

tube (1 mm Be filter) has been used with fine grain Lippman Film.

By this method the radiograms enable one to perceive a greater resolution than has been possible before. The pictures show chiefly the distribution of the calcium in the different structures of the teeth. The white areas represent the parts rich in calcium and the dark areas show the parts which have less calcium and more organic substance<sup>1</sup>.

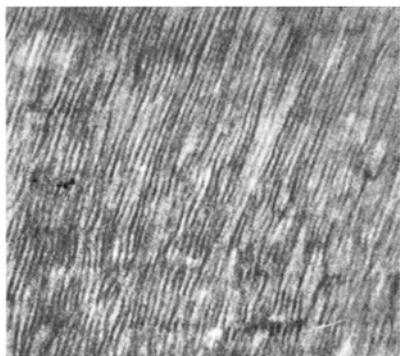


Fig. 2.—Dentin: Dentinal tubules which appear as black lines (long section), 200  $\times$ .

The microradiograms of the ground sections of enamel (Fig. 1) clearly show Retzius' lines which seem to be formed by rhythmical mineralisation. In the picture they go horizontally. One can even see the Hunter-Schreger bands which go vertically in the picture. These bands indicate that there is rhythmical calcification and their appearance is probably not due to an optical phenomenon which some authors assert<sup>2</sup>.

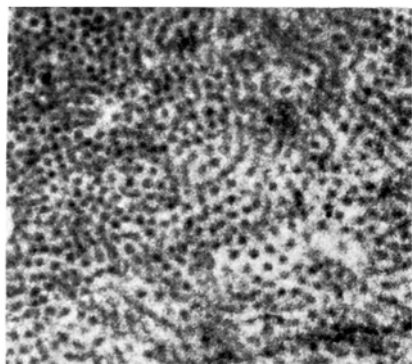


Fig. 3.—Dentin: Dentinal tubules in cross section. 200  $\times$ .

In the X-ray pictures of dentin, the dentinal tubules containing protoplasmic processes of the odontoblasts, Tomes' fibers, may be seen. They do not absorb the X-rays and are probably not mineralised and therefore appear as dark threads or points in longitudinal and cross section, respectively (Fig. 2 and 3). In dentin even the rhythmical mineralisation in the shape of von Ebner's lines appears.

On the dentin-enamel junction a characteristic wavy shape may be seen in many places in many of the teeth

<sup>1</sup> R. AMPRINO and A. ENGSTRÖM, *Acta Anatomica* 15, 1 (1952). – A. ENGSTRÖM, *Acta Radiol.* 31, 503 (1949). – A. ENGSTRÖM and S. WELIN, *Acta Radiol.* 31, 483 (1949). – A. ENGSTRÖM and R. AMPRINO, *Exper.* 6, 267 (1950). – A. ENGSTRÖM and I. WEGSTEDT, *Acta Radiol.* 35, 345 (1951). – A. ENGSTRÖM and B. ENGFELDT, *Exper.* 9, 19 (1953).

<sup>2</sup> ORHAN, *Oral Histology and Embryology*, 1949, 60.

as well as enamel tufts which appear to contain about as much calcium as dentin.

The cementocytes in the cellular cementum are not mineralised and do not absorb the X-rays. Consequently these cells appear as black points in contrast to their surroundings.

The figures show the preliminary results of the experiments designed to establish the quantitative distribution of calcium in the different structures of the tooth. Quantitative data and a detailed report will be published later.

H. RÖCKERT

*Department of Histology, Medical Faculty, University of Göteborg, October 3, 1954.*

### Zusammenfassung

Mit Röntgenstrahlen, deren Wellenlängen dem engbegrenzten Absorptionsmaximum von Calcium entsprachen, wurden von Schleifsnitten adulter, normaler menschlicher Zähne Mikroradiogramme aufgenommen. Diese geben Aufschluss über das Vorkommen von Calcium in menschlichen Zähnen.

### Elektronenmikroskopische Untersuchungen an lebenden Bakterien mit Hilfe des Abdruckverfahrens

Elektronenmikroskopisch lassen sich nur sehr dünne Objekte (0,1  $\mu$ ) durchstrahlen. Sind die Objekte nicht von Natur aus so dünn, oder reicht Umrissabbildung nicht aus, so kann man zu Dünnschnitten (200 bis 1000  $\text{\AA}$ ) greifen<sup>1</sup> oder zu Oberflächenabdruckverfahren wobei die Objekte beliebig kompakt sein dürfen. Letztere, von H. MAHL eingeführte und in zahlreichen Varianten angewandte mittelbare Methode liefert das Oberflächenrelief des Objektes mit einem Auflösungsvermögen von etwa 60 bis 150  $\text{\AA}$ <sup>2</sup>.

Die bisherigen Untersuchungen mit Abdruckverfahren bezogen sich im wesentlichen auf fixiertes Material<sup>3</sup>. Es wurde daher der Versuch unternommen, das Oberflächenabdruckverfahren bei lebenden Bakterien, die auf ihrem natürlichen Nährsubstrat verblieben, anzuwenden. Dabei wurde erwartet, dass Einzelheiten über Oberflächenstrukturen und Begeißelung erkennbar werden würden, die sonst bei der üblichen Präparationsweise (Abschwemmen, Zentrifugieren) leicht verlorengehen oder artifiziellen Veränderungen unterworfen waren<sup>4</sup>.

Die untersuchten Bakterien wurden auf möglichst weitflächig beimpften 2%igen, zuweilen auch auf

<sup>1</sup> Zum Beispiel: D. C. PEASE und R. F. BAKER, *Proc. Soc. Exp. Biol. med.* 67, 470 (1948). – L. H. BRETSCHNEIDER, *Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch. Amsterdam* 52, 1 (1948); 53, 9 (1950). – F. S. SJÖSTRAND, *Exper.* 9, 114 (1953).

<sup>2</sup> Zum Beispiel: H. MAHL, *Naturwissenschaften* 30, 207 (1942). – F. KRAUSE und H. MAHL, *Kolloid-Z.* 105, 53 (1943). – H. MAHL, *Erg. exakten Naturwissensch.* 12, 262 (1945).

<sup>3</sup> A. KLEINSCHMITT und E. KINDER, *Zbl. Bakt. I. Orig.* 156, 219 (1950). – A. KLEINSCHMITT, *Z. Tropenmedizin und Parasit.* 2, 507 (1951). – A. KLEINSCHMITT und F. SCHLEICH, *Z. Tropenmed. Parasit.* 3, 42 (1951). – E. KELLENBERGER und L. HUBER, *Exper.* 9, 289 (1953). – J. HILLIER und R. BAKER, *J. Bact.* 52, Nr. 4 (Okt. 1946).

<sup>4</sup> Diese methodischen Fragen tauchten auf im Rahmen von Untersuchungen W. LUDWIGS und Mitarbeitern, darunter der eine Verfasser (SCHRELL), Zoologisches Institut Heidelberg, über rechts- und linksgewundene Stämme von *Bacillus mycoides* und die künstliche Invertierbarkeit deren Asymmetrieeform (R-L-Problem)<sup>5</sup>

<sup>5</sup> U. HETTENBACH und W. LUDWIG, *Exper.* 7, 457 (1951).

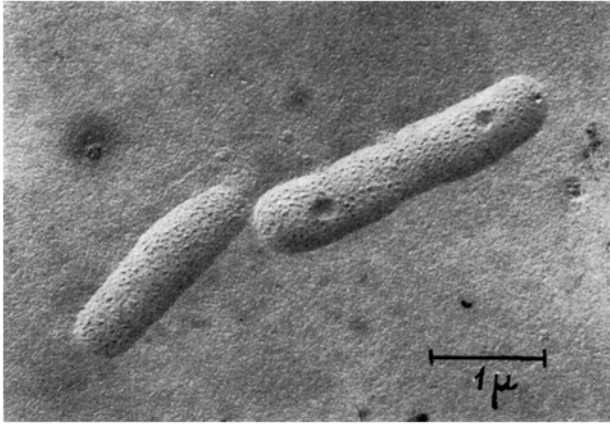


Abb. 1. *Shigella paradysenteriae*. Palavit-Sio-Abdruck von Agarkultur, 20 h bei Zimmertemperatur bebrütet, Nährboden 1,5%ig. Abdruck mit Trypsin verdaut. Vergrößerung: 15000:1.

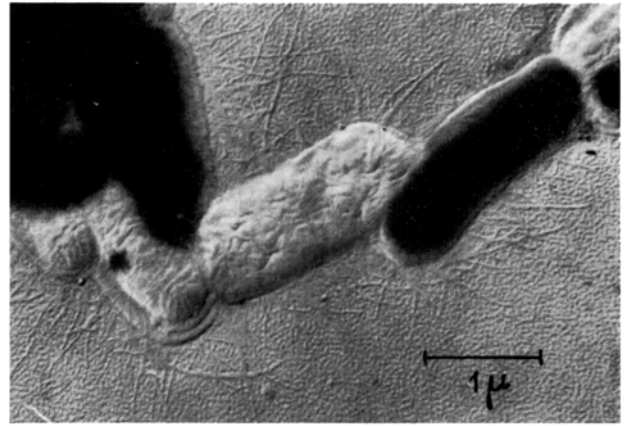


Abb. 2. *Escherichia coli*. Palavit-Sio-Abdruck von Agarkultur, 9 h bei 37° bebrütet, Nährboden 2%ig. Abdruck mit Festal verdaut. Vergrößerung: 15000:1.

1½ %igen Fleischbrühe-Pepton-NaCl-Agarplatten von einem pH = 7,4 bei 37°C 4–24 h bebrütet. Danach wurden die Platten mit einem flüssigen Kunststoff begossen und dieser nach seinem Erstarren von der Agarfläche abgehoben.

Bei den hier beschriebenen Untersuchungen haben sich zwei Kunststoffe als besonders brauchbar erwiesen: Polystyrol<sup>1</sup> und als unseres Wissens neuartig in der Elektronenmikroskopie Palavit<sup>2</sup>. Während Polystyrol mit Benzol verflüssigt durch Verdunsten seines Lösungsmittels erst in 12 bis 24 h eine Abdruckmatrize bildet, erstarrt das Palavit durch den Polymerisationsvorgang in 5 bis 8 min<sup>3</sup>. Ein Teil der Bakterien haftete in der Regel am Abdruck und musste mit verschiedenen Verdauungsfermenten herausverdaut werden. Von den handelsüblichen Fermentsystemen erwies sich vor allem Festal<sup>4</sup> als wirksam, doch konnte auch mit aktiviertem Papain<sup>5</sup> und Trypsin-Pepsin-Verdauungen erfolgreich gearbeitet werden. Gleichmässige Verdauungserfolge wurden bisher nicht erzielt, eine weitere Untersuchung hierüber ist vorgesehen. Die der Verdauungsflüssigkeit entnommenen Abdruckfolien wurden im kräftigen Wasserstrom durch Stunden hindurch gespült und schliesslich an der Luft getrocknet.

Nunmehr wurden diese Kunststoffmatrizen nach dem bekannten Verfahren<sup>6</sup> im Hochvakuum zur Erhöhung der Kontrastwirkung mit Platin oder Paladium schräg und mit Siliziummonoxyd senkrecht bedampft. Die Aufdampfschichten konnten mit Hilfe der Gelatine-methode<sup>7</sup> abgehoben werden.

Abbildung 1 zeigt einen Oberflächenabdruck von *Shigella paradysenteriae*, die Abbildungen 2 und 3 solche von *Escherichia coli*, die zum Teil unvollkommene Verdauung erkennen lassen. Über die in den Abbildungen 2 und 3 sichtbar gewordenen Geisselstrukturen, die bisher nicht bekannt waren, mögen Erörterungen vorerst unterbleiben. Jene Geisselorganellen, die auf der dem Beschauer zugekehrten Seite inserieren, sind zunächst auf dem Bakterienkörper aufgeklatscht und treten dann

über diesen hinaus. Auch die unverdauten Abdrücke zeigen solche Strukturen. Bei den abgebildeten Präparaten sind die «Geisselemente» zum Teil mit dem SiO-Abdruck abgehoben, stellen also im Gegensatz zu den Bakterienkörpern keine Abdrücke dar. Dass sie bisher selten gesehen wurden, ebenso wie Oberflächenbesonderheiten der *Shigella paradysenteriae*, lässt sich wohl auf unsere schonende Präparationsweise zurückführen, wird doch das Bakterium auf seiner Agarplatte lebend erfasst und auch nicht mechanisch abgeschwenmt oder zentri-fugiert.

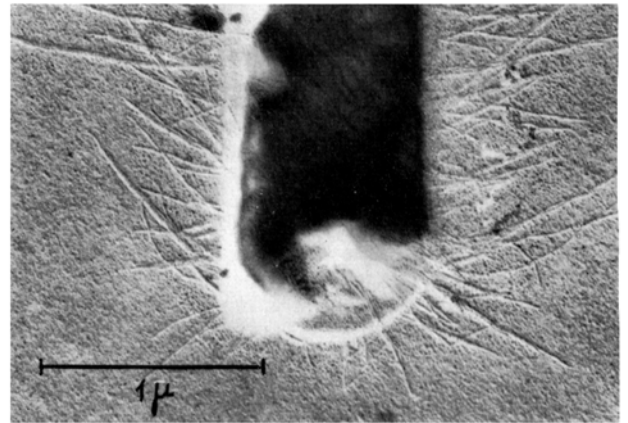


Abb. 3. *Escherichia coli*. Palavit-Sio-Abdruck von Agarkultur, 12 h bei 37° mit Coliphage 2 bebrütet, Nährboden 1,5%ig. Abdruck mit Festal verdaut. Vergrößerung: 30000:1.

Die hier beschriebene Methode der Gewinnung von Lebendabdrücken dürfte wohl einen präparativen Fortschritt darstellen. Den Schäden bisheriger Präparationen<sup>1</sup> stehen bei oben beschriebener Methode möglicherweise geringere durch die flüssigen Kunststoffe gegenüber. Beide verwandten Kunststoffe sind wasserabstossend, das schnell erstarrende Palavit scheint früher fest zu werden als die Zelle abstirbt und sich dabei verändert, es besitzt vermutlich keine fixierenden Eigenschaften, gelang es doch, von der Abdruckfolie lebendes Bakterienmaterial erfolgreich zu überimpfen.

<sup>1</sup> B. v. BORRIES, Einführung in die Übermikroskopie (Verlag Cantor, Aulendorf, Württemberg, 1949).

<sup>1</sup> Hersteller: B.A.S.F. Ludwigshafen/Rhein.

<sup>2</sup> Dentalmedizinisches Präparat von Kulzer & Co. (Frankfurt a.M.) auf Plexiglasbasis.

<sup>3</sup> A. F. BROWN und W. M. JONES, Nature 159, 635 (1947).

<sup>4</sup> Farbwerke Hoechst, Frankfurt a.M.-Hoechst.

<sup>5</sup> W. SCHWARZ und G. PAHLKE, Z. Zellf. 38, 475 (1953).

<sup>6</sup> Zum Beispiel R. D. HEIDENREICH und V. G. PECK, J. Appl. Phys. 14, 23 (1943).

<sup>7</sup> E. KINDER, Phys. Verhandl. 4, 102 (1953).

Wir danken Herrn Regierungsrat Dr. G. A. KAUSCHE für freundliche Unterstützung und Herrn Dozent Dr. G. POETSCHKE und Herrn Dr. med. dent. F. FLOTTMEIER für ihre Ratschläge. Elektronenoptische Aufnahmen: Zeiss-Gerät EM 8.

W. SCHREIL und F. SCHLEICH

*Institut für Virusforschung, Heidelberg, und Gastlaboratorium der Firma Carl Zeiss, Oberkochen, Württemberg, Abteilung für Elektronenoptik, den 24. August 1954.*

### Résumé

Au moyen d'une technique nouvelle, fondée sur l'emploi de matières plastiques (Polystyrol et Palavit), l'auteur obtient d'excellentes images de la surface de bactéries vivantes cultivées sur agar-agar. Grâce à cette méthode il est possible de mettre en évidence des structures qui n'avaient pas été décrites jusqu'à ce jour, le «double moulage» restituant fidèlement les détails caractéristiques de l'original.

## Über die Wirkung der chronischen Colchicinvergiftung auf experimentelle Mykosen

Unter den Stoffen, die die Ausbreitung einer experimentellen Mykose begünstigen, bzw. ihre Abheilung verzögern, kommt dem Cortison nach den Berichten verschiedener Autoren<sup>1</sup>, sowie eigenen Untersuchungen<sup>2</sup> eine gewisse Bedeutung zu. Wenn sich auch über den Mechanismus dieses Geschehens bisher nur Vermutungen anstellen lassen, so ist doch so viel sicher, dass eine Generalisation nur bei Verwendung pathogener Stämme erfolgt, während apathogene auch unter Cortison keine Pathogenität erlangen. Selbst bei solchen von nur geringer Pathogenität gibt Cortison nicht immer einen Impuls zur Ausbreitung, wie wir an der experimentellen Chromoblastomykose zeigen konnten<sup>3</sup>.

Die Ähnlichkeit der Angriffsorte von Cortison und Colchicin, besonders auf Knochenmark und RES, gaben uns Veranlassung, auch das Colchicin in seiner Wirkung auf experimentelle Mykosen zu untersuchen. Da uns negative Vorversuche bei der Histoplasmose der Ratte davon überzeugten<sup>4</sup>, dass mit einer akuten Colchicinvergiftung keine brauchbaren Resultate zu erhalten waren, haben wir uns der chronischen Vergiftung nach der Methode von MATKO und HARASZTI<sup>5</sup> zugewandt, die eine ausreichende Überlebenszeit zur Beobachtung der behandelten Tiere gewährleistet.

**Versuchsmaterial und Methode.** Nachdem Vorversuche erwiesen hatten, dass eine morphologisch fassbare Schädigung des Knochenmarks bei der Ratte nach etwa 10 Tagen einer Colchicinverabreichung von 35 bis 50  $\gamma$  je 100 g (täglich oder jeden 2. Tag) eintritt, wurde der 10. Tag zur Inokulation ausgewählt. Die Veränderungen im Markabstrich aus dem unteren Femurdrittel bestanden in einer Linksverschiebung mit zahlreichen arretier-

ten Mitosen. Als Colchicin wurde Colchicinum puriss. Merck verwendet.

Im einzelnen wurde so vorgegangen, dass von drei Gruppen zu je 10 Albinoratten, mit einem Durchschnittsgewicht von 60 g bei Versuchsbeginn, jeweils 5 Tiere mit einer wässrigen Colchicininlösung in der oben angegebenen Dosierung behandelt wurden. Die Lösung wurde intraperitoneal gespritzt, da nach subkutaner Injektion häufig lokale Nekrosen auftraten. Am 10. Tag der Colchicinbehandlung wurden Versuchstiere und Kontrollen auf intraperitonealem Wege infiziert. Die Colchicinverabreichung wurde bis zum Versuchsende am 30. Tag *post infectionem* fortgesetzt. Zur autopsischen und histologischen Untersuchung gelangte je ein Tier der Versuchs- und Kontrollgruppen am 7., 12., 18., 24. und 30. Tag nach der Inokulation. Als Kontrolle für die Colchicingruppe schliesslich wurden 10 intakte, nicht infizierte Ratten in gleicher Weise durch 40 Tage mit Colchicin behandelt. Es kann hier vorweggenommen werden, dass diese Tiere ausser den Erscheinungen einer chronischen Colchicinvergiftung keine pathologischen Veränderungen aufwiesen und den Versuch überlebten.

Als Pilzstämmen wurden verwendet: *Nocardia Leishmani*, *Nocardia asteroides* und *Torula histolytica*. Von den auf flüssigem Czapek-Dox-Medium unter Zusatz von 5 g Pepton-Proteose bei Zimmertemperatur gewachsenen, 14 Tage alten Kulturen wurden 0,1 cm<sup>3</sup> abzentrifugiertes Kulturmateriale je 50 g Ratte i.p. gegeben.

**Ergebnisse.** *Nocardia Leishmani*. Dieser Stamm erwies sich für unsere Ratten als nur wenig pathogen, und die Krankheitserscheinungen beschränkten sich auf eine spärliche Aussaat kleinster Knötchen am viszeralen Peritoneum und Omentum. Nach dem 18. Tag war bei den Kontrollen kein pathologischer Befund mehr zu erheben.

Bei allen Colchicintieren dagegen fanden sich ausser am Peritoneum und Omentum auch am Zwerchfell bis zu einem Dutzend miliarer Knötchen, die mikroskopisch als mykotische Mikrogemmen anzusprechen waren. Die Knochenmarkabstriche bei diesen Tieren zeigten ein toxisch verändertes Mark mit zahlreichen Mitosen, Linksverschiebung und vereinzelt pyknotischen Kernen. Eine Ausbreitung der Infektion über die Bauchhöhle hinaus in den Brustraum und seine Organe unterblieb.

*Nocardia asteroides*. Die Pathogenität dieses Stammes war gegenüber der *Nocardia Leishmani* wesentlich grösser, aber auch hier liessen sich bei den nur infizierten Kontrollen deutliche Zeichen einer Selbstheilung beobachten. Die Zahl der mykotischen Granulome bei diesen Tieren betrug durchschnittlich 20–30, ihre Grösse 0,5–1 mm. Betroffen von der Aussaat waren Peritoneum und Omentum, und bei 3 Tieren bestanden zarte Adhäsionen zwischen Darmserosa und Bauchwand.

Im Gegensatz dazu waren die pathologischen Erscheinungen bei den Colchicinbehandelten ausgedehnter und massiver; die Adhäsionen plattenartig und derb, die Zahl der Knötchen bis zu 100 und darüber. Ihre Ausdehnung erstreckte sich vom Zwerchfell, das mit zahlreichen miliaren Granulomen besät war, über den serösen Überzug von Milz und Leber auch in deren Parenchym und schliesslich abwärts bis ins Becken und den retroperitonealen Raum. In den Lungen fanden sich bei 2 Tieren vereinzelt miliare Abszesse, jedoch ohne sicher nachweisbare Erreger. Wir möchten daher diese Herde nicht mit dem mykotischen Geschehen in Zusammenhang bringen. Die Veränderungen im Knochenmark waren proportional der fortschreitenden Colchicinvergiftung und zeigten gegen Versuchsende zahlreiche pyknotische Kerne und Rosettenformen.

<sup>1</sup> P. REDAELLI, C. CAVALLERO, M. BORASI, G. SALA und A. AMIRA, Exper. 7, 109 (1951). – C. CAVALLERO, Rev. Canad. Biol. 12, 189 (1953). – V. D. NEWCOMBER, E. T. WRIGHT, J. E. TARBET, L. H. WINER und Th. H. STERNBERG, J. invest. Dermat. 20, (1953). – C. E. SNOCK und G. MIESCHER, Bull. Schweiz. Akad. Wiss. 8, 220 (1952). – F. REISS und L. CAROLINE, J. invest. Dermat. 19, 365 (1952). – P. REDAELLI und L. PIANTONI, Giorn. Malatt. infett. 5, 77 (1953).

<sup>2</sup> H. KÖNIGSBAUER, Zbl. Bakt. Abt. I. 159, 473 (1953); 160, 637, (1954).

<sup>3</sup> H. KÖNIGSBAUER, Zbl. Bakt. Abt. I. 160, 637 (1954).

<sup>4</sup> H. KÖNIGSBAUER, Archiv Dermat. 195, 492 (1953).

<sup>5</sup> L. MATKO und A. HARASZTI, Act. morph. Hung. 2, 219 (1952).