

Zur abnormalen Ausläuferbildung des Gallenkanälchennetzes in Leberpunktaten

A. HORVÁTH, J. HORVÁTHOVÁ, E. BRIXOVÁ und M. LUKÁČ

Lehrstuhl für pathologische Anatomie des ärztlichen Fortbildungsinstitutes (Vorstand: Dr. med. V. Ottis), III. Medizinische Klinik der Comenius-Universität (Vorstand: Prof. Dr. med. R. T. Niederland, Dr. Sc.), Medizinische Abteilung des Städtischen Krankenhauses (Vorstand: Doz. Dr. med. K. Holomáň) Bratislava, ČSSR

Eingegangen am 26. März 1971

On Abnormal Projections of Bile Canaliculi in Liver Biopsies

Summary. In 192 liver needle biopsies prepared with Wachstein-Meisel method, we found a development of abnormal projections of bile canaliculi 95 times. Of 95 biopsies, 50 also revealed other types of canalicular abnormalities. From the intensity of changes seen 4 groups could be formed. The maximal changes appeared in complicated fatty liver, in cirrhosis and in chronic hepatitis. The changes described were particularly focal. The pathogenesis of the formation of projections is ascribed to the combined actions of several factors, mainly to hepatocellular damage with obstruction. The relationships of these morphologic changes to other histological findings in the liver are discussed.

Zusammenfassung. In 192, nach der Methode von Wachstein und Meisel bearbeiteten Leberpunktaten, wurde 95mal die Bildung von abnormalen Gallenkanälchenausläufern beobachtet. Bei den 95 Punktaten kamen 50mal auch andere Typen von Kanälchenabnormalitäten vor. Mit Rücksicht auf deren Intensität wurden die vorwiegend herdförmigen Veränderungen in 4 Gruppen eingeteilt. Der Maximalbefund wurde bei komplizierter Leberverfettung, bei Cirrhosen und bei chronischer Hepatitis beobachtet. In der Pathogenese der Entstehung neuer Kanälchenausläufer wirken mehrere Faktoren, hauptsächlich die hepatocelluläre Beschädigung mit Obstruktion. Es werden die morphologischen Beziehungen zu den anderen feingeweblichen Befunden in der Leber angeführt.

Zwischen den Leberzellen, Sinusoïden und Periportalgebilden besteht eine enge morphologische und funktionelle Beziehung. Bei der routinemäßigen Punktion-diagnostik der Leberkrankheiten bewerten wir die Morphologie dieser Bestandteile des Leberläppchens aufgrund einer Standardserie histologischer und histo-chemischer Methoden. Eine Ausnahme bilden die Veränderungen der durch die geläufigen Methoden nicht erfaßbaren Gallenkanälchen. Die einzige Veränderung, die wir unter diesen Umständen in den Kanälchen feststellen können, sind die Gallenthromben bei der Cholestase. Bei verschiedenen pathologischen Prozessen unterliegt das Kanälchennetz des Leberparenchyms sowohl lokalen, als auch strukturellen Veränderungen, die man mit der Methode nach Wachstein und Meisel (1957) darstellen kann. Wir wollen uns hier nur mit jenen morphologischen Veränderungen befassen, die wir aufgrund von Präcipitatslinien und -herden, die bei der Reaktion nach Wachstein und Meisel entstanden sind, als Bildung abnormaler Seitenausläufer und Erweiterung der Canaliculi bewerten. Zweck dieser Arbeit ist die Klassifikation solcher Veränderungen in den Leber-

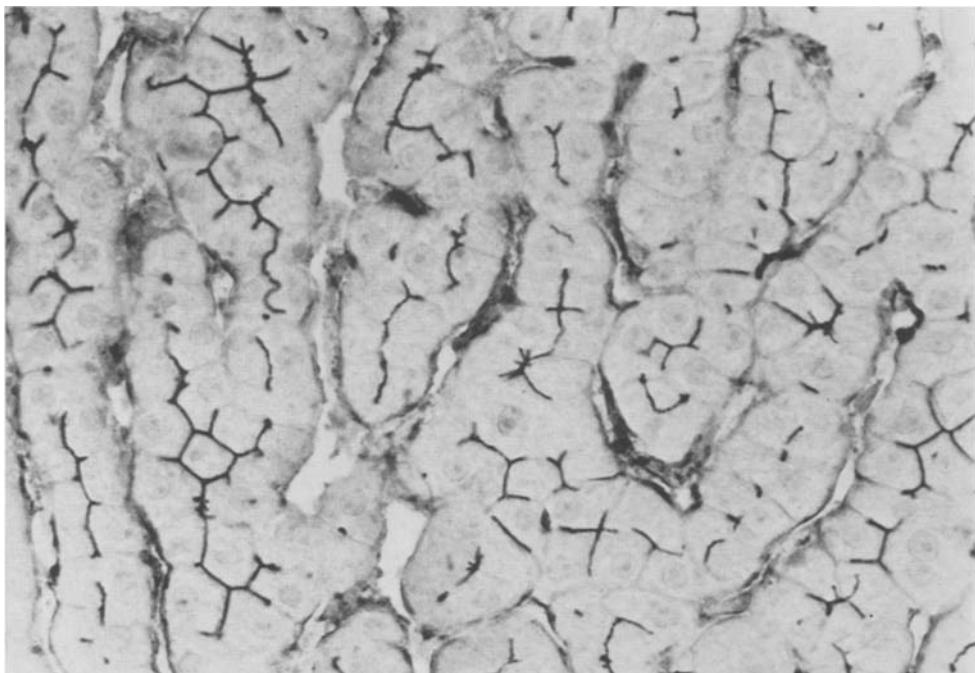


Abb. 1. Normales Gallenkanälchenetz, deren verschiedene Querschnitte zu sehen sind. Die Canaliculi sind in regelmäßigen Abständen verzweigt. Sichtbare Harmonie zwischen der Zahl der Leberzellen und der Zahl der Seitenäste. ATPase. Vergr. 625 ×

punktaten und ein Versuch um deren Korrelation mit den übrigen feingeweblichen Befunden in der Leber.

Material und Methodik

Wir haben 192 Leberpunktate, die Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen entnommen wurden, nach der Wachstein-Meisel-Methode (1957) zum Beweis der ATPase-Aktivität in den Zellmembranen behandelt. Die Punktate haben wir unmittelbar nach der Entnahme 20 Std in eiskalter Baker-Lösung fixiert, dann von jedem Punktat einen 2—3 mm langen Teil für fermenthistochemische Reaktion abgetrennt. Für die Diagnostik und die genauere Orientierung diente der Rest des Punktacylinders, den wir mit Standardmethoden färbten (HE, Berliner-Blau-Reaktion, PAS, van Gieson und Silberimpregnation nach Gömöri). Für die Fermentreaktion wurden Gefrierschnitte hergestellt. Der Schnitt wurde jeweils 1 Std bei 37° C im Medium inkubiert, welches Adenosintriphosphat (Spofa) als Substrat enthielt. Kontrollschnitte haben wir unter den gleichen Bedingungen ohne Substrat inkubiert. Ausgewertet wurden 10—12 Mikron dicke Schnitte.

Der normale Verzweigungstyp des Kanälchenetzes hat folgende Form (Abb. 1): Unter physiologischen Bedingungen steht die Zahl der Seitenäste in enger Beziehung zur Zahl der umliegenden Leberzellen. Die einzelnen Äste folgen in regelmäßigen Abständen. Der überwiegende Teil der Seitenausläufer steht in Verbindung mit einem anderen Teil des Kanälchenetzes, der außerhalb des Schnittes liegt. Deshalb ist es wohl richtig unter normalen Umständen von Seitenästen zu sprechen und den Ausdruck „Ausläufer“ für pathologische Zustände zu reservieren. Bei Störung der Harmonie zwischen der Zahl der um-

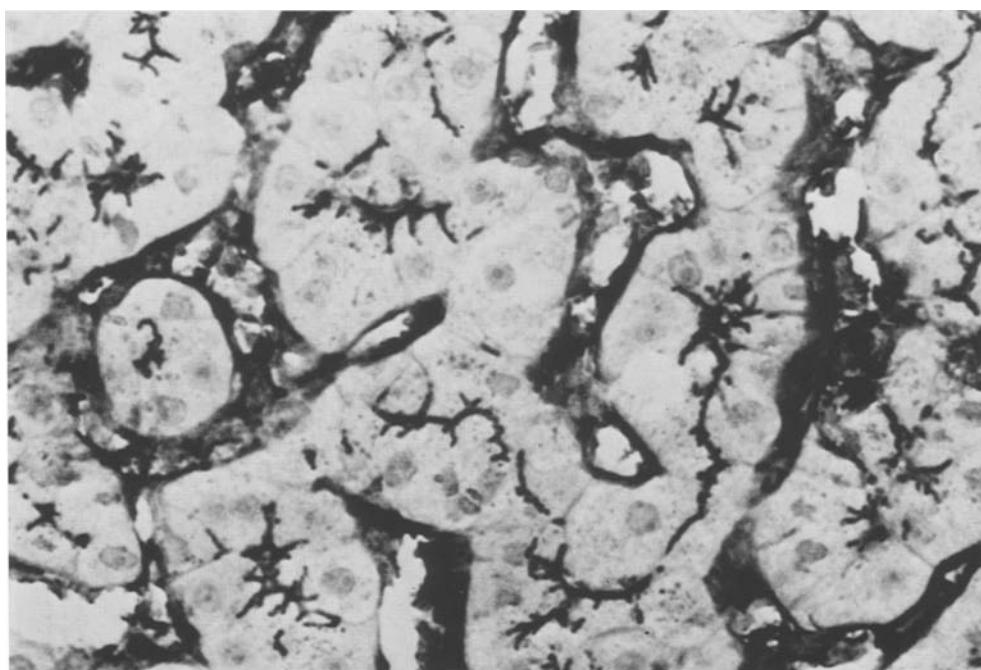


Abb. 2. Gallenkanälchen bei sekundärem Lebercarcinom. Schwergradige Entstehung neuer unregelmäßiger Ausläufer, häufig erweiterte Canaliculi. ATPase. Vergr. 800×

liegenden Leberzellen und der Ausläufer des Netzes zugunsten der Ausläufer und in Verbindung mit verschiedenen Unregelmäßigkeiten der Kanälchen, sprechen wir von einer abnormalen Seitenausläuferbildung, bzw. von blind endenden Kanälchenformationen. Unter physiologischen Umständen ist die Weite der einzelnen Kanälchen gleichmäßig, zur Peripherie erweitern sie sich.

Ergebnisse

Von 192 Leberpunktaten, bearbeitet nach der angeführten Methode, haben wir 17 aus technischen Gründen nicht ausgewertet. In den restlichen 175 Punktaten haben wir 95mal das Bild einer Neubildung von Gallenkanälchen gefunden. Das Gallenkanälchenetz war in 58 Fällen ganz normal, meist in Verbindung mit unverändertem oder nur minimal verändertem Lebergewebe. Die 175 Fälle teilten wir nach dem Grad der Neubildungen der Seitenausläufer in vier Gruppen ein (s. Tabelle).

1. Hoher Grad der Ausläuferbildung. In dieser Gruppe finden wir Neubildungen im Großteil des Schnittes, manchmal diffus. Die auffallendsten Veränderungen sind häufig in der Nähe der Entzündungsfiltration, des Bindegewebes und der Verfettungsherde lokalisiert. Neue Seitenausläufer entspringen in verschiedenen Richtungen in unregelmäßigen Abständen oder aus einer Stelle. Die Größe, Form und Weite der Ausläufer schwanken erheblich. Es kommen sackförmige, kurze, lange und faserförmige Ausläufer vor. Manchmal beherrscht ein

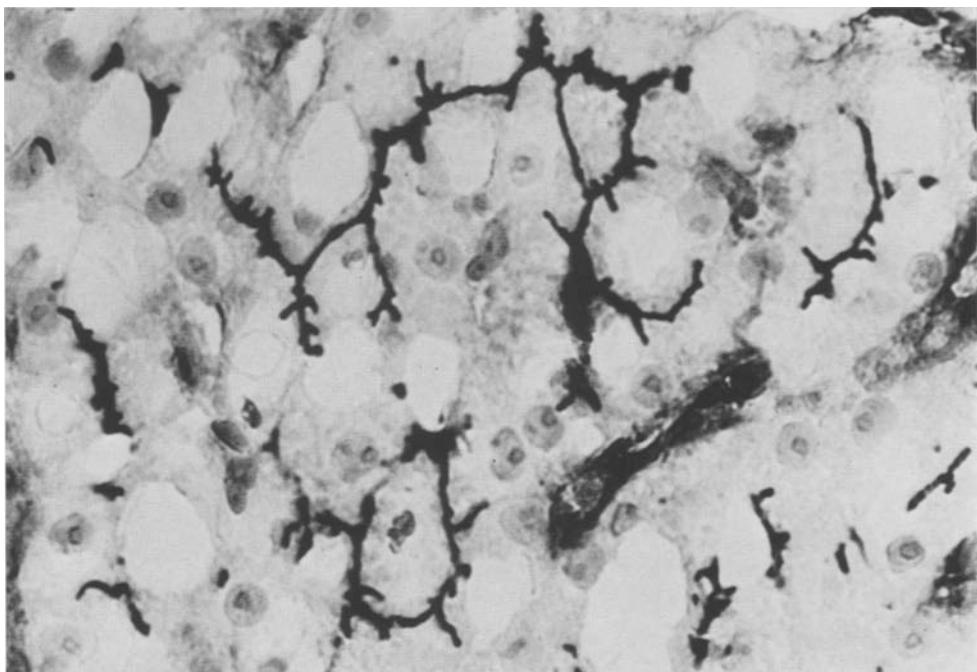


Abb. 3. Fettleber (ca. 80%). Läppchenperipherie mit relativ geringer Verfettung. Die Grundstruktur des Kanälchennetzes ist erhalten. Entstehung kleiner sakkulärer Auslauer. ATPase. Vergr. 900 ×

Typ das ganze Bild, öfter sehen wir auch Kombinationen (Abb. 2). Nach dem vorherrschenden Typ kann das Bild einförmig oder recht bizarr sein. Die Richtung der Schnittebene durch Leberzelllamellen, bzw. Veränderungen der Lamellen, besonders in der Läppchenperipherie, beeinflussen sehr die Form der Kanälchenfiguren. Manchmal scheint es, als ob die einzelnen Figuren ohne Verbindung im Gewebe zerstreut wären. Zur Mannigfaltigkeit des Bildes trägt auch eine herdförmige oder diffus unregelmäßige Kanälchenerweiterung bei. Es kommt vor, daß sich kurze Auslauer in solchen Herden verlieren, wodurch verhältnismäßig kleine „Sterne“ entstehen.

2. Mittlerer Grad der Auslauferbildung. In dieser Gruppe ist die Neubildung mehr herdförmig ausgeprägt (Abb. 3). Neue Auslauer sind in der Nähe des neugebildeten Materials, manchmal ohne Prädilektionsstelle. Die Intensität der Veränderungen ändert sich gewöhnlich im Bereich desselben Herdes. In den Einzelheiten unterscheidet sich diese Gruppe nicht von der ersten. Auch hier kommen die für die Leberverfettung typischen Veränderungen vor (Fragmentation des Netzes, Druckdeformationen der Canaliculi usw.).

3. Geringer Grad der Auslauferbildung. Das Kanälchennetz ist überwiegend normal. Neubildungen finden wir in kleinen Herden, meist in den gleichen Prädilektionsstellen, wie bei den vorgehenden Gruppen. Neue Auslauer sind nicht so zahlreich und variabel, wie in den obengenannten Gruppen. Veränderun-

gen der Kanälchendicke sind selten. Auch hier finden wir oft die für die Verfettung typischen Veränderungen.

4. Leberpunktate ohne Ausläuferbildung. Das Kanälchennetz ist unverändert oder weist nur leichte Variationen des Normalbildes auf; manchmal kommen Abnormitäten anderer Typs vor.

Die untersuchten Punktate teilten wir nach den histologischen Diagnosen in 11 Gruppen ein (s. Tabelle).

Gruppe 1: Normalleber.

Gruppe 2: geringe Periportalfibrose, minimale Verfettung, isolierter Befund von Lochkernen, geringe periportale Zellulisation, auffallende Leberzellpolymorphie usw.

Gruppe 3: Fettleber mit 5—95% Leberzellverfettung.

Gruppe 4: Fettleberhepatitis, Fettfibrose und Fettcirrhose.

Gruppe 5: chronische Hepatitis (mit Ausnahme von persistierender und Fettleberhepatitis) unterschiedlicher Aktivität und Cirrhosen verschiedener Genese und Aktivität (mit Ausnahme biliärer Cirrhose).

Gruppe 6: periportale und intralobuläre Fibrose verschiedenen Grades ohne Entzündungsaktivität und Umbau. Einige Fälle entsprechen einer chronischen abgeklungenen Hepatitis.

Gruppe 7: fortgeschrittene Leberamyloidose.

Gruppe 8: Leber mit Carcinommetastasen.

Gruppe 9: zwei Fälle von akuter Virushepatitis und sieben Fälle ihrer späteren Rückbildung.

Gruppe 10: Punktate mit isoliertem Befund stärkerer Pigmentation und nicht geklärten unspezifischen Hepatitiden mit bescheidenen Veränderungen.

Gruppe 11: zerbrockelte und wahrscheinlich nicht repräsentative Punktate (verdächtige Cirrhose, chronische Hepatitis und Fibrose).

Aus der Tabelle geht hervor, daß wir die Neubildung der Ausläufer etwa in der Hälfte der Punktate fanden. Von 122 ausgeprägt pathologisch veränderten Punktaten sahen wir 33mal das Kanälchennetz ohne abnormale Ausläufer. In der Gruppe der normalen und minimal veränderten Lebern ist die Ausläuferbildung eine Seltenheit (insgesamt 6mal von 53 Fällen). Bei komplizierter Verfettung ist die Ausläuferbildung fast ein regelmäßiger Befund. Eine Beziehung zwischen der Intensität der Neubildung und der Verfettung haben wir weder bei unkomplizierten noch bei komplizierten Steatosen feststellen können. Zwei Fälle von Amyloidose und einen Fall von Sekundärcarcinom der Leber haben wir wegen ausgeprägten Veränderungen gesondert angeführt. Bei der Amyloidose wechseln Herde einer übermäßigen Ausläuferbildung mit jenen, in denen sich die Kanälchenzeichnung verliert. Eine Beziehung zwischen dem Typ der neuen Ausläufer und der Form der Lebererkrankung stellen wir nicht fest. Bizarre Ausläufer kommen etwas häufiger bei Verfettungen und deren Komplikationen vor, weniger auffallende Figuren fanden wir bei chronischen Hepatitiden und Cirrhosen.

Den höchsten Grad der Ausläuferbildung fanden wir bei komplizierten Verfettungen, Cirrhosen und chronischen Hepatitiden (insgesamt 14mal, bei allen anderen Gruppen nur 5mal). Beim mittleren Grad tritt die Gruppe von Fibrosen dazu. Von 95 Punktaten, bei denen wir die Ausläuferbildung beschrieben haben, waren 50 auch mit anderen Typen von Kanälchenabnormalitäten verbunden.

Tabelle. *Abnorme Anordnung des Gallenkanälchennetzes in Leberpunktaten*

Grup- pen	Histologische Diagnose	Gesamt- zahl der Punktate	Canaliculi					andere Besonder- heiten					
			Nor- mal- netz	Ausläuferbildung				Ge- sam- zahl	Ge- sam- ten Grades	Ge- sam- ten Grades	Ge- sam- zahl	mit Aus- läufern	ohne Aus- läufer
				Ge- sam- tahl	gerin- gen	mitt- leren	höhe- ren						
1	Normalleber	22	21	1	1	—	—	1	1	—	—	—	—
2	Minimal- veränderungen	31	21	5	4	1	—	5	—	—	5	—	—
3	Unkomplizierte Fettleber	26	6	13	9	3	1	20	13	7	—	—	—
4	Komplizierte Fettleber	30	1	25	10	9	6	28	24	4	—	—	—
5	Chronische Hepatitiden und Cirrhosen	22	2	20	5	7	8	5	5	—	—	—	—
6	Leberfibrose	13	3	10	5	5	—	—	—	—	—	—	—
7	Amyloidose	2	—	2	—	2	—	2	2	—	2	—	—
8	Leber mit Carcinom- metastasen	1	—	1	—	—	1	1	1	—	—	—	—
9	Virushepatitis und ihre Rück- bildungsstadien	9	1	7	4	3	—	5	4	—	1	—	—
10	Andere Befunde	10	3	2	1	1	—	5	—	—	5	—	—
11	Keine definitive Diagnose	9	—	9	2	4	3	—	—	—	—	—	—
Gesamtzahl		175	58	95	41	35	19	72	50	—	22	—	—

Solche Befunde stellten wir auch bei weiteren 22 Punktaten ohne Ausläuferbildung fest. Verbindungen zwischen den Gallenkanälchen und den Disse'schen Raum fanden wir äußerst selten.

Diskussion

Bei der Auswertung des Gallenkanälchennetzes haben wir für einen neugebildeten Ausläufer, der aus normal lokalisierten Kanälchen im intercellulären Raum entspringt, die Präcipitatslinie des Bleisulfids gehalten. Die Zahl der Linien steht nicht in einem direkten Verhältnis zur Zahl der umliegenden Leberzellen. Auf einen Parenchymabschnitt entfallen mehr Linien als Normaläste unter physiologischen Bedingungen. Beim Großteil der Ausläufer kann man auch in dickeren Schnitten die Kontinuität mit einem anderen Netzabschnitt nicht nachweisen. Die Neubildung der Ausläufer ist oft mit einer abnormalen Verdickung größerer oder kleinerer Kanälchenabschnitte verbunden. Die regelmäßige netzförmige

Struktur ist oft gut erkennbar und neue Ausläufer entspringen aus ihr. In anderen Fällen ist die ganze Struktur verändert und vom ursprünglichen Netzwerk bleiben nur schwer erkennbare kürzere Abschnitte übrig.

Die formale Pathogenese der Kanälchenabnormitäten ist nicht gelöst. Bei unseren Erwägungen gehen wir von den gemeinsamen Eigenschaften der angeführten Lebererkrankungen aus und vermuten, daß es wenigstens bei einem Teil der Fälle mit erhöhter Ausläuferneubildung zu degenerativen Veränderungen der Leberzellen bis zu deren Untergang (in größerem oder kleinerem Ausmaß) und zur Anhäufung abnormalen Materials (Entzündungsfiltration, Bindegewebe, Fett, Amyloid, Metastase) kommt. Bei schwerer Degeneration oder beim Zerfall der Leberzellen kommt es zum Untergang auch dieser Kanälchenabschnitte, wodurch die Kontinuität des Netzes unterbrochen wird. Ähnlich wirkt auch der Druck des sich allmählich ansammelnden abnormalen Materials. So verkürzt sich die Gesamtlänge der Gallenkanälchen im betroffenen Parenchym und der Gallenabfluß wird im chaotisch veränderten Kanälchenlabyrinth gestört. Wir vermuten, daß unter diesen Umständen die Leberzellen neue extra- und intrazelluläre Flächen bilden, die nach der Wachstein-Meisel-Methode als Gallenkanälchen sichtbar werden. Unter solchen pathologischen Umständen entstehende Gebilde können wahrscheinlich nicht alle funktionelle und morphologische Kriterien der normalen Gallenkanälchen erfüllen. Wir halten sie für pathologische Formationen und glauben, daß hier eine Leberzellschädigung mit dem Obstruktionsmoment zusammenwirkt. So erwägt man auch die Genese sehr ähnlicher Kanälchenveränderungen bei humaner und experimenteller extra- und intrahepatischer Cholestase (Wachstein und Meisel, 1959; Holzner et al., 1963; Breitfellner et al., 1966; Desmet et al., 1968; Krstulović et al., 1968). Dabei ist der mögliche Einfluß humoraler und medikamentöser Faktoren nicht zu vergessen.

Seit 1957, als Wachstein und Meisel die Methode des Nachweises der Aktivität der das ATP spaltenden Fermente publizierten, wird sie zur Demonstration des Kanälchennetzes in der Lichtmikroskopie verwendet — trotz der strittigen Resultate der Untersuchungen, die sich mit deren Enzymspezifität befassen (Novikoff et al., 1961; Moses et al., 1966; Rosenthal et al., 1966; Novikoff, 1967; Sandström, 1970). Dieser Umstand ist aber für die Problematik unserer Arbeit nicht wesentlich. Die Ergebnisse *elektronenoptisch-histochemischer* Untersuchungen zeigen, daß die unter physiologischen Bedingungen entstehenden Reaktionsprodukte regelmäßig an die Lumenoberfläche der canaliculären Mikrovilli und nur ganz selten an die laterale Zellmembran der Leberzellen gebunden sind (Wills und Epstein, 1966; Tanikawa, 1969; Sandström und Westman, 1969). Das sog. ultrahistochemische Bild der ATPasen in der pathologisch veränderten Leber ist nur wenig bekannt. So schwindet z.B. bei extrahepatischer Cholestase (Wills und Epstein, 1966) gleichzeitig mit dem Schwund der Mikrovilli in den Gallenkanälchen auch die Aktivität der ATPasen, dagegen sind auf den lateralen Zellmembranen die positiven Abschnitte häufiger. Das so entstandene Bild stellt nicht das gesamte Kanälchensystem dar. Bei der extra- und intrahepatalen Cholestase des Menschen und der experimentellen der Tiere wurden *elektronenmikroskopisch* Kanälchendilatationen, Verlängerung der Canaliculi in der Richtung zum Disse'schen Raum, Bildung und Vermehrung sakkularer Gebilde in den Leberzellen, Bildung und Dilatation der Mikrovilli in interzellulären Spalten und

intracelluläre Kanälchen beschrieben (Steiner und Carruthers, 1961; Carruthers und Steiner, 1962; Breitfellner et al., 1966; Tanikawa, 1969; Schaffner, 1965). Bei Cirrhose der Menschen (Phillips und Steiner, 1965; Pavel et al., 1969; Tanikawa, 1969), wie auch in der Frühphase der Regeneration nach partieller Hepatektomie bei Ratten (Lane und Becker, 1966) wird besonders auf die Erweiterung der interzellulären Spalten mit der Bildung von Mikrovilli hingewiesen. Bei aktiven posthepatitischen Cirrhosen beschrieben Phillips und Steiner (1966) auf der Knotenperipherie eine Tubularisation dickerer Lamellen der Leberzellen mit einer abnormalen Lumenoberfläche der Zellen. Bei der Virushepatitis kommen Dilatationen der Gallenkanälchen um die nekrotisierenden und ballonisierenden Zellen vor (Tanikawa, 1969). In der intermediären Zone des Läppchens beschrieben Safran und Schaffner (1967) bei der Stauungsleber stark erweiterte Gallenkanälchen mit Bildung intracellulärer Divertikel.

Unsere Beobachtungen bestätigen die enzymhistochemischen Ergebnisse von Holzner et al. (1966), die die beschriebenen Kanälchenformationen bei posthepatitischen Zuständen und chronischen Entzündungen fanden. Wir konnten aber diese Prozesse von dem beginnenden Umbau nach den Kanälchenfiguren, wie es diese Autoren angeben, nicht unterscheiden. Wir glauben, daß die Neubildung der Ausläufer eine ziemlich polymorphe, allgemeine Erscheinung ist und nach ihrer Anordnung, Dicke und Form es nicht möglich ist Schlüsse über eine beginnende Regeneration zu ziehen. Zum Unterschied von Holzner et al. (1962) haben wir bei Leberverfettung die Bildung abnormaler Sterngebilde und bizarre verzweigter Abschnitte auch ohne Anwesenheit cirrhotischer Veränderungen gesehen. Die beschriebenen feingeböschlichen Veränderungen stimmen auch mit den cytologischen Befunden von menschlichen Lebern überein, wie sie Wasastjerna et al. (1970) beschrieben, sowie mit den Ergebnissen intravitaler Fluoreszenzuntersuchungen bei experimenteller intrahepatischer Cholestase (Bhathal et al., 1969).

Die dargelegten Abnormitäten des Kanälchennetzes im Sinne der Neubildung von Ausläufern (d.h. wahrscheinlich tubuläre Gebilde mit manchen Eigenschaften der Canaliculi) und die Lumenveränderungen betrachten wir als das Resultat des Zusammenwirkens mehrerer Faktoren, die im pathologisch veränderten Lebergewebe vorkommen. In Einzelfällen kommt es zu verschiedenen Kombinationen dieser Faktoren mit unterschiedlichen Auswirkungen. Das Ergebnis ist eine beträchtliche Variabilität der Veränderungen. Aus dem Angeführten geht hervor, daß die morphologischen Veränderungen im Kanälchennetz im Punktionsmaterial nicht vernachlässigt werden dürfen, da sie sich in engem Zusammenhang mit den pathologischen Veränderungen der übrigen Komponenten des Lebergewebes viel häufiger entwickeln, als es bei der routinemäßigen Punktionsdiagnostik feststellbar ist.

Literatur

- Bhathal, P. S., Christie, G. S.: A fluorescence microscopic study of bile duct proliferation induced in Guinea pigs by α -naphthyl isothiocyanate. Lab. Invest. **20**, 480—487 (1969).
 Breitfellner, G., Holzner, J. H., Schumacher, A., Stefanelli, N.: Die elektronenoptischen und die nach enzymhistochemischer Darstellung der ATPase erkennbaren Veränderungen der Rattenleber bei experimenteller intrahepatischer Cholestase. Beitr. path. Anat. **134**, 267—288 (1966).
 Carruthers, J. S., Steiner, J. W.: Fine structure of terminal branches of the biliary tree. Arch. Path. **74**, 117—126 (1962).

- Desmet, V. J., Krstulović, B., Damme, B. von: Histochemical study of rat liver in alpha-naphthyl isothiocyanate (ANIT) induced cholestasis. Amer. J. Path. **52**, 401—421 (1968).
- Holzner, J. H., Stefenelli, N., Wewalka, F. G.: 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. III. München, 1962. Basel-New York: Karger 1963.
- — — Enzymhistochemische Veränderungen der Leber bei Hepatitis. Acta hepato-splenol. (Stuttg.) **13**, 1—14 (1966).
- Krstulović, B., Damme, B. von, Desmet, V. J.: Comparative histochemical study of rat liver in bile-duct ligation and in alpha-naphthyl isothiocyanate (ANIT) intoxication. Amer. J. Path. **52**, 423—436 (1968).
- Lane, B. P., Becker, F. F.: Regeneration of the mammalian liver. II. Surface alterations during differentiation of the liver cell in preparation for cell division. Amer. J. Path. **48**, 183—196 (1966).
- Moses, H. L., Rosenthal, A. S., Beaver, D. L., Schuffman, S. S.: Lead ion and phosphatase histochemistry. II. Effect of adenosine triphosphate hydrolysis by lead ion on the histochemical localization of adenosine triphosphatase activity. J. Histochem. Cytochem. **14**, 702—710 (1966).
- Novikoff, A. B.: Enzyme localization with Wachstein-Meisel procedures; real or artifact. J. Histochem. Cytochem. **15**, 353—354 (1967).
- Drucker, J., Woo-Yung Shin, Goldfischer, S.: Further studies of the apparent adenosinetriphosphatase activity of cell membranes in formol-calcium-fixed tissues. J. Histochem. Cytochem. **9**, 434—451 (1961).
- Pavel, I., Cămpeanu, S., Bonaparte, H., Petrovici, A.: The ultrastructure of the hepatic intercellular spaces in certain diseases. Path. Microbiol. **34**, 35—44 (1969).
- Phillips, M. J., Steiner, J. W.: Electron microscopy of liver cells in cirrhotic nodules. I. The lateral cell membranes. Amer. J. Path. **46**, 985—1005 (1965).
- — — Electron microscopy of cirrhotic nodules. Tubularization of the parenchyma by biliary hepatocytes. Lab. Invest. **15**, 801—817 (1966).
- Rosenthal, A. S., Moses, H. L., Beaver, D. L., Schuffman, S. S.: Lead ion and phosphatase histochemistry. I. Nonenzymatic hydrolysis of nucleoside phosphates by lead ion. J. Histochem. Cytochem. **14**, 698—701 (1966).
- Safran, A. P., Schaffner, F.: Chronic passive congestion of the liver in man. Amer. J. Path. **50**, 447—463 (1967).
- Sandström, B., Westman, J.: Non-freezing light- and electron microscopic enzyme histochemistry by means of polyethylene glycol embedding. Histochemie **19**, 181—183 (1969).
- On the specificity of histochemistry demonstrable bile canalicular phosphatase activities. Histochemie **22**, 316—323 (1970).
- Schaffner, F.: Morphologic studies on bile secretion. Amer. J. dig. Dis. **10**, 99—115 (1965).
- Steiner, J. W., Carruthers, J. S.: Studies on the fine structure of the terminal branches of the biliary tree. Amer. J. Path. **39**, 41—63 (1961).
- Tanikawa, K.: Ultrastructural aspects of the liver and its disorders. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1968.
- Wachstein, M.: Enzymatic histochemistry of the liver. Gastroenterology **37**, 525—537 (1959).
- Meisel, E.: Histochemistry of hepatic phosphatases at physiologic pH. With special reference to the demonstration of bile canaliculi. Amer. J. clin. Path. **27**, 13—23 (1957).
- Wasastjerna, C., Thodén, C. J., Ekelund, P., Haltia, K.: The bile canaliculi in cytological aspiration biopsies from patients with liver disorders. Scand. J. Gastroent. **5**, 327—331 (1970).
- Wills, E. J., Epstein, M. A.: Subcellular changes in surface adenosine triphosphatase activity of human liver in extrahepatic obstructive jaundice. Amer. J. Path. **49**, 605—635 (1966).

Dr. med. Alex Horváth
Städtisches Krankenhaus
Bratislava, Kramáre
Tschechoslowakei