

(Aus der II. Medizinischen Universitätsklinik in Wien. — Vorstand: Professor Dr. N. Ortner.)

Zur färberischen Darstellung bestimmter Kanälchenabschnitte in der Niere.

Von

E. Lauda und Ph. Rezek.

Mit 11 Textabbildungen.

(Eingegangen am 7. März 1928.)

Unsere Kenntnisse über die Physiologie der Harnbereitung sind in vieler Hinsicht lückenhaft. Ganz abgesehen von zum Teil noch ungeklärten extrarenalen Einflüssen erscheint vor allem die Frage nach den Teilleistungen der einzelnen Nierenabschnitte nicht endgültig gelöst; es gilt dies ebenso für den glomerulären und tubulären Apparat überhaupt, wie für die verschiedenen Abschnitte des Kanälchensystems im besonderen. Es ist in jüngster Zeit mehrfach versucht worden, den letzteren verschiedene Teilleistungen zuzusprechen, eindeutig beweisendes Material konnte aber bisnun nicht beigebracht werden. Bei der Unsicherheit der in Rede stehenden Frage erscheint uns jeder neue Beitrag mitteilenswert, der irgendeinen sicheren Anhaltspunkt zur Unterscheidung bestimmter Harnkanälchenabschnitte liefert, wenn sich hierbei auch vorläufig unmittelbare Schlüsse hinsichtlich ihrer Leistung nicht ergeben. Wir berichten im folgenden über einen derartigen histologischen Befund, dessen Auffindung wir einem Zufall verdanken.

Bei vergleichenden Knochenmarksstudien verschiedener Laboratoriumstiere benutzten wir auf Anraten Prof. *Kolmers*¹ die *da Fanosche* Versilberungsmethode zur Darstellung der Sinus. Da die ersten Färbungen am Knochenmark nicht gelangen, versuchten wir diese Methode, die der Darstellung des Golgischen Binnennetzapparates der Zelle dient, an den verschiedensten Organen einer weißen Ratte, auch an der Niere. Hierbei ergab sich nun der merkwürdige Befund, daß sich im Nierenparenchym, und zwar insbesondere in den Rindenabschnitten ein Teil der Tubuli stark mit Silber imprägniert, ein anderer Teil ungefärbt blieb. Eine auch nur flüchtige Betrachtung der Schnitte, in welchen sich die gefärbten Kanälchen, zumal in der Rinde, ziemlich gleichförmig

¹ Wir möchten Herrn Professor *Kolmer* auch an dieser Stelle unseren verbindlichsten Dank für seine freundlichen Ratschläge aussprechen.

verteilen, ließ mit großer Wahrscheinlichkeit vermuten, daß es sich hier um eine regelmäßige Anfärbung bestimmter Anteile des tubulären Apparates handle. Ein genaueres Studium der Frage bestätigte diese Vermutung.

Die *da Fanosche* Technik ist die folgende:

Fixation durch 9—20 Stunden je nach Stückgröße in der folgenden Lösung: Kobaltnitrat 1,0, 40proz. Formol 15,0, Aqua destill. 100,0. Kurzes Wässern. Übertragen der Stücke in eine 1—2proz. Silbernitratlösung für 12—24 Stunden. Kurzes Auswaschen in destilliertem Wasser, Übertragen der Stücke in eine Hydrochinonlösung folgender Zusammensetzung: Hydrochinon 2,0, 40proz. Formalin 6,0,



Abb. 1.

Aqua destillata 100,0, wasserfreies Natr. sulfid 0,15—0,25. Die Stücke verbleiben 2—24 Stunden in dieser Lösung. Entwässern in 95proz. Alkohol, Paraffineinbettung, Entparaffinieren der Schnitte, Einschließen in Canadabalsam. Nach eigenen Erfahrungen ist das Wässern nach der Fixation der Silbernitrateinwirkung, sowie der Zusatz von Natriumsulfid zur Hydrochinonlösung für unsere Zwecke nicht notwendig. Die Fixationsdauer muß mindestens 6 Stunden betragen, sie kann aber auch 20 Stunden ohne Schaden übersteigen. Man muß sich hinsichtlich der Silbernitrat- und Hydrochinonkonzentration nicht genau an die obige Vorschrift halten. Es erwies sich aber ein Übersteigen einer 5proz. Konzentration bei beiden Lösungen als nachteilig. Bei zu dicken Stücken des Gewebes bleiben die zentralen Teile oft ungefärbt. Gegenfärbungen mit Hämatoxylin-Eosin, Lithioncarmin, Thionin A gelingen, wenn man den entparaffinierten Schnitt vorher mit Goldchloridlösung und Thiosulfat behandelt (Abb. 1).

Ehe wir auf den Befund selbst eingehen, seien zur leichteren Verständigung einige Bemerkungen über die Histologie der normalen Niere

des Säugetieres, vor allem über die Bezeichnung der einzelnen Kanälchenabschnitte vorausgeschickt, wobei wir im wesentlichen den Angaben *Peters*¹ folgen (s. Abb. 2). Dieser unterscheidet:

1. Das Hauptstück, und zwar a) eine Pars convoluta (corticalis) (1)
b) eine Pars medullaris (recta) (2).
2. Die Henlesche Schleife, und zwar einen hellen dünnen } (3)
einen trüben dicken } Anteil (4)
einen hellen dicken } (5)
3. Das Schaltstück, und zwar a) das Zwischenstück (6)
b) das eigentliche Schaltstück (7).
4. Die Sammelrohre (8).

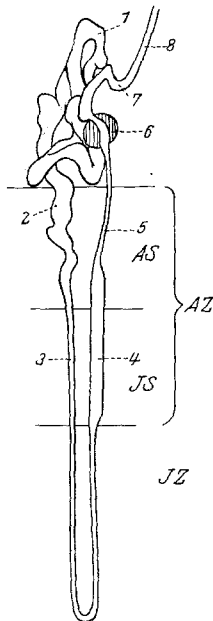


Abb. 2.

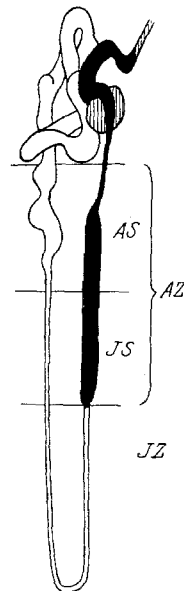


Abb. 3.

Peter unterscheidet ferner eine Rinden- und eine Markschicht, welche letztere in eine Innen- (J 7) und Außenzone (A 7) zerfällt. Ihre Grenze ist durch die untersten Anteile der langen, dicken Schleifen gegeben. In der Außenzone unterscheidet er einen Außen- (AS) und Innenstreifen (JS).

Die Beantwortung der Frage, welcher der Abschnitte des *Peter*-schen Schemas das Substrat der nach der obigen Methode imprägnierten Schlingen abgibt, bot anfänglich nicht unerhebliche Schwierigkeiten, wir konnten aber schließlich, wie wir glauben, einwandfrei feststellen, daß sich nur die Abschnitte 4, 5, 6 und 7, also die dicken Anteile der Henleschen Schleife, das Zwischenstück und Schaltstück mit Silber imprä-

¹ *Peter*, Untersuchungen über den Bau und die Entwicklung der Niere. Jena: Fischer 1909.

nieren, die Hauptstücke und die dünnen Anteile der Henleschen Schleife aber ungefärbt bleiben (s. Abb. 3). Als Beweis für diese Behauptung seien die folgenden histologischen Einzelbilder und die folgenden Überlegungen angeführt:

Das Mikrophotogramm (Abb. 4) stellt einen Schnitt einer Kaninchen-niere vom Übergang der Innen- in die Außenzone dar. Wir finden hier den untersten Abschnitt der schwarz angefärbten Kanälchen. Daß es sich hier tatsächlich unserer Annahme zufolge um den Anfangsteil des aufsteigenden dicken Schleifenschenkels handelt, geht in überzeugender Weise daraus hervor, daß sich einerseits die dunkel gefärbten

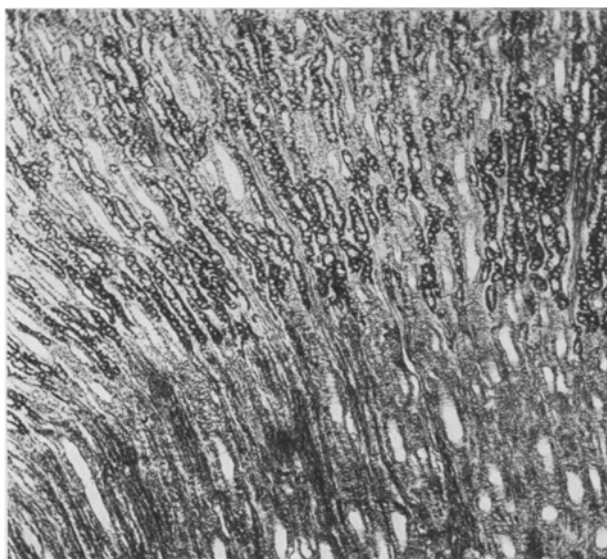


Abb. 4.

Abschnitte in fast linienförmiger Begrenzung gegen die ungefärbten Anteile absetzen und wir andererseits wissen, daß sich die Anfangsteile der Henleschen dicken Schleifenanteile in gleicher Weise scharf begrenzen. Wir haben beim Kaninchen lange und kurze Schleifen zu unterscheiden; bei jenen liegt der Scheitel im Bereiche des dünnen Anteiles, in einer bestimmten Höhe des aufsteigenden Schenkels ändert sich das Epithel, aus dem dünnen entsteht der dicke Schenkel, und diese Umschlagstelle liegt bei den langen Schleifen ausnahmslos in gleicher Höhe, so daß die oben beschriebene und die nebenstehend abgebildete linienförmige Abgrenzung entsteht. Abb. 5 zeigt die Verhältnisse bei stärkerer Vergrößerung. Das folgende Übersichtsbild (Abb. 6), welches einem Markstrahle entspricht, läßt mit Sicherheit erkennen, daß die dunkel

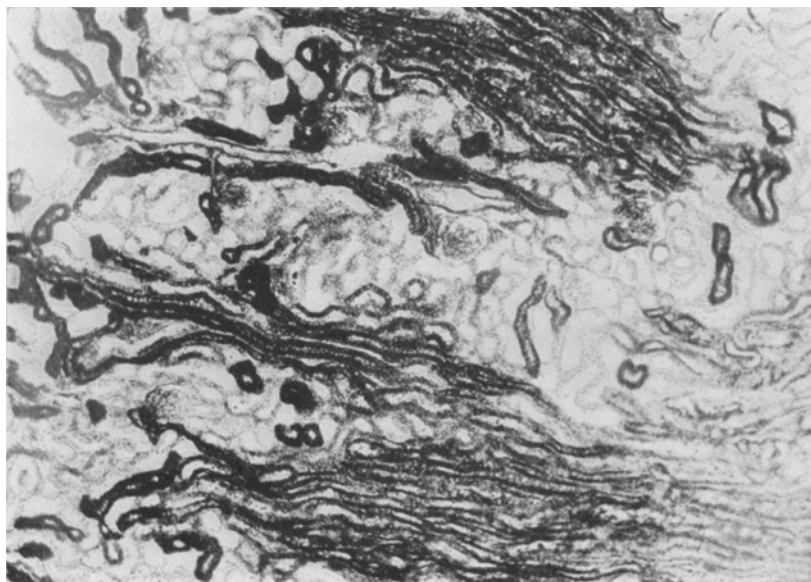


Abb. 6.

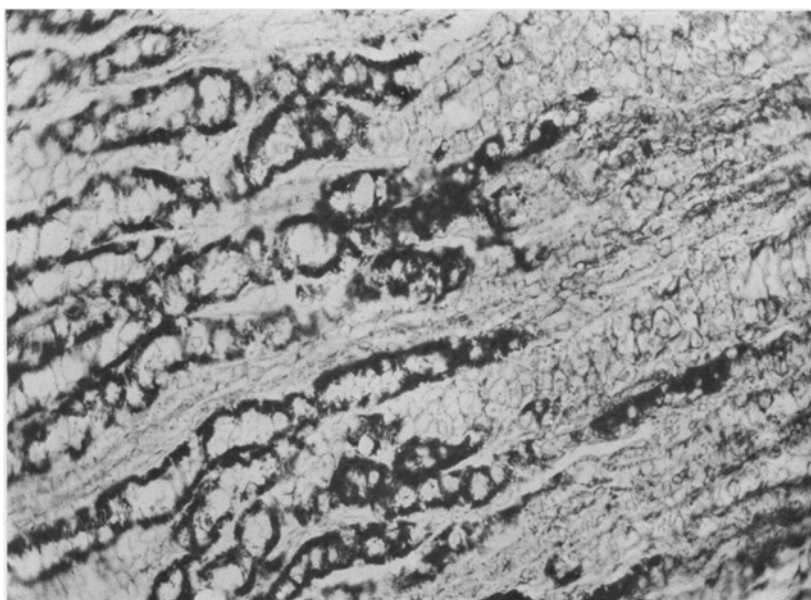


Abb. 5.

angefärbten Kanälchen in fast geradem Verlauf nach aufwärts ziehen. Es könnte sich in den Markstrahlen um die absteigenden Sammelrohre oder um die aufsteigenden Henleschen Schleifen und Anfangsteile der Schaltstücke handeln. Abgesehen davon, daß wir aus den weiteren Abbildungen tieferer Kanälchenabschnitte eindeutig werden zeigen können, daß sich die Sammelrohre mit Silber beladen, kann aus der



Abb. 7.

feineren Histologie dieser Bezirke der Nachweis geführt werden, daß es sich hier um die imprägnierten aufsteigenden Schenkel handelt (siehe Abb. 7). In diesen Abbildungen sehen wir, daß die hohen Epithelien der dunkel gefärbten Kanälchen peripherwärts bei gleichzeitiger Veränderung des Lumens der Kanälchen niedriger werden. Es geht dies übrigens auch aus der Abb. 6 bei schwacher Vergrößerung schon deutlich hervor. *Peter* hebt bei Besprechung der aufsteigenden Schleifenschenkel und seines Überganges zum Schaltstück (Zwischenstück) ausdrücklich hervor,

daß der aufsteigende Schenkel vor dem Übergang in das Zwischenstück dünner wird. Sein Kaliber wird, vorerst noch von hohen Zellen begrenzt, kleiner, weiterhin wird das Epithel niedriger, bis es eine schmale Begrenzung des jetzt wieder etwas weiteren Lumens bildet; alsbald wechselt auch der Durchmesser des Lumens, es wird enger und kann sogar stellenweise bandartig abgeplattet erscheinen. In Abb. 7 sieht man neben zwei noch von hohem Epithel begrenzten Kanälchen einen schmalen, von niedrigem Epithel ausgekleideten Tubulus und man kann — es ist dies in der Abbildung nicht mehr ersichtlich — dieses Kanälchen nach oben zum Übergang des Zwischenstückes verfolgen. Es ist kein Zweifel, daß wir es hier mit den obersten Anteilen des aufsteigenden dicken Schenkels zu tun haben. Derartige Bilder lassen sich naturgemäß nur bei entsprechender, die Längsrichtung der Kanälchen treffender Schnittführung, hier aber mit großer Regelmäßigkeit nachweisen. Beim Vergleich einer größeren Anzahl derartiger Stellen kann man sich überzeugen, daß der rückläufige Schenkel der Henleschen Schleife die eigentümlichen Verschiedenheiten hinsichtlich Form, Lumen und Zellbegrenzung aufweist, wie sie *Peter* beschrieben hat.

Der rückläufige Schenkel strebt weiter nach aufwärts, nähert sich dem Glomerulus und legt sich diesem schließlich an. Hierbei erfährt das Kanälchen vorerst eine Verengung seines Lumens, auf die eine Verbreiterung folgt, wie dies Abb. 8 zeigt. *Peter* hat sichergestellt, daß diese Verbreiterung nicht, wie *Schweigger-Seidel*¹ gemeint hat, eine spindelförmige ist, sondern daß sich das Kanälchen nur in einer Richtung stark verbreitert, in der darauf senkrechten aber bedeutend abplattet („löffelartig dem Glomerulus aufliegende Verbreiterung“, *Peter*). Unsere Abb. 8 zeigt diese Verhältnisse, wie wir glauben, in recht anschaulicher Weise und gibt uns ebenso wie eine Reihe entsprechender Beobachtungen einen weiteren Beweis, daß wir uns in der Gleichstellung dieses angefärbten Anteiles mit dem obersten rückläufigen Schenkel der Henleschen Schleife bzw. mit dem Zwischenstück am richtigen Wege befinden.

In der Höhe der Glomeruli und auch rindenwärts finden wir schließlich kurze, stark angefärbte Kanälchen, die ihrem Lumen, ihrer Größe und ihrem Epithel nach als Schaltstücke anzusprechen sind. An entsprechenden Stellen kann man auch gelegentlich den unmittelbaren Übergang der Zwischenstücke in die Schaltstücke verfolgen. Eine scharfe Grenze gegenüber den Sammelröhren ist nach *Peter* nicht festzustellen und in unseren Präparaten auch nicht zu finden. Abb. 9 zeigt bei starker Vergrößerung Sammelrohre; sie zeigen keine Silberimprägnierung.

Auf Grund unserer Erfahrungen an einem sehr großen Material erscheint somit kein Zweifel, daß mit der oben angeführten Impräg-

¹ Angeführt nach *Peter*.

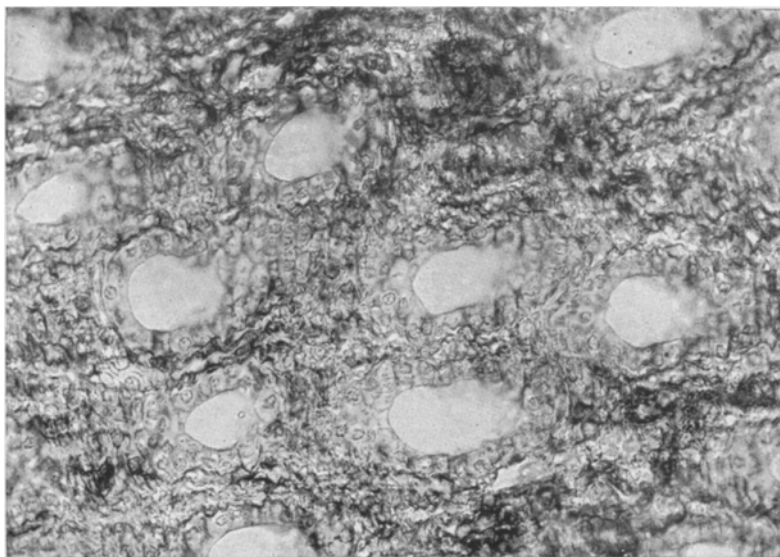


Abb. 9.

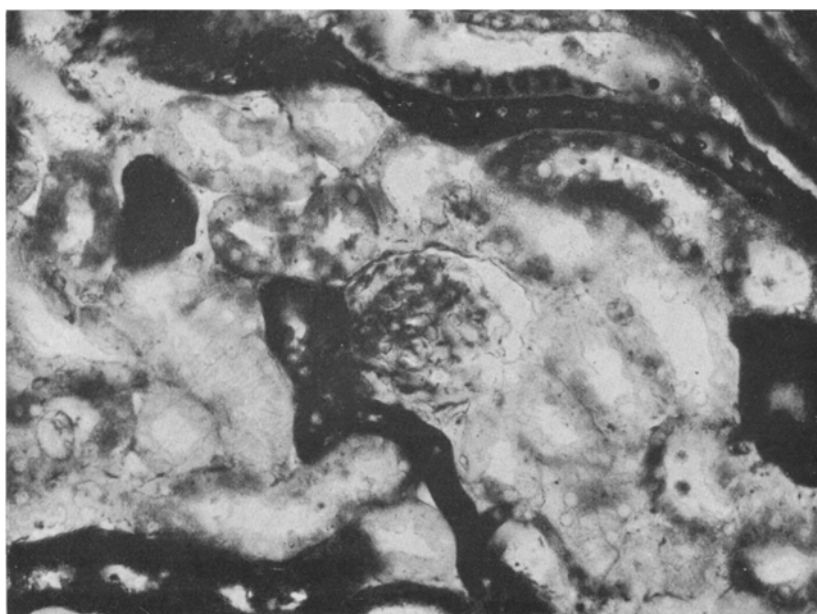


Abb. 8.

nierungstechnik eine sichere Unterscheidung zwischen Hauptstück, Sammelrohren und dünnen Henleschen Schleifen einerseits und aufsteigenden dickem Schleifenschenkel, Zwischen- und Schaltstück andererseits getroffen werden kann. Die Nichtimprägnierung der dünnen Henleschen Schleifen geht aus den beigegebenen Abbildungen mit Sicherheit nicht hervor, wir konnten sie aber an der Hand unserer Präparate einwandfrei feststellen.

Der Versuch, unseren Befund auch durch das Verfolgen bestimmter Kanälchen in Reihenschnitten sicherzustellen, scheiterte. Es erwies sich als unmöglich, sich in dem wirren Bild der sich überschneidenden Kanälchen zurecht zu finden. Die Tubuli liegen so außerordentlich nahe beieinander, daß es uns, wie dies ja auch schon *Peter* in anderem Zusammenhang betont hat, in den Reihen nicht gelang, die entsprechenden Schnittbilder wieder richtig zusammenzufinden.

Die Stärke der Silberimprägnation kann eine verschiedene sein. Wir haben hierbei einerseits Verschiedenheiten in verschiedenen Präparaten, andererseits solche im gleichen Präparat zu berücksichtigen. Was die ersten anbelangt, so lassen sich diese aus der Färbetechnik allein erwarten; je nach dem Grade der Reduktion werden sich verschiedene Bilder ergeben. Grundsätzliche Unterschiede zwischen den einzelnen Präparaten bestehen hierbei aber nicht. Hinsichtlich der verschiedenen starken Silberimprägnierung im gleichen Schnitt erscheint uns aber der folgende Umstand bemerkenswert und wichtig: Es kann als Regel bezeichnet werden, daß sich die in unseren Präparaten dunkel erscheinenden Abschnitte in der Nierenrinde, speziell am Zwischenstück und Schaltstück viel stärker anfärben als der übrige aufsteigende Schleifenschenkel; während diese beiden Abschnitte zumeist dunkelbraun oder auch schwarz erscheinen, weisen die aufsteigenden dicken Schenkel der Henleschen Schleife im allgemeinen nur einen braunen Farbenton auf. Bei allzu schwacher Silberimprägnierung des Präparates kann diese Braunfärbung sogar so geringfügig sein, daß nur der Geübte die differentielle Färbung gegenüber den Sammelrohren zu erkennen vermag. Dieser Befund erscheint uns unter Hinblick auf die Streitfrage zwischen *Peter* und *Policard*¹ bemerkenswert; während nämlich *Peter* auf Grund der Verschiedenheit des Epithels, des Lumens usw. zwischen dickem trübem, dickem hellen Anteil der Henleschen Schleife und zwischen Zwischenstück und Schaltstück unterscheidet, unterscheidet *Policard* am ganzen Kanälchenapparat der Niere insgesamt nur drei Anteile, und zwar das Hauptstück, den dünnen Teil der Henleschen Schleife und schließlich den dicken Schleifenschenkel mit dem Schaltstück. Unser Befund entspricht also einerseits *Policards* Auffassung insofern, als in unseren Präparaten

¹ *Policard*, Cpt. rend. d. l'assoc. des anat. **14**. Rennes 1912; Ann. d. l'anat. micr. **12**. 1910.

gerade nur *Policards* dritter Abschnitt imprägniert ist, er scheint aber auch *Peter* insofern recht zu geben, als die verschieden starke Anfärbbarkeit der einzelnen Abschnitte eine weitere Unterscheidung dieses dritten Anteils von *Policard* nahelegt.

Vom Grade der Silberimprägnierung hängt es ferner noch ab, ob die Epithelzellen der Kanälchen im ganzen und diffus schwarz erscheinen, ob sie nur eine schwarze Körnelung aufweisen oder ob schließlich die Kerne als Aussparungen sichtbar werden. Die Bilder, in welchen infolge dieser Aussparungen der Kern als heller Fleck erscheint, machen es übrigens wahrscheinlich, daß die Imprägnierung ausschließlich den Zelleib betrifft und der Kern in dem diffus schwarz erscheinenden Zellen durch Überlagerung mit Silberniederschlägen überdeckt wird.

Es muß schließlich noch hervorgehoben werden, daß die Darstellung der genannten Röhrenanteile mit der obigen Methode zwar regelmäßig gelingt, daß aber die oben geschilderten Verhältnisse nur bei günstiger Schnittführung und bei entsprechend starker Anfärbung ohne weiteres deutlich in Erscheinung treten. In Horizontalschnitten z. B. wird man die oben gebrachten Beläge für die Identifizierung der schwarz gefärbten Schlingen nicht beibringen können. Wir haben auch früher schon darauf hingewiesen, daß bei schwacher Imprägnierung die sonst braun erscheinenden aufsteigenden dicken Schleifenschenkel sich färberisch kaum von den leicht gelben Sammelrohren unterscheiden. Hierzu kommt noch, daß gelegentlich in den äußersten Rindenteilen ebenso wie in den dem Nierenbecken nahen Abschnitten das charakteristische Bild durch diffuse Niederschläge stark verwischt werden kann.

Die Methode der Darstellung dieser Kanälchenabschnitte wurde am Kaninchen, an der weißen Ratte, der weißen Maus, am Hund, am Rind und am Menschen versucht. Abb. 10 zeigt bei schwächerer Vergrößerung einen Schnitt der Hundeniere. Wie auch diese Abbildung zeigt, wurden regelmäßig grundsätzlich gleiche Imprägnierungsverhältnisse aufgedeckt. Auch die Taube wurde in den Kreis unserer Untersuchungen gezogen; die Verhältnisse liegen hier nicht ganz eindeutig und bedürfen noch einer eingehenderen Untersuchung.

Was besonders die Menschennieren anbelangt, so verfügen wir nicht über einwandfreie Präparate normaler Nieren. Der Grund hierfür ist der folgende:

Die Darstellung der aufsteigenden dicken Schenkel der Henleschen Schleife, des Zwischen- und Schaltstückes gelingt nach der obigen Technik in schöner Weise nur am lebenswarm fixierten Material, wie wir uns in einer größeren Versuchsreihe an Mäusen und Ratten überzeugen konnten. Tötet man ein Versuchstier, läßt es liegen und fixiert die Niere erst nach 1—2 Stunden, so kann man nach dieser verhältnismäßig kurzen Zeitspanne sehr häufig eine bereits sehr mangel-

hafte Imprägnierung beobachten, obwohl im Hämalaun-Eosin-Präparat wesentliche Leichenveränderungen noch nicht feststellbar sind. Die mangelhafte Imprägnierung äußert sich entweder darin, daß sich nur einzelne Zellen eines Kanälchens schwarz anfärben, andere ungefärbt bleiben oder daß sogar ganze Abschnitte die verschiedene Färbung nicht angenommen haben. Immerhin kann man nach dieser kurzen Zeit, manchmal sogar noch nach Abliegen durch 10—12 Stunden sehr gute Bilder erhalten, nach längerer Zeit (24 Stunden) hingegen werden die Präparate unbrauchbar. Die schweren autolytischen Veränderungen am Nierenparenchym sind hier deutlicher als bei Hämalaun-Eosin-

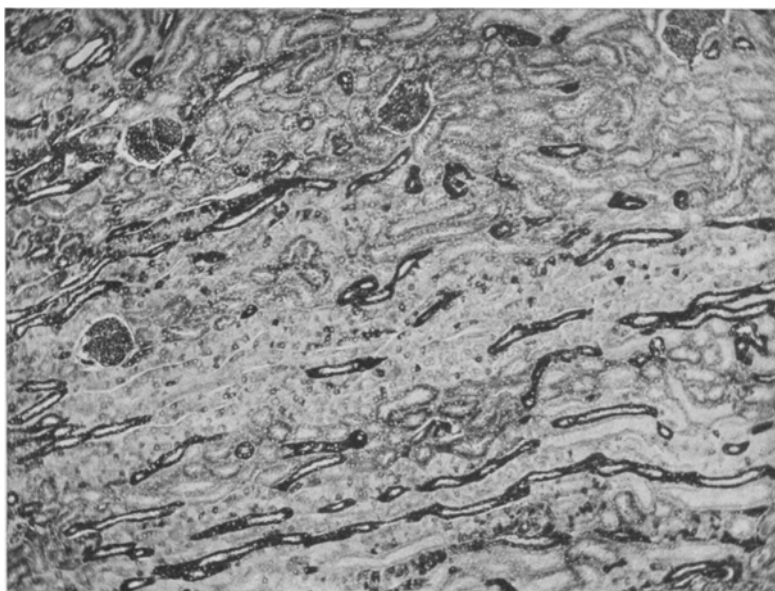


Abb. 10.

Präparaten. Autopsiematerial des Menschen eignet sich aus diesem Grunde für unsere Zwecke nicht. An Nierenstückchen, die durch Nephrektomie gewonnen worden waren¹, konnten wir uns aber überzeugen, daß grundsätzlich gleichartige Bilder, wie wir sie bei Versuchstieren erhalten hatten, auch beim Menschen gewonnen werden können, wie die Abb. 11 zeigt, in welcher neben ungefärbten Hauptstücken stark imprägnierte Zwischen- und Schaltstücke zu sehen sind. Die Bilder, die wir in 3 Fällen an Nephrektomiematerial erhielten, sind allerdings nicht in allen Rindenabschnitten ausgezeichnet. In einem Falle versagte die Methode sogar vollständig; ob hierfür bestimmte krankhafte

¹ Herrn Primarius Dr. R. Th. Schwarzwald, möchten wir für die lebenswürdige Überlassung des Materials an dieser Stelle unsern besten Dank sagen.

Veränderungen am Nierenparenchym, ob die Stauung der Niere bei der Nephrektomie maßgebend sind, kann erst an einem größeren Material entschieden werden.

Nachdem der obige Befund an zahlreichen Nieren mit Regelmäßigkeit erhoben war, versuchten wir auch das Wesen der eigentümlichen Imprägnierung der bestimmten Kanälchenabschnitte näher zu ergründen. Hierbei galt es vor allem festzustellen, welche der in die Reaktion eintretenden Chemikalien zum Gelingen der Färbung unbedingt notwendig sind. Es ergab sich hierbei vorerst, daß das Kobalt-

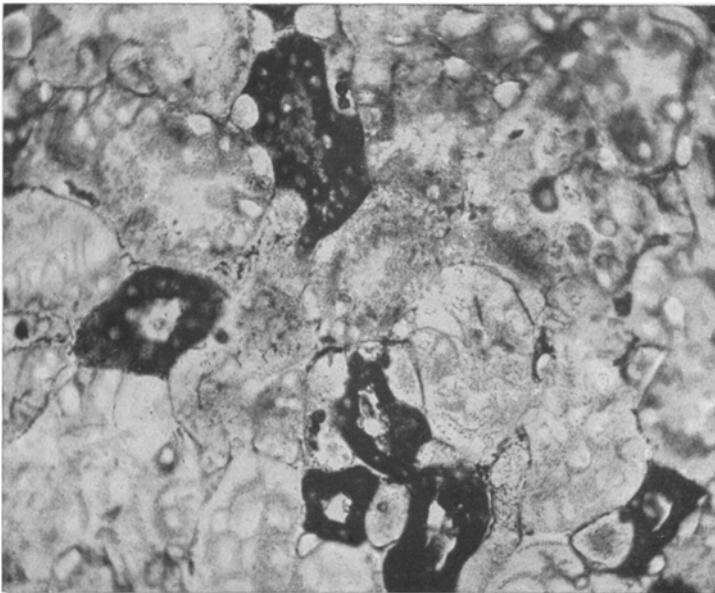


Abb. 11.

nitrat der Fixierungsflüssigkeit jedenfalls keinen unentbehrlichen Bestandteil der Reaktion bildet und daß höhere Kobaltnitratkonzentrationen, ebenso wie länger dauerndes Einwirken einer 1proz. Kobaltnitratlösung allein, vor Fixation mit Formalin, das Gewebe schwer schädigt und das Auftreten der Reaktion verhindert. Die entsprechende Versuchsanordnung war die folgende:

a) Nierenstückchen einer weißen Ratte wurden im lebenswarmen Zustande für 5 Minuten in eine 1proz. Kobaltnitratlösung gebracht und hierauf in Formalin eingetragen; im übrigen wurde die Reaktion nach der Originalmethode fortgesetzt. Es ergeben sich gleichartige mikroskopische Bilder wie bei der Originalmethode.

b) Nierenstücke einer weißen Ratte wurden im lebenswarmen Zustande für 30 Minuten in eine 1proz., für 5 oder für 30 Minuten in eine 20proz. Kobalt-

nitratlösung eingebracht und hierauf in Formalin übertragen. Weiteres Vorgehen nach der Originalvorschrift. Es fanden sich in den Schnitten schwere degenerative Veränderungen des Nierenparenchyms, isolierte Imprägnierungen bestimmter Kanälchenabschnitte waren an keiner Stelle des Präparates zu finden.

c) Die Fixierung wird nur mit Formalin durchgeführt. Kobaltnitrat gelangt nicht zur Anwendung. Diese Abänderung wurde sowohl an Ratten als auch an Kaninchen und Hunden erprobt. Es wurden zumeist ausgezeichnete Färbungsergebnisse erhalten, die Färbung versagte aber manchmal aus bisher nicht bekannten Gründen besonders im Bereiche der Markstrahlen. Leichte Ansäuerung des Formols mit verdünnter Essigsäure ebenso wie leichte Alkalisierung desselben mit Calcium carbonicum störte die Imprägnierung.

Da sich also Formalinfixierung ohne Zusatz von Kobaltnitrat als ausreichend erwies, wurde versucht, das Formalin durch andere Fixierungsmittel zu ersetzen: Fixierung mit Zenkerscher Lösung verhinderte die Imprägnierung in mehreren Versuchen an Ratten vollständig. Ebenso erwies sich die Fixierung mit 96proz. Alkohol als unbrauchbar. Verwendung von Müller-Formol hatte das überraschende Ergebnis, daß zumeist die Kerne sämtlicher Harnkanälchen deutlich schwarz gefärbt erschienen, das Protoplasma dagegen nur einen leicht bräunlichen Farbton aufwies; ein Unterschied zwischen Hauptstück und Schaltstück war nicht zu sehen. Es war auch auffallend, daß sich in einzelnen Präparaten dieser Versuchsreihe nicht die Kerne sämtlicher Kanälchenepithelien, sondern nur die der Zwischenstücke und Schaltstücke imprägnierten; auch in diesen Schnitten war der Zelleib nicht imprägniert. In nicht fixierten Gefrierschnitten schließlich, welche sofort in die Silberlösung gebracht und im übrigen nach der Originalmethode behandelt wurden, erwies sich kein Abschnitt der Tubuli als imprägniert.

Wir können daher zusammenfassend sagen, daß *zum Gelingen einer einwandfreien Färbung Formolfixation unerlässlich ist* und daß der Zusatz von Kobaltnitrat zum Formalin die Aussichten für ein gutes Gelingen der Färbung etwas erhöht.

Die Frage, ob die Imprägnierung bestimmten protoplasmatischen Strukturen entspricht, konnte a priori abgelehnt werden, da es sich in unseren Präparaten fast regelmäßig um diffuse Schwarzfärbungen handelte. Nur in einigen Präparaten, in welchen eine schwarze Körnelung aufgetreten war (siehe oben), hatte man gelegentlich den Eindruck, eine ähnliche Anordnung der Granula zu Stäbchen zu erkennen, wie sie den Altmann-Granulis zukommt. Es ist bekannt, daß in den Kanälchenabschnitten, welche sich nach unserer Methode imprägnieren, gerade das Schaltstück die am dichtesten gelagerten Stäbchen besitzt, womit die Tatsache in Einklang gebracht werden könnte, daß sich gerade diese Abschnitte nach unserer Färbung am stärksten darstellen, sofern nämlich die Silberimprägnierung sich an die protoplasmatische Stäbchenstruktur hält. Wir müssen aber betonen, daß das kurze Zwischenstück dem Schaltstück an Stärke der Schwarzfärbung zumeist nicht nachsteht und daß dieser Tubulusabschnitt keine oder fast keine Altmann-Granula aufweist. Eine noch so starke Anfärbung der Altmann-Granula in den Schaltstücken würde übrigens noch immer keine befriedigende Erklärung für die zumeist gesehene, starke, diffuse Schwarzfärbung

dieser Abschnitte abgeben. Die bekannten protoplasmatischen Strukturen der Harnkanälchen können demnach das Substrat der Färbung nicht abgeben. Es handelt sich scheinbar vielmehr um Niederschläge am formolfixierten Protoplasma, die dasselbe je nach ihrer Dichte teilweise oder vollständig ausfüllen.

Woraus bestehen nun die Niederschläge und wie kommen sie zustande? Es ist wohl kein Zweifel, daß bei der beschriebenen Technik reine Silberniederschläge entstehen, daß es sich also um eine Imprägnation der Zelle mit reinem Metall handelt. Läßt man im Epprouvettenversuch die Hydrochinonlösung auf die Silberlösung einwirken, so entsteht ein Silberspiegel und wir müssen annehmen, daß die gleiche Reaktion an den mit Formalin-Kobaltnitrat fixierten Zellen abläuft; eine elektive Imprägnation der letzteren könnte nun dadurch zustande kommen, daß ihnen ein besonders starkes Adsorptionsvermögen für Silbernitrat zukommt, welches den übrigen Zellen der Niere fehlt. Es ist übrigens auch daran zu denken, daß die betreffenden Zellen ein besonderes Adsorptionsvermögen für Formalin haben und daß aus diesem Grunde an ihnen eine besonders starke Reduktion stattfindet, da ja Formalin Silbernitrat reduziert. Diese Annahme schien allerdings wenig Wahrscheinlichkeit für sich zu haben, da unsere Reduktionsflüssigkeit ebenfalls Formalin enthält, und wir konnten sie auch durch den folgenden Befund widerlegen: Langdauerndes Auswässern des Formalins vor der Silbernitrateinwirkung vermag die Silberimprägnierung in keiner Weise zu verhindern.

Niederschläge von metallischem Kobalt kommen unserer Meinung nach nicht in Betracht. Abgesehen davon, daß man im Epprouvettenversuch beim Einwirken des reduzierenden Hydrochinons aus Kobaltnitrat keinen Niederschlag erhält, ist die Verwendung von Kobaltnitrat neben Formalin für das Gelingen der Imprägnierung von untergeordneter Bedeutung. Die etwas bessere Anfärbung nach gleichzeitiger Fixation mit Formalin und Kobaltnitrat kann ihren Grund übrigens auch nicht darin haben, daß neben Silber auch geringe Kobaltniederschläge entstehen, wie aus der folgenden Versuchsanordnung hervorgeht: Fixiert man mit der Originallösung, welche Formalin und Kobaltnitrat enthält und reduziert nach Auswaschen sofort mit der Hydrochinonlösung, ohne vorher Silbernitrat einwirken zu lassen, so erhält man ebenso wenig Niederschläge, wie wenn man mit Formalin fixiert, dann in Kobalt beliebiger Konzentration einlegt und schließlich mit Hydrochinon reduziert.

Die früher geäußerte Vermutung, daß ein besonders starkes Adsorptionsvermögen bestimmter Zellen für das Silbersalz Ursache des Niederschlages von reduziertem Silber an den Zellen sei, ist aber keineswegs bewiesen. Der Vorgang könnte auch durch eine rein chemisch ab-

laufende Reaktion erklärt werden: Es ist mit der Möglichkeit zu rechnen, daß das Silbernitrat mit bestimmten Salzen — wir müssen hier in erster Linie an das Kochsalz denken — eine Reaktion eingeht, daß bei dieser ein Zwischenprodukt, z. B. Silberchlorid entsteht, und erst dieses durch Hydrochinon zum metallischen Silber reduziert wird. Das Auftreten von Silberniederschlägen wäre dann Ausdruck eines höheren Kochsalzgehaltes der betreffenden Zellen, die positive Reaktion an bestimmten Zellen würde eine Stapelung von Kochsalz in den Zellen beweisen. Eine derartige Überlegung macht unser histologisches Problem zu einem physiologischen, da wir uns nun mit der Frage zu beschäftigen haben, ob die in unseren Präparaten mit Silber imprägnierten Tubulusanteile in irgendeiner Beziehung zur Chlorid- bzw. Kochsalzausscheidung stehen.

Wir könnten diese Annahme unter Hinblick auf die Angabe von *Leschke*¹ ohne weiteres ablehnen, der bekanntlich mit einer ähnlichen Methode zu zeigen behauptete, daß die Chloride nur in den Hauptstücken und in den weiten Übergangsteilen der geraden Kanälchen, die noch zu den Hauptstücken gehören, ausgeschieden werden. Seine Methode bestand darin, daß dünne Scheibchen von frisch herausgenommenen Nieren sogleich in eine 1—3proz. angesäuerte Silbernitratlösung eingelegt und hierauf durch 12—24 Stunden im Dunklen aufbewahrt wurden; nach mehrstündigem Wässern in destilliertem Wasser werden die Scheiben dem Licht ausgesetzt und schließlich in den photographischen Entwickler (Hydrochinon 2,0, Natriumsulfid 0,5, Aqua destill. 100,0, 40proz. Formalin 5,0) gebracht, woselbst die Schnitte 10 bis 20 Stunden verbleiben. Die Chloride fallen in der Silberlösung als Chlor-silber aus, welches in der Reduktionsflüssigkeit zum metallischen Silber verwandelt wird.

Treffen *Leschkes* Angaben zu, so können die Niederschläge in unseren Präparaten, die ja eine andere Lokalisation aufweisen, einem besonderen Chloridreichtum der imprägnierten Stellen nicht entsprechen. *Leschkes* Befund bedarf aber unserer Überzeugung nach dringend einer Überprüfung. Wir selbst konnten uns von seiner Richtigkeit in einer großen Anzahl von Versuchen nicht überzeugen. Nach seinem Verfahren treten im Nierengewebe allerdings feinere oder auch gröbere Niederschläge auf, von einer beständigen Lokalisation derselben in bestimmten Tubulusabschnitten kann jedoch nach unseren Erfahrungen nicht die Rede sein. Abgesehen davon, daß eine Silberniederschlagsbildung nicht selten überhaupt ausbleibt, fanden wir in einer Reihe von Präparaten sämtliche Rindenanteile, Schaltstücke, Zwischen- und Hauptstücke, auch Glomeruli, selbst das interstitielle Gewebe unterschiedslos imprägniert, in anderen fast frei von Silber, während sich gerade, entgegen den Angaben *Leschkes*,

¹ *Leschke*, Zeitschr. f. klin. Med. 81. 1915.

die dicken Schenkel der Henleschen Schleifen als mit Silberkörnchen besetzt erwiesen. In nur vereinzelten Schnitten hatten wir im Bereiche der Rinde gelegentlich an einigen Stellen den Eindruck, daß die Hauptstücke versilbert wären, die Schalt- und Zwischenstücke dagegen frei blieben. Auch bei dem an mehreren Kaninchen angestellten Versuch einer Chloridanreicherung in der Niere durch Einspritzung von 10 ccm einer 10proz. Kochsalzlösung — das Tier wurde 10 Min. nach der Einspritzung getötet und der histologischen Untersuchung zugeführt — konnten Bilder, die *Leschkes* Anschauungen entsprochen hätten, nicht gefunden werden.

Leschkes Mitteilung ist daher nicht geeignet, jeglichen Zweifel an einer Beziehung des Kochsalzgehaltes bestimmter Zellen zur Silberimprägnierung nach der obigen Methode zu zerstreuen, wir mußten die Möglichkeit einer derartigen Beziehung sogar um so mehr in Erwägung ziehen, als in letzter Zeit gerade die mit dieser Methode darstellbaren Kanälchenabschnitte wenigstens zum Teil als Ort der Kochsalzausscheidung betrachtet wurden. *Pütter*¹ verlegt in seiner bekannten „Dreidrüsentheorie der Harnbereitung“ die Salzausscheidung in die Salzdrüse der Niere, worunter er den dicken Schenkel der Henleschen Schleife versteht. Wenn mit der oben besprochenen, von uns verwendeten Methode zwar auch das Schaltstück mitimprägniert erscheint und dieses zusammen mit den Tubulis erster Ordnung von *Pütter* als „Stickstoffdrüse“ bezeichnet wird, so mußte die Theorie dieses Forschers doch berücksichtigt werden, da er ja selbst betont, daß „die Feststellung, ein bestimmtes Salz könne durch die Salzdrüse ausgeschieden werden, keinesfalls dahin verstanden werden darf, daß dieser Weg der einzig mögliche der Elimination sei“. *Pütters* Theorie stützt sich weniger auf gesicherte Befunde als vielmehr auf geistreiche Deduktionen. Als Argumente für die Annahme, daß der dicke Schleifenschenkel die Kochsalzdrüse darstelle, führt er hauptsächlich folgende Punkte an.

Er betont, daß nur die Säugetiere einen Harn liefern, der in bezug auf Kochsalz konzentrierter ist als das Blut und daß nur die Tiere, die einen hypertonen Harn liefern, jene Kanälchenabschnitte besitzen, die wir als dicke Henlesche Schleifen bezeichnen. Er beruft sich ferner auf Untersuchungen *Grünwalds*², der beim Kaninchen Rinde und Mark in bezug auf ihren Chlorgehalt mit dem Blut verglich und hierbei feststellte, daß zwischen Chlorgehalt des Blutes und der Rinde kein wesentlicher Unterschied bestünde, wohl aber zwischen Blut und Rinde einerseits und Mark andererseits; der Chlorgehalt des Markes ist beim normalen Kaninchen 1,82mal so hoch wie der des Blutes, beim Kaninchen

¹ *Pütter*, Die Dreidrüsentheorie der Harnbereitung. Berlin: Julius Springer 1926.

² *Grünwald*, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 60. 1909.

mit chlorfreiem Harn (siehe unten) 1,64mal so hoch. Das Mark setzt sich aus den dünnen und dicken Anteilen der Henleschen Schleife und den Sammelrohren zusammen; da er in den dünnen Schleifenschenkel einen Apparat zur Harneindickung erblickt und wohl mit Recht für die Sammelrohre eine Kochsalzspeicherung nicht annehmen will, so kommt er durch Ausschluß zur Überzeugung, daß die Salzausscheidung bzw. Speicherung in den dicken Teilen der Henleschen Schleife stattfindet. Als weiteren Grund für seine Annahme führt er die außerordentlich enge Beziehung zwischen Chlorausscheidung und Oberfläche der dicken Schleifen an, die er für Maus und Mensch annähernd berechnet; bei Mensch und Maus wird seiner Überlegung nach auf den Quadratmeterdicke Schleife und für den Tag eine annähernd gleiche Menge Chlor ausgeschieden. „Bei gewöhnlicher Kost scheiden Maus, Kaninchen und Mensch pro 1 qm dicke Schleifen und Tag im Mittel 162 Millimol Salz aus.“

Unter Hinblick auf Pütters Theorie beschäftigten wir uns mit der Frage, ob die Imprägnierung der aufsteigenden dicken Schleifenschenkel, ebenso wie der Zwischen- und Schaltstücke eine Abhängigkeit von der Kochsalzausscheidung zeigt. Zu diesem Zwecke haben wir chlorarme und chlorreiche Tiere verglichen. Für diese Versuche wurden Kaninchen und weiße Ratten verwendet. Zur Gewinnung von Tieren mit chlorarmem Harn wurde entweder eine kräftige Wasserdurese eingeleitet oder den Versuchstieren durch längere Zeit chlorarmes Futter, evtl. gleichzeitig Diuretin verabreicht.

Die Wasserduresen wurden entweder so durchgeführt, daß dem Tiere Aqua destillata (bei Ratten z. B. 10 ccm) mittels Schlundsonde verabfolgt und das Tier auf der Höhe der Diurese nach etwa $\frac{3}{4}$ —1 Stunde getötet wurde, oder, daß die Tiere mehrere Tage hindurch mehrmals täglich eine größere Menge Wasser mit Schlundsonde zugeführt erhielten, um schließlich ca. 1 Stunde nach der letzten Wasseraufnahme getötet zu werden. In den Schnitten der entsprechenden Versuche ergab sich, daß sich die Nieren dieser Tiere von Normaltieren in keiner Weise unterscheiden.

Da Versuchstiere nach Verfütterung von chlorfreiem Sago und von Aqua destillata, welches Material Potocki¹, Ruschhaupt² und Schenk³ zur Erzielung chlorarmen Harnes verwendeten, nach verhältnismäßig kurzer Zeit zugrunde gehen, benützten wir nach der Angabe von Grünwald Maiskörner, die einige Tage in mehrmals gewechseltem Aqua destillata gelegen und bereits etwas gequollen waren. Ratten bleiben bei dieser Kost auch nach wochenlanger Dauer des Versuches in einem ausgezeichneten Ernährungszustand, Kaninchen magern bei der ungewohnten und nicht gerne genommenen Nahrung allerdings bald ab, man kann aber auch diese Tiere auf diese Weise 10—14 Tage bei ver-

^{1, 2, 3} Zitiert nach Grünwald.

hältnismäßigem Wohlbefinden erhalten. Die Chlorausscheidung im Harn nimmt unter diesem Regime wesentlich ab. Auch die Nieren dieser Tiere ergaben bei der da Fanoschen Färbetechnik gleiche Bilder wie Normaltiere.

Wir trachteten schließlich nach der Methode von *Grünwald*, in welcher die oben beschriebene Maisfütterung mit der Verabreichung von Diuretin (bei mittelschweren Kaninchen täglich 1 g gelöst in 15 ccm Aqua destillata) kombiniert ist, kochsalzfreien Harn zu bekommen. Nach *Grünwald* erhält man am 2. Tage nach der Diuretindarreichung häufig noch einen kochsalzreicheren Harn als unter normalen Bedingungen, nach 2, spätestens 3 Diuretingaben, auf die unmittelbar eine stärkere Kochsalzausschwemmung folgt, soll der Harn am folgenden diuretinfreien Tag kochsalzfrei sein. Wir können diese Angaben nicht vollinhaltlich bestätigen; die Chlormengen nahmen allerdings im wesentlichen ab, einen chlorfreien Harn erzielten wir aber auch nach längerer Fortführung dieser Behandlung nicht. Wir verfügen über Versuche, in welchen den Kaninchen bei Maisfütterung bis zu 7 Tagen je 1 g Diuretin gegeben wurde, über Versuche ferner, in welchen innerhalb 16 Tagen 9mal 0,5 und 2mal, und zwar zu Ende des Versuches 1,0 Diuretin gegeben wurde, ohne daß die Kochsalzreaktion im Harn verschwand. Die schon von anderen Forschern beschriebenen Lähmungen, meist der hinteren Gliedmaßen, haben wir in diesen Versuchen fast regelmäßig gesehen. Das Ergebnis dieser Versuche war, daß die Imprägnierung der in Rede stehenden Tubuliantile zumeist mangelhaft war oder sogar stellenweise ausblieb. Diesen Befund dürfen wir aber trotzdem unserer Meinung nach nicht auf eine mangelhafte Kochsalzspeicherung in den entsprechenden Zellen zurückführen, da sich Vergleichstiere, die normale kochsalzhaltige Kost neben Diuretin erhielten und bei welchen dauernd kochsalzreicher Harn nachweisbar war, entsprechend verhielten. Das Diuretin scheint den tubulären Apparat unbeschadet der Kochsalzreaktion im Harn häufig in der Weise zu schädigen, daß die normale Imprägnierung nicht mehr zustande kommt.

In Versuchen einer Kochsalzanreicherung in den Nierenepithelien durch Einspritzung von 10proz. Kochsalzlösung (bei Kaninchen 10 ccm) in die Blutbahn, erhielten wir keineswegs deutlichere Bilder als bei Normaltieren, ein weiterer Beweis, daß der Ausfall der Silberimprägnation in der Pütterschen Salzdrüse von dem vermuteten Chlorgehalt dieses Tubulusabschnittes nicht abhängig ist.

Wir haben schließlich eine Reihe orientierender Versuche in der Art vorgenommen, daß wir Kochsalzlösungen in verschiedenen Konzentrationen in die frisch herausgenommene Niere eines normalen Tieres an umschriebener Stelle einspritzten, um nachzusehen, ob dieses Kochsalzdepot nach der Methode von *da Fano* mit einer diffusen Silber-

niederschlagsbildung reagiere. In ähnlicher Weise haben wir defibriertes Rattenblut mit Kochsalz versetzt und dasselbe dann an umschriebener Stelle in frisch herausgenommene Organe (Niere, Hoden, Muskel usw.) eingespritzt und die Einspritzungsstelle nach Behandlung der Methode von *da Fano* histologisch untersucht. Wir konnten niemals das Auftreten deutlicher Silberniederschlagsbildungen feststellen.

Wir mußten unsere Kochsalzversuche somit dahin zusammenfassen, daß sich weder bei chlorarmen noch bei chlorreichen Tieren Unterschiede in der Darstellbarkeit der in Rede stehenden Tubulusanteile feststellen lassen, daß ferner örtliche Niederlagen von Kochsalz in verschiedenen Geweben nach den obigen Verfahren nicht mit Silberniederschlagsbildungen reagieren. Die oft schlechtere Darstellbarkeit der normalerweise imprägnierten Schlingen nach Diuretinmedikation scheint in einer degenerativen Beeinflussung des Tubulusepithels ihre Erklärung zu finden.

Da auch andere harnfähige Stoffe in Frage kamen, welche, in den Zellen gespeichert, die Imprägnierung derselben mit Silber hätten verursachen können, haben wir schließlich folgende Versuche durchgeführt, die nur kurz angeführt sein sollen. Dünne Scheibchen lebenswarm entnommener Nieren wurden in Aqua destillata eingelegt in der Absicht, wasserlösliche Stoffe auszuwaschen. Die Gewebsstücke wurden nach verschieden langer Zeit dem *da Fano*schen Versilberungsverfahren unterworfen. Da das Liegenlassen des Materials an sich, wie oben gezeigt, den Ausfall des Versilberungsprozesses beeinträchtigt, mußten bei diesen Versuchen naturgemäß exakte Vergleiche durchgeführt werden. Es ergaben sich hinsichtlich der Silberimprägnierung in den ausgewaschenen Stücken und den nicht ausgewaschenen Vergleichsstücken keinerlei Unterschiede. Auch kurzdauernde Spülungen der Niere mit Aqua destillata beeinträchtigten das Ergebnis in keiner Weise.

Wenn ein im Harn erscheinender Stoff, der vorerst in den Nierentubulis gespeichert ist, tatsächlich Ursache der eigentümlichen histologischen Bilder wäre, so mußte durch unmittelbare Einspritzung von Harn in das Gewebe dieses der Färbung zugänglich gemacht werden. Wir hatten aber auch hier negative Färbungsergebnisse zu verzeichnen; wir arbeiteten allerdings nicht mit eingedicktem Harn, und es wäre möglich, daß bestimmte harnfähige Stoffe erst bei bestimmten Konzentrationen, die eben in diesen Zellen erreicht würden, den Ausfall metallischen Silbers bedingen. Eine lokale Einspritzung einer Urealösung in das Nierenparenchym ließ an der Einspritzungsstelle eindeutige Niederschlagsbildungen nicht zustande kommen.

Unsere Befunde vermögen also der *Pütterschen* Dreidrüsentheorie der Harnbereitung höchstens insofern eine Stütze zu geben, als der von ihm als Salzdrüse angesprochene Tubulusabschnitt allerdings zusammen mit dem Schaltstück eine charakteristische histologische Reaktion zeigt.

Wir möchten hier ausdrücklich feststellen, daß unsere Ausführungen keinerlei Kritik an *Pütters* Ansichten bedeuten sollen. Wir haben lediglich gezeigt, daß das von uns beobachtete eigentümliche Verhalten eines bestimmten Tubulusanteiles bei Anwendung des da Fanoschen Verfahrens ursächlich anscheinend nicht auf die Anreicherung bestimmter Stoffe, insbesondere von Kochsalz zu beziehen ist. Wir sind der Ansicht, daß eine besondere, uns im Wesen nicht näher bekannte Eigenart des Protoplasmas dieser Zellen Ursache ihres eigentümlichen Verhaltens ist.

Unser vom histologischen Standpunkt aus bemerkenswerter Befund vermag daher über die Teilleistungen der verschiedenen Tubulusepithelien nichts auszusagen; es scheint aber doch der Schluß berechtigt, daß die sich im Imprägnierungsverfahren verschieden verhaltenden Abschnitte wahrscheinlich auch verschiedene Aufgaben besitzen. Weitergehende Schlußfolgerungen sind vorläufig nicht erlaubt. Wir möchten es aber ablehnen, aus dem gleichartigen Verhalten des dicken Anteiles der Henleschen Schleife, des Zwischen- und Schaltstückes mit Sicherheit auf eine gleichartige Leistung dieser Zellen zu schließen. Die verschiedene Stärke der Imprägnierung der einzelnen Anteile könnte ja sogar das Gegenteil annehmen lassen.

In diesem Zusammenhang erscheint übrigens die jüngst erschienene Mitteilung *Komoris*¹ beachtenswert, der an den meisten Drüsenzellen (Speicheldrüsen, Drüsen des Magen-Darmrohres, Leber, Pankreas) bei einem bestimmten Versilberungsverfahren das Auftreten brauner Körnchen beobachtete, während z. B. Beleg- und Becherzellen silberfrei blieben. Die Imprägnation zeigte, wie durch Fütterungsversuche erwiesen wurde, eine Abhängigkeit vom Tätigkeitszustande der Drüsen. Auch *Komori* kam zur Ansicht, daß nicht ein anorganisches Salz (Chlorid, Phosphat, Thiosulfat) Grundlage des Silberausfalles sei, und er konnte weiter mit Wahrscheinlichkeit zeigen, daß organische Stoffe bzw. Eiweißzersetzungsprodukte für dessen Auftreten verantwortlich seien. Er glaubte dies aus den Ergebnissen von Eiweißbestimmungen an Wasserextrakten aus dem Pankreas vor und nach Fütterung schließen zu dürfen; die Extrakte enthielten vor der Fütterung reichlich höheres Eiweiß, 3 Stunden nach derselben Aminosäuren und die dazu gehörigen niederen Eiweißkörper.

Wir behalten uns vor, in einem späteren Zeitpunkt über das Ergebnis unserer Untersuchungen an experimentellen Nephritiden, ebenso wie an einem größeren menschlichen operativ gewonnenen Material zu berichten. In den Rahmen unserer weiteren Untersuchungen soll auch das Studium der embryonalen Niere mit einbezogen werden.

Wir sind uns dessen bewußt, hinsichtlich der Nierenhistologie nichts

¹ *Komori*, Scient. reports. from the govern. inst. for infect. dis. Tokyo 5, 303. 1927.

wesentlich Neues gebracht zu haben, denn daß es sich z. B. in den Zellen der Hauptstücke und der Schaltstücke um verschiedenartige Teile handelt, war ja auf Grund des verschiedenen Verhaltens hinsichtlich Zahl, Dichte, Farbe der Stäbchen im Altmann-Präparat, ferner hinsichtlich des Bürstenbesatzes der Zellen bekannt. Immerhin schien uns der Befund mitteilenswert, weil er neuerlich auf histologisch leicht nachweisbare Unterschiede verschiedener Kanälchenanteile und auf die Möglichkeit ihrer gegenseitigen Abgrenzung hinweist, weil der Befund, wie uns scheint, im Lehrbetrieb einen praktischen Behelf darstellt, weil er zumindest neuerdings dazu anregt, die Teilleistungen der einzelnen Kanälchenabschnitte weiter zu erforschen und weil er vielleicht sogar bei bestimmten physiologischen und pathologischen Fragestellungen eine Verwertung wird finden können.
