

DAS VERHALTEN DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE IM BLUTSERUM UND IN DEN GEWEBEN BEI AKUTER EXPERIMENTELLER KADMIUM-VERGIFTUNG

S. KOŚMIDER, M. ZACHAREWICZ und K. ZAJUSZ

*Klinik für Innere und Berufskrankheiten der Schlesischen Medizinischen Akademie,
und Abteilung für Experimentelle Pathologie des Instituts für Arbeitsmedizin in der
Bergbau und Hüttenindustrie, Zabrze, Polen*

(Eingegangen am 28. August 1967)

Bei Kaninchen, welche Kadmiumchlorid i. v., 3 mg/kg pro dosi, während 10 Tage erhielten, wurde das Verhalten der alkalischen Phosphatase (AP) im Blutserum und in Leber-, Nieren-, Lungen- und Gehirnhomogenaten untersucht. Bei den vergifteten Kaninchen wurde eine Erhöhung der AP-Aktivität im Blutserum und in Leber- und Nierenhomogenaten festgestellt- wobei statistisch signifikant nur der Aktivitätsanstieg der AP in der Leber war. Eine Verminderung der AP-Aktivität wurde in Lungenhomogenaten (statistisch nicht signifikant) und Gehirnhomogenaten (statistisch signifikant) festgestellt.

Mit histochemischen Methoden wurde ein Aktivitätsanstieg der AP, besonders in der Leber- der Nieren- Därmen und Hoden festgestellt. In anderen Organen war kein Unterschied in der Intensität der histochemischen Reaktion im Vergleich zu den Kontrolltieren feststellbar.

Die alkalische Phosphatase (AP) gehört zu den uneinheitlichen Enzymen und besteht aus einigen spezifischen Phosphatasen. Sie ist in allen Geweben, besonders in den Nieren, Dünndarmschleimhaut und Knochen nachweisbar (1, 2, 3). Die wichtigsten Stoffwechselforgänge, wie Abbau und Synthese von Eiweiss, Fetten und Kohlenhydraten sind mit der Phosphatasewirkung eng verknüpft (2, 4).

Der Aufbau der AP ist noch nicht genügend erkannt. Metalle, besonders Schwermetalle, können die Aktivität dieses Enzyms beeinflussen. Zu bekannten Inhibitoren der AP gehört Blei und Quecksilber (5, 6). Andere Metalle, wie z. B. Magnesium, Calcium und Zink wirken antagonistisch und sind als Aktivatoren der AP bekannt (7, 8, 9). Es wurde auch festgestellt, dass Kadmium antagonistisch gegen einige Aktivatoren der AP, besonders gegen Zink wirkt (10).

Im Verlauf von Fällen mit Kadmiumvergiftung bei Menschen wurden Veränderungen in den Knochen, Leber und Nieren beobachtet, also in denjenigen Organen, in denen die AP-Aktivität stark hervortritt (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

Die Kadmiumionen, abgesehen vom Ort ihrer Eindringung in den Körper, werden an die Erythrocyten gebunden und gelangen mit ihnen in die Gewebe und Organe (13). Untersuchungen mit radioaktivem Kadmium erwiesen dass es schon 24 Stunden nach seiner Injektion aus dem Blut verschwindet infolge seines Überganges in die Gewebe in denen es deponiert wird (18). Besonders grosse Mengen von Kadmium wurden in den Nebennieren festgestellt (18, 19) wobei die Menge in der Rinde einige Male grösser ist als im Nebennierenmark (20).

Das Ziel der ausgeführten Untersuchung war das Verhalten der AP bei akuter experimenteller Kadmium-Vergiftung nachzuforschen.

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND METHODIK

Das Untersuchungsmaterial bestand aus 42 ungefähr einjährigen Kaninchen (Mischrasse) beiderlei Geschlechts. Ihr Körpergewicht lag zwischen 2400 und 3000 g. Die Tiere erhielten vor und während der Untersuchungen eine Standarddiät. Die Versuchsgruppe bestand aus 22, die Kontrollgruppe aus 20 Kaninchen. Den Versuchstieren wurde 0,1% Lösung CdCl_2 in 0,9% Kochsalzlösung in der Menge von 3 mg CdCl_2 pro kg Körpergewicht pro die, 10 Tage hindurch i. v. (in die *V. marginalis auriculi*) verabreicht. Eine Dosis von 4 mg CdCl_2 pro kg Körpergewicht führte innerhalb einer Zeitspanne von 3–5 Tagen zum Tode 50% der Tiere (LD_{50}).

Die Aktivität der AP im Blutserum wurde mit Hilfe der Bodansky-Methode in der Modifikation nach Urbach und Rabe bestimmt (21). Die Menge des enzymatisch ausgeschiedenen anorganischen Substratphosphors wurden in Millimol-Einheiten (MME) nach Fiske-Subbarow angegeben (21). Die Extinktion wurde am Colorimeter Pulfrich II abgelesen.

Nach Dekapitierung der Tiere wurden zwecks biochemischer Untersuchung jeweils identische Ausschnitte der Leber, Nieren, Lungen und des Gehirns entnommen. Die Excisionen wurden homogenisiert. In den Vollhomogenaten bestimmte man die Aktivität der alkalischen Phosphatase nach Bodansky-Methode (auf 1 g Gewebseiweiss umgerechnet).

Zur histochemischen Untersuchung wurden jeweils Ausschnitt der Leber, Nieren, Lungen, Zwölffingerdarm, Dünndarm und Hoden entnommen. Das Sektionsmaterial wurde die Nacht hindurch im kalten Aceton fixiert, im Paraffin eingebettet und in Präparate von ca. 10 μ Dicke geschnitten. Die Schnitte wurden auf albuminisierte Objektträger geklebt und danach histochemisch untersucht. Zur Bestimmung der alka-

lichen Phosphatase diente die Gomori-Methode nach *Pearse* (6). Die Inkubationszeit betrug 60 Min bei 37 °C. Alle Reaktionen wurden durch zumindest eine Kontrollinkubation überprüft. Ein Teil der Präparate färbte man auf typische Weise mit Hämatoxylin-Eosin.

UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

A. Biochemische Untersuchungen

Die ausgeführten Experimente bewiesen, dass die AP sich verschieden im Blutserum und in den Homogenaten der einzelnen Organe verhält. In gegebenen Experimentverhältnissen wurde ein Aktivitätsanstieg der AP im Blutserum festgestellt (Tab. 1), wobei er an der Grenze der statistischen Signifikanz blieb.

Tabelle 1
Aktivität der alkalischen Phosphatase im Blutserum von mit CdCl_2 vergifteten Kaninchen (in MME dargestellt)

Kontrolltiere	$1,67 \pm 0,58$ (20)
Cd-vergiftete Tiere	$2,08 \pm 0,84$ (22)
Signifikanz der Differenz	t 2,83
Wahrscheinlichkeitsgrad	P > 95%

± bezeichnet Standardabweichung; in den Klammern wurde die Zahl der Tiere angegeben.

Auch in Leber und Nierenhomogenaten wurde bei akuter Kadmiumvergiftung ein Aktivitätsanstieg der AP festgestellt. Auf Grund einer Berechnung der statistischen Signifikanz der erhaltenen Ergebnisse an Hand des Student-Tests erwies, dass nur in der Leber der genannte Anstieg statistisch signifikant war. In den Nierenhomogenaten dagegen lag der Aktivitätsanstieg an der Grenze der statistischen Signifikanz (Tab. 2).

Ein ganz unterschiedliches Verhalten der Aktivität der AP konnte in den Lungen und Gehirnhomogenaten nachgewiesen werden. In diesen Fällen wurde nämlich eine Aktivitätsverminderung festgestellt, die jedoch nur im Gehirn als statistisch signifikant angesehen werden kann.

B. Histochemische Untersuchungen

In der Leber der Kontrolltiere wurde eine mässige Intensität der Reaktion auf AP vorgefunden. Eine positive Reaktion war in der Intima der Blutgefässe, am Sekretionspol der Leberzellen und im kleinerem

Tabelle 2
*Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Homogenaten auf 1 g Gewebseisweiß
 umgerechnet (in MME dargestellt)*

	Niere	Leber	Lunge	Hirn
Kontrollgruppe	3,10 ± 1,22 (20)*	1,20 ± 0,49 (20)	3,70 ± 1,60 (20)	0,80 ± 0,03 (20)
Cd-Vergiftete Tiere	3,60 ± 1,15 (20)	1,60 ± 0,72 (20)	3,00 ± 1,31 (20)	0,30 ± 0,02 (20)
Signifikanz der Differenz t	2,56	3,31	2,02	3,35
Wahrscheinlichkeitsgrad P	P > 95%	P > 99%	P > 90%	P > 99%

± bezeichnet Standardabweichung; in den Klammern wurde die Zahl der Tiere angegeben.

Mass auch in Körnerform im Cytoplasma lokalisiert. Eine stärkere Reaktion war in der Peripherie der Leberläppchen feststellbar (Abb. 1). Bei den Versuchskaninchen tritt die Reaktion auf die AP in der Leber intensiver zum Vorschein, besonders in äusseren Teilen der Leberläppchen (Abb. 2). In Läppchenzentren, rundum die Vena centralis blieb die Intensität der AP-Reaktion im Vergleich mit den Kontrolltieren unverändert.

Die Reaktion auf die AP in den Nieren war sehr deutlich und wies eine ziemlich starke Intensität auf. Eine besonders starke Aktivität der AP war im Sekretionsteil der Tubulli feststellbar. In den in Nierenmark liegenden Kanälchen (Sammelröhren) war die Reaktion negativ. Bei kürzeren Inkubationszeiten (20 Minuten) war die AP-Reaktion in den Glomerulen auch negativ. Eine positive Reaktion kam erst nach einer Verlängerung der Inkubationszeit bis zu 40 Minuten zum Vorschein (Abb. 3). Im Vergleich zu den Kontrolltieren war bei den Versuchskaninchen die Reaktion auf AP in den Nieren viel deutlicher und intensiver- wobei der Intensitätsanstieg ziemlich gleichmässig im ganzen Präparat war. Die entsprechende Mikrophotographie (Abb. 4) wurde aus einem Präparat, das um 50% kürzer im Vergleich zu vorherigem Bild inkubiert war entnommen. Trotz der verkürzten Inkubationszeit ist die Reaktionsintensität weiterhin etwas stärker als bei den Kontrollkaninchen.

In den Lungen war die Reaktion auf AP hauptsächlich in der Intima der Blutgefässe, in den Phagocyten und im kleinerem Grad im Lungenepithel lokalisiert. Eine positive Reaktion war auch in Zellen des Bindegewebes feststellbar (Abb. 5). Die Intensität der Reaktion bei Kontrolltieren war nur mässig. Bei den vergifteten Tieren kam es zu einer kleiner gleichmässiger Intensitätssteigerung der Reaktion (Abb. 6).

In den Därmen der Kontrolltieren war die Intensität der AP-Reaktion wesentlich stärker. Die AP war in diesem Organ hauptsächlich im Deckepithel lokalisiert (Abb. 7). Im kleineren Grade war eine positive Reaktion auch in den Darmdrüsen, in den Wänden der Blut und Lymphgefässe sowie auch in der Schleimhaut sichtbar. Bei den vergifteten Kaninchen kam es zur weiteren Steigerung der Intensität der Reaktion, besonders im Deckepithel der Zotten. Dank dessen war in den Präparaten der Verlauf der Gefässe (Abb. 8) deutlich sichtbar, während die Zeichnung der Epithelzellen in Folge einer Diffusion der AP unklar wurde.

Auch im Hoden war die Intensität der AP-Reaktion sehr hoch. Das Enzym war in der Basalmembran und im Geschlechtsepithel lokalisiert. Im Vergleich zu den Kontrolltieren kam es zu keinen wesentlichen Veränderungen in der Intensität der AP-Reaktion bei den vergifteten Kaninchen.

DISKUSION

Aus den durchgeführten biochemischen Untersuchungen, die gleichzeitig histochemisch bestätigt wurden, geht hervor, dass akute Kadmiumvergiftung zu einer Veränderung der AP-Aktivität sowohl im Blutserum wie auch in den untersuchten Organen führt. Da jedoch diese Veränderungen im Bereich der untersuchten Organe nicht in einer Richtung verlaufen, muss man einnehmen, dass die Veränderung der AP-Aktivität nicht von direkten Einwirken des Giftes auf das Enzym bedingt ist. Man muss wohl eher annehmen, dass die festgestellte Veränderungen auf den Einfluss der Cd-Ionen auf die Aktivatoren bzw. Inhibitoren der AP zurückzuführen sind. Es wurde nämlich in anderen Arbeiten bewiesen, dass in einem Organ zwei verschiedene Formen der AP, die sich u. d. durch verschiedene Aktivatoren unterschieden auftreten können. So z. B. Gryder u. Mitarb. (1) haben in Rattennieren zwei AP festgestellt, von denen die eine (Enzym A) durch Glycin und Zink aktiviert wird, die andere dagegen (Enzym B) durch Magnesium. Das Enzym B wird durch die Aktivatoren des Enzym A inaktiviert. Die Leukocyten beim Menschen enthalten eine AP, die von Zink aktiviert wird (22). Die im Blutserum auftretenden AP wird durch Magnesium aktiviert die Zinkionen dagegen haben keine Wirkung auf die Aktivität dieser AP-Form (5).

Auf Grund der durchgeführten Untersuchungen muss die Antwort über die Ursache des uneinheitlichen Verhalten der AP-Aktivität unter dem Einfluss der Cd-Ionen unbeantwortet bleiben. Es scheint wahrscheinlich zu sein, dass das verschiedene Verhalten der AP in einzelnen Organen seine Ursache im differentem chemischem Aufbau des Enzymes und der damit verbundenen Differenzen der Aktivationsmöglichkeiten findet.

Eine Verminderung der AP-Aktivität in den Lungenhomogenaten besonders aber in den Gehirnhomogenaten scheint für eine inaktivierende Wirkung der Cd-Ionen auf die AP zu zeugen. Es ist jedoch nicht gelungen diese Feststellung mit den histochemischen Untersuchungen im Einklang zu bringen. Die Intensität der histochemischen Reaktion auf AP in den genannten Organen war bei den Versuchskaninchen entweder unbeeinflusst, teilweise konnte sogar eine Aktivitätssteigerung nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass der Anstieg der AP-Aktivität bei den vergifteten Tieren in diesen Organen hervortritt, die bei der Excretion teilnehmen und zwar in der Leber, Nieren und Därmen. Diese Feststellung steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Verfasser die gefunden haben, dass Kadmium durch die Leber wie auch mit dem Urin und durch die Därme vom Organismus abgesondert wird. In den histochemischen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die stärkste Intensität der AP-Reaktion an sekretorischen Zellpolen lokalisiert war. Diese Ergebnisse bestätigen noch einmal, dass die AP eine aktive Rolle bei Sekretionsprozessen spielt.

Insofern eine Steigerung der AP-Aktivität in den Absonderungsorganen seine Begründung finden konnte, insoweit trifft die Erklärung eines Aktivitätsabfalls der AP in den Lungen und Gehirn auf grössere Schwierigkeiten. Da an Hand unserer bisherigen Untersuchungen ein direkter Einfluss der Cd-Ionen auf die AP kaum in Frage kommt, muss man sich mit der Hypothese eines indirekten Einflusses des Kadmiums auf die AP-Aktivität, auf dem Wege biochemischer Schädigung anderer Art, begnügen.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

1. Akute Vergiftung der Kaninchen mit Kadmium-Chlorid verursacht Veränderungen in der AP-Aktivität im Blutserum sowie in anderen Organen.

2. Den grössten Anstieg der AP-Aktivität wurde in Organen, durch welche Kadmium aus dem Organismus abgesondert wird, festgestellt.

Literatur

1. Gryder, R. M., Friedenswald, J. S., Carlson, C.: Arch. Biochem., 54 (1955) 281.
2. Kopeć, M., Kowalski, E.: Pol. Tyg. Lek., 43 (1949) 207.
3. Kowalski, E.: Pol. Tyg. Lek., 45 (1951) 1498.
4. Zajusz, K.: Mechanizm działania insuliny, glukagonu i adrenaliny na wątrobę i mięśnie szkieletowe w świetle badań histochemicznych, Zabrze, 1961.
5. Kośmider, S.: Int. Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg., 20 (1963) 11.
6. Pearse, A. G. E.: Histochemistry, theoretical and applied, J. and A. Churchill Ltd., London, 1960.
7. Mathies, J. C.: J. Biol. Chem., 33 (1958) 1121.
8. Szmigielski, S., Litwin, J.: Post. Hig. Med. Dośw., 29 (1964) 615.
9. Valentine, N. W., Tanaka, K. R., Fredrick, R. F.: J. Lab. Clin. Med., 55 (1960) 303.
10. Parizek, J.: J. Reprod. Fertil., 1 (1960) 3.
11. Berlin, M., Ulberg, S.: Arch. Environ. Health., 7 (1963) 686.
12. Friberg, L.: Arch. Industr. Health., 16 (1957) 27.
13. Koelsch, F.: Handbuch der Berufskrankheiten, Jena, 1959.
14. Minden, H.: Zschr. Ärztl. Fortbild., 58 (1964) 23.
15. Nowacki, J.: Med. Pracy, 12 (1961) 27.
16. Piscator, M.: Arch. Environ. Health., 4 (1962) 607.
17. Zahorski, W.: Choroby Zawodowe, Warszawa, PZWL, 1963.
18. Berlin, M., Friberg, L.: Arch. Environ. Health, 4 (1960) 478.
19. Gunn, S. A., Gould, T. C.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 96 (1957) 820.
20. Axelsson, B., Piscator, M.: Arch. Environ. Health, 12 (1966) 360.
21. Homolka, J.: Diagnostyka biochemiczna, Warszawa, PZWL, 1961.
22. Trubowitz, S., Feldman, D., Benante, C., Kreiman, D.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 95 (1957) 35.

*Izvod*AKTIVNOST ALKALNE FOSFATAZE U SERUMU
I TKIVIMA KOD AKUTNOG EKSPERIMENTALNOG
TROVANJA KADMIJEM

Mjerena je aktivnost alkalne fosfataze u serumu i homogenatima jetre, bubrega, pluća i mozga kunića, kojima je dnevno (ukupno 10 dana) apliciran kadmijev klorid (3 mg/kg, i. v.). Aktivnost alkalne fosfataze bila je neznatno povećana u serumu i homogenatima bubrega, a statistički signifikantno povećana u homogenatima jetre. U homogenatima pluća aktivnost se neznatno umanjila, a smanjenje aktivnosti u mozgu bilo je statistički značajno.

Histokemijskim metodama utvrđeno je povećanje aktivnosti alkalne fosfataze u jetri, bubrezima, crijevima i testisu, dok je aktivnost u ostalim istraženim organima ostala nepromijenjena.

*Klinika za unutarnje i profesionalne bolesti
Šlezijske medicinske akademije i Odjel za
eksperimentalnu toksikologiju
Instituta za medicinu rada, Bergbau,
i Industrija Zabrze, Poljska*

Primljeno 28. VIII 1967.

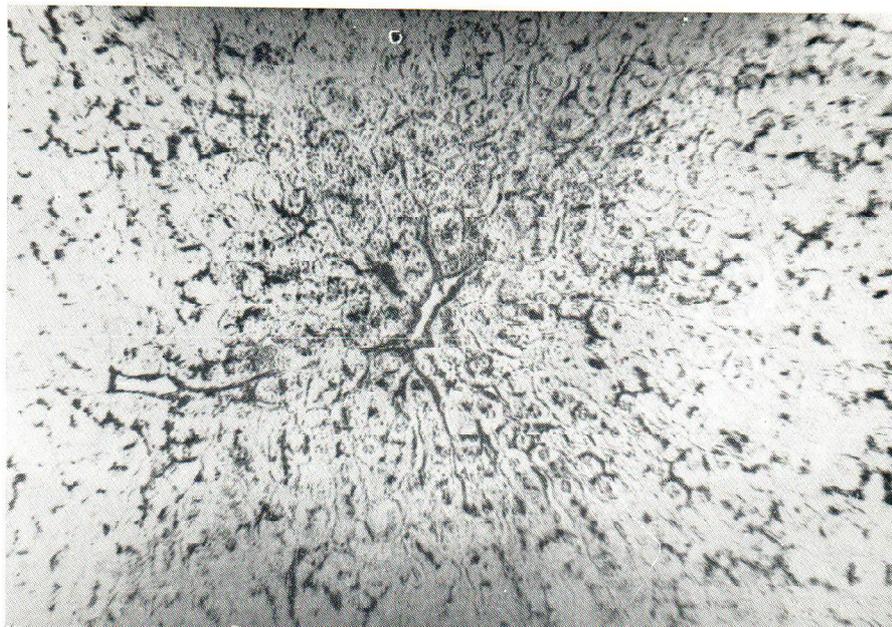


Abb. 1. *Reaktion in der Leber der Kontrollgruppe (Inkubationszeit 40 Min. Vergr. 240 X.*

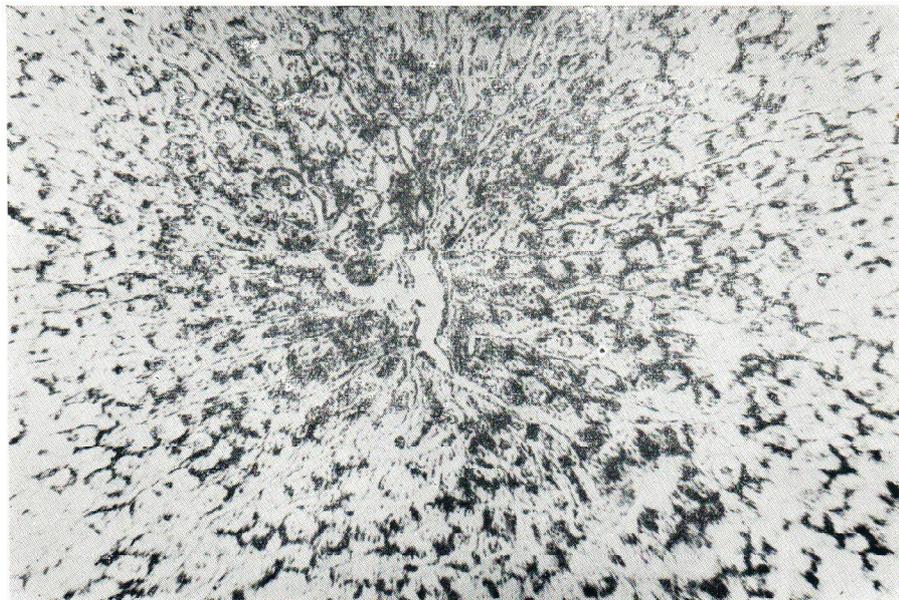


Abb. 2. *Reaktionsanstieg in der Leber bei der Versuchsgruppe (Inkubationszeit 40 Min.) Vergr. 240 X.*

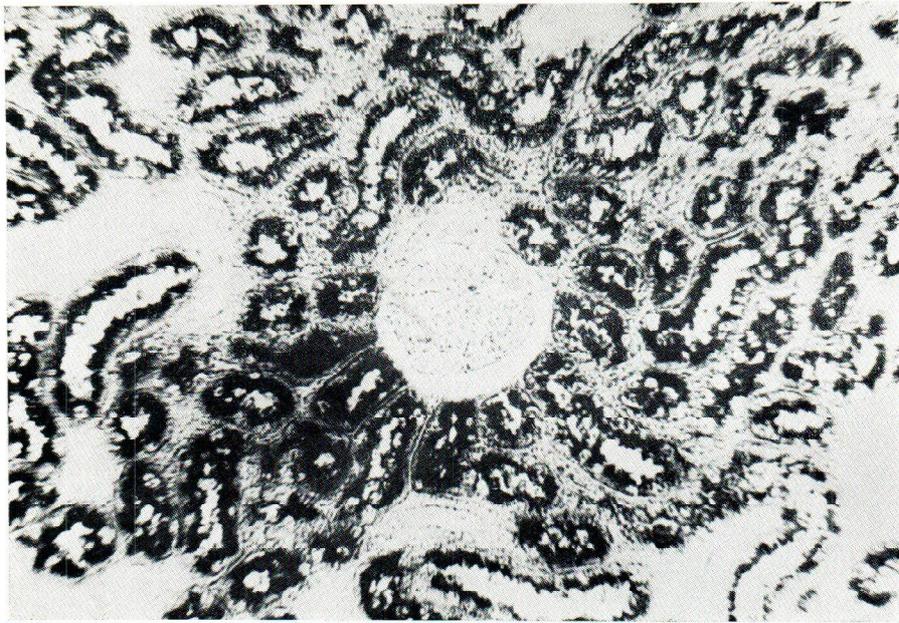


Abb. 3. *Reaktion in der Niere der Kontrollgruppe (Inkubationszeit 40 Min.) Vergr. 240 ×.*

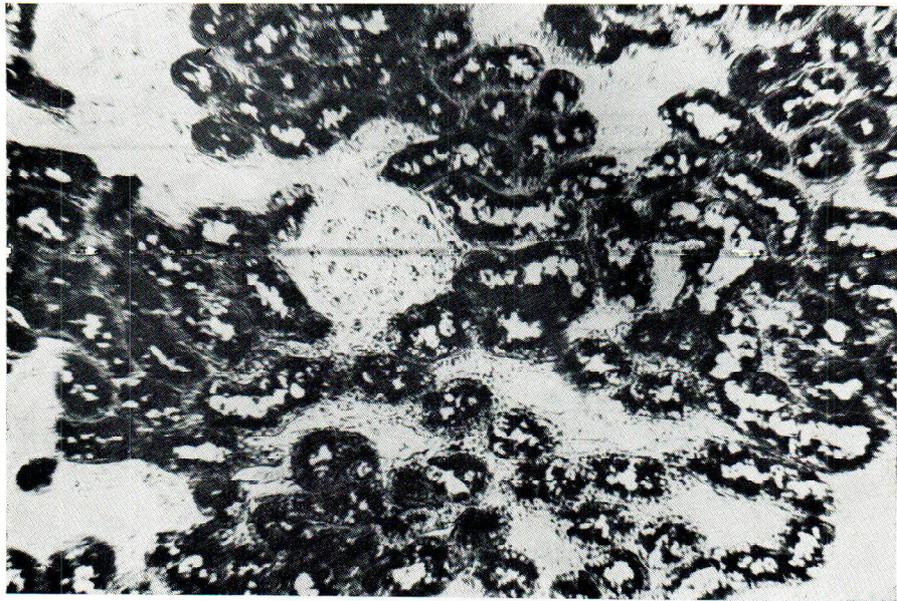


Abb. 4. *Reaktionsverstärkung in der Niere der Versuchsgruppe (Inkubationszeit 20 Min.), Vergr. 240 ×.*

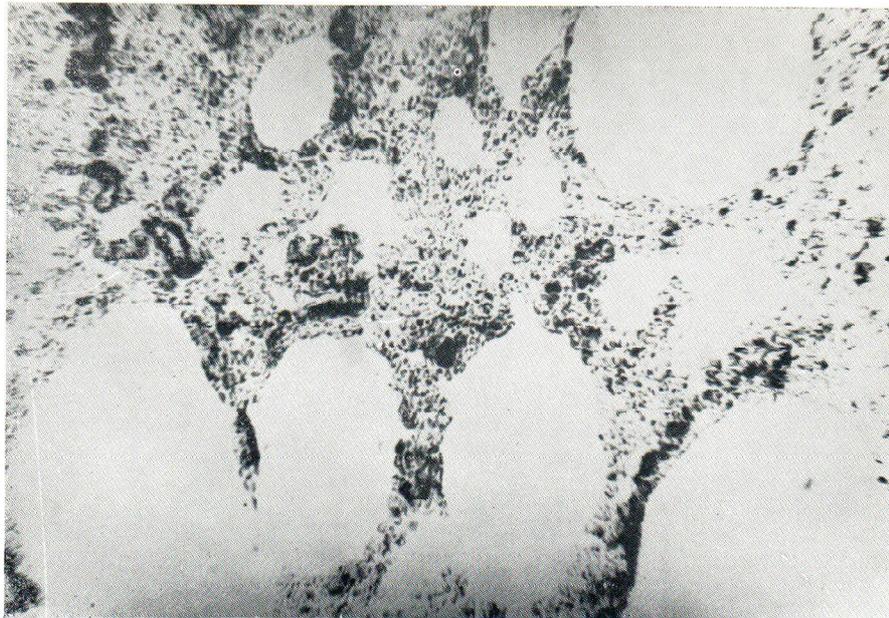


Abb. 5. Reaktion in der Lunge der Kontrollgruppe (Inkubationszeit 60 Min.) Vergr. 240 \times .

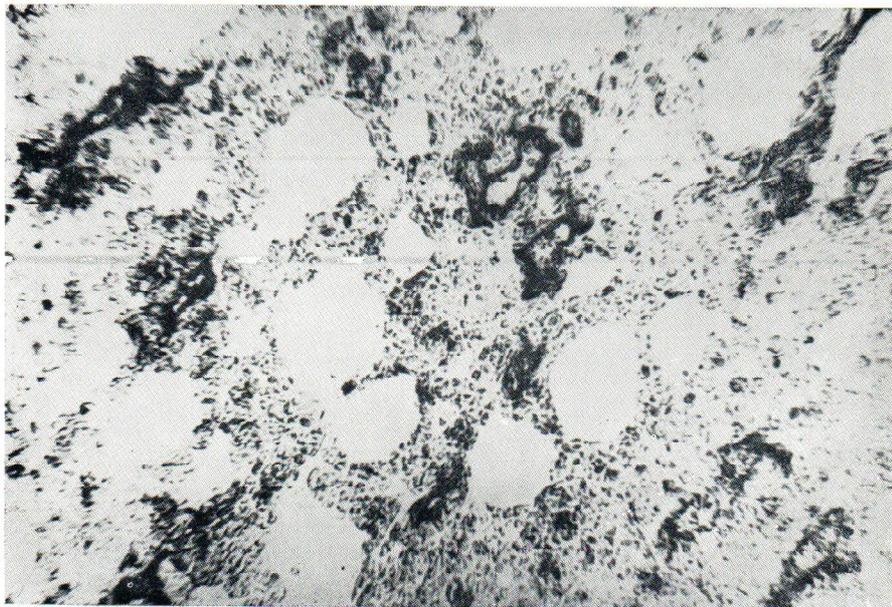


Abb. 6. Geringe Reaktionsverstärkung in der Lunge bei der Versuchsgruppe (Inkubationszeit 60 Min.) Vergr. 240 \times .



Abb. 7. Reaktion in der Dünndarm-Zotten der Kontrollgruppe (Inkubationszeit 40 Min.), Vergr. 240 \times .



Abb. 8. Reaktionsanstieg in den Dünndarm-Zotten bei der Versuchsgruppe. (Inkubationszeit 40 Min.). Vergr. 240 \times .