

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

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an bleivergifteten Kaninchen mit und ohne Calciumzufuhr.

Von

E. Emminger und G. Battistini.

(Eingegangen am 12. Mai 1933.)

Massa und *Battistini* berichten in einer soeben erschienenen Mitteilung, wie es ihnen gelungen ist, eine bei verschiedenen Krankheitsbildern vorgefundene Porphyrinurie durch intravenöse Calciumapplikation zum Verschwinden zu bringen. In je einem Fall von *Hanotscher* Cirrhose, Polyneuritis mit psychischen Veränderungen, „motorischer Unruhe“ mit Delirien und von Veronalvergiftung war im Urin nach Eisessig-Ätherextraktion (nach *Fischer*) spektroskopisch Porphyrin festgestellt worden. Bei den beiden ersten Krankheiten lagen geringfügige anamnestische Angaben über Lichtempfindlichkeit und Hautpigmentation vor, während die beiden letzten Kranken nichts Derartiges zu berichten wußten. In allen vier Fällen konnte nun nach mehrmaliger intravenöser Injektion von Calciumchlorid das Porphyrin nicht mehr nachgewiesen werden. Die Verfasser gehen im weiteren nicht darauf ein, in welchem Zusammenhang die Porphyrinausscheidung mit dem klinischen Krankheitsbild stand; unerörtert bleibt auch, ob überhaupt, und wenn ja, welchen Einfluß das Verschwinden des Porphyrins aus dem Harn auf den Verlauf der Krankheit gehabt hatte. Es wurden aber im Anschluß an diese klinischen Feststellungen Tastversuche unternommen, die eine Klärung der Wirkungsweise des Calciums zum Gegenstand haben sollten. Zu diesem Zwecke sollte zunächst eine Porphyrinurie beim Versuchstier erzeugt werden; aus verschiedenen Gründen wurde dazu die Vergiftung mit Blei gewählt. Ziemlich rasch konnte auf diese Weise im Urin Porphyrin nachgewiesen werden. Dann wurde Calcium gegeben und schon nach 2 Tagen konnte beide Male Porphyrin im Harn nicht mehr gefunden werden. Diese Versuche sollten unter Mitarbeit von *G. Battistini* am Münchner Pathologischen Institut weiter ausgeführt werden.

Wir stellten nun verschiedene Serien von Versuchen an:

Reihe I. Die Tiere wurden nur mit Blei vergiftet.

Reihe II. Wir gaben den Tieren zuerst Blei und anschließend, nachdem eine einwandfreie Bleiintoxikation festgestellt war, Calcium, wobei das Blei abgesetzt wurde.

Reihe III. Wir fütterten die Tiere mit Blei und gaben gleichzeitig Calcium.

Bei allen Versuchen verwendeten wir Bleiacetat in 2–5%iger Lösung, das wir, in einzelnen Fällen über 8 Wochen lang, täglich peroral mit der Magensonde zuführten. Wir verabreichten dabei im Durchschnitt 0,025–0,100 g pro Kilogramm Körpergewicht im Tag; als seltenes Maximum bekamen einige Tiere subline 0,500 g pro Kilogramm. Calcium gaben wir als 10%ige Calciumchloridlösung, von der wir, soweit notwendig, täglich intravenös 2–3,5 ccm einspritzten. In einem Falle gaben wir Calciumchlorid auch mit der Schlundsonde.

Wie aus den Versuchen *H. Fischers* und *Duesbergs* bekannt ist, handelt es sich bei der Porphyrinurie nach Bleivergiftung beim Tier um die Ausscheidung von Koproporphyrin. Wir konnten daher auf eine Vornahme der Identifizierung des ausgeschiedenen Porphyrins verzichten und uns auf die Feststellung einer Porphyrinausscheidung überhaupt beschränken.

Der Kaninchenurin wurde täglich nach der *Fischerschen* Methode untersucht. Nach Ausschütteln mit Eisessig-Äther wird das Porphyrin mit HCl extrahiert und diese auf Fluorescenz und spektroskopisch geprüft. Um einigermaßen einen Anhaltspunkt für die vermehrte oder verminderte Porphyrinausscheidung zu haben, untersuchten wir immer etwa 30 ccm der täglichen Urinmenge und immer genau nach der gleichen Methode.

In Anlehnung an die Methode von *Fikentscher* durften wir annehmen, daß beim Vergleich zweier porphyrinhaltiger Lösungen, die in derselben Weise hergestellt wurden, eine stärkere Fluorescenz auch einem höheren Porphyringehalt entspricht, wenn die entsprechenden Bedingungen beobachtet werden. Um diese Fluorescenz genauestens prüfen zu können, verwendeten wir die Quarzanalysenlampe, und zur spektroskopischen Untersuchung das Fluoreszenzmikroskop¹.

Schon allergeringste Mengen des Porphyrin, das in Salzsäure übergetreten war, konnten damit als rote Fluorescenz der am Tageslicht völlig farblosen HCl dargestellt werden. Umgekehrt durften wir annehmen, daß bei Fehlen jeglicher Fluorescenz der Porphyringehalt ein nennenswerter nicht sein würde. Daß Spuren von Porphyrin wohl immer im Urin sein werden, darauf weisen ja verschiedene Untersuchungen (*Garrod, Stockvis, H. Fink* u. a. m.) hin. Wenn daher im folgenden von „porphyrinfrei“ die Rede ist, handelt es sich um eine Feststellung entsprechend dem Fluoreszenzbefund, bezogen auf die Menge von 30 ccm Harn. Die Ablesung des Absorptionsspektrums wurde bei 10 mm und wenn da nicht sichtbar, bei 30 mm Schichtdicke vorgenommen. Die ausgeschiedene Tagesharmmenge war ziemlich Schwankungen unterworfen und betrug im allgemeinen zwischen 60 und 150 ccm Urin. Dabei war interessant, daß nach lang dauernder Bleizufuhr die Harnmenge sehr niedrig war, während eine Calciumgabe eine ziemliche Vermehrung des Urins bewirkte. Außer der täglichen Urinprüfung nahmen wir noch regelmäßig Blutuntersuchungen vor, um eine weitere Kontrolle des Vergiftungsgrades und des Allgemeinzustandes

¹ Nähere Angaben hierüber siehe *Borst u. Königsdorffer*: Untersuchungen über Porphyrine. Leipzig 1928.

unserer Tiere zu haben. Bezüglich der Veränderung im Blutbild bei Bleivergiftung ist auf die Versuche *Duesbergs* hinzuweisen, aus denen die regenerationshemmende Wirkung des Bleies und sein störender Einfluß besonders auf das Knochenmark hervorgehen. Einige Tiere waren solange im Versuch, bis sie unter dem Zeichen hochgradiger Anämie und Kachexie eingingen; die Mehrzahl töteten wir durch Entblutung oder durch Nackenschlag.

Bei allen bleivergifteten Tieren fielen übrigens nach längerer Dauer die heftigen Darmkontraktionen auf. Auch war der Kot schließlich ganz klein und hart geworden, nach Gewicht und Umfang bis auf $\frac{1}{10}$ des normalen Kotteilchens gesunken. Die mit jeweils mehreren Vergleichstieren durchgeführten Versuche verliefen alle für jede einzelne Reihe regelrecht. Schwankend war lediglich der Beginn der Bleivergiftung, wobei einzelne Tiere entsprechend ihrem ganzen Gesamtzustand etwas schneller auf die Bleizufuhr ansprachen.

Bei den einzelnen Versuchen konnten wir folgendes feststellen.

Reihe I. Die Tiere reagieren auf die tägliche Bleizufuhr mit langsamer Gewichtsabnahme, Sinken der Erythrocytenzahl und Ausscheidung von Porphyrin im Harn. Anfangswerte für Hämoglobin zwischen 78–81% (Sahli) bei 5 500 000 roten und im Durchschnitt 9000 weißen Blutkörperchen. Diese Werte sinken z. B. bei Tier 16 am 13. Versuchstag nach 5,5 g gesamter Bleiacetatmenge auf 41% — 2 800 000, oder bei Tier 13 am 37. Versuchstag nach 8,75 g gesamter Bleiacetatmenge auf 28% — 1 420 000. Zwischen diesen beiden Grenzen liegen auch die entsprechenden Werte der anderen Tiere. Der anfänglich hellgelbe Urin wird am 3., spätestens 5. Tage rotbraun und schließlich schmutzigbraun und enthält sehr reichlich Porphyrin: deutliche Fluoreszenz der Salzsäure und nach längerer Vergiftungsdauer meist dreibandiges Absorptionsspektrum. Im Blutbild fallen bei hohen Bleigaben und kürzer dauerndem Versuch eine starke Vermehrung der Reticulocyten nach Vitalfärbung und eine ebenso starke Vermehrung der basophil punktierten Erythrocyten auf (z. B. Tier 16). Sehr viel geringer ist die Zunahme dieser Formen bei chronischer Vergiftung mit geringeren Dosen (z. B. Tier 9); auch konnten wir feststellen, daß gegen Ende, als das Tier nur mehr 1150 g wog bei 1700 g Ausgangsgewicht, die Porphyrinausscheidung eine wesentlich geringere als etwa in der Mitte des sich über 8 Wochen erstreckenden Versuches war.

Reihe II. Hier wurde die Fütterung mit Bleiacetat so lange fortgesetzt, bis bei wiederholten Untersuchungen immer wieder Porphyrin deutlich im Spektrum und nach Extraktion in Salzsäure gelöst fluorescierend gefunden wurde. Hämoglobin- und Erythrocytenwerte und Körpergewicht waren gesunken, der Urin war tiefbraun; nach Absetzen von Blei weitere Porphyrinausscheidung. Wurde dann nach 2 Tagen Pause Calcium gegeben, so wurde meist schon nach der zweiten Spritze der Urin hellbraun: Absorptionsspektrum der HCl nicht mehr festzustellen, dagegen noch deutlich eine schwache Rosafluoreszenz der Salzsäure. Nach drei Calciuminjektionen war in fast allen Fällen der Urin hellgelb und wurde als „porphyrinfrei“ (s. oben) befunden. Dasselbe Ergebnis erzielten wir, wenn wir die Calciumgaben sofort, unmittelbar nach Absetzen des Bleies, verabreichten. Wir hatten außerdem durch Vergleichsversuch festgestellt, daß bei dem hier erzielten Vergiftungsgrad die Porphyrinausscheidung während der ganzen 14 Tage, die wir die Calciumversuche maximal ausdehnten, unvermindert anhielt, auch nach Bleiabsetzung; die Tatsache, daß der Urin „porphyrinfrei“ war, konnte somit einwandfrei mit der Calciumzufuhr in Zusammenhang gebracht werden und war nicht abhängig von dem Absetzen der Bleizufuhr. Außer diesem Verschwinden des Porphyrins im Harn konnten wir aber auch eine enorme Vermehrung der basophil

punktierten Erythrocyten und der Reticulocyten nach Calciumzufuhr feststellen. Das Gewicht der Tiere stieg ziemlich rasch an und erreichte innerhalb 14 Tage fast wieder das Ausgangsgewicht. Auch die Hämoglobin- und Erythrocytenwerte stiegen langsam an (bis auf 60% Hämoglobin bei 4 000 000 Erythrocyten). Wie stark die Wirkung des Calciums sein kann, sehen wir in einem besonderen Fall (Tier 13): Ein Tier der Reihe I bekam nach über 5 Wochen Versuchsdauer bei schlechtestem Allgemeinzustand ein hochgradiges Lungenödem. Da wir das Tier unter allen Umständen noch länger lebend erhalten wollten, setzten wir Bleiacetat ab; der Urin war am Abend braun; dann injizierten wir auf einmal 3 ccm Ca, und am nächsten Morgen wieder: der Urin war am Nachmittag hellgelb; Porphyrin war nur in Spuren fluorescenzmäßig nachzuweisen; bei täglicher Calciuminjektion war schließlich Porphyrin zwar nicht verschwunden, aber doch sehr gering geworden. Das Tier ist am Abend des 4. Tages nach Absetzen des Bleiacetates dann noch gestorben, nachdem es sich vorübergehend, wie wir annehmen unter dem Einfluß des Calcium, erholt hatte. Daß wesentlich die Menge des zugeführten Calciums von Bedeutung war, konnten wir aus einem Versuch ersehen, bei dem wir Unterbrechung der Ca-Zufuhr vornahmen (Tier 14): Nachdem wie bisher nach einwandfreier Bleiintoxikation durch Calcium bei Absetzen des Bleies die Porphyrinurie abgestoppt worden war, trat prompt 1 Tag nach Aussetzen der Ca-Zufuhr wieder Porphyrin, wenn auch in geringen Mengen, im Urin auf. Ja selbst, nachdem seit der letzten Bleigabe 11 Tage verflossen waren und immer wieder Ca gespritzt wurde, trat nach Absetzen von Ca am 11. Tage am 12. Tage prompt Porphyrin, durch Rosafluorescenz und schwaches Absorptionsspektrum (2 Banden in 30 mm Schicht) kenntlich, auf.

Reihe III. Bei diesen Versuchen gaben wir jeweils am Vormittag Blei, und 2 Stunden später Calcium; dabei wählten wir eine möglichst hohe Dosis, 0,250 bis 0,500 g Bleiacetat, um rasch und massiv genug eine Vergiftung zu erzielen. Wir wußten aus den Versuchen der Reihe I, daß die angewandten Dosen von Blei, allein gegeben, spätestens am 4. Tage eine Porphyrinurie hervorrufen mußten. Diesmal aber fanden wir in keinem unserer Versuche Porphyrin im Harn: Urin war nach wie vor hellgelb, keine Fluorescenz, kein Absorptionsspektrum. Auch dann nicht, wenn wir vorübergehend Calcium- und Bleizufuhr während eines Tages unterbrachen, gleichsam, um die vielleicht stärkere Komponente der Bleiintoxikation besser wirken zu lassen. Allerdings findet sich ein ganz langsames Absinken der Blutwerte, wie z. B. von 81 auf 71% Hämoglobin oder von 78 auf 64% Hämoglobin. Die Erythrocyten fielen nicht unter 4 600 000. Dieses, wenn auch geringe Absinken von Hämoglobin und Erythrocyten scheint doch darauf hinzuweisen, daß trotz fehlender Porphyrinausscheidung eine schädliche Bleiwirkung vorliegt. Es könnte indes auch möglich sein, daß die täglich injizierten 3 ccm Calciumchlorid intravenös nicht genügten, um die toxische Wirkung des Bleies auf den Organismus zu coupieren; daß Bleizufuhr und Calciumzufuhr in einem mengenmäßig irgendwie proportionalen Verhältnis stehen müssen, darauf wiesen wir ja schon oben hin. Es dürfte auch ein weiterer Versuch hierfür sprechen (Tier 15, Reihe III): Trotz sorgfältigster Ausführung gelang es in einem Falle nicht, das Calcium intravenös richtig zu applizieren: die Ohrvenen erwiesen sich in diesem Falle als zu klein und die infolge des neben die Vene gespritzten Calciums entstandenen Nekrosen veranlaßten uns, Calcium intravenös abzusetzen; wir versuchten nun, das Calcium kurz nach dem Blei ebenfalls peroral zu geben: bei durchschnittlich 0,250 g Bleiacetat (= 5 ccm in Lösung) verfütterten wir jetzt statt 2–3 ccm intravenös 10 ccm peroral Calciumchlorid 10%ig. In der Folgezeit fand sich bei täglicher Urinkontrolle manchmal kein Porphyrin; meist aber trotz des bräunlichgelben Aussehens des Urins zwar keinerlei Absorptionsspektrum der Salzsäure, aber eine, wenn auch nur äußerst geringe rosa Fluorescenz der HCl. Das dürfte für eine sehr geringe Vermehrung der Porphyrinausscheidung sprechen. Denn im HCl-Rest des normalen

Kaninchenharns haben wir bei gleicher Methodik nie auch nur eine Spur von Fluoreszenz, geschweige denn ein Absorptionsspektrum feststellen können.

Diesen Befunden müssen wir die Ergebnisse hinzufügen, die wir bei der Untersuchung verschiedener Organe unserer Tiere erhalten haben.

Bei allen untersuchten Nieren der Tiere aus der Reihe I konnten wir eine Parenchymschädigung in mehr oder weniger ausgeprägtem Maße feststellen; im auffallenden Gegensatz hierzu wurden die Nieren von Tier 14, Reihe II, und Tier 18, Reihe III, als vollständig unversehrt im histologischen Bild befunden. In der Milz fanden wir bei fast allen Tieren grobschollige braune Pigmente im Hämatoxylin-Eosinpräparat, die deutlich positive Eisenreaktion ergaben; dabei scheint der Hämosideringehalt keineswegs mit der Vergiftung durch Blei in einem Zusammenhang zu stehen; es fand sich nämlich bei verschiedenen gleich lang und stark bleivergifteten Tieren im histologischen Bild ein sehr wechselnder Eisengehalt.

In der Leber fand sich bei einigen Tieren der Reihe I eine diffuse feinkörnige Pigmentierung der Leberzellen, neben vereinzelt groben gelbbraunen Pigmentschollen, die zwischen den Läppchen im *Glissonschen* Gewebe gelagert waren. Diese Befunde waren indes nicht immer gleichmäßig; eine positive Eisenreaktion wurde nicht festgestellt.

Nebennieren, Schilddrüse, Pankreas und Lunge waren — von peribronchialer Entzündung bzw. pneumonischer Infiltration in einigen Fällen abgesehen — ohne histologisch erkennbare Veränderung.

Sämtliche angeführten Organe unterzogen wir anschließend einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung¹; die sowohl in Alkohol wie in Formalin fixierten Organe wurden in Paraffin eingebettet und trocken aufgezogen.

Untersucht wurde auf primäre Fluoreszenz und auf sekundäre Fluoreszenz nach Einwirkung von Glycerin-NH₃ bzw. Pyridin, bzw. Äther-Eisessig bzw. Salzsäure. Wir können zusammenfassend sagen, daß wir einen positiven Befund in bezug auf eine Porphyrinfluoreszenz in keinem der untersuchten Präparate erheben konnten. Verwunderlich war jedenfalls, daß wir bei unserer Methodik nicht einmal in der Niere trotz enormer Porphyrinausscheidung im Harn, Porphyrin nachweisen konnten; es kann dies entweder daran liegen, daß etwa vorhandenes Porphyrin im Verlauf der Einbettung verloren ging, oder daran, daß eine Bleieinwirkung zu wenig lang stattgefunden hatte, als daß Porphyrinfärbungen zu erwarten wären; oder es wäre denkbar, daß das durch die Nieren ausgeschiedene Porphyrin eben überhaupt nicht als Pigment oder sonstwie morphologisch faßbar im Körper abgelagert wird.

Die Knochen erwiesen sich im Fluoreszenzmikroskop als porphyrinfrei.

¹ Fluoreszenzmikroskop von *Borst-Königsdörffer*.

Bei der Untersuchung des Magen-Darmtractus fiel vor allem der starke schwärzliche Bleiniederschlag im Magen auf. Makroskopisch erkennbare Verätzungen in Oesophagus und Magen fanden sich nicht. Dagegen konnten vom pylorusnahen Magenteil und insbesondere vom Duodenum sehr reichliche Massen eines gelbweißen Schleimes abgestrichen werden; im Ultraviolettlicht zeigte dieser bei zwei länger vergifteten Tieren der Reihe I (Nr. 9 und 19) eine deutliche Rosafluoreszenz und im Spektroskop auch ein für Porphyrin charakteristisches Fluoreszenzspektrum. Die Schleimhaut selbst zeigte im Frischpräparat, sowie nach Fixation und Einbettung nirgends Fluoreszenz; im Hämatoxylin-Eosinpräparat fanden sich aber entzündliche Infiltrationen der Schleimhaut des Duodenums und Schleimhautnekrosen. Auffallend war, daß auch bei Tier 14 aus der Reihe II eine sich ganz ähnlich verhaltende Fluoreszenz des Schleimes sich fand; in anderen Fällen wurde davon nichts festgestellt. Es wäre möglich, diese Fluoreszenz auf postmortal rückläufig bis zum Magen geflossene Galle zurückzuführen; in drei untersuchten Fällen der Reihe I konnten wir nämlich eine geringste Fluoreszenz der HCl nach Extraktion der aufgefangenen Blasengalle feststellen; bei Nr. 14, Reihe II, gelang es uns indes nicht, die sehr geringe Menge Galle zweckmäßig aufzufangen, so daß wir mit Erfolg eine Extraktion nicht vornehmen konnten.

Daß allerdings mit dem schlagartigen Aufhören der Porphyrinausscheidung in Reihe II nach geringer Ca-Zufuhr schon die Giftwirkung des Bleies vollständig ausgeglichen wäre, dagegen spricht nicht nur die wahrscheinliche Anwesenheit des Porphyrins in der Galle, sondern auch insbesondere das Ergebnis der Knochenmarksuntersuchung, über das wir noch kurz berichten wollen:

Entsprechend dem Alter unserer Versuchstiere mußten wir erwarten, daß bei der Sektion ein rotes bzw. noch jugendliches Knochenmark beim Normaltier vorliegen würde; das ist auch bei den drei für die verschiedenen Reihen angesetzten Kontrolltieren der Fall gewesen; das dunkelrote Knochenmark zeigte eine ausgesprochene schwarzviolette Fluoreszenz im Ultraviolettlicht. Im Ausstrichpräparat werden bei geeigneter Beleuchtung und Filtrierung deutlich die einzelnen Zellen in ihrer gleichmäßig fahlgrünen (durch Filtrierung hervorgerufen!) Eigenfluoreszenz gesehen, bei Färbung nach *May-Grünwald-Giemsa* der charakteristische Befund eines jugendlichen Knochenmarks.

Anders der makroskopische Befund am Knochenmark der Tiere aus der Reihe I: Das Knochenmark ist himbeerrot, hauptsächlich aber nur in den langen Röhrenknochen und da nur in den rumpfnahen, nicht mehr in Radius und Ulna, nicht mehr im unteren Teil der Tibia und nicht in allen kurzen Röhrenknochen; dagegen sehr deutlich in Scapula, Rippen und Schädelknochen. Überall dort, wo dieses himbeerfarbene Mark zu sehen ist, fluoresciert es auch intensiv rot im Ultraviolettlicht. Das andere, mehr graurote glasige Mark fluoresciert nicht, es besteht

sehr reichlich aus Fettmark. (Die nachfolgenden Ausstrichpräparate stammen alle aus den fluoreszierenden Knochenmarksgebieten bzw. aus Femur- oder Humerusknochenmark.)

Bei Ausstrich- bzw. Tupfpräparaten vom Knochenmark der Tiere der Reihe I sieht man im gefärbten Präparat eine deutliche Vermehrung der eosinophilen Punktierung der myeloischen Elemente; die jugendlichen Roten sind etwas vermehrt und die „Makroblasten“ nach *Speransky* und *Sklianskaja* treten deutlich hervor und sind in jedem Gesichtsfeld vermehrt vorhanden. Selbstverständlich fehlen auch die Normo- und Proerythroblasten nicht. Im Ultraviolettlicht nun bekamen wir im Gegensatz zu den bisher negativen Organbefunden ein positives Ergebnis: Mitten in die wie beim Kontrolltier gelbgrün fluoreszierenden Knochenmarkszellen sind solche von prächtig roter Fluoreszenz gestreut, die auch dem Kontrollbeobachter sofort als deutlich rot fluoreszierend imponierten. Durch eingehende Färberversuche am Objektisch hatten wir dann feststellen können, daß es sich bei diesen Zellen um solche aus der Erythroblastenreihe handelt, und zwar vornehmlich um Makroblasten. Wir glauben damit auch fluoreszenzmäßig die Anschauung verschiedener Untersucher wie *Nägeli*, *Duesberg* u. a. bestätigen zu können, daß das Blei primär das Knochenmark schädige. Wir glauben aus unseren Befunden schließen zu dürfen, daß hier auch der Ort der Porphyrinbildung sein müsse, um so mehr, als wir im strömenden Blut nur selten eine Zelle aus der Erythroblastenreihe bei unseren Versuchen der Reihe I haben nachweisen können, in keinem Falle aber eine einwandfreie fluoreszierende Zelle.

Die durch Blei gesetzte Schädigung des Knochenmarkes scheint nun keineswegs durch Calcium so schnell aufgehoben zu werden, als es dem Verschwinden des Porphyrins entspricht. Denn wenn auch in ungleich geringerer Anzahl, so fanden wir doch in einem Falle vereinzelt im Knochenmarkstupfpräparat eines Tieres der Reihe II (Tier 14) Zellen, Erythroblasten, die fluoreszierten. Die geringe, anscheinend immer noch produzierte Porphyrinmenge scheint also eben doch zu gering zu sein, als daß sie einen mit der gebrauchten Methode und vielleicht deren zu grobschematischen Anwendung (z. B. Beschränkung der Untersuchung auf nur einen Teil der Harnmenge usw.) nachweisbaren Porphyrin-gehalt im Urin hätte ergeben können.

Ganz überzeugend scheint weiterhin der bei Tier 18 der Reihe III gelungene Versuch zu sein, wo bei gleichzeitiger Calcium- und Bleizufuhr eine Fluoreszenz im Knochenmark des langen Röhrenknochen nicht zu sehen war und dieses auch makroskopisch ganz dem des Normaltieres gleich. Allerdings müssen wir hinzufügen, daß in rechter und linker Scapula sich einige Stellen mit schwach rötlich fluoreszierendem Knochenmark fanden, wenn wir auch im Ausstrichpräparat eine Fluoreszenz von einzelnen Zellen trotz eingehenden Suchens einwandfrei nicht haben feststellen können.

Wenn wir vorhin davon gesprochen haben, daß nirgends eine morphologisch faßbare Porphyrinablagerung im Organismus vorhanden zu sein scheint, so gilt das nur mit einer Einschränkung: Wir haben bei drei länger vergifteten Tieren der Reihe I (Tiere 9, 13, 16) eine Porphyrinablagerung feststellen können, und zwar in jedem der drei Fälle übereinstimmend und gleichmäßig in den trachealen Ringknorpeln, den Kehlkopfknorpeln und in den dem knöchernen Schädel nächstliegenden Partien des Ohrknorpels. Wir sahen dabei deutlich eine Rosafärbung im Ultraviolettlicht und nachdem wir von frischem, unfixiertem Material Schnitte angefertigt hatten, konnten wir auch im Fluoreszenzmikroskop eine für Porphyrin in seinem Spektrum charakteristische Rotfärbung der Knorpelzellen sehen. Interessant ist die Anordnung: Hauptsächlich rechts und links von einer gedachten Mittellinie durch den Querschnitt eines Ringknorpelstückchens läuft ein schmaler Saum fluoreszierender Knorpelzellen, der manchmal ganz schmal, etwa nur eine Zelle umfassend, manchmal auch sehr breit ist. Die Fluoreszenz aller dieser knorpeligen Anteile ist gegen das Licht unserer Lichtquelle sehr empfindlich und verblaßt sehr rasch.

Wir versuchten, durch Kalkfärbungen einen etwaigen Zusammenhang zwischen gerade dieser Lokalisation der Porphyrinablagerung und einer möglichen Verkalkung des Knorpels festzustellen. Indes, in zwei Fällen fiel der Kalknachweis negativ aus und im dritten Fall — das Tier hatte sub fine einige Male Ca intravenös bekommen (Tier 13, s. oben) — war die Kalkreaktion in derselben Weise positiv wie in anderen in Reihe II bzw. III laufenden Fällen. Immerhin bleibt gerade im Zusammenhang mit unserer früheren Arbeit — wenn auch dort die „Knorpelverhältnisse“ grundsätzlich andere waren — die Tatsache bemerkenswert, daß wiederum im Knorpel, der ebenfalls, wie die Versuche der Reihen II und III und der des Tieres 13, Reihe I, zu bestätigen scheinen, eine besondere Affinität zum Calcium besitzt, eine Porphyrinablagerung festgestellt werden konnte.

Schließlich müssen wir auch noch auf eine Arbeit von *G. O. E. Lignac* hinweisen. *Lignac* hatte versucht, Calcium und Porphyrin gleichzeitig weißen Mäusen zu applizieren.

Er sensibilisierte weiße Mäuse nach Hämatoporphyrininjektionen durch anschließende Bestrahlungen. Wenn er den Tieren zuerst und auch noch gleichzeitig mit dem Porphyrin Ca intramuskulär verabreichte, waren alle Sensibilisierungserscheinungen sehr gering, ja sogar der Exitus läßt sich im Vergleich zu den Kontrolltieren hinausschieben oder trat gar nicht ein. Zur Begründung dieser merkwürdigen Tatsachen führt *Lignac* verschiedene in Frage kommende Möglichkeiten an. Das Wichtigste scheint ihm eine evtl. mögliche Bindung des Calciums an das Porphyrin zu sein; damit scheint das Porphyrin auf Bestrahlung nicht mehr zu reagieren.

Es erscheint uns jedoch auch mit dem vorliegenden Material keineswegs geklärt, warum und wie gerade das Calcium, auf dessen Beziehung zum Porphyrin wir schon an anderen Orten hinwiesen, einen so überraschenden Einfluß auf die Porphyrinausscheidung hat. Zu denken wäre natürlich auch daran, ob nicht vielleicht durch das Calcium eine Änderung in der Porphyrinausscheidung hervorgerufen wird; möglicherweise könnte ja das gesamte Porphyrin im Kot ausgeschieden werden. Wir werden jedenfalls versuchen, der Lösung des Problems weiter durch neue ähnliche Versuche näherzukommen.

Zusammenfassung.

1. Die Befunde, daß Ca die Porphyrinausscheidung nach Bleivergiftung hemmt, werden bestätigt und durch Varianten der Versuchsanordnung erwehrt.

2. In den Organen konnte weder bei Bleivergiftung allein noch bei nachträglicher oder gleichzeitiger Calciumzufuhr eine Porphyrinablagerung gefunden werden, mit Ausnahme bei lang dauernder Bleivergiftung in Trachea-, Schild- und Ohrknorpel.

3. Es werden im Fluoreszenzmikroskop die Erythroblasten als porphyrinführende und wahrscheinlich auch porphyrinbildende Zellen im Knochenmark bleivergifteter Kaninchen festgestellt.

Schrifttum.

Borst u. Königsdörffer: Untersuchungen über Porphyrine. Leipzig 1928. (Vgl. die dort angegebene Spezialliteratur.) — Fikentscher, R.: Biochem Z. **249**, 257 (1932). — Fikentscher, Fink u. Emminger: Virchows Arch. **287**, 764 (1933). — Fischer, H. u. Duesberg: Arch. f. exper. Path. **166**, 95 (1932). — Duesberg, R.: Arch. f. exper. Path. **162**, 249 (1931). — Lignac, G. O.: Krkh.forsch. **1**, 177 (1925). — Massa u. Battistini: Pathologica. (Parma) **25** (1933). — Speransky u. Sklianskaja: Fol. haemat. (Lpz.) **95** (1928).
