

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg  
[Direktor: Prof. Dr. H. Groll].)

## **Förderung pathologisch-anatomischer Probleme durch die Fluoreszenzmikroskopie.**

Von

**Ernst Fahr,**

Assistent am Institut.

Mit 4 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 3. November 1912.)

### **Inhaltsverzeichnis.**

Einleitung S. 123. — Eigene Untersuchungen, Bemerkungen zur Methodik S. 125.

1. Kapitel. Fluoreszenzerscheinungen bei der Eiweißgerinnung mit besonderer Berücksichtigung der Infarkte S. 126. — Gerinnung durch Hitzeeinwirkung S. 127. — Fluoreszenz der Infarkte S. 128. — Fehlen der Fluoreszenz bei älteren Infarkten S. 130. — Fehlen der Fluoreszenz der alten Infarkte durch vermehrten Eisengehalt bedingt S. 132. — Experimentell erzeugte Infarkte S. 133. — Wiederauftreten der Fluoreszenz alter Infarkte nach Salzsäurebehandlung S. 135. — Zusammenfassung des 1. Kapitels S. 137.

2. Kapitel. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen kaliumchromatvergifteter Nieren von Hunden S. 138. — Fluoreszenzmikroskopische Befunde S. 139. — Darstellung der degenerativen Verfettung durch Chlorophyll S. 141. — Schlußfolgerungen aus den Befunden S. 142. — Abgrenzung echter nephrotischer Veränderungen von kadaverösen S. 142.

3. Kapitel. Ausscheidung von fluoreszierenden Stoffen durch die kaliumchromatvergiftete Niere S. 143. — Fragestellungen zu diesem Kapitel S. 144. — Versuchsanordnung (Mäuse) S. 145. — Besprechung der Befunde S. 146. — Versuchsanordnung (Ratten) S. 148. — Deutung der Befunde S. 150.

4. Kapitel. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen am menschlichen Leichenmaterial mit besonderer Berücksichtigung der Niere S. 151. — 1. Amyloid S. 152. — 2. Tuberkulose (Lungen und Nebenniere) S. 153. — 3. Gelbe Leberatrophie S. 153. — 4. Nierenerkrankungen. a) Benigne Nephrosklerose S. 154. — b) Cholämische Nephrose S. 155. — c) Glomerulonephritis S. 155. — d) Unbestimmt charakterisierte Nephrosen S. 156. — e) Herdförmige Glomerulonephritis S. 157. — f) Arteriosklerotische Schrumpfnieren S. 157. — Übersicht über die Befunde S. 157. — Zusammenfassung der gesamten Arbeit S. 158.

Obwohl es schon seit langem bekannt ist, daß ultraviolette Licht die Fähigkeit besitzt, die verschiedensten Stoffe zur Fluoreszenz zu bringen, d. h. sie zum Aussenden sichtbaren Lichtes zu veranlassen, findet sich erst in neuerer Zeit eine größere Zahl von Arbeiten, in welchen die verschiedensten Probleme mit Hilfe von Fluoreszenzerscheinungen erforscht werden. Verschiedene Gründe mögen daran schuld sein. Der entscheidendste wird der sein, daß es erst in jüngerer Zeit gelungen ist,

Lichtquellen herzustellen, welche ein ultraviolettes Licht von genügender Flächenintensität aussenden. Erst hierdurch war es möglich, stärkere Vergrößerungen anzuwenden und eine größere Auflösung der Zellstrukturen zu erreichen. Mehrere Forscher haben versucht, die Fluoreszenzmikroskope zu verbessern. Ich möchte auf diese Versuche nicht näher eingehen, da sie andernorts genau beschrieben sind. Einen entscheidenden Aufschwung hat die Fluoreszenzmikroskopie jedoch erst genommen, als *M. Haitinger* und *Ellinger* und *Hirt* ihre Apparate konstruiert und der Allgemeinheit zugänglich gemacht hatten. Der *Haitingersche* Apparat wird von der Firma Reichert, Wien, die *Ellinger* und *Hirtsche* Konstruktion von Carl Zeiß, Jena, hergestellt. Auf Prinzip und Einzelheiten der Apparaturen näher einzugehen, erübrigt sich, da dies schon von verschiedenen Autoren geschehen ist. Eine sehr gute Übersicht über die vorhandenen Apparaturen gibt unter anderem *Haitinger* in seinem Buch: Fluoreszenzmikroskopie, ihre Anwendung in der Histologie und Chemie, in welchem er auch ausführlich auf die bis 1938 auf dem Gebiete der Fluoreszenzmikroskopie erschienenen Arbeiten eingeht. Weitere ausführliche Literaturangaben finden sich bei *Danckwörtt*. Ein ausführliches Referat des Autors über den heutigen Stand der fluoreszenzmikroskopischen Literatur konnte aus Gründen der Raumersparnis im Rahmen dieser Arbeit nicht gebracht werden.

Auf anatomisch-physiologischem Gebiet wären die Arbeiten *Hirts* und *Ellingers* zu erwähnen, die das Schicksal verschiedener Vitamine und Redoxsysteme im Organismus besprechen, außerdem interessante Ergebnisse über die Leber- und Nierensekretion bringen. Auch in der Bakteriologie liegen zahlreiche, interessante Arbeiten vor. Mit der Darstellung von Bakterienkolonien befaßten sich *Acs*, *Kaiserling*, *Hagemann* u. a. Auch in der Virusforschung leistet die Fluoreszenzmikroskopie gute Dienste, wie aus den Arbeiten *Gerlachs*, *Claubergs* usw. hervorgeht. Kaum zu übersehen ist das Schrifttum der Porphyrinforschung. Hier geben die Arbeiten von *Borst* und *Königsdorffer*, außerdem die Arbeiten *Kämmerers*, eine gute Übersicht. Weitere zahlreiche Arbeiten liegen ferner auf dem Gebiet der inneren Medizin, Psychiatrie, gerichtlichen Medizin, Dermatologie und Augenheilkunde vor, auf welche aus Gründen der Raumersparnis nicht weiter eingegangen werden kann.

Auch in der pathologischen Anatomie sind zahlreiche Arbeiten vorhanden, welche nicht alle erwähnt werden können. Sehr interessant ist die ausführliche, in diesem Archiv erschienene Arbeit *Hamperls*, welche sich mit der Fluoreszenz, und zwar hauptsächlich der Eigenfluoreszenz der normalen menschlichen Gewebe, beschäftigt. Für jeden, der sich mit der Untersuchung der Eigenfluoreszenz pathologisch veränderter Organe befassen will, ist das Studium dieser Arbeit unerläßlich, um sich über die normalerweise vorhandenen Fluoreszenzen der einzelnen Gewebe zu unterrichten.

**Eigene Untersuchungen.**  
*Bemerkungen zur Methodik.*

Wie sich aus der Literaturübersicht ergibt, stehen uns verschiedene Untersuchungsmethoden zur Verfügung, die ich folgendermaßen einteilen möchte:

1. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit dem Auflichtmikroskop am lebenden Tier.
2. Untersuchungen am Schnittpräparat.
3. Anwendung von Fluorochromen, d. h. Anfärbung der Schnitte oder auch des lebenden Materials mit fluoreszierenden Stoffen.
4. Beobachtung der Eigenfluoreszenz von Geweben ohne Anwendung irgendwelcher Farbstoffe.
5. Verwendung von fixiertem Material (Formol, Alkohol usw.).
6. Herstellung unfixierter Schnitte mit Hilfe der Messerunterkühlungstechnik.

Über persönliche Erfahrungen mit der ersten Methode, welche von *Ellinger* und *Hirt* hauptsächlich angewandt und ausgebaut wurde, ver füge ich nicht. Es war nicht mehr möglich, im Kriege die entsprechende Apparatur, namentlich die unumgänglichen Wasserimmersionen, anzuschaffen. Ich glaube, daß die Lebenduntersuchungen namentlich zur Klärung allgemein-pathologischer Probleme hervorragend geeignet sind. Andererseits war es auch wieder reizvoll, zu versuchen, ob nicht mit der in der menschlichen Pathologie allein anwendbaren Durchlichtmethode neue Erkenntnisse mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie gewonnen werden könnten. Man muß sich nun darüber klar sein, daß eben auf die Betrachtung von Vorgängen zu verzichten ist. Man ist wie bei bisher üblichen histologischen Untersuchungsmethoden darauf angewiesen, aus augenblicklichen Zuständen auf Vorgänge zu schließen. Aber da an Tieren gewonnene Erkenntnisse ja doch nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar sind, wird man immer die am Tier mit der Auflichtmethode gewonnenen Erkenntnisse am Menschen mit der Methode im durchfallenden Licht nachprüfen müssen. Aus diesem Grunde würde es sich vielleicht auch schon bei Tierversuchen empfehlen, die mit der Auflichtmethode gewonnenen Ergebnisse mit der Durchlichtmethode nachzuprüfen, um auf diese Weise Rückschlüsse auf die menschliche Pathologie um so eher zu ermöglichen. (Von *Hirt* und seinen Schülern ist dies in vielen Fällen auch bereits schon getan worden. Auch von anderen ist es geschehen, wenn auch noch nicht in systematischer Weise.)

Meine Untersuchungen wurden ausschließlich am Schnittpräparat, und zwar hauptsächlich am unfixierten Schnitt, vorgenommen. Das Arbeiten mit unfixierten Schnitten hat, wie ich ohne weiteres zugebe, auf der einen Seite große Nachteile, deren hervorstechendster ist, daß die Schnitte sich nur kurze Zeit halten. Aber bei manchen Versuchen, wie z. B. bei der Verfolgung von Eiweißgerinnungsvorgängen, hat sich

ergeben, daß die Anwendung irgendwelcher Fixierungsmethoden unmöglich ist. Es wird von verschiedenen Beobachtern (*Hamperl* u. a.) angegeben, daß z. B. die Formolfixierung vorhandene Fluoreszenzen so gut wie nie störe. Das gebe ich ohne weiteres zu, es ist mir aber aufgefallen, daß durch die Fixierung am frischen Material nicht sichtbare Fluoreszenzen sehr rasch geweckt werden. Bei vielen Versuchen stört das nicht, wie auch z. B. von *Hamperl* hervorgehoben wird. Wenn es einem aber darauf ankommt, geringe Eigenfluoreszenzschwankungen zu beobachten, dann kann auch eine schwächere, durch das Fixierungsmittel bedingte Fluoreszenz sehr störend wirken. Als Einschlußmittel der Schnitte habe ich fast immer physiologische Kochsalzlösung benützt, da sie sicher fluoreszenzfrei ist und weder Fluoreszenzen hervorruft, noch vorhandene auslöscht. Den Nachteil der mangelnden Haltbarkeit habe ich in Kauf genommen. Die unfixierten Schnitte sind sämtlich mit dem Gefriermikrotom mit unterkühltem Messer hergestellt. Bei dieser Methode tritt eine Fehlerquelle auf, auf die ich gern besonders hinweisen möchte. Aus der Kohlensäure schlägt sich manchmal auf dem Mikrotommesser eine ölige Substanz nieder, welche wahrscheinlich als Verunreinigung der handelsüblichen Kohlensäure angesehen werden muß. Diese ölige Substanz gelangt manchmal in feinsten, mikroskopisch kleinen Tröpfchen auf den Schnitt und ruft hier eine helle, blauweißliche Fluoreszenz hervor. Da sich diese Tröpfchen aber hauptsächlich am Rande des Präparates finden, wo sie ja zuerst vom Messer abgestreift werden, ist es leicht, die bläulichen punktförmigen Fluoreszenzen als Verunreinigung zu erkennen und entsprechend zu werten. Nach diesen Vorbemerkungen zur Methodik komme ich zur Schilderung meiner Versuche. Zum Teil habe ich meine Ergebnisse durch Untersuchung von Leichenmaterial gewonnen, zum Teil habe ich Tierversuche angestellt.

Ich teile meine Versuche folgendermaßen ein:

1. Fluoreszenzerscheinungen bei der Eiweißgerinnung mit besonderer Berücksichtigung der Infarkte.
2. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen kaliumchromatvergifteter Nieren von Hunden und Kaninchen.
3. Ausscheidung von fluorescierenden Stoffen durch die kaliumchromatvergiftete Niere.
4. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an menschlichem Leichenmaterial mit besonderer Berücksichtigung der Nieren.

#### 1. Fluoreszenzerscheinungen bei der Eiweißgerinnung mit besonderer Berücksichtigung der Infarkte.

Die Tatsache, daß fixiertes Material, gleichgültig von welchem Organ, im Laufe der Zeit immer heller fluoresciert, veranlaßte mich, der Frage der durch Eiweißgerinnung hervorgerufenen Fluoreszenz der Gewebe näher nachzugehen.

Bekannt und von vielen bestätigt ist die Tatsache, daß, von Ausnahmen abgesehen, frisches, gesundes Parenchym der Organe nicht fluoresciert. Die an normalen menschlichen Geweben zu beobachtenden Fluoreszenzen sind sehr ausführlich und übersichtlich von *Hamperl* (68) beschrieben worden, und ich glaube nicht, daß es möglich ist, dieser Arbeit Wesentliches hinzuzufügen. Dagegen weniger bekannt sind die primären Fluoreszenzen an pathologisch verändertem Gewebe, daher will ich dieser Frage in der vorliegenden Arbeit näher nachgehen.

Schon *Hamperl* schreibt, daß durch das Formol an einzelnen Geweben eine Fluoreszenzsteigerung hervorgerufen wird (kollagenes Bindegewebe und Protoplasma) und führt diese Fluoreszenzsteigerung auf eine Fällung der Eiweißkörper zurück. Ich möchte auch glauben, daß bei dieser neuauftretenden Fluoreszenz die Eiweißgerinnung eine wesentliche Rolle spielt. Aus diesem Grunde habe ich mich auch bei der Untersuchung der durch pathologische Prozesse hervorgerufenen Gewebsfluoreszenz zunächst der (wahrscheinlich) durch Gerinnung hervorgebrachten zugewandt.

Es wird vielleicht der Einwand erhoben werden, daß bei der Fixierung auch andere Gewebsveränderungen auftreten könnten wie eine bloße Gerinnung. Das will ich gar nicht in Abrede stellen. So ist z. B. die von *Hamperl* beobachtete Fluoreszenz der sonst im allgemeinen nicht fluoreszierenden Erythrocyten in altem Formolmaterial sicher nicht allein auf Gerinnungsprozesse zurückzuführen. Aber im Laufe meiner Versuche hat sich gezeigt, daß zum mindesten der Gerinnung auch eine wesentliche Bedeutung beim Auftreten der Fluoreszenz zukommt. Zunächst habe ich die Eiweißgerinnung durch Hitzeeinwirkung geprüft und Gewebstückchen, welche von normalen Nieren (Sektionsmaterial) stammten, einige Minuten in Wasser gekocht. Das so behandelte Nierengewebe zeigte eine deutliche Fluoreszenz, und zwar fluorescierten sowohl die Tubuli und Sammelröhren als auch Glomeruli (letztere allerdings schwächer) in einer hellgelb-bräunlichen Farbe. Unverändert blieb die vor dem Kochen schon sichtbare Fluoreszenz der elastischen Fasern. Um den Unterschied zwischen gekochtem und ungekochtem Gewebe noch sinnfälliger zu machen, schnitt ich von einer Niere einen schmalen Streifen von etwa 3 cm Länge und  $1\frac{1}{2}$  cm Breite ab und brachte die eine Hälfte des Streifens, also etwa 1,5 cm, zwischen feuchtes Fließpapier und zwei Objektträger und ließ nur die unbedeckte Hälfte in das kochende Wasser eintauchen. Auf diese Weise wurde die Gerinnung der bedeckten Hälfte verhütet, und man sah im Fluoreszenzmikroskop sehr gut den Kontrast zwischen der geronnenen und frischen Präparatenhälfte. Zur Aufzeigung der Gerinnungsfluoreszenz durch Kochen erwies sich Lebergewebe noch geeigneter als Nierengewebe, weil bei der Leber die Fluoreszenz gleichmäßiger ist, da bei der Niere doch immer einzelne Tubuli etwas heller leuchten. Vor allen Dingen ist es leichter, Lebergewebe zu finden, welches (mit Ausnahme der elastischen Fasern der Gefäße) im

frischen Zustände gar keine Fluoreszenz zeigt, als Nierengewebe, bei welchem aus ungeklärten Gründen viel häufiger mehr oder weniger ausgeprägt fluoreszierende Tubuli gefunden werden. Ich werde auf diesen Punkt weiter unten bei der Schilderung der Versuche des Abschnittes 3 meiner Arbeit zu sprechen kommen. Gekochtes Lebergewebe zeigt im Gegensatz zu gekochtem Nierengewebe keine gelbbraunliche, sondern eine mehr grauweißliche Farbe. Nicht nur Leber und Nierengewebe, sondern auch sehr viele andere lassen sich durch Kochen ebenso wie durch länger dauernde Fixierungen zur Fluoreszenz bringen, die Befunde weichen von den bisher beschriebenen nicht wesentlich ab, es erübrigt sich daher, näher auf sie einzugehen. Schon durch die Kochversuche erschien es mir sehr wahrscheinlich, daß Gerinnungsvorgänge für das Auftreten von Fluoreszenzen verantwortlich sein könnten.

Eine pathologische Veränderung tierischer und menschlicher Organe, bei welcher eine Eiweißgerinnung im Vordergrund steht, ist bekanntlich der Infarkt. Besonders geeignet zur Untersuchung erschien mir der anämische Infarkt zu sein. Zur Untersuchung wurden nur blande Infarkte verwendet, um Störungen durch Eiterungen und Bakterienwirkung zu vermeiden. Die untersuchten Infarkte stammten hauptsächlich von Milzen und Nieren. Zunächst wurden Infarkte untersucht, welche am Leichenmaterial gefunden wurden, später führte ich auch Tierversuche aus. Zunächst kamen einige Niereninfarkte zur Untersuchung, welche zum Teil im Anschluß an Endokarditiden, zum Teil durch losgerissene Thromben im linken Herzohr bei Herzinsuffizienzen verschiedenster Genese entstanden waren. Die Präparate wurden unfixiert mit dem unterkühlten Messer geschnitten und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Das intakte Nierengewebe zeigte, abgesehen von einigen gelblich fluoreszierenden Körnchen (Abnutzungspigmente und dergleichen), in den Tubulusepithelien keine Fluoreszenz. Auffallend hell fluorescierte jedoch das Infarktgewebe. Die Tubuli leuchteten in der Infarktzone in hellweißlicher Farbe, während die Glomeruli und das interstitielle Gewebe nur eine schwache Fluoreszenz aufwiesen. Weiterhin wurden Milzinfarkte untersucht. Die Milzinfarkte stammten gleichfalls sowohl von Leichen mit einer Endokarditis als Hauptbefund als auch von Fällen, welche einer muskulären Insuffizienz des Herzens erlegen waren. Es hatte nicht den Anschein, daß die den Infarkt erzeugende Grundkrankheit einen Einfluß auf die Fluoreszenz der Infarkte ausübte, aber bei der verhältnismäßig geringen Anzahl der im laufenden Sektionsgut anfallenden Infarkte möchte ich über diesen Punkt noch nichts Endgültiges aussagen. Die beobachteten Milzinfarkte zeigten niemals eine so helle und intensive Fluoreszenz wie die Niereninfarkte. Nur bei einer Milz sah ich einen etwas heller graufluoreszierenden Infarkt, bei einer weiteren einen, der fast so hell fluorescierte wie die Niereninfarkte. Im übrigen waren aber alle beobachteten Milzinfarkte vollständig dunkel.

Es wäre nun die Frage zu klären, welcher Vorgang oder welcher Stoff für die Gerinnung bzw. für die Fluoreszenz der Infarkte verantwortlich ist. Auf die Vorgänge der Eiweißgerinnung kann im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden, und es muß auf die zahlreichen über diesen Punkt vorhandenen Veröffentlichungen verwiesen werden (*Weigert, Ernst, Borger, Bauer* u. a. haben ausführlich über dieses Thema gearbeitet). Interessant wäre die Klärung der Frage, ob das geronnene Eiweiß an sich leuchtet, oder ob es die die Gerinnung bewirkenden Stoffe sind, welche das Aufleuchten des Eiweißes im ultravioletten Licht hervorrufen. Es ist mir nicht gelungen, diese Frage mit Sicherheit zu entscheiden, aber die meisten in dieser Richtung angestellten Versuche sprechen für die erstere Annahme. Ich habe schon oben erwähnt, daß gekochtes Material aufleuchtet. Es ist ja nicht gut vorstellbar, daß durch das Kochen vorher nicht vorhanden gewesene Stoffe auftreten könnten, man müßte lediglich daran denken, daß durch das Kochen irgendwelche Umsetzungen eintreten, welche fluoreszierende Eigenschaften aufweisen. Weiterhin fiel bei der Beobachtung einiger experimentell erzeugter Infarkte auf, daß besonders hell die Partien aufleuchteten, welche sich bei der feingeweblichen Untersuchung im Hämatoxylin-Eosin-Präparat als verkalkt herausstellten. Da das Calcium bei Gerinnungsvorgängen überhaupt eine wichtige Rolle spielt, lag es nahe, daran zu denken, das Calcium möchte in irgendeiner Weise für das Auftreten der Fluoreszenz verantwortlich sein. Um dieser Frage nachzugehen, habe ich einige Reagensglasversuche unternommen. Zunächst wurden frische Leberstückchen unter sterilen Bedingungen in frisches, steril entnommenes menschliches Serum gebracht und 24 Stunden darin belassen. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung zeigte sich am Rande des Gewebstückchens eine einige Millimeter breite, in einem hellgrau-weißlichen Farbton fluoreszierende Zone, die sich in ihrer Fluoreszenz in nichts von den zur Beobachtung gekommenen Infarkten unterschied. Die mittleren Partien des Gewebstückchens waren vollkommen dunkel. Die Grenze zwischen den hellen und dunklen Abschnitten war absolut scharf. Man darf also wohl annehmen, daß hier ein ähnlicher Vorgang für die Fluoreszenz verantwortlich ist wie bei den echten Infarkten. Um den Versuch noch natürlicher zu gestalten, brachte ich, wiederum unter völlig sterilen Bedingungen, Leberstückchen in die freie Bauchhöhle von Meerschweinchen. Auch bei diesen Versuchen ergab sich das gleiche Bild: Hell-weißlich-grau leuchtender scharf abgesetzter Rand, dunkle Mitte. Um nun zu prüfen, welche Rolle das Calcium bei diesen Vorgängen spielt, brachte ich unter den gleichen Bedingungen Organstückchen, Leber und Niere, in Serum, welchem Oxalat zugesetzt war, um die Calciumwirkung auszuschalten. Bei der nachfolgenden fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung zeigte sich, daß bei den so behandelten Organstückchen das Aufleuchten der Randzone ausblieb. Hieraus geht klar hervor, daß dem

Calcium eine wichtige Rolle beim Zustandekommen der Fluorescenz zugeschrieben werden muß. Es ist aber absolut unwahrscheinlich, daß das Calcium selbst leuchtet. Ich habe verschiedene Calciumsalze in gelöstem Zustand auf ihre Fluorescenz hin untersucht und gefunden, daß sie im ultravioletten Licht nicht aufleuchten. Man muß also wohl annehmen, daß zum Zustandekommen der Gerinnungsfluorescenz die Anwesenheit von Calcium notwendig ist, darf dies aber nicht in dem Sinne verstehen, daß das Calcium selbst leuchtet, sondern daß es beim Zustandekommen der Gerinnung eine wichtige Rolle spielt, und erst die geronnenen Eiweißmaßen selbst das Aufleuchten bewirken. Diese Behauptung gilt mit einer Ausnahme. Auskristallisierte, nicht gelöste Calciumsalze zeigen auch im Modellversuch eine helle Fluorescenz, ebenso kann man bei allen Verkalkungen der Gewebe eine Weißfluorescenz beobachten. Aber normalerweise handelt es sich ja bei den Gerinnungsvorgängen um gelöstes und nicht um auskristallisiertes Calcium.

Weiterhin untersuchte ich zahlreiche Fermente in gelöstem Zustand auf ihre fluoreszierenden Eigenschaften hin. Es kamen Trypsin, Steapsin, Lipase, Thrombin und Thrombokinasen zur Untersuchung. Bei keinem dieser Fermente konnte ich eine Fluorescenz bemerken. Ich halte es für nicht sehr wahrscheinlich, daß anderen Fermenten, die ich nicht untersucht habe, eine Fluorescenz eigen ist. Diese Versuche scheinen es mir wahrscheinlich zu machen, daß die Fluorescenz der Infarkte nicht auf von außen an das Gewebe herangebrachten Stoffen beruht, sondern lediglich auf unbekannten Eiweißumsetzungen bei der Gerinnung. Auf die durch Gefäßunterbindung im Tierversuch erzeugten Infarkte möchte ich weiter unten zu sprechen kommen.

Im Laufe meiner Untersuchungen an von Leichenmaterial stammenden Infarkten kamen noch einige ältere, hauptsächlich Milzinfarkte, zur Untersuchung, welche keinerlei Fluorescenzerscheinungen zeigten und bei der Bestrahlung mit ultraviolettem Licht vollständig dunkel blieben. Dieses Verhalten der älteren Infarkte erschien mir zunächst vollkommen unverständlich. Ich habe an die verschiedensten Möglichkeiten gedacht, welche hierfür verantwortlich gemacht werden können. Da behauptet wird, ältere Infarkte seien wasserärmer als frische (Inspissation der Infarkte von *Virchow*), erwog ich die Möglichkeit, ob vielleicht durch den Wasserverlust die Fluorescenz ausgelöscht würde, obwohl mir dies von vornherein nicht sehr wahrscheinlich erschien. Ich habe nämlich immer beobachtet, daß eingetrocknete Schnitte ihre Fluorescenz nicht einbüßten, sondern im Gegenteil eine hellere aufwiesen. Nun kann ja allerdings bei den älteren Infarkten von einem Eintrocknen im üblichen Sinne keine Rede sein, sondern sie können höchstens wasserärmer als ihre Umgebung werden. Um nun den Einfluß einer Wasserverarmung des Gewebes auf die Fluorescenz zu prüfen, brachte ich Gewebsstückchen von Leber und Niere (welche durch vorheriges Kochen zur Gerinnung gebracht



waren) in konzentrierte Kochsalzlösung und beließ sie 8 Tage in derselben. Ich stellte nun fest, daß die Fluoreszenz dieser Gewebe keineswegs ab-, sondern sogar zunahm. Der Wasserverlust der Gewebe scheint also keinen Einfluß auf die Abnahme der Fluoreszenz zu haben. Der Wert dieser Versuche wird allerdings dadurch beeinträchtigt, daß durch konzentrierte Kochsalzlösung ebenfalls eine Fällung der Eiweißkörper bewirkt wird, daß also möglicherweise die beim Kochen aufgetretenen Gerinnungsvorgänge noch verstärkt und dadurch eine vielleicht doch vorhandene Fluoreszenzabnahme überdeckt wurde. Für das Wahrscheinlichere halte ich jedoch, daß der Wasserentzug keine Fluoreszenzabnahme bewirkt.

Weiterhin ist bekannt, daß die Infarkte eine alkalische Reaktion aufweisen (*Borger*). Ich dachte nun daran, daß vielleicht diese alkalische Reaktion für das Aufhören der Fluoreszenz der Infarkte verantwortlich zu machen wäre. Um dieser Frage nachzugehen, habe ich Infarktstückchen und auch von Leber und Niere stammendes Gewebsmaterial in n/10 Natronlauge gebracht und in Abständen von 24 Stunden von dem betreffenden Material Gewebsschnitte angefertigt. Ich konnte beobachten, daß in der Tat von außen nach innen fortschreitend die Fluoreszenz des Gewebes abnahm bzw. ganz aufhörte. Auch hier war wieder die Grenze zum noch leuchtenden Gewebe absolut scharf. Es hatte also zunächst den Anschein, daß eine alkalische Reaktion in der Tat in der Lage sei, Gewebsfluoreszenzen auszulöschen. Man muß wahrscheinlich hierfür die Quellung des Gewebes verantwortlich machen, denn schon nach einigen Tagen bemerkt man auch mit bloßem Auge eine sehr erhebliche Aufquellung der Organe. Die Tatsache, daß Alkalien eine Gewebsquellung verursachen, ist ja bekannt. Es fragt sich nur, ob man diese im Versuch gewonnenen Ergebnisse ohne weiteres auf die sich tatsächlich im Leben abspielenden Vorgänge übertragen darf. Dagegen erheben sich verschiedene Bedenken. Der wichtigste Einwand, den man gegen diesen Versuch erheben kann, erscheint mir der zu sein, daß so starke Alkalitätsgrade wie sie eine n/10 NaOH-Lösung aufweist, im Organismus nicht vorkommen. Es wurde also untersucht, ob auch schwächere alkalische Lösungen den gleichen Effekt haben würden. Um den Versuch möglichst physiologisch zu gestalten, wurde die ja ebenfalls alkalisch reagierende Tyrodelösung verwandt. (Es wurde die Tyrodelösung der ursprünglichen Vorschrift verwandt, also folgende Zusammensetzung: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g CaCl<sub>2</sub>, 0,1 g MgCl<sub>2</sub>, 1 g NaHCO<sub>3</sub>, 0,05 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g Glucose.) Zu den Versuchen mit Tyrodelösung wurden Leberstückchen benützt, welche durch vorheriges Kochen zur Gerinnung gebracht waren und eine helle Fluoreszenz zeigten. Diese Leberstückchen wurde nun unter sterilen Kautelen in die Tyrodelösung eingebracht. Die Organstückchen wurden 7 Tage lang mit Abständen von 24 Stunden fluoreszenzmikroskopisch untersucht, und es zeigte sich, daß trotz der alkalischen Reaktion

der Tyrodelösung, die ja in ihrer Zusammensetzung wesentlich physiologischer ist als  $n/10$  NaOH, von derselben keinerlei Einfluß auf die Fluoreszenz der Gewebe ausgeübt wurde. Es war keine Fluoreszenzverminderung nachzuweisen, auch am Rande der Schnitte nicht. Der negative Ausfall dieser Versuche mit Tyrodelösung macht es sehr unwahrscheinlich, daß das Aufhören der Fluoreszenz der alten Infarkte durch die alkalische Reaktion bedingt wird. Es mußte also noch nach anderen Gründen gesucht werden. Mir kam noch der Gedanke, ob dies nicht vielleicht am höheren Eisengehalt der alten Infarkte liegen könnte. Beim Studium der Literatur ergab sich, daß verschiedene Untersucher (vor allem *Marchand*) in Infarkten eine nicht unerhebliche Zunahme des Eisengehaltes fanden. Nun ist ebenfalls bekannt, daß Eisengehalt die Fluoreszenz von Geweben hemmt bzw. ganz aufhebt. Auf diese Tatsache haben verschiedene Forscher hingewiesen (*Haitinger, Hamperl* u. a.). Man nimmt z. B. an, daß Erythrocyten und Hämosiderinpigment wegen ihres hohen Eisengehaltes nicht fluorescieren, andererseits ist es möglich, durch Abspalten des Eisens Hämosiderinpigment zum Leuchten zu bringen (*Hamperl*). Ich kochte Hämoglobinpulver der Firma Merck mit  $N/HCl$  und stellte fest, daß durch diese Maßnahme das an sich nicht fluorescierende Hämoglobinpulver eine weißliche Fluoreszenz annahm. Alle diese Tatsachen sprachen dafür, daß vielleicht die Zunahme des Eisengehaltes für das Aufhören der Fluoreszenz der alten Infarkte verantwortlich zu machen sei. Ich versuchte nun, experimentell nachzuweisen, daß vorher einwandfrei fluorescierendes Gewebe durch Erhöhung seines Eisengehaltes tatsächlich weniger oder gar nicht mehr fluoresciere. Als erstes prüfte ich, ob dieser Zweck schon durch Einbringen von Gewebsschnitten in Eisensulfatlösungen (Ferri- oder Ferrosulfat) erreicht werden könnte. Ich brachte Schnitte, welche von gekochten Leber- und Nierenstückchen stammten und einwandfrei fluorescierten, in diese Lösungen und beließ sie bis 48 Stunden in denselben. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung fand sich jedoch, daß die Fluoreszenz nicht ab-, sondern sogar eher zugenommen hatte. Eine mit Ferri-Ferro-Cyankalium vorgenommene Eisenfärbung der Schnitte zeigte deutlichen Eisengehalt. Es mußte bei diesem Ausfall der Versuche daran gedacht werden, daß vielleicht nur eine Durchtränkung der Schnitte mit Eisensulfatlösung stattgefunden hatte, ohne daß das Eisen eine Verbindung mit den Gewebszellen eingegangen war, und daß dadurch der negative Ausfall der Versuche bedingt sei. Mit Hilfe der Eisenfärbung war nicht ohne weiteres feststellbar, ob das Eisensulfat nur einfach in das Gewebe hineindiffundiert, oder ob es mit den Zellen irgendwelche Bindungen eingegangen war. Da ich es aus diesem Grunde nach wie vor für wahrscheinlich hielt, daß die Anwesenheit von Eisen für das Aufhören der Fluoreszenz verantwortlich sei, habe ich noch auf andere Weise versucht, nämlich mit Hilfe des elektrischen Stromes, das Eisen in das Gewebe hineinzubringen.

Meine Versuchsanordnung war dabei folgende: Das gekochte Nieren- oder Lebergewebe, das vorher auf seine Fluoreszenz geprüft war, wurde mit dem Gefriermikrotom geschnitten und die Schnitte in Wasser aufgefangen. Nun wurden die Schnitte auf ein Stückchen Platinblech aufgezogen und angetrocknet. Da zu befürchten war, daß durch die unvermeidliche Bildung von Gasblasen während des Stromdurchganges auch unter dem Schnitt derselbe abschwimmen würde, habe ich ihn noch zusätzlich durch Bestreichen seiner Ränder mit geschmolzenem Paraffin an dem Platinblech befestigt. Als Elektrolyt wurde Ferri- und auch Ferrosulfat (chemisch rein Merck), in destilliertem Wasser gelöst, verwendet. Als Kathode wurde pulverisiertes chemisch reines Eisen benutzt, welches in einem Dialysierfilter in die Lösung eingebracht war. Gearbeitet wurde mit einer Netzspannung von 110 Volt Gleichstrom und ein Widerstand von 900 Ohm vorgeschaltet. Der Abstand der Elektroden im Elektrolyten betrug 6 cm. Der Strom blieb immer 1 Stunde eingeschaltet.

Es zeigte sich, daß die Schnitte nach dieser Behandlung keinerlei Fluoreszenz mehr aufwiesen und vollständig dunkel im Fluoreszenzmikroskop erschienen. Die Eisenfärbung war positiv. Man mußte nun natürlich daran denken, daß vielleicht nicht das Eisen, sondern der Stromdurchgang durch das Gewebe die Fluoreszenz ausgelöscht haben könnte. Um diesem Einwand zu begegnen, habe ich den gleichen Versuch unter etwas veränderten Bedingungen angestellt. Der Schnitt wurde wie erwähnt auf das Platinblech aufgeklebt, nur wurde jetzt als Elektrolyt destilliertes Wasser mit geringem Kochsalzzusatz, um es leitend zu machen, verwendet. Als Kathode wurde nicht Eisen, sondern ein zweites Platinblech in die Lösung eingetaucht. Bei dieser Versuchsanordnung wurde die Fluoreszenz nicht nur nicht ausgelöscht, sondern sie nahm sehr stark zu. Nach diesem Kontrollversuch ist man nach meiner Überzeugung berechtigt, anzunehmen, daß das Eisen für das Aufhören der Fluoreszenz bei der ersten Versuchsanordnung verantwortlich zu machen ist. Ich glaube, daß man das Versuchsergebnis mit Vorbehalt auf die Infarkte übertragen darf. Es wird zwar niemals möglich sein, so große Eisenmengen, wie ich sie mit Hilfe des elektrischen Stromes in das Gewebe brachte, in den Infarkten nachzuweisen, aber ich glaube bestimmt, daß auch wesentlich geringere Eisenmengen schon ein Auslösen der Fluoreszenz bewirken werden. Jedenfalls ist z. B. der Eisengehalt der Erythrocyten völlig ausreichend, um ihnen jegliche Fluoreszenz zu nehmen. Durch die verschiedenen Versuche scheint es mir als sehr wahrscheinlich gemacht, daß die Zunahme des Eisengehaltes bei den Infarkten nach einer gewissen Zeit das Aufhören ihrer Fluoreszenz bewirkt.

Nun blieb noch die Frage zu prüfen, nach welcher Zeit etwa ein Infarkt seine helle Fluoreszenz einbüßt. Diese Frage ist nur mit Hilfe von Tierversuchen zu klären. Hierzu wurden Kaninchen verwandt. Den Tieren wurden durch Unterbindung eines Astes der Arteria renalis künstlich Niereninfarkte gesetzt (Abb. 1).

Die Operationstechnik war folgende: Die Tiere wurden mit Pernocton narkotisiert, dann erfolgte retroperitoneale Freilegung einer Niere, die dann nach Kapsel-

spaltung dekapuliert wurde. Dann wurde ein Ast der Nierenarterie aufzufinden versucht, um ihn zu unterbinden. Dies gelang mehr oder weniger leicht, da die Teilungsstelle der Nierenarterien manchmal fast am Nierenhilus zu finden ist, manchmal aber auch schon 1 cm unterhalb von ihm. Nach Unterbindung wurde die Niere in ihr Lager zurückgeschoben und die Operationswunde durch Naht und Klammern verschlossen. Die Tötung einiger Tiere erfolgte 3 Tage nach der Operation. Es fanden sich bei einem geglückten Teil von diesen schöne, scharf gegen die Umgebung abgesetzte weiße Infarkte. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung fand sich eine helle weißliche Fluoreszenz, die ganz besonders

Abb. 1. Frischer, anämischer Niereninfarkt. *a* Gesundes, nicht fluoreszierendes Gewebe mit leuchtenden Lipoideinlagerungen. *b* Grenze des Infarktes gegen das gesunde Gewebe mit schwach leuchtenden Tubuli. *c* Hell leuchtende, völlig nekrotische Tubuli.

imponierend bei einigen Tubulis der Rindenrandpartien zu sehen war. Die Untersuchungen der Hämatoxilin-Eosinpräparate ergab, daß diese helle Fluoreszenz einiger Tubuli auf Kalkeinlagerungen zurückzuführen war. Bei den Glomerulis fiel auf, daß nur die *Bowmansche* Kapsel schwarzbläulich leuchtete (ein Befund, der auch bei normalen Nieren erhoben werden kann), während die Gefäßschlingen vollständig dunkel waren. Ebenso konnten solche Fluoreszenzschwankungen auch an den nicht verkalkten Tubulis erhoben werden, welche nämlich an manchen Stellen hell fluoreszierten, an anderen wieder vollständig dunkel waren. Diese Befunde kann ich nicht mit Sicherheit deuten. Es bestehen zwei Erklärungsmöglichkeiten. Einmal ist vorstellbar, daß die Gerinnung nicht schlagartig an allen Stellen des Nephrons gleichzeitig einsetzt, so daß die ja durch die Gerinnung bedingten Fluoreszenzerscheinungen ebenfalls verschieden stark ausfallen müssen. Die zweite Deutung wäre die, daß vielleicht schon an einzelnen Stellen die oben beschriebene Auslöschung der Fluoreszenz durch Eisenablagerung einsetzt. Für die Richtigkeit der ersten Deutung würde sprechen, daß gerade die Glomeruli nicht leuchteten. Es zeigte sich nämlich im Hämatoxilin-Eosinpräparat, daß die Glomeruli im Gegensatz zu den Tubulis noch eine verhältnismäßig gute Kern-

färbung aufwiesen, also noch nicht völlig zugrunde gegangen waren. An den Tubulis war ebenfalls die Kernfärbung verschieden stark ausgeprägt. Um diese Frage aber endgültig zu klären, wäre es nötig, eine wesentlich größere Versuchsreihe anzusetzen, es ist mir aber unter den augenblicklichen Umständen nicht gelungen, die hierfür erforderlichen Tiermengen zu erhalten.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Tiere erst nach 13 bis 28 Tagen getötet. Bei dieser waren die Ergebnisse uneinheitlich. Zum Teil war im Infarktgebiet die Fluoreszenz so gut wie ausgelöscht, zum Teil ließ sich aber auch noch eine helle Fluoreszenz nachweisen. Bei vorsichtiger Deutung meiner Befunde glaube ich, soviel sagen zu können, daß frische bis 10 Tage alte Niereninfarkte auf alle Fälle hell fluoreszieren, während bei einem Alter der Infarkte von 10—28 Tagen die Fluoreszenz unter Umständen schon nachzulassen beginnt.

Zum Schluß muß ich noch auf einen Punkt zu sprechen kommen. Es ist auffallend, daß die Niereninfarkte offensichtlich sehr viel länger brauchen, um ihre Fluoreszenz einzubüßen, als die Milzinfarkte. Es ist überhaupt fraglich, ob man häufiger wirklich hell leuchtende Milzinfarkte finden wird. Mir ist es bisher nur einmal gelungen. Ich habe mich nun gefragt, ob zwischen den beiden Organen nicht vielleicht ein prinzipieller und nicht nur ein gradueller Unterschied bezüglich der Fluoreszenz ihrer Infarkte besteht. Die Niere ist größtenteils aus Epithelien aufgebaut, die Milz aus mesenchymalem Gewebe. Es wäre ja nun gut denkbar, daß sich die Epithelien grundlegend anders verhalten wie das mesenchymale Gewebe. Gegen diese Annahme spricht aber Verschiedenes. Einmal ist es mir gelungen, sowohl einen Niereninfarkt zu finden, welcher vollständig dunkel war, als auch einen hellfluoreszierenden Milzinfarkt (Abb. 2 und 3). Weiterhin stellte ich folgenden Versuch an: Ich habe vollständig fluoreszenzfreies Milzinfarktgewebe in Normalsalzsäure gekocht. Bei der hierauf folgenden fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung zeigte das vor der Säurebehandlung vollständig dunkel gewesene Gewebe eine helle bläuliche Fluoreszenz. Das benachbarte intakte Milzgewebe hatte seine Fluoreszenz lange nicht in dem Maße verändert wie das Infarktgewebe. Dieser Versuch spricht doch auch sehr dafür, daß durch die Salzsäure Eisen, welches etwa in dem Infarktgewebe vorhanden gewesen war, herausgelöst wurde. Der nunmehr eisenfreie Infarkt leuchtete in einem hellen bläulichen Fluoreszenzfarbton. Weiterhin ist zu bedenken, daß sich Milzinfarktgewebe sehr viel leichter mit Eisen imprägnieren kann als das Epithelgewebe der Niere. In der Milz kommt erstens sehr viel häufiger Eisen vor, zweitens ist sie viel blutreicher, es kann also aus den im Infarkt zugrunde gehenden roten Blutkörperchen sehr viel mehr freierwerdendes Eisen in das Gewebe übergehen. Schließlich konnte ich ja auch feststellen, daß das interstitielle Nierengewebe und die Glomeruli, also gerade das gefäßführende Gewebe, bei den älteren Niereninfarkten vollständig dunkel war. Schließlich konnte ich noch beobachten, daß

die Miniaturinfarkte der Glomeruli bei einer embolischen nichteitrigen Herdnephritis hell leuchteten, also ein weiterer Beweis dafür, daß auch mesenchymales Gewebe bei der Infarzierung hell fluorescieren kann. Um aber ganz sicher zu gehen, habe ich vor, in einer späteren Arbeit durch reichliche parenterale Eisenzufuhr die Nieren mit Eisen anzureichern und zu versuchen, ob bei solchen Tieren nach Unterbindung der Nierenarterie die Infarkte schon nach kürzerer Zeit fluoreszenzfrei sein werden. Ich glaube aber, auch ohne diesen Versuch wahrscheinlich

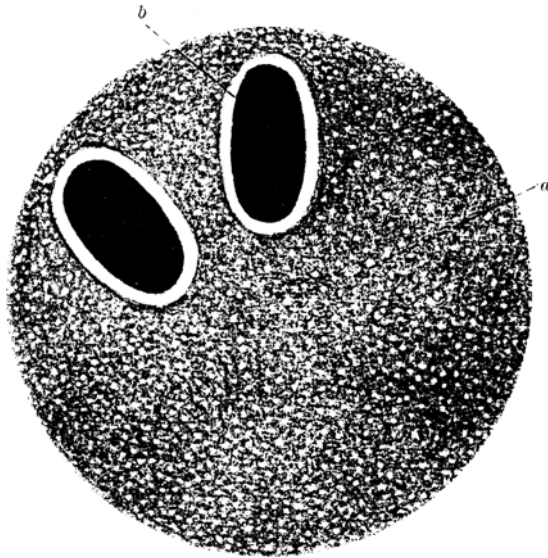


Abb. 2. Älterer, nicht mehr fluorescierender Milzinfarkt. *a* Infarktgewebe mit Abnützungspigmenteinlagerungen. *b* Gefäße mit blauweißlicher fluorescierender Elastica.

gemacht zu haben, daß die Fluoreszenz der Infarkte von ihrem Eisen-gehalt abhängig ist.

Am Schlusse des ersten Abschnittes meiner Arbeit will ich noch die Frage prüfen, ob vom Rande der Infarkte her noch nachweisbare Diffusionsströme oder capilläre Gefäßversorgungen nachweisbar sind. Um dies nachzuprüfen, spritzte ich einigen Kaninchen mit Infarkten 15 Min. vor ihrer Tötung 1 ccm einer  $\frac{1}{2}\%$ igen Trypaflavinlösung ein. Das Trypaflavin ist ein ausgezeichnetes Mittel, um die Zellkerne zur Darstellung zu bringen (*Hirt*). Vor allen Dingen hat es den großen Vorteil, noch in außerordentlich starken Verdünnungen Kerne anzufärben. Auch das Protoplasma wird vom Trypaflavin blaßgrünlich angefärbt. Da das Trypaflavin in so außerordentlich starken Verdünnungen noch wirkt, kann man bei Ausbleiben der Färbung mit ziemlicher Sicherheit darauf schließen, daß an die betreffenden ungefärbten Stellen auch kein

Trypaflavin hingekommen ist. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der mit Trypaflavin vorbehandelten Infarkte zeigte sich, daß sie nicht angefärbt waren, während das angrenzende gesunde Gewebe gute Kern- und Protoplasmafärbung aufwies. Man könnte nun den Einwand erheben, daß das geronnene Gewebe gar keine Färbung mit Trypaflavin mehr zuließ. Um diesem Einwand zu begegnen, habe ich geronnenes Gewebe mit Trypaflavin in einer Verdünnung von 1 : 50000 angefärbt. Das Gewebe zeigte eine deutlich erkennbare Grünfluoreszenz.

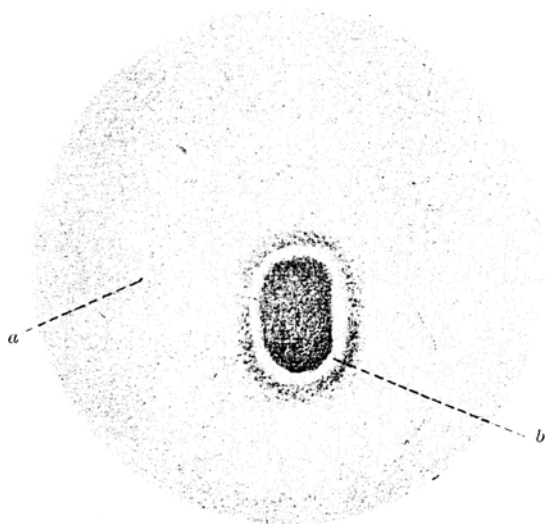


Abb. 3. Der gleiche Infarkt wie in Abb. 2 nach kurzem Kochen in N.HCl. *a* Infarktgewebe, *b* Gefäß mit blauweißlich fluoreszierender Elastica.

Man darf also annehmen, daß das Trypaflavin sicher nicht in das Infarktgewebe eingedrungen ist, da es sonst nach dem Ausfall dieser Versuche zu einer Anfärbung hätte kommen müssen. Es wird also in kurzer Zeit sicher kein nennenswerter Flüssigkeitsaustausch zwischen gesundem und Infarktgewebe stattfinden. Es kann natürlich nicht in Abrede gestellt werden, daß bei längerer Versuchsdauer doch eine Anfärbung des Infarktgebietes zustande gekommen wäre.

Ich möchte nun einen kurzen Überblick über die bisher gewonnenen Ergebnisse anschließen:

1. Es konnte gezeigt werden, daß geronnene Eiweißmassen fluoreszieren.
2. Weiterhin wurde die Rolle des Calciums bei diesen Fluoreszenzerscheinungen untersucht.
3. An von Leichenmaterial stammenden Milz- und Niereninfarkten konnte die eigenartige Tatsache festgestellt werden, daß Milzinfarkte

ihre Fluoreszenz in den meisten Fällen ganz eingebüßt hatten, während die Niereninfarkte noch nach längerer Zeit hell fluorescierten.

4. Für die schwindende Fluoreszenz der Milzinfarkte wurde ein erhöhter Eisengehalt verantwortlich gemacht und diese Behauptung durch verschiedene Versuche gestützt.

5. Es war nicht möglich, durch Tierversuche den Zeitraum zu bestimmen, in welchem die Fluoreszenz etwa zum Verschwinden kommt.

6. Wurde noch untersucht, ob zwischen Infarkt und Umgebung nennenswerte Diffusionsströme vorhanden seien. Der Ausfall der Versuche machte dies nicht wahrscheinlich.

## 2. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen kaliumchromatvergifteter Nieren von Hunden.

Die im ersten Kapitel meiner Arbeit beschriebenen, bei der Eiweißgerinnung auftretenden Fluoreszenzerscheinungen machten es sehr wahrscheinlich, daß auch pathologische Prozesse an den Nieren Fluoreszenzen bedingen würden. Am geeignetsten für solche Untersuchungen erschienen mir die sogenannten nekrotisierenden Nephrosen, die ja durch Schwermetallsalze, wie Kaliumchromat oder Sublimat, leicht experimentell hervorzurufen sind. Bei diesen nekrotisierenden Nephrosen treten bekanntlich am tubulären Apparat des Nephrons schwerste degenerative Prozesse, Verquellungen, Nekrosen und Gerinnungen auf, von denen ganz sicher Fluoreszenzerscheinungen zu erwarten waren. Weiterhin interessierte es mich, festzustellen, ob etwa auftretende Fluoreszenzen mit am Hämatoxilin-Eosinpräparat studierten Veränderungen in Einklang zu bringen seien. Zu den Versuchen wurden Hunde verwandt, da sie sehr empfindliche Nieren haben und sich bei ihnen die ausgeprägtesten Veränderungen erwarten ließen. Als Gift benützte ich Kaliumchromat, das sehr schnell und sicher eine schwere nekrotisierende Nephrose hervorrief. Pro Kilogramm Körpergewicht wurden den Tieren etwa 7 mg Kaliumchromat, in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst, subcutan injiziert. Nach etwa 8 Tagen erfolgte nochmals die gleiche Gabe. Nach 14 Tagen wurden die Tiere getötet, einige waren auch vorher schon spontan gestorben. Der Urin wurde laufend auf Eiweiß untersucht und ergab meist schon nach wenigen Tagen eine stark positive Sulfosalicylsäureprobe. Insgesamt nahm ich 5 Hunde in Versuch und untersuchte ihre Nieren fluoreszenzmikroskopisch. Da die Ergebnisse weitgehend übereinstimmten, werde ich nur einen Versuch genau schildern und auch nur das eine Protokoll genau mitteilen.

Einer Bulldogge injizierte ich in Abständen von 8 Tagen je 150 mg Kaliumchromat, in je 5 cem physiologischer Kochsalzlösung gelöst, subcutan (die Bulldogge war 20 kg schwer), vom 3. Tage ab war die Sulfosalicylsäureprobe auf Eiweiß stark positiv. Das Allgemeinbefinden des Hundes schien schlecht, seine Freßlust



war sehr gering. 14 Tage nach der ersten Injektion tötete ich den Hund durch Entbluten in Äthernarkose und nahm die Nieren sofort heraus. Makroskopisch erschienen die Nieren etwas vergrößert, die Kapseln waren schwer abziehbar. Die Farbe der Oberfläche war blaßbraunrötlich, die Konsistenz teigig. Auf den Schnittflächen sah man eine verwaschene Markrindenzeichnung, die Rinde war verhältnismäßig schmal. In der Rinde fanden sich weißliche, etwa  $\frac{1}{2}$  mm breite Streifen von ungleicher Länge, welche die Nierenoberfläche nicht ganz erreichten. Stellenweise gingen diese Streifen auch in die Marksubstanz über. Im übrigen war die Marksubstanz ohne besondere pathologische Befunde. Die Nierenbecken zeigten eine zarte, blasse, glatte Schleimhaut und waren nicht erweitert. Die Ureteren und Beckenorgane waren ohne Besonderheiten.

Mikroskopische Untersuchung bei Tageslicht im Hämatoxylin-Eosinpräparat: Obgleich die histologischen Veränderungen nach Kaliumchromatvergiftungen bei Hunden genau bekannt und beschrieben sind, will ich doch den bei Tageslicht erhobenen Untersuchungsbefund mitteilen, da ich mich bei Schilderung der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen häufig auf denselben beziehen muß. Die Glomeruli zeigten keine besonders schweren Veränderungen. Stellenweise erschienen sie etwas zellreich. Die meisten zeigten eine starke Hyperämie, in einigen sah man regelrechte Stasen. Viele wiesen leichte Verquellungen der Gefäßschlingen auf. Im großen und ganzen füllten daher die Glomeruluscapillaren den Glomerulus prall aus, so daß die *Bowmanschen* Räume nur als ein schmaler Spalt zu sehen waren. Soweit dieser sichtbar war, zeigte er sich mit geronnenen, wahrscheinlich Eiweißmassen angefüllt. Ganz außerordentlich schwere Veränderungen zeigte der tubuläre Apparat. Namentlich die in der Umgebung der Glomeruli gelegenen Hauptstücke hatten besonders schwer gelitten. Zum Teil waren sie vollständig verquollen und nekrotisch, ein Lumen war bei verschiedenen Hauptstücken nicht mehr nachzuweisen. Aber nicht nur die Hauptstücke zeigten diese Veränderungen, auch die übrigen Tubulusabschnitte, namentlich die *Henleschen* Schleifen, waren schwer verändert, die Schwere ihrer Schädigung unterschied sich oft in nichts von der der Hauptstücke. Die initialen Sammelröhren zeigten schließlich noch vereinzelte Veränderungen, die Sammelröhren selbst wiesen keine Veränderungen im Sinne einer Nekrose mehr auf. Es fanden sich nun alle Übergänge zwischen diesen geschilderten schwersten Veränderungen und noch einigermaßen intakten Tubulis. Am wenigsten intakte Tubuli waren im Bereich der Hauptstücke vorhanden, während wiederum die dünnen Abschnitte der *Henleschen* Schleifen verhältnismäßig wenig gelitten hatten. Manche Abschnitte, namentlich wieder im Bereich der Hauptstücke, zeigten einen dunkelbläulichen Farbton, man konnte an diesen Stellen schon von einer beginnenden Verkalkung sprechen. An manchen Stellen sah man auch Andeutungen von Regenerationsversuchen, aber nicht so gut und ausgeprägt, wie man diesen Befund manchmal an mit Sublimat vergifteten menschlichen Nieren erheben kann. Im Lumen vereinzelter Tubuli und vor allem in den Sammelröhren fanden sich reichlich Eiweißzylinder.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung: Während die eben beschriebenen Präparate wie gewöhnlich nach Formolfixierung gewonnen waren, wurden die zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung bestimmten aus in dem ersten Kapitel ausführlich besprochenen Gründen frisch mit dem unterkühlten Messer geschnitten und in physiologischer Kochsalzlösung eingedeckt. Die Glomeruli erschienen vollständig dunkel, lediglich die *Bowmansche* Kapsel leuchtete in einem schwachen bläulichen Farbton. Die Tubuli zeigten sehr auffallende Fluoreszenzerscheinungen. Namentlich im Bereich der Hauptstücke fand sich an vielen Tubulis eine

deutliche grauweißliche, manchmal auch mehr grangelbliche Fluoreszenz. Manche Tubuli zeigten einen fast weißen Farbton. Je stärker das Fluoreszenzlicht war, um so größer waren auch die morphologischen Veränderungen. Die hell fluoreszierenden Stellen des Tubulusapparates ließen keine Zellstrukturen mehr erkennen, sondern entsprachen den bei der Hämatoxilin-färbung beschriebenen vollständig nekrotischen Partien. In

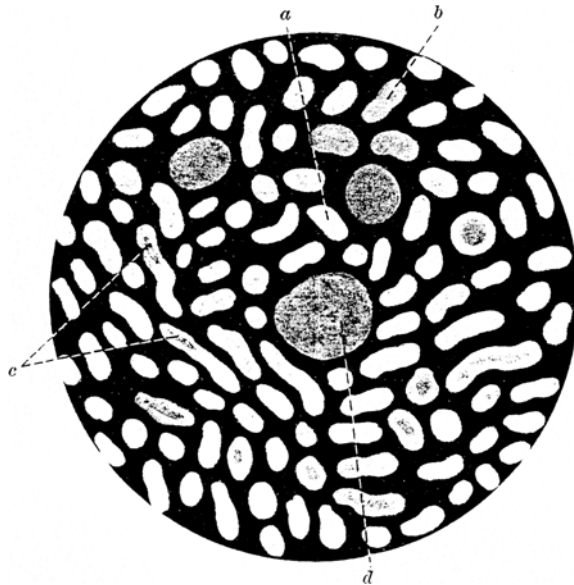


Abb. 4. Kaliumchromatvergiftete Niere. *a* Völlig nekrotische, weiß fluoreszierende Tubuli. *b* Weniger stark geschädigte, dunkler erscheinende Tubuli. *c* Tubuli, welche zum Teil völlig nekrotisch sind, aber in noch besser erhaltene Partien übergehen, die auch noch ein Lumen erkennen lassen. *d* Schwach fluoreszierende Glomeruli.

den Gebieten mit besser erhaltenen Strukturen ließ die Intensität des Fluoreszenzlichtes sofort nach.

**Färbung mit Trypaflavin:** Da in den hellweiß fluoreszierenden Partien keinerlei Zellstrukturen mehr erkennbar waren, habe ich versucht, durch Anfärben der Präparate mit Fluorochromen kontrastreichere Bilder zu erzielen. Zur nachträglichen Anfärbung benutzte ich Trypaflavin in einer Verdünnung von 1 : 5000. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der mit Trypaflavin gefärbten Präparate sah man, daß die bei den ungefärbten Präparaten dunkel erschienenen Partien (also die intakteren) eine sehr gute Kernfärbung zeigten. Die Kerne fluoreszierten in gewohnter Weise in einem leuchtend grünlichen Farbton. Dergleichen waren die Glomerulus- und Sammelröhrenkerne gut angefärbt. Die nekrotischen Partien, welche im ungefärbten Präparat weiß fluoresziert hatten, zeigten keine Spur einer Kernfärbung mehr, sondern fluores-

cierten in einem gleichmäßigen, grünlichen, über den ganzen Tubulusabschnitt verteilten Farbton. Wahrscheinlich waren die Kernsubstanzen, welche sich elektiv mit Trypaflavin anfärben, in Lösung gegangen und hatten dadurch die diffuse Färbung der nekrotischen Partien mit Trypaflavin bewirkt. In einer Beziehung scheint mir aber der Ausfall der Trypaflavinfärbung von Wichtigkeit. Es war zwar schon bei der Untersuchung ungefärbter Präparate sehr wahrscheinlich geworden, daß die Stellen hellster Fluoreszenz auch tatsächlich den Stellen stärkster Schädigung entsprachen. Während es aber bei den ungefärbten Präparaten bei der Wahrscheinlichkeit bleiben mußte, waren die Trypaflavinpräparate absolut beweisend; denn die Stellen, welche keine Kernfärbung mehr aufwiesen, waren auch die Partien hellster Fluoreszenz. Man war nämlich trotz der Grünfluoreszenz noch gut in der Lage, die helle weißliche Fluoreszenz des Protoplasmas zu erkennen, welche durch die grünliche Trypaflavinfärbung nicht völlig überdeckt wurde. Weiterhin habe ich noch versucht, die bei den nekrotisierenden Nephrosen auftretenden degenerativen Verfettungen fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen. Bei der Betrachtung der ungefärbten Präparate waren nämlich in einigen sonst ganz besonders hell fluoreszierenden Tubulis weißgelblich fluoreszierende Pünktchen aufgefallen, welche ich gleich als Fett- oder wenigstens Lipoidsubstanzen deutete, ohne aber einen sicheren Beweis für diese Annahme zu haben. Auch *Hamperl* berichtete schon, daß er in den Nieren blaßgelblich oder weißlich bzw. blaugrün aufleuchtende Fetttropfchen gesehen habe. Weiterhin beobachtete er, daß die bei der Verfettung der Tubulusepithelien eingelagerten Neutralfetttröpfchen nicht immer fluoreszierten, ohne daß andere histologische Methoden imstande gewesen wären, einen Unterschied zwischen fluoreszierendem und nichtfluoreszierendem Fett aufzudecken. Ausgezeichnet zur fluoreszenzmikroskopischen Fettdarstellung ist das Chlorophyll geeignet (*Haitinger*).

*Haitinger* empfiehlt die Herstellung dieses Fluorochroms aus den Wurzeln von *Chelidonium majus* in Alkohol und Essigsäureextrakt. Da diese Wurzeln nicht so ohne weiteres greifbar sind, versuchte ich, das Chlorophyll aus Kastanienblättern zu gewinnen. Die Blätter wurden entrippt, in einem Mörser zerrieben und mit 70%igem Alkohol extrahiert und dann filtriert.

Die Versuchsergebnisse mit diesem so gewonnenen Chlorophyll waren absolut befriedigend. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der 1 Min. mit Chlorophyll angefärbten Präparate ergab folgendes Bild: Sämtliche Glomeruli zeigten eine ausgesprochene Rotfärbung, und zwar ganz diffus (Chlorophyll leuchtet im ultravioletten Licht rot). Ein sehr interessanter Befund, der weiter die *Hamperlsche* Ansicht bestätigt, daß Neutralfette oder auch andere Fettstoffe nicht primär zu fluoreszieren brauchen. Im ungefärbten Präparat hatten die Glomeruli keine Spur einer Fluoreszenz gezeigt. Auch die nichtnekrotischen Tubuli, welche

eine deutliche Kernfärbung mit Trypaflavin aufwiesen (um die Bilder kontrastreicher zu machen, habe ich in einigen Fällen die Chlorophyllfärbung mit Trypaflavin kombiniert), waren schwach rötlich gefärbt. Sogar die Epithelien der Sammelröhren, welche ja ebenfalls im ungefärbten Präparat dunkel erschienen waren, zeigten vereinzelte Rotfärbung. Sehr deutlich war die Verfettung der schwerer geschädigten Tubulusabschnitte zu erkennen, welche keine Kernfärbung mit Trypaflavin mehr aufwiesen. Im großen und ganzen waren die betreffenden nekrotischen Tubuli diffus leuchtend rot gefärbt, andere wieder hatten aber nur einen schmalen um so intensiver rot gefärbten Randsaum. Die Kontrollpräparate mit Scharlachrotfärbung ergaben einen ähnlichen Befund, es zeigte sich aber, daß die Chlorophyllfärbung der mit Scharlachrot offenbar überlegen ist. Denn einmal waren die bei der Chlorophyllfärbung deutlich rot gefärbten Glomeruli bei der Scharlachrotfärbung kaum oder gar nicht dargestellt, und zum anderen waren die Farben nicht so leuchtend wie bei der Chlorophyllfärbung.

Schlußfolgerungen aus den Befunden: Die beschriebenen Versuche verfolgten das Ziel, festzustellen, ob nephrotische Veränderungen fluoreszenzmikroskopisch erfaßbar sind und ob womöglich neue Erkenntnisse gewonnen werden könnten. Aus meinen Versuchen dürften folgende Schlüsse zu ziehen sein: Einigermassen schwere nephrotische Veränderungen im Sinne einer nekrotisierenden Nephrose (durch Schwermetallvergiftung hervorgerufen) sind ohne weiteres erkennbar. Am schwersten verändert erscheinen die Tubuli contorti erster Ordnung, aber auch der übrige Tubulusapparat zeigt mehr oder weniger ausgeprägte Veränderungen im Fluoreszenzmikroskop. Vollständig frei von Veränderungen wurden im ungefärbten Präparat die Sammelröhren und die Glomeruli gefunden. Kontrastreiche Bilder erhält man bei der Anfärbung der Präparate mit Trypaflavin. Man ist ohne weiteres in der Lage, die Diagnose nekrotisierende Nephrose mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie zu stellen. Ich habe niemals, weder am menschlichen noch am tierischen gesunden Material, Bilder erhalten, welche zu Verwechslungen mit meinen beschriebenen Befunden Anlaß geben könnten. Sehr bewährt hat sich auch zur Darstellung der degenerativen Verfettung bei den nekrotisierenden Nephrosen das Chlorophyll. Es gibt kontrastreichere Bilder als die zur Kontrolle angewandte Scharlachrotfärbung. Außerdem konnten mit Hilfe des Chlorophylls verfettete Partien nachgewiesen werden, die sich mit der Scharlachrotfärbung gar nicht angefärbt hatten. Wenn man bedenkt, daß die Chlorophyllfärbung in 1 Min. hergestellt werden kann, muß man die Überlegenheit des fluoreszenzmikroskopischen Fettnachweises zugeben, die namentlich bei größeren Reihenuntersuchungen sehr ins Gewicht fallen wird.

Abschließend habe ich noch festzustellen versucht, ob es möglich ist, mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie die echten nephrotischen Ver-

änderungen von kadaverösen abzugrenzen. Es ist ja bekanntlich oft ganz außerordentlich schwer, mit den gewöhnlichen histologischen Methoden beginnende Fäulnis von echter trüber Schwellung zu unterscheiden. Manchmal ist man bei etwas stärker kadaverös veränderten Nieren nicht in der Lage, zu einer endgültigen Diagnose zu kommen. Um hierüber Klarheit zu erlangen, habe ich gesunde, von Leichenmaterial stammende Nieren, die keine Fluoreszenz zeigten, bei Zimmertemperatur liegen lassen und 3 Tage lang alle 24 Stunden mit dem Gefriermikrotom Schnitte angefertigt. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung ergab, daß während dieser Zeit keine neuen, vorher nicht vorhanden gewesene Fluoreszenzen auftraten. Man kann also in Zweifelsfällen die betreffenden Präparate fluoreszenzmikroskopisch untersuchen und bei deutlicher Fluoreszenz der Tubuli sich für nephrotische und gegen kadaveröse Veränderungen aussprechen. Ich habe vor, auch dieser Frage später noch weiter nachzugehen.

### 3. Ausscheidung von fluorescierenden Stoffen durch die kaliumchromatvergiftete Niere.

*Ellinger* und *Hirt* haben in zahlreichen sehr aufschlußreichen Arbeiten, welche ich in der Literaturübersicht erwähnte, die Ausscheidung von fluorescierenden Stoffen durch die Niere am lebenden Tier untersucht. Im Rahmen dieses Abschnittes meiner Arbeit interessiert am meisten, an welchen Stellen des Nephrons sie die Farbstoffausscheidung beobachteten. Im allgemeinen nahmen sie an, daß die Farbstoffe durch die Glomeruli ausgeschieden wurden und führen die Anfärbung der Tubulusepithelien auf die Rückresorption von Farbstoff zurück. Interessanterweise konnten beide Forscher jedoch beobachten, daß unter besonderen Bedingungen, namentlich bei verschlechtertem Kreislauf, auch von den Epithelien der 2. Abschnitte der Tubuli der Farbstoff aktiv sezerniert wurde. Beim Studium der Arbeiten von *Ellinger* und *Hirt* gelangt man zu der Anschauung, daß die Beobachtung mit Hilfe des Intravitalmikroskops die Methode der Wahl ist. Bei keinem anderen Verfahren ist man mit der gleichen Überzeugungskraft in der Lage, Zweifeln an der Richtigkeit der Bestimmung des Ausscheidungsortes, welcher beobachtet wurde, zu begegnen. Während man beim Schnittpreparat immer gezwungen ist, von einem Zustand auf einen Vorgang zu schließen, rollt bei der Lebendbeobachtung das Geschehen vor unseren Augen ab. Leider ist diese Arbeitsmethode bei menschlichem Untersuchungsmaterial gar nicht und bei großen Versuchstieren, wie z. B. Hunden, nur beschränkt anwendbar. Soweit ich die Literatur übersehe, ist mit Hilfe der Intravitalmikroskopie am genauesten die Funktion der Froschniere erforscht. Es erscheint aber zum mindesten fraglich, ob man die Ergebnisse dieser Untersuchungen auf die großen Säuger und den Menschen übertragen

darf, da die Froschniere, namentlich in ihrer Gefäßversorgung, einen nicht unerheblich abweichenden Bau aufweist. Aber auch wenn man auf die Lebendbeobachtung verzichten muß, leistet die Fluoreszenzmikroskopie bei der Erforschung der Funktion pathologisch veränderter Nieren Vorzügliches. Der große Vorteil dieser Methode liegt darin, daß man erstens in der Lage ist, ohne besondere vorherige Anfärbung der Präparate geschädigte von ungeschädigten Nierenabschnitten zu unterscheiden (s. auch voriges Kapitel), und zweitens die von der Niere auszuschcheidenden Stoffe (Fluorochrome) schon in außerordentlich großen Verdünnungen fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar sind. Sehr wichtig ist es natürlich, mit Sicherheit zu sagen, an welcher Stelle des Nephrons der betreffende Stoff, Fluorescein oder andere, ausgeschieden wurde. Aber im Laufe meiner Versuche haben sich doch verschiedene Anhaltspunkte ergeben, die es gestatten, wenn auch nicht mit Sicherheit, so doch mit großer Wahrscheinlichkeit auf den wahren Ort der Ausscheidung zu schließen. Den ganzen großen Fragenkomplex: Filtriert oder sezerniert die Niere, an dieser Stelle aufzurollen, ist nicht meine Absicht und würde auch weit über den Rahmen dieser Arbeit hinausführen. Bis heute ist es jedenfalls nicht gelungen, einer der beiden Theorien restlos zur Anerkennung zu verhelfen. In neuerer Zeit mehrten sich wieder die Stimmen, welche die Filtrationstheorie in den Vordergrund stellen wollen (*Randerat, Cushny*), ohne jedoch völlig sichere Beweise dafür bringen zu können, daß wirklich im Glomerulus ausschließlich filtriert und im Tubulus nur rückresorbiert wird. Die Wahrheit wird wahrscheinlich in der Mitte liegen. Dafür sprechen zahlreiche in neuerer Zeit gemachte Beobachtungen, nicht zuletzt die von *Hirt*, welche ergab, daß unter besonderen Umständen auch beim Frosch in den zweiten Abschnitten nicht rückresorbiert, sondern sezerniert wird. Auch ich konnte im Rahmen meiner Arbeit, welche sich mit der Hämoglobinausscheidung durch die Niere befaßte, zeigen, daß die Tubuli ganz sicher auch in der Lage sind, aktiv zu sezernieren. Auch bei Versuchen, die sich mit der Ausscheidung von Stoffen durch die pathologisch veränderte Niere befassen, ist man gezwungen, die Frage, filtriert oder sezerniert die Niere, zu streifen. Wie wir im Laufe der Schilderungen der Versuche sehen werden, ist es ganz unmöglich, die erhobenen Befunde zu werten, ohne sich mit dem Problem auseinander zu setzen, woher der an den verschiedenen Stellen des Nephrons gefundene Farbstoff eigentlich stammt. Ich möchte nach diesen Vorbemerkungen nun zur Schilderung meiner Versuche kommen. Die Fragestellung dieses Arbeitsabschnittes lautete:

1. Wie sieht bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung die normale Niere nach Injektion von Fluorochromen im Schnittpreparat aus?
2. Wie verhalten sich stark geschädigte Abschnitte der Nephren nach Injektion von Fluorochromen?

3. Lassen sich aus den fluoreszenzmikroskopischen Befunden Rückschlüsse auf den Ausscheidungsort ziehen?

Zu den Versuchen wurden Ratten und Mäuse als Versuchstiere verwendet. Zur Injektion kamen folgende fluoreszierende Farbstoffe: Auramin, Trypaflavin, Fluoresceinnatrium und -kalium. Zunächst wurden die Farbstoffe normalen Mäusen und Ratten intravenös injiziert, die Tiere nach verschiedenen langen Zeiten getötet und die Nieren sofort fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Nieren wurden frisch mit dem unterkühlten Messer geschnitten und mit konzentrierter Kochsalzlösung eingedeckt. Die Art und Weise, wie die Präparate gedeckt werden, ist von außerordentlicher Wichtigkeit. Die zur Erregung der sekundären Fluoreszenz von mir verwandten Fluorochrome sind nämlich sehr leicht wasserlöslich. Verwendet man also zur Eindeckung der frischgeschnittenen Präparate physiologische Kochsalzlösung, Glycerin, Formol oder ähnliche Mittel, wird der Farbstoff in kürzester Zeit aus den Zellen herausgelöst, und man bekommt eine gleichmäßige sich über das ganze Präparat erstreckende grünliche Fluoreszenz, die ganz außerordentlich störend wirkt. Nach wenigen Sekunden ist das Bild schon stark verschwommen, und Einzelheiten sind kaum noch zu erkennen. Noch viel bedenklicher ist jedoch die Tatsache, daß nun natürlich auch sehr bald an anderen Nierenabschnitten durch den herausgelösten Farbstoff Färbungen vorgetäuscht werden, die nichts mit intravitalen Prozessen zu tun haben. Zunächst schien durch diese störende Nebenerscheinung die Möglichkeit, mit Hilfe des durchfallenden Lichtes die Fluoresceinausscheidung durch die Niere fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen, in Frage gestellt. Ich habe nun die verschiedensten Versuche unternommen, um diese Störungen zu beseitigen.

Zunächst versuchte ich, durch eine kurze, etwa  $1\frac{1}{2}$  Stunden dauernde Formolfixierung der unaufgeschnittenen Nieren die Erscheinung zu beseitigen. Die Versuche in dieser Richtung schienen auch zunächst ganz erfolgversprechend zu sein. Die auf diese Weise gewonnenen Präparate waren vollständig klar, die Tubuli zeigten eine schwach bräunliche Fluoreszenz mit ganz leicht grünlichem Einschlag. Die nur schwache Grünfärbung führte ich auf den Einfluß des Formols zurück. Die Kontrolluntersuchungen nicht mit Farbstoff vorbehandelter Nieren ergaben aber die betrübliche Tatsache, daß die Tubuli hier genau den gleichen Fluoreszenzfarbton aufwiesen, der bei Rattennieren demnach physiologischerweise vorkommt. Beim Auffangen der Gefrierschnitte in Wasser war also trotz der Formolfixierung das Fluorescein herausgelöst worden. Auch diese Methode mußte also wieder verlassen werden. Als nächstes versuchte ich nun, mit Hilfe von Flüssigkeiten, in welchen sich das Fluorescein nicht löst, die Eindeckung der nun wieder mit unterkühltem Messer gewonnenen Präparate zu bewerkstelligen. Zunächst nahm ich Aceton, fand aber, daß dieses Fluoreszenzänderungen des Parenchyms hervorruft und dadurch ebenfalls zu falschen Bildern führte. Abgesehen von dieser Tatsache ist das Aceton sehr flüchtig und führt an den Präparaten sehr rasch zu Austrocknungserscheinungen. Schließlich versuchte ich noch, mein Ziel mit konzentrierter Kochsalzlösung zu erreichen. Fluorescein ist zwar in konzentrierter Kochsalzlösung nicht völlig unlöslich, aber zum mindesten doch so schlecht, daß der Versuch

lohnend erschien. Die Versuche mit konzentrierter Kochsalzlösung haben nun auch ergeben, daß man mit ihr völlig klare Bilder erhält. Es erfolgt weder ein Herauslösen des Farbstoffes, noch wird die Fluoreszenz des in den Tubulusepithelien vorhandenen Fluoresceins beeinträchtigt. Die geschilderten Versuche wurden daher alle mit dieser Einbettungsmethode unternommen. Der Nachteil der geringen Haltbarkeit wurde in Kauf genommen, und von einer Fixierung Abstand genommen, um durch das Fixierungsmittel etwa hervorgerufene Fluoreszenzen zu vermeiden. Zunächst wurden Mäuse untersucht.

1. Trypaflavin: Den Mäusen wurde das Trypaflavin in einer Verdünnung von 1 : 10000 intravenös injiziert, und zwar jeweils  $\frac{1}{2}$  ccm. Ein Teil der Mäuse wurde schon 5 Sek. nach der Injektion getötet, ein anderer Teil der Tiere nach 20 Sek. Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung: Bei den von den nach 5 Sek. getöteten Mäusen stammenden Präparaten sah man eine deutliche Anfärbung der Kerne der Glomerulusschlingen, während die Tubuli nur eine ganz vereinzelte Kernfärbung zeigten. Ein völlig anderes Bild ergab sich an den Gewebsschnitten, welche von den erst nach 20 Sek. getöteten Tieren stammten. Hier färbten sich die Kerne des ganzen Nephrons gut an, Glomeruli, Tubuli und Sammelröhren wiesen eine gleichmäßige hellgrün leuchtende Kernfärbung auf.

2. Auramin: Auch das Auramin wurde in einer Verdünnung von 1 : 10000 verwendet und gleichfalls in einer Menge von 0,5 ccm zur Injektion gebracht. Die Versuchstiere wurden nach 5, 10, 15 und 20 Sek. getötet. Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung: Nach 5 Sek. getötet: Die Glomeruli sind vollständig dunkel, weder leuchten die Schlingen selbst, noch läßt sich im *Bowmanschen* Raum eine fluoreszierende Substanz feststellen. Die Tubulusepithelien zeigen eine ganz gleichmäßige grünlichweiße Fluoreszenz, ein selektives Anfärben der Kerne findet beim Auramin nicht statt. Bei den Tieren, welche nach 10, 15 und 20 Sek. getötet wurden, konnte der gleiche Befund erhoben werden..

3. Fluorescein: Beim Fluorescein wurde eine Verdünnung von 1 : 5000 gewählt, die Injektionsmenge blieb die gleiche, nämlich 0,5 ccm (verwendet wurde Fluorescein-Natrium). Das Fluorescein wurde ebenfalls intravenös gegeben, die Tiere wurden 3, 5 und 10 Sek., außerdem nach 3, 5, 10, 20 und 30 Min. nach der Injektion getötet. Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung: Bei den von nach 3—5 Sek. getöteten Tieren stammenden Präparaten war noch keine Ausscheidung des Fluorochroms feststellbar. Nach 3 Min. sah man eine schwache, aber noch deutlich erkennbare grünweißliche Fluoreszenz der Tubuli. Die Glomeruli waren vollständig dunkel. Das gleiche Ergebnis fand sich bei Tötung nach 5 Min., nur war hier die Fluoreszenz der Tubuli etwas deutlicher. Nach 10 Min. ergab sich im allgemeinen das gleiche Bild, nur bei 2 Tieren sah man bei vereinzelt Glomerulis in der *Bowmanschen* Kapsel halbmondförmige, grünweißlich fluoreszierende Massen. Dieser Befund konnte nur sehr selten erhoben werden, so daß die Möglichkeit nicht ausgeschlossen erscheint, daß es sich vielleicht gar nicht um ausgeschiedenes Fluorescein handelt, sondern um einen anderen Körper. Ich werde auf diesen Punkt weiter unten noch zurückkommen. Auch bei der Tötung nach 20 Min. konnten im *Bowmanschen* Kapselraum solche fluoreszierende Massen gefunden werden, allerdings ebenfalls nur vereinzelt. Im übrigen kein Unterschied gegen die Präparate der vorigen Versuchsreihe. Nach 30 Min. bemerkt man schon ein Nachlassen der Fluoresceinausscheidung, jedenfalls fanden sich schon vereinzelt Tubuli, welche eine schwächere Fluoreszenz aufwiesen als die benachbarten.

Besprechung der Befunde: Das Ergebnis der Versuche mit Trypaflavin zeigt, daß dieser Körper für Ausscheidungsversuche an der Niere nicht sonderlich geeignet ist (auch andere haben hierauf schon hingewiesen).



Es färben sich gleichmäßig alle Kerne mit Trypaflavin an, die Glomeruluskerne so gut wie die der Sammelröhren und Tubuli. Ich glaube nicht, daß die Anfärbung in irgendeiner Beziehung zu der Sekretionsleistung der betreffenden Abschnitte des Nephrons steht. Den Sammelröhren zum mindesten wird man auf Grund dieser Befunde wohl kaum eine Sekretions- oder Rückresorptionsleistung zusprechen dürfen. Interessant ist lediglich die Tatsache, daß bereits nach 5 Sek. die Glomeruluskerne vollständig angefärbt sind, während die der Tubulusepithelien noch vollständig dunkel sind. Man muß diese schnellere Anfärbung der Glomeruluskerne wahrscheinlich damit erklären, daß die Blutversorgung der Glomeruli eine bessere ist und der Farbstoff schneller an sie herankommen kann als an die übrigen Abschnitte des Nephrons. Eine Prüfung der Ausscheidung scheint jedoch mit Trypaflavin nicht möglich zu sein. Hierfür sind das Auramin und Fluorescein wesentlich geeigneter (letzterer Farbstoff wurde ja auch namentlich von *Ellinger* und *Hirt* bei ihren Ausscheidungsversuchen verwandt). Die beiden Farbstoffe ergeben keine selektive Kernfärbung, sondern färben ganz gleichmäßig das Protoplasma an. Nach den Versuchsergebnissen von *Ellinger* und *Hirt* ist man berechtigt, anzunehmen, daß die Fluoreszenz der Epithelien auf einer aktiven Aufnahme des Farbstoffs, sei es nun durch Sekretion oder Rückresorption, seitens der Zelle beruht. Im Gegensatz zum Trypaflavin, das gleichmäßig alle Zellkerne der ausreichend mit Blut versorgten Körperregionen anfärbt, erzielt man mit Auramin und Fluorescein eine Anfärbung der Epithelien nur an solchen Organen, welche die genannten Farbstoffe ausscheiden. (Neben der Niere ist bisher wohl am genauesten die Ausscheidung durch die Leber untersucht.) Bei den mit Auramin behandelten Tieren sah man schon nach kurzer Zeit eine Anfärbung der Tubulusepithelien, und zwar erschienen alle Abschnitte ziemlich gleichmäßig angefärbt. Ein ähnliches Bild boten die Fluoresceinpräparate. Auffallend war nun, daß es in den meisten Fällen nicht möglich war, im *Bowmanschen* Kapselraum Fluorescein nachzuweisen. Aus den Versuchen *Ellingers* und *Hirts* geht einwandfrei hervor, daß im Regelfall (von einigen Ausnahmen abgesehen) zum mindesten beim Frosch das Fluorescein vom Glomerulus ausgeschieden, von den Tubulis rückresorbiert wird. Wie soll ich nun meine abweichenden Befunde erklären? Die Anhänger der Filtrationstheorie werden mir ohne weiteres entgegenhalten, daß bei der außerordentlich geringen Konzentration des „Glomerulusfiltrates“ durch Verluste bei der Herstellung der Schnitte so wenig übrig bleibt, daß es eben auch mit der Fluoreszenzmikroskopie nicht mehr nachgewiesen werden kann. Ich habe mir diesen Einwand auch selbst gemacht, wurde aber wieder zweifelnd, als ich bei weiteren Versuchen die unter völlig gleichen Bedingungen unternommen wurden, plötzlich in vereinzelten Glomerulis doch weißgrünlich fluoreszierende halbmondförmige Massen im *Bowmanschen* Raum sah. Zunächst

dachte ich daran, daß es sich vielleicht um Zufallsbefunde handle, vielleicht um ausgeschiedenes Eiweiß oder dergleichen. Gegen diese Annahme spricht aber, daß in Nieren unvorbehandelter Mäuse, die ich in sehr großer Zahl untersucht habe, solche Befunde niemals erhoben werden konnten. Man muß also wohl annehmen, daß es sich bei dieser beobachteten Fluoreszenz doch um Fluorescein gehandelt hat. Es muß also auf Grund dieser Befunde ohne weiteres zugegeben werden, daß auch bei der Säugetierniere von den Glomerulis Fluorescein ausgeschieden wird. Auffallend ist nur das Mißverhältnis zwischen fluoreszierenden Tubulis und *Bowmanschen* Räumen. Ich glaube nun nicht, daß man diese geringe Anzahl der fluoreszierenden *Bowmanschen* Räume darauf zurückführen kann, daß in den nicht fluoreszierenden Räumen das Fluorescein ausgeschwemmt wurde und in den fluoreszierenden nicht, denn es ist ja kaum einzusehen, warum sich das Fluorescein in einem *Bowmanschen* Raum halten soll und im anderen nicht. Ich glaube vielmehr, daß die Hauptausscheidungslast eben von den Tubulis getragen, und von den Glomerulis nur vereinzelt Fluorescein ausgeschieden wurde. Bei später noch zu besprechenden Versuchen konnte ich es sehr wahrscheinlich machen, daß die Tubuli zum mindesten *auch* die Fähigkeit haben, selbständig Fluorescein auszuscheiden. Mit den Ausscheidungsversuchen am normalen Tier glaube ich also gezeigt zu haben, daß wahrscheinlich die Tubuli den Farbstoff nicht mehr rückresorbieren, sondern auch aktiv sezernieren. Endgültig beweisen kann man diese Behauptung mit solcher Versuchsanordnung allerdings nicht. Ich komme nun zur Besprechung weiterer Versuche, welche sich mit der Ausscheidungsleistung vergifteter Nieren befassen. Zu diesen Versuchen wurden Ratten verwendet. Vergiftet wurden die Tiere ausnahmslos mit Kaliumchromat, als Farbstoffe wiederum Auramin und und Fluoresceinnatrium verwendet. Bevor mit der Untersuchung vergifteter Tiere begonnen wurde, erhielten einige normale Ratten intravenöse Auramininjektionen, um zu prüfen, ob die Ratten bei der Ausscheidung fluoreszierender Substanzen Mäusen gegenüber wesentliche Unterschiede aufwiesen. Zur intravenösen Injektion kam 1 ccm einer Auraminlösung 1 : 2500. Die Befunde bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung waren im wesentlichen die gleichen wie bei den Mäusen. Die Glomeruli erschienen vollständig dunkel, in den Tubulis sah man eine helle grünliche Fluoreszenz, also ein den bei den Mäusen erhobenen Befunden entsprechendes Ergebnis.

Schilderung der Vergiftungsversuche: Den Versuchstieren, Ratten, wurden 6 mg Kaliumchromat intraperitoneal eingespritzt. Nach Ablauf von 3 Tagen erhielten die Ratten teilweise Auramin, teilweise Fluorescein, teils intravenös, teils intraperitoneal injiziert. Es zeigte sich kein Unterschied der Ergebnisse bei den beiden Injektionsarten. Die Ratten wurden 30, 45 und 50 Min. nach der Injektion getötet. 2 Tiere untersuchte ich ohne vorherige Farbstoffinjektion, um die durch das Kaliumchromat hervorgerufenen nephrotischen Veränderungen unangefärbt beobachten zu können.

*Versuchsergebnisse.*

1. Ungefärbt: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung: Die Glomeruli erschienen vollständig dunkel. Die Tubuli zeigten ein sehr wechselndes Bild. Zum Teil fluorescierten sie ganz schwach und unterschieden sich kaum von den Tubulis normaler Nieren. An anderen Stellen sah man außerordentlich hell fluoreszierende Tubuli, welche einen blendend weißen Farbton aufwiesen. Die besonders hell fluoreszierenden Tubulusabschnitte waren verbreitert und deutlich verquollen. Die Sammelröhren wiesen keine Fluoreszenz auf. Im übrigen sah man die auch normalerweise in den Nieren auftretenden Fluoreszenzen, wie auch *Hamperl* beim Menschen schon beschrieben hat (blauweiße Fluoreszenz der elastischen Fasern der Gefäße, des interstitiellen Bindegewebes und der *Bowmanschen* Kapseln). Bei der Hämatoxylin-Eosinfärbung stellte ich fest, daß die besonders hellweißlichen Fluoreszenzen Verkalkungen entsprachen, im übrigen bestätigte sich die Behauptung, daß an den hell fluoreszierenden Stellen Verquellungen und Verbreiterungen der Tubuli vorliegen. An manchen Stellen waren die Verquellungen so stark, daß sie das Lumen völlig verschlossen.

## 2. Untersuchungsergebnisse nach Farbstoffinjektion:

a) Den Ratten wurde das Fluorescein in einer Verdünnung von 1 : 2500 intraperitoneal eingespritzt, und zwar jeweils in einer Menge von 1 ccm. Die Tiere wurden dann 45 bzw. 50 Min. nach der Injektion getötet und die Nieren herausgenommen. Makroskopisch boten sie keine besonderen pathologischen Befunde.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung ergab sich folgendes: In den Rindenbezirken fanden sich namentlich unter der Nierenoberfläche zahlreiche hellweißlich fluoreszierende, also wohl nekrotische Tubuli. Besonders muß hervorgehoben werden, daß in der Umgebung mancher Glomeruli alle Tubuli contorti 1. Ordnung vollständig nekrotisch waren und eine helle weißliche Fluoreszenz zeigten. Von einem Lumen war in diesen Bezirken nichts mehr zu sehen. Die zu diesen Hauptstücken gehörigen *Henleschen* Schleifen und Schaltstücke zeigten eine deutliche Grünfluoreszenz. Im übrigen fanden sich aber auch an den *Henleschen* Schleifen nekrotische Partien, welche kein Lumen mehr erkennen ließen. Zwischen diesen weißlich fluoreszierenden Schleifen sah man auch wieder solche, welche in einem grünlichen Farbton fluorescierten, an diesen Stellen muß also Fluorescein ausgeschieden oder vielleicht auch rückresorbiert worden sein. Ich werde auf diesen Punkt später noch eingehen. An einigen Stellen ließ sich ein sehr interessanter Befund erheben. Man sah nämlich deutlich, daß solche hellweißlich fluoreszierenden Tubulusabschnitte, welche kein Fluorescein ausgeschieden oder rückresorbiert haben, an weiter abwärts gelegenen Stellen keine weiße, sondern deutlich grüne Fluoreszenz zeigen, welche dafür spricht, daß an diesen Stellen ausgeschieden oder rückresorbiert wurde.

Hier zeigten die betreffenden Tubulusabschnitte auch keine Verquellungen und Verbreiterungen mehr und machten einen verhältnismäßig intakten Eindruck. Die Glomeruli waren vollständig dunkel. In den *Bowmanschen* Kapseln ließen sich an keiner Stelle fluoreszierende Massen nachweisen. Die Sammelröhren zeigten gleichfalls keine Fluoreszenz. Die verschiedene Versuchsdauer von 45 bzw. 50 Min. bedingte keinen Unterschied.

b) Auramin: Das Auramin wurde gleichfalls intraperitoneal injiziert, verwendet wurde das Auramin in einer Verdünnung von 1 : 2500 und in einer Menge von 1 ccm injiziert. Getötet wurden die Tiere 30 bzw. 45 Min. nach der Injektion. Die Glomeruli zeigten auch bei den Auraminversuchen keine Fluoreszenz des *Bowmanschen* Raumes. Die Tubuli boten ein ähnliches Bild wie bei den Fluoresceinversuchen. Auch hier gingen wieder stark verquollene, weiß fluoreszierende Tubulusabschnitte in solche über, welche einen weniger stark veränderten Eindruck machten und grünliche Fluoreszenz aufwiesen. Im Lumen der intakten Tubuli fanden sich vereinzelt weißlich fluoreszierende Zylinder, welche ich als ausgeschiedenes Eiweiß ansprach. Auch bei den Auraminversuchen waren die verschieden langen Versuchszeiten ohne Einfluß.

Ergebnisse der Tageslichtuntersuchungen: Die Untersuchung der Präparate mit der gewöhnlichen Hämatoxilin-Eosinfärbung ergab das übliche Bild der schweren nekrotisierenden Nephrose mit enormer Verquellung der Tubulusepithelien, Eiweißzylindern und beginnenden Verkalkungen. Es erübrigt sich daher, im einzelnen auf die Beschreibung dieser Punkte einzugehen, da doch nur schon Bekanntes wiederholt werden mußte.

Deutung der Befunde: Ich will versuchen, ob es möglich ist, an Hand der gewonnenen Versuchsergebnisse die anfangs gestellten Fragen zu beantworten. Die beiden ersten Fragen sind durch die eingehende Schilderung der Befunde bereits beantwortet. Es muß nun noch die dritte Frage besprochen werden, welche lautete: Lassen sich aus den fluoreszenzmikroskopischen Befunden Rückschlüsse auf den Ort der Farbstoffausscheidung ziehen? Dies ist außerordentlich schwer zu entscheiden, da es immer ein Wagnis bedeutet, vom toten Schnittpräparat, das einen Zustand darstellt, auf einen Vorgang, der sich während des Lebens abgespielt hat, zu schließen. Ich habe weiter oben auf diese Schwierigkeit auch schon hingewiesen. Aus diesem Grunde sind die ersten Versuche am gesunden Tier nur mit großer Zurückhaltung zu verwerten. Es fanden sich zwar nur sehr selten im *Bowmanschen* Raum fluoreszierende Stoffe, aber es ist fraglich, ob man aus dieser Tatsache allein schon einen Beweis ableiten darf, daß die Tubuli den Farbstoff, den sie ja zweifellos enthielten, aktiv sezerniert und nicht rückresorbiert haben. Es ist sehr schwer, den Einwand zu entkräften, daß in den meisten Glomerulis deshalb kein

Farbstoff mehr gesehen wurde, weil er bei der Behandlung der Präparate herausgelöst wurde. Die Ergebnisse der Ausscheidungsversuche bei mit Kaliumchromat vergifteten Tieren scheinen nun sehr dafür zu sprechen, daß meine oben wiedergegebene Vorstellung zum mindesten zu verteidigen ist. Ich schilderte bei der Besprechung der Versuche, wie die Tubuli teilweise vollständig nekrotisch waren und eine völlige Verquellung des Lumens zeigten, ferner daß sehr oft unmittelbar unterhalb dieser schwer geschädigten weiß und nicht grün fluoreszierenden Tubulusabschnitte das Epithel wieder besser erhalten war und auch wieder eine deutliche Grünfluoreszenz zeigte. Wie soll man diese Befunde erklären? Versuchen wir es zunächst mit der Filtrationstheorie. Nach dieser müßte also alles Fluorescein von den Glomerulis abfiltriert und dann von den Tubulis rückresorbiert worden sein. Wie kommt aber nun der Farbstoff in Tubulusabschnitte hinein, welche unterhalb völlig verquollener Tubuluspartien liegen, die gar kein Lumen mehr aufweisen. Man könnte natürlich einwerfen, die betreffenden schwer geschädigten Tubulusabschnitte seien eben doch nicht völlig verschlossen gewesen und hätten noch soviel Farbstoff durchgelassen, daß von den tiefer gelegenen Tubuluspartien noch zur Anfärbung ausreichende Farbstoffmengen aufgenommen werden konnten. So unwahrscheinlich diese Annahme an sich ist, habe ich mich vorsichtshalber doch mit ihr auseinander gesetzt. Ich schilderte schon, daß die schwergeschädigten Partien im Gegensatz zu den intakten völlig weiß und keine Spur grünlich fluorescierten. Ich habe nun ausprobiert, ob sich solches nekrotisches Tubulusgewebe nicht passiv mit Fluorescein anfärbt, brachte also Gewebsschnitte kaliumchromatvergifteter Nieren in außerordentlich stark verdünnte Fluoresceinlösung (1 : 100000) und beließ sie einige Minuten in ihr. Ich fand, daß nach dieser Behandlung auch die vorher weiß fluoreszierenden nekrotischen Partien nunmehr grün aufleuchteten. Wenn also vom Glomerulus her Farbstoff die nekrotischen Tubulusabschnitte passiert hätte, würden sie sich zweifellos angefärbt haben. Sie waren aber völlig farblos, weil eben kein Farbstoff durch sie hindurchgegangen ist. Das unterhalb der nekrotischen Partien beobachtete Fluorochrom kann also nur von der Blutseite her in die Tubulusepithelien hineingelangt sein, da das Lumen nach diesen Überlegungen keinen Farbstoff enthalten konnte. Aus diesen Versuchen glaube ich schließen zu dürfen, daß das Fluorescein zum mindesten nicht unter allen Umständen von den Glomerulis abgeschieden wird, sondern daß auch die Tubuli die Fähigkeit besitzen, das Fluorescein aktiv zu sezernieren.

#### **4. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen am menschlichen Leichenmaterial mit besonderer Berücksichtigung der Nieren.**

In dem vorliegenden Abschnitt meiner Arbeit beabsichtige ich keineswegs, eine systematische Untersuchung verschiedener Krankheitsbilder

mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie durchzuführen. Ich will lediglich eine Reihe pathologischer Veränderungen daraufhin untersuchen, ob überhaupt eine Möglichkeit besteht, fluoreszenzmikroskopische Befunde zu erheben, und ob es aussichtsreich erscheint, auch das Sektionsgut einer systematischen Untersuchung zu unterziehen. Es sind auch schon Versuche in dieser Richtung unternommen worden; in meiner einleitenden Literaturübersicht bin ich auf diese Arbeiten, soweit sie mir zugänglich waren, eingegangen. Namentlich auf dem Gebiet der Bakteriologie, der Geschwulstforschung, Erforschung des Porphyrins und der Untersuchung des Zentralnervensystems liegen zum Teil sehr ausführliche Arbeiten vor. Ebenso sind die normalerweise am menschlichen Leichenmaterial zu beobachtenden Fluoreszenzen sehr eingehend von *Hamperl* untersucht worden. Die ausführliche und sorgfältige Arbeit *Hamperls* ist ganz besonders deshalb zu begrüßen, weil sie es ermöglicht, sich sofort darüber zu orientieren, ob irgendwelche bei pathologischen Prozessen beobachtete Fluoreszenzen womöglich schon normalerweise vorkommen.

Eine laufende Untersuchung des jeweils anfallenden Sektionsgutes ist jedoch, soweit ich die Literatur übersehe, noch nicht angestellt worden, und aus diesem Grunde habe ich es unternommen, nachzuprüfen, ob eine solche erfolgversprechend ist, um dann später auf dem Boden der gewonnenen Erfahrungen systematische Untersuchungen verschiedener Krankheitsbilder entweder selbst auszuführen, oder zum mindesten dazu anzuregen. Die Untersuchungsergebnisse aus dem laufenden Sektionsgut sollen bei folgenden Krankheitsbildern geschildert werden: 1. Amyloidose. 2. Lungen- und Nebennierentuberkulose. 3. Akute gelbe Leberatrophie. 4. Verschiedene der Gruppe des Morbus Brighti angehörende Nierenerkrankungen.

1. Fluoreszenzmikroskopische Befunde bei Amyloidose: Es kamen verschiedene Amyloidfälle zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung, darunter einer mit einer sehr schön ausgeprägten Schinkenmilz. Alles untersuchte Amyloid zeigte weder im frischen noch im fixierten Zustand eine Spur von Fluoreszenz. Dieser Befund wurde schon von *Hamperl* erhoben. Da die zur Beobachtung gekommenen Amyloidfälle alle sicher schon älter waren, halte ich es durchaus für möglich, daß ähnlich wie bei den Infarkten aus irgendwelchen Gründen eine vielleicht vorhanden gewesene Fluoreszenz ausgelöscht ist. Ich habe auch vor, in einer experimentellen Arbeit nachzuprüfen, ob ganz frisches Amyloidmaterial nicht vielleicht doch fluoresciert. Nun wäre noch die Frage zu prüfen, welche sekundären Vorgänge denn nun die hypothetische Fluoreszenz des Amyloids auslöschen könnte. Das Naheliegendste ist natürlich, wieder an Eisen zu denken, das nach meinen Untersuchungen mit großer Wahrscheinlichkeit für das Aufhören der Fluoreszenz der Infarkte verantwortlich zu machen ist. Wenn diese Vermutung richtig ist, müßte nach

Behandlung mit N/HCl eine Fluoreszenz des Amyloids auftreten bzw. „zurückkehren“. Ich habe Stückchen einer Schinkenmilz einige Minuten in N/HCl gekocht, dann von dem betreffenden Material Gefrierschnitte angefertigt. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung zeigte sich, daß das vor der Behandlung völlig dunkle, keinerlei Fluoreszenz ergebende Amyloid in einem hellen bläulichen Farbton fluorescierte. Das Ergebnis ist also ganz ähnlich dem, das ich bei der Salzsäurebehandlung alter nicht leuchtender Milz- und Niereninfarkte erzielte. Man könnte sich ganz gut vorstellen, daß sich auch das Amyloid im Laufe der Zeit mit Eisensalzen belädt und dadurch seine Fluoreszenz einbüßt. Selbstverständlich muß dies bei meinen wenigen bis jetzt vorliegenden Versuchen eine bloße Vermutung bleiben, denn ich weiß ja nicht einmal, ob frisches Amyloid sich tatsächlich so verhält wie frische Infarkte. Diese Frage kann endgültig nur durch Untersuchung frischen experimentell erzeugten Amyloids geklärt werden. Meine Annahme, daß eventuell ein gewisser Eisengehalt des Amyloids dieses am Fluorescieren hindert, möchte ich als bloße Arbeitshypothese aufgefaßt wissen.

2. Fluoreszenzmikroskopische Befunde bei verkäsender Lungen- und Nebennierentuberkulose: Als nächstes habe ich einige verkäste Lungen- und Nebennierentuberkulosen untersucht. Die verkästen Partien sowohl der Lungen als auch der Nebennieren fluorescieren nicht. Vielleicht kommen für dieses Fehlen der Fluoreszenz die gleichen Gründe in Frage, wie sie schon beim Amyloid besprochen wurden. Auch hier müssen noch weitere Versuche Klärung schaffen. Gut sind in dem verkästen Lungengewebe die elastischen Fasern nachzuweisen, die in einem hellen weißlichen Ton fluorescieren. Weiterhin sieht man in den den verkästen Gebieten benachbarten Alveolen desquamiierte Epithelien, welche in einem braungelblichen Farbton fluorescieren. Die Nebennieren zeigten in der den Verkäsungen benachbarten Zona fasciculata den gleichen Befund, wie ihn auch schon *Hamperl* beschrieb. Man sah eine blaßbraungelbliche Fluoreszenz, die offenbar auf eingelagerten Fettstoffen beruhte. Die verkästen Massen selbst fluorescierten nicht. Die braungelbliche Fluoreszenz der desquamiierten Alveolarepithelien möchte ich ebenfalls auf einen Gehalt an Lipoidsubstanzen zurückführen. Weitere neue Befunde konnte ich bei der Tuberkulose nicht erheben und glaube auch nicht, daß auf diesem Gebiet, abgesehen von dem vielfach erforschten Tuberkelbacillennachweis und der Prüfung des Flüssigkeitsaustausches zwischen verkästen Herden und ihrer Umgebung (*Pfaff*), mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wesentliche neue Erkenntnisse gewonnen werden können.

3. Gelbe Leberatrophie: Fälle von gelber Leberatrophie kamen in der Zeit der Anfertigung dieser Arbeit nur zwei zur Beobachtung. Der erste Fall war eine akute gelbe Leberatrophie, welche ein recht eindrucksvolles fluoreszenzmikroskopisches Bild bot. Das zugrunde gegangene

Lebergewebe war dunkel, es leuchteten in diesen Partien nur die elastischen Elemente der Gefäße. Eine sehr helle grüngelbliche Fluoreszenz zeigten dagegen die erhalten gebliebenen Inseln des Lebergewebes. Im Zentrum der Leberzellen sah man teils kugelige, teils mehr längliche braunrötliche fluoreszierende Massen. Irgendwelche Bindegewebszüge waren nicht wahrnehmbar, zum mindesten sah man keine bläuliche Fluoreszenz, welche auf die Anwesenheit von Bindegewebe hätte schließen lassen. Auch die Untersuchung der Präparate bei Tageslicht mit einer *van Giesson*-Färbung ließ nur spärliche Bindegewebszüge erkennen. Sowohl in den erhaltenen Leberbälkchen wie auch in dem an sich nicht fluoreszierenden zugrunde gegangenen Lebergewebe sah man helle weißgelblich fluoreszierende Tröpfchen, offenbar Fett- oder Lipoidmassen. Sehr viel weniger eindrucksvoll waren die Bilder bei dem zweiten Fall einer chronischen gelben Leberatrophie. Die Leberbälkchen, welche erhalten oder regeneriert waren, leuchteten in einem schwach bräunlichen Fluorescenztönen. Zwischen dem erhaltenen Lebergewebe sah man blaßbläuliche Gewebzüge, welche als Bindegewebe angesprochen werden müssen, außerdem sah man in den Leberbälkchen, ebenso wie beim ersten Fall, hellweißlich fluoreszierende Tröpfchen, wohl auch sicher Fett- oder Lipoidsubstanzen. Es ist also nach diesen, wegen der geringen Anzahl der Fälle allerdings mit Vorsicht aufzufassenden Befunden zu sagen, daß es möglich ist, sich mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie rasch einen Überblick über das Alter einer gelben Leberatrophie zu verschaffen. Bei frischen Fällen helle Fluoreszenz des erhaltenen Lebergewebes, offenbar durch Einlagerung von Gallenfarbstoff bedingt, bei älteren Fällen nur schwaches Leuchten des Lebergewebes, dafür Auftreten von bläulich fluoreszierenden Bindegewebszügen. Es bleibt abzuwarten, ob weitere Fälle diese Befunde bestätigen.

4. Fluoreszenzmikroskopische Befunde bei verschiedenen der Gruppe des Morbus Brightii angehörenden Nierenerkrankungen:

a) Zunächst wurden einige Fälle von benigner Nephrosklerose untersucht. Hier interessierte vor allem die Frage, ob bei den hyalinisierten Glomerulis ein Unterschied zwischen dem Hyalin der Gefäßschlingen einerseits und dem der *Bowmanschen* Kapseln andererseits besteht. Die Untersuchung ergab nun, daß tatsächlich ein deutlicher Unterschied zwischen Kapsel- und Knäuelhyalin vorhanden war. Das Kapselhyalin fluorescierte in einem bläulichen, das Knäuelhyalin in einem bräunlichen Farbton. Die Intima der kleinen Gefäße fluorescierte gleichfalls in einem graubraunen Farbton. Diese Ergebnisse sind insofern interessant, als sie eine weitere Bestätigung der von vielen Untersuchern vertretenen Meinung sind, daß Hyalin und Hyalin durchaus verschiedene Körper sein können (*Müller, Leupold, M. B. Schmidt* u. a.). Es erscheint nach diesen Befunden also durchaus lohnend, dem Hyalinproblem auch mit der fluoreszenz-mikroskopischen Methode nachzugehen.



b) Weiterhin wurden einige Fälle von cholämischen Nephrosen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Makroskopisch handelt es sich bei den untersuchten Fällen um cholämische Nephrosen bei schwerem allgemeinen Ikterus. Die Glomerulusschlingen leuchteten in einem ganz schwachbräunlichen Ton. Die Epithelien der Tubuli und Sammelröhren zeigten eine deutliche braungelbliche Fluoreszenz. Ab und zu sah man im Lumen der Tubuli schwach bräunlich fluoreszierende Gallezylinder eingelagert. Also abgesehen von dieser schwach braungelblichen Fluoreszenz, die offenbar durch die ikterische Verfärbung bedingt war, keine Besonderheiten.

c) Untersuchungen an Glomerulonephritiden: Die Bilder, welche ich bei der Untersuchung von Glomerulonephritiden erhielt, waren wechselnd. Diese Tatsache erklärt sich zwanglos daraus, daß verschiedene Stadien der Glomerulonephritis zur Untersuchung kamen. Sehr interessant war ein Präparat, welches von einem Fall von subakuter Glomerulonephritis mit nephrotischem Einschlag stammte. Das Hämatoxylin-Eosin-Präparat ergab folgenden Befund: Vereinzelte Halbmondbildungen, geringe degenerative Veränderungen an den Glomerulis. Vereinzelte embolische Abscesse in einigen Glomerulis. Geringe degenerative Veränderungen an den Tubulis im Sinne einer albuminösen Degeneration. Fettfärbung: Ganz geringe Verfettung der Glomeruli, in etwas stärkerem Maße auch der Tubuli. Keine Doppelbrechung der Fettkörper. Ganz außerordentlich interessant waren die Untersuchungsergebnisse dieses Falles in ultraviolettem Licht. Es fand sich nämlich eine auffallend helle, fast weiße Fluoreszenz sämtlicher Glomeruli, wie ich sie in keinem Fall vorher oder nachher gesehen habe. Die Fluoreszenz mußte als blendend hell bezeichnet werden. Auch die Tubuli fluoreszierten teilweise recht hell, wenn auch bei weitem nicht in dem Maße wie die Glomeruli. Es fragt sich nun, wie man diese auffallend helle Fluoreszenz der Glomeruli erklären soll. Zunächst dachte ich daran, ob nicht vielleicht beginnende Nekrosen hierfür verantwortlich seien. Ich konnte ja verschiedentlich zeigen, daß namentlich frische Nekrosen helle Fluoreszenzen hervorzurufen imstande sind. Wenn diese Annahme sich bestätigen sollte, wäre diese Tatsache auch bezüglich der Erforschung der Nierenfunktion von großer Wichtigkeit. Wenn nämlich alle Glomeruli so schwer geschädigt sind, daß sie eine helle, auf Eiweißkoagulation beruhende Fluoreszenz geben, müßte ja die Hauptausscheidungslast von den Tubulusepithelien getragen werden. (Die Nierenfunktion war in dem betreffenden Fall erhalten geblieben, es lag keine Urämie vor.) Ich bin leider nicht in der Lage, diese Annahme zu beweisen, denn es könnten natürlich auch Lipoidinlagerungen für die Fluoreszenz der Glomeruli verantwortlich gemacht werden, denn Fette oder Lipide könnten ja auch manchmal eine sehr helle Fluoreszenz hervorrufen, ohne daß es allerdings bisher gelungen wäre, aus der Art ihrer Fluoreszenz

Rückschlüsse auf ihren Bau zu ziehen. Die übrigen Fälle von Glomerulonephritis, welche ich zu untersuchen Gelegenheit hatte, zeigten nur eine geringe Fluoreszenz der Glomeruli. Auch die Tubuli zeigten eine weit geringere, wenn auch deutlich wahrnehmbare Fluoreszenz. Es muß also abgewartet werden, ob noch ähnliche Fälle, wie der zuerst beschriebene, zur Beobachtung kommen. Vorerst ist es wie gesagt nicht möglich, Rückschlüsse aus diesen Beobachtungen zu ziehen.

d) Unbestimmt charakterisierte Nephrosen: Die fluoreszenzmikroskopischen Befunde entsprachen den Erwartungen. Die Tubuli fluoreszierten mehr oder weniger stark in einem grauweißlichen Ton, die Glomeruli waren durchweg dunkel, vereinzelt leuchteten sie mattblau. Die Sammelröhren zeigten keine besondere Fluoreszenz. Manchmal fanden sich sowohl in den Tubulusepithelien wie auch in den Glomerulis feinste hellgelblich leuchtende Pünktchen, welche wohl auf die Lipoid-einlagerungen zurückgeführt werden müssen. Es kann wohl als feststehende Tatsache betrachtet werden, daß nephrotische, also degenerative Veränderungen zu etwa der Schwere der Veränderungen parallelen graueren Fluoreszenzen führen. Ich bin auf diesen Punkt schon ausführlich bei der Besprechung der experimentell hervorgerufenen nekrotisierenden Nephrosen eingegangen. Bei der Untersuchung der Nephrosen habe ich auch versucht, den Grad der Verfettung fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen. Im ungefärbten Präparat hat man wenig Aussicht, die eingelagerten Fettsubstanzen restlos zu erfassen, da ja das eingelagerte Fett nicht unter allen Umständen fluoresziert. Man muß also in diesem Fall zur Fluorochromierung greifen. Gut zur Fettdarstellung geeignet ist, wie schon erwähnt, das Chlorophyll. Seine Gewinnung habe ich weiter oben schon beschrieben. Nach der Fluorochromierung mit Chlorophyll sah man nun ausgedehnte Verfettungen sowohl der Tubuli als auch der Glomeruli und Sammelröhren. Häufig fiel auf, daß gerade die weniger stark veränderten, also dunkler erscheinenden Tubuli stärkere Verfettung zeigten. Am geringsten war die Verfettung meistens bei den Sammelröhren. Auch die Glomeruli zeigten im allgemeinen nicht so starke Verfettungen wie die Tubuli. Zur Kontrolle wurden alle Präparate noch mit Scharlachrot gefärbt, und es stellte sich heraus, daß die Chlorophyllfärbung die vorhandenen Fette und Lipide offenbar restloser ausfärbt, als die sonst übliche Scharlachrotfärbung. Es fiel auf, daß so und so oft die Verfettung der Gefäßschlingen der Glomeruli nur bei der Chlorophyllfärbung sichtbar zu machen war, während ich umgekehrt nie bemerken konnte, daß etwa durch Scharlachrot angefarbtes Fett mit Chlorophyll nicht zur Darstellung gekommen wäre. Die Fettfärbung mit Chlorophyll scheint mir auch sehr geeignet für Reihenuntersuchungen, bei welchen viele Präparate angefertigt werden müssen, oder weiterhin zur raschen Orientierung über einen eventuell vorliegenden Fettgehalt eines Präparates. Die Herstellung eines Chlorophyllpräparates

ist nämlich ungleich einfacher als die eines mit Scharlachrot gefärbten. Man braucht nur den aufgezogenen unvorbehandelten Gefrierschnitt für die Dauer 1 Min. in die Chlorophylllösung zu stellen, dann mit Wasser abzuspülen, um eine gute Ausfärbung zu erreichen. Zur Herstellung einer Scharlachrotfärbung benötigt man mindestens die 10fache Zeit.

e) Herdförmige Glomerulonephritiden: Ein sehr interessantes Bild ergaben die Präparate eines Falles von Endocarditis lenta. Die Untersuchung der Niere im Hämatoxilin-Eosinpräparat ergab eine typische embolische nicht eitrig-nekrotische Herdnephritis, wie man sie bei der Endocarditis lenta häufiger sieht. Interessant war das Verhalten der Miniaturinfarkte der Glomeruli im Fluoreszenzlicht. Sie leuchteten in einem hellweißlichen Ton, also ein weiterer Beweis dafür, daß nicht nur epitheliale Gewebe, sondern auch mesenchymale nach der anämischen Infarzierung hellweißlich aufleuchten. Weitere Besonderheiten ergaben sich bei der Untersuchung dieses Falles nicht.

f) Arteriosklerotische Schrumpfnieren: Zum Schluß noch die Schilderung des fluoreszenzmikroskopischen Befundes bei arteriosklerotischen Schrumpfnieren. Teils waren die Glomeruli dunkel, teils zeigten sie bläuliche Fluoreszenz. Deutlich erkennbar war auch eine weißbläuliche Fluoreszenz der Gefäßintima, sowohl bei größeren als auch kleineren Gefäßen. Die Tubuli, Sammelröhren und interstitielles Gewebe zeigten keine Fluoreszenz.

Damit bin ich am Ende der Schilderungen der fluoreszenzmikroskopischen, am laufenden Sektionsgut erhobenen Befunde. Wenn das in Betracht kommende Material auch nicht allzu groß war, kann man doch sagen, daß die Untersuchung der frischen unfixierten Präparate als durchaus lohnend zu bezeichnen ist. Bei der Amyloidose konnten die Befunde anderer Untersucher, die eine Fluoreszenz des Amyloids vermißten, bestätigt, als neu jedoch die Möglichkeit erkannt werden, durch Kochen des Amyloids in N/HCl (Herauslösen von Eisen?) dasselbe zum Fluoreszieren zu bringen.

Weiterhin stellte sich heraus, daß verkäste tuberkulöse Lungen und Nebennierenherde keine Fluoreszenz ergaben und sich damit ähnlich wie die alten Infarkte verhielten.

Bei Fällen von Leberatrophy zeigte sich, daß akute Fälle eine helle, offenbar durch Gallenfarbstoffgehalt hervorgerufene Fluoreszenz der Leberzellen aufwiesen, bei alten chronischen Fällen dagegen die bläuliche Fluoreszenz des eingelagerten Bindegewebes im Vordergrund stand.

Interessante Beobachtungen ließen sich bei verschiedenen pathologischen Nierenveränderungen erheben. Es konnte festgestellt werden, daß bei benigner Sklerose ein deutlicher fluoreszenzmikroskopischer Unterschied zwischen Kapsel und Knäuelhyalin besteht. Bei einer subakuten Glomerulonephritis fand sich eine auffallend helle Fluoreszenz

der Glomeruli. Bei embolischer Herdnephritis sah man eine deutliche helle Fluoreszenz der Miniaturinfarkte der Glomeruli. Nephrosen ließen eine gut sichtbare Fluoreszenz der Tubuli erkennen, und zwar nicht nur bei nekrotisierenden Nephrosen, sondern auch bei reiner trüber Schwellung.

Es wird also nach diesen Ergebnissen als absolut aussichtsreich bezeichnet werden müssen, Untersuchungen unfixierter Präparate des laufenden Sektionsgutes auch in Zukunft vorzunehmen.

#### *Zusammenfassung.*

1. Zunächst wurde eine kurze Übersicht über den heutigen Stand der fluoreszenzmikroskopischen Literatur gegeben.

2. In eigenen Untersuchungen wurden verschiedene Probleme der allgemeinen Pathologie in Angriff genommen und zunächst die Frage der Eiweißgerinnung behandelt. Es stellte sich heraus, daß geronnenes Eiweiß, ganz gleich, auf welche Weise es zur Gerinnung gekommen war, fluoresciert. Es wurde erwogen, ob die Fluoreszenz auf von außen in das geronnene Gewebe eingedrungenen Substanzen beruht. Hierbei wurde in erster Linie an das Calcium gedacht. Durch verschiedene Versuche (Fluoreszenz auch bloß gekochten Gewebes) konnte aber wahrscheinlich gemacht werden, daß die Gerinnung als solche die Fluoreszenz hervorruft.

3. Im Rahmen der Gerinnungsversuche wurden ganz besonders die Infarkte untersucht, und es fiel auf, daß namentlich ältere Infarkte nicht mehr leuchteten. Als Grund für diese Erscheinung wurden die verschiedensten Momente in Betracht gezogen (Zunahme der Alkalität der Infarkte, Austrocknung). Als wahrscheinlichste Ursache konnte die Zunahme des Eisengehaltes älterer Infarkte gefunden werden, da es gelang, durch auf galvanischem Wege ins Gewebe eingebrachtes Eisen vorher vorhanden gewesene Fluoreszenzen auszulöschen.

4. Weiterhin wurden kaliumchromatvergiftete Nieren von Hunden fluoreszenzmikroskopisch untersucht und festgestellt, daß nekrotische geronnene Tubulusabschnitte besonders hell leuchten, aber auch nicht direkt geronnene Tubuli eine über die Norm hinausgehende Fluoreszenz zeigen.

5. Auch die Ausscheidungsleistung kaliumchromatvergifteter Nieren wurde geprüft und gefunden, daß die Fluorochrome wahrscheinlich nicht nur durch die Glomeruli, sondern auch durch die Tubuli aktiv sezerniert werden können, da auch unterhalb völlig verquollene rund kein Lumen mehr aufweisender Tubulusabschnitte wieder besser erhaltene Partien gesehen wurden, welche wiederum Farbstoff ausgeschieden hatten, der wegen der Unwegsamkeit der oberhalb gelegenen Abschnitte nur auf dem Blutwege an die betreffenden Tubulusepithelien gelangt sein konnte.

6. Schließlich wurden noch verschiedene pathologisch veränderte Organe des laufenden Sektionsgutes unfixiert untersucht und festgestellt, daß z. B. das an sich nicht leuchtende Amyloid durch Behandlung mit N/HCl zur Fluoreszenz gebracht werden kann.

Tuberkulöse Herde lassen z. B. jede Fluoreszenz vermissen, verhalten sich also wie alte Infarkte.

Auch verschiedene Nierenerkrankungen zeigten interessante Befunde, u. a. besteht ein deutlicher Unterschied zwischen Knäuel- und Kapselhyalin bei benigner Nephrosklerose.

Es erscheint also durchaus aussichtsreich, diese Untersuchungen fortzusetzen und systematisch auszubauen.

#### Literaturverzeichnis.

- Borger*: Hoppe-Seylers Z. **217** (1933); **234** (1935); **237** (1935); **243** (1936). — Beitr. path. Anat. **103** (1939). — *Cushman, A. R.*: Die Absonderung des Harnes. Jena: Gustav Fischer 1926. — *Danckwortl, P. W.*: Die Lumineszenzanalyse im filtrierte ultravioletten Licht, 3. Aufl. Leipzig: Akad. Verlagsgesellschaft m. b. H. 1934. — *Ellinger u. Hirt*: Z. Anat. **90** (1929). — Arch. f. exper. Path. **145** (1929); **150** (1930); **159** (1931). — *Abderhaldens* Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. V, Teil 2/2, S. 1753. 1930. — Umschau **34** (1930). — *Haitinger, M.*: Fluoreszenzmikroskopie. Ihre Anwendung in der Histologie und Chemie. Leipzig: Akad. Verlagsgesellschaft m. b. H. 1938. — *Hampel, H.*: Virchows Arch. **292**, 1 (1934). — *Heim u. Csik*: Gyógyászat (ung.) **1933**, Nr 44. — *Hirt, A.*: Anat. Anz., Erg.-Bd. **1934**, 222. — *Hirt, A., J. Ansoerg u. H. Markstrahler*: Z. Anat. **109**, 1 (1938). — *Kämmerer, H.*: Verh. Ges. inn. Med. **1933**, 28. — *Marchand u. Krehl*: Allgemeine Pathologie. — *Pfaff, W.*: Klin. Wschr. **1937** I, 284. — *Pfaff, W. u. W. Herold*: Beitr. Klin. Tbk. **87**, 519 (1936).