

## XX.

# Über die Mitochondria in den Epithelzellen der gewundenen Nierenkanälchen bei der Einwirkung einiger Diuretika (Koffein und Theocin).

(Aus dem Histologischen Laboratorium zu Helsingfors.)

Von

K. J. Hjelt.

(Hierzu Taf. V.)

Über die Frage, auf welche Weise verschiedene Diuretika eine Diurese zustande bringen, sind viele Untersuchungen von verschiedenen Forschern gemacht, die zu sehr divergierenden Resultaten gekommen sind. Da aber diese kleine Studie eine eng begrenzte Frage behandelt, will ich kurz nur einige Untersuchungen über die Einwirkung des Koffeins und damit verwandter Diuretika auf die Niere berühren und dazu auch solche Arbeiten erwähnen, die durch ihre Behandlung der Frage über die Zellenstruktur der Nierenepithelien dieser Untersuchung nahe stehen.

v. Schröder<sup>1</sup> beobachtete bei Koffeindiurese eine vermehrte Ausscheidung nicht allein von Wasser, sondern auch von festen Harnbestandteilen und folgerte hieraus, daß das Koffein eine lebhaftere sekretorische Reizung auf das Nierenepithel ausübe. Hierbei hat er sich also auf die Heidenhainsche Theorie über die Harnabsonderung gestützt.

✱ Etwas später spricht Rüdel<sup>2</sup> in einer unter der Leitung von v. Schröder ausgeführten Arbeit die Vermutung aus, daß alle Diuretika auf den Glomerulus einwirken und die aus ihm kommende Flüssigkeitsmenge vermehren.

v. Sobieranski<sup>3</sup> kritisiert die v. Schroedersche Annahme einer Reizung des Nierenepithels: „Wenn diese Annahme richtig wäre, so sollte man im Sinne Heidenhains bei Koffeindiurese eher eine stärkere Färbung des Epithels erwarten. Der Versuch hat jedoch das Gegenteil gezeigt.“ Nachdem er bei einem Kaninchen eine Diurese durch Koffein und Chloralhydrat zustandegebracht hatte, injizierte er eine Indigolösung in die Vena jugularis. Bei mikroskopischer Untersuchung der Niere konnte er keine Färbung der Kerne in den Tubuli cont. beobachten, sondern „nur ab und zu eine diffuse Färbung des auskleidenden Epithels“. Demzufolge äußert er sich: „Ferner schließe ich aus dem Farblosbleiben der Tubuli contorti, daß das Koffein vor allen Dingen die resorbierende Fähigkeit der Epithelien der gewundenen Kanälchen paralyisiert und auf solche Weise die Diurese verursacht.“ (v. S. vertritt nämlich die Ansicht, daß im Glomerulus nicht nur Wasser, sondern auch alle im Blute präformierten „harnfähigen Salze“, frei zirkulierende Eiweißstoffe ebenso wie Indigo und Karmin, abgesondert werden. Neben diesem Filtrationsapparat existiert ein Eindickungsapparat, bestehend hauptsächlich aus den Tub. cont.)

Sauer<sup>5</sup> untersuchte das Verhalten des Nierenepithels während der Sekretion und hat keine Veränderungen in dem Zellinhalt gefunden, sondern nur solche betreffs des Lumens der Kanälchen und der Zellenform. Bei schwacher Sekretion waren die Zellen niedriger, das Lumen größer. Der sogenannte Bürstenbesatz war unabhängig von dem Funktionsstadium immer da. Es muß erwähnt werden, daß Sauer als Diuretikum nicht Koffein oder damit verwandte Diuretika angewandt hatte.

Hellin und Spiro<sup>6</sup> untersuchten die Einwirkung des Koffeins auf die Niere bei arterieller Nephritis und sprechen sich so aus: „Wir sehen bei mancherlei hochgradigen Vergiftungen

der Niere, trotzdem die Epithelzellen einmal der gewundenen, ein andermal der geraden Kanälchen in der schwersten Weise affiziert waren, dennoch eine ausgesprochene Wirkung des Koffeins mit ebenso hochgradiger wie andauernder Diurese eintreten. Aus diesem Befunde können wir zwar den an und für sich naheliegenden Schluß noch keineswegs mit Sicherheit ziehen, daß die genannten Epithelien für das Zustandekommen der Diurese überflüssig wären. Doch wenn wir Serienschritte aus verschiedenen Teilen gemacht haben, und es sich dabei erwiesen hat, daß alle Bezirke der Niere betroffen waren, so waren doch selbstverständlich immer noch einzelne Epithelien der Kanälchen erhalten.“ Sie nehmen an, daß ihr Versuch die v. Schrödersche Ansicht sehr stark zerrüttet.

Ebenso kommen Fletscher, Henderson und Löwi<sup>7</sup> zu negativem Resultate betreffs der Teilnahme der Tubuli cont. an der Koffeindiurese. Sie glauben aus ihren Versuchen schließen zu können, daß das Koffein auf die Nierengefäße direkt dilatierend einwirkt und daß die so vermehrte Blutdurchströmung die Ursache der Koffeindiurese sei. Ihres Erachtens gibt es keine sicheren Anhaltspunkte dafür, daß das Koffein irgendeine andere Einwirkung auf die Niere haben sollte als die obenerwähnte.

In einer späteren Arbeit<sup>4</sup> nimmt v. Sobieranski die Frage von der Einwirkung des Koffeins auf die Epithelzellen der Nierenkanälchen wieder auf. Er sagt: „Das Koffein also verändert meiner Meinung nach kaum die Form der Epithelien der Tubuli contorti, d. h. es unterhält beinahe denselben Zustand, in welchem sich die Epithelien der gewundenen Kanälchen vorher befanden. Es versetzt aber diese Teile der Niere in einen eigentümlichen Zustand, in welchem sie ihre resorbierende Tätigkeit mindern bzw. zeitlich aufheben.“

Modrakowski<sup>8</sup> machte experimentelle Untersuchungen über die Einwirkung verschiedener Diuretika auf die Epithelzellen der Tubuli contorti. Er fixierte und färbte nach Altmann. Da seine Arbeit sehr nahe dem Gegenstande dieser Studie steht, will ich dieselbe etwas näher besprechen. Schon bei der Färbung der Präparate von Koffeinnieren beobachtete M., daß die Granula nur mit Schwierigkeit das Säurefuchsin aufnahmen und daß sie bei Pikrinsäureeinwirkung sehr schnell entfärbt wurden. Unter dem Mikroskope zeigten sich mehr oder weniger deutlich Differenzen in der Größe der Granula. Nur selten waren sie in Reihen geordnet, und das nur an begrenzten Stellen. Dort fand er das Lumen größer und den Bürstenbesatz deutlich sichtbar. Der typische Ausdruck der Koffeineinwirkung zeigte sich betreffs der Granula darin, daß die fadenförmige Aufstellung derselben aufgehoben war. Im allgemeinen sah er die Granula ohne regelmäßige Ordnung verstreut. Er meint, daß dieses Verhalten mit einer gewissen Quellung der Zellen bei der Koffeineinwirkung in Zusammenhang stehen solle. So würden enges Lumen, Quellung der Zellen, Auflösung oder totales Verschwinden des Bürstenbesatzes immer zusammen auftreten. Die Zellkerne waren von dem basalen Teile der Zellen verschoben. So streckten sich auch die Granula gegen das Lumen hin. Vakuolen fand er nur in den Teilen näher dem Lumen. Er vereint sich mit der Ansicht Rothsteins, daß die Granula in der normalen Niere wie auf Fäden gezogen erscheinen; es dürften diese Bildungen den Heidenhain'schen Stäbchen entsprechen.

Bei seinen Untersuchungen über die Stäbchenstruktur in der Niere u. a. bei der Einwirkung der Diuretika kam Takaki<sup>9</sup> zu dem Schlusse, daß die Stäbchen in der normalen Zelle homogene Bildungen seien. Bei der Sekretion werden sie in körnchenhaltige Stäbchen und Körnchenreihen umgewandelt.

Betreffs der von Benda entdeckten sogenannten Mitochondria gibt es, was das Vorkommen und das Verhalten derselben in den Epithelien der Nierenkanälchen betrifft, bisher nicht viele Veröffentlichungen.

Mitochondria wird von Benda<sup>10</sup> „ein körniger Bestandteil des Zytoplasmas“ genannt, „der zum Teil mit früher beschriebenen Zytomikrosomen und Granulationen identisch ist, der sich aber durch seine eigenartige Stellung in der Architektur mehrerer Zellarten und durch sein Verhalten zu den verschiedenen Funktionsstrukturen der Zelle auszeichnet. Dieser Zytoplasmabestandteil befindet sich u. a. in mehreren Epithelien als zytoplasmatische Fäden und bildet zu-

sammen mit dem Zytoplasma während starker Vermehrung und Aufspeicherung Zellorgane, die Chondriomiten genannt werden. Zu den wichtigsten von diesen Chondriomiten gehören die Basalfilamente und Palisadenstruktur der Niere“.

Regaud<sup>11</sup> hat die Mitochondria in den Nierenepithelzellen untersucht und dabei meistens in einer Lösung fixiert, die aus 8 Vol. 3½ proz. Kal. bichrom.-Lösung und 2 Vol. reinem Formalin besteht, und mit Eisenhämatoxylin gefärbt.

Hirsch<sup>12</sup> hat bei seinen experimentellen Untersuchungen über die Nierenzelle hauptsächlich in Müller-Formol fixiert und mit Eisenhämatoxylin nach Heidenhain gefärbt. Er hat auch die Methode von Benda versucht, aber ohne Resultat. Er sagt, daß er mit derselben keine Körnchenfärbung erzielt hat. Durch seine Untersuchungen kommt er zum folgenden, soweit mir bekannt geworden, allein stehenden Schlusse:

„Die Granula gehen nicht aus den Heidenhainschen Stäbchen hervor. Sie stellen eine Umwandlung des Protoplasmas dar, bei der freilich auch die Stäbchen „zerbrechen“ bzw. schwinden.

Die Heidenhainschen Stäbchen möchten wir als Protoplasmaverdichtungen zwischen Flüssigkeitsströmen im Protoplasma ansprechen.“

Keine anderen bisher publizierten Arbeiten über die Mitochondria in den Nierenepithelzellen habe ich Gelegenheit zu sehen gehabt.

Untersuchungen über die Veränderungen in den Protoplasmastrukturen der Nierenepithelzellen während verschiedener Funktionsstadien sind in großer Menge publiziert, ich kann mich aber mit dem Referieren der obenerwähnten Arbeiten begnügen unter dem Hinweis auf die ausführliche Zusammenfassung über Arbeiten, die diesen Gegenstand behandeln, mit welcher Hirsch<sup>12</sup> seine Arbeit: „Experimentell-anatomische Untersuchungen an der Nierenzelle“ einleitet.

Auf Anregung und unter der Leitung des Herrn Professor Rud. Kolster fing ich im Herbst 1910 an zu untersuchen, ob man mittels der Mitochondriamethode von Benda Veränderungen in der Struktur der Epithelzellen in den Tubuli contorti der Niere nach der Einwirkung von Koffein oder Theocin nachweisen könnte.

Die Methode von Benda, welche ich genau befolgte, sowohl in der Fixierung als in der Färbung, zeigte sich etwas schwer, doch gelang es mir, mittels derselben recht schöne Präparate zu bekommen. Auch benutzte ich die Methode von Regaud (Fixierung in obenerwähnter Lösung von Regaud, worauf Chromierung während 14 Tage in 2 bis 3 % Kal. bichrom.-Lösung). Hierbei färbte ich mit Eisenhämatoxylin wie Regaud oder auch nach Benda. Mit dieser Methode bekam ich schönere Präparate als mit der Originalmethode von Benda. Wenn möglich noch schöneres Resultat gab die von Kolster<sup>1)</sup> neuerlich ausgearbeitete Methode. Da diese in manchen wichtigen Hinsichten sowohl von der Methode von Benda als von der von Regaud abweicht, finde ich es am besten, dieselbe etwas näher zu beschreiben.

Die absolut frischen Stückchen von dem zu untersuchenden Organ werden 24 Stunden in einer Mischung fixiert, die aus 2 Vol. reinem Formalin und 8 Vol. einer Wasserlösung, die 5 proz.

<sup>1)</sup> Mitochondria und Sekretion in den Tub. contorti der Niere. Festschr. f. Homöon. Ziegl. Beitr. Bd. 51, 1911.

Kal. bichrom. und 2proz. Chromalaun enthält, besteht. Hierauf sollen die fixierten Stückchen in die obenerwähnte Chromlösung übergeführt werden und hier 3 bis 4 Tage verweilen (lieber nicht länger, da die Präparate sonst leicht brüchig werden), worauf sie in rinnendem Wasser ausgewaschen werden. Das Wasser wird durch Alkohol wie gewöhnlich entfernt, worauf die Stückchen für Paraffineinbettung behandelt werden. Die mit Eiweißlösung aufgeklebten Schnitte werden mit Xylol von Paraffin befreit, nachher in Alkohol und Wasser wie gewöhnlich gebracht, worauf sie in obenerwählter Kal. bichrom.- und Chromalaun-Lösung 48 Stunden lang in einem Thermostat bei 37° C. stehen bleiben sollen. Sie werden dann in destilliertem Wasser abgespült und nachher hauptsächlich nach B e n d a behandelt. B e n d a läßt die Schnitte nur 24 Stunden in der Alizarin-Natron-Lösung stehen, die Bilder werden aber schöner, wenn sie in dieser Lösung etwa 3 Tage stehen bleiben. Die Entfärbung mit Essigsäure von 30 % muß mit großer Vorsicht vorgenommen werden. Ich habe es so gemacht, daß, wenn die Schnitte nach der Kristallviolettbehandlung mit Wasser abgespült sind, sie in die Säure eingetaucht werden, bis nicht mehr Farbe in sichtbarer Menge abgeht; die Schnitte werden ordentlich in destilliertem Wasser abgespült und unter dem Mikroskope untersucht. Die Kerne sollen rot und die Basalstruktur mit scharfen Umrissen erscheinen. Sind die Zellen noch diffus violett gefärbt, so werden die Präparate weiter in der Säure entfärbt, bis die Konturen deutlich werden. Ist die Entfärbung zu stark gewesen, so kann man mit dem Kristallviolettgemisch noch einmal färben. Die Schnitte sollen nach der Differenzierung mindestens eine halbe Stunde in destilliertem Wasser stehen, worauf sie zwischen Fließpapier gepreßt und in Azeton eingetaucht werden, um entwässert zu werden. Aus dem Azeton werden sie in Xylol übergeführt und in Balsam konserviert.

Es scheint, als wäre die Behandlung mit der Kal. bichrom.- und Chromalaun-Lösung von großer Bedeutung, da, wenn dieselbe auf obenerwähnte Weise gebraucht ist, die Präparate selten mißlungen sind. Die Färbung mit alizarinsulfosaurem Natron soll ziemlich stark sein, da die Differenz zwischen der Grundsubstanz und den Mitochondria dann schärfer wird. Vor der Konservierung in Balsam hat B e n d a früher die Schnitte mit Alkohol, Bergamottöl und Xylol behandelt. Der Alkohol ist an dieser Stelle sehr gefährlich, da das Präparat davon sehr schnell entfärbt wird. Dagegen bringt das von ihm später gebrauchte Azeton diese Gefahr nicht mit sich. Außerdem braucht man bei Azetonbehandlung nicht Bergamottöl anzuwenden.

Außer diesen Methoden habe ich des Vergleiches wegen die A l t m a n n s c h e Methode verwandt, auch in C a r n o y fixiert und nach S a u e r, B i o n d i - H e i d e n h a i n und mit Eisenhämatoxylin gefärbt. Bei dieser Untersuchung sind diese letzteren von untergeordneter Bedeutung gewesen.

#### N o r m a l e N i e r e (Fig. 1 und 2, Taf. V.).

An einem Querschnitt von Tubul. cont. einer normalen Kaninchenniere (Fig. 1), sieht man die Zellen mit scharf violett gefärbten Körnchen erfüllt, die als auf fadenartige Gebilde aufgereiht erscheinen. Außerdem sieht man hier und da auch Fäden die nicht deutlich segmentiert sind, diese werden aber meistens von den segmentierten verdeckt. Meines Erachtens sind diese Gebilde mit den sog. H e i d e n h a i n s c h e n Stäbchen absolut identisch. Diese Körnchenfäden stehen ziemlich vertikal gegen die Basalmembran, berühren diese jedoch nicht, sondern fangen auf einem kleinen Abstand davon an und strecken sich bis nahe an die Grenze des Bürstenbesatzes, dessen Konturen ziemlich deutlich gesehen werden. Der Raum zwischen den Fäden und dem Bürstenbesatz enthält verstreute größere und kleinere Granula, die ersichtlich durch den Zerfall der Körnchenfäden entstanden sind. Hier und da sieht man

Vakuolen von der Größe größerer Granula. Das Präparat von normaler Mäuseniere gibt ein ähnliches Bild (Fig. 2). Doch sind die Körnchen etwas größer als bei dem Kaninchen.

Hirsch<sup>12</sup> behauptet, daß die Granula und die Heidenhainschen Stäbchen nichts miteinander zu tun haben, sondern daß die Stäbchen nur „Protoplasmaverdichtungen zwischen Flüssigkeitsströmungen im Protoplasma“ seien. Ich bin doch der Ansicht, daß man durch die hier beschriebenen Methoden zu dem Schlusse kommen muß, daß die Granula aus diesen Stäbchen entstehen.

Takaki<sup>9</sup> sagt, daß die Stäbchen in einer normalen Niere homogene Bildungen sind, die bei Sekretion in körnchenhaltige Stäbchen und Körnchenreihen umgewandelt werden. Sezerniert denn eine normale Niere nicht? Die normalen Nieren, die ich untersucht habe, zeigen alle, daß der größte Teil von den Stäbchen oder Fäden deutlich segmentiert und körnchenhaltig ist.

#### Koffeinniere (Fig. 3, Taf. V).

Um die Einwirkung des Koffeins auf die obenerwähnten Gebilde zu untersuchen, wurde einem Kaninchen  $\frac{1}{2}$  ccm einer Lösung von

Coff. natr. salic.

Glyzerin

Aq. dest.  $\hat{a}\hat{a}$  5,0

subkutan injiziert, nach 3 Stunden wieder  $\frac{1}{2}$  ccm und schließlich wieder nach 3 Stunden 1 ccm. Darauf wurde das Tier nach  $1\frac{1}{2}$  Stunden getötet. Aus den Nieren wurde gleich eine genügende Anzahl kleiner Stücke genommen, die sogleich fixiert wurden.

Das Präparat von einer Koffeinniere (Fig. 3, Taf. V) zeigt ein ganz anderes Bild als die normale Niere. Das Lumen der Tub. cont. ist etwas größer als in der normalen Niere, der Bürstenbesatz ebenso deutlich sichtbar. Die hauptsächlichste Veränderung zeigt der Zellinhalt. Der basale Teil der Zellen, der in normaler Niere von körnchenhaltigen Fäden eingenommen wird, ist hier von einer Masse dicht nebeneinander stehender zum größten Teil homogener Fäden oder Stäbchen gefüllt, die in ziemlich kleinen Maßen im Verhältnis zur Dicke und Länge variieren, aber im allgemeinen kürzer erscheinen als die körnchenhaltigen Fäden in normaler Niere, d. h. sie strecken sich nicht so nahe an den Bürstenbesatz. Man sieht auch körnchenhaltige Fäden, diese sind aber zum größten Teil zwischen den nicht körnchenhaltigen versteckt. Es scheint, als wäre eine bedeutende Vermehrung dieser Basalfilamente geschehen. Der Raum zwischen diesen Fäden und dem Bürstenbesatz ist um den ganzen Kanal von isolierten Körnchen erfüllt, die überhaupt kleiner erscheinen als die Körnchen in normaler Niere. Doch gibt es auch hier verstreute größere Granula. Die Anzahl der isolierten Körnchen ist bedeutend größer als in normaler Niere. Vakuolen sieht man hier und da näher dem Lumen. Beinahe alle Tub. cont. zeigen solche Veränderungen.

#### Theocinniere (Fig. 4 und 5, Taf. V).

Für die Untersuchung von der Einwirkung des Theocins wurde einem Kaninchen viermal täglich während 2 Tage  $1\frac{1}{2}$  ccm von

Theocin natr. acet. 3,0

Aq. dest. 150,0

per Magensonde

gegeben, worauf es 1 Stunde nach der letzten Dosis getötet wurde.

Auf dieselbe Weise wurde einer Maus während eines Tages viermal  $\frac{1}{2}$  ccm gegeben und das Tier  $\frac{1}{2}$  Stunde, nachdem es den letzten Satz bekommen hatte, getötet.

Die Präparate von diesen Nieren sowohl von dem Kaninchen (Fig. 4, Taf. V) als von der Maus (Fig. 5, Taf. V) zeigen Bilder, die sehr stark an die Koffeinniere erinnern.

Das Lumen ist etwas vergrößert im Vergleich zu der normalen Niere. Der Bürstenbesatz unverändert. An dem Zellinhalt werden ungefähr dieselben Veränderungen wie bei der Koffeinniere gesehen. Doch ist die Anzahl der körnchenhaltigen Fäden etwas größer. Die Anzahl der isolierten Granula ist bedeutend größer als in der normalen Niere. Vakuolen gibt es wie in den andern Nieren. Auch hier sieht man so gut wie alle Tub. cont. verändert.

Mit der Altmannschen Granulamethode habe ich hauptsächlich analoge Bilder bekommen, sie sind aber nicht so scharf und deutlich als die Präparate, die ich mit der Methode von Kolster bekommen habe.

Es scheint mir, als könnte man von diesen Veränderungen an den mitochondrialen Gebilden in den Tub. cont. bei der Einwirkung von Koffein und Theocin zu dem Schlusse kommen, daß diese Diuretika einen direkten Einfluß auf dieses Epithel haben. Ich will doch nicht näher auf diese Frage eingehen, da es meine Absicht gewesen ist, nur die histologischen Veränderungen zu beschreiben, die ich durch Mitochondria-Methoden in den Epithelzellen der Tub. cont. bei der Einwirkung obenerwähnter Diuretika habe nachweisen können.

### Literatur.

1. v. Schröder, Über die Wirkung des Koffeins als Diuretikum. Arch. f. exp. Path. Bd. 22, 1886. — 2. Rüdel, Über den Einfluß der Diurese auf die Reaktion des Harns. Arch. f. exp. Path. Bd. 30, 1892. — 3. v. Sobieranski, Über die Nierenfunktion und die Wirkungsweise der Diuretika. Arch. f. exp. Path. Bd. 35, 1895. — 4. Derselbe, Weitere Beiträge zur Nierenfunktion und Wirkungsweise der Diuretika. Arch. f. d. ges. Phys. Bd. 98, 1903. — 5. Sauer, Neuere Untersuchungen über das Nierenepithel und sein Verhalten bei der Harnabsonderung. Arch. f. mikrosk. Anat. Bd. 46. — 6. Hellin und Spiro, Über Diurese. Die Wirkung von Koffein und Phloridzin bei artefizieller Nephritis. Arch. f. exp. Path. Bd. 38, 1897. — 7. Löwi, Fletscher und Henderson, Untersuchungen zur Physiologie und Pharmakologie der Nierenfunktion. III. Mitteilung. Über den Mechanismus der Koffeindiurese. Arch. f. exp. Path. Bd. 53, 1905. — 8. Modrakowski, Weitere Beiträge zur Nierenfunktion. Arch. f. d. ges. Phys. Bd. 98, 1903. — 9. Tabaki, Über die Stäbchenstrukturen der Niere. Arch. f. mikr. Anat. Bd. 70, 1907. — W. Benda, Mitochondria. Enzyklop. d. mikr. Technik, 2. Aufl., Bd. 2, 1910. — 11. Regaud, Variations des formations mitochondriales dans les tubes à cuticule striée du rein. Compt. rend. de la soc. d. biol. 1908. — 12. Hirsch, Experimentell-anatomische Untersuchungen an der Nierenzelle. Anat. Hefte I. Abt. 123/124. H. (41. Bd., H. 1/2). 1910.

### Erklärung der Abbildungen auf Taf. V.

Fig. 1. Tub. cont. der normalen Kaninchenniere. Fixierung und Färbung nach Kolster.

Fig. 2. Tub. cont. der normalen Mäuseniere. Fixierung nach Regaud, Färbung nach Kolster.

