

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

Untersuchungen an künstlich rachitisch gemachten Ratten nach Injektion von Porphyrin (I).

Von

E. Emminger und B. Büchele.

(Eingegangen am 2. Mai 1935.)

Die Tatsache, daß bei der kongenitalen Porphyrie eine braunrote Verfärbung des ganzen Knochensystems gefunden wird, die durch Porphyrinablagerung bedingt ist, hat den Anstoß zu einer Reihe von Untersuchungen gegeben, die den Zusammenhang zwischen Porphyrin und Kalkablagerung zu klären versuchten.

Die letzten diesbezüglichen Untersuchungen von *Emminger* und *Battistini*, daß bei bleivergifteten Kaninchen die Porphyrinausscheidung durch Calciumzufuhr gehemmt wird, ebenso wie die Ergebnisse der Untersuchungen von *Fränkel* und auch von *Fikentscher-Fink-Emminger* lassen erkennen, daß besondere Beziehungen zwischen Porphyrin und Kalkstoffwechsel bestehen. Der Gedanke lag nun nahe, diese Beziehungen bei einer Störung des Kalkstoffwechsels zu studieren; wir versuchten das bei der Rachitis mit ihren abnormen Wachstums- und Verkalkungsverhältnissen.

Die Frage der Beziehung Porphyrin und Rachitis wurde schon von *van Leersum* angegangen; er will mit Porphyrin eine Heilung der experimentellen Rattenrachitis erzielt haben. Er injizierte Dosen von 10 bis 30 mg „zoutzure haematoporphyrine“. Welches der Porphyrine dabei zur Verwendung kam, ist aus der Originalarbeit *van Leersums* nicht ersichtlich. Ob er das Porphyrin *Nenki* injizierte, für welches heute das Wort „Hämatoporphyrin“ vorbehalten ist, oder ob er den Salzsäure-(= zoutzure) Extrakt von porphyrinhaltigem Urin verwendet hat, sei dahingestellt. *Van Leersum* hat *McCollum*-Ratten nach röntgenologischer Feststellung der Rachitis einen Hinterfuß amputiert, dann „Hämatoporphyrin“ gespritzt und nach einiger Zeit das Tier getötet. Beim histologischen Vergleich beider hinteren Extremitäten konnte er eine Heilung der Rachitis feststellen (positiver „line-test“). Er führt diese Heilung auf eine mittelbare Wirkung des Porphyrins zurück, derart, daß das Porphyrin die Haut der Ratten für das abgeschwächte Tageslicht — die Ratten wurden in einem mäßig erhellten Keller gehalten — sensibilisiert. Diese schwache, diffuse Lichtwirkung soll durch die Sensibilisierung mittels Porphyrin so verstärkt werden, daß sie einer Ultraviolettbestrahlung gleichkommt und damit die Rachitis zur Heilung bringt.

Unsere Versuche, die *van Leersums* Ergebnisse nachprüfen sollen, sind noch nicht ganz abgeschlossen; es soll zunächst eine Vorfrage studiert werden, die Porphyrinablagerung bei der Rattenrachitis¹.

Bei unseren Versuchen kam Iso-Uroporphyrin zur Verwendung — das Porphyrin mit dem besten „Aufzugsvermögen“ auf den Knochen —, das uns in dankenswerter Weise von Herrn Geheimrat *H. Fischer* zur Verfügung gestellt wurde.

Wir stellten eine 1%ige Lösung von Iso-Uroporphyrin, gelöst in 0,2%iger Natronlauge, her. Injiziert wurden Dosen von 0,3—1,0 mg Porphyrin unter die Rückenhaut der Ratten. Die Lösung selbst kann unter den getroffenen Vorsichtsmaßregeln als steril bezeichnet werden. Es sei hier erwähnt, daß die Tiere die Injektionen im allgemeinen gut vertragen. Wenn trotzdem zahlreiche Versuchstiere eingegangen sind, so war das auf eine intercurrente, katarrhalische Infektion zurückzuführen.

Die experimentelle Rattenrachitis.

Seit den klassischen Versuchen *McCollums* und Mitarbeiter, ferner von *Sherman* und *Pappenheimer* gilt die Ratte als das Versuchstier, bei dem sich auf diätetischem Wege eine typische Rachitis erzeugen läßt. Es soll hier nicht auf den Streit eingegangen werden, ob die Rattenrachitis mit der menschlichen Rachitis identisch ist. Beide müssen ja verschieden sein, da die Lebensbedingungen von Mensch und Ratte verschieden sind (*Pfaundler*). Bei der Ratte besteht im Gegensatz zum Menschen die Möglichkeit, in den komplizierten Stoffwechselmechanismus dadurch einzugreifen, daß durch vermehrte Calciumzufuhr eine Phosphatverarmung des Organismus entsteht, da das aufgenommene Calciumcarbonat im Darm als Phosphat ausgeschieden wird. Diese Hypophosphatämie führt am Knochensystem zu einer Störung, für die die pathologisch-histologischen Kriterien der Rachitis erfüllt sind, nämlich vermehrte Knorpelwucherung auf Grund verzögerten, unregelmäßigen Abbaues, Bildung von Osteoid und abnorme Vasculärisation an der Knorpel-Knochengrenze. Diese Kriterien gelten auch für die Rattenrachitis. Es wäre verfehlt, deshalb bei der menschlichen und der Rattenrachitis eine gleiche Ätiologie annehmen zu wollen, weil sie histologisch und blutchemisch gleiche Bilder bieten. Wichtig für die Entstehung einer Rachitis bei der Ratte ist außer dem Ca-P-Quotient das Fehlen von D-Vitamin in der Nahrung und der Lichtmangel. Die Zufuhr von D-Vitamin wie von Licht heilen ja die Rattenrachitis.

Bei beiden heute am meisten angewandten Kostformen besteht ein Überschuß an Kalk und ein Unterangebot an Phosphor. *O. Schultz* konnte feststellen, daß Unterschiede bestehen zwischen den durch Kost 3143 und durch *Sherman-Pappenheimer*-Kost 84 erzeugten Rachitisformen, weil die *McCollum*-Kost 3143 eine qualitativ ausreichende Nahrung ist, die die Ergänzungsstoffe — außer Vitamin-D — enthält.

¹ Technische Einzelheiten siehe bei *B. Büchele*: Inaug.-Diss. München 1935.

„Die *Sherman-Pappenheimer-Kost* 84 ist dadurch gekennzeichnet, daß in ihr praktisch keine Vitamine vorhanden sind.“

Bei unseren mit Kost 84 ernährten Ratten fanden wir ein Zurückbleiben im Wachstum. Ferner hat sich ihre Rachitis mit anderen Avitaminosen kombiniert; so beobachteten wir mehrere Fälle schwerer Xerophthalmie und einen Fall, wo das Tier unter klonischen Krämpfen zugrunde ging, was vielleicht als B-Avitaminose zu deuten ist.

Wir haben für unsere ersten Versuchsreihen *McCollum-Kost* 3143, für die späteren Versuche *Sherman-Pappenheimer-Kost* 84 verwendet; es lassen sich nämlich die Zusammenhänge Verkalkung und Porphyrinablagerung bei der durch Kost 84 erzeugten Rachitis mit ihrer genügend starken Osteoidbildung genau so studieren wie bei der Rachitis durch *McCollum-Kost*.

Wir sind von der Originalzubereitung der *McCollum-Kost*, nämlich der einfachen Vermischung der einzelnen Bestandteile, folgendermaßen abgewichen: Wir vermischten den verschroteten Weizen und Mais, die Salze und den Kleber — wir verwandten „*Mercks vitaminfreien Weizenkleber*“ — gut miteinander und setzten die in einer etwa 10fachen Menge heißen, destillierten Wassers gelöste Gelatine zu. Das Ganze wurde zu einem Brei verrührt, in einer Dicke von etwa 1 cm auf ein Blech ausgestrichen, nach dem Erkalten in kleinere Platten zerschnitten und mehrere Tage lang im Trockenschrank bei 80° getrocknet. Die Kost ist nun sehr hart und wird in haselnußgroße Stücke zerbrochen. Derartig zubereitet kann die *McCollum-Kost* 3143 monatelang in einer Flasche verschlossen aufbewahrt werden, während sie nichtgetrocknet innerhalb 48 Stunden dicht von Schimmelpilzen übersät ist. Eine einfache Vermischung und Verabreichung der *McCollum-Kost* hat den Nachteil, daß sich die Tiere die größeren und schmackhafteren Teile auswählen und das pulverisierte Calciumcarbonat durch das Drahtnetz am Boden durchfällt und somit eine rachitogene Kost gar nicht garantiert ist.

Die *Sherman-Pappenheimer-Kost* 84 — ein feines Mehlgemisch — rührten wir vor der Fütterung mit destilliertem Wasser zu einem dicken Teig an. Bei derart ernährten Tieren sinkt die Freßlust rasch ab, außerdem beobachteten wir öfters Mißbildungen der Zähne in Form von Schiefstellung der Incisivi. Wir sahen das auch einmal bei der Originalzubereitung der *McCollum-Kost*, während wir es bei unserer Modifikation, wo die Kost in ganz harter Form verabreicht wird, nie beobachtet haben; wir glauben, daß die Ratten als Nager eben harte Kost benötigen. Wir haben deshalb auch versucht, den „*Pappenheimer-Teig*“ im Trockenschrank zu trocknen. Die Tiere nehmen ihn aber in dieser Zubereitung überhaupt nicht zu sich.

4—5 Wochen alte Albino- und schwarz-weiße Ratten haben wir mit *McCollum-Kost* 3143 ernährt. Die Tiere wurden in einem fensterlosen Kellerraum gehalten, der nur durch elektrisches Rotlicht zu erhellen ist. In anderen Versuchsreihen wurden die Tiere mit *Sherman-Pappenheimer-Kost* 84 ernährt. Um aber dem schlechten Wachstum und damit der mäßigen Knorpelwucherung im Bereich der rachitischen Zone vorzubeugen, ebenso der Keratomalacie, haben wir bei später angesetzten weiteren Versuchen die Tiere zwar grundsätzlich mit *Sherman-Pappenheimer-Kost* ernährt, aber zweimal in der Woche *McCollum-Kost* verfüttert; das hat den großen Vorteil, daß die Tiere gut gedeihen, keine Abnahme der Freßlust zeigen und histologisch einwandfreie Resultate geben. Außer der rachitogenen Kost wurde den Ratten im Vogelnäpfchen destilliertes Wasser gereicht, so daß das Trinkwasser nicht verschüttet werden konnte und den unten aufgefangenen

Urin wertlos gemacht hätte. Anfänglich wurden die Tiere wurfweise beisammen gelassen — etwa 4 Tage lang — dann einzeln in Käfige gesetzt, deren doppelter Boden aus eng- und weitmaschigem Drahtgitter besteht. Trotz peinlicher Reinhaltung ging besonders bei der *Pappenheimer*-Kost eine nicht geringe Anzahl Versuchstiere an einem infektiösen Darmkatarrh ein, der nach *Wamösscher* und *Schmieden* hauptsächlich durch Erreger der Paratyphus-B-Gruppe hervorgerufen wird. Bei der von uns in den letzten Versuchsreihen angewandten gemischten Fütterung (*Pappenheimer*-Kost und zweimal in der Woche *McCullum*-Kost) sahen wir eine geringere Sterblichkeit an Darmkatarrhen, da die Tiere gut gediehen. Dabei hatten diese Ratten mit ihrer floriden Rachitis einen Froschbauch und biegsame Extremitäten.

Technik der Röntgenuntersuchung.

Zur Feststellung der Rachitis am lebenden Tier wurde die Röntgenuntersuchung herangezogen. Es sind hierzu die untere Femur- und obere Tibia-Epi-Metaphyse zweckmäßig und vollkommen ausreichend zu werten. Die Röntgenuntersuchungen wurden gemacht, nachdem etwa 3 Wochen lang die rachitogene Kost verabreicht worden ist.

Kontrollratten im Alter von 7—8 Wochen, die mit Milch, Weizen und Haferflocken ernährt wurden, zeigten im Röntgenbild die gewöhnlichen normalen Bilder von scharf konturierter Femur- und Tibia-Diaphyse.

Gleichaltrige mit Rachitisdiät ernährte Ratten mit florider Rachitis (biegsame Extremitäten und Froschbauch !) zeigen dagegen bei gleicher Aufnahmetechnik wie bei den Kontrolltieren eine verringerte Schattendichte der Tibia- und Femuriaphyse; das spricht für herabgesetzten Kalkgehalt. Die Epiphysen sind unscharf begrenzt und zeigen wolkige Aufhellungen. Die proximale Tibia-Epiphysen gibt einen ellipsenförmigen Schatten. Die Epiphysenfuge ist stark verbreitert und imponiert als unscharf begrenztes, unregelmäßiges Band, das teilweise ausgefranst erscheint. Die Metaphyse ist im ganzen verbreitert und gegen die Epiphysenfuge zu „becherförmig“ ausgehöhlt. Der distale Epiphysenspalt des Femur ist selten deutlich zu erkennen.

Makroskopischer Nachweis der Porphyrinablagerung.

Nachdem die Diagnose Rachitis röntgenologisch gesichert war, wurden die Porphyrininjektionen entsprechend der erwähnten Technik vorgenommen. Um rachitische Ratten mit verschiedenen Gesamt-dosen untersuchen zu können, haben wir die Injektionsdauer und -dosis derart variiert, daß wir Tiere hatten mit 0,5 bis 9,0 mg Porphyrin. Nachdem die gewünschte Gesamtdosis injiziert war, wurden nach 2 Tagen die Ratten getötet zum Nachweis des abgelagerten Porphyrins. Wir haben dabei dessen Fähigkeit, im ultravioletten Licht zu fluorescieren, herangezogen (*Hoppe-Seyler, Hausmann*).

Wir verwandten zum makroskopischen Nachweis der Porphyrin-Fluorescenz die Hanauer Analysenquarzlampe, die aus einer Quecksilberdampflampe mit

Wood-Filter besteht. Ist eine Porphyrinablagerung irgendwo im Gewebe vorhanden, so leuchtet diese Partie unter der Analysenquarzlampe hellrot auf. Zur Untersuchung der histologischen Schnitte auf Fluoreszenz wurde das Fluoreszenz- und Spektralanalysenmikroskop von *Borst-Königsdörffer* verwendet. Das Ultraviolettlicht wird hier erzeugt von einer Eisenbogenlampe, gefiltert durch 8%ige Kupfersulfatlösung und ein Schwarz-Uviolglas.

Histologische Technik.

Besonders große Schwierigkeiten bereitete die Herstellung der histologischen Schnitte zur Untersuchung auf Fluoreszenz. Um die Beziehung der Porphyrinablagerung im Knochen zum Kalk studieren zu können und um andererseits das abgelagerte Porphyrin nicht durch kalklösende Mittel zu beeinflussen, mußten vom unentkalkten Knochen Schnitte angefertigt werden.

Wir verwendeten zunächst Gelatineeinbettung. Die Gelatineblöcke wurden auf dem Gefriermikrotom geschnitten. Die Porphyrinablagerung wurde dadurch nicht beeinflußt. Es lassen sich damit ausgezeichnete Schnitte herstellen, die wegen ihrer geringen Dicke zur Untersuchung auf Fluoreszenz besonders wertvoll sind; sie haben aber den großen Nachteil, daß eine Hämatoxylin-Eosinfärbung der Kontrollschnitte wegen der starken Schrumpfung der Schnitte im Alkohol nicht möglich ist. Deshalb hat sich uns eine abgekürzte Celloidineinbettung am besten bewährt. Es wurde immer das Kniegelenk mit angrenzender Tibia und Femur untersucht.

Wir konnten feststellen, daß mit dieser Methode jedenfalls nur sehr wenig Porphyrin aus dem Knochen herausgelöst wird.

Die Schnitte wurden verwendet ungefärbt 1. zur Fluoreszenzmikroskopie, 2. mit *Kossa*-Färbung zum Nachweis der Kalkablagerung (mit Farbunterschieden von gelb bis schwarz). Ein Teil der *Kossa*-Präparate wurde mit H-E. nachgefärbt. 3. Zur Hämatoxylin-Eosinfärbung (ebenso auch entkalkte Vergleichsschnitte).

Es mußte versucht werden, möglichst drei brauchbare Schnitte nacheinander zu erhalten und diese verschieden zu färben bzw. ungefärbt zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung einzudecken. Serienschnitte sind leider bei dem harten Material nicht möglich. Es sei hier gleich erwähnt, daß die Fluoreszenz in den ungefärbten Schnitten nicht lange erhalten bleibt, sondern bald sehr stark abblaßt.

Histologische Befunde.

Bei der mikroskopischen Betrachtung eines Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Celloidinschnittes der Kniegelenkgegend eines 8 Wochen alten normalen Kontrolltieres sind die Markräume von zahlreichen Knochenbalken durchzogen. Die Knorpelzellen des Gelenkknorpels sind in parallelen Reihen, senkrecht zur Gelenkoberfläche, angeordnet, die gegen den Knochen zu voluminöser werden und schlechtere Protoplasmastruktur zeigen. An diese blasig aufgetriebenen Knorpelzellen des Gelenkknorpels schließen sich oft scharf abgesetzt die unregelmäßig angeordneten Knochenbälkchen der Epiphyse an, die den Markraum ausfüllen. Die proximale Epiphysenfuge der Tibia stellt einen fast gerade verlaufenden Saum dar, die distale Femurfuge dagegen ist wellenförmig. Die Epiphysenfuge besteht aus einer Schicht von parallelen Knorpelzellsäulen, die in der Richtung der Längsachse des Knochens angeordnet sind. Die Knorpelgrundsubstanz um die blasigen Knorpelzellen herum ist blau gefärbt und im *Kossa*-Präparat braun, also verkalkt. Diese Zone der präparatorischen Verkalkung ist ein gleichmäßiges, gerades Band,

parallel zur Knorpelfuge. An der Grenze zwischen den blasig aufgetriebenen Knorpelzellen und den hier ebenfalls noch parallel angeordneten Knochenbälkchen der Metaphyse findet sich ein dichter Saum von dunklen Zellen mit viel Protoplasma, das grau-violett gefärbt ist. Diese Zellen sind Osteoplasten. Sie umsäumen die einzelnen Knochenbälkchen und grenzen sie gegen die Markräume ab. Die Gefäß-Sprossen reichen von den Markräumen her bis an die Zone der präparatorischen Verkalkung heran. Die Gefäße sind axial angeordnet, indem sie zwischen die einzelnen Knorpelzellsäulen hereinwachsen.

Histologie der Rattenrachitis.

Das histologische Bild der Rattenrachitis ist von *Erdheim, Ottokar Schultz* u. a. eingehend beschrieben worden. Wir haben uns deshalb darauf beschränkt, im folgenden über unsere Befunde nur soweit zu berichten, als sie für die Fluoreszenzuntersuchungen von Wichtigkeit sind.

Wurden von Ratten, die röntgenologisch einwandfreie Rachitis aufweisen, die an das Kniegelenk anstoßenden Knochenpartien histologisch untersucht (Hämatoxylin-Eosinfärbung), so fanden wir bei der Beobachtung mit der Lupe die starke und unregelmäßige Verbreiterung der Epiphysenfugen als den auffallendsten Befund.

Entsprechend der Einteilung von *Kaufmann* (nach *Schultz*) konnten wir nun im einzelnen folgende Befunde feststellen:

A. Zone des ruhenden Knorpels.

Diese ist sehr schmal und liegt direkt den Knochenbälkchen der Epiphyse auf. Die Knorpelzellen sind spindelförmig.

B. Zone der Knorpelwucherung.

Diese Zone, die die ganze Epiphysenfuge umfaßt, ist im allgemeinen in der Mitte am breitesten. Die Höhe dieser Schicht ist dem allgemeinen Körperwachstum proportional; wir fanden dementsprechend, daß im Wachstum zurückgebliebene Ratten eine geringere Höhe der Knorpelwucherungszone aufweisen und damit eine leichtere Form von Rachitis haben als gut gedeihende. Die Zone der Knorpelwucherung mit ihren drei Teilen lieferte uns folgende Bilder:

I. Zone der nichtorganisierten Knorpelzellsäulen mit Haufen stark blau gefärbter, rundlicher Knorpelzellen.

II. Zone der organisierten, parallelen Knorpelzellsäulen. Die Knorpelzellen sind nicht haufenweise, sondern einzeln in axial-paralleler Schichtung säulenmäßig angeordnet. Hier sind die Knorpelzellen größer als in Zone I und zeigen wabige Protoplasmastruktur. Die Schichthöhe ist ganz ungleichmäßig.

III. Zone des hyperplastischen Knorpels.

In dieser Zone fanden sich große, blasige Knorpelzellen, deren Protoplasma nicht mehr sichtbar ist, und vollkommene Verwerfung der einzelnen Schichten. Es liegen Knorpelzungen oder -inseln durcheinander neben rosa gefärbtem, kernarmem Gewebe, dem Osteoid; Gefäße sind

reichlich in diesem osteoiden Gewebe eingelagert. Diese starke Gefäßsprossung dringt bei Präparaten, die einer in Ausheilung begriffenen Rachitis entsprechen, bis in die Zone der organisierten Knorpelzellsäulen vor. Die Gefäße dringen nicht nur in axialer Richtung in den Knorpel ein wie normal, sondern schräg und sogar senkrecht zur Knochenachse. Sie umschlingen ganze Gruppen von Knorpelzellsäulen, während im allgemeinen zwischen zwei Säulen ein Gefäß eindringt. Die Gefäße im osteoiden Gewebe sind weit und prall mit Erythrocyten gefüllt. In Präparaten mit florider Rachitis kommen andererseits Inseln von Säulenknorpelzellen mitten im osteoiden Gewebe vor, bei denen sich keine Gefäße in der nächsten Umgebung dieser Knorpelinseln finden.

C. Zone der präparatorischen Verkalkung, die bei florider Rachitis verbreitert und unterbrochen ist. Sie bildet die Begrenzung der Knorpelwucherungszone diaphysenwärts. Die Knochenbälkchen sind im kombinierten *Kossa*-Präparat in der Mitte schwarz, außen rosa, also zentrale Verkalkung mit osteoiden Säumen.

Wir sahen außerdem noch Bilder, wo in der Mitte der Knorpelwucherungszone die Knorpelgrundsubstanz verkalkt ist; ferner andere, wo diese Verkalkungszone epi- und diaphysenwärts verbreitert ist, sogar bis zu einer Verschmelzung mit der früheren präparatorischen Verkalkungszone. Bei anderen Präparaten sind auch die Knorpelzellen an Stellen stärkerer Gefäßwucherung abgebaut worden und durch verkalktes Gewebe ersetzt. Das osteoide Gewebe lagert von der Peripherie her Kalksalze an. Schließlich fanden sich bei manchen unserer Tiere Bilder, wo nur noch eine mehr oder weniger schmale Epiphysenfuge zu sehen war. Es sind das alles Befunde, wie sie einer Heilung der Rachitis, die vorher röntgenologisch gesichert war, entsprechen; teils ist diese beginnend, teils mehr oder weniger fortgeschritten. Auch röntgenologisch haben wir in Heilung begriffene Rachitis erkennen können; wir sahen nämlich verschiedentlich schmale Schattenstreifen mitten in der breiten Epiphysenfuge.

Durch Variation der Versuchsdauer haben wir die Rattenrachitis in den verschiedenen Phasen studieren können. Der Grad der Rachitis ist bei den einzelnen Tieren verschieden, sogar bei gleicher Kost und Versuchsdauer.

Makroskopische Befunde im UV.-Licht.

Wir fanden bei allen Tieren eine Primärfluoreszenz des Darms, die im unteren Ileum am stärksten ist; diese Fluoreszenz dürfte hauptsächlich durch Koproporphyrin verursacht sein, da sich das Porphyrin der Darmschleimhaut in Äther lösen ließ. Die Galle zeigt schwache, die Tränendrüsen starke Fluoreszenz. An den inneren Organen wie Leber, Milz und Nebenniere konnten wir mit Hilfe der Fluoreszenz weder

makroskopisch noch mikroskopisch Porphyrin nachweisen. In Celloidinschnitten von Tränendrüsen sahen wir Rotfluorescenz in Form von Tröpfchen im Drüsenumen; das Protoplasma der Epithelien zeigt diffuse Rotfluorescenz. Es handelt sich nach *Derrien* und *Turchini* um Ooporphyrin.

Wurden die Nieren von porphyringespritzten, rachitischen Ratten in Alkohol fixiert, wobei der Alkohol in steigender Konzentration mehrmals gewechselt wurde, so fand sich makroskopisch auf dem Schnitt durch die Niere eine schwache, diffuse Rotfluorescenz in der Rinde. Als wir uns die Nieren frisch nach der Tötung unter der Quarzanalysenlampe ansahen, war eine primäre Fluorescenz deshalb nicht nachzuweisen, weil sie, wenn vielleicht vorhanden, vom Blut überdeckt wird. Ob es sich dabei um Porphyrinfluorescenz handelt, haben wir nicht feststellen können, da die Fluorescenz zu schwach war, um spektroskopisch identifiziert zu werden. Im Gewebschnitt ist trotz Anwendung aller Schnittmethoden diese anscheinend nur geringe Menge fraglichen Porphyrins ausgeschwemmt, so daß überhaupt keine Fluorescenz mehr nachweisbar ist.

Am Knochensystem fanden wir sowohl bei normalen wie rachitischen Porphyrinratten nach Injektion von 2mal 0,5 mg Porphyrin eine geringe Rotfluorescenz der Metaphysen dicht unter der Epiphysenfuge. Bei höherer Dosis (9 mg) über längere Zeit verteilt, sahen wir eine diffuse Rotfluorescenz der gesamten Compacta und Spongiosa. Wie *Fikentscher*, *Fink* und *Emminger* sehen auch wir, daß die Porphyrinablagerung sich vorwiegend in den Gebieten stärksten Wachstums findet. Der Knorpel ist porphyrinfrei. Die Knorpelgrundsubstanz im Bereich der präparatorischen Verkalkung, die, wie die *Kossa*-Färbung zeigt, verkalkt ist, fluoresciert rot. Die Knochenbälkchen in der Metaphyse sind stark porphyrinhaltig.

Unsere rachitischen Ratten mit 2—4 mg Porphyrin zeigten makroskopisch unter der Analysenquarzlampe mäßige Rotfluorescenz der Compacta, stärkere Fluorescenz der Metaphysenspongiosa. Die Fluorescenz der Metaphyse ist gegen die stark verbreiterte Epiphysenfuge nicht so scharf und gleichmäßig abgesetzt wie beim normalen Kontrolltier, sondern gezackt und teilweise unterbrochen. Nach Injektion von 2mal 0,5 mg Porphyrin fand sich ein schmales, unregelmäßiges rotes Band in der Metaphyse, dicht unter dem Intermediärknorpel. Die Epiphysenfuge selbst zeigt nie Fluorescenz.

Bei Präparaten, die wir als ausheilende Rachitis beurteilen, sind in der Mitte der Fuge 1—2 schmale, rotfluoreszierende Bänder zu sehen. Die Epiphyse zeigt ebenso wie die Patella 2 Schalen: die äußere, nicht fluoreszierende, bläuliche Knorpelzone, darunter die rotfluoreszierende Knochenspongiosa. Das Knochenmark erscheint dunkelviolett und zeigt keine Fluorescenz. Das Periost ist ebenfalls frei von Porphyrin.

Fluoreszenzmikroskopische Befunde.

Wie oben erwähnt, verglichen wir jeweils möglichst deckungsgleiche Schnitte ungefärbt und gefärbt.

Der ruhende und der Säulenknorpel sind frei von Porphyrinfluoreszenz. Die unregelmäßige und teilweise ganz verworfene Zone der präparatorischen Verkalkung zeigt in der Knorpelgrundsubstanz Porphyrinablagerung. Im Kossa-H-E-Präparat rosa gefärbtes, kernarmes Gewebe, das bälkchenförmig angeordnet ist und das, entsprechend der „Verwerfung“ der einzelnen Schichten bei der Rachitis sowohl als Insel im Wucherungsknorpel als auch als Zunge zwischen den einzelnen Knochenbälkchen gelegen sein kann, erscheint im Fluoreszenzmikroskop blau (Osteoid). Die Knochenbälkchen in der Metaphyse zeigen in der Mitte Fluoreszenz, die osteoiden Randsäume keine Fluoreszenz. Daneben finden sich in Präparaten von Tieren, bei denen wir nach dem röntgenologischen und histologischen Befund eine beginnende Heilung der Rachitis annehmen, Bilder, die folgendes erkennen lassen: Neben den schon erwähnten Bälkchen mit zentraler Fluoreszenz liegen solche, die ausgesprochene Randfluoreszenz zeigen und solche, bei denen das Bälkchen deutlich in seiner ganzen Ausdehnung fluoresciert. Das kommt nach unserer Ansicht daher, daß wir es mit verschiedenen Phasen in dem An- und Umbau des osteoiden Gewebes zu tun haben. So kommen, wenn einmal Heilungsvorgänge einsetzen, Bälkchen vor, wo sich die Randzone mit Kalk beschlägt und damit Fluoreszenz zeigt, während andere Bälkchen mit zentraler Verkalkung, die aus der Knorpelgrundsubstanz hervorgegangen ist, am Rand noch Osteoid aufweisen, das keine Fluoreszenz zeigt. Bälkchen, die in toto fluorescieren, sind schon fertiger Knochen.

Wir sehen also im Fluoreszenzbild besonders deutlich, wie die Heilungsvorgänge langsam und ungleichmäßig einsetzen und wie die Kalkbindung nicht auf einmal zur sofortigen Heilung führt, sondern langsam nach und nach entsprechend unseren Bildern vorstatten geht.

Der Gelenkknorpel der Epiphyse ist porphyrinfrei. Die Wand der blasig aufgetriebenen Knorpelzellen gegen das Mark zu fluoresciert.

Wir haben zum Schluß Urinuntersuchungen angestellt.

Beim Vergleich der Salzsäureauszüge vom Urin rachitischer Ratten mit denen vom Urin normaler Ratten fanden wir bei rachitischen Ratten eine stärkere Koproporphyrinausscheidung als bei Normalratten. Wir führen dies darauf zurück, daß bei rachitischen Ratten das Porphyrin-Bindungsvermögen herabgesetzt ist wegen des verringerten Kalkgehaltes des Knochens, so daß mehr Porphyrin ausgeschieden wird, und zwar als Koproporphyrin. Selbstverständlich war die Injektionsdosis bei diesem Versuch dieselbe wie bei den normalen und rachitischen Ratten. Beim Vergleich der Urine von nichtgespritzten, rachitischen und normalen Ratten ergab sich kein Unterschied in der Ausscheidung.

Zusammenfassung und Ergebnisse.

Ohne die biologischen Unterschiede zwischen der menschlichen und tierischen Rachitis zu berücksichtigen, verwandten wir die durch *McCollum-Kost* 3143 und *Sherman-Pappenheimer-Kost* 84 erzeugte Rachitis bei der Ratte, um hier bei dieser Störung des Kalkstoffwechsels die Porphyrin-Ablagerungsverhältnisse zu studieren als Fortsetzung der Arbeiten von *Fränkel* und *Fikentscher-Fink-Emminger*, die die Affinität des Porphyrins zum Kalk experimentell festgestellt haben. Wir verwandten Iso-Uroporphyrinlösungen, die in Tagesdosen von 0,5 mg mehrere Tage lang bis zu 22 Tagen subcutan injiziert wurde, nachdem bei den Ratten klinisch und röntgenologisch Rachitis festgestellt worden war. Die dabei erhobenen Befunde sind beschrieben und zugleich mit den Ergebnissen früherer Untersucher verglichen worden. Von den rachitischen, porphyringespritzten Ratten wurde das Kniegelenk mit anschließenden Knochenpartien entkalkt und unentkalkt histologisch und fluorescenzmikroskopisch untersucht, wobei möglichst deckungsgleiche Fluorescenzschnitte mit *Kossa-HE-Schnitten* verglichen wurden. Wir fanden dabei, entsprechend dem nach der Variation der Versuchsverschiedenen Grad der Rachitis, daß immer da, wo verkalkte Partien übriggeblieben waren oder neue Verkalkung einsetzte, auch Rotfluorescenz, hervorgerufen durch die Porphyrininfektion, vorhanden war. Dabei konnten wir, wie aus früheren Untersuchungen bekannt war, feststellen, daß ganz allgemein im Gebiete der stärksten Wachstumsvorgänge die stärkste Porphyrinablagerung zu finden war. Das Osteoid, ebenso die Knorpelzellen zeigten keine Fluorescenz, wohl aber war, entsprechend dem positiven *Kossa*-Befund, die Knorpelgrundsubstanz in der bei der Rachitis sehr unregelmäßigen präparatorischen Verkalkungszone porphyrinhaltig.

Wir sahen bei unseren mikroskopischen Schnitten Bilder, die ganz einer mehr oder weniger weit vorgesetzten Heilung der Rachitis entsprachen. Wir wollten die Frage, ob Porphyrin im Sinne von *Leersums* durch seine Sensibilisierung des Organismus durch Ausnutzung geringster Lichtmengen eine Heilwirkung auf die Rachitis hat, vorläufig noch nicht beantworten, da bei unseren Versuchen die Tiere in völliger Dunkelheit gehalten wurden und da wir mit viel geringeren Porphyrinmengen gearbeitet hatten als von *Leersum*. Unsere Heilungsbilder konnten wir nicht auf das Konto der Porphyrinzufuhr setzen, sondern mußten sie als beginnende Spontanheilung ansehen.

Trotz einwandfrei erzeugter Rachitis, die ganz den Bildern von *van Leersum* und von *O. Schultz* entspricht, war die Heilung eine sehr zögernde und die Porphyrinablagerung ein scheinbar indifferenter Vorgang in bezug auf die Rachitis.

Nebenbei haben wir in Galle und Darm Porphyrinfluorescenz gefunden, ebenso in der Tränendrüse und *Harder*-Drüse. Das Porphyrin

fand sich da in Form kleiner Tropfen im Drüsenlumen; im Protoplasma der Drüsenepithelien fand sich diffuse Rotfluorescenz.

Vergleichende Urinuntersuchungen ergaben eine erhöhte Koproporphyrinausscheidung bei rachitischen Ratten gegenüber normalen Kontrolltieren, wobei die Iso-Uroporphyrinzufuhr und die äußeren Bedingungen während der Versuchsdauer jeweils die gleiche war. Wir führten das darauf zurück, daß das Porphyrinbindungsvermögen des rachitischen Knochens wegen seines verringerten Kalkgehaltes herabgesetzt ist.

Schrifttum.

- Borst-Königsdörffer*: Untersuchungen über Porphyrie. Leipzig: S. Hirzel 1929.
Büchele, B.: Inaug.-Diss. München 1935. — *Derrien u. Turchini*: C. r. Acad. Sci. Biol. (Séance 26. 7. 24) Straßburg. — *Emminger u. Battistini*: Virchows Arch. **290**, 492 (1933). — *Erdheim*: Rachitis und Epithelkörperchen. Denkschr. kaiserl. Akad. Wiss. Wien 1914. — *Filkentscher*: Biochem. Z. **249**, 257 (1932). — *Filkentscher, Fink, Emminger*: Virchows Arch. **287**, 764 (1933). — *Fischer u. Heisel*: Liebigs Ann. **457**, 101 (1927). — *Fränkel, E.*: Virchows Arch. **248**, 125 (1924). — *György*: Erg. inn. Med. **36**. — *Henke-Lubarsch*: Rachitis, Beitrag M. B. Schmidt, Bd. 9. — *Leersum, van*: Nederl. Tijdschr. Geneesk. **1923**, 1931. — *Lobeck*: Frankf. Z. Path. **30**, 402 (1924). — *McCollum*: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **19**, 123. — J. of biol. Chem. **45**, 333; **47**, 507; **51**, 41. — *Pfaundler*: Münch. med. Wschr. **1927 I**, 659, 721. — *Schmorl*: Virchows Arch. **275**, 129 (1929). — Verh. dtsch. path. Ges. **1905**, 248. — *Schultz, O.*: Arch. Tierheilk. **59**, 400; **60**, 259, 273. — *Sherman-Pappenheimer*: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **18**, 193. — J. of exper. Med. **34**, 189. — *Ullrich*: Z. Kinderheilk. **47**, 105, 581. — *Wamoscher u. Schmieden*: Münch. med. Wschr. **1932 I**, 51.
-