

Aktivitätsveränderungen der alkalischen Phosphatase des Herzmuskels bei tierexperimentell erzeugter Herzhypertrophie*

Wolfgang Rebel und Thomas Stegmann

Pathologisches Institut der Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Universität
Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. med. G. Schallock)

Eingegangen am 10. Juni 1972

Changes in the Myocardial Alkaline Phosphatase Activity in Experimental Hypertrophy of the Heart

Summary. Rats of various ages and weights are subjected to swimming training for 0.5 to 200 hours. The alkaline phosphatase activity is established, measured photometrically and compared with the enzyme activity in animals not subjected to stress.

The enzyme activity within the vascular walls and the capillary endothelia is high in young animals and falls with advancing age. The young animals subjected to the stress of swimming show an initial decrease in the alkaline phosphatase activity compared to the controls but the activity rises above the normal level following further stress. Increased alkaline phosphatase activity is detected early in the adult animals under the stress of swimming training and it is increased further by additional stress. Untrained animals subjected to maximum stress immediately before sacrifice show only a slight increase in activity. The phosphatase activity in previously-trained animals is increased substantially if the animals have been subjected to maximum stress before sacrifice; no further increase in activity is recorded following additional stress even when the training period has been as long as 200 hours.

The importance of these results is discussed with reference to hypertrophy of the heart and incipient cardiac insufficiency. The alkaline phosphatase of the vascular wall is assumed to play a part in the provision of energy for the intensified transport process in hypertrophy.

Zusammenfassung. Ratten unterschiedlichen Alters und Körpergewichts werden einem Schwimmtraining von 0,5—200 Std ausgesetzt. Es wird die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase nachgewiesen, photometrisch gemessen und mit der Enzymaktivität unbelasteter Tiere verglichen.

Die Enzymaktivität in den Gefäßwänden und Capillarendothelien ist bei jungen Tieren hoch und fällt mit dem Lebensalter ab. Durch Schwimmtraining belastete junge Tiere zeigen zunächst eine gegenüber den Kontrollen erniedrigte Phosphataseaktivität, die sich jedoch bei weiterer Belastung über die Norm erhöht. Für ausgewachsene Tiere, die durch Schwimmtraining belastet werden, lässt sich frühzeitig eine erhöhte Aktivität der alkalischen Phosphatase nachweisen; sie steigt mit zunehmender Belastung weiter an. Unmittelbar vor der Tötung maximal belastete Tiere, die untrainiert sind, lassen eine nur geringe Aktivitäts erhöhung erkennen. Werden vorher trainierte Tiere vor der Tötung maximal belastet, ist ihre Phosphataseaktivität deutlich erhöht; bei einem langen Vortraining von 200 Std ist kein weiterer Aktivitätsanstieg in der zusätzlichen Belastungssituation zu verzeichnen.

Die Bedeutung dieser Befunde im Hinblick auf Herzhypertrophie und beginnende Herzinsuffizienz wird diskutiert. Es wird angenommen, daß die alkalische Phosphatase der Gefäßwand an der Bereitstellung von Energie für die bei Hypertrophie gesteigerten Transportprozesse beteiligt ist.

* Mit Unterstützung des Verbandes der Lebensversicherungsunternehmen e. V., Bonn.

1. Einleitung

Neben zahlreichen Arbeiten über die elektronenmikroskopisch nachweisbaren Veränderungen der Herzmuskelstruktur bei Belastung, experimenteller Hypertrophie und Insuffizienz (Wollenberger und Schulze, 1961, 1962; Meerson, Zaletajeva, Lagutchev und Pshennikova, 1964; Wegner und Mölbert, 1966; Novi, 1968; Poche, de Mello-Mattos, Rembarz und Stoepel, 1968; Hatt und Swynghedauw, 1968; Onishi und Zittel, 1968; Bozner und Meessen, 1969; Büchner und Onishi, 1970) ist in neuerer Zeit auch der Stoffwechsel des hypertrofischen und insuffizienten Myokards Gegenstand vieler Untersuchungen (Meerson, 1962, 1965; Bing, Wu und Gudbjarnason, 1964; Bing, 1965; Hochrein, 1968; Hochrein und Lossnitzer, 1968; Lindenmayer, Sordahl und Schwartz, 1968; Gudbjarnason, Braasch und Bing, 1968; Fanburg und Posner, 1968; Badeer, 1968; Koide und Rabinowitz, 1969; Dart und Holloszy, 1969; Fanburg, 1971). Besonders auf dem Gebiet des Stoffwechsels der Proteine und der energiereichen Phosphate konnten umfangreiche neue Erkenntnisse gewonnen werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich ebenfalls mit dem Stoffwechsel des experimentell belasteten Herzens. Dabei interessierte besonders, inwieweit sich Stoffwechselveränderungen des Herzmuskels durch Enzymaktivitätsveränderungen nachweisen lassen (Gudbjarnason, de Schryver, Hunn und Bing, 1964; de Champlain, Krakoff und Axelrod, 1968; Hochrein, 1968; Vihert und Pozdnyunina, 1969). Der Herzmuskel wird in diesem Zusammenhang als ein funktionelles Ganzes betrachtet, dessen physiologische Leistung an ein regelrechtes Zusammenspiel von Myokardfasern, Interstitium und Gefäßen gebunden ist. Der Begriff der „Synergide“, wie er von Siegmund (1944) für das Lebergewebe geprägt wurde, wird hier in analoger Weise auf den Herzmuskel übertragen („Myokardion“, Doerr, 1970, 1971). Histochemische Methoden ermöglichen dabei die Lokalisation von biochemischen Prozessen bei der Entwicklung einer Herzhypertrophie.

Direkte Zielstellung dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, welche Veränderungen in der Aktivität der alkalischen Phosphatase der Gefäßwand im Herzmuskel von im Schwimmversuch belasteten Ratten vorliegen. Die Enzymaktivität als Untersuchungsgegenstand ist deshalb besonders geeignet, weil sie als Indicator von Änderungen im Stoffwechsel angesehen werden kann. Mit quantitativer histochemischer Methodik wird von morphologischer Seite ein Beitrag zur Klärung der metabolisch-energetischen Problematik des hypertrofischen Herzens erarbeitet.

2. Methodik

a) Material und Experimente

Von insgesamt 122 für die hier beschriebenen Experimente verwendeten weiblichen und männlichen Wistaratten (Körpergewicht: 20—600 g) wurden 41 durch Schwimmtraining (0,5—200 Std) unterschiedlich stark belastet. 11 unbelastete Tiere verschiedenen Körpergewichtes (20—440 g) dienten als Kontrollen. 20 vorher sowohl unbelastete als auch belastete Tiere wurden unmittelbar vor der Tötung einer maximalen Schwimmbelastung (3,5—4,5 Std) ausgesetzt und ließen deutliche Zeichen der Erschöpfung erkennen.

50 Tiere dienten ausschließlich zur Aufstellung der Beziehungen zwischen Körper- und Herzgewicht bei steigendem Alter der Tiere. Bei allen Tieren wurden Körpergewicht, Herzgewicht und Herzindex bestimmt. Die Tötung der Tiere erfolgte durch Nackenschlag. Nach sofortiger Entnahme und Präparation des Herzens wurden Teile des linken Ventrikels un-

mittelbar der Gefriertrocknung (Gefriertrocknungsanlage GT 001 der Fa. Leybold-Heraeus) zugeführt.

b) Enzymaktivitäts-Nachweis

Der Nachweis der alkalischen Phosphatase erfolgte an gefriergetrockneten, 5μ dicken Schnitten mit Hilfe der Azo-Farbstoffmethode (Pearse, 1960; Thompson, 1966) mit α -Naptylphosphat als Substrat und fast-red-TR-2 als Diazoniumsalz. Inkubationsdauer: 40 min bei 20°C . Als Kontrollen dienten ohne Substrat inkubierte Schnitte. Zusätzlich wurden von jedem Rattenherz ein Präparat mit Hämalaun-Gegenfärbung und ein HE-Präparat angefertigt. Das Eindecken der Schnitte erfolgte mit Glyceringelatine.

c) Mikrophotometrie

Die vergleichend quantitative Auswertung der Enzymaktivitäten der einzelnen nicht mit Hämalaun gegengefärbten Schnitte erfolgte nach der sog. Plug-Methode (Roels, 1965; Krug, 1965, 1969; Kiefer und Sandritter, 1966; Stiller, 1969). Zunächst wurden mehrere Absorptionsspektren des Reaktionsproduktes im vorliegenden Präparat in Punkten verschiedener Farbstoffintensität gemessen; die sich ergebende Parallelität der Absorptionsspektren beweist indirekt die Proportionalität zwischen Azo-Farbstoff-Intensität im Gewebe und gemessener Extinktion (Sandritter, 1958; Sandritter, Kiefer und Rick, 1963; Kiefer und Sandritter, 1966). Das Lambert-Beersche Gesetz ist somit für die photometrische Messung des vorliegenden Reaktionsproduktes der Enzymwirkung gültig und anwendbar. Ein direkter Nachweis der Proportionalität zwischen Extinktion und Farbstoffkonzentration im Gewebe ist nicht möglich (Sandritter, 1958; Krug, 1964; Kiefer und Sandritter, 1966), da sowohl der molare als auch der spezielle Extinktionskoeffizient des Azo-Farbstoffes im Herzmuskelgewebe unbekannt ist.

Die Bestimmung der Schnittdicke wurde mit der Focussierungsmethode (Weissbach, 1960) vorgenommen; die Schnittdicke betrug $5 \mu \pm 8\%$. Die jeweils photometrisch ausgemessene, durch die Meßblende vorgegebene Einzelmeßfläche hatte eine Größe von $0,79 \mu^2$. Es wurden nur solche Stellen des Präparates ausgemessen, die mikroskopisch eine deutliche Enzymaktivität zeigten. Aus 14 Meßwerten wurde der Mittelwert bestimmt. Die Angabe der Meßwerte erfolgte in Arbeitseinheiten (AE) (Kiefer und Sandritter, 1966; Krug, 1967), die über die gemessene Transmission, die daraus errechnete Extinktion und die bekannte konstante Meßfläche berechnet wurden ($AE = E \times F$).

Photometrisch gemessen wurde im Absorptionsmaximum des Reaktionsproduktes, das bei $\lambda = 449 \text{ nm}$ lag. Die Messungen wurden mit dem Mikroskop-Photometer MPV der Fa. Leitz, Wetzlar durchgeführt (Kondensor: 20/0,33; Objektiv: 25/0,50; Zwischenocular: 25 \times).

3. Ergebnisse

In Übereinstimmung mit der Tatsache, daß das Capillarendothel in den meisten Organen aller bisher untersuchten Species eine histochemisch deutlich nachweisbare Aktivität der alkalischen Phosphatase zeigt (Takamatsu, 1939; Gomori, 1939; Manheimer und Seligman, 1948; Gomori, 1952; Pearse, 1960; Thompson, 1966; El-Maghraby und Gardner, 1968; Müller und Pearse, 1969), konnten auch wir im Capillarendothel des Rattenmyokard eine positive Enzymreaktion nachweisen (Abb. 1). Der Vergleich der enzym-histochemischen Präparate mit den HE-gefärbten Schnitten erhärtete diesen Befund.

In den mittel- und größer-kalibrigen Arterien war die Enzymaktivität vorwiegend im adventitiellen Gewebe lokalisiert; das Endothel ließ keine Enzymaktivität erkennen.

In den kleinen Arterien zeigte die gesamte Gefäßwandung eine positive Reaktion. Eine Differenzierung der Wandschichten dieser Gefäße war wegen der mäßiggradigen Diffusion des Reaktionsproduktes nicht möglich. Die Wand der kleinen Arterien bot mikroskopisch somit das Bild einer nahezu homogenen

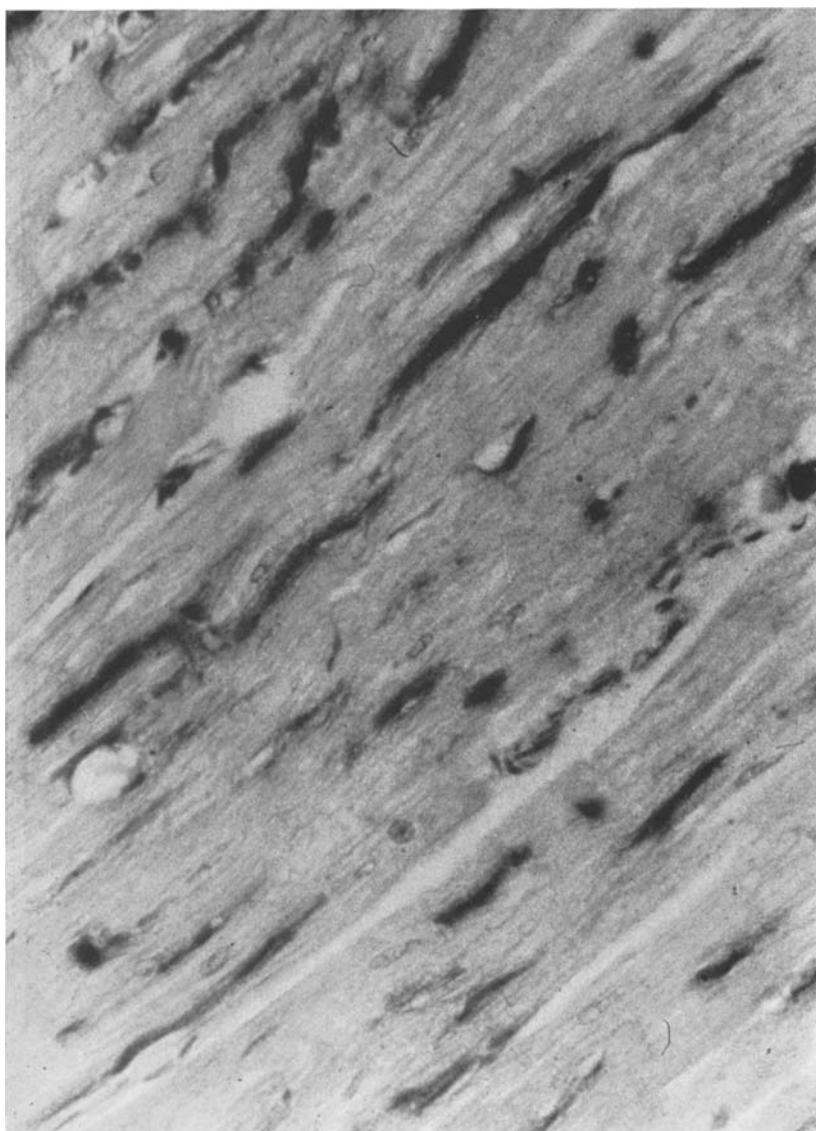


Abb. 1. Alkalische Phosphatase im Myokard der Ratte. Hämalaun-Gegenfärbung.
Vergr. 1:250 (verkleinert auf $\frac{6}{7}$)

Verteilung des Reaktionsproduktes. *Die Myokardfasern selbst ließen keine Enzymaktivität erkennen.* Eine geringe Diffusion des Reaktionsproduktes war in allen Präparaten festzustellen.

Der Vergleich zwischen unbelasteten Kontroll- und belasteten Schwimmieren zeigte für junge Tiere (Alter: bis 2 Monate) keinen wesentlichen Unterschied bezüglich des Herzindexes. Dies ist wohl in erster Linie darauf zurückzuführen, daß diese Tiere noch im Wachstumsprozeß stehen und eine beginnende Herzhypertriebie nicht gegen das physiologische Herzwachstum abzugrenzen ist. Der

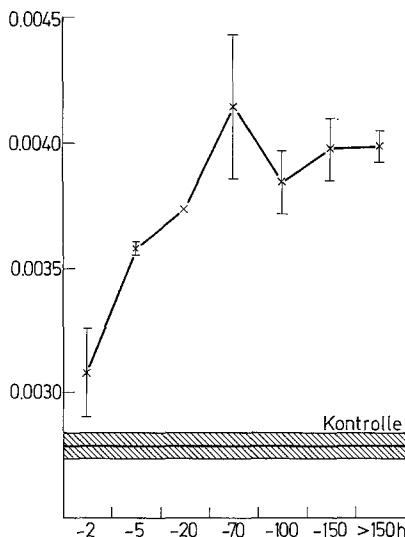


Abb. 2. Herzindex (Ordinate) in Abhängigkeit von der Belastungszeit (Abszisse) mit Angabe der Standardabweichungen und des Kontrollwertes. Die Werte auf der Abszisse geben Gruppen verschiedener Belastungszeit an

Herzindex ausgewachsener, belasteter Tiere (Alter: 3—13 Monate) war jedoch gegenüber dem von Kontrolltieren signifikant erhöht (Abb. 2). Er zeigte zudem eine steigende Tendenz bei zunehmender Belastung. Dies dürfte als Ausdruck einer Belastungshypertrophie gewertet werden.

Die Reaktionsintensität der alkalischen Phosphatase im Capillarendothel und in der Adventitia der kleinen Arterien ist abhängig vom Lebensalter bzw. vom Körpergewicht der Tiere (Abb. 3 und Tabelle 1). Die photometrisch bestimmten und in Arbeitseinheiten (AE) ausgedrückten Intensitätswerte des Reaktionsproduktes im Gewebe zeigten für junge unbelastete Tiere (Alter: 20—34 Tage) eine hohe Enzymaktivität um 52 AE an, die mit fortschreitendem Alter steil abfiel. Zwischen dem 70. und 90. Lebenstag — entsprechend einem durchschnittlichen Körpergewicht von 210 g — betrug die Enzymaktivität um 35 AE und änderte sich im weiteren Lebensalter nur noch unwesentlich. Bei älteren Tieren (Alter: 10—13 Monate; Körpergewicht: über 300 g) bewegte sich die Phosphataseaktivität in einem Bereich um 34 AE.

Dieser Befund einer deutlich unterschiedlichen Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase bei verschiedenem Alter der Tiere erforderte, die Meßwerte der Azo-Farbstoff-Intensität im Myokardgewebe der belasteten Tiere nach dem Alter aufzutrennen. Nur so war ein Vergleich zwischen der Enzym-Reaktionsstärke von unbelasteten und von belasteten Tieren möglich.

Basierend auf den Ergebnissen von Abb. 3 und Tabelle 1 teilten wir das Kollektiv der belasteten Ratten in junge (Alter: bis 70 Tage; Körpergewicht: bis 150 g) und alte Tiere (Alter: 2—13 Monate; Körpergewicht: 150—600 g) auf. In Abb. 4 und 5 ist der Mittelwert der Enzymaktivität der jungen und alten Kontrolltiere zum Vergleich mitangegeben.

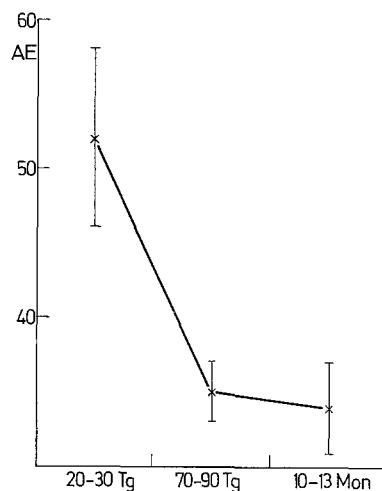


Abb. 3. Abhängigkeit der alkalischen Phosphatase (Angabe in AE) vom Lebensalter mit Angabe der Standardabweichung. Ordinate: AE ; Abszisse: Altersgruppen

Tabelle 1. Mittelwerte der Aktivität der alkalischen Phosphatase (AE) mit Angabe der Standardabweichung. Verschiedene Alters- und Gewichtsgruppen. n = Anzahl der Tiere; m = Mittelwert; s = Standardabweichung

Alter	Körpergewicht (g)	Aktivität der alkal. Phosph.
20—34 Tage $n = 3$	20—90 $m = 45$	$m = 52$ AE $s = \pm 6$
70—90 Tage $n = 2$	165—270 $m = 215$	$m = 35$ AE $s = \pm 2$
10—13 Monate $n = 6$	> 300 $m = 405$	$m = 34$ AE $s = \pm 3$

Tabelle 2. Aktivitätswerte der alkalischen Phosphatase bei trainierten jungen Tieren. Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Trainingszeit wurde in Gruppen eingeteilt

Training (h)	Aktivität der alkal. Phosph. (AE)	Anzahl
—2	$m = 42,7$ $s = 4,7$	3
—5	$m = 51,0$ $s = 3,4$	5
—20	$m = 58,0$ $s = 2,0$	6

Belastete junge Ratten zeigten zu Beginn der Belastung eine gegenüber den Kontrolltieren erniedrigte Phosphataseaktivität (Abb. 4; Tabelle 2). Bei weiterer, zunehmender Belastung durch Schwimmtraining nahm die Enzymaktivität zu und erreichte nach 20stündigem Schwimmtraining einen Wert von 58 AE, der deutlich über der Aktivität der Kontrolltiere lag (Tabelle 2).

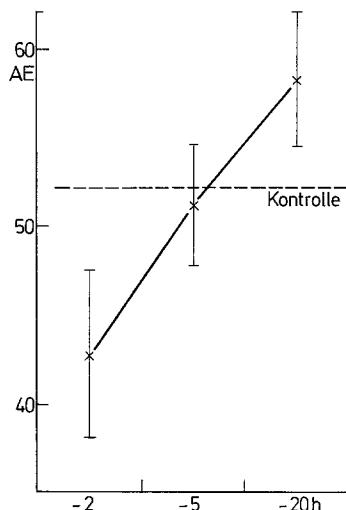


Abb. 4. Junge Tiere. Abhängigkeit der Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase (AE) von der Belastungszeit. Kontrollwert (gestrichelt) zum Vergleich

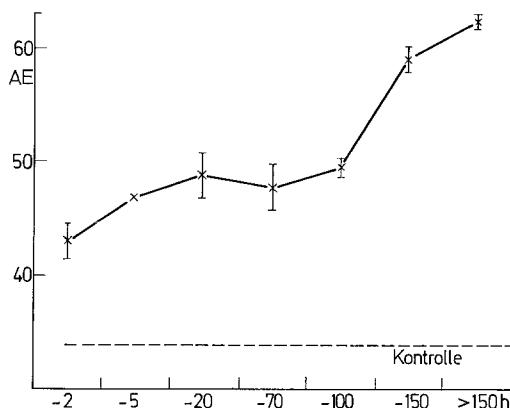


Abb. 5. Ausgewachsene Tiere. Abhängigkeit der Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase (AE) von der Belastungszeit. Kontrollwert (gestrichelt) zum Vergleich

Belastete ausgewachsene Tiere besaßen eine grundsätzlich erhöhte Enzymaktivität gegenüber den Kontrolltieren der gleichen Altersgruppe (Abb. 5; Tabelle 3). Mit zunehmender Schwimmbelastung nahm auch die Enzymaktivität zu, stabilisierte sich jedoch im weiteren Verlauf des Schwimmtrainings auf einen Wert um 50 AE. Erst nach Schwimmbelastung über 100 Std fanden wir einen erneuten Anstieg der Enzymaktivität auf über 60 AE (Tabelle 3).

In der Gruppe der unmittelbar vor der Tötung maximal belasteten Tiere ergab sich für untrainierte Tiere mit einem Durchschnittsgewicht von 370 g eine mäßiggradige Erhöhung der Aktivität der alkalischen Phosphatase (Tabelle 4) gegenüber den Kontrollen (Tabelle 1). Der Mittelwert für 12 Tiere betrug

Tabelle 3. Aktivitätswerte der alkalischen Phosphatase bei trainierten ausgewachsenen Tieren mit Angabe der Trainingszeit. Mittelwerte und Standardabweichung

Training (h)	Aktivität der alkal. Phosph. (AE)	Anzahl
—2	$m = 43,0$ $s = 1,5$	4
—5	$m = 47,0$	1
—20	$m = 49,0$ $s = 2,0$	2
—70	$m = 47,7$ $s = 2,0$	3
—100	$m = 49,4$ $s = 0,7$	5
—150	$m = 59,2$ $s = 1,2$	9
>150	$m = 62,3$ $s = 0,9$	3

Tabelle 4. Vor der Tötung maximal belastete Tiere. Angabe von Anzahl, Körpergewicht, Aktivität der alkalischen Phosphatase, Belastungszeit vor der Tötung und Trainingsdauer. Die erste Querreihe zeigt die Werte für untrainierte Tiere. Die letzte Querreihe gibt den Mittelwert aller trainierten Tiere an

Anzahl	Körpergewicht (g)	Aktivität der alkal. Phosph. (AE)	Belastung vor der Tötung (Std)	Training (Std)
12	370	39	4	0
2	150	43	4—5	—20
4	240	51	4—5	—90
2	230	51	4—5	—200
$\Sigma 8$	210	49	4—5	20—200

39 AE. Trainierte Tiere jedoch wiesen eine deutlichere Aktivitätserhöhung entsprechend ihrer vorangegangenen Schwimmzeit auf (Tabelle 4); bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 210 g betrug der Mittelwert der Enzymaktivität 49 AE.

4. Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methode der *histophotometrischen Messung* des Reaktionsproduktes beim histochemischen Nachweis der alkalischen Phosphatase im Herzmuskelgewebe stellt den Versuch dar, *Unterschiede in der Enzymaktivität* nachzuweisen, die durch mikroskopische Betrachtung des Präparates kaum erfaßt werden können. Eine einfache visuelle Schätzung der Farbintensität des in der Enzymreaktion gebildeten Azo-Farbstoffes ist zu grob, um subtile Veränderungen der Enzymaktivität in verschiedenen Alters- und Belastungsstufen zu verifizieren.

Andererseits ist die Photometrie eines im Präparat nur bedingt homogen verteilten Farbstoffes — wie hier vorliegend — problematisch. Zu den bekannten grundsätzlichen, physikalischen Fehlerquellen der Histophotometrie (vgl. Naora, 1958; Sandritter, 1958; Krug, 1964, 1969; Stiller, 1969) kommt bei der Intensitätsmessung des enzymatischen Reaktionsproduktes die Tatsache, daß der gebildete Azo-Farbstoff in Form von Granula vorliegt, also inhomogen ist. Dennoch erscheint

die Anwendung der photometrischen Messung sinnvoll: Die Granula sind sehr klein; die Enzymaktivität — mithin auch die Granula — ist nicht wahllos im Gewebe verteilt, sondern stellt sich konzentriert und gehäuft als reaktionspositive Fläche dar, die in der Gefäßwand lokalisiert ist; die photometrisch ausgemessene Fläche wird sehr klein gehalten. Hinzu kommt, daß beim enzymhistochemischen Nachweis der alkalischen Phosphatase die Inkubationsbedingungen (Inkubationszeit, Puffer, pH, Substratkonzentration) für alle Präparate konstant sind.

Der Nachweis der Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes (Sandritter, Kiefer und Rick, 1963) für das Reaktionsprodukt, auf den im methodischen Teil eingegangen wurde, sowie eine genaue Flächenbestimmung sind weitere Voraussetzungen für eine Anwendung der Histophotometrie (Kiefer und Sandritter, 1966). Um die Fehlerquellen der mikroskopisch-photometrischen Apparatur möglichst gering zu halten, wurde mit kleiner Kondensorapertur, kleiner Leuchtfeldblende und netzstabilisiertem monochromatischen Licht gearbeitet.

Ohne alle möglichen Fehlerquellen ausschalten oder zahlenmäßig bilanzieren zu können, stellt die angegebene Methodik dennoch einen für die vorliegende Fragestellung brauchbaren Weg dar, vergleichend quantitative Meßwerte zu erhalten.

Die alkalische Phosphatase, zur Gruppe der Hydrolasen gehörig, spaltet auf hydrolytischem Wege vorwiegend Orthophosphomonoester; ihr pH-Optimum liegt bei pH 9,0—9,6 (Deane, Barnett und Seligman, 1960; Thompson, 1966). Neben dem Vorkommen dieses Enzyms in Knochen, Nierenrinde, Darmschleimhaut (Roche und Thoai, 1950), in den Sekreten von Leber, Pankreas, Speicheldrüsen und Mamma (Deane, Barnett und Seligman, 1960) ist die Lokalisation der alkalischen Phosphatase in der Gefäßwand bekannt (Takamatsu, 1939; Gomori, 1939, 1941; Hüttner, Kerényi, Veress, Tóth, Kónyár und Jellinek, 1967; El-Maghraby und Gardner, 1968; Müller und Pearse, 1969; Kirk, 1969). Die Myokardfasern zeigen keinen (Takamatsu, 1939; Gomori, 1939, 1941; Müller und Pearse, 1969) oder nur ganz geringen (Bourne, 1942) positiven Reaktionsausfall. Auch wir konnten keine Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase im Inneren der Muskelzellen nachweisen.

Struktur und Funktion der alkalischen Phosphatase sind noch weitgehend ungeklärt (Morton, 1961; Thompson, 1966). Das Enzym hydrolysiert verschiedene sowohl physiologisch vorkommende als auch synthetische Phosphatester, z.B. Glycerophosphat, Glucose-1-Phosphat, Kreatinphosphat, Hexosediphosphat, Adenylsäure, Adenosintriphosphat, Thiaminpyrophosphat, α -Naphtlyphosphat (Gomori, 1949; Newman, Feigin, Wolf und Kabat, 1950; Feigin und Wolf, 1955). Die geringe Substratspezifität, unterschiedliche Aktivatoren und Inhibitoren und das breite pH-Optimum sprechen dafür, daß es sich bei der alkalischen Phosphatase um eine *Gruppe von Phosphatasen* handelt, die in der histochemischen Nachweisreaktion gemeinsam erfaßt werden (Emmel, 1952; Burgos, Deane und Barnett, 1954; Friedenwald und Gryder, 1958; Morton, 1961).

Die möglichen *Funktionen* dieses Enzyms im Stoffwechsel scheinen im wesentlichen folgende zu sein (Morton, 1961): 1. Aufrechterhaltung der intracellulären Phosphatkonzentration; 2. Katalyse von Dephosphorylierungsreaktionen, die

Absorption und aktiven Transport ermöglichen; 3. Stoffwechselkontrolle durch Dephosphorylierung; 4. Synthese von Phosphatestern.

Porter und Palade (1957) deuten das sarkoplasmatische Reticulum der quer-gestreiften Muskelfaser, in dem elektronenmikroskopisch Phosphataseaktivität nachgewiesen wurde, als Vermittler des Aktionspotentials von der Zelloberfläche zur Region der Myofibrillen unter Mitwirkung der membranständigen Phosphatase. Ähnlich nimmt Clark (1961) eine grundsätzliche Beteiligung der alkalischen Phosphatase an der Umwandlung von chemischer Energie in Bewegung an.

Die hohe Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Myokardgefäßen junger Tiere (Abb. 3) scheint in einer gegenüber älteren Tieren höheren Stoffwechselrate begründet zu sein. Die Deutung liegt nahe, daß die aktiven Transportprozesse in der Arterienwand und im Capillarendothel während des Wachstums gesteigert sind; dabei ist eine Beteiligung der alkalischen Phosphatase an der Bereitstellung von Energie für diese Prozesse wahrscheinlich (Lansing, 1959; Hüttner, Kerényi, Veress, Tóth, Konyár und Jellinek, 1967).

Eine Beteiligung der alkalischen Phosphatase an Transportprozessen wird auch von Samorajski und McCloud (1961) diskutiert, die auf Veränderungen der Enzymaktivität in geschädigten Hirngefäßen hinweisen. Hüttner, Kerényi, Veress, Tóth, Konyár und Jellinek (1967) nehmen an, daß die Aktivität der alkalischen Phosphatase an der Media-Aventitia-Grenze von Rattengefäßen mit der Steigerung der Ernährung und der Transportprozesse der Gefäßwand parallel ansteigt. Der Einfluß von anorganischem Phosphat und die Beteiligung der alkalischen Phosphatase bei der Zuckerresorption im Dünndarm wird von Bourne (1942) zur Diskussion gestellt. Lansing (1959) diskutiert die Bedeutung der alkalischen Phosphatase im Capillarendothel für die Struktur der Endothelzellmembran und für den Stofftransport durch das Endothel. Elektronenmikroskopische Untersuchungen, die die Lokalisation der alkalischen Phosphatase vorwiegend auf den Membranen der Zelle nachwiesen (Mölbert, Duspiva und von Deimling, 1960; Clark, 1961; Porter und Palade, 1957), lassen die Deutung der Membranen als allgemeinen Wirkungsort dieses Enzyms zu (Clark, 1961).

Auch die hier vorliegenden Ergebnisse lassen annehmen, daß der alkalischen Phosphatase eine wesentliche Funktion bei Dephosphorylierungsreaktionen im Stoffwechsel der Gefäßwand zukommt. Die durch die Enzymwirkung freigesetzte Energie wird für die Zelleistungen des aktiven Transportes von Stoffen durch die Gefäßwand zu den Parenchymzellen benötigt.

Der Befund einer deutlichen Aktivitätsabnahme der alkalischen Phosphatase in den Myokardgefäßen der Ratte mit fortschreitendem Alter steht im *Gegensatz* zu den Ergebnissen von Bourne (1957), der eine allgemeine Aktivitätszunahme der dephosphorylierenden Enzyme in alten Geweben feststellte.

Die anfängliche Aktivitätsverminderung der alkalischen Phosphatase bei jungen, durch Schwimmtraining belasteten Tieren (Abb. 4) deuten wir als Ausdruck einer gewissen Stoffwechselleabilität im Herzmuskel junger Tiere; ihnen scheint die Umstellung der Stoffwechselsituation auf ein neues Niveau des steady state entsprechend der Belastung nicht so rasch und kontinuierlich zu gelingen wie ausgewachsenen Tieren. Erst langsam stellt sich der Stoffwechsel der Gefäßwandlung auf den bei Belastung erhöhten Substratbedarf des Myokard um; nach 20stündigem Schwimmtraining zeigt die alkalische Phosphatase eine

dauernd erhöhte Aktivität als Ausdruck gesteigerter Transportprozesse in der Gefäßwand.

Bei ausgewachsenen Tieren (Abb. 5) geht die Angleichung der Phosphataseaktivität an die gesteigerten Stoffwechselbedürfnisse des Myokard sofort und ohne Aktivitätsabfall vonstatten. Der Stoffwechsel von Gefäßwand und Capillarendothel scheint sich ohne Schwierigkeiten auf die Belastungssituation des Herzens umstellen und die erhöhte Substrataufnahme aus dem Blut ermöglichen zu können.

Anders ist die Situation bei einmalig kurz vor der Tötung maximal belasteten Tieren (Tabelle 4): Vorher untrainierte Ratten zeigen eine nur leichte Erhöhung der Phosphataseaktivität, die wir als in der kurzen Zeit der Belastung (4—5 Std) maximal mögliche Angleichung an die Stoffwechselbedürfnisse auffassen. Die Flexibilität im energetischen Stoffwechsel scheint somit bei untrainierten Tieren relativ gering zu sein.

Trainierte Ratten zeigen in der Situation der maximalen Belastung ein unterschiedliches Bild: Bei vorher bis zu 90stündigem Schwimmtraining steigt die Enzymaktivität entsprechend der Schwimmzeit an (Tabelle 4); bei Ratten, die einer gesamten Schwimmbelastung bis zu 200 Std ausgesetzt waren, ist keine weitere Aktivitätssteigerung festzustellen. Wir deuten dies als Ausdruck der beginnenden Herzinsuffizienz; der fehlende Aktivitätsanstieg des Enzyms in der Gefäßwand und im Capillarendothel bei zunehmender Belastung hat eine verminderte Bereitstellung von Energie für den Transport von wichtigen Substraten — in erster Linie Glucose und freie Fettsäuren — zur Folge. Damit ist die notwendige Substratversorgung des Myokard in Frage gestellt.

Die diskutierten Befunde lassen erkennen, daß sich die Aktivität der alkalischen Phosphatase der Gefäßwand im Myokard schon bei geringen Belastungen verändert. Es ist zu erwarten, daß bei Belastung Aktivitätsänderungen auch anderer Enzyme auftreten. Dies bedeutet, daß sich die Akzente im Stoffwechselgeschehen weitaus früher verlagern, als Veränderungen morphologisch-pathologischer Art faßbar sind. Inwieweit die frühen Stoffwechselveränderungen für das ausgeprägte Bild der Herzhypertrophie oder -insuffizienz charakteristisch sind, muß offen bleiben.

Frau I. Riemann danken wir für ihre Mithilfe bei der Durchführung dieser Untersuchungen.

Literatur

- Badeer, H. S.: Metabolic basis of cardiac hypertrophy. *Progr. cardiovasc. Dis.* **11**, 53—63 (1968).
- Bing, R. J.: Cardiac metabolism. *Physiol. Rev.* **45**, 171—213 (1965).
- Bing, R. J., Wu, C., Gudbjarnason, S.: Mechanism of heart failure. *Circulat. Res.* **15**, Suppl. II, 64—69 (1964).
- Bourne, G.: The distribution of alkaline phosphatase in various tissues. *Quart. J. exp. Physiol.* **32**, 1—20 (1943).
- Bourne, G. H.: Changes in dephosphorylating enzymes in young and old tissues of the rat. *Gerontologia (Basel)* **1**, 50—58 (1957).
- Bozner, A., Meessen, H.: Die Feinstruktur des Herzmuskels der Ratte nach einmaligem und nach wiederholtem Schwimmtraining. *Virchows Arch. Abt. B* **3**, 248—269 (1969).
- Burgos, M. H., Deane, H. W., Barnett, R. J.: Sites of reaction products in alkaline phosphatase preparations incubated with two classes of organic phosphate esters. *J. Histochem. Cytochem.* **2**, 442—443 (1954).

- Champlain, J. de, Krakoff, L. R., Axelrod, J.: Increased monoamine oxidase activity during the development of cardiac hypertrophy in the rat. *Circulat. Res.* **23**, 361—369 (1968).
- Clark, S. L., Jr.: The localization of alkaline phosphatase in tissues of mice, using the electron microscope. *Amer. J. Anat.* **109**, 57—84 (1961).
- Dart, C. H., Jr., Holloszy, J. O.: Hypertrophied non-failing rat heart. Partial biochemical characterization. *Circulat. Res.* **25**, 245—253 (1969).
- Deane, H. W., Barnett, R. J., Seligman, A. M.: Histochemische Methoden zum Nachweis der Enzymaktivität. In: *Handbuch der Histochemie*, Bd. VII/1. Hrsg. von W. Graumann und K. Neumann. Stuttgart: G. Fischer 1960.
- Doerr, W.: Allgem. Path. d. Organe d. Kreislaufes. *Handb. Allg. Path.* Bd. III, Tl 4, S. 359. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1970.
- Doerr, W.: Morphologie d. Myokarditis. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* **77**, 301 (1971).
- El-Maghriby, M. A. H. A., Gardner, D. L.: A comparative study in young male animals of 10 species of the distribution of alkaline phosphatase activity in small arteries. *Histochemie* **16**, 227—235 (1968).
- Emmel, V. M.: Effects of HCl on alkaline phosphatase in kidney and intestine — histochemical and quantitative study. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **75**, 114—117 (1950).
- Fanburg, B. L.: Recent studies on cardiac hypertrophy. *Amer. Heart J.* **81**, 447—450 (1971).
- Fanburg, B. L., Posner, B. I.: Ribonucleic acid synthesis in experimental cardiac hypertrophy in rats. I. Characterization and kinetics of labeling. *Circulat. Res.* **23**, 123—135 (1968).
- Feigin, I., Wolf, A.: The phosphatase of the nervous system. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **14**, 11—22 (1955).
- Friedenwald, J. S., Gryder, S. M.: The substrate specificity of alkaline phosphatase of rat kidney. *Arch. Biochem.* **73**, 262—272 (1958).
- Gomori, G.: Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **42**, 23—26 (1939).
- Gomori, G.: Histochemical specificity of phosphatases. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **70**, 7—11 (1949).
- Gomori, G.: Microscopic histochemistry. Principles and practice. Chicago: Chicago University Press 1952.
- Gudbjarnason, S., Braasch, W., Bing, R. J.: Protein synthesis in cardiac hypertrophy and heart failure. In: *Herzinsuffizienz. Pathophysiologie und Klinik. Internat. Symp.* 2. 11.—5. 11. 1967. Hinterzarten 1967. Stuttgart 1968, 184—189.
- Gudbjarnason, S., Schryver, C. de, Hunn, G., Bing, R. J.: Changes in myocardial enzyme patterns in human heart disease. *J. Lab. clin. Med.* **64**, 796—801 (1964).
- Hatt, P. Y., Swynghedauw, B.: Electron microscopic study of myocardium in experimental heart insufficiency. In: *Herzinsuffizienz. Pathophysiologie und Klinik. Internat. Symp.* 2. 11.—5. 11. 1967. Hinterzarten 1967. Stuttgart 1968, 19—40.
- Hochrein, H.: Kreatinphosphatstoffwechsel bei Druck- und Volumenbelastung des Herzens. *Verh. dtsch. Ges. Kreisl.-Forsch.* **34**, 34—44 (1968).
- Hochrein, H.: Änderungen der Enzymaktivitäten im Myokard im Zusammenhang mit Störungen des Substrat- und Elektrolytstoffwechsels bei Belastung und Insuffizienz des Herzens. In: *Herzinsuffizienz. Pathophysiologie und Klinik. Internat. Symp.* 2. 11.—5. 11. 1967. Hinterzarten 1967. Stuttgart 1968, 202—210.
- Hochrein, H., Lossnitzer, K.: Beziehungen des Myokardstoffwechsels zur Herzinsuffizienz. *Münch. med. Wschr.* **110**, 53—58 (1968).
- Hüttner, I., Kerényi, T., Veress, B., Tóth, A., Konyár, É., Jellinek, H.: Über die Verteilung der alkalischen Phosphatase in der Gefäßadventitia von Ratten bei experimenteller Hypertonie. *Acta histochem. (Jena)* **26**, 21—27 (1967).
- Kiefer, G., Sandritter, W.: Die Nucleinsäuren des Cytoplasmas. *Protoplasmatologia* II/B/2/b. Wien-New York: Springer 1966.
- Kirk, J. E.: Enzymes of the arterial wall. New York-London: Academic Press 1969.
- Koide, T., Rabinowitz, M.: Biochemical correlates of cardiac hypertrophy. II. Increased rate of RNA synthesis in experimental cardiac hypertrophy in the rat. *Circulat. Res.* **24**, 9—18 (1969).
- Krug, H.: Die Bedeutung der Mikrophotometrie für die Morphologie. *Acta histochem. (Jena)* **18**, 388—392 (1964).

- Krug, H.: Anwendungsmöglichkeiten der Mikrophotometrie in Medizin und Biologie. *Acta histochem.* (Jena) **22**, 180—182 (1965).
- Krug, H.: Zur Anwendung der Histophotometrie im sichtbaren und im ultravioletten Licht. *Acta histochem.* (Jena) **34**, 51—61 (1969).
- Lansing, A. I.: The arterial wall. Baltimore: Williams & Wilkins Company, 1959.
- Lindenmayer, G. E., Sordahl, L. A., Schwartz, A.: Reevaluation of oxidative phosphorylation in cardiac mitochondria from normal animals and animals in heart failure. *Circulat. Res.* **23**, 439—450 (1968).
- Manheimer, L. H., Seligman, A. M.: Improvement in the method for the histochemical demonstration of alkaline phosphatase and its use in a study of normal and neoplastic tissues. *J. nat. Cancer Inst.* **9**, 181—199 (1948).
- Meerson, F. Z.: Compensatory hyperfunction of the heart and cardiac insufficiency. *Circulat. Res.* **10**, 250—258 (1962).
- Meerson, F. Z.: A mechanism of hypertrophy and wear of the myocardium. *Amer. J. Cardiol.* **15**, 755 (1965).
- Meerson, F. Z., Zaletajeva, F. A., Lagutchev, S. S., Pshennikova, M. G.: Structure and mass of mitochondria in the process of compensatory hyperfunction and hypertrophy of the heart. *Exp. Cell Res.* **36**, 568—578 (1964).
- Mölbert, E. R. G., Duspiva, F., Deimling, O. H. von: The demonstration of alkaline phosphatase in the electron microscope. *J. biophys. biochem. Cytol.* **7**, 387—389 (1960).
- Morton, R. K.: Acid and alkaline phosphatases. In: Biochemists handbook, ed. by C. N. H. Long, p. 249—251. Princeton, New Jersey: D. van Norstrand Co. 1961.
- Müller, E., Pearse, A. G. E.: The effect of catecholamines on alkaline phosphatase activity in rat heart. *Cardiovasc. Res.* **3**, 391—395 (1969).
- Naora, H.: Microspectrophotometry in visible light range. In: Handbuch der Histochemie, Bd. I/1, S. 192—219. Hrsg. von Graumann und K. Neumann. Stuttgart: G. Fischer 1958.
- Newman, W., Feigin, I., Wolf, A., Kabat, E. A.: Histochemical studies on tissue enzymes. IV. Distribution of some enzyme systems which liberate phosphate at pH 9,2 as determined with various substrates and inhibitors; demonstration of three groups of enzymes. *Amer. J. Path.* **26**, 257—305 (1950).
- Novi, A. M.: Beitrag zur Feinstruktur des Herzmuskels bei experimenteller Herzhypertrophie. *Beitr. path. Anat.* **137**, 19—50 (1968).
- Onishi, S., Zittel, R.: Frühstadien der experimentellen Herzhypertrophie im elektronenmikroskopischen Bild. *Naturwissenschaften* **55**, 549—550 (1968).
- Pearse, A. G. E.: Histochemistry. Theoretical and applied, 2nd ed. London: Churchill Ltd. 1960.
- Poche, R., Mello-Mattos, C. M. de, Rembarz, H. W., Stoepel, K.: Über das Verhältnis Mitochondrien: Myofibrillen in den Herzmuskelzellen der Ratte bei Druckhypertrophie des Herzens. *Virchows. Arch. path. Anat.* **344**, 100—110 (1968).
- Porter, K. R., Palade, G. E.: Studies on the endoplasmic reticulum. III. Its form and distribution in striated muscle cells. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 269—300 (1957).
- Roche, J., Thoai, N.: Phosphatase alkaline. *Advanc. Enzymol.* **10**, 83—122 (1950).
- Roels, H.: Die Plug-Methode. *Acta histochem.* (Jena), Suppl. **6**, 73—79 (1965).
- Samorajski, T., McCloud, J.: Alkaline phosphomonoesterase and blood brain permeability. *Lab. Invest.* **10**, 492—501 (1961).
- Sandritter, W.: Ultravioletmikrospektrophotometrie. In: Handbuch der Histochemie, Bd. I/1, Hrsg. von W. Graumann und K. Neumann, S. 220—338. Stuttgart: G. Fischer 1958.
- Sandritter, W., Kiefer, G., Rick, W.: Über die Stöchiometrie von Galloxyaninchromalaun mit Desoxyribonukleinsäure. *Histochemie* **3**, 315—340 (1963).
- Siegmund, H.: Veränderungen der Leber beim Icterus epidemicus. *Virchows Arch. path. Anat.* **311**, 180 (1944).
- Stiller, K.-J.: Zu Fragen der Auswertung und der Fehlermöglichkeiten in der UV-Mikrospektrophotometrie. *Acta histochem.* (Jena) **34**, 62—69 (1969).
- Takamatsu, H.: Histologische und biochemische Studien über die Phosphatase (I. Mitteilung). Histochemische Untersuchungsmethodik der Phosphatase und deren Verteilung in verschiedenen Organen und Geweben. *Trans. jap. path. Soc.* **29**, 492—498 (1939).

- Thompson, S. W.: Selected histochemical and histopathological methods. Springfield-Illinois: Charles C. Thomas, Publisher 1966.
- Vihert, A. M., Pozdunia, N. M.: Changes in enzyme activity and electrolyte content in the myocardium in experimental myocardial hypertrophy and insufficiency. *Virchows Arch. Abt. A* **347**, 44—56 (1969).
- Wegner, G., Mölbert, E.: Das Verhalten des Myokards bei der experimentellen supravalvulären Aortenstenose. Autoradiographische und elektronenmikroskopische Untersuchungen am Rattenherzen. *Virchows Arch. path. Anat.* **341**, 54—63 (1966).
- Weissbach, S.: Das Problem der Schnittdickenbestimmung. *Acta histochem. (Jena)* **2**, 183—187 (1960).
- Wollenberger, A., Schulze, W. J.: Mitochondrial alterations in the myocardium of dogs with aortic stenosis. *J. biophys. biochem. Cytol.* **10**, 285—288 (1961).
- Wollenberger, A., Schulze, W. J.: Über das Volumenverhältnis von Mitochondrien zu Myofibrillen im chronisch überlasteten hypertrophierten Herzen. *Naturwissenschaften* **49**, 161—162 (1962).

Dr. med. Wolfgang Rebel
Thomas Stegmann
Pathologisches Institut der Fakultät
für Klinische Medizin Mannheim
der Universität Heidelberg
D-6800 Mannheim
Theodor-Kutzer-Ufer
Bundesrepublik Deutschland