

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität München  
[Vorstand: Geheimrat Prof. Dr. M. Borst].)

## Untersuchungen an Knochen wachsender Säugetiere nach Injektion verschiedenartiger Porphyrine<sup>1</sup>.

Von

R. Fikentscher, H. Fink und E. Emminger.

Mit 3 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 18. August 1932.)

In der Forschung nach dem Vorkommen, der Art und der Funktion der Porphyrine gehören die Untersuchungen über die auffallende *Beziehung gewisser „natürlicher“ Porphyrine zum Knochensystem und anderen kalkhaltigen Organen* mit zu den wichtigsten Aufgaben. Diese Beziehung zeigen wohl am eindrucksvollsten die Befunde an Knochen und Zähnen bei jener seltenen Erkrankung der menschlichen angeborenen Porphyrie. Auch bei Tieren kennen wir jetzt einen ähnlichen Krankheitsvorgang; bei der sog. Osteohämochromatose der Tiere (oder „Tierochronose“) konnte der im Skelet und Gebiß abgelagerte Farbstoff — erst in jüngster Zeit — einwandfrei als Porphyrin identifiziert werden. Wichtiger noch als diese *pathologischen* Befunde erscheinen die *physiologischen* Zusammenhänge zwischen dem Porphyrin und den genannten Geweben und Organen. Es darf jetzt als feststehend gelten, daß Porphyrin normalerweise, wenn auch nur in geringen nachweisbaren Mengen, in den Knochen und Zähnen *wachsender* Tiere vorkommt. Ferner wurde Porphyrin in Schalen der Eier und Muscheln und in anderen kalkhaltigen tierischen Organen nachgewiesen. Die *physiologischen Porphyrinbefunde* zeigen also einmal eine außer Zweifel stehende Beziehung zum jugendlichen, noch nicht ausgereiften Skeletsystem, sie lassen zum anderen vermuten, daß den porphyrischen Farbstoffkörpern bei den *Verkalkungsvorgängen* des Organismus eine besondere Rolle zufällt. Damit tritt die *Frage nach der Bedeutung des Porphyrins bei den Wachstumsvorgängen im Skelet* in den Vordergrund des ganzen Aufgabenkreises.

---

<sup>1</sup> Vgl. vorläufige Mitteilung. Klin. Wschr. 10, 2036 (1931).

*Eugen Fraenkel*<sup>1</sup> hat als erster versucht, am Tier durch Einverleibung von Porphyrin eine künstliche Porphyrie zu erzeugen und hierbei vor allem die charakteristische, ausgesprochene Elektivität des Farbstoffes für Knochengewebe unter Beweis zu stellen. Es gelang ihm durch Einspritzungen eines aus dem Harn des Porphyriekranken Petry gewonnenen Porphyringemisches<sup>1</sup> eine Ablagerung des Farbstoffes im Skeletsystem der jugendlichen Versuchstiere zu erzielen. Je nach der Häufigkeit und Menge der Einspritzungen waren die Knochen mehr oder weniger rot oder braunrot, die Zahnkronen bis kirschrot gefärbt (das Knorpelgewebe und der Schmelz der Zähne waren farblos). An den ausgewachsenen Tieren konnte dagegen im Versuch keinerlei entsprechende Färbung — abgesehen von einer leichten Tönung des Gebisses — festgestellt werden. Die Verwandtschaft gerade zum jugendlichen, sich neubildenden Knochen ging noch deutlicher daraus hervor, daß *Fraenkel* im frischen Callusgewebe von künstlich gesetzten Knochenbrüchen eine Porphyrinablagerung auch bei ausgewachsenen Tieren, deren ganzes übriges Skelet ungefärbt blieb, erreichte.

Weitere Versuche mit Porphyrineinspritzungen wurden vor allem von *Hans Fischer* und auf dessen Veranlassung in größerem Umfange von *Hans Königsdörffer* ausgeführt (in der gemeinsamen Arbeit von *Borst-Königsdörffer*). Die Ergebnisse ihrer Untersuchungen bestätigten die oben angeführten Feststellungen *E. Fraenkels*; doch konnte eine Farbstoffablagerung im jugendlichen Skelet nur mit Uroporphyrin erzielt werden; bei Einspritzungen mit anderen natürlichen (Kopro-Ooporphyrin) und künstlichen Porphyrinen (Hämato-Mesoporphyrin) trat keine Färbung auf. „Weder mit spektralen (Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie) noch mit chemischen Methoden ließen sich die genannten Porphyrine in freier Form oder in Form von Komplexverbindungen nachweisen.“ Nach den Ergebnissen *H. Fischers* und *Königsdörffers* besitzen also nicht alle Porphyrine das Vermögen, „auf den Knochen aufzuziehen“, nur dem Uroporphyrin und — wie aus einer weiteren Angabe *H. Fischers*<sup>2</sup> hervorgeht — dem Isuroporphyrin kommt jene Eigenschaft zu.

Diesen Feststellungen stehen neuerdings die Beobachtungen *H. Hammers* entgegen. Er berichtet, mit Hämatoporphyrin (aus Rinderblut nach *Willstätter* dargestellt) eine starke Färbung der Knochen und Zähne von jungen Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen und Hunden erzielt zu haben. Die Wirkung des Hämatoporphyrins trat anscheinend im Unterschied zum Uroporphyrin erst nach mehrmaliger Einspritzung ein. Im übrigen konnte auch *Hammer* die wesentlichen Beobachtungen der früheren Forscher hinsichtlich der Elektivität des Farbstoffes gegenüber dem jugendlichen Knochengewebe bestätigen. Auf die speziellen Untersuchungen *Hammers* an den Zähnen („Überdeckung“ oder Wiederabgabe des abgelagerten Porphyrins) soll im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen werden. Vor kurzem hat *H. Pflüger* an den Zähnen junger, porphyringespritzter Hunde den Porphyringehalt des Dentins mit dem Lumineszenzverfahren nachgewiesen und daraus auf die Wachstumsgeschwindigkeit des Dentins geschlossen<sup>3</sup>. Schließlich muß die experimentelle Arbeit *van Leersums* hier angeführt werden. *van Leersum* will eine künstlich erzeugte Rachitis von Ratten durch Porphyrineinspritzungen geheilt haben. Gerade diese Angabe lenkt unser Augenmerk auf die bei der

<sup>1</sup> *E. Fraenkel* spricht in seiner Arbeit bei den Porphyrinbefunden noch ganz allgemein von „Hämatoporphyrin“. Nach der nunmehr eingetretenen Unterscheidung der Porphyrine kann diese Bezeichnung nicht gleichgesetzt werden dem speziellen Körper „Hämatoporphyrin“ aus der Gruppe der künstlichen Porphyrine.

<sup>2</sup> *Fischer, H.*: Liebig's Ann. Chem. 457, 101 (1927).

<sup>3</sup> Porphyrinuntersuchungen an Zähnen — ohne vorherige Porphyrineinspritzung — wurden in letzter Zeit auch von *St. Loos* ausgeführt.

Rachitis vor allem erkrankten Teile des Knochens, auf die Wachstumszonen und ihre möglicherweise besondere Beziehung zum Porphyrin.

Von den genannten Forschern wurden — soweit aus ihren Arbeiten hervorgeht — besondere Untersuchungen über künstlich erzielte Porphyrinablagerung gerade in den *Wachstumsgebieten* der jugendlichen Knochen nicht vorgenommen. *Derrien*, dem wir vor allem die ersten morphologischen Kenntnisse über die physiologischen Porphyrinbefunde im Körper verdanken, hat allerdings schon ausgesprochen, daß die Porphyrinaufnahme im wachsenden Skelet gerade im Bereich der „aktiven“ *Knochenbildung* festzustellen sei (am Schädelknochen der Ratte z. B. dort, wo die Verknöcherung einsetzt). *G. Schmorl* hat nun angeregt, die Beziehungen des Farbstoffes zu den einzelnen, für die Knochenbildung so wichtigen Gebieten näher zu erforschen und dabei womöglich die „kalklos apponierten jüngsten Knochen-schichten“ und die *verkalkten Knorpelteile der provisorischen Verkalkungszone* auf Porphyringehalt zu prüfen. (Bekanntlich wurde der Knorpel sowohl bei der Porphyrinerkrankung des Menschen und der Tiere wie auch bei der im Tierversuch erzeugten Porphyrie ungefärbt befunden.) *Schmorl* hat selbst Untersuchungen über diese Frage angestellt. Bei dem ihm zur Verfügung stehenden Material konnte er aber seine Ergebnisse nicht zu sicheren Schlüssen verwerten. Er weist dabei vor allem auf die Schwierigkeit in der Deutung der Befunde hin und betont die Notwendigkeit, für diese Arbeiten die hierzu geeigneten Spezialmethoden heranzuziehen. *Schmorl* hat lediglich die Vermutung ausgesprochen, daß die Stärke der Porphyrinfärbung von der Wachstumsenergie der einzelnen Zonen abhängig ist und daß in den Verkalkungszonen, in welchen stärkstes Wachstum stattfindet, weniger Porphyrin abgelagert wird, weil hier die rascheste Gewebseinschmelzung stattfindet.

Wir haben die *Schmorlsche* Anregung aufgenommen, die Porphyrinablagerung gerade in den *Wachstumsgebieten des jugendlichen Knochens* zu prüfen. Gleichzeitig haben wir damit die Aufgabe verbunden, durch Einspritzung *verschiedenartiger Porphyrine* die oben angeführte, umstrittene Frage der *Beziehung der einzelnen Porphyrine zum Knochen-system* einer möglichen Klärung zuzuführen.

### Experimenteller Teil.

Unsere Versuche wurden an größeren Reihen von *wachsenden* Meer-schweinchen, Kaninchen und Hunden vorgenommen. Soweit es uns irgendwie möglich war, wurden für *vergleichende* Beobachtungen Tiere, die von ein und demselben Wurf stammten, gewählt und gleichzeitig, möglichst auch mit gleichen Mengen der einzelnen Porphyrine, gespritzt.

Für alle Versuche hatten wir die entsprechenden *Vergleichstiere* abge-sondert, da wir einerseits einen Maßstab für Wachstum und Ge-deihen, andererseits einen Vergleich zur physiologischen Porphyrie der neugeborenen und ganz jungen Tiere haben mußten.

Man kann den *physiologischen Porphyringehalt* im frühen Lebensalter der Tiere bekanntermaßen meist sehr schön daran erkennen, daß die Zähne im ultravioletten Licht eine Rosafluoreszenz zeigen. Zum exakten Porphyrinnachweis muß aber auch hier möglicherweise die spektrale Analyse herangezogen werden. (Wir werden darauf später noch zurückkommen.)

Einspritzungs- und Vergleichstiere wurden unter gleichen Bedingungen ernährt und gepflegt.

Die für unsere Untersuchungen nötigen Porphyrine verdanken wir *Hans Fischer*. Zur Verwendung gelangten natürliche und künstliche Porphyrine (Koproporphyrin, Hämatoporphyrin, Deuteroporphyrin und Isouroporphyrin). Außerdem stand uns ein Rest von Uroporphyrin „Petry“ zur Verfügung.

Zu unseren Einspritzungen stellten wir Farblösungen folgender Konzentrationen her:

*A. Isouroporphyrin:*

1. eine 1,0%ige  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung mit einem Porphyringehalt von  $0,2\frac{0}{00}$
2. „ 0,2%ige  $\text{NaOH}$ -Lösung „ „ „ „  $1,0\frac{0}{00}$
3. „ 0,5%ige  $\text{NaOH}$ -Lösung „ „ „ „  $2,0\frac{0}{00}$
4. „ 1,0%ige  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung „ „ „ „  $4,0\frac{0}{00}$

*B. Hämatoporphyrin:*

1. eine 1%ige  $\text{KHCO}_3$ -Lösung mit einem Porphyringehalt von  $1\frac{0}{00}$
2. „ 1%ige  $\text{KHCO}_3$ -Lösung „ „ „ „  $3\frac{0}{00}$
3. „ 1%ige  $\text{KHCO}_3$ -Lösung „ „ „ „  $5\frac{0}{00}$ <sup>1</sup>

*C. Koproporphyrin:*

1. Eine  $\text{NaOH}$ -Lösung mit einem Porphyringehalt von  $1\frac{0}{00}$  (Farbstoff in 1 cem einer 1%igen  $\text{NaOH}$ -Lösung verseift, restliche Verdünnung mit Aqua dest.).
2. KOH-Lösung mit einem Porphyringehalt von  $4\frac{0}{00}$  (Farbstoff in 1 cem  $\frac{1}{10}$  n KOH verseift und mit Aqua dest. verdünnt).

*D. Deuteroporphyrin:*

1. eine 1%ige  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung mit einem Porphyringehalt von  $0,5\frac{0}{00}$
2. eine 1%ige  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung mit einem Porphyringehalt von  $1,0\frac{0}{00}$

*E. Uroporphyrin „Petry“.*

Die alte Lösung wurde mit Eisessig gefällt und der Niederschlag mit 1%igem  $\text{NaHCO}_3$  zu einer Lösung mit einem Porphyringehalt von  $1\frac{0}{00}$  verdünnt.

Alle Lösungen wurden sorgfältig filtriert, im Dampfbad bei  $100^\circ$  30 Min. lang erhitzt und keimfrei unter Lichtabschluß verwahrt. Einen schädigenden Einfluß der Sterilisation auf die Farbstofflösung konnten wir in keinem Fall feststellen. Als Einspritzungsnadeln verwandten wir Kanülen aus verchromtem Stahl.

Die Meerschweinchen wurden vom 3. Tag an, die Kaninchen vom 17. Tag an und die Hunde vom 15. Lebenstag an subcutan (zumeist unter die Bauchhaut) gespritzt.

Die Porphyrinkonzentrationen der Lösungen und die Porphyrinmengen bei den einzelnen Einspritzungen wurden von uns absichtlich sehr niedrig gehalten: Die Einzelgaben schwankten im allgemeinen von 0,0001 g bis 0,005 g Porphyrin als Höchstgabe. Zu Beginn eines Versuches wählten wir die geringsten Gaben und erst gegen Ende — wenn das Versuchstier älter und schwerer geworden war — überschritten die Farbstoffmengen bei der Einspritzung 1 mg. Um aber eine genügend starke Porphyrinablagerung im Organismus zu erzielen, mußten wir bei der Kleinheit der Einzelgabe die Gesamtzahl der Injektionen steigern (50 bis 70 pro Versuch) und — da die Tiere in der Mehrzahl täglich nur eine Einspritzung erhielten — den Versuch über längere Zeit ausdehnen. *Fraenkel* verwendete für seine Versuche Sodalösungen, die teils 0,5%, teils 1% Farbstoff enthielten. *Königsdörffer*<sup>2</sup> nahm 1%ige Farbstofflösungen in n/100 Kalilauge und injizierte 2–3mal wöchentlich 0,3–0,6 cem. *Hammer* spritzte täglich 0,5–2 cem einer dünnen

<sup>1</sup> Bei einer zweiten Serie von Hämatoporphyrineinspritzungen verwandten wir eine 1%ige Hämatoporphyrinlösung, als Lösungsmittel eine 1%ige Sodalösung.

<sup>2</sup> Es sei auch an dieser Stelle Herrn Dr. *Königsdörffer* gedankt, daß er uns Einsicht in seine Niederschriften nehmen ließ.

wässrigen Sodalösung mit 0,5–1% Hämatoporphyringehalt. *Im Vergleich zu den genannten Verfassern haben wir also wesentlich kleinere Farbstoffkonzentrationen für die Einspritzungen gewählt — die Lösungen enthielten im allgemeinen  $\frac{1}{10}$  und noch weniger der bisher benützten Porphyrinmengen — und dafür die Versuchsdauer verlängert.* Diese Anwendung hat sich vor allem für unsere Untersuchungen über die Porphyrinablagerung in den einzelnen Wachstums-Zonen des Knochens sehr vorteilhaft erwiesen.

Durch die kleinen Porphyringaben wurden anscheinend auch schwerere Giftschädigungen der Tiere vermieden, wie sie bei starken Konzentrationen schon wiederholt beobachtet wurden. Die Keimfreiheit der Einspritzungsflüssigkeit und die Verwendung geeigneter Lösungsmittel hat sich wohl auch förderlich ausgewirkt. (Wir haben in einem Versuch erprobt, welche Konzentrationen der alkalischen Flüssigkeiten am besten vertragen wurden.) Wochenlang gediehen die Versuchstiere in gleicher Weise wie die Vergleichstiere. Erst dann machten sich zuweilen *Wachstumshemmungen* bemerkbar, vor allem bei den „Deuteroporphyrintieren“. Im übrigen ließen auch diese Tiere keine sonstigen Schädigungen erkennen. Verschiedene Porphyrintiere (fast alle Hunde, einzelne Kaninchen und Meerschweinchen) nahmen so regelmäßig zu wie die Vergleichstiere. Wir haben alle Tiere im diffusen Tageslicht gehalten. Photosensibilisierungsversuche wurden nicht ausgeführt.

Für unsere Aufgabenstellung konnten die *Beobachtungen am lebenden Versuchstier* nur in geringem Maßstab herangezogen werden. Die Rosa- und Rotfärbung der Zähne bei Bestrahlung im ultravioletten Licht gab zwar einen gewissen Anhaltspunkt dafür, ob das gespritzte Porphyrin „aufgezogen“ war. Jedoch ist die Abgrenzung gegen den physiologischen Porphyringehalt der Zähne (s. oben) unter Umständen nicht leicht. Nur wenn beim Versuchstier eine deutlich stärkere Fluoreszenz gegenüber dem zugehörigen Vergleichstier festzustellen war — in den späteren Monaten der Versuchsdauer waren die Zähne der Vergleichstiere sogar meist schon „entfärbt“ — durfte eine künstlich erzielte Ablagerung des Farbstoffes angenommen werden. Es läßt sich aber unseres Erachtens keineswegs aus solchen Befunden eine sichere Diagnose stellen. Noch weniger beweisend für eine Porphyrinablagerung ist — wenn nicht sehr starke Farbstoffkonzentrationen eingespritzt wurden — die Rot- und Rotbraunfärbung der Zähne *bei Betrachtung im Tageslicht*. Wir konnten — auch an nichtgespritzten Tieren — beobachten, wie sehr die Farbtönungen an den Zähnen gleichalter Tiere, ja sogar bei ein und demselben Tier innerhalb weniger Tage wechseln können. Außerdem zeigten bei den Meerschweinchen die Oberzähne schon bald nach der Geburt schmutzig-braunrote Verfärbungen, die im Tageslicht eine Porphyrinablagerung vortäuschen können, bei ultravioletter Lichtbestrahlung aber eine eventuell vorhandene Fluoreszenz überdecken. Auch *E. Fraenkel* weist auf die Schwierigkeit einer Diagnosestellung am Gebiß des lebenden Tieres hin.

Somit konnten allein die *Untersuchungsbefunde am skelettierten Tier* ausschlaggebend sein für die Beantwortung der Aufgabe. Es mußte eine mögliche Veränderung oder Schädigung des abgelagerten Farbstoffes bei der Präparation vermieden werden und ein einwandfreies

Verfahren für den Porphyrinnachweis im Untersuchungsmaterial gefordert worden.

Das Freilegen der Skeletteile erfolgte deshalb ausschließlich mit Messer, Schere und Pinzette, ohne Zuhilfenahme chemischer Agentien, die auf die porphyrischen Farbstoffe hätten einwirken können. Die Präparate waren, wenn sie nicht sofort untersucht wurden, teils in trockenem Zustand, teils in 96%igem Alkohol oder in 10%igem Formalin unter Lichtabschluß aufbewahrt.

Für die Untersuchungen der Skeletteile auf porphyrische Farbstoffe gelten ähnliche Gesichtspunkte wie für den Nachweis des Farbstoffes in den Zähnen. Eine rote oder rotbraune (oft mahagonibraune) Färbung, wie sie porphyrinhaltige Knochen bei Betrachtung im Tageslicht aufweisen, läßt keineswegs von vornherein den Schluß zu, daß es sich wirklich um eine Porphyrinablagerung handelt. Nicht selten können, was uns auch *H. Fischer* bestätigte, „normale“ Tierknochen eine rötlich-braune Färbung zeigen und durch Verfärbungen irgendwelcher Art zu falscher Deutung Anlaß geben. Nur bei ganz eindrucksvollen Befunden und deutlichen Unterschieden gegenüber dem Vergleichsmaterial wird man die makroskopische Betrachtung im Tageslicht zur Diagnosestellung heranziehen dürfen. *Mit Sicherheit* kann freilich nur dann eine Porphyrinablagerung angenommen werden, wenn der Farbstoff mit *chemischen* oder *spektrochemischen* Methoden sichergestellt ist. So hat auch *E. Fraenkel* das abgelagerte Porphyrin exakt (durch *Schumm*) nachweisen lassen.

Wir verwendeten für unsere Untersuchungen vor allem auch die *Lumineszenzanalyse*, die schon *Derrien* zu Erkennung der physiologischen Porphyrine im Tierkörper herangezogen hatte. Die bekannten, sehr eindrucksvollen Fluoreszenzen der Porphyrine bei Bestrahlung im ultravioletten Licht liefern im Spektroskop charakteristische Emissionsbanden, welche eine sichere Diagnosestellung ermöglichen. Da sich durch die Lumineszenzanalyse gerade auch die geringen Porphyrinkonzentrationen nachweisen lassen, mußte sich diese Untersuchungsmethode für unsere Versuche, in denen kleine Farbstoffkonzentrationen zur Verwendung kamen, besonders eignen. So konnten wir im Licht der Hanauer *Quarzanalysenlampe* deutliche Rotfluoreszenzen auch dann noch feststellen, wenn das porphyrinhaltige Skeletstück in gewöhnlichem Licht keine von dem Vergleichsstück abweichende Farbtönung zeigte. Der *physiologische* Porphyringehalt der Knochen kann ebenfalls, wie der der Zähne, eine schwache Lumineszenz liefern. Der Unterschied in der Leuchtstärke gegenüber der künstlich erzielten Farbstoffablagerung ist aber schon nach einigen Tagen der Versuchsdauer bereits sehr stark. Außerdem verschwindet diese „physiologische“ Lumineszenz in den späteren Wochen des Wachstums. Beim ständigen Vergleich mit Vergleichstieren läßt sich also eine Fehldiagnose leicht ausschließen.

Die Schnittpräparate wurden nach dem *Borst-Königsdörffer*-Verfahren mittels eines Spektralanalysenmikroskops<sup>1</sup> untersucht. Gerade die Aufgabe, die einzelnen

<sup>1</sup> Das von *Königsdörffer* angegebene Spektralanalysenmikroskop wird von der Firma *C. Reichert*, Wien, hergestellt. Es hat neuerdings einige Modifikationen erfahren und ist mit einer Lichtquelle (Metallelektrodenlampe nach *Haitinger*), die eine äußerst intensive Ultraviolettstrahlung liefert, ausgestattet. Den zugehörigen Spektralaufsatz zur spektroskopischen oder spektrographischen Definierung der im histologischen Bild auftretenden Farberscheinungen liefert die Firma *Steinheil*, München.

genannten Zonen im Knochen auf Porphyringehalt zu prüfen, war — worauf auch *Schmorl* hinwies — wohl nur unter Verwendung einer solchen Untersuchungsanordnung befriedigend zu lösen. Mit dieser Methodik konnte selbst ein geringer *Porphyringehalt des Gewebes* unmittelbar im Schnitt bei ultravioletter Lichtbeleuchtung (einwandfreie Filterung des Strahlengangs!) mikroskopisch erfaßt und fluoreszenzspektroskopisch bestätigt werden. Bei stärkerer Konzentration wurde auch das Absorptionsspektrum festgelegt. Auf diese Weise wurde der Farbstoff im *chemisch völlig unbeeinflussten Präparat* nachgewiesen und die Fehlerquelle, die bei der Extraktion dieser oft verschwindend kleinen Porphyrinmengen eventuell entstehen konnte, vermieden. Vor allem aber war es möglich, das gefundene Porphyrin in ganz bestimmten kleinsten Gewebsteilen, ja in einzelnen Zellen, nachzuweisen und dadurch seine *Lokalisation* in diesen wichtigen Bezirken einwandfrei festzustellen.

Auf manche Einzelheiten in der Arbeitsmethode wird bei der Beschreibung der von uns erhobenen Befunde noch eingegangen werden.

## I. Untersuchungen über die Affinität der gespritzten Porphyrine zum Skeletsystem.

### Reihe A.: Versuche mit *Isouroporphyrineinspritzungen*.

Die Dosierung wurde für alle Tiere nach der eingangs aufgestellten Art gewählt: Also geringe Anfangsmengen, nur ganz langsame Steigerung der Farbstoffkonzentrationen, dafür verlängerte Versuchsdauer.

1. *Wachsende Meerschweinchen*: Es ließen sich schon nach Einspritzung von insgesamt  $\frac{1}{3}$ —3 mg Isouroporphyrin Lumineszenzerscheinungen an den Zähnen nachweisen, die im Vergleich mit den Kontrolltieren ohne Bedenken (s. oben) als künstlich erzielte Porphyrinablagerung angenommen werden durften. Je nach Alter und Gewicht des Tieres waren die Fluoreszenzen verschieden stark. (Es ist wohl sicher, daß für größere Tiere entsprechend größere Farbstoffmengen nötig sind, um gleich kräftige Färbungen zu bekommen.) Nach Verabreichung von etwa 12—15 mg war auch am Tageslicht eine leichte, bei etwa 25 mg eine deutliche Verfärbung festzustellen.

Skelet der Tiere: Die Skelete zweier Meerschweinchen, von denen jedes insgesamt 0,0797 g bzw. 0,047 g erhielt, zeigten schon im Tageslicht eine deutliche rotbraune Färbung. Tiere, die kleinere Gesamtgaben des Farbstoffes bekamen, zeigten keine von den entsprechenden Vergleichstieren abweichende Knochenfarbe. Im ultravioletten Licht fluorescieren jedoch die knöchernen Skeletteile (Compacta- und Spongiosazonen) *aller* Versuchstiere mehr oder weniger leuchtend rot, Knorpel und Bänder erscheinen dagegen weiß. In einem Fall (Tier 2) genügten schon 3 Einspritzungen von je 0,0001 g, um eine rote Fluoreszenz der gesamten Spongiosa zu erzielen. (Das 15 Tage alte Tier war an einer Erkältungskrankheit eingegangen.)

2. Bei unseren *Kaninchen* und

3. bei unseren *Hunden* bekamen wir ähnliche Ergebnisse bei den Skeletuntersuchungen. Selbstverständlich mußten die Farbstoffmengen größer sein, wenn sie gleich eindrucksvolle Bilder, wie sie an den Meerschweinchen beobachtet wurden, schaffen sollten; z. B.:

a) Meerschweinchen. Gewicht vor Tötung 422 g. Gesamtmenge des eingespritzten Farbstoffes 0,079 g.

b) Hund (Tier 14) Gewicht vor Tötung 12 200 g. Gesamtmenge des eingespritzten Farbstoffes 0,077 g.

Die Knochen von Tier a) im Tageslicht deutlich braunrot; im ultravioletten Licht tief purpurrot leuchtend.

Die Knochen von Tier b) im Tageslicht kein Unterschied zum Vergleichshund, im ultravioletten Licht rosarot leuchtend. (Vergleichsknochen zu b: bläulichgrau, ohne Porphyrinfluoreszenz.)

Knochenschnitte, -schliffe- oder -splitter der Isouroporphyrintiere ergaben auch bei der Untersuchung im Spektralanalysenmikroskop eine deutliche „Primärfluoreszenz“ (d. h. eine Fluoreszenz, die vom untersuchten Gewebe ohne vorherige Einwirkung eines Lösungsmittels ausgesandt wird).

Spektroskopisch zeigt sich in *allen Fällen* ein deutliches *Porphyrin-Fluoreszenzspektrum*. Die Knochen der Vergleichstiere lassen kein Fluoreszenzspektrum erkennen. (Die physiologische Porphyrinfluoreszenz war am Ende der Versuche in keinem Falle mehr nachweisbar.)

#### Reihe B: *Versuche mit Hämatoporphyrineinspritzungen.*

Art der Gabenbemessung grundsätzlich wie bei den Versuchen A.

Die Befunde, die wir aus dieser Versuchsreihe erhielten, sind nicht so einheitlich und eindeutig, wie die, welche wir an den Isouroporphyrintieren erheben konnten.

1. *Meerschweinchen*: Ein Tier (21) von 98 g Gewicht zeigte bei einer Gesamtgabe von 0,0045 g Hämatoporphyrin eine deutliche Rosafluoreszenz des gesamten Skelets im ultravioletten Licht.

Ein zweites Tier (22) ließ bei einer Gesamtgabe von 0,0035 g Rosafluoreszenz der Nagezähne erkennen. Bei einer Gesamtmenge von 0,006 g besteht die Rosafluoreszenz weiter, man sieht im Tageslicht leichte Brauntönung der Zähne, ein Befund, den wir aber nach obigen Ausführungen nicht zu werten wagen. Bei etwa 0,01 g Gesamtgabe zeigt das knöcherne Skelet der Tiere allenthalben rosa Lumineszenz, im Tageslicht jedoch keine Abweichung vom Vergleichsmaterial.

Dagegen bietet das Skelet des Tieres 29 nach einer Einspritzungsmenge von insgesamt 0,012 g keinerlei Porphyrinfluoreszenz. (Bei einer Gesamtmenge von etwa 0,006 g trat vorübergehend (!) stärkere Rosafluoreszenz der Zähne auf, während an den Zähnen des Vergleichstieres keine Porphyrinfluoreszenz nachzuweisen war.)

2. *Kaninchen*: Tier 30 ähnlich wie Meerschweinchen 29, nur noch deutlicher, zeitweiliges Auftreten einer (nichtphysiologischen — Vergleichstier!) Rosafluoreszenz an den Zähnen (bei 0,0075 g Hämatoporphyrin), die nach der 23. Einspritzung bei insgesamt 0,0495 g wieder verschwand. Die verabreichte Hämatoporphyringesamtgabe betrug schließlich 0,1135 g. Das Skelet, am Tageslicht von normaler Farbe, zeigte unmittelbar nach der Sektion an verschiedenen Stellen Rosa- bis Rotfluoreszenz. Bei Fixierung in 96%igem Alkohol und in 20%igem Formalin ging der Farbstoff leider größtenteils in Lösung und wurde dort offenbar zerstört. (Die Lösung zeigte auf kurze Zeit eine schwache Fluoreszenz.)

3. *Hunde*: Eine Porphyrinfluoreszenz war an den Zähnen während des Lebens nicht mit Sicherheit festzustellen. Bei einer Gesamtdarreichung von etwa 0,2 g Hämatoporphyrin ließen sich am Skelet in der Analysenlampe, wenn auch nicht sehr starke, so doch immerhin deutliche Rosa-Rotfluoreszenzen feststellen. Bei Tageslicht bestanden keine Unterschiede gegen das Vergleichsmaterial. Am deutlichsten war die genannte Fluoreszenz an den kompakten Teilen des Schulterblattes und der Fußwurzelknochen zu erkennen; die Spongiosa war im ultravioletten Licht nur stellenweise rötlich leuchtend.

4. Die so wechselnden Befunde veranlaßten uns, weitere Versuche zu unternehmen, und zwar mit bedeutend höher konzentrierten Lösungen. *Hammer* hatte ja ganz ausdrücklich darauf hingewiesen, daß bei künstlichen Porphyrinen, d. h. bei Hämatoporphyrin, das er verwandte, mit wesentlich höheren Porphyrinmengen gearbeitet werden muß. Obwohl es uns gelungen war, auch mit den oben beschriebenen geringsten Mengen



eine Fluoreszenz des Knochens zu erzielen, so reichte das doch nicht aus, um Näheres über die hier, wie es schien, andersgeartete Ablagerung zu erfahren. Weitere Versuche wurden nun mit 1%iger Porphyrinlösung, gelöst in 1%iger Sodalösung, unternommen. Dabei wählten wir Tiere aus, die wir ganz eingehend auf ihre Fluoreszenz an den Zähnen beobachtet hatten: Wir begannen mit den Injektionen erst, nachdem seit mindestens 3 Wochen jede Rosafluoreszenz der Nagezähne, herrührend von dem physiologisch vorhandenen Porphyringehalt der Knochen bei jüngeren Tieren, verschwunden war. Zuerst spritzten wir jeden zweiten Tag 0,5 ccm, dann 1, später 2—3 ccm. Die ersten Fluoreszenzerscheinungen am lebenden Tier, abgesehen von der sehr starken Rotfluoreszenz des Leibes im Bereich der Einspritzungsstellen, sahen wir nach 90 mg an den unteren Nagezähnen. Nach weiteren Einspritzungen konnte eine im Tageslicht sichtbare Verfärbung der Zähne im Vergleich zum Normaltier nicht beobachtet werden. Die hellen Ohren der Tiere fluorescierten bald rosa, ebenso die gesamte behaarte Haut. Als wir unmittelbar nach der Entblutung die Tiere mit der Quarzlampe untersuchten, fehlten die letztgenannten Erscheinungen vollkommen. Lediglich die Zähne zeigten noch einen rosa Farbton.

Die Sektion ergab dann folgendes: Es fand sich eine weitgehende Übereinstimmung des Befundes der verschieden lang gespritzten Tiere. Im einzelnen konnte festgestellt werden: Gegenüber den Kontrolltieren war ein Zurückbleiben im Wachstum deutlich; z. B. Tier Nr. 56: 310 g gegen 395 g des Vergleichstieres im Alter von  $3\frac{1}{2}$  Monaten. Die Zähne und das gesamte Skelet ließen im Tageslicht keinerlei Farbdifferenzen erkennen. Im Bereich der Injektionsstellen am Abdomen fanden sich weitgehende Verwachsungen der Bauchdecken. Außerdem war hier eine auffallend starke Braunfärbung. Die Organe der Versuchstiere waren im allgemeinen etwas kleiner, durchaus entsprechend dem niedrigeren Gewicht im Vergleich zu den Kontrolltieren. Manchmal hatte es den Anschein, als ob die dunkelbraune Leber beim Kontrolltier eher brauner, bzw. dunkler gefärbt sei als beim Normaltier. Bei der Untersuchung im Fluoreszenzlicht fiel sofort die leichte, diffuse Rosafluoreszenz sämtlicher Darmschlingen, überhaupt aller Organe einschließlich der Muskulatur in mehr oder weniger starkem Maße auf. Besonders rot waren die Nebennieren. Im Rahmen dieser Arbeit soll jedoch nur auf die Knochenbefunde näher eingegangen werden.

Nach sorgfältigem Ablösen der Weichteile von den Knochen boten diese im ultravioletten Licht folgendes Bild: Geringe Rosafluoreszenz gegen die Gelenkenden, d. h. der Metaphyse zu, am schwächsten in der Mitte der langen Röhrenknochen. Im Schnitt deutliche Rotfluoreszenz des Knochenmarks im Schaft und zwischen den Spongiosabälkchen der Epi- und Metaphyse. Geringe Rosafluoreszenz der Spongiosabälkchen. Nach mehrmaligem Kratzen an der Compacta, hauptsächlich im Bereich der Diaphyse der Knochen, kamen weiße Schichten zutage. Im ganzen war auffallend die wechselnde Färbung der Knochen im Vergleich zu dem gleichmäßigen Leuchten z. B. der Isouroporphyrinknochen und außerdem die geringe Intensität: Schwache Rosafluoreszenz, während bei den mit Isouroporphyrin gespritzten Tieren schon bei den geringsten Dosen eine Purpurfluoreszenz auftrat. Außerdem müssen wir als auffallend hinzufügen, daß wir, wie schon vermutungsweise bei den ersten Versuchen mit Hämatoporphyrin festgestellt, zum erstenmal eine deutliche Rotfluoreszenz des Knochenmarks feststellen konnten. Sehr lehrreich

war schließlich der Befund bei Tier 60, das nach ständigem Gewichtsverlust schließlich eingegangen war: Hochgradige Abmagerung, Braunfärbung überall, besonders dort, wo die Einspritzungen verabreicht wurden. Aber auch alle Organe erschienen sehr viel brauner als beim Vergleichstier. Am Knochen war allerdings ein Abweichen in der Farbe im Vergleich zum Normaltier nicht festzustellen. Unter der Quarzanalysenlampe hatte sich nun folgendes ergeben: Starke Rotfluoreszenz aller Organe, einschließlich Haut und Muskulatur, besonders auch Zwerchfell. Die Zähne, die übrigens nach Verabreichung von 0,08 g Porphyrin am lebenden Tier schwache Rosafluoreszenz hatten erkennen lassen, fluoreszieren nicht. Die Knochen bieten folgendes Bild: Starke Fluoreszenz aller Gelenkkapsel- und Bänderteile, aller noch anhaftenden Muskulatur; nach ihrer Ablösung gerade hier, wo die Muskulatur fest am Knochen haftete: Rotfluoreszenz des Knochens; weiter auch dort, wo die den Knochen versorgenden Gefäße jeweils in ihn eintreten. An einzelnen Knochen kann man eine in unregelmäßigen Längsstreifen angeordnete Fluoreszenz beobachten; allerdings ließ sich an den meisten Stellen, hauptsächlich auch hier wieder in der Diaphyse, die Fluoreszenz zum Verschwinden bringen, wenn man die oberen Periostschichten abkratzte. An diesen Stellen fand sich dann auch in der Diaphysencompacta im Querschnitt keine Fluoreszenz. Nicht zum Verschwinden zu bringen war die Fluoreszenz meist dort, wo in der Metaphyse ein Rotaufleuchten zu sehen war. Stark fluoreszierte das Knochenmark, ebenso, wenn auch viel dunkler rot, die Spongiosabälkchen.

Die Vergleichstiere zu 1, 2, 3 und 4 zeigten in den in Frage kommenden Stadien der Versuche keine Rotfluoreszenzen der Zähne oder der Knochen.

Die *fluoreszenzspektroskopische Untersuchung* (analoge Messung wie bei A) ergab bei Tier 21 und einem Hundeknochensplitter (aus Reihe B 3) sowie bei den Tierknochen aus Reihe B 4 ein Porphyrinspektrum. Die untersuchten Knochenteile der übrigen Tiere aus Reihe B ergaben, ebenso wie die zugehörigen Vergleichsknochen, kein Porphyrinfluoreszenzspektrum.

#### Reihe C: *Versuche mit Koproporphyrineinspritzungen.*

Art der Dosierung grundsätzlich wie bei den Versuchen A.

Versuchstiere: *Kaninchen* und *Meerschweinchen*.

Bei einer Gesamtmenge von 0,004–0,007 g Koproporphyrin zeigten sich an den Zähnen die ersten Fluoreszenzerscheinungen, die man einer künstlich erzielten Anfärbung zurechnen konnte. Bei einer Farbstoffeinverleibung von insgesamt 0,0125 g (19. Einspritzung) zeigte ein Tier (Meerschweinchen) ein Maximum dieser Fluoreszenz. Nach Verabreichung von insgesamt 0,015 g (25. Einspritzung), spätestens aber nach 0,03 g (30. Einspritzung) verschwand die Lumineszenz bei den Tieren. Dementsprechend war der Befund am *Skelet* der Tiere negativ: In keinem Falle ließ sich irgendeine Porphyrinfluoreszenzerscheinung nachweisen. Die Knochenteile leuchten im ultravioletten Licht fahlgelb-grau. Die Vergleichstiere zeigten in den in Frage kommenden Stadien der Versuche keine Rotfluoreszenz der Zähne oder Knochen.

Bei der *fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung* der Knochenteile (analoge Messung wie bei A) ergab sich bei Versuchstier wie Vergleichstier keinerlei Porphyrinfluoreszenzspektrum.

#### Reihe D: *Versuche mit Deuteroporphyrineinspritzungen.*

Dosierung grundsätzlich wie bei den Versuchen A.

Die Versuche mit diesem Porphyrin verliefen bei *allen* Tieren völlig „negativ“, d. h. in keinem Fall waren während der Injektionsdauer an den Zähnen und nach der Skeletierung an den knöchernen Bezirken irgendwelche künstlich erzielten Porphyrinablagerungen festzustellen. Höchste Gesamtmenge war beim Tier 4

(Meerschweinchen) 0,0325 g Deuteroporphyrin (49 Einspritzungen). Die knöchernen Teile leuchten im ultravioletten Licht bei Versuchs- und Vergleichstier in gleicher Weise fahlgrau.

*Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Knochenteile* (entsprechende Messung wie bei A): Versuchs- und Vergleichsmaterial zeigt kein Porphyrin-fluoreszenzspektrum.

#### Reihe E: *Versuche mit Uroporphyrineinspritzungen.*

Schon bald nach Beginn des Versuches mußten wir feststellen, daß unsere Lösung nicht einwandfrei war. Wahrscheinlich hatte das Uroporphyrin in der alten Lösung (s. o.) beim langjährigen Stehen gelitten. Auch bei den schon gespritzten Tieren verblaßte die anfänglich sehr starke Rotfluoreszenz wieder, sie war am Skelet auch spektroskopisch nicht mehr festzustellen.

Wir stellten die Versuche mit unserer Uroporphyrinlösung daher ein. Da das „*Aufziehvermögen*“ des Uroporphyrins, des natürlichen Knochenporphyrins, durch die Untersuchungen der genannten Verfasser *hinreichend*, auch spektralanalytisch *festgelegt* ist, wollten wir einen zweiten Versuch mit Uroporphyrin, zu dem neue Mengen des seltenen Farbstoffes benötigt wären, nicht vornehmen.

#### *Zusammenfassung und Deutung der Befunde von I.*

Am eindrucksvollsten sind die Ergebnisse, die wir aus den Versuchen mit Isouroporphyrin erhielten. Die Feststellung von *Fischer* und *Heisel*, daß Isouroporphyrin leicht auf den Knochen aufzieht, ist durch unsere Versuche neu bestätigt. Isouroporphyrin ähnelt also in seinem Färbevermögen durchaus dem Uroporphyrin<sup>1</sup>. Die genannten Forscher verwandten pro Meerschweinchen und Tag 10—15 mg Farbstoff. Wir erzielten die positiven Ergebnisse mit Isouroporphyrin mit ganz erheblich kleineren Mengen bei allen unseren Tieren.

Unsere Versuche mit Isouroporphyrin zeigen am besten, daß die von uns gewählte niedrige Gabenbemessung sowie die Art der Durchführung der Einspritzungen von den Tieren ausgezeichnet vertragen wird. Es findet dabei eine *im Sinne des Versuchs sehr gut zu nennende Ausnutzung des Farbstoffes statt*. Das Verhältnis zwischen Körpergewicht und Farbstoffmenge ist für die „*Stärke*“ der „*Anfärbung*“ sicherlich mit ausschlaggebend.

Mit *Hämatoporphyrin* konnte nur bei einem Teil der Tiere am Knochenmaterial eine Rotfluoreszenz im ultravioletten Licht erzielt werden, die beim Spektroskopieren ein Porphyrinspektrum ergab.

Bei den Versuchen mit *Koproporphyrin* war überhaupt nur bei einzelnen Tieren, und da nur ganz vorübergehend, eine Anfärbung der Zähne im Leben zu erkennen. Am Skelet ließ sich keine Porphyrinablagerung nachweisen.

Die Versuche mit *Deuteroporphyrin* ergaben in keinem Fall weder beim lebenden Tier noch am Skelet einen Anhaltspunkt für ein Aufziehen dieses Farbstoffkörpers.

*Die Affinität zum Knochensystem — gemessen am Färbevermögen — ist also bei den beiden Uroporphyrinen weitaus am deutlichsten.*

<sup>1</sup> Versuche mit diesem Farbstoffkörper konnten wir aus den erwähnten Gründen nicht durchführen.

Diese Ergebnisse lassen erkennen, daß unsere Untersuchungen zur Frage der Affinität der verschiedenartigen Porphyrine zum Knochen-system noch keine allgemeine Klärung gebracht haben, wenn sie auch teilweise zu einem feststehenden Ergebnis führten. Sie müssen als Beitrag und Anregung zur Fortführung der Arbeiten in diesem immerhin wichtigen Kapitel gewertet werden.

Soweit es mit unserem Material möglich ist, wollen wir eine *Deutung der widersprechenden, bzw. auffälligen Punkte unserer Ergebnisse versuchen*.

Es muß, wie aus Reihe B hervorgeht, angenommen werden, daß das Hämatoporphyrin doch — wenn auch nur in bescheidenem Maße — bis zu einem gewissen Grad auf den Knochen aufzieht. Wir wagen aber diesen Vorgang des Aufziehens von Hämatoporphyrin nicht der Affinität des Uro- und Isouroporphyrins zum Knochen von vornherein gleichzusetzen. Die nur bei einem Teil der Tiere erzielte Anfärbung und das Wieder-verschwinden einer schon vorhandenen Porphyrinfluorescenz bei einem anderen Teil der Tiere legt die Frage nahe, ob es sich beim Hämatoporphyrin vielleicht um eine lockerere Bindung an den Knochen handelt und ob ein Abbau oder ein Umbau des Farbstoffkörpers stattgefunden hat, der in unseren Befunden teils als positives, teils als zweifelhaftes oder negatives Resultat beeindruckte. Dieselben Fragen gelten natürlich auch in analoger Weise für die andern Porphyrine. *H. Fischer* hat uns hier eine Anregung gegeben, durch „Auswaschversuche“ eventuell zu klären, inwieweit sich die einzelnen Porphyrine in der Stärke ihrer Hinneigung zum Knochengewebe unterscheiden. Ferner sollten wir die Hämatoporphyrinknochen spektroskopisch mit den Isouroporphyrinknochen vergleichen und damit prüfen, ob eine Änderung im Hämatoporphyrinmolekül erfolgte und erst dadurch das Aufziehen hervorgerufen wurde. Es wäre denkbar, „daß der Organismus kleinste Dosen Hämatoporphyrin zwecks Entgiftung carboxyliert und so das Aufziehen herbeiführt und es wäre besonders interessant mit Koproporphyrin die Injektion mit kleinen Dosen viele Wochen hindurchzuführen, weil hier das Carboxylierungsergebnis bereits bekannt ist und es weiter feststeht, daß in den Petryknochen kein Koproporphyrin vorhanden ist, obwohl Petry sein ganzes Leben hindurch eine Koproporphyrinfabrik war.“

*Auswaschversuche:* Die Versuche wurden nach den Angaben von *Fink* folgendermaßen ausgeführt: Es wurden alle Porphyrinknochen je 1 Stunde lang in 10%iger Sodalösung gekocht. Dann wurden die Lösungen unter der Quarzanalysenlampe betrachtet und die gekochten Knochenstücke mit nichtgekochten Teilen des gleichen Knochens vom gleichen Tier und mit Knochen des Kontrolltiers verglichen.

*Ergebnisse:* 1. Isouroporphyrinknochen (Teile eines Schulterblattes von Hund Nr. 14). Die Lösung fluoresciert nach dem Kochen rosa (schwaches Porphyrinspektrum). Der gekochte Knochen hat die leuchtendrote Fluorescenz weitgehend verloren; nur die tiefer gelegenen Teile des Knochens fluorescieren schwach rötlich.

2. Hämatoporphyrinknochen (Teile von Knochen — Beckenschaufel und Röhrenknochen — eines Hundes und Teile eines Hämatoporphyrinkaninchenknochens). Die Knochen beider Tiere zeigten mäßige Porphyrinfluoreszenz, verloren aber, hauptsächlich beim Kaninchen, einige Tage nach der Fixierung zusehends ihre Färbung im ultravioletten Licht. Beide Kochlösungen fluorescieren nicht. Die gekochten Knochen zeigen eine noch geringere Rosafluoreszenz wie die nicht-behandelten Skeletteile.

3. Von Tier 56, Hämatoporphyrinmeerschweinchen aus Reihe B 4, mit 1%iger Lösung gespritzt, werden Knochenteile nach Trocknen in der Sodalösung gekocht: Nach  $\frac{1}{2}$  Stunde tritt eine deutliche Verstärkung der Fluoreszenzerscheinungen ein, die auch nach weiterem Kochen nach insgesamt  $1\frac{1}{2}$  Stunden nicht wesentlich abgenommen hat. Es war die Fluoreszenz dieser Stückchen jetzt mindestens ebenso stark, wenn nicht stärker als die der zum Vergleich teils in Wasser gebrachten, teils trocken gehaltenen Stückchen. Die weißliche glasige Sodalösung ist trübe und fluoresciert nicht.

4. Bei den Auswaschversuchen an den Knochen der Kopro- und Deuteroporphyrintiere, zeigte sich keine Fluoreszenz im Waschwasser.

Außerdem konnten wir beobachten, daß unsere *Entkalkungsflüssigkeiten* (vgl. folgenden Teil II), Trichloressigsäure und Salpetersäure, ebenfalls aus Iso- und Hämatoporphyrinknochen den Farbstoff herauslösen. Die Flüssigkeiten zeigten eine mehr und mehr zunehmende Porphyrinfluoreszenz. Im Knochengewebe hatte diese dagegen deutlich abgenommen.

Zur Prüfung der Affinität des *Uroporphyrins* zum Knochensystem nahmen wir schließlich *Auswaschversuche an den Knochen eines Falls von „Tirochronose“* vor, in welchen dieser tierische porphyrische Farbstoff einwandfrei in größerer Menge nachgewiesen war<sup>1</sup>. Es wurden große Teile von Knochen (vor allem Compacta) des betreffenden Rindes gründlich mit Alkohol und Äther entfettet und in 10%iger Sodalösung, analog den obigen Versuchen, gekocht. Die Lösung hatte nach dem Kochen sehr starke Rosafluoreszenz, welche ein Porphyrinspektrum ergab. Die Porphyrinfluoreszenz der Skeletstücke hatte dagegen deutlich abgenommen. Sie war in den schwächer gefärbten Teilen nach dem Versuch sogar völlig verschwunden. Schabt man aber die entfärbten Schichten in etwa 1 mm Dicke ab, so treten die darunterliegenden Teile mit prächtig roter Fluoreszenz neu zutage.

Der *spektroskopische Vergleich* der Iso- und Hämatoporphyrinknochen mit den Hämatoporphyrinknochen konnte bei dem sehr schwer erkennbaren und schwachen Porphyrinfluoreszenzspektrum, das wir vom Hämatoporphyrinknochen erhielten (s. oben), nicht zur *genauen Feststellung der Art* des abgelagerten Porphyrins führen. Auch nach der chemischen Verarbeitung des Hämatoporphyrinmaterials zur Extraktion des Farbstoffes konnten wir leider keinen spektroskopischen Nachweis des Porphyrins erbringen. Nach unseren Erfahrungen müssen wir wohl annehmen, daß das Hämatoporphyrin in der Zeit nach der Skeletierung bereits zerstört war.

Methode der Verarbeitung des Hämatoporphyrinknochens: 62 g verschrotete Knochen (Hämatoporphyrinhund) wurden, nachdem sie durch mehrtägige Behandlung mit Alkoholäther im Soxhlet weitgehendst von Fett befreit waren, mit 100 cm 5%iger Salzsäure übergossen. Nach 14 Tagen wurde die Lösung abgossen und

<sup>1</sup> Fink, H.: Z. physiol. Chem. **197**, 198; **202**, 8. — Vgl. hierzu R. Fikentscher: Virchows Arch. **279**, 731.

Rückstand erneut mit 100 ccm Salzsäure behandelt. Dieselbe Operation wurde noch zweimal wiederholt. Die vereinigten Lösungen wurden filtriert — Farbe bräunlichgelb ohne Fluoreszenz — und im Vakuum zur Trockene eingedampft. Es wurde auf verschiedenste Weise versucht, spektroskopisch den Nachweis der Anwesenheit des Porphyrins zu erbringen.

a) Ein Teil des Rückstandes wurde in 5%iger Salzsäure aufgenommen und direkt spektroskopiert. Kein Porphyrinspektrum; lediglich sehr geringe Absorption ausgedehnt über den größten Teil des Bandes.

b) Ein Teil des Rückstandes wurde in 10%iger  $H_2SO_4$  aufgenommen. Die unlöslichen Sulfate abfiltriert und das Filtrat spektroskopiert. Ein Porphyrinspektrum war nicht zu erkennen.

c) Ein Teil des Salzurückstandes wurde mit Wasser aufgenommen, mit Essigsäure angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. In der ätherischen Schicht konnte ein Porphyrinspektrum nicht festgestellt werden.

d) Eine weitere Portion wurde 2 Stunden am Rückflußkühler mit Methylalkohol-Schwefelsäure erhitzt. Nach der Filtration wurde mit Chloroform versetzt und mit Wasser entmischt. Im Chloroform konnte das Spektrum des Methylsters nicht festgestellt werden.

Das *verschieden leichte Aufziehen* der einzelnen Porphyrine auf den Knochen ist wohl in speziellen chemischen Konstitutionsverhältnissen (Carboxylgruppen!) der einzelnen Farbstoffe, vielleicht auch in Verschiedenheiten ihres physikalisch-chemischen Verhaltens begründet. Einer von uns (*Fink*) hat an anderer Stelle<sup>1</sup> hierüber ausführlicher berichtet.

Zweifellos müssen zur Klärung noch weitere Versuche in noch größerem Maßstab und unter Verwendung einer noch größeren Anzahl von verschiedenen Porphyrinen bei gleich strengen Versuchsbedingungen (vgl. S. 766) durchgeführt werden.

## II. Untersuchungen über die Porphyrinablagerung in den Wachstumszonen der jugendlichen Knochen.

Für diese Aufgabe konnten wir nur Knochenmaterial, an dem die Porphyrinfärbung einwandfrei gelungen war, also das Skelet der Isouroporphyrintiere heranziehen. Dieses Untersuchungsmaterial lieferte sehr eindrucksvolle Bilder und sichere Ergebnisse. Wir führen die günstigen Ergebnisse — wie schon angedeutet — vor allem auf die *Art unserer Versuchsanordnung* — kleine, nur allmählich sich steigernde Porphyringaben, verlängerte Versuchsdauer — zurück. Die oben genannten Autoren, die sich mit experimenteller Knochenporphyrose beschäftigten, wurden wohl deswegen nicht auf die später von *Schmorl* angeregte Frage gelenkt, weil die von ihnen verwendeten verhältnismäßig hohen Porphyringaben den Knochen allenthalben sehr stark färbten. Die Porphyrinablagerung war in unserem Material dagegen sehr viel geringer. Eventuelle Unterschiede in der Stärke der Porphyrinablagerung in den einzelnen Zonen mußten an unseren weniger „überfärbten“ Knochen

<sup>1</sup> *Fink*: Z. physiol. Chem. **197**, 198.

naturgemäß deutlicher zum Vorschein kommen. Die geringen Mengen des Farbstoffes ließen sich aber trotzdem sehr gut *fluoreszenzanalytisch* mit der beschriebenen makroskopischen und mikroskopischen Methode nachweisen und spektroskopisch identifizieren.

#### Makroskopischer Befund.

Wir betrachten aus unserem Material zunächst Skelete, bei denen die *höchste Porphyrinablagerung* erzielt werden konnte. Es handelt sich also um einen Teil unserer kleineren Tiere, Meerschweinchen und Kaninchen,



Abb. 1. Uvachrom-Farbphoto im ultravioletten Licht. Isouroporphyrinhund 14; Durchschnitt durch langen Röhrenknochen. Die Compacta (C), im unteren Bild von innen gesehen, fluoresciert nur an einigen Stellen der Ränder, sonst größtenteils bei diesem Knochen überhaupt nicht.

die im Verhältnis zu ihrem Körpergewicht sehr große Farbstoffmengen erhielten. Das sorgfältig präparierte Skelet, z. B. von Isouroporphyrinkaninchen 31 (645 g; 0,047 g Isouroporphyringesamtdosis), zeigt im Tageslicht leicht mahagonibraune, vom Vergleichstier abweichende Färbung. Bei Betrachtung im ultravioletten Licht (jedes Rot ist aus der Lichtquelle streng herausgefiltert) leuchten *alle* Teile des knöchernen Systems tiefrot auf. Die Knorpelüberzüge fluorescieren mehr oder weniger blau (manchmal auch violett, wenn das Rot des darunterliegenden Knochenbezirks durch die Knorpelzone durchdringt). Das Periost erscheint matt blaugrau, nach seiner Ablösung tritt das Rot des Knochengewebes noch viel kräftiger zutage. Im Längsschnitt sieht man im Röhrenknochen die gesamte Spongiosa der Epi- und Metaphyse und die Compacta der Diaphyse *gleichmäßig stark fluoreszierend*. Das Knochenmark in Epi- und Diaphyse zeigt keine Porphyrinlumineszenz. Der Epiphysenknorpel fluoresziert ebenfalls blau.

Ganz im Gegensatz zu dieser in allen Knochenbezirken *gleichmäßig stark auftretenden Fluoreszenz* lassen die großen Versuchstiere mit den verhältnismäßig kleinen Farbstoffgesamtmengen eine *ganz verschieden starke Porphyrinablagerung in den verschiedenen Zonen* des Knochensystems erkennen. Diese Tiere sind also im Sinne unserer Aufgabe nicht „überfärbt“. Das Skelet z. B. des Hundes 14 weist im Tageslicht weder bei äußerer Betrachtung noch auf dem Durchschnitt eine abnorme Färbung auf. Im ultravioletten Licht tritt erst nach Abschaben des nichtleuchtenden Periosts eine deutliche, schöne Rosafluoreszenz auf. Die Knorpelüberzüge sind auch hier bläulich gefärbt. Im Längsschnitt des langen Röhrenknochens (wie z. B. in Abb. 1) schimmert der knorpelige Gelenküberzug und der Intermediärknorpel im erregenden Licht blau. Die an diesen Knorpelbezirk sich diaphysenwärts anschließende Schicht (Metaphyse) leuchtet kräftigst rot auf (in Abb. 1 bei a), in geringerem Maße auch das unter der Gelenkfläche befindliche Wachstumsgebiet der Epiphyse (z. B. Abb. 1b). Von beiden Zonen aus nimmt die Porphyrinfärbung gegen die übrigen Knochenteile der Spongiosa hin allmählich ab. Das Gros der Knochenbälkchen in Epi- und Diaphyse weist schließlich überhaupt keine Porphyrinfluoreszenz mehr auf, die Knochensubstanz leuchtet nur in ihrem gewöhnlichen Eigenlicht graugrün. Die ziemlich schwache Rotlumineszenz der Compacta ist in manchen Präparaten in Längsstreifen angeordnet, zwischen denen geringe fluoreszierende Schichten liegen. In manchen Durchschnitten ist die Porphyrinfluoreszenz der Compacta unter dem Periost am stärksten. Die Räume zwischen den Spongiosabälkchen und die Markhöhle der Diaphyse erscheinen

tiefschwarz. In den kurzen Röhrenknochen luminesciert ebenfalls die Compacta nur leicht rosa, die Metaphyse dagegen weit stärker. Manchmal sieht man auch eine mittelstarke Rotfärbung in den subchondralen Teilen des Epiphysenknochenkerns. Sonst keinerlei Porphyrinfluoreszenz in diesen Knochen. Auch in den platten Knochen, so im Schulterblatt<sup>1</sup> und im Beckenknochen kann man im ultravioletten Licht nach Wegschneiden der ganz schwach fluorescierenden, oberflächlichen Compactaschichten eine deutliche Rotfärbung im Gebiet der enchondralen Verknöcherung, d. h. in der unter dem Knorpelrand befindlichen Zone wahrnehmen, während die übrige Spongiosa die „normale“ Knochenfarbe zeigt.

Bei Knochen von Tieren, die sehr wenig Porphyrin erhielten, leuchten überhaupt nur die Wachstumszonen im ultravioletten Licht.

Von den Hämatoporphyrinknochen lassen die platten Knochen, vor allem auch wieder das Schulterblatt eines Hundes, am besten erkennen, daß die Porphyrinablagerung in den einzelnen Zonen in gleicher Weise wie bei den Isouroporphyrinieren verteilt ist. Die Bilder sind bei der geringeren Porphyrinfluoreszenz hier ungleich weniger eindrucksvoll.

Wir fertigten von einzelnen Knochenpräparaten bei ultravioletter Lichtbestrahlung Farbphotos nach dem Uvachromverfahren an. Natürlich ist es hier nicht möglich, die Aufnahmen für alle geschilderten Befunde zu bringen. Die Abb. 1 und 2 zeigen aber wohl eindrucksvoll genug das Wesentlichste in unseren Bildern, die *vorwiegende Porphyrinablagerung in den Gebieten stärksten Wachstums*. Selbstverständlich wurde der Farbstoff spektroskopisch in der geschilderten Weise als Porphyrin sichergestellt.

#### *Mikroskopischer Befund.*

Die Untersuchungen des mikroskopischen Bildes mit der *Borst-Königsdörffer*-schen Methode erlaubte es, die Porphyrinablagerung in den einzelnen Zonen näher zu bestimmen. Die Herstellung von Präparaten, die sich für unsere Aufgabe eigneten, machte große Schwierigkeiten. Um einen deutlichen und einwandfreien Befund erheben zu können, mußten einmal die Schnitte sehr dünn sein, andererseits durften die ursprünglichen Ablagerungsverhältnisse in keiner Weise bei der Anfertigung des Untersuchungsmaterials gestört werden.

Die Entkalkungsflüssigkeiten lösen den Farbstoff aus unseren Porphyrinknochen in der gleichen Weise, wie *Borst-Königsdörffer* es an den Uroporphyrinknochen festgestellt haben. Für die Untersuchung konnte also entkalkter Knochen im allgemeinen nicht verwendet werden. Am *nichtentkalkten* Material war es sehr schwer, Schnitte von einer Größe zu bekommen, die es erlaubten, womöglich alle Zonen nebeneinander in demselben Präparat zu vergleichen. Wir versuchten zunächst in Rasiermesserschnitten, Schliffen und feinstgefeilten Knochenplättchen geeignete Objekte zu bekommen. In den Schliffen und Feilpräparaten waren die ursprünglichen Ablagerungsverhältnisse verwischt. Unter Hunderten von Rasiermesserschnitten bekamen wir einige wenige (von kleineren, nicht allzu spröden Knochen), die die Epi- und Diaphyse im Zusammenhang zeigten. Schließlich konnten wir nach einer abgekürzten Gelatineeinbettung und noch besser nach einer abgekürzten Celloidineinbettung auch mit dem Gefriermikrotom brauchbare Präparate erhalten. (Wir hatten selbstverständlich zuvor festgestellt, daß die kurze Alkohol und Celloidineinwirkung die Porphyrinablagerung nicht verändert hatte.)

Die erhaltenen Schnitte waren teilweise so dünn, daß wir im ungefärbten Präparat deutlich die Knochenzellen mit ihren Ausläufern sehen konnten. Im gefärbten Objekt ließen sich alle wesentlichen Zellstrukturen sichtbar machen.

<sup>1</sup> Wir konnten auch von platten Knochen eindrucksvolle Farbphotos anfertigen, die eine ganz analoge Porphyrinablagerung erkennen lassen, deren Abdruck aber infolge der hohen Reproduktionskosten leider unterbleiben mußte.



Am unentkalkten (!) ungefärbten Schnitt waren lediglich die Osteoidsäume schwer zu erkennen. An gefärbten Vergleichsschnitten (die selbstverständlich immer von demselben Knochen gefertigt waren) ließen sich nach regelrechter Einbettung mit den geeigneten Spezialfärbungen (z. B. Ammoniak-Carminfärbung nach *Schmorl*, *Kossa*-Silberimprägnation, mit und ohne Nachfärbung) die fraglichen Strukturen festlegen.

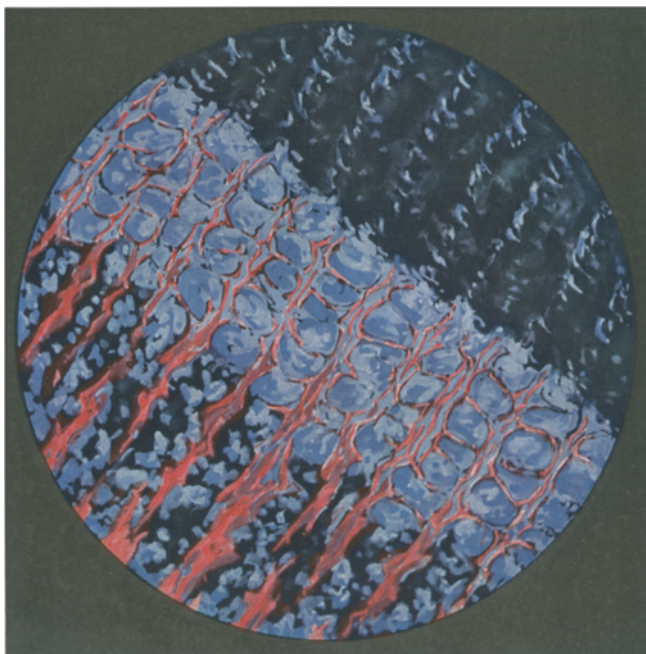


Abb. 2. Unentkalkter, ungefärbter Schnitt durch die Epidiaphysenzone des Femurs eines Isouroporphyrinkaninchens (Tier 31). Bild im ultravioletten Lichtstrahlengang (Kupfersulfat Schwarzglasfilter), im *Königsdörfferschen* Spektralanalysenmikroskop betrachtet. Dunkelfeld. Vergr. etwa 300fach.

Die so gewonnenen Präparate eigneten sich nun tatsächlich sehr gut für die fluoreszenz-mikroskopische Untersuchung. Besonders schöne Bilder bekamen wir z. B. vom Kaninchenfemur (Tier 31) (vgl. Abb. 2).

Im ultravioletten Strahlengang (jedes Rot ist im erregenden Licht natürlich wieder streng herausgefiltert!) erscheint am besten bei Beobachtung im Dunkelfeld eine prächtige Primär-Rotfluoreszenz im Knochengewebe. Bei eingehenderem Studium, bei welchem vor allem die Leuchterscheinungen im Untersuchungsschnitt durch vergleichende Betrachtungen mit dem Hämatoxylin-Eosin gefärbten Vergleichsschnitt (Abb. 3). lokalisiert werden müssen, läßt sich folgendes feststellen: Gebiet des ruhenden, des wuchernden und des Säulenknorpels porphyrinfrei. Im Bereich der provisorischen Verkalkungszone, dort wo die erste Kalkablagerung in die Knorpelgrundsubstanz stattfindet, Porphyrinfluoreszenz.

Die verkalkten Knorpelpfeiler leuchten besonders stark rot auf. Stellenweise auch bei starker Vergrößerung eine Rotfärbung einiger Querbalken. Im Bereich der vordringenden Gefäße, um die primären Markräume herum, werden die leuchtenden Teile immer breiter. Die ganze verkalkte Knorpelgrundsubstanz porphyrinhaltig. Die Knochenbälkchen im oberen Bereich der Metaphyse teilweise ganz, teilweise nur in der Mitte und am Rand gefärbt. Noch weiter gegen die Diaphyse hin hat

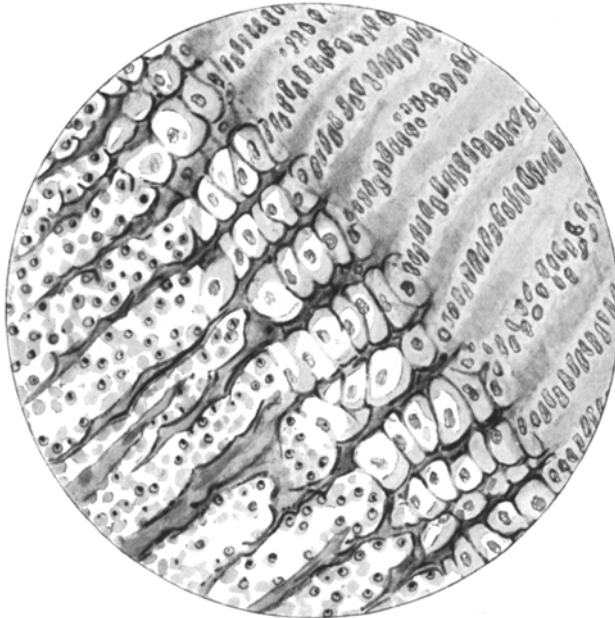


Abb. 3. Kontrollschnitt zu Schnitt Abb. 2 Hämatoxylin-Eosinfärbung. Im Tageslicht betrachtet. Vergr. etwa 300fach.

man den Eindruck, als ob manchmal rote Ränder die Knochenbälkchen umschließen, deren Inneres rote feine Streifen zeigt. Diese Erscheinungen nur bei starker Vergrößerung erkennbar. Die zwischen dem Knochengewebe befindlichen Knochenmarkszellen und Blutkörperchen fluorescieren nicht.

Ganz ähnliche Verhältnisse im Epiphysenbereich. Die Wachstumszone unter dem Gelenkknorpel zeigt die gleichen Porphyrinbefunde wie in der provisorischen Verkalkungszone der Epidiaphyse. Die sich an die Wachstumszone anschließenden Spongiosabälkchen der Epiphyse leuchten ebenfalls in gleicher Weise wie die in der Diaphyse. Eine epiphysenwärts an den Intermediärknorpel sich anschließende Wachstumszone, wie sie *Schmorl* für möglicherweise bestehend annimmt, konnten wir bei der Porphyrinuntersuchung nicht erkennen.

Von den Befunden an den übrigen Schnittbildern sei nur noch das Wesentlichste hervorgehoben: In den Präparaten von Röhrenknochen der Isouroporphyrinhunde ist ganz allgemein die Fluoreszenz der Knochenbälkchen geringer. Die Rotlumineszenz

setzt in der provisorischen Verkalkungszone erst dort ein, wo gegen den Knorpel vordringende Blutgefäße deutlich zu erkennen sind und die verkalkte Knorpelgrundsubstanz Scheidewände zwischen den Markräumen bildet. Eine stärkere Porphyrinablagerung aber erst in den Knochenbälkchen der Metaphyse, in denen ausschließlich nur die mittleren Teile, nicht die Randabschnitte, rot leuchten. Weiter diaphysenwärts die Bälkchen in ihrer ganzen Ausdehnung von der Lumineszenz erfaßt. Gegen den Markraum nimmt dann die Porphyrinlumineszenzstärke mehr und mehr ab. Ebenso leuchtet der überwiegende Teil der Epiphysenspongiosa nicht. Nur im Gebiet der subchondral gelegenen provisorischen Verkalkungszone ist in den mittleren Teilen der jungen Knochenbälkchen, in der eingeschlossenen verkalkten Knorpelgrundsubstanz, eine Porphyrinablagerung erkennbar.

Auch in den Hundeknochen konnten wir die Osteoidsäume nicht mit Sicherheit auf Porphyringehalt prüfen. Anscheinend sind sie porphyrinfrei. Die jüngsten, kalklos angelagerten Knochensäume sind — soweit wir sie überhaupt zu erkennen vermögen (s. o.) — manchmal in die rote Fluoreszenzstrahlung mit einbezogen. Wir halten solche Erscheinungen aber lediglich für Überdeckungen durch benachbarte stärker fluoreszierende kalkhaltige Partien.

An der Compacta sahen wir teilweise die lamellöse Schichtung der fluoreszierenden Bezirke (s. o.)<sup>1</sup>. In manchen Präparaten war die Porphyrinlumineszenz unter dem Periost (periostales Wachstum!) am stärksten.

Der Farbstoff ist, wie die Untersuchung aller Schnitte ergab, diffus im Knochen abgelagert. Ein körniges Pigment kann man nicht nachweisen. Die Prüfung auf sekundäre Fluoreszenz — Auflösung morphologisch faßbarer Farbstoffmengen — ist nirgends gelungen.

Die Fluoreszenz wurde auf Grund der Spektralanalyse im Gewebe direkt, am chemisch unbeeinflussten Knochen als Porphyrinfluoreszenz erkannt.

### *Zusammenfassung und Deutung der Befunde von II.*

Wir haben *Schmorls* Anregung aufgenommen. Bei unseren Untersuchungen kamen wir hauptsächlich zu folgenden Ergebnissen:

Unsere Versuchsanordnung führte zu einer deutlich erkennbaren, *verschieden starken* Porphyrinablagerung in den einzelnen Gebieten des wachsenden Knochens. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den bisherigen, bei experimenteller Knochenporphyrose erzielten Bildern: In den „nichtüberfärbten“ Knochen war eine ganz überwiegende Porphyrinablagerung im Gebiet des stärksten Wachstums, in den Röhrenknochen also vor allem im Gebiet der Metaphyse, in geringerem Maße auch in der unter der Gelenkfläche befindlichen Wachstumszone der Epiphyse festzustellen. Von beiden Zonen aus nimmt die Porphyrinfärbung gegen die übrigen Knochenpartien hin ab. Auch in den platten Knochen ist die meiste Porphyrinfluoreszenz in den Gegenden stärksten Wachstums, den subchondral gelegenen Teilen, zu beobachten. Bei Knochen von Tieren, die sehr wenig Porphyrin erhielten, leuchten überhaupt nur die Wachstumszonen im ultravioletten Licht. Bei „überfärbten“ Tieren (einem Teil unserer kleinen Versuchstiere) wurden diese

<sup>1</sup> Auf die Ablagerung des Farbstoffes in Schichten und die Gründe dieser viel erörterten Erscheinung (in Schüben erfolgende Anlagerung?, teilweiser Wiederabbau des Porphyrins?) soll im Rahmen unserer Aufgabe nicht eingegangen werden.

Unterschiede in der Porphyrinverteilung in den einzelnen Zonen nicht deutlich. Die zum Teil sehr geringen Mengen des abgelagerten Porphyrins ließen sich mit der angewandten Methode gut nachweisen und spektral-analytisch sicherstellen.

Bei der Untersuchung mit der *Borst-Königsdörfferschen* Methode konnte im mikroskopischen Bild ein Porphyrinbefund im Knochen immer dort erhoben werden, wo auch Verkalkung stattgefunden hatte. Es war auch *ganz einwandfrei im Knorpel* eine Porphyrinablagerung nachzuweisen, freilich nur an jenen ganz umschriebenen Stellen der provisorischen Verkalkungszone, an welchen die *Verkalkung* der Knorpelgrunds substanz eingetreten war (verkalkte Knorpelgrunds substanzpfeiler, verkalkte Knorpelgrunds substanzeinschlüsse).

Aus unseren Untersuchungen geht jedenfalls hervor, *daß in den Wachstumszonen des Knochens die stärkste Porphyrinablagerung zu finden ist und daß eine ausgesprochene Verwandtschaft des Farbstoffes gerade zu kalkhaltigen Teilen des Knochens besteht. Die der Verkalkung anheimfallenden Bezirke, Knochen- wie Knorpelteile, verhalten sich also gewissermaßen in unseren Versuchen als „Porphyrintfänger“.*

Weitere Schlüsse wagen wir nicht aus diesen Befunden zu ziehen. Die schon von *Derrien* aufgeworfene Frage, ob es sich bei dieser Porphyrinablagerung lediglich um eine passive Durchtränkung des Gewebes, in dem die Knochenbildung sich vollzieht, handelt, oder ob dem Farbstoff bei diesem Vorgang eine physiologische Rolle zukommt, ist noch ungeklärt.

Es erscheint uns zunächst wichtig, auch die *normalen* jugendlichen menschlichen und tierischen Knochen in ihren einzelnen Wachstumszonen auf Porphyrin mit den von uns angewandten Methoden (vor allem fluorescenz-mikroskopisch) zu untersuchen. Eine solche Untersuchung wird allerdings bei der sehr geringen Menge des hier zur Beobachtung gelangenden Porphyrins nicht leicht durchzuführen sein.

### Schrifttum.

- Borst, M.* u., *H. Königsdörffer*: Untersuchungen über Porphyrie. Leipzig: S. Hirzel 1928. — *Derrien, Eugene*: C. r. Acad. Biol. Paris; und folgende Publikationen (Schrifttum s. *Borst-Königsdörffer*). — *Fischer, Hans*: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **150**, 44 (1925). — *Fischer, Hans* u. *Heisel*: Liebig's Ann. **457**, 101 (1927). — *Fraenkel, Eugen*: Virchows Arch. **248**, 125 (1924). — *Hammer, Heinrich*: Virchows Arch. **277**, 159 (1930); Mschr. Zahnheilk. **1930**, H. 4, 345. — *Leersum, van*: Tijdschr. Genesk. **1923**; J. of Biochem. Jan. **1924**. — *Loos, Stephan*: Z. Stomat. **29**, H. 11 (1931). — *Pflüger, Hans*: Vjschr. Zahnheilk. **1931**, H. 2 (203); Klin. Wschr. **1931**, 572. — *Schmorl, G.*: Virchows Arch. **275** (1929).