

(Aus der Pathologisch-anatomischen Abteilung des Obuch-Institutes für Erforschung der Berufskrankheiten in Moskau. — Prosektor: *H. Freifeld.*)

Anämie der Ratten nach Entmilzung.

Von

Dr. E. Sorina.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 30. Juni 1928.)

Der Zweck unserer Versuche war den Einfluß der Entmilzung auf das morphologische Blutbild nach Möglichkeit festzustellen. Als Versuchstiere dienten uns Ratten, da bei ihnen bekanntlich die Entmilzung am wenigsten ausgeglichen wird. Andererseits erschien es uns von besonderer Wichtigkeit, die von *Lauda* aufgestellte Behauptung zu prüfen, nach welcher bei Ratten nach Milzentfernung eine Anämie von perniziösem Charakter sich entwickelt, welche *Lauda* auf eine sekundäre Infektion durch Mikroorganismen zurückführt, die auch vorher im Organismus vorhanden wären, aber infolge der Entmilzung virulent würden. Als unsere Arbeit schon fast abgeschlossen war, erschien die Arbeit von *Mayer*, der charakteristische Veränderungen der Rattenerythrocyten beobachtete, die bei Giemsa-Färbung in Form von azurophilen Körnern und Stäbchen erscheinen und welche er für die Parasiten hält und mit dem Namen *Bartonella bacilliformis* bezeichnet.

Unsere Versuche umfassen 40 Ratten von verschiedenem Körpergewicht (65 g bis 340 g) und verschiedenen Alters (3 Monate bis 2 Jahre).

Die Untersuchungsmethoden waren vorwiegend morphologische. Das Blut wurde untersucht.

1. Bei vitaler Färbung mit Neutralrot und Janusgrün.

Verfahren nach Sabin: Es wird eine 1 proz. Neutralrot- und Janusgrünlösung in absolutem Alkohol hergestellt. Vor der Untersuchung wird ex tempore ein Gemisch dieser beiden Lösungen hergestellt: zu 5 cem abs. Alkohol werden 20 Tropfen der Neutralrotlösung und 15 Tropfen der Janusgrünlösung hinzugefügt. Wenn das Gemisch fertig ist, wird von demselben ein ziemlich großer Tropfen auf einen sauberen Objektträger getan und durch Schwenken in verschiedener Richtung auf ihm gleichmäßig verteilt. Der mit der Farbe bedeckte Objektträger trocknet rasch an der Luft. Jetzt wird ein Tropfen Blut auf ein Deckgläschen gebracht und auf den gefärbten Objektträger getan. Das Präparat wird in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Es muß im Laufe der ersten Stunde nach der Blutentnahme untersucht werden.

Bei dieser Färbung treten in den Leukocyten die sogenannten Neutralrotgranula in Form von orangeroten Körnchen sowie die mit Janusgrün grüngefärbten Mitochondrien hervor.

In unserem Laboratorium wird damit, nach dem Vorschlag von *Freifeld* die Regeneration der Erythrocyten beurteilt, da, wie sie es gezeigt hat in den allerjüngsten Erythrocyten bei dieser Färbung die Neutralrotgranula und Janusgrün-Mitochondrien hervortreten, wie dies auf der Abb. 1 zu sehen ist. Wir halten diese Färbung für eine Vitalfärbung, da sofort nach dem Absterben die Neutralrotgranula und Janusgrün-Mitochondrien schwinden.

2. *Die postvitale Substantia granulo-filamentose wurde mit Brillantkresylblau gefärbt.* —

Färbemethode: Es wird eine gesättigte Brillantkresylblaulösung in absolutem Alkohol hergestellt. Dann wird auf einen sauberen, in der Flamme erwärmten Objektträger die Farbe mit einem geschliffenen Glas ausgebreitet. Auf diesem mit Farbe bedeckten Objektträger wird ein Blutausstrich hergestellt, welcher auf 3—5 Minuten in eine feuchte Kammer gelegt wird, wonach das Präparat untersucht werden kann.

3. *Untersuchung auf Heinzsche Körperchen im Bluttröpfen mit Methylviolett.*

Färbemethode: 1 Tropfen einer 1proz. Methylviolettlösung in 0,6proz. NaCl-Lösung wird auf den Objektträger gebracht, in diesen Tropfen wird ein auf ein Deckgläschen gebrachter Bluttröpfen getan. Das Präparat wird in feuchter Kammer aufbewahrt.

4. *Trockene Anstriche wurden gefärbt mit Azur II-Eosin, sowie mit Karbolfuchsin-Methylenblau nach Freifeld.*

Färbemethode: Es werden hergestellt: 1. eine Carbolfuchsinlösung (1 g Fuchsin f. Bac. wird bei Erwärmung in 15 ccm 96proz. Alkohol gelöst und nach Erkalten 100 ccm 5proz. Carbolsäurelösung zugefügt) und 2. eine 1proz. wässrige Methylenblaulösung (Methylb. med. puris. Grübler). Auf 20 ccm Leitungswasser werden 7 Tropfen der 1. und 5 Tropfen der 2. Lösung gegeben. Das Gemisch wird immer frisch bereitet, auf das Präparat in hoher Schicht aufgegossen und 1 Stunde gefärbt.

Bei dieser Färbung zeigt bekanntlich das Protoplasma der Neutrophilen, welches normalerweise homogen-rosa erscheint, in Fällen von verschiedenen Vergiftungen eine mehr oder minder ausgesprochene blau-violette körnig-flockige Zeichnung.

5. Außerdem wurden frische Bluttröpfen im Dunkelfelde untersucht.

Hb-Gehalt, sowie rote und weiße Blutkörperchenzahl wurde nicht in allen Fällen bestimmt.

6. Oxydase und Peroxydasereaktion.

Sämtliche Versuchstiere saßen in einzelnen Käfigen mit einem Drahtnetzboden, an welchem ein Glastrichter befestigt wurde. In den Glastrichter wurde ein Filter getan und unter denselben ein Gefäß, um den filtrierte Harn aufzufangen.

Von den 40 Ratten lebten 21 3—14 Tage lang, wonach sie unter Erscheinungen zunehmender Blutarmut starben. Bei sämtlichen Ratten dieser Gruppe trat zwischen dem 3—7 und 9—14 Tage blutiger Harn auf, in welchem in einigen Fällen Erythrocyten gefunden wurden, in

anderen nur gelöstes Oxyhämoglobin. In einzelnen Fällen wurden, in der Zeit des blutigen Harns, im Blute *Heinzsche* Körperchen gefunden, was auf eine Methämoglobinämie hinweist.

Was die Körnelung der Erythrocyten bei Neutralrot-Janusgrün-färbung betrifft, so war bei dieser Gruppe eine Vermehrung der gekörnten Erythrocyten nach der Entmilzung zu verzeichnen. So wurden vor der Operation im Durchschnitt 8—10 im Gesichtsfeld gefunden, nach der Operation stieg ihre Zahl bis 20—25.

Sehr elektiv tritt bei dieser Färbung die verschieden ausgesprochene Erythrocytenphagocytose durch die Mononukleären und neutrophilen Leukocyten hervor. Die Erythrophagie beginnt am 3.—5. Tage und hält manchmal bis zum 12.—14. Tage an. Bemerkenswert ist, daß die phagocytierten Erythrocyten sich mit Neutralrot stark orangegelb färben. In diesen Präparaten können ebensolche orangefarbige nicht phagocytierte Erythrocyten beobachtet werden. (Abb. 1).



Abb. 1. Vitale Färbung der Erythrocyten mit Neutralrot-Janusgrün. Erythrophagie der Mononucleären.

Bei Färbung mit Brillantkresylblau konnte auch eine Vermehrung der sog. vitalgekörnten Erythrocyten festgestellt werden. So konnten vor der Operation im Mittel 20—25 in jedem Gesichtsfeld gezählt werden, welche Zahl nach der Operation auf 40—50 anstieg. Die Vermehrung der gekörnten Erythrocyten fand am 3.—5. Tage, in einzelnen Fällen am 7.—10. Tage statt.

Nach *Giemsa* konnte eine Vermehrung der Polychromatophilen, manchmal eine stark ausgesprochene Anisocytose und in einzelnen Fällen Makrocyten, selten auch basophile Körnelung festgestellt werden. In der Mehrzahl der Fälle wurde Vermehrung der kernhaltigen roten Blutkörperchen — Normoblasten, sowie der *Jolly*-Körper gefunden.

In 13 Fällen wurden zwischen dem 3. und 7. Tage azurophile Einschlüsse in den Erythrocyten gefunden, wie dies in der Abb. 2 zu sehen, welche manchmal zwischen dem 7. und 14. Tage neuerdings auftraten. Zur selben Zeit konnte in einzelnen Fällen eine starke Vermehrung der Blutplättchen festgestellt werden, sowie eine stark ausgesprochene Hypersegmentation der Neutrophilen (bis zu 12 Segmenten) mit einer großen Anzahl von rosetteförmigen Kernen (s. Abb. 2).

Die Leukocytenformel änderte sich, bei einer bedeutenden Vermehrung der Leukocyten, in der Richtung einer prozentuellen Vermehrung der Neutrophilen; vor der Entmilzung wurden 20—35% Neutrophile gezählt, nach ihr bis 60—80%. Ebenso vergrößerte sich der Prozentgehalt der Mononukleären. So fanden sich vor der Operation 5—12%, nach ihr 19—26%, in einzelnen Fällen sogar bis 35% Mononukleäre. —

Toxische Veränderungen in den Neutrophilen wurden, bei der oben beschriebenen Färbung nach *Freifeld*, in 17 Fällen beobachtet; sie traten am 3.—6. Tage auf und vermehrten sich in einigen Fällen bis zum 9.—14. Tage. Das Protoplasma war meistens feinkörnig, wie Abb. 3 zeigt.

Die Oxydase und Peroxydasereaktion wurde nicht beeinflusst.

Bei Untersuchung eines frischen Bluttröpfens im Dunkelfeld, in den Fällen, in welchen die oben beschriebenen azurophilen Einschlüsse in den Erythrocyten (*Bartonella bacilliformis*) gefunden wurden, konnte diese nur selten und mit Mühe in Form heller Punkte auf der dunklen Grundlage der Erythrocyten entdeckt werden. Bei 2—3 stündigem Stehen erscheinen in vielen Fällen, an denselben Stellen helle Punkte und Stäbchen. In den Fällen, in welchen bei *Giemsa*-Färbung

die azurophile Punktierung in den Erythrocyten nicht zu sehen war, traten nach mehrstündigem Stehen des Präparates, im Dunkelfeld die charakteristischen hellen Bildungen auf. Ähnliche Veränderungen der Erythrocyten im Dunkelfeld konnten von uns bei den nicht operierten Ratten von 10 Fällen nur einmal und in geringer Anzahl entdeckt werden.

Bemerkenswert ist hierbei eine Eigenschaft des Rattenhämoglobins, welche bei der Untersuchung des frischen Bluttröpfens beobachtet werden kann. Im Augenblick des Hämolysebeginns konnte am Rande des Präparates die Bildung von Krystallen in Form von Tafeln verfolgt werden (Abb. 4).

Die 2. Gruppe enthält 7 Ratten, ebenfalls verschiedenen Alters und Gewichtes, die aber die Entmilzung schlecht vertrugen und alle am 3. Tage nach der Operation zugrunde gingen. Hier muß der rasche Abfall des Hb-Gehaltes erwähnt werden. So wurde vor der Operation ein Hb-Gehalt von 80—85% gefunden, welcher am 3. Tage nach der Entmilzung auf 25—30% fiel. Die Anzahl der Erythrocyten fiel von 6—7 Millionen auf 2—2,5 Millionen. Es wurde eine sehr starke Vermehrung der Leucocyten festgestellt.

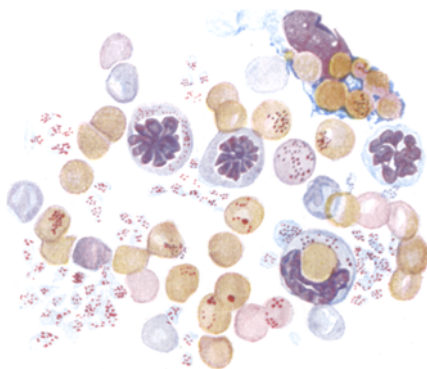


Abb. 2. Azurophile Einschlüsse der Erythrocyten. Hypersegmentierung der Kerne bei Neutrophilen. Erythrophagie Thrombocytose. Färbung nach *Giemsa*.

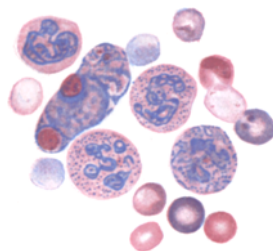


Abb. 3. Toxische Körnelung der Neutrophilen bei Carbolfuchsin-Methylenblaufärbung.

Die Anzahl der vitalgefärbten Erythrocyten bei Neutralrot-Janusgrün und die der postvitalen bei Brillantkresylblaufärbung war, im Gegensatz zur 1. Gruppe, bedeutend vermindert. So war die Anzahl der vital gefärbten vor der Operation = 20 im Gesichtsfeld, die nach ihr bis zu 12 im Gesichtsfeld sank; die postvitalgefärbten verminderten sich ebenfalls von 45 im Gesichtsfeld vor der Operation bis 20. Hier muß erwähnt werden, daß nur in dieser Gruppe in vereinzelten Fällen neben einer Verminderung der Anzahl der postvital gefärbten Erythrocyten eine Vermehrung der vitalgefärbten, wenn auch in unbedeutendem Grade, beobachtet werden konnte. Toxische Verände-

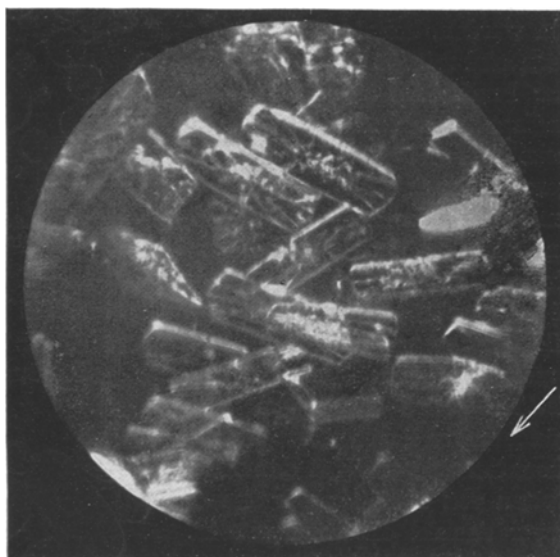


Abb. 4. Hämoglobinkristalle aus dem Rattenblut. Dunkelfeld.

rungen in den Neutrophilen wurden in allen Fällen festgestellt. Die Körnelung war stärker ausgesprochen. Erythrophagie wurde nur in 2 Fällen beobachtet. Blutiger Harn ebenfalls in 2 Fällen. Bei *Giemsa*-Färbung wurden degenerative Veränderungen in den mononukleären und neutrophilen Leukocyten beobachtet. Azurophile Einschlüsse in den Erythrocyten konnten nur in einem Falle festgestellt werden.

Schließlich vertrug die 3. Gruppe — 10 Ratten, die Entmilzung gut. Sie lebten 4 Monate und noch länger. Einige von ihnen wurden zu anderen Versuchen verwendet, 5 leben noch zur Zeit (5 Monate). Der Hb-Gehalt des Blutes dieser Gruppe fällt anfangs. So betrug er vor der Operation 76—80%, fällt am 5.—7. bis zum 9.—11. Tage rasch ab bis zu 25—28%, nimmt aber vom 9.—16. Tage wieder rasch zu und erreicht 70—76%. Die Anzahl der Erythrocyten nimmt ebenso rasch

ab, wie das Hb, so beträgt dieselbe vor der Operation 7—8 Millionen, fällt vom 3.—9. 11. Tage bis zu 1600000—1300000 und beginnt wieder ebenso zuzunehmen. Wenn somit zum 16. Tage der Hb-Gehalt wieder den Wert vor der Operation erreichte, — stieg die Zahl der Erythrocyten ebenfalls bis 3—5 Millionen. Es muß auch die ausgesprochene Leukocytose erwähnt werden, welche zwar sehr langsam, aber doch abnimmt und schließlich ebenfalls zur Norm kommt. Was die Regeneration des Blutes dieser Gruppe anbelangt, so verlief diese stärker, als bei der 1. Gruppe. So nahm die Zahl der vitalgefärbten Erythrocyten von 8% vor der Operation, nach der Operation bis 33% zu.

Die Zahl der mit Brillantkresylblau postvital gefärbten Erythrocyten nahm von 27 vor der Entmilzung, vom 5.—7. Tage darnach an, in einzelnen Fällen auch später, auf 60 im Gesichtsfeld zu. Toxische Veränderungen im Protoplasma der Neutrophilen wurden in 4 Fällen beobachtet, die Körnelung war schwach ausgesprochen und schwand bald. Erythrophagie wurde in geringem Grade beobachtet, sie schwand ebenfalls rasch. Blutiger Harn wurde in 2 Fällen beobachtet und hielt sich nur 1—2 Tage, wobei in diesen 2 Fällen in den Erythrocyten azurophile Einschlüsse in geringer Zahl zu sehen waren, die auch rasch wieder schwanden. —

In einigen Fällen untersuchten wir die pathologisch-anatomischen Veränderungen in der Leber und in den Nieren. Auffallend sind die Veränderungen in der Leber; in der Mehrzahl der Fälle treten bei Hämatoxilin Eosinfärbung, helle Herde mit gequollenen Leberzellen auf, die stellenweise eine schwache Kernfärbung zeigen, an anderen Fällen fehlt die Kernfärbung vollkommen und die Leberzellen schwinden ebenfalls, so daß die Herde nur von Capillaren und stellenweise leukocytyären Herden gebildet sind. Bei Sudanfärbung auf Fett sind Lipide in diesen Herden nur in unbedeutender Menge zu sehen, während das umgebende Lebergewebe sehr lipidenreich ist.

In einzelnen Fällen sind die *Kupfferschen* Zellen eisenreich und zeigen ebenfalls ausgesprochene Erythrophagie. In anderen Fällen konnte kein Eisen nachgewiesen werden. In den Nieren ist stellenweise eine Quellung der Glomerulüsendothelien, sowie Blut oder Hb in den Kanälchen zu sehen.

Schlußfolgerungen.

1. Nach Entmilzung entwickelt sich bei den Ratten eine fortschreitende hämolytische *Blutarmut* mit Hämaturie (Hämoglobin- oder Methämoglobinurie), manchmal mit *Heinzschen* Körperchen in den Erythrocyten.

2. Mit den Erscheinungen der Hämolysen gehen eigenartige Strukturveränderungen der Erythrocyten einher, wahrscheinlich infolge der Änderung des kolloidalen Zustandes ihres Protoplasmas (Kolloidale

Entmischung). Diese Veränderungen der Struktur sind gut zu sehen im Dunkelfeld beim Stehenlassen eines Bluttröpfens.

Diese Veränderungen im Dunkelfeld treten ganz erheblich häufiger und stärker auf im Blute der operierten Ratten, als in dem der nicht operierten Tiere, wo sie nur in Ausnahmefällen zu beobachten sind. *Rossle*, *Takeuchi* wiesen auf diese eigenartigen Strukturveränderungen bei Hämolyse hin, in Verbindung mit Spirochätenbildung bei perniziöser Anämie.

Indem wir uns der Methodik dieser Forscher bedienen, erhielten wir nur in 3 Fällen Spirochäten, in den übrigen Fällen fanden wir die oben erwähnte Körnelung der Erythrocyten, welche Brownsche Bewegungen zeigten.

Es ist zu vermuten, daß die azurophilen Gebilde, welche nach der Entmilzung in Erythrocyten auftreten (und welche manchmal auch in den Erythrocyten der gesunden Ratten zu sehen sind), auch Strukturveränderungen der Hämolyse darstellen und nicht Parasiten, wie dies *Mayer* annimmt.

Dieser Schluß könnte vielleicht gewagt erscheinen, insbesondere wenn man die Angaben über gelungene Züchtung dieser „Mikroben“ von *Mayer*, *Kuczynsky* und *Schilling* in Betracht zieht.

Uns erscheint dagegen nach genauer Prüfung dieser Angaben und der Angaben über gelungene Übertragung der Schluß auf die Parasitenatur vorläufig viel gewagter und des Beweises bedürftig.

Was die Übertragbarkeit anbetrifft, stimmen sämtliche Forscher (*Lauda*, *Mayer*, *Kuczynski*, *Schilling*) darin überein, daß dieselbe nur auf entmilzte Tiere gelingt, wobei jedoch angegeben wird, daß das Auftreten der Anämie und dieser Bildungen *bei entmilzten Tieren auch ohne jede Übertragung erfolgt*.

Bemerkenswert ist dabei, daß bisher trotz des großen Materials nur *eine* Andeutung über gelungene Übertragung auf ein nicht entmilztes Tier vorliegt, und dies auffallenderweise auch nur durch Einspritzung einer auf Mischinfektion verdächtigen Kultur.

Der Schluß auf die Erregernatur auf Grund der Übertragungsversuche ist daher weder logisch noch experimentell genügend begründet.

Was die Züchtungsversuche betrifft, steht die Sache ebenso. So sind dieselben nur in mikroskopischem Maßstabe gelungen, von einer echten Kultur, die als Beweis für die Erregernatur in der Bakteriologie zu dienen pflegt, ist nichts erwähnt. Die Vermehrung dieser Gebilde im Kondenswasser aber besagt nichts, da ja die von uns beschriebenen Bildungen im Dunkelfeld bei Hämolyse, die *ebenfalls vorwiegend bei entmilzten Tieren* auftreten, *sich auch beim Stehen vermehren*. Bezüglich der gelungenen Versuche, die *Schilling* erwähnt, schreibt er selber, daß er geringe Erfahrung hierüber besitzt, daß er überhaupt nur einmal und im Gegensatz zu *Mayer* sehr reichliches sichtbares Wachstum sah, welche ihm aber auch auf eine Mischinfektion verdächtig erschien.

3. Die bedeutende Vermehrung der Segmente in den Kernen der neutrophilen Leukocyten muß als ein Befund betrachtet werden, der von der Entmilzung abhängt, infolgedessen kann das Vorhandensein der Hypersegmentierung als Folge einer Funktionsstörung der Milz betrachtet werden (so z. B. bei der charakteristischen Rechtsverschiebung der Neutrophilen bei perniziöser Anämie).

4. Die Anämie hat bei einigen Ratten einen hyperchromen, makrocytären Charakter.

5. Die sehr rasche Ausrückung des Hämoglobins aus dem Rattenblute weist auf gewisse Besonderheiten ihres Hämoglobins hin, was vielleicht eine der Ursachen darstellt, weshalb der Pigmentstoffwechsel nach Entmilzung hier viel stärkere Störungen zeigt.

6. Die Erythrophagie durch die Mononukleären, Neutrophilen und Kupfferschen Zellen der Leber stellt auch eine Folge der Veränderungen der Erythrocyten selbst dar, die bei Vitalfärbung stark orangegebläut gefärbt erscheinen.

7. Die Vermehrung der Zahl der jungen Erythrocyten nach der Entmilzung ist das Ergebnis der Hämolyse und nicht Folge des Wegfalls der hemmenden Wirkung der Milz auf das Knochenmark.

8. Die toxischen Veränderungen des Protoplasmas der Neutrophilen in Form von Ausflockung basophiler Substanz, bei Färbung mit Carbol-fuchsin-Methylenblau weist ebenfalls darauf hin, daß nach Entmilzung eine Stoffwechselstörung in den Leukocyten eintritt, wie dies am menschlichen Materiale bei Einwirkung irgendeines Giftes festgestellt werden konnte. Wir sehen da eine Analogie mit den Vorgängen bei der perniziösen Anämie, wo die toxischen Veränderungen der neutrophilen Leukocyten in die Zeit der Verschlimmerung fallen und in den Zwischenzeiten einen Rückgang zeigen, sogar vollständig schwinden können*.

Literaturverzeichnis.

Lauda, Virchows Arch. **258**. — *Lauda*, Klin. Wschr. **1925**, 1587. — *Mayer*, Arch. Schiffs- u. Tropenhyg. **31** (1927). — *Lauda*, Zbl. Bakter. **98** (1926). — *Ta-keuchi*, K., Fol. haemat. (Lpz.) **33** (1928). — *Schilling*, Klin. Wschr. **1928**, Nr 25.

* *Zusatz zur zweiten Korrektur*: Wir hatten inzwischen Gelegenheit gehabt, bei Menschen nach Entmilzung folgende Veränderungen an den roten Blutkörperchen festzustellen: in zwei Fällen (5 Monate und 2 Jahre nach Entmilzung) zeigten die roten Blk. in fixierten Präparaten helle, ungefärbte Partien, im Dunkelfeld waren dieselben an frischen Präparaten ebenfalls sichtbar und erschienen als runde leuchtende Gebilde, nach längerem Stehen traten zwischen denselben kleine, granulaförmige Gebilde auf, welche Brownsche Bewegung zeigten und den bei den entmilzten Tieren beschriebenen völlig entsprachen. Diese Veränderungen waren in dem Falle, in welchem die Entmilzung 5 Monate vorher stattfand, zahlreicher als in dem anderen Falle, während sie in einem dritten Falle, sofort nach der Entmilzung, vollkommen fehlten.