotischer und biliarer Cirrhose. Pathologisch verstärkte ATP-ase-Aktivität in Endothelzellen geht nicht immer parallel mit einer verstärkten 5-Nucleotidase-Reaktion in denselben Zellen. Im Gegenteil, die 5-Nucleotidase-Aktivität in Endothelzellen mit verstärkter ATP-ase-Aktivität erscheint oft stark vermindert. Entzündliche Infiltratzellen geben nur zum Teil eine positive Reaktion.

Die Reaktion in den Periportalfeldern ist nur bei starker entzündlicher Infiltration derselben verstärkt infolge der positiven Reaktion der Infiltratzellen.

Die *Leberfibrose* zeigt weitgehend das Bild der normalen Leber.

#### *D. Unspezifische Esterase*

Bei den verschiedenen Cirrhoseformen ist die Beschränkung der Aktivität wie in der normalen Leber vorwiegend auf die epithelialen Elemente erhalten. Die Gleichmäßigkeit des Bildes bezüglich der Intensität der Reaktion, die für die normalen Leberläppchen charakteristisch ist, ist jedoch aufgehoben und die Intensität der Aktivität innerhalb eines cirrhotischen Pseudolobulus zeigt starke Schwankungen. Neben Leberzellen, die sich durch eine besonders intensive und jetzt, anstelle der granulären, mehr diffuse Reaktion auszeichnen, finden sich Bezirke, in denen die Reaktion nur angedeutet ist oder völlig fehlt (Abb. 15). Bei den Zellen mit verstärkter Esteraseaktivität handelt es sich vorwiegend um Elemente, die sich in Hämatoxylin-Eosin-Schnitten durch ein blasses, manchmal basophiles Plasma und durch große chromatinarme, manchmal auch mehrere

Kerne auszeichnen. Die Zellen mit verminderter Esteraseaktivität zeigen zumeist dystrophische Veränderungen.

Diese Veränderungen an den Leberzellen können bei allen Cirrhoseformen gesehen werden, wobei signifikante Unterschiede nicht bestehen. Eher findet sich eine Korrelation mit dem Grad der dystrophischen Leberzellveränderung und damit in gewissem Sinne mit der Progredienz des Prozesses. So zeigen die Cirrhosen mit progredientem Verlauf und schweren dystrophischen Leberzell-

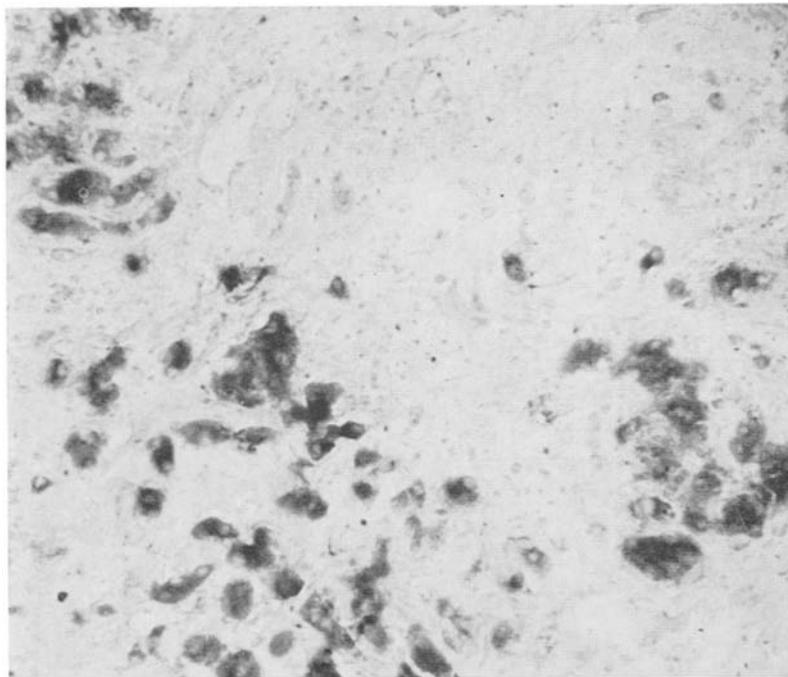


Abb. 15. Postnekrotische Cirrhose, unspezifische Esteraseaktivität: nur einzelne Leberzellen angefärbt ( $8 \times 10$ )

veränderungen stärkere Abweichungen vom normalen Bild, ohne Abhängigkeit von der Art der Cirrhose.

Vereinzelt können esterasepositive Zellen in den Bindegewebssepten und im Bereich der Sinusoide gesehen werden. Hierbei handelt es sich in erster Linie um histiocytäre Elemente.

Bei der *Leberfibrose* finden sich keine Abweichungen von der Esteraseaktivität normaler Leberzellen.

#### *E. Dehydrogenasen*

Die bei den beiden angewandten Methoden (SD und DPND) erhaltenen Reaktionsbilder sind weitgehend identisch, was die Lokalisation anbelangt. Es bestehen lediglich quantitative Unterschiede in der Reaktionsintensität.

Bei *septaler Cirrhose* sind die Leberzellen der Pseudolobuli im allgemeinen durch eine intensive positive Reaktion ausgezeichnet, die ihren stärksten Grad in den sog. hypertrofischen Lobuli und innerhalb derselben, vorwiegend in deren Randpartien erreicht (Abb. 16). Die beiden Fälle mit klinischen Leberinsuffizienz-Erscheinungen zeigen in einem Teil der Pseudolobuli eine signifikant

verminderte Aktivität in den Leberzellen, stellenweise fehlt sie auch ganz. Daraus ergibt sich eine inhomogene scheckige Darstellung des Leberparenchyms. In den bindegewebigen Septen findet sich neben einer Aktivität in der Gefäßwandmuskulatur und in einzelnen Entzündungszellen, wie dies in der normalen Leber beschrieben wurde, vor allem eine solche in Zellen, die die sog. Gallengangsregenerate aufbauen und die eine deutliche Anfärbung ihres relativ schmalen Plasmaraumes aufweisen (Abb. 16). Zum Unterschied von der normalen Leber zeigen auch die Bindegewebszellen der portalen Septen eine schwache Tönung, die auf eine geringgradige Dehydrogenaseaktivität schließen lässt.

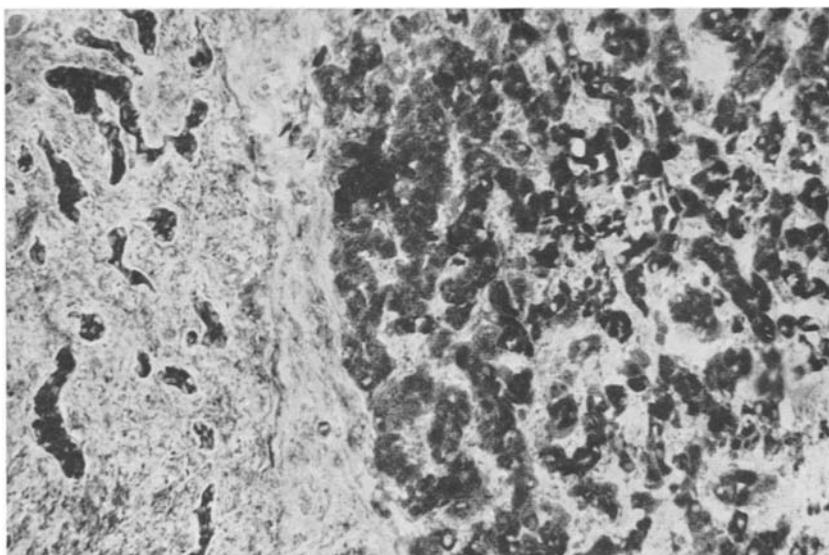


Abb. 16. Septale Cirrhose, DPND-Aktivität (8×10): Starke Aktivität der Leberzellen eines Pseudolobulus, starke Aktivität der „Gallengangsregenerate“

Eine stark variierende Dehydrogenaseaktivität innerhalb der Pseudolobuli findet sich in verstärktem Ausmaß bei *postnekrotischer Cirrhose*. In manchen Pseudolobuli sind nur einzelne Leberzellen oder kleine Gruppen von solchen dargestellt, während dazwischen größere Areale negativ reagierender Leberzellen liegen. Besonders deutlich ist diese Veränderung in Fällen mit akutem hepatitischem Schub zu sehen. Die Verhältnisse in den portalen Septen entsprechen denen der septalen Cirrhosen.

Gleichartig wie die postnekrotische Cirrhose verhält sich hinsichtlich ihrer Dehydrogenaseaktivität die *biliäre Cirrhose*, während bei der *Hämochromatose* die Aktivität der Leberzellen weitgehend jener bei den septalen Cirrhosen entspricht.

Bei *Fibrose* entspricht das Bild hinsichtlich Intensität und Gleichmäßigkeit weitgehend dem der normalen Leber. Lediglich bei der posthepatitischen Fibrose kann stellenweise eine stärkere Variation der Fermentreaktion und damit eine etwas ungleichmäßige Verteilung beobachtet werden. Verfettete Leberzellen enthalten im allgemeinen nur wenig Aktivität.

#### Besprechung

Der *Glykogengehalt* der Leber ist schon unter normalen Verhältnissen außerordentlich variabel und von vielen Faktoren abhängig. Bei der Cirrhose erscheint die Glykogenreaktion unabhängig von der Art der Cirrhose, jedoch in gewisser

Korrelation zum Grad dystrophischer Zellveränderungen vermindert. Dieselbe Beobachtung konnten auch RÜTTNER u. Mitarb. bei der thioacetamidinduzierten experimentellen Cirrhose erheben, wo mit dem Glykogenschwund eine Verminderung der cytoplasmatischen Ribonucleinsäure parallel geht.

Als charakteristisches Zeichen einer dystrophischen Leberschädigung kann jedoch das pathologische Vorkommen *PAS-positiver diastaseresistenter Substanzen* gewertet werden. Die scholligen PAS-positiven Ablagerungen in nekrobiotischen Leberzellen, die vielfach auch eine positive Lipidreaktion geben, scheinen Ausdruck eines gestörten Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsels zu sein. In diese Gruppe gehört auch das sog. alkoholische Hyalin, das NORKIN u. Mitarb. als denaturierten Proteinkomplex in sonst lebenstüchtigen Leberzellen auffassen. Das PAS-positive Material in den auch durch eine erhöhte Enzymaktivität ausgezeichneten RES-Zellen in der Nachbarschaft nekrobiotischer Bezirke, ist wohl phagocytiertes Material aus zugrunde gegangenen Leberzellen.

Die *peribiliären Granula*, die besonders reichlich bei cholestaticischen Formen der Lebercirrhose beobachtet werden, sind teils Pigment-Kohlenhydrat-(Glucuronid-)Komplexe, teils handelt es sich um fermentaktive Zellorganellen (Lysosomen), um welche sich PAS-Substanzen akkumuliert haben (POPPER u. Mitarb.).

Die vermehrte PAS-Anfärbarkeit des *portalen Bindegewebes* geht mit Veränderungen der Grundsubstanz einher, die als Vorstadium vermehrter Faserbildung anzusehen sind. Chemisch handelt es sich in erster Linie um eine qualitative Vermehrung von *Hydroxyprolin* (RUBIN u. Mitarb.).

Die derzeit verfügbaren histochemischen *Eiweißreaktionen* sind zu unspezifisch, um detaillierte Aussagen zu ermöglichen. Lediglich eine Verminderung der cytoplasmatischen — nicht der nucleolären — RNS scheint für die Cirrhose charakteristisch zu sein (RÜTTNER u. Mitarb.; MONTGOMERY). Der Gehalt an proteingebundenen Sulfhydrylgruppen, die als Bestandteile in Fermentkomplexen eine Rolle spielen, scheint nicht signifikant verändert, was im Tierexperiment auch von TELKKÄ u. Mitarb. gefunden wurde.

Von besonderem Interesse im Hinblick auf neue Beurteilungsmöglichkeiten eines cirrhotischen Prozesses erscheinen die *histochemischen Fermentreaktionen*. Allerdings ist die Spezifität der Veränderungen und damit die Aussagekraft der einzelnen Methoden sehr unterschiedlich. Bei allen Versuchen einer funktionellen Deutung darf nicht vergessen werden, daß der Großteil der Reaktionen unter unphysiologischen Bedingungen durchgeführt wird und aus dem Ergebnis der histochemischen Reaktion nicht ohne weiteres auf eine Störung einer biologischen Zellfunktion geschlossen werden darf. Lediglich auf Grund empirischer Erfahrungen, die jetzt schon in großer Zahl auch an der Leber vorliegen, können gewisse Korrelationen angenommen werden.

Die auffälligste Veränderung der unspezifischen *alkalischen Phosphataseaktivität* in der cirrhotischen Leber ist die Intensivierung der Enzymreaktion im portalen Bindegewebe. Da analoge Befunde auch bei anderen Prozessen, die mit einer Bindegewebsneubildung einhergehen, erhoben werden können, vermutet PETZOLD in ihr einen Ausdruck einer Steigerung des Gewebsstoffwechsels im aktiv proliferierenden Mesenchym.

Die unspezifische alkalische Phosphataseaktivität in den Leberzellen ist in der menschlichen Leber gering und zeigt bei Cirrhose keine signifikanten Verände-

rungen. Zum gleichen Ergebnis kommt LAMBERS. Lediglich eine Verminderung der Aktivität in der Canaliculuswand findet sich bei nekrobiotischen Vorgängen und bei länger bestehender Gallestauung (BIRNS u. Mitarb.). Diese Befunde werden durch biochemische Untersuchungen von BERENBOM u. Mitarb. bestätigt.

Die Steigerung der sinusoidalen alkalischen Phosphataseaktivität geht weitgehend parallel mit einer Vermehrung der ATP-ase-Aktivität in den gleichen Zellen. Möglicherweise werden mit beiden Methoden sich überschneidende Fermentgruppen dargestellt (BARKA u. Mitarb.).

Die Aktivitätssteigerung in den endothelialen Zellen ist nicht spezifisch für Parenchymuntergang, sondern findet sich auch bei entzündlichen Prozessen (WACHSTEIN u. Mitarb., HOLZNER u. Mitarb.) vermutlich als Ausdruck einer Funktionssteigerung dieser Zellen.

Die Hauptlokalisation *unspezifischer saurer Phosphatase* in der Leberzelle sind pericanaliculäre Gebilde, die von NOVIKOFF als spezielle Zellorgane („Lysosomen“) erkannt und den „dense bodies“ von DE DUVE gleichgesetzt wurden. Bei verschiedenen Lebererkrankungen, bei denen eine Störung des intracellulären Stofftransportes und der Gallesekretion angenommen werden kann, wie Cholestase, Hepatitis und Cirrhose, geht ihre typische Lokalisation verloren (HOLZNER u. Mitarb., RONDEZ u. Mitarb., WACHSTEIN und MEISEL). Handelt es sich um beginnende oder verhältnismäßig geringgradige Zellschädigungen, so sind die an saurer Phosphatase reichen Gebilde besonders groß und durch eine intensive Aktivität ausgezeichnet. Bei schweren irreversiblen Veränderungen verschwinden sie und machen einer diffus über das ganze Cytoplasma verteilten Fermentreaktion Platz, wahrscheinlich als Folge der Auflösung der Lysosomenmembranen mit Austritt der Enzyme.

Eine Reihe von neuen Möglichkeiten für die Beurteilung eines Lebergewebes hat die histochemische Darstellung der *ATP-ase* und *5-Nucleotidase-Aktivität* gebracht.

Es steht heute keineswegs fest, ob die Bezeichnung „ATP-ase“, und „5-Nucleotidase“ für die nachgewiesenen Fermente gerechtfertigt ist. Es handelt sich nicht um im biochemischen Sinne streng spezifische Fermente, sondern es werden mit diesen Methoden eine Gruppe von Enzymaktivitäten dargestellt, die sich durch verschiedene Aktivierungs- und Hemm möglichkeiten unterscheiden und die die Fähigkeit verbindet, aus ATP Phosphat abzuspalten (BARKA u. Mitarb.).

Durch die spezifische Lokalisation des genannten Enzyms an der den Canalculus begrenzenden Zelloberfläche der Leberzelle (ESSNER u. Mitarb., WACHSTEIN u. Mitarb.) ermöglicht diese Methode eine ausgezeichnete Darstellung der intra lobulären Gallekanälchen. Sie ist den bisher bekannten Möglichkeiten zur Sichtbarmachung dieser Kanälchen (EPPINGER, RABL, HANZON) weit überlegen. Dadurch wird auch eine Beurteilung der Läppchenarchitektur möglich, was besonders beim cirrhotischen Umbau von Interesse erscheint. Auf Grund unserer Beobachtungen sind bei der menschlichen Cirrhose zwei verschiedene Typen von Veränderungen des Kanälchenverlaufes zu unterscheiden.

1. Eine völlige Umwandlung des regelmäßigen Maschenwerkes der Kanälchen in vielfach keinen Zusammenhang zeigende oft korallenartige Kanälchenkonvolute. Diese Veränderung, die ein Endstadium darstellt, wird über eine zunehmende Schlängelung und eine Vermehrung irregulärer und verzweigter Ver-

ästelungen erreicht. Sie ist für die klassische Form der septalen Cirrhose charakteristisch.

2. Bei anderen Fällen ist neben den unter 1. beschriebenen Veränderungen in weiten Bezirken noch ein Maschenwerk von Kanälchen erkennbar, das sich von der normalen Leber nur durch seine Unregelmäßigkeit und vermehrte Verästelungen und Verzweigungen der Kanälchen unterscheidet. Dieses Bild scheint typisch für die postnekrotische Cirrhose zu sein, bei welcher ja der Erkrankungsprozeß nicht die Leber in einheitlicher Weise betrifft, sondern Läppchenteile oder Läppchengruppen in ihrer ursprünglichen Architektur erhalten bleiben können.

Zu diesen Veränderungen können sich als sekundäre Prozesse die für Cholestase typischen sackförmigen und zylindrischen Erweiterungen der Kanälchen (besonders bei biliären Cirrhosen), und Kompressionseffekte durch Fetteinlagerungen in die Leberzellen gesellen (bei Fettcirrhosen). Daß die letzteren zu einer Störung des Galleflusses führen, konnte bei Fettlebern mit Cholestase nachgewiesen werden (HOLZNER u. Mitarb.).

Neben den morphologischen Veränderungen des Kanälchenverlaufes, ergeben sich weitere Beurteilungsmöglichkeiten in den Veränderungen der Intensität der ATP-ase und 5-Nucleotidase-Aktivität in der Canalculuswand. Zahlreiche Beobachtungen bei verschiedenen pathologischen Zuständen (WACHSTEIN u. Mitarb.; HOLZNER; SCHATZKI u.a.) lassen den Schluß zu, daß die Intensität der Enzymaktivität an der Zelloberfläche in Beziehung zur sekretorischen Funktion der Zelle steht.

So findet sich bei allen Veränderungen, bei denen eine solche Störung angenommen werden kann, eine signifikante Verminderung der Enzymaktivität. Diese Beobachtungen konnten durch experimentelle Untersuchungen von GOLDFISCHER u. Mitarb. bestätigt werden. Für eine Membranfunktion dieser Fermentgruppe spricht auch die Tatsache, daß ähnliche Reaktionen an anderen Zelloberflächen mit aktivem Stofftransport gesehen werden (ABRAMS u. Mitarb., BARADI u. Mitarb., BIRNS u. Mitarb., SPATER u. Mitarb., WACHSTEIN u. Mitarb.).

Nicht spezifisch für die Cirrhose ist die Aktivitätssteigerung der ATP-ase in den Endothelien der Sinusoide, die parallel mit einer Intensivierung der alkalischen Phosphataseaktivität einhergeht. Ihr Vorkommen in der Nachbarschaft von nekrobiotischen Leberzellbezirken, bei länger dauernder Gallestauung, bei entzündlichen Prozessen (HOLZNER u. Mitarb.; RONDEZ u. Mitarb.; SCHATZKI, WACHSTEIN u. Mitarb.) weist auf eine besondere Aktivierung dieser Zellen hin. Die Verstärkung der Reaktion ist nicht allein durch eine zahlenmäßige Vermehrung dieser Zellen (RONDEZ) zu erklären, sondern es liegt daneben eine tatsächliche Aktivitätszunahme der einzelnen Elemente vor. Unter ähnlichen Bedingungen zeigen diese Zellen auch eine Verstärkung ihrer phagocytären Aktivität (STERN u. Mitarb.).

Die Veränderungen an den Sinusoidzellen sind bei der ATP-ase-Reaktion deutlicher wie bei der 5-Nucleotidase-Reaktion, bei welcher schon unter normalen Verhältnissen eine stärkere Aktivität dieser Zellen besteht. Die Steigerung der ATP-ase-Aktivität in den periportalen Feldern steht mit Beobachtungen in Einklang, nach denen proliferierendes Bindegewebe durch eine erhöhte Aktivität verschiedener Phosphatasen ausgezeichnet ist.

Die histochemische Darstellung der unspezifischen *Esterase*aktivität ergibt in der Leber nur wenig Deutungsmöglichkeiten. Eine Verminderung der Aktivität ist Ausdruck einer Zellschädigung (s. auch WACHSTEIN u. Mitarb.). Jugendliche Zellen in Regeneraten geben dagegen eher eine verstärkte Reaktion, was auch tierexperimentell bei der äthionininduzierten Lebercirrhose gefunden werden konnte (WACHSTEIN u. Mitarb.). Für die relativ geringe Empfindlichkeit der Esterase sprechen biochemische Untersuchungen von BERENBOM u. Mitarb., wonach sich auch beim Vorliegen von nekrobiotischen Prozessen keine signifikante Veränderung der Gesamtesteraseaktivität im Lebergewebshomogenat fand.

Wesentlich empfindlichere Indikatoren für die Vitalität der Leberzellen sind die *oxydierenden Fermente*. Wie auch biochemische Untersuchungen bestätigen (BERENBOM u. Mitarb.) ist schon bei verhältnismäßig geringen Zellveränderungen ihre Aktivität beträchtlich vermindert. Durch die unterschiedliche Methodik divergieren die histochemischen Befunde verschiedener Untersucher nicht unbeträchtlich (DE u. Mitarb.; EGER u. Mitarb.; FRENCH, HOPSU u. Mitarb.; PEARSON u. Mitarb.; WACHSTEIN u. Mitarb.). Detaillierte Aussagen über die Art der Funktionsstörung sind bei Anwendung spezifischerer Methoden zu erwarten. Regenerierende Leberzellareale, sog. hypertrophische Pseudolobuli, zeigen oft eine verstärkte Reaktion. Zu analogen Befunden kommt MYREN auf Grund biochemischer Untersuchungen. Die starke Dehydrogenaseaktivität in manchen der sog. Gallengangsregenerate, läßt darauf schließen, daß es sich auch hier, zumindest zu einem Teil, um junge regenerierende Zellen handelt.

### Zusammenfassung

Histochemische Untersuchungen an 89 Leberbiopsien und 26 Autopsielebern von Cirrhosefällen führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Durch die spezifischen Phosphatasereaktionen (ATP-ase und 5-Nucleotidase) können die morphologischen Veränderungen im Verlauf der intralobulären Gallenkanälchen und damit die architektonischen Differenzen der verschiedenen Cirrhoseformen besonders gut erfaßt werden.

2. Die Stärke der histochemischen Fermentreaktion wird in erster Linie durch den Funktionszustand und den Grad der Zellschädigung beeinflußt, wie Vergleiche zwischen Funktionsprobe und histochemischer Reaktion zeigen. Eine Zellschädigung geht im allgemeinen mit einer Verminderung, eine funktionelle Aktivierung mit einer Vermehrung der Fermentaktivität einher.

Histochemische Untersuchungen sind somit eine wertvolle Ergänzung der Routine Methoden, sowohl für die histomorphologische Beurteilung wie auch für die funktionelle Beurteilung des Lebergewebes.

### On the Histochemistry of Hepatic Cirrhosis

#### Summary

The following conclusions can be drawn from histochemical studies on 89 liver biopsies and on 26 postmortem livers in cases of liver cirrhosis:

1. By specific phosphatase-reactions (ATP-ase, 5-nucleotidase), morphologic changes of intralobular bile canaliculi and consequently the architectonic differences of various types of cirrhosis can be demonstrated easily.

2. The intensity of histochemical enzyme reactions is primarily affected by the functional condition and the degree of cellular damage, as a comparison of liver function tests and the histochemical reactions shows. In general a decrease of enzyme activity is caused by cellular damage, an increase by functional activation.

Histochemical methods therefore seem a valuable addition to routine technics for histomorphologic as well as for functional evaluation of liver biopsies.

### Literatur

- ABRAMS, A., P. McNAMARA, and F. B. JOHNSON: Adenosine triphosphatase in isolated bacterial membranes. *J. biol. Chem.* **235**, 3659—3662 (1960).
- BARADI, A. F., and R. QUINTON-COX: Staining secretory capillaries of exocrine glands with techniques for specific phosphatases. *Stain Technol.* **38**, 121—126 (1963).
- BARKA, T., and P. J. ANDERSON: Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 741—753 (1962).
- — Histochemistry. Theory, practice and bibliography. New York: Hoeber Med. Div. 1963.
- , and J. H. HOLZNER: Studies on the heterogeneity of specific phosphatases of the liver. *Ann. Histochem.* **7**, 43—50 (1962).
- , F. SCHAFFNER, and H. POPPER: Acid phosphatase and reticuloendothelial system. *Fed. Proc.* **19**, 187 (1960).
- BARNETT, R. J., and A. M. SELIGMAN: Histochemical demonstration of sulphydryl and disulfide groups of protein. *J. nat. Cancer Inst.* **14**, 769—804 (1954).
- BERENBOM, M., P. I. CHANG, and R. E. STOWELL: Changes in mouse liver undergoing necrosis in vivo. *Lab. Invest.* **4**, 315—323 (1955).
- BIRNS, M., B. MASEK, and O. AUERBACH: The effects of experimental acute biliary obstruction and release on the rat liver. A histochemical study. *Amer. J. Path.* **40**, 95—111 (1962).
- BURSTONE, M. S.: Histochemical comparison of naphthol-AS-phosphates for the demonstration of phosphatases. *J. nat. Cancer Inst.* **20**, 601—616 (1958).
- DE, P., R. CHATTERJEE, and S. MITRA: Nucleolar localization of succinic dehydrogenase in normal rat hepatic cells. *Nature (Lond.)* **191**, 925 (1961).
- EGER, W., u. U. KURTH: Das Verhalten der Succinodehydrase der Leber allylalkohol- und tetrachlorkohlenstoffvergifteter Ratten unter Einwirkung von Cystein. *Acta histochem. (Jena)* **6**, 8—16 (1958).
- EPPINGER, H.: Die Leberkrankheiten. In: Allgemeine und spezielle Pathologie und Therapie der Leber. Wien: Springer 1937.
- ESSNER, E., A. B. NOVIKOFF, and B. MASEK: Adenosine triphosphatase and 5-nucleotidase activities in the plasma membrane of liver cells as revealed by electron microscopy. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 711—716 (1958).
- FRENCH, W. S.: Liver dehydrogenase activity in chronic alcoholism. A comparative histochemical study. *Arch. Path.* **69**, 303—313 (1960).
- GOLDFISCHER, S., I. M. ARIAS, E. ESSNER, and A. B. NOVIKOFF: Cytochemical and electron microscopic studies of rat liver with reduced capacity to transport conjugated bilirubin. *J. exp. Med.* **115**, 467—475 (1962).
- HANZON, V.: Liver cell secretion under normal and pathologic conditions studied by fluorescence microscopy on living rats. *Acta physiol. scand.* **28**, Suppl. 101 (1952).
- HOLZNER, J. H.: Fermenthistochemische Untersuchungen an Leberbiopsien. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **44**, 233—236 (1960).
- , u. G. KOVANYI: Tierexperimentelle fermenthistochemische Untersuchungen an Zellen des retikulohistiocytären Systems bei Verabreichung von eiweißhaltigen und eiweißfreien Substanzen, sowie beim Impftumoren. *Path. et Microbiol. (Basel)* **25**, 409—420 (1962).

- HOLZNER, J. H., N. STEFENELLI u. F. G. WEWALKA: Veränderungen an den Gallenkapillaren bei Fettleber. *Wien. klin. Wschr.* **74**, 810—814 (1962).
- — — Die Bedeutung enzymhistochemischer Methoden für die Unterscheidung verschiedener Formen der Cholestase. 2. Weltkongr. für Gastroenterologie, München 1963, Bd. III, S. 208—212.
- — — Enzymhistochemische Veränderungen der Leber bei Hepatitis. *Acta hepato-splenol.* (Stuttg.) (im Druck).
- HOPSU, V. K., and M. HÄRKÖNEN: Succinic dehydrogenase activity in liver tissue after partial hepatectomy. *Acta path. microbiol. scand.* **47**, 353—356 (1959).
- LAMBERS, K.: Die Verteilung der histochemisch darstellbaren alkalischen Phosphatase in der menschlichen Leber unter normalen und pathologischen Bedingungen. *Acta hepato-splenol.* (Stuttg.) **6**, 76—88 (1959).
- MONTGOMERY, P.: A histochemical study of normal and cirrhotic livers. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **89**, 355—357 (1955).
- MYREN, J.: Dehydrogenase activity in the regenerating rat liver. *Acta path. microbiol. scand.* **50**, 12—16 (1960).
- NACHIAS, M. M., K.-CH. TSOU, E. DE SOUZA, CH.-S. CHENG, and A. M. SELIGMAN: Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 420—436 (1957).
- , D. G. WALKER, and A. M. SELIGMAN: A histochemical method for the demonstration of diphosphopyridine nucleotide diaphorase. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 29—38 (1958).
- NORKIN, ST. A., R. WEITZEL, D. CAMPAGNA-PINTO, and R. A. MACDONALD: "Alcoholic" hyalin in human cirrhosis. *Amer. J. Path.* **87**, 49—62 (1960).
- NOVIKOFF, A. B.: The intracellular localization of chemical constituents. In: R. C. MELLORS: *Analytical cytology*. New York: McGraw-Hill Book Co. 1959.
- , and E. ESSNER: Cytolysomes and mitochondrial degeneration. *J. Cell Biol.* **15**, 140—146 (1962).
- , H. D. HAUSMAN, and E. PODBER: The localization of adenosine triphosphatase in liver: in situ staining and cell fractionation studies. *J. Histochem. Cytochem.* **6**, 61—71 (1958).
- PEARSON, B., and V. DEFENDI: A comparison between the histochemical demonstration of non-specific esterase activity by 5-bromo-indoxyl acetate,  $\alpha$ -naphthyl acetate and naphthol AS acetate. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 72—83 (1957).
- , F. GROSE, and R. GREEN: Histochemical changes in liver succinic dehydrogenase during rapid growth following partial hepatectomy. *Amer. J. Path.* **35**, 139—151 (1959).
- PETZOLD, H.: Histochemische Untersuchungen an der mit Tetrachlorkohlenstoff geschädigten Kaninchenleber. *Acta biol. med. germ.* **2**, 7—12 (1959).
- PIOCH, W.: Über die Darstellung saurer Mukopolysaccharide mit dem Kupferphthalocyaninfarbstoff Astrablau. *Virchows Arch. path. Anat.* **330**, 337—341 (1957).
- POPPER, H.: Present day morphology of cirrhosis. *Gastroenterology* **34**, 661—666 (1958).
- , F. PARONETTO, and T. BARKA: PAS-positive structures of nonglycogenic character in normal and abnormal liver. *Arch. Path.* **70**, 300—313 (1960).
- RABL, R.: Untersuchungen zur Morphologie der Gallensekretion. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **23**, 71—97 (1930).
- RONDEZ, R., u. J. R. RÜTTNER: Die Bedeutung der Kupfferzellen bei der Thioacetamid-induzierten Lebercirrhose der Ratte. *Med. exp. (Basel)* **3**, 189—194 (1960).
- — — Zur Pathologie des Ikterus. Fermenthistochemische Untersuchungen über das Verhalten der Gallenkapillaren nach experimenteller ikterogener Leberschädigung. *Path. et Microbiol. (Basel)* **26**, 784—796 (1963).
- RUBIN, E., F. HUTTERER, and H. POPPER: Cell proliferation and fiber formation in chronic carbon tetrachloride intoxication. *Amer. J. Path.* **42**, 715—728 (1963).
- RÜTTNER, J. R., u. R. RONDEZ: Zur formalen Genese der Thioacetamid-Zirrhose der Rattenleber. *Path. et Microbiol. (Basel)* **23**, 113—119 (1960).
- — u. R. GASSMANN: Histochemische Untersuchungen an der toxisch geschädigten Rattenleber. *Schweiz. Z. Path.* **22**, 294—300 (1959).
- SCHATZKET, P. F.: Rat liver adenosinetriphosphatase. Histochemical changes in biliary obstruction. *Arch. Path.* **73**, 511—517 (1962).

- SPATER, H. W., A. B. NOVIKOFF, and B. MASEK: Adenosinetriphosphatase activity in the cell membranes of kidney tubule cells. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 765—770 (1958).
- TELKKÄ, A., and J. AHLQUIST: Succinic dehydrogenase activity and sulphhydryl groups in cirrhosis of the rat liver induced by a low protein high fat diet. *Acta path. microbiol. scand.* **46**, 1—10 (1959).
- WACHSTEIN, M., and E. MEISEL: Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH. *Amer. J. clin. Path.* **27**, 13—23 (1957).
- — Substrate specific phosphatases at pH 7.2 in biliary obstruction and liver cell damage; special reference to bile canaliculi in obstructive jaundice and liver cell necrosis. *Arch. Path.* **65**, 449—459 (1958).
- — Enzymatic histochemistry of ethionine-induced liver cirrhosis and hepatoma. *J. Histochem. Cytochem.* **7**, 189—201 (1959).
- —, and C. FALCON: Enzymatic histochemistry in the experimentally damaged liver. *Amer. J. Path.* **40**, 219—241 (1962).

Dr. HEINRICH HOLZNER  
Laboratorium der II. Univ.-Frauenklinik  
A 1090 Wien IX, Österreich  
Spitalgasse 23