Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
13. Jg. 1975, S. 437–444

Über alkalische Phosphatasen in menschlichen Faeces, Dünndarmschleimhaut und Galle und das Vorkommen von 5'-Nucleotidase in Faeces

Von Vera Benić und Marijana Fišer-Herman

Aus der Klinik für Infektionskrankheiten (Vorstand: Prof. Dr. J. Fališevac) der Medizinischen Fakultät der Universität Zagreb

(Eingegangen am 30. Oktober 1974/13. Mai 1975)

Zusammenfassung: Die alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1) aus normalen Faeces gleicht der alkalischen Phosphatase in Extrakten aus Dünndarmschleimhaut, von welcher sie sich nur durch etwas größere Beweglichkeit in Stärkegelelektropherogrammen unterscheidet. Zwischen den Eigenschaften der alkalischen Phosphatase in Extrakten aus normalen und acholischen Faeces wurden keine Unterschiede gefunden. Alkalische Phosphatase aus Blasengalle scheint in Faeces nicht unverändert vorzukommen. In den Faeces von Patienten mit akuter Virushepatitis oder Protozoosis kommt eine alkalische Phosphatase vor, welche Eigenschaften einer 5'-Nucleotidase (EC 3.1.3.5) hat und aus der Galle zu stammen scheint. In Stühlen, welche dieses Enzym enthalten ist die Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatase viel geringer als in normalem oder acholischem Stuhl.

Alkaline phosphatases in human feces, intestinal mucosa and bile, and the occurrence of 5'-nucleotidase in feces

Summary: Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) in extracts of human feces resembles alkaline phosphatase in extracts of duodenal mucosa, except for its electrophoretic mobility in starch gel. It is very probable that the normal feces alkaline phosphatase derives from intestinal mucosa. Gall bladder alkaline phosphatase, which is markedly different, has not been found in normal feces. Some patients with acute viral hepatitis or protozoosis excrete an alkaline phosphatase which resembles gall bladder alkaline phosphatase and has the characteristics of 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5). The appearance of this enzyme correlates with low total alkaline phosphatase activity of the excreta.

Einführung

Es ist seit langem bekannt, daß menschliche Faeces viel alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1) enthalten. Wir versuchten die Eigenschaften der in Faeces vorkommenden alkalischen Phosphatase kennen zu lernen und womöglich zu ermitteln, woher sie stammt. Deshalb verglichen wir alkalische Phosphatase aus Faeces mit der aus Duodenalsaft, Blasengalle und Dünndarmschleimhaut. Über einen Teil dieser Versuche haben wir früher berichtet (1).

Wir berichten jetzt über Ergebnisse von weiteren Untersuchungen der alkalischen Phosphatase in Faeces von gesunden und kranken Personen, sowie in Extrakten aus Dünndarmschleimhaut und Blasengalle. Besonders beschäftigten wir uns mit einer auf Stärkegelelektrophogrammen sichtbaren Fraktion der alkalischen Phosphatase, welche wir ursprünglich nur in Faeces von Protozoen-

trägern beobachtet hatten und deren Eigenschaften sich von denen der übrigen alkalischen Phosphatase der Faeces unterscheiden.

Material und Methoden

Faeces

Frische Faeces wurden bei 4 °C längstens 24 Stunden aufbewahrt und von jeder Portion ein Teil bei 100 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Untersucht wurden Faeces von folgenden Personen:

	N
Gesunde Kinder, 2–8 Jahre alt	10
Kinder mit akuter Virushepatitis	45
Gesunde Erwachsene	15
Erwachsene mit Leberkrankheiten:	
a) obstruktiver Gelbsucht	23
b) Lebercirrhose	13
c) akuter Virushepatitis	4
Erwachsene mit Lamblasis	40
Insgesamt	150

Je 2 g der homogenisierten Faeces wurden mit der 5fachen Menge physiologischer NaCl-Lösung verrieben und bei 2500 U/min 15 Minuten zentrifugiert. Sichtbar fetthaltige Extrakte wurden mit 2/3 ihres Volumens an *n*-Butanol gemischt, 24 Stunden bei 4 °C gehalten, zentrifugiert und die Butanolschicht verworfen. Die wäßrigen Extrakte wurden sofort verarbeitet oder bei -18 °C aufbewahrt.

Blasengalle

Galle stammte aus den Gallenblasen von 10 frischen Leichen an deren Leber, Gallengängen und Darmtrakt makroskopisch keine Veränderungen festgestellt worden waren. 50 ml eines Gemisches von annähernd gleichen Mengen Galle wurden mit 100 ml physiologischer NaCl-Lösung vermischt, 30 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert, der visköse Teil abgetrennt und die Lösung wie Faecesextrakt behandelt.

Darmschleimhaut

Je 30 cm vom Jejunum derselben Leichen wurden sofort bei -18 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde etwa 100 g Schleimhaut abgeschabt, mit der doppelten Wassermenge bei 4 °C homogenisiert und die Emulsion mit 2/3 ihres Volumens an *n*-Butanol extrahiert. Der fast klare wäßrige Extrakt wurde teils sofort verarbeitet, teils bei -18 °C aufbewahrt.

Bestimmung der Phosphataseaktivität

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde nach *Kirberger & Martini* (2) bei pH 9 und nach *King & Armstrong* (3) bei pH 10 bestimmt und in King-Armstrong-Einheiten¹⁾ pro kg trockener Faeces, bzw. 1 nativer Galle, bzw. kg frischer Dünndarmschleimhaut ausgedrückt.

Inhibition durch L-Phenylalanin

Der Aktivitätsabfall der Enzymlösungen in Gegenwart von 5 mmol/l L-Phenylalanin wurde nach *Fishman & Ghosh* bei pH 9 und pH 10 bestimmt (4).

Denaturierung durch Harnstoff

Die Restaktivität der Phosphatase-Lösungen wurde nach *Fenelly et al.* (5) in Gegenwart von 2 mol/l Harnstoff bei pH 9 und pH 10 gemessen.

Inaktivierung bei 56 °C

Nach Vorschrift von *Posen et al.* (6) wurde der Aktivitätsverlust der 15 Minuten auf 56 °C erwärmten Enzymlösungen bei pH 9 und pH 10 gemessen.

Alle Aktivitätsverluste sind in Prozent der ursprünglichen Aktivität ausgedrückt.

Elektrophoretische Trennung der Fraktionen

Die Elektrophorese der alkalischen Phosphatase-Lösungen wurde auf horizontalen Stärkegeleplatten nach *Smithies* (7) im diskontinuierlichen Puffersystem nach *Poulik* (8) ausgeführt, die Lage der Enzymfraktionen mit α -Naphthylphosphat und Fast Blue RR nach *Bamford* (9) sichtbar gemacht und mit im gleichen Versuch aufgetrennten Serumweißfraktionen verglichen.

Reinigung der Enzymlösungen durch Gelfiltration

Die alkalische Phosphatase enthaltenden Extrakte wurden 30 Minuten mit 20000 U/min zentrifugiert und durch Kolonnen von Sephadex G 100 filtriert. Kolonnendurchmesser 4 cm, Schichtlänge 100 cm, Anquellen des Gels und Elution mit 0,1 mol/l Carbonat-Bicarbonat-Puffer pH 9, Durchlauf 18,6 ml pro Stunde. Mit Hilfe eines automatischen Kollektors wurden je 70 Portionen von 6,2 ml gesammelt und ihre optische Dichte bei 280 nm registriert. Alle alkalische Phosphatase enthaltenden

Fraktionen einer Kolonne wurden lyophilisiert und unmittelbar vor der Weiterverarbeitung in 10 ml dest. Wasser gelöst.

Bestimmung der spezifischen Aktivität und K_m -Werte

Die spezifischen Aktivitäten der durch Gelfiltration gereinigten alkalischen Phosphatasen wurden mit Phenylphosphat in Carbonat-Bicarbonat Puffer in Gegenwart von 2,0, 5,0, 6,25, 8,5, 12,5 und 25 mmol/l Substrat bei pH 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5 und 11,0 gemessen und in μ g Phenol pro ml Enzymlösung ausgedrückt.

K_m -Werte wurden nach *Lineweaver & Burk* bestimmt.

Bestimmung der 5'-Nucleotidase-(EC 3.1.3.5)-Aktivität

5'-Nucleotidase-Aktivität wurde mit AMP nach *Campbell* (10) mit und ohne Zusatz von 0,1 mol/l Nickelchlorid gemessen.

Ergebnisse

Stärkegelelektrophorese der Rohextrakte

Die Lage der stärksten alkalische Phosphatase enthaltenden Fraktionen in Stärkegelelektropherogrammen von nativen Extrakten aus Faeces, Blasengalle und Dünndarmschleimhaut, verglichen mit dem Serumproteinogramm und den Isoenzymen der alkalischen Phosphatasen im Serum zeigt Abbildung 1 unserer früheren Arbeit (1).

Auf Abbildung 1 sind alle beobachteten alkalische Phosphatase enthaltenden Fraktionen aus Serum, Faeces, Galle und Darmschleimhaut schematisch dargestellt.

Abbildung 2 zeigt die Häufigkeit der alkalische Phosphatase enthaltenden Fraktionen in Faecesproben von Gesunden und Kranken.

Die Fraktionen 1 und 1a kamen in Faeces von gesunden Kindern und Erwachsenen regelmäßig vor, während in Elektropherogrammen von Gallenextrakten an diesen Stellen nichts zu sehen war. Fraktion 3 haben wir in einem Fünftel der untersuchten Faecesproben und im

Abb. 1. Übersicht der auf Stärkegelelektropherogrammen beobachteten alkalischen Phosphatase-Fraktionen. Die Lage der Fraktion 1 entspricht der sogenannten Leberphosphatase des Serums; Fraktion 3 der sogenannten intestinalen Serumphosphatase; die Fraktionen 4 und 5 wurden im Serum von Kranken mit Stauungsikterus beobachtet; „a“ bedeutet anodenwärts verschoben, „k“ verschoben zu Kathode, „0“ Auftragstelle.

¹⁾ Umrechnung in internationale Einheiten (U) erfolgte nicht, da eine Diskrepanz zwischen empirischem Umrechnungsfaktor (4,0; *Südhof et al.*, Deut. Med. Wochenschr. 87, 249(1962) und theoretischem Wert (7,1) besteht.

Abb. 2. Häufigkeit der auf Stärkegelelektropherogrammen beobachteten alkalischen Phosphatasenfraktionen in 150 Faecesproben von gesunden und kranken Personen: a) gesunde Kinder, 3–8 Jahre ($n = 10$) b) Kinder, 3–10 Jahre, akute Virushepatitis ($n = 45$) c) Gesunde Erwachsene ($n = 15$) d) Erwachsene, Lebererkrankungen ($n = 40$) e) Erwachsene, Lamblasis ($n = 40$).

Extrakt aus Darmschleimhaut gefunden. Die Fraktion 4a bildete stets einen breiten Streifen und kam nur bei Leberfunktionsstörungen oder Protozoasis vor. In Stühlen mit dieser Fraktion war die Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatase niedrig, die Fraktion 1 und 1a waren schwach oder gar nicht sichtbar, häufig war nur 4a zu sehen. Tabelle 1 zeigt die Häufigkeit des Auftretens dieser Fraktion.

Tab. 1. Frequenz der Phosphatasenfraktion 4a in Stuhlextrakten

	Zahl der Fälle	Elektropherographisch gefunden	
		Nur Fraktion 4a	Fraktion 4a und 1 oder 1a
Gesunde Kinder 3–8 Jahre	10	0	0
Kinder mit akuter Virushepatitis, 3–10 Jahre	45	9	14
Gesunde Erwachsene	15	0	0
Erwachsene mit Leberkrankheiten:			
obstruktive Gelbsucht	23	3	2
Lebercirrhose	13	3	2
akute Virushepatitis	4	0	1
Erwachsene mit Lamblasis	40	10	3

Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatase in Stühlen von Gesunden und Kranken

In der Tabelle 2 sind die in Stühlen von 150 Personen gefundenen Aktivitäten in *King-Armstrong-Einheiten*¹⁾ pro kg Trockensubstanz angegeben. Merkwürdigerweise waren die durchschnittlichen Aktivitäten in Stühlen sowohl von gesunden und kranken Kindern als auch von Erwachsenen in welchen die Fraktion 4a fehlte, kaum verschieden. Die Streuung der Befunde war aber sehr groß, und zwar bei Erwachsenen wesentlich größer als bei Kindern. Die Affinität der alkalischen Phosphatase aus Faeces für Phenylphosphat war bei pH 10 viel größer als bei pH 9.

Mit dem Auftrennen der Fraktion 4a änderte sich das Bild: die Aktivität der alkalischen Phosphatase war herabgesetzt und bei pH 10 wurden niedrigere Werte gemessen als bei pH 9. In Stühlen die nur die Fraktion 4a enthielten, wurden nur geringe Aktivitäten gefunden.

Inhibition der alkalischen Phosphatase in Faeces-extrakten durch *L*-Phenylalanin, Inaktivierung bei 56 °C und Harnstoffdenaturierung

Unterschiede zwischen der Fraktion 4a und den übrigen in Faeces vorkommenden Fraktionen zeigten sich auch bei Inhibitions- und Inaktivierungsversuchen. Ein Teil dieser Resultate ist auf der Abb. 3 dargestellt.

Abbildung 3 zeigt, daß die Aktivität der alkalischen Phosphatase der Faeces ohne Fraktion 4a durch *L*-Phenylalanin stark herabgesetzt wurde; bei pH 9 um 70–80%; bei pH 10 um 50–60%.

In Extrakten, welche die Fraktion 4a enthielten, wurden die alkalische Phosphatase durch *L*-Phenylalanin weit weniger inhibiert, besonders bei pH 9, bei welchem diese Fraktion gegenüber dem Inhibitor fast vollkommen resistent zu sein schien.

Extrakte ohne Fraktion 4a verloren in 15 Minuten bei 56 °C etwa ein Fünftel ihrer Aktivität; bei pH 9 etwas mehr als bei pH 10. Die Fraktion 4a wurde bei pH 9

Tab. 2. Mittelwerte und Standardabweichungen der alkalischen Phosphatasenaktivitäten der Faeces. *King-Armstrong* Einheiten pro kg Trockensubstanz.

	N	pH 9	s	pH 10	s	$\bar{X}$ pH 10/ $\bar{X}$ pH 9
		$\bar{X}$		$\bar{X}$		
I Stühle in welchen die Fraktion 4a nicht gefunden worden war:						
– von gesunden Kindern	10	302 300	150 700	596 200	269 200	1,96
– von Kindern mit akuter Virus Hepatitis	22	308 000	183 900	545 500	303 700	1,77
– von gesunden Erwachsenen	15	326 900	297 600	469 600	338 700	1,44
– von Erwachsenen mit Leberkrankheiten	29	336 500	309 700	574 200	517 300	1,71
– von Erwachsenen mit Lambliasis	27	337 100	320 000	508 700	493 600	1,51
II Stühle in welchen die Fraktionen 4a und 1 und (oder) 1a gefunden waren.	22	142 800	193 900	134 100	149 500	0,95
III Stühle in welchen nur die Fraktion 4a gefunden war.	25	47 800	32 400	35 100	24 300	0,73

Abb. 3. Hemmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität in Faecesextrakten durch 5 mmol/l L-Phenylalanin. Gezeichnet sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen der Herabsetzungen der Anfangsaktivität bei pH 9 und pH 10 in Prozent. (pH 9 —; pH 10 ----). a)–e) Stühle, in welchen die Fraktion 4a nicht gefunden worden war: a) von gesunden Kindern, b) von Kindern mit akuter Virushepatitis, c) von gesunden Erwachsenen, d) von Erwachsenen mit Lebererkrankungen, e) von Erwachsenen mit Lambliasis f) Stühle, in welchen die Fraktion 4a neben 1 und/oder 1a gefunden wurde, g) Stühle, in welchen nur die Fraktion 4a gefunden wurde.

fast nicht beeinflusst und auch bei pH 10 nur wenig inaktiviert.

Denaturierungsversuche mit 2 mol/l Harnstoff führten bei beiden pH-Werten in allen Proben zu Aktivitätsverlusten von 36–41 %.

Gelfiltration der Extrakte

Durch Kolonnen von Sephadex G 100 wurden filtriert:

1. ein Extrakt aus Faeces eines gesunden Erwachsenen,
2. ein Extrakt aus acholischen Faeces eines Kranken mit Stauungsikterus,

3. ein Extrakt aus Faeces eines erwachsenen Lamblien-trägers in welchem nur die Fraktion 4a gefunden worden war,
4. ein Extrakt aus Dünndarmschleimhaut,
5. ein Extrakt aus Blasengalle.

Auf der Abbildung 4 sind die Elutionsdiagramme dargestellt. Aus den Kolonnen wurden zuerst inaktive Eiweißstoffe ausgewaschen. Die nachfolgenden Phosphatase-aktiven Portionen enthielten nur wenig bei 280 nm Licht absorbierendes Material (Abb. 4a, b). Kurve a der alkalischen Phosphatase (normale Faeces) weist auf zwei nahverwandte Fraktionen hin, welche den Elektrophoresebanden 1 und 1a entsprechen könnten. Dasselbe bedeutet wahrscheinlich auch die linke Schulter auf Kurve b (acholische Faeces).

Die breite Kurve der Fraktion 4a auf Diagramm c spricht dafür, daß das eluierte Enzym nicht homogen war. Im Einklang damit steht die stets breite Zone der Fraktion 4a auf Elektropherogrammen.

Das Diagramm d zeigt, daß die alkalische Phosphatase der Dünndarmschleimhaut in Bezug auf Molekülgröße sehr homogen war, obgleich sich auf Elektropherogrammen zwei Banden mit nur wenig verschiedener Beweglichkeit zeigten. Diagramm e zeigt, daß die alkalische Phosphatase aus Blasengalle etwas früher eluiert wurde

Tab. 3. Vergleich der alkalischen Phosphatasenaktivitäten in Rohextrakten und Eluat. *King-Armstrong*-Einheiten, pH 9.

Phosphatasen	Phosphatasenaktivitäten		
	eingetragen	eluiert	wieder-gefunden (%)
Faeces eines gesunden Erwachsenen	12,6	12,8	101
Acholische Faeces	40,0	35,2	88
Faeces mit der Fraktion 4a	6,0	1,9	31
Darmschleimhaut-extrakt	26,2	26,6	101
Gallenextrakt	1,6	5,6	350

Abb. 4. Elutionsdiagramme der alkalischen Phosphatasen aus den Sephadex G 100 Säulen.
 — Aktivität der alkalischen Phosphatasen, King-Armstrong-Einheiten
 --- Protein, Absorbanz bei 280 nm
 Gallenpigmente, Absorbanz bei 280 nm.
 a) Normale Faeces
 b) Acholische Faeces
 c) Faeces, die Fraktion 4a enthalten
 d) Darmschleimhaut
 e) Galle

als die alkalische Phosphatase aus Faeces. Das Eluat war grünlich gefärbt und absorbierte stark im UV.

Auf der Tabelle 3 sind die Aktivitäten der alkalischen Phosphatase der gesammelten Eluate mit denen des Ausgangsmaterials verglichen.

Die alkalische Phosphatase aus den Faeces einer gesunden Person und aus Darmschleimhaut wurden in den Eluaten vollständig wiedergefunden. Von der Aktivität der alkalischen Phosphatase im Extrakt aus acholischem Stuhl wurde ein kleiner Teil, von der aus Stuhl mit der

Fraktion 4a mehr als zwei Drittel im Gelfiltrat nicht wiedergefunden.

Das Elutionsdiagramm c auf der Abbildung 4 entspricht also nur etwa einem Drittel der in die Kolonne eingebrachten alkalischen Phosphatase. Dagegen zeichnete sich der Gallenextrakt dadurch aus, daß die Aktivität des Eluats mehr als verdreifacht war. Wir vermuten, daß in der Kolonne Gallensäuren zurückgeblieben waren, welche nach *Peterlik* (11) alkalische Phosphatase stark inhibieren.

Untersuchungen der durch Gelfiltration gereinigten alkalischen Phosphatase

Die eluierten alkalischen Phosphatasen wurden nochmals mittels Stärkegelelektrophorese aufgetrennt, mit *L*-Phenylalanin inkubiert, bei 56 °C inaktiviert, sowie ihre spezifischen Aktivitäten und K_m -Werte bestimmt.

Nach der Filtration über Sephadex konnten wir verschiedene schwache, in der Nähe der Auftragsstelle zurückbleibende Fraktionen auf Elektropherogrammen nicht wiederfinden. Die Lage der Hauptfraktionen aus normalem Stuhl und Dünndarmschleimhaut war unverändert. Im gereinigten Extrakt aus acholischem Stuhl fehlte die Fraktion 3. Die Hauptfraktion der alkalischen Phosphatase aus Galle erschien bei gleicher, geringer Beweglichkeit kompakter als vor der Reinigung. Die Fraktion 4a war im Elektropherogramm des nur wenig aktiven Eluats nicht sichtbar.

Alkalische Phosphatasen aus normalem und acholischem Stuhl, aus Dünndarmschleimhaut und auch aus Galle wurden vor und nach der Gelfiltration durch *L*-Phenylalanin sowohl bei pH 9 als auch bei pH 10 fast ebenso stark inhibiert wie vor der Reinigung, zugleich waren sie nach der Reinigung viel empfindlicher gegen erhöhte Temperatur als in rohen Extrakten. Mit der gereinigten Fraktion 4a konnten wir keine Inhibitions- und Inaktivierungsversuche ausführen, weil ihre Aktivität im Eluat zu gering war.

Resultate der Aktivitätsmessungen bei verschiedenem pH mit verschiedenen Substratkonzentrationen sind auf Abbildung 5 dargestellt.

Die pH Optima der alkalischen Phosphatase aus normalem und acholischem Stuhl, Dünndarmschleimhaut und Galle liegen alle bei pH 10, das Optimum der Fraktion 4a liegt dagegen bei pH 9.

Abb. 5. pH-Optima der gereinigten alkalischen Phosphatasen bei verschiedenen Konzentrationen von Phenylphosphat: 2,0 mmol/l ○—○; 5,0 mmol/l ○—○—○; 8,5 mmol/l ●—●; 12,5 mmol/l ●—●—●; 25 mmol/l
a) Normale Faeces (Eluat)
b) Acholische Faeces (Eluat)
c) Faeces, die Fraktion 4a enthalten (Extrakt)
d) Darmschleimhaut (Eluat)
e) Galle (Eluat)

Tab. 4. K_m -Werte der alkalischen Phosphatasen aus Stühlen, Dünndarmschleimhaut und Galle. Substrat: Dinatrium-monophenylphosphat.

Phosphatasen aus	V_{max} ($\mu\text{g/ml}$ Phenol)	K_m (mmol/l Phenylphosphat)
Faeces eines gesunden Erwachsenen	120,4	1,52
Acholische Faeces	91,0	1,52
Faeces mit der Fraktion 4a	16,6	10,0
Darmschleimhautextrakt	416,6	1,52
Gallenextrakt	294,1	2,04

K_m -Werte sind in der Tabelle 4 angeführt.

Alkalische Phosphatasen aus normalem, acholischem Stuhl und Dünndarmschleimhaut hatten identische, niedrige K_m -Werte, Gallenphosphatase einen nur wenig höheren. Mehr als sechsfach höher war der K_m -Wert der Fraktion 4a.

Untersuchung der Fraktion 4a

Alle beschriebenen Beobachtungen wiesen darauf hin, daß die Fraktion 4a synthetische Phosphorsäureester vom Typus Phenyl- oder Naphthylphosphat zwar spaltete, aber eine viel geringere Affinität für solche Ester hatte als die typischen alkalischen Phosphatasen. Der Aktivitätsverlust bei Gelfiltration ließ uns vermuten, daß es sich bei dieser Fraktion um eine Phosphatase mit größerem Molekulargewicht handeln könnte. Als Kandidat kam die zuerst von Reis (12) in vielen menschlichen Geweben gefundene 5'-Nucleotidase in Betracht, welche nach Kowlessar (13, 14) und Taswell (15) in Stärkegelelektropherogrammen im Bereich zwischen Auftragstelle und α_2 -Globulinen zurückbleibt, wo wir die Fraktion 4a auch gefunden haben. Moss (16) hat 1966 versucht, die 5'-Nucleotidase von den unspezifischen alkalischen Phosphatasen zu trennen, wobei er fand, daß die 5'-Nucleotidase ein Molekulargewicht von mehr als 200.000 haben müsse und daß sie nur geringe Affinität für Phenylphosphat hat.

Deshalb bestimmten wir die Aktivitäten der alkalischen Phosphatasen und der 5'-Nucleotidase nach Campbell. Die Resultate dieser Versuche sind in der Tabelle 5 angegeben.

Tab. 5. Anteil der 5'-Nucleotidase (in Prozenten) an der gesamten alkalischen Phosphatasenaktivität von Stühlen, Dünndarmschleimhaut und Galle. Messungen nach Campbell (10).

Phosphatasen aus	Gesamt- aktivität mg P/l	Aktivität der 5'-Nu- cleotidase mg P/l	% der Gesamtak- tivität
Faeces eines gesunden Erwachsenen	25.8	4.8	18,6
Acholische Faeces	21.7	5.1	23,8
Faeces mit der Fraktion 4a	10.0	4.9	49,0
Darmschleimhautextrakt	13.6	3.3	24,3
Gallenextrakt	11.4	1.4	12,2

In jedem der untersuchten Extrakte war ein Teil, höchstens ein Viertel, der alkalischen Phosphatase-Aktivität auch mit Adenosin-5-phosphat bei pH 7,5 meßbar. Eine Ausnahme bildete wieder der Extrakt aus Stuhl mit der Fraktion 4a, in welchem die Hälfte der Gesamtaktivität von 5'-Nucleotidase zu stammen schien.

Diskussion

Der Ausgangspunkt unserer Untersuchungen der alkalischen Phosphatasen der Faeces waren die Fragen, woher diese Enzyme stammten, und, ob es bei Störungen im Bereich der Verdauungsorgane zu charakteristischen Änderungen ihrer Ausscheidung käme.

Unsere Beobachtungen sprechen dafür, daß der Hauptteil der alkalischen Phosphatase in normalen und acholischen Faeces aus der Dünndarmschleimhaut stammt, und daß normalerweise nicht viel Gallenphosphatase im Stuhl vorkommt. Die alkalische Phosphatase der normalen und acholischen Faeces hat das gleiche pH-Optimum und den gleichen K_m -Wert wie die Dünndarmphosphatase, wird durch L-Phenylalanin gleich inhibiert und beim Erwärmen in gleichem Maß inaktiviert. Es scheint aber, daß die alkalische Phosphatase der Schleimhaut im Darm nicht unverändert bleibt, da sich der Hauptteil der alkalischen Phosphatase in Faeces von der in Schleimhaut durch etwas größere Beweglichkeit bei Stärkegelelektrophorese unterscheidet.

Alkalische Phosphatase aus Galle hat einen höheren K_m -Wert, viel geringere Beweglichkeit im Elektropherogramm, auch wird sie durch L-Phenylalanin — im Gegensatz zu den alkalischen Phosphatase aus Stühlen und Schleimhaut — kaum gehemmt.

Unsere zweite Frage glauben wir bejahend beantworten zu können. Die von uns „4a“ genannte Faeces-Phosphatase, welche Eigenschaften einer 5'-Nucleotidase hat, haben wir in Stühlen von Kranken mit akuter Virushepatitis, Lebercirrhose und Protozoasis beobachtet. Es könnte sein, daß ihr Auftreten mit Störungen verbunden ist, welche tiefere Gewebsschichten erfassen. Protozoen vermehren sich in der Schleimhaut des Darms und der Gallenwege und zerstören die oberflächlichen Zellschichten; die 5'-Nucleotidase der Gewebe, welche nicht wasserlöslich ist, könnte dann unter dem Einfluß der Gallensäuren herausgelöst und mit der Galle in den Darm gebracht werden.

Bemerkenswert scheint uns, daß das Auftreten der Fraktion 4a im Stuhl stets von einem starken Abfall der gesamten Aktivität begleitet ist. Es sieht so aus, als ob die Produktion der alkalischen Phosphatase in der Schleimhaut, oder ihre Ausscheidung in den Darm, gehemmt sei.

Die Feststellung der beschriebenen Veränderungen des Gehalts von alkalischer Phosphatase im Stuhl könnte einen Beitrag zur Diagnostik der Leber- und Darmkrank-

heiten bilden. Es ist nicht nötig, die Fraktion 4a mittels Elektrophorese aufzusuchen. Bestimmungen der Phosphatasen-Aktivität pro kg trockener Faeces bei pH 10,

und der Inhibition durch *L*-Phenylalanin bei pH 9 und 10 genügen zur Charakterisierung der abnormalen Enzymlage im Darm.

Literatur

1. Benić, V. & Fišer-Herman, M. (1970), *diese Z.* 8, 458–464.
2. Kirberger, E. & Martini, G. A. (1950), *Deut. Arch. Klin. Med.* 197, 268–287.
3. King, E. J. & Armstrong, A. R. (1934), *Can. Med. Ass. J.* 31, 376–381.
4. Fishman, W. H. & Ghosh, N. K. (1967), *Advan. Clin. Chem.* 10, 225–270.
5. Fennelly, J. J., Fitzgerald, M. X. & Geaney, K. Mc. (1969), *Gut* 10, 45–51.
6. Posen, S., Neale, F. C. & Clubb, J. S. (1965), *Ann. Intern. Med.* 62, 1234–1243.
7. Smithies, O. (1955), *Biochem. J.* 61, 629–641.
8. Poulik, M. D. (1957), *Nature (London)* 180, 1477–1479.
9. Bamford, K. F., Harris, H., Luffman, J. E., Robson, E. B. & Cleghorn, T. E. (1965), *Lancet* I, 530–531.
10. Campbell, D. M. (1962), *Biochem. J.* 82, 34 P.
11. Peterlik, M. (1966), *diese Z.* 4, 34–35.
12. Reis, J. L. (1951), *Biochem. J.* 48, 548–551.
13. Kowlessar, O. D., Pert, J. H., Haeffner, L. J. & Slesinger, M. H. (1959), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 100, 191–193.
14. Kowlessar, O. D., Haeffner, L. J. & Riley, E. M. (1961), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 94, 836–843.
15. Taswell, H. F. & Jeffers, D. M. (1963), *Amer. J. Clin. Pathol.* 40, 349–356.
16. Moss, D. W. (1966), *Nature (London)* 209, 806–807.

Dr. mr. Vera Benić
Klinika za zarazne bolesti
41000 Zagreb, Mirogojska 8
Jugoslavija

Prof. dr. Marijana Fišer-Herman
41000 Zagreb, Bijenička 21
Jugoslavija