

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. ERICH LETTERER).

Meßtechnische Untersuchungen über das Wachstum der Leber der weißen Maus als Grundlage für morphologisch-funktionelle Studien.

Von

MANFRED SIESS und HUBERT STEGMANN.

Mit 15 Textabbildungen.

(Eingegangen am 23. November 1949.)

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
I. Einleitung (Problemstellung und Literatur)	534
II. Wachstum und Zellzahl	537
A. Methodik. S. 537. — B. Untersuchungsergebnisse. S. 539. — 1. Das relative Lebergewicht. S. 539. — 2. Zahl der Leberzellen und Endothelien in einer konstanten Flächeneinheit. S. 541. — 3. Leberzellzahl X und Endothelzellzahl B in ihrer Beziehung zum Lebergewicht. S. 542. — 4. Verhältnis der einzelnen Leberlappen zum Gesamtvolumen der Leber. S. 547.	
III. Mathematische Betrachtungen	548
A. Einführung. S. 548. — B. Benennungen. S. 549. — C. Mathematische Ableitung. S. 550. — D. Die Konstante K und ihre Teilfaktoren. S. 553. 1. Das spezifische Gewicht. S. 553. — 2. Die Organschrumpfung bei der Einbettung. S. 554. — 3. Der Gefäßfaktor. S. 556. — 4. Die Kern-Plasmarelation an der Leberzelle. S. 557. — 5. Zusammenfassung. S. 561.	
IV. Kern-Plasmarelation und Verschiebungen der Kerngrößenvariation während des Wachstums der Leber	564
A. Einleitung und Literatur. S. 564. — B. Vorversuche. S. 566. — C. Kern-Plasmarelation (Methodik und Ergebnisse). S. 566. — D. Kerngrößenvariation. S. 570. — E. Zusammenfassung. S. 572.	
V. Schlußbetrachtung und Zusammenfassung	572

I. Einleitung.

Maß und Zahl werden in der Biologie oft mit gewisser Skepsis betrachtet, aber exakte Wissenschaft ohne quantitative und qualitative Betrachtungsmöglichkeit ist undenkbar. Daß bei richtiger Anwendung quantitativer Methoden in der Morphologie und speziell in der Histologie grundlegende Erkenntnisse geschaffen werden können, zeigt die Lehre von der Kern-Plasmarelation von R. HERTWIG und die JAKOBJSche Regel vom Verdoppelungswachstum der Kerne. HEIDENHAIN spricht vom Proportionalitätsgesetz als einer allgemeinen Grundwahrheit in den organischen Naturwissenschaften, dem eine axiomatische Bedeutung zukomme.

Unsere Grundlagen für jede vergleichende Betrachtung sind Maß und Zahl und die Exaktheit der Aussagen hängt ab von der Meßgenauigkeit und physiologischen Streubreite der Werte. Daß diese Bedingungen in der Morphologie meist ungünstig liegen, mag eine der Ursachen sein, daß quantitative Betrachtungen in so verhältnismäßig kleinem Umfang Anwendung gefunden haben. RÖSSLE und ROULET haben in ausgedehnten Untersuchungen gezeigt, wie Maß und Zahl in der menschlichen Anatomie Wachstums- und Proportionalitätsgesetzen folgen und haben damit die Grundlagen für die pathologischen Abweichungen gelegt. Die meisten histologischen Untersuchungen mit quantitativen Methoden beziehen sich auf Kern- und Zellgrößmessungen, die teils direkt ausgeführt wurden, zum Teil in neuerer Zeit durch planimetrische Bestimmungen vergleichende Werte der Gewebsbestandteile geben. Beziehungen von histologischen Messungen zur Größe der betreffenden Organe sind meist noch nicht aufgestellt. Und doch erscheint uns gerade diese Beziehung für eine funktionell vergleichende Betrachtungsweise, wie wir sie anstreben, recht wichtig. LINZBACH hat in jüngster Zeit am menschlichen Herzen solche Beziehungen gefunden und grundlegende Feststellungen treffen können.

Unsere Untersuchungen, die wir auf Veranlassung von Professor LETTERER durchführten, zielen darauf hin, unter verschiedenen Versuchsbedingungen makroskopische und mikroskopische Änderungen an der Leber der weißen Maus mit quantitativen Methoden zu erfassen, um auf diesem Wege auf Stoffwechselvorgänge Rückschlüsse aus morphologischen Kriterien ziehen zu können. Da diese Problemstellung sich naturgemäß auf Zahl und Größe der Leberzellen zu erstrecken hatte, so führten uns unsere Untersuchungen notwendig auch an die Frage des Wachstums der normalen Mäuseleber heran. Diese Ergebnisse und die möglichen Schlußfolgerungen sollen als Grundlage für eine größere, andersartige Versuchsreihe aus dem Fragenkreis der Amyloidose, die wir mit einer Arbeitsgruppe zusammen durchführten, als methodische Voruntersuchung niedergelegt werden.

Das Lebergewicht einer etwa 1 g schweren, neugeborenen Maus nimmt von 37,5 mg bis auf etwa 1400 mg bei 30 g schweren erwachsenen Tieren zu. Theoretisch könnte diese Zunahme auf verschiedene Weise erfolgen: Bei gleichbleibendem mittlerem Zellvolumen durch Vermehrung der Gesamtleberzellzahl, bei gleichbleibender Gesamtleberzellzahl durch Vergrößerung des Volumens der vorhandenen Leberzellen, d. h. einer Vergrößerung des mittleren Leberzellvolumens oder schließlich durch beide Vorgänge zugleich. Für den zugehörigen Capillar- und Gefäßraum gelten ähnliche Überlegungen. Da nun das eigentliche Leberparenchym den weitaus größten Teil des Lebervolumens ausmacht,

so ist verständlich, daß Messungen der Volumen- und Gewichtszunahme in erster Linie auf die Leberzellen Bezug nehmen müssen.

Nach der JACOBJSchen Regel vergrößern die Leberzellen durch Verdoppelungswachstum in der Regel ihr Volumen um das 4—8fache, während größere Volumina mit dem 16—64fachen des Ausgangsvolumens seltener sind. Über Beziehungen zwischen Organgewicht und Leberzellgröße finden sich in der Literatur nur ungenaue Angaben unter Berücksichtigung des Alters der Mäuse. JACOBJS fand bei neugeborenen Mäusen fast ausschließlich Kerne der kleinsten Klasse. — Nach PFUHL stimmen in allen Altersklassen prozentualer Anteil von Läppchenvolumen und Lebergewicht bei Schweinelebern überein. Er nimmt deshalb an, daß die Leberläppchen sich nach ihrer Herausbildung nach der Geburt nicht mehr vermehren. — HEIBERG fand, daß der Kerndurchmesser bei neugeborenen Mäusen von $5,5\mu$ auf 8μ bei erwachsenen Mäusen anwächst und schließt daraus, daß das Wachstum der Zelle einen wesentlichen Faktor beim Wachstum der Leber darstellt. — ILLING kommt durch Leberzellmessungen und Bestimmung des Läppchendurchmessers an verschiedenen Haustieren zu dem Schluß, daß kein Beweis vorhanden sei, daß die Leberläppchen durch Zellvermehrung wachsen.

Zur Frage der Kern-Plasmarelation an der Leberzelle liegen bis jetzt nur wenige Untersuchungen vor, auf die wir noch zu sprechen kommen. Es wird allgemein angenommen, daß auch die Leber diesem Gesetz folgt. PFUHL meint, daß es praktisch kaum möglich sei, das Verhältnis von Kern zu Plasma bei Leberzellen zahlenmäßig festzulegen, da in der Leber paraplasmatische Speicherstoffe das Verhältnis von Kern zu Plasma, welches nur das Idioplasma betreffe, verschieben.

Zusammenfassend stellen wir fest, daß Beziehungen zwischen Organgewicht und Leberzellvolumen bisher nicht systematisch untersucht wurden, daß aber der Zellvergrößerung beim Leberwachstum eine beträchtliche Rolle zukommt. Dies wird dadurch erhärtet, daß die Leberläppchen sich offenbar nach ihrer Ausformung nicht mehr vermehren. Da das Wachstum der einzelnen Leberläppchen durch Zellvermehrung in Frage gestellt wird, ist die Frage nach der *Konstanz der Gesamt-leberzellzahl während des Wachstums* sehr naheliegend.

Zur Untersuchung dieser Frage ist es nun wichtig, die Beziehung des mittleren Zellvolumens zum Organgewicht einmal zu untersuchen. Das mittlere Zellvolumen einer Leber stellt sich dar als die Summe aller Einzelzellvolumina geteilt durch die Gesamtzahl der Leberzellen. Messungen können nur immer Stichproben erfassen, sei es am Macerationspräparat, sei es am Schnitt. Sie setzen ferner eine gewisse Homogenität des Gesamtorgans voraus.

Wir gingen nun von folgenden Überlegungen aus: Zählt man an Leberschnitten gleicher Dicke in einem konstanten Meßquadrat bei gleichbleibender Vergrößerung alle mit Kern geschnittenen Leberzellen, so steht diese Zahl in direktem Verhältnis zum mittleren Kern- und Zelldurchmesser. Nimmt man die Kern-Plasmarelation als konstant an, so können verschiedene Leberschnitte miteinander verglichen werden, da ja die Zahl der Leberzellen in der Flächeneinheit dann eine Aussage über das mittlere Zellvolumen gestattet. Der Vorteil einer solchen

Methode liegt darin, eine größere Gesamtfläche als Stichprobe überblicken zu können und damit Mittelwerte von größerer Genauigkeit zu erhalten.

Setzen wir dann die so gewonnenen Zellzahlen der Flächeneinheit in Beziehung zum Organgewicht, so ergeben sich analog zu den vorigen Überlegungen folgende Möglichkeiten: 1. Bleibt die Leberzellzahl im Meßquadrat in allen Gewichtsklassen konstant, so würde eine Gewichtszunahme der Leber nur durch zahlenmäßige Vermehrung der Leberzellen erfolgen, da ja das mittlere Zellvolumen gleichbleibt. 2. Nimmt die Zellzahl im Meßquadrat mit zunehmendem Lebergewicht gesetzmäßig ab, so muß sich das mittlere Zellvolumen vergrößern, während die Zahl aller Leberzellen konstant bleibt. 3. Finden wir keine Gesetzmäßigkeit zwischen Zellzahl im Meßquadrat und Organgewicht, sondern eine regellose Verteilung innerhalb der verschiedenen Gewichtsklassen, so ist anzunehmen, daß Volumen- und Zellvermehrung nebeneinander hergehen und das Wachstum der Leber beiden Faktoren, der Volumen- und Zellvermehrung, zuzuschreiben ist.

Voraussetzungen für derartige Untersuchungen würden außer der gleichbleibenden Behandlung des Materials von der Tötung des Tieres bis zum Schnitt gleicher Dicke sein, daß die Kern-Plasmarelation, das spezifische Gewicht, sowie die Schrumpfungsvorgänge bei der Einbettung keinen größeren Schwankungen unterliegen. Ferner müssen die Stichproben so ausreichend sein, daß sie dem tatsächlichen mittleren Zellvolumen der ganzen Leber entsprechen.

II. Wachstum und Zellzahl.

Zunächst soll die Methodik und ihre Fehlermöglichkeiten besprochen werden.

A. Methodik.

Wir haben im ganzen 120 Mäuselebern von Tieren eigener Zucht verschiedenen Geschlechtes und der verschiedensten Gewichtsklassen untersucht. Während ein großer Teil der Tiere unsere Normalfütterung mit Milch, Brot und Hafer erhielt, hatten wir 3 Gruppen von je 10 Tieren gesondert 3 Wochen mit reiner Haferfütterung oder mit Eiweiß in Form von Casein oder getrocknetem Pferdeplasma untermischt mit etwas Hafer behandelt. Außerdem konnten noch weitere Tiere aus anderen Versuchsreihen Verwertung finden, so daß wir über ein reichhaltiges Untersuchungsmaterial verfügen.

Es wurden von den Tieren die Körpergewichte zum Teil über 4 Wochen beobachtet. Um eine gleichmäßige Ausblutung zu erreichen, wurden alle Tiere gleichmäßig durch Dekapitieren getötet, anschließend die Leber im ganzen freipräpariert, Zwerchfell, Gefäßstiel und Gallenblase entfernt und das Lebergewicht auf einer Feinwaage auf 10 mg genau bestimmt.

Wir bestimmten dann sofort das Volumen des frischen Organs in physiologischer Kochsalzlösung mittels eines Volumeters, das eine Ablesung bis auf 10 mm³ erlaubt (Abb. 1). — Das Volumeter besteht aus einer 10 cm³ Rekordspritze, deren Stempel nach innen konisch ausgebohrt wurde. Es wurde eine 1 cm³-Pipette

mit $0,01 \text{ cm}^3$ Graduierung darin fest eingesetzt und durch Anbringung einer Raste ein konstanter Anschlag zwischen Stempel und Spritze geschaffen. Die Flüssigkeitszufuhr erfolgt durch einen Schlauch am Spritzenansatz mittels einer kommunizierenden Röhre und ist durch eine Klemme regulierbar. Es wird bis zum Teilstrich $0,9 \text{ cm}^3$ an der Pipette Flüssigkeit eingelassen, dann der Stempel mit der Pipette herausgehoben, das Organstück eingelegt und der Stempel wieder bis zum Anschlag der Raste eingesetzt. Infolge der Capillarattraktion kann beim Herausheben der Pipette die geringe Flüssigkeitsmenge nicht abfließen. Die Flüssigkeitsdifferenz in der Meßpipette zeigt das verdrängte Flüssigkeitsvolumen

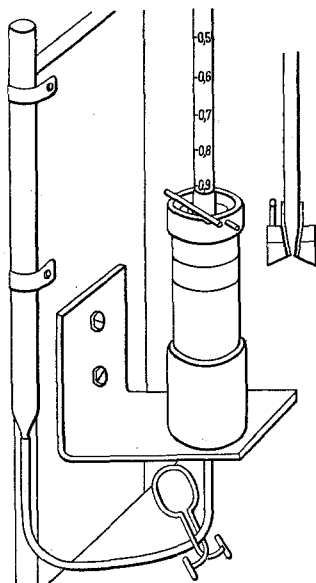


Abb. 1. Volumeter.

an und entspricht dem Organvolumen. Als Fehlermöglichkeit muß bei der Messung lediglich darauf geachtet werden, daß der Stempel bereits angefeuchtet ist und daß keine Luftbläschen am Stempel hängen bleiben. Fehlermöglichkeiten von seiten des Organstückchens bestehen vor allem in der Art der Flüssigkeitsbenetzung der Oberfläche, die bei frischen Organen nie ganz konstant ist. Bei fixierten Organen erhöht sich die Meßgenauigkeit durch Abtrocknen der Oberfläche. Der Meßbereich liegt zwischen 20 mm^3 und 980 mm^3 . Größere Organe werden geteilt gemessen, was die Fehlermöglichkeit etwas erhöht.

Danach wurden die Organe sofort in Susa 24 Std fixiert, anschließend in 96%igen Alkohol gebracht, um nach einem zeitlich genau festgelegten Plan in gleicher Weise über Chloroform in Paraffin eingebettet zu werden. Dabei wurde bei 48 Lebern gleichzeitig mittels des Volumeters die Schrumpfung gemessen. $7,5 \mu$ Bänderschnitte wurden nach Jodierung mit Hämalan-Eosin und zum Teil mit Azan gefärbt. Für die Auszählung empfiehlt sich am besten die Hämalan-Eosinfärbung, die das

Äuge nicht so rasch ermüdet wie die Azanfärbung. Die Zellgrenzen treten auch hier deutlich hervor, sind allerdings bei Azanfärbung noch besser sichtbar.

Die Schnitte wurden sodann mittels eines selbstgefertigten Gitterquadrates, das im Zeiß-Okular Nr. 6 befestigt war, bei Objektiv 42 (Ap. 0,85) und einer Flächenvergrößerung von 1:900 ausgezählt. Das Gitterquadrat stellten wir aus einem gewaschenen Röntgenfilm her, der auf Millimeterpapier befestigt wurde. Mittels Lineal und Rasierklinge wurden in $0,2 \text{ mm}$ Abstand die Linien fein nachgezogen und das Quadrat dann mit Hilfe eines Sprengtringes im Okular befestigt. Man erkennt ein feines Gitternetz von 16 kleinen Quadraten, die nach genauen objektmetrischen Bestimmungen zusammen eine Fläche von $71820 \mu^2$ als Flächeneinheit einnehmen. Für kleine Lebern schien es zweckmäßig, Ölimmersion zu verwenden. Bei einer Flächenvergrößerung von 1:3700 betrug die Flächeneinheit $17550 \mu^2$.

Die Auszählung erfolgte für jedes der 16 kleinen Quadrate in der Weise, daß zuerst die Gesamtkernzahl der Leberzellen bestimmt wurde, wobei die Kernkalotten mitgezählt wurden. Danach wurde die Zahl der doppelkernigen Zellen bestimmt. Nach Addition der 16 Werte ergab die Differenz von Gesamtkernzahl (L) und Zahl der doppelkernigen Zellen (D) die Zahl der mit Kern geschnittenen

Leberzellen (X) im Meßquadrat (Flächeneinheit). Es wurden dabei die vom Quadratrand links und oben geschnittenen Kerne mitgezählt, während die rechts und unten geschnittenen Zellen unberücksichtigt blieben. Doppelkernige Zellen, von denen ein Kern außerhalb des Meßquadrates lag, galten als eine Zelle mit einem Kern. Innerhalb der 16 kleinen Quadrate wurden vom Gitternetz geschnittene Kerne und Doppelkerne je nach ihrer Lage zum einen oder anderen Quadrätchen gezählt. Die doppelkernigen Zellen sind nach einiger Übung leicht an ihrer Lage, sowie an den Zellumrissen zu erkennen. Nur manchmal können Protoplasmastrukturen eine sichere Differenzierung erschweren, doch ist diese Fehlermöglichkeit infolge ihrer Seltenheit als gering einzuschätzen. Für unsere Messungen benötigen wir nur die scheinbare Zahl der doppelkernigen Zellen im Schnitt, so daß unsere Werte nach den PFUHLschen Berechnungen etwa verdoppelt werden müßten, um den tatsächlichen Prozentsatz der doppelkernigen Leberzellen festzustellen.

Die Vergrößerung hatten wir so gewählt, daß wir für mittlere Lebergewichtsklassen das Meßquadrat zwischen 2 Zentralvenen durchschieben können und so annähernd den Querschnitt eines Hepatons erfassen. Dabei sind die Leberzellen noch leicht zu erkennen und zu differenzieren. Die GLISSONschen Felder sind bei der Maus normalerweise sehr gering ausgebildet und werden erst erkennbar, wenn Proliferationsherde von Mesenchymzellen um Pfortaderäste auftreten. Dadurch, daß die Leberzellen in frisch fixiertem Zustand ganz dicht beieinander liegen, kann der schmale Capillarraum zunächst vernachlässigt werden. Die Endothelkerne liegen bei allen Gewichtsklassen schmal und oft kommaförmig zwischen den Leberzellen und lassen nur einen schmalen Capillarspalt mit wenigen Erythrocyten und Leukocyten erkennen. Größere Gefäßräume und Randgebiete des Schnittes wurden immer außerhalb des Meßquadrates gelassen.

Anfänglich zählten wir für jeden Schnitt 20 Flächeneinheiten aus und nahmen davon den Mittelwert, nachdem sich aber zeigte, daß die mittlere Abweichung sich nicht merklich verschiebt, zählten wir nur noch 15 und später 10 Flächeneinheiten aus. Für Routineuntersuchungen an größeren Versuchsreihen sind Mittelwertbestimmungen aus 5 Flächeneinheiten durchaus ausreichend, um die Größenordnung des mittleren Zellvolumens festzulegen. Doch gibt es Lebern, die unter besonderen Versuchsbedingungen eine inhomogenere Verteilung der Leberzellgrößen aufweisen, bei denen 20 Flächeneinheiten zur exakten Bestimmung des Mittelwertes nötig sind. Während anfänglich 4—5 Std zur Auszählung eines Schnittes benötigt wurden, konnten wir so die Zeit auf etwa $\frac{3}{4}$ Std zur Ausmessung eines Leberschnittes herabsetzen, was für größere Reihenuntersuchungen sehr zweckmäßig war.

Gleichzeitig mit den Leberzellen wurde jeweils die Zahl der Endothelkerne im Meßquadrat ausgezählt.

Für die mathematische Auswertung unserer Ergebnisse verwandten wir den arithmetischen Mittelwert (M), die mittlere Abweichung (σ) und den mittleren Fehler des Mittelwertes (m), nach den Angaben von RÖSSLE und ROULET sowie von GEBELEIN.

B. Untersuchungsergebnisse.

1. Das relative Lebergewicht bei verschiedener Fütterung.

Vergleiche zwischen Leber- und Körpergewicht bei Tieren unter normaler Mischfütterung mit Hafer, Brot und Milch, sowie auch bei Tieren mit reiner Haferfütterung zeigen, daß das Lebergewicht innerhalb einer zwar verhältnismäßig großen Streubreite annähernd proportional

zum Körpergewicht ansteigt. Das relative Lebergewicht — ausgedrückt in Milligramm Lebergewicht je Gramm Körpergewicht — beträgt bei 56 Tieren der verschiedensten Gewichtsklassen im Mittel 45,8 mg/g bei einer mittleren Abweichung von $\sigma \pm 4,5$ mg/g und einem mittleren Fehler des Mittelwertes von $m \pm 0,6$ mg/g (Abb. 2). Hierbei hat man den Eindruck, daß niedrigere Gewichtsklassen bis etwa 15 g relativ leichte Lebergewichte besitzen, während Tiere höherer Gewichtsklassen von etwa 20 g an zu schwereren Lebergewichten innerhalb der Streubreite

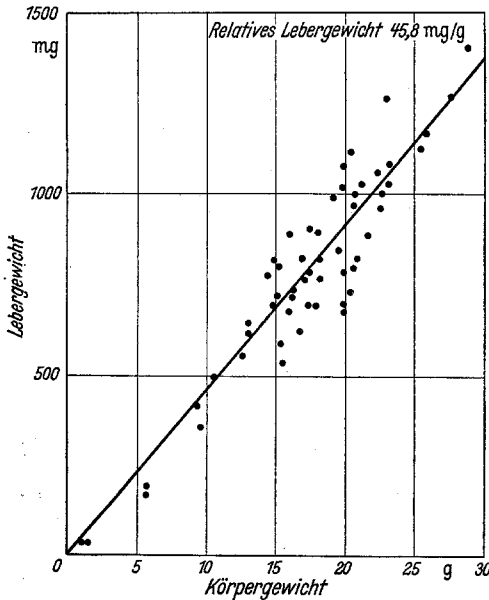


Abb. 2. Lebergewicht und Körpergewicht.

neigen. Die beträchtliche Schwankungsbreite dürfte zum Teil auf individuelle Unterschiede zurückzuführen sein, zum Teil mögen darin auch die physiologischen Schwankungen des Lebergewichtes in den Phasen der Assimilation und Sekretion, wie sie von HOLMGREN und FORSGREN beschrieben wurden, zum Ausdruck kommen. Tiere mit reiner Hafer- und Wasserfütterung zeigen in der 1. Woche ein deutliches Absinken des Gewichtes, das nur langsam wieder aufgeholt wird; Körpergewicht und Lebergewicht halten sich dann in mittleren Grenzen.

Bei Eiweißfütterung (getrocknetes Pferdeplasma oder Casein) mit etwas Hafer tritt als Umstellung auf die normale Mischfütterung zuerst eine leichte Gewichtsabnahme ein. Die Tiere nehmen dann rasch wieder zu und zeigen ein gutes Gedeihen. Nach 3 Wochen Fütterung war das Anfangsgewicht bei wachsenden Tieren meist um etwa 2—3 g überschritten. Das relative Lebergewicht betrug bei 10 Tieren mit Plasmafütterung im Mittel 50,8 mg/g ($\sigma \pm 4,69$ mg/g, $m \pm 1,5$ mg/g), bei 10 mit Casein gefütterten Tieren 48,1 ($\sigma \pm 5,1$, $m \pm 1,7$). Die Werte des relativen Lebergewichtes liegen hier also etwas über dem Normalmittelwert, doch überschreiten sie noch nicht wesentlich die Streuung der Differenz der Mittelwerte.

Zwei Tiere, die bei einer Ernährung mit Rüben und Wasser innerhalb von 6 Tagen mit ihrem Körpergewicht von 20 g auf 15 g zurückgingen, zeigen beide ein relatives Lebergewicht von 37 bzw. 34 mg/g.

Diese starke Abnahme des relativen Lebergewichtes, die einen rascheren Rückgang des Lebergewichtes im Verhältnis zur allgemeinen Gewichtsabnahme anzeigt, ist zweifellos als Folge des Hungerzustandes anzusehen.

Unter besonderen Versuchsbedingungen sind auch beträchtliche Steigerungen des relativen Lebergewichtes weit über die Streubreite der Normaltiere möglich. Das relative Lebergewicht gibt uns trotz einer physiologischen Streubreite gute Einblicke in die Stoffwechselunktionen der Leber unter verschiedenen Bedingungen.

2. Zahl der Leberzellen und Endothelien in einer konstanten Flächeneinheit.

Bestimmt man an verschiedenen Schnitten eines Leberläppchens die Zahl der mit Kernen geschnittenen Leberzellen (X) im Meßquadrat, so fällt auf, daß diese Zahl in verschiedenen Gesichtsfeldern nur eine geringe Schwankungsbreite zeigt und um einen Mittelwert gehäuft auftritt. Die Zahl der doppelkernigen Leberzellen weist dagegen von

Tabelle 1. Auszählungen an einem Leberlappen (Beispiel).

Tier Nr. A 8 (Mischfütterung), Körpergewicht 23 g, Lebergewicht 1260 mg, relatives Lebergewicht 54,6.

Zahl der doppelkernigen Zellen in a^2	Zahl der mit Kern geschnittenen Leberzellen in a^2	Zahl der Endothelkerne in a^2
D	X	B
9	100	123
35	104	131
27	108	130
19	115	138
25	109	129
29	107	118
25	104	131
19	109	139
12	113	134
28	109	133
Mittelwert $M = 22,8$	107,8	130,6
$(\sigma = \pm 4,1; m \pm 1,2)$		

Gesichtsfeld zu Gesichtsfeld im gleichen Schnitt deutliche Schwankungen auf, ohne daß die Zellzahl X sich deswegen wesentlich ändert. Die Zahl der Endothelkerne verhält sich ähnlich. Auch sie treten um einen Mittelwert gehäuft auf, nur ist die Streubreite etwas größer.

Untersuchungen an mehreren Tieren ergaben nun, daß diese Zellzahl in allen Lappenteilen der Leber, auch in den kleinsten für die betreffende Leber innerhalb der Fehlerbreite stets konstant blieb. Wir zählten an 3 Lebern jeweils 6 Lappenteile an mehreren Schnitten durch und konnten diese Regel immer wieder bestätigt finden. Interessant ist es, daß dabei die Zahl der doppelkernigen Leberzellen prozentualen Schwankungen nicht nur im Schnitt, sondern auch in verschiedenen Lappenteilen derselben Leber unterliegt, ohne daß auch hier der Mittelwert der Zellzahl X wesentlich verschoben würde. Daß mit dem Auftreten von sehr vielen doppelkernigen Leberzellen der Mittelwert gelegentlich

etwas höher erscheint, liegt zum Teil daran, daß dann auch mehr Zellen mit Kern geschnitten werden.

An zahlreichen anderen Lebern wurden 2 und mehr Lappenteile untersucht und immer dieselben Beobachtungen gemacht.

Wir können daher schließen, daß das mittlere Zellvolumen innerhalb *aller* Lappenteile einer Leber annähernd dasselbe bleibt. Umgekehrt gibt uns daher die *Bestimmung aus einem Lappen*, ja sogar aus *einem Schnitt ein Maß des mittleren Zellvolumens für die gesamte Leber*.

Tabelle 2. *Messungsergebnisse an 6 Lappenteilen der Leber eines Tieres.*

Tier Nr. A 26, Körpergewicht 20,0 g, Lebergewicht 785 mg, Lebervolumen 730 mm³.

Leberlappen	Zahl der doppelkernigen Zellen <i>D</i>	Zahl der mit Kern geschnittenen Leberzellen <i>X</i>	Zahl der Endothelkerne <i>B</i>
I	41	144	136
II	29	142	126
III	26	147	138
IV	50	145	130
V	57	150	121
VI	38	148	118
Mittelwerte	40	146 <i>m</i> = ± 1,0 <i>σ</i> = ± 2,6	128

Die prozentuale Verteilung der doppelkernigen Zellen ist innerhalb der Leber deutlichen Schwankungen unterworfen. Man sieht allerdings gelegentlich auch sehr gleichmäßige Bilder, doch ist dies nicht die Regel. Da das mittlere Zellvolumen, gemessen an der Zahl der mit Kern geschnittenen Zellen von der Schwankung der doppelkernigen Zellen nicht wesentlich be-

einträchtigt wird, können wir schließen, daß die Leber die *Fähigkeit besitzt, bei gleichbleibendem mittlerem Zellvolumen die Zahl der doppelkernigen Zellen zu erhöhen*. Dies bedeutet bei gleichem Zell- und Kernvolumen eine Vergrößerung der Grenzoberflächen zwischen Kern und Plasma. Wir können dies als weiteren Beweis dafür ansehen, daß die doppelkernigen Zellen Ausdruck gesteigerten Stoffwechselgeschehens sind. Wir halten es auf Grund unserer Untersuchungen für erwiesen, daß die Zahl der doppelkernigen Zellen innerhalb der einzelnen Leber und auch innerhalb einer Tierklasse nicht konstant ist. In einzelnen Lebern fanden wir gehäuft dunkle, zum Teil pyknotische Leberzellkerne, die fast stets einen der Doppelkerne darstellen, während der andere Kern normale Struktur zeigt. Vielleicht ist dies dahin gehend zu deuten, daß einer der Doppelkerne wieder verschwinden kann, ohne daß die Zelle dabei zugrunde geht.

3. *Leberzellzahl X und Endothelzellzahl B in ihrer Beziehung zum Lebergewicht.*

Wir haben nun bei insgesamt 120 Tieren verschiedener Fütterung und Behandlung den Mittelwert der Zellzahl (*X*) sowie die Zellzahl

der Endothelien (B) zu dem jeweiligen Lebergewicht in Beziehung gesetzt. Aus der beiliegenden graphischen Darstellung (Abb. 3) ergibt sich eindeutig, daß die Leberzellzahl X eine Funktion des Lebergewichtes G darstellt, derart, daß mit zunehmendem Lebergewicht die Zahl X gesetzmäßig abnimmt und damit das mittlere Zellvolumen sich vergrößert. Dabei zeigt X auch bei verschiedenen Lebern gleicher Gewichtsklassen nur geringe Schwankungen um den Mittelwert (Abb. 4 bis 7). So erscheint es gemäß unserer einleitenden Betrachtung wahrscheinlich, daß die Gewichtszunahme der Leber *allein* durch die Volumenzunahme der Leberzellen bedingt ist.

Indem wir das Ergebnis unserer mathematischen Betrachtungen zunächst vorwegnehmen, bemerken wir, daß

$$X = \frac{\text{Konstante}}{\sqrt[3]{\text{Lebergewicht}^2}}$$

ist. Wir haben dann von 25 Tieren, bei denen 10–20 Flächeneinheiten ausgezählt waren, den Mittelwert dieser Konstanten aus X und G berechnet:

$$K = 12230 \sigma \pm 390 (\sigma \pm 3,2\%), m = \pm 78 (0,6\%).$$

Zeichnet man diese Kurve

$$X = \frac{12230}{\sqrt[3]{G^2}}$$

in unsere Ergebnisse ein, so zeigt sich, daß mit Ausnahme von wenigen Fällen die Ergebnisse sich für alle 120 Tiere eng um diese Kurve gruppieren. Bestimmen wir für alle unsere empirischen Ergebnisse die Abweichung vom Kurvenmittelwert und errechnen daraus die mittlere Abweichung für X bei $K = 12230$ so ergibt sich $\sigma \pm 3,08\%$ bei einem

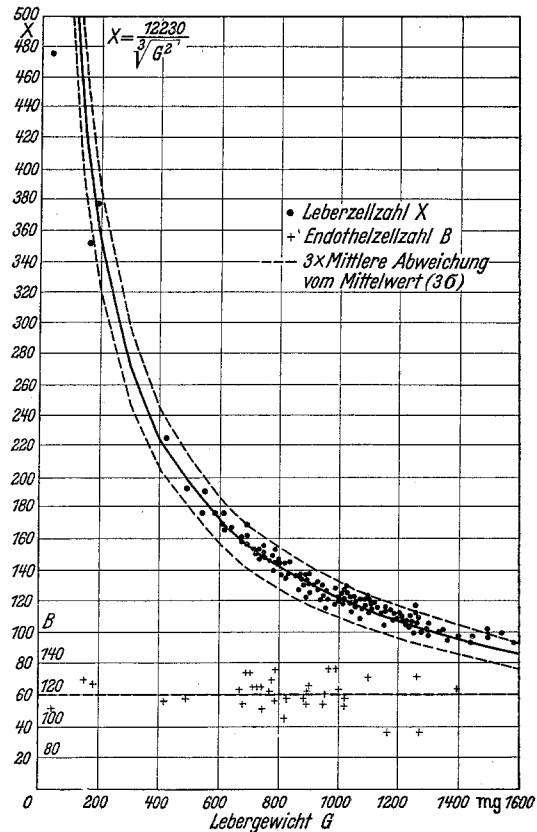


Abb. 3. Anzahl der Leberzellen (X) und Endothelien (B) je Flächeneinheit in Beziehung zum Lebergewicht.

Tabelle 3. *Zahlenbeispiele für die Kurve in Abb. 3.*

Tier Nr.	Lebergewicht G (mg)	Zahl der doppel- kernigen Leberzellen %	Zahl der Leberzellen X	Konstante $K = X \cdot \sqrt[3]{G^2}$	Endothelzahl in a^2 B
A 22	186	9	377	12307	128
A 21	415	41	225	12520	117
A 23	490	28	192	11930	119
A 27	670	33	161	12320	130
A 28	680	44	158	12200	115
A 26	785	28	145	12340	130
A 14	950	16	124	11982	113
A 6	1020	41	122	12360	119
A 18	1110	15	116	12435	140
A 8	1260	20	108	12332	133
A 20	1400	21	99	11800	127

mittleren Fehler des Mittelwertes von X , $m_x \pm 0,28\%$. Die Fehlergrenze liegt damit für $X = \pm 3\sigma = \pm 9,24\%$. Werte, die außerhalb dieser Grenze liegen, befinden sich daher nicht mehr im Zufallsbereich.

Bei weiterer Betrachtung unserer Zahlen (s. Abb. 3) zeigt sich, daß ein 1 Tag altes Tier mit einem Lebergewicht von 37,5 mg und einer Zellzahl X von 475 weit unterhalb dieser Fehlerbreite liegt. Auch bei einem Tier mit 159 mg Lebergewicht nähert sich der Wert erst der unteren 3- σ -Grenze. Ein Tier mit 180 mg liegt bereits in der Kurve. Von da an folgt die Leberzellzahl bei allen Tieren innerhalb der Fehlergrenze der Kurve. Erst bei Gewichten ab 1400 mg nähern sich die Werte wieder der oberen Fehlergrenze. *Wir können daher sagen, daß innerhalb der Gewichtsgrenze von 200 mg und 1500 mg die Zellzahl X und damit das mittlere Zellvolumen innerhalb einer Fehlerbreite von $\pm 9,2\%$ gesetzmäßig eine Funktion des Lebergewichtes darstellt.* Grenzwerte von 200 mg und 1500 mg machen eine vorsichtige Beurteilung notwendig.

Ganz anders als die Leberzellen verhält sich die *Zahl der Endothelzellen je Flächeneinheit (B)* im Vergleich zum Lebergewicht. Wir können für alle nichtbehandelten Normaltiere die Regel aufstellen, daß innerhalb aller Gewichtsklassen die Endothelzellzahl je Flächeneinheit zwischen 100 und 140 schwankt, wobei die häufigsten Werte um 120 liegen. Schwere Lebern ohne Proliferationsherde neigen dazu, niedrigere Werte bis 100 zu zeigen. Bei 140 Endothelkernen treten bereits Proliferationsherde mesenchymaler Zellen auf, die von M. B. SCHMIDT als „Milzgewebe der Leber“ bezeichnet wurden. Diese sind bei Normaltieren selten und treten meist erst bei größeren Tieren auf. Wir möchten annehmen, daß solche Tiere irgendeinen Infekt durchgemacht haben. Meist findet man bei ihnen Bißwunden. Werte über 140 Endothelkerne gehen fast regelmäßig mit zunehmender Ausdehnung der Proliferationsherde einher, so daß wir die Zahl der Endothelkerne als

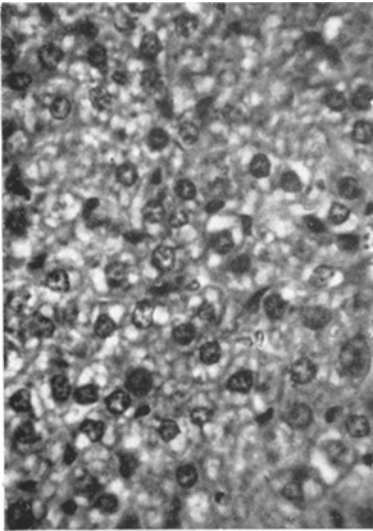


Abb. 4. Tier Nr. A 22. Körpergewicht 5,5 g.
Lebergewicht 186 mg. Leberzellzahl $X = 377$.
Endothelzellzahl $B = 128$.

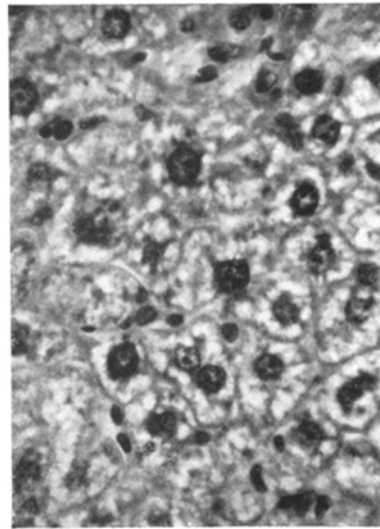


Abb. 5. Tier Nr. B 3. Körpergewicht 16,2 g.
Lebergewicht 890 mg. Leberzellzahl $X = 126$.
Endothelzellzahl $B = 122$.

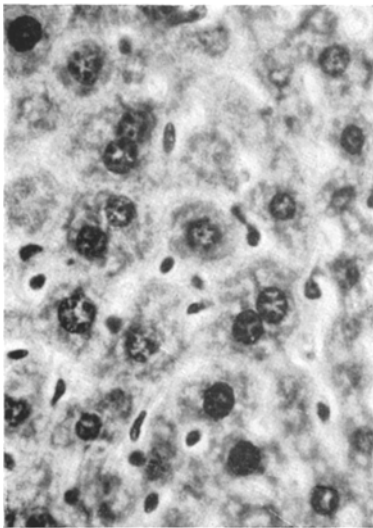


Abb. 6. Tier Nr. C 3. Körpergewicht 20,5 g.
Leberzellzahl $X = 119$. $B = 120$. Leber-
gewicht 1000 mg.

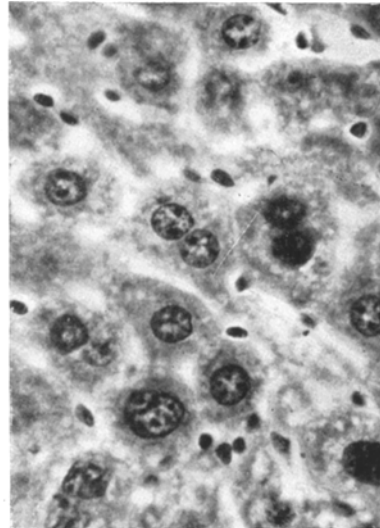


Abb. 7. Tier Nr. A 20. Körpergewicht 29,0 g.
Leberzellzahl $X = 99$. $B = 127$. Leber-
gewicht 1400 mg.

Abb. 4—7. Kern- und Zellbild der Leber verschiedener Gewichtsklassen bei gleicher Vergrößerung. (Lineare Vergrößerung 1:800.)

empfindlichen Test für Reizungen des Mesenchyms aus infektiösen oder anderen Ursachen ansehen möchten. Die obere Grenze mit 140 Zellen ist anscheinend etwas willkürlich angesetzt, aber bei Normaltieren treten Werte darüber nur auf, wenn gleichzeitig stärkere Proliferationsherde vorhanden sind, welche wir nicht mehr als normal bezeichnen können.

Eine Endothelkernzahl ohne Proliferationsherde über den oberen Grenzwert von 140 sahen wir nur bei den beiden Hungertieren, die in 6 Tagen 5 g Gewicht verloren hatten und deren Lebergewicht sehr stark abgefallen war. Da das mittlere Leberzellvolumen dabei dem Gewicht durchaus entsprach, ist diese Vermehrung der Endothelkerne nur eine scheinbare, da ein dem Leberzellvolumen analoges Verschwinden der Endothelkerne nicht eingetreten ist.

Es bleibt also in allen Gewichtsklassen die Zahl der Endothelkerne je Flächeneinheit gleich. Da im Unterschied zur Leberzelle die Endothelzelle während des Wachstums ihr Volumen nicht wesentlich vergrößert, so folgt daraus, daß der Volumenzunahme der Leberzellen, d. h. einer numerischen Abnahme der Leberzellen im Meßquadrat, eine absolute Zunahme der Endothelzellen gegenübersteht (s. Abb. 3). Daraus geht weiter hervor, daß auch der Capillarraum absolut vergrößert wird.

Auch bei Tieren mit Proliferationsherden und Endothelkernvermehrung bis 200 und mehr verschiebt sich die Leberzellzahl in der Flächeneinheit nur ganz gering gegen die obere Fehlergrenze. Dies bedeutet, daß die Endothelproliferation sich zunächst innerhalb des vorhandenen Capillarraumes abspielt, ohne auf das Leberparenchym wesentlich verdrängend zu wirken. Gewichtsmäßig sind Proliferationsherde und Endothelvermehrung nur eine unwesentliche Fehlermöglichkeit. Erst bei starken Umbauerscheinungen der Leber, wie wir sie in einem Teil unserer Versuche wahrnehmen konnten, sind diese Fehler in die Beurteilung mit einzubeziehen.

Zur *Morphologie* sei noch bemerkt, daß Unterschiede in den Protoplasmastrukturen der Leberzellen keine Veränderungen des mittleren Zellvolumens verursachen, die die Fehlerbreite der Methode überschreiten. Auch bei Normaltieren finden wir Unterschiede in den Protoplasmastrukturen, die von Alter und Geschlecht unabhängig sind und sichtlich zur augenblicklichen Stoffwechsellage in Beziehung stehen. Es wechseln Bilder von wabigen pflanzenzellähnlichen Leberzellen mit Zellen dichten oder scholligen Protoplasmas, ohne daß die Werte der Zellzählung dadurch beeinflußt werden.

Untersuchungen von FORSGREN und HOLMGREN zeigen eine tageszeitliche Schwankung des Leberstoffwechsels unabhängig von der Nahrungsaufnahme. Demnach hat die weiße Maus eine assimilatorische Phase der Glykogenspeicherung zwischen 24 und 2 Uhr während die

Sekretionsphase von 12—14 Uhr ihren Höhepunkt erreicht. Damit soll auch das Lebergewicht gewissen Schwankungen unterworfen sein. Um solche Einflüsse weitgehend auszuschalten, hatten wir die Tiere immer zu gleichen Zeiten (zwischen 10 und 12 Uhr) vor der Fütterung getötet. Bei Eiweißfütterung herrscht das dichte und schollige Protoplasma vor.

Mitosen sind normalerweise äußerst selten anzutreffen. BRUES und MARBLE geben für die normale Rattenleber auf 20000—30000 Leberzellen eine Mitose an. Für die normale Mäuseleber dürften ähnliche Verhältnisse zutreffen.

Von verschiedenen Untersuchern sind gewisse Regeln über die Zahl der doppelkernigen Leberzellen aufgestellt worden. Auch wir bemühten uns eine Abhängigkeit zu finden, können aber nach unseren ausgedehnten Untersuchungen nur wiederholen, daß der prozentuale Anteil der doppelkernigen Zellen nicht nur in der einzelnen Leber gewissen Schwankungen unterliegt, sondern daß wir auch bei verschiedenen Tieren Schwankungen zwischen 10 und 40% der relativen Schnittwerte erhalten, die aber von Fütterung und anderen Einflüssen unabhängig und von Tier zu Tier auch innerhalb derselben Versuchsreihe verschieden sind. Wir können daher aus der Zahl der doppelkernigen Zellen wohl auf eine augenblicklich erhöhte Stoffwechselfunktion schließen, doch muß man sich unseres Erachtens hüten, Vermehrung oder Verminderung spezifischen Versuchsbedingungen ohne weiteres zuzuordnen.

4. Das Verhältnis der einzelnen Leberlappen zum Gesamtvolumen der Leber.

Wenn wir aus der Funktion des mittleren Zellhalbmessers in bezug auf das Organgewicht den Schluß zogen, daß eine Gesetzmäßigkeit des Wachstums bei allen unseren Mäuselebern vorliegt und wenn wir dies auf die Konstanz der Leberzellzahl zurückführen, so ist auch anzunehmen, daß das Verhältnis der einzelnen Leberlappen zum Gesamtvolumen der Leber konstant bleibt, zumal wir feststellen, daß das mittlere Zellvolumen innerhalb der einzelnen Leber gleichbleibt.

Bei unseren Untersuchungen über die Schrumpfung, über die noch eingehend berichtet wird, haben wir routinemäßig fast immer denselben Leberlappen entnommen und besitzen so von 25 Tieren die Volumenwerte für die Gesamtleber und jeweils den gleichen Leberlappen (linker Hauptlappen). Das Verhältnis $\frac{\text{Gesamtlebervolumen}}{\text{Lappenvolumen}}$ ergibt im Mittelwert von 25 Tieren 14,6 mit einer mittleren Abweichung $\sigma \pm 0,26$ und einem mittleren Fehler des Mittelwertes von $\pm 0,05$. Die Lebergewichte dieser 25 Tiere liegen zwischen 600 und 1400 mg. Wir sehen daher in diesem konstanten Verhältnis einen neuen Beweis für unsere Anschauung von der konstanten Leberzellzahl.

III. Mathematische Betrachtungen.

A. Einführung.

Zum besseren Verständnis der mathematischen Ableitung für X als Funktion des Lebergewichtes G ist es gut, sich nochmals unsere eingangs erwähnte Problemstellung und unsere bisherigen Ergebnisse zu vergegenwärtigen. Nachdem die Leberzellzahl X als Funktion des mittleren Zellvolumens *gesetzmäßig* innerhalb der Gewichtsklassen von 200 bis 1400 mg Lebergewicht abnimmt, das mittlere Leberzellvolumen innerhalb der einzelnen Leber in allen ihren Lappen gleichbleibt und die Einzellappen der Leber zum Gesamtvolumen in allen Gewichtsklassen im gleichbleibenden Verhältnis stehen, erscheint unsere Annahme berechtigt, daß die Vergrößerung der Leber innerhalb der genannten Grenzen auf Vergrößerung des mittleren Zellvolumens beruht, während die Gesamtzellzahl konstant bleibt.

Wir fassen daher die Voraussetzungen für unsere Berechnungen zusammen:

1. Die Gesamtzellzahl der Leberzellen ändert sich während des Wachstums *nicht*, d. h. die Zellmauserung durch Zellanbau und -abbau bleibt konstant. Damit beruht die Gewichtszunahme der Leber während des Wachstums allein auf dem Gewichtszuwachs der einzelnen Zellen, wobei wir annehmen, daß der Capillar- und Gefäßbindegewebsraum in konstantem Verhältnis zum jeweiligen Lebergesamtvolumen verbleibt.

2. Das Verhältnis von Kernmasse zu Plasmamasse bleibt während des Lebens im Mittel unverändert.

3. Stellen wir uns vor, man würde aus einer großen und aus einer kleinen Leber je einen Würfel gleichen Volumens heraus schneiden, so würden diese Würfel unter den oben genannten Voraussetzungen jeweils die gleiche Kernmasse, die gleiche Zellplasmamasse an Leberzellen und den gleichen Capillarraum besitzen. Bei der kleinen Leber setzt sich diese Kern- und Zellplasmamasse aus vielen kleinen Leberzellen zusammen, die dicht beieinanderliegen, bei der großen Leber dagegen aus wenigen dafür aber großen Kernen mit dem zugehörigen Plasma. Da der Capillarraum gemessen an der Zahl der Endothelkerne im gleichen Verhältnis zur Leberzellmasse in diesem Würfel bleibt, die Endothelien ihr Volumen aber nicht merklich vergrößern, so bleibt die Zahl der Endothelkerne in der großen und in der kleinen Leber die gleiche, nur das anfänglich sehr schmale und feinverzweigte Capillarnetz wird sich zu einem größeren, weniger verzweigten Netzwerk umwandeln, das denselben Gefäßraum besitzt. Betrachten wir diesen Würfel nun nicht räumlich, sondern denken ihn uns in gleich dünne Scheiben geschnitten und sehen ihn von der gleichbleibenden Quadratfläche aus an, so ergibt sich daraus unsere empirisch schon gefundene Beobachtung: die Zahl der geschnittenen Leberzellen im Meßquadrat ist in der kleinen Leber groß und

in der großen Leber klein und zwar unmittelbar als Funktion des mittleren Zellvolumens. Weiter ergibt sich daraus, daß diese Überlegung entsprechend der Homogenität des Materials für jede der einzelnen geschnittenen Scheiben gelten muß. Die *geschnittene Kernfläche* in diesen Quadraten muß sowohl für die große Leber wie auch für die kleine annähernd konstant bleiben und damit das *Verhältnis der geschnittenen Kernfläche zum Gesamtquadrat* einen *bestimmten konstanten Wert besitzen*, welcher zum Ausdruck der Kern-Plasmarelation wird. Daß die Endothelkernzahl in diesem Quadrat ebenfalls innerhalb der Schwankungsbreite konstant bleibt, ergibt sich von selbst.

4. Die Schrumpfungsbedingungen bis zum fertigen mikroskopischen Schnitt, der eine konstante Dicke aufweisen muß, bleiben dieselben und dürfen bei verschiedenem Zustand des Protoplasmas der Leberzellen keine Schwankungen aufweisen, die die Fehlerbreite der Methode übersteigen.

B. Benennungen.

Zur mathematischen Formulierung ist es notwendig, Bezeichnungen einzuführen, auf die im folgenden zurückgegriffen wird (Abb. 8).

Lebergewicht (des frischen Organs)	G (mg)
Lebervolumen (des frischen Organs)	V (mm ³)
Leberparenchymvolumen (einschließlich des Capillarraumes des frischen Organs)	V_p
Lebergefaßvolumen (größere Gefäße des frischen Organs)	V_g
Flächeneinheit (konstant)	a^2 (μ^2)
Schnittdicke (konstant)	h (μ)
Gesamtzahl der Leberkerne in a^2	L
Zahl der doppelkernigen Leberzellen in a^2	D
Zahl der mit Kern geschnittenen Leberzellen in a^2	$X = L - D$
Zahl der insgesamt in a^2 geschnittenen Leberzellen (= Zahl der mit Kern geschnittenen (X) + der ohne Kern geschnittenen (z) Leberzellen in a^2	$Z = X + z$
Zahl der geschnittenen Endothelkerne in a^2	B
Wahrer mittlerer Halbmesser der Leberzellen am Organschnitt	R_w (μ)
Gemessener mittlerer Halbmesser der Leberzellen am Organschnitt	R_m (μ)

Dieser ist immer kleiner, da am Schnitt nicht immer der optimale Durchmesser getroffen ist und dadurch der Mittelwert herabgedrückt wird.

Verhältnis zwischen gemessenem und wahren Halbmesser der

$$\text{Leberzellen} \quad \frac{R_m}{R_w} = \varrho$$

R_w und R_m schließen den schmalen Capillarspalthalbmesser ein, der für die Berechnung als Mantel um die ganze Zelle verlaufend gedacht ist.

Wahrer mittlerer Kernhalbmesser am Organschnitt r_w (μ)

Meßbarer mittlerer Kernhalbmesser am Organschnitt r_m (μ)

Verhältnis zwischen wahren und meßbarem mittlerem Kernhalbmesser am Organschnitt $\frac{r_m}{r_w} = \varrho$

Wahres mittleres Zellvolumen am frischen Organ (einschließlich

Capillarraum) $v_z (\mu^3)$

Wahres mittleres Zellvolumen am Organschnitt $v'_z (\mu^3)$

Konstanten.

Kern-Plasmarelation $\frac{R_w}{r_w} = c$

Schrumpfungsfaktor (wobei V' das Lebervolumen nach der
Schrumpfung darstellt) $\frac{V'}{V} = \frac{v'_z}{v_z} = I$

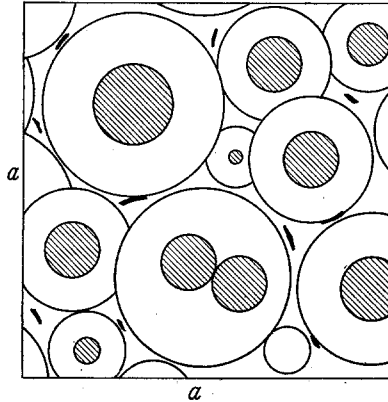


Abb. 8. Schematisierende Skizze zur Erläuterung der Bezeichnungen. L = Zahl der in a^2 geschnittenen Leberkerne (10); D = Zahl der in a^2 geschnittenen Doppelkerne von Leberzellen (1); X = Zahl der in a^2 mit Kern geschnittenen Leberzellen; $L-D$ (10-1=9); Z = Zahl der in a^2 geschnittenen Leberzellen (mit Kern und ohne Kern). Im Schnitt nicht exakt feststellbar. Hier etwa 16; z = Zahl der ohne Kern geschnittenen Leberzellen (7); $\frac{Z}{X} = 1,8$ (in diesem Beispiel); B = Zahl der Endothelkerne in a^2 (10).

Gesamtleberzellzahl im Organ $\frac{V_p}{v_z} = C$

Gefäßfaktor $\frac{V_g}{V} = k$

Spezifisches Gewicht $\frac{G}{V} = s$

C. Die Ableitung der Gleichung: $X = \frac{K}{\sqrt[3]{G^2}}$.

Für unsere Berechnungen stellen wir uns die polygonalen Leberzellen idealisiert als Kugeln vor, wobei wir den Capillarraum aus Vereinfachungsgründen zunächst rechnerisch mit einbeziehen. Zellplasma mit zugehörigem Capillarraum bilden daher in unseren Berechnungen ein Ganzes.

1. Grundgleichung.

Nach unseren bisherigen Darlegungen und Definitionen beträgt die Zahl der im Flächenquadrat a^2 geschnittenen Leberzellen:

$$Z = \frac{a^2}{R_m^2 \cdot \pi} \quad (1)$$

Da aber

$$R_m = \varrho \cdot R_w \quad (2)$$

ist, ergibt sich (2) in (1) zu

$$Z = \frac{a^2}{\varrho^2 \cdot R_w^3 \cdot \pi}. \quad (3)$$

Nun ist das Volumen einer Leberzelle im Organschnitt

$$V'_z = \frac{4}{3} \cdot R_w^3 \cdot \pi \quad (4)$$

oder

$$R_w = \sqrt[3]{\frac{3}{4\pi}} \cdot \sqrt[3]{v'_z} \quad (4')$$

(4') in (3) gibt

$$Z = \frac{a^2}{\varrho^2 \cdot \pi \sqrt[3]{\left(\frac{3}{4\pi}\right)^3}} \cdot \frac{1}{\sqrt[3]{v'_z}}. \quad (5)$$

2. Berechnung von v'_z .

Die Schrumpfung I des frischen Organs bis zum Organschnitt beträgt:

$$I = \frac{V'}{V} = \frac{V'_p + V'_g}{V_p + V_g}. \quad (6)$$

Da aber V_g nur einen kleinen Prozentsatz des Gesamtvolumens beträgt (5%) kann die Schrumpfung für V_g als annähernd gleich der Gesamtschrumpfung angesehen werden.

Daher gilt

$$\frac{V'_p}{V_p} = \frac{V'_z}{V_z} = I \quad (6')$$

$$v'_z = I \cdot V_z. \quad (6'')$$

Nach unserer Definition ist aber

$$\begin{aligned} \frac{V'_p}{v'_z} &= \frac{V_p}{v_z} = C \\ v_z &= \frac{V_p}{C} \end{aligned} \quad (7)$$

(7) in (6'') zu

$$v'_z = I \cdot \frac{V_p}{C}. \quad (8)$$

Den Gefäßanteil der größeren Gefäße am Gesamtvolumen nehmen wir als konstant an

$$k = \frac{V_g}{V} \quad (9)$$

da aber

$$V_p = V - V_g \quad (10)$$

gilt (9) in (10) zu

$$V_p = V - V \cdot k = V(1 - k) \quad (11)$$

(11) in (8) ergibt

$$v'_z = \frac{I \cdot (1 - k)}{C} \cdot V. \quad (12)$$

Da aber

$$V = \frac{G}{s} \quad (13)$$

ist

$$v'_z = \frac{I \cdot (1 - k)}{C \cdot s} \cdot G \quad (14)$$

(14) in (5) ergibt

$$Z = \frac{a^2}{c^2 \cdot \pi \cdot \sqrt[3]{\left(\frac{3 \cdot I \cdot (1 - k)}{4 \cdot \pi \cdot C \cdot s}\right)^2}} \cdot \frac{1}{\sqrt[3]{G^2}}. \quad (15)$$

3. Berechnung von X.

Die Zahl der in a^2 geschnittenen Leberzellen Z kann nicht direkt bestimmt werden. Wir kennen nur die Zahl der in a^2 mit Kern geschnittenen Leberzellen X . Es verhält sich nun nach einfachen Überlegungen

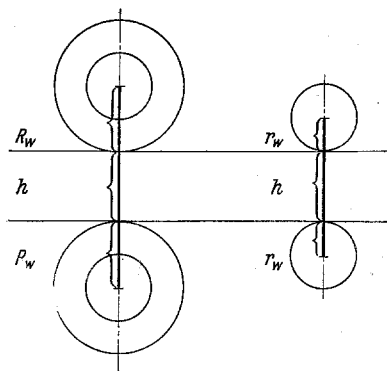


Abb. 9.

$$\frac{Z}{X} = \frac{2 R_w + h}{2 r_w + h}. \quad (16)$$

Aus Abb. 9 ist verständlich, daß bei gleichbleibender Schnittdicke h Zellplasma und Kern erst von h geschnitten werden, wenn die Mittelpunkte der Zelle näher als R_w (für die Zelle) und näher als r_w (für den Kern) an h gerückt sind. Setzen wir nun gleichmäßige Verteilung voraus, so ergibt sich nach Wahrscheinlichkeitsgesetzen, daß die Häufigkeit von Z und X sich wie das Verhältnis des

Zell- und Kerndurchmessers zuzüglich der Schnittdicke h verhält. Lassen wir h unendlich klein werden, so verhält sich $\frac{Z}{X} = \frac{R_w}{r_w}$.

Nach der Kern-Plasmarelation ist

$$\frac{R_w}{r_w} = c \quad (17)$$

$$R_w = c \cdot r_w \quad (17')$$

(17') in (16) zu

$$\frac{Z}{X} = \frac{(2 \cdot c \cdot r_w + h)}{(2 \cdot r_w + h)}. \quad (18)$$

Da der mittlere Kernhalbmesser r_w sich bei konstanter Größe h ändert, ist auch zunächst das Verhältnis Z/X nicht für alle Gewichtsklassen als konstant anzusehen. Es ist zu prüfen, ob die systematische Schwankung von Z/X noch innerhalb der Fehlergrenze liegt.

4. Endgleichung.

Setzen wir (18) in (15) so ergibt sich die Endgleichung:

$$X = \frac{a^2}{\varrho^2 \cdot \pi \cdot \sqrt[3]{\left(\frac{3 \cdot I \cdot (1-k)^2}{4 \cdot \pi \cdot s \cdot C}\right) \cdot \frac{(2 \cdot c \cdot r_w + h)}{(2 \cdot r_w + h)}}} \cdot \frac{1}{\sqrt[3]{G^2}} \quad (19)$$

$$X \cdot \sqrt[3]{G^2} = K = \frac{a^2}{\varrho^2 \sqrt[3]{\pi \left(\frac{3 \cdot I \cdot (1-k)^2}{4 \cdot s \cdot C}\right) \cdot \frac{(2 \cdot c \cdot r_w + h)}{(2 \cdot r_w + h)}}} \quad (19')$$

$$X = \frac{K}{\sqrt[3]{G^2}}. \quad (19'')$$

D. Die Konstante K .

Wir nahmen bisher in unserer Ableitung an, daß der Ausdruck

$$K = \frac{a^2}{\varrho^2 \sqrt[3]{\pi \left(\frac{3 \cdot I \cdot (1-k)^2}{4 \cdot s \cdot C}\right) \cdot \frac{(2 \cdot c \cdot r_w + h)}{(2 \cdot r_w + h)}}}$$

eine Konstante bildet. Um Irrtümern vorzubeugen und um die Fehlermöglichkeit klarzulegen, werden daher im folgenden die Teilfaktoren der Konstanten überprüft.

Aus 25 Lebergewichten der Gewichtsklassen zwischen 180 mg und 1400 mg hatten wir wie bereits erwähnt zusammen mit den empirischen Werten von X den Mittelwert der Konstante $K = 12230$, $\sigma \pm 390$ ($\pm 3,2\%$) und der 3σ -Grenze von $9,6\%$ berechnet, der mittlere Fehler des Mittelwertes beträgt dabei ± 78 ($\pm 0,6\%$). Nachdem wir für X auf Grund dieses Mittelwertes an 120 Tieren eine mittlere Abweichung vom Mittelwert mit $3,08\%$ und einer 3σ -Grenze von $\pm 9,24\%$ und damit eine fast völlige Übereinstimmung mit der aus 25 Tieren errechneten Konstanten entnehmen durften, kann der mittlere Fehler des Mittelwertes von K kleiner angenommen werden und beträgt bei 120 Tieren ± 35 ($0,28\%$). Wir müssen daher fordern, daß eventuelle Schwankungen der Teilfaktoren kein Überschreiten der Fehlerbreite verursachen, es muß aber berücksichtigt werden, daß bei den folgenden Bestimmungen eine gewisse Fehlerbreite der jeweiligen Methodik mit eingerechnet werden muß.

1. Spezifisches Gewicht.

Mit der eingangs erwähnten Methode wurde grundsätzlich bei jeder Leber außer dem Gewicht das Volumen am frischen Organ bestimmt.

Der Mittelwert $s = G/V$ ergab bei 120 Messungen $1,09, \sigma \pm 0,02 (\pm 1,8\%)$ und einen mittleren Fehler des Mittelwertes von $0,0017 (\pm 0,16\%)$. Wir sehen hier also eine ganz geringe Schwankungsbreite des spezifischen Gewichtes, die zum Teil auf den wechselnden Gehalt an Fett, Eiweiß und Glykogen, zum Teil auch auf die Fehlerbreite der Methodik zurückzuführen ist. Vergleiche des spezifischen Gewichtes mit der Plasmadichte der Leberzellen und Auftreten von Proliferationsherden ergaben keine Abhängigkeit vom morphologischen Zustande der Leber. Das spezifische

Gewicht ist daher für unsere Berechnungen als konstant anzusehen.

Tabelle 4. *Schrumpfung der Leber vom frischen Organ bis zum Paraffinblock.*

Frishvolumen	100 $\sigma \pm 4,2$	$m = 0,6$
Lebervolumen nach Susa- fixierung	91 $\sigma \pm 2,3$	$m = 0,3$
Lebervolumen nach 100% Alkohol	87 $\sigma \pm 1,4$	$m = 0,2$
Lebervolumen nach Chloroform	82 $\sigma \pm 2,3$	$m = 0,3$
Lebervolumen nach Paraffin	66 $\sigma \pm 2,6$	$m = 0,4$

2. Die Organschrumpfung bei der Einbettung.

In der Literatur konnten wir für die Schrumpfung bei Susa-fixierung und unsere Einbettungsmethode

über Chloroform keine irgendwie verwertbaren Angaben finden, so daß wir gezwungen waren, diese Bestimmung gesondert durchzuführen.

Zum Teil wurden die bisherigen Schrumpfungsbestimmungen durch Längenmessungen in den verschiedenen Flüssigkeiten der Einbettungsreihe durchgeführt (PATTEN und PHILPOT), zum Teil durch direkte Zellmessung am Salamanderknorpel (G. HERTWIG). Beide Methoden schienen für unsere Zwecke nicht anwendbar, Längenbestimmungen stoßen bei der Leber auf Schwierigkeiten und Messungen am Salamanderknorpel, die zwar den Vorteil der getrennten Kern- und Plasmatschrumpfungsbestimmung haben, erschien uns wegen der Fremdartigkeit des Gewebes ungünstig. Wir schalteten daher in unseren Untersuchungsgang 50 Leberschrumpfungsbestimmungen derart ein, daß dieselben Lebern auch nachher wie üblich zur Auszählung kamen. Mittels des Volumeters ließ sich die Schrumpfung, wie unsere Messungen ergaben, verhältnismäßig einfach und exakt bestimmen. Als Flüssigkeit wurde zum Teil die betreffende Flüssigkeit der Einbettungsreihe benützt: Frisches Organ — physiologische Kochsalzlösung, fixiertes Organ — 96% Alkohol — 100%iger Alkohol — Chloroform und nach weichem und hartem Paraffin wurde kurz vor dem Ausgießen durch Einlegen in Xylol die oberste Paraffinschicht entfernt und das Volumen in Xylol gemessen. Daß die Organe jeweils oberflächentrocken zur Messung kamen — mit Ausnahme des frischen Organs — sei nochmals erwähnt.

Die Ergebnisse der Messung sind aus jeweils 48 Messungen ermittelt worden.

Nahmen wir das frische Organvolumen mit 100 an, so verläuft die Schrumpfung in den verschiedenen Flüssigkeiten der Einbettungsreihe zunächst sehr gleichmäßig, der mittlere Fehler der Mittelwerte, sowie die Streuung ist gering (Abb. 10).

Die Schrumpfung bis zum Paraffinblock beträgt 34%, wobei die Schrumpfung im Paraffin am stärksten ist (50% der Gesamtschrumpfung).

Bei den Frischvolumenbestimmungen erscheint die Schwankungsbreite und damit der mittlere Fehler relativ am höchsten, für Alkohol am geringsten. Man könnte dem verschiedenen Protoplasmazustand der Leberzellen bei der Fixierung diese größere Schwankungsbreite zuschreiben, da nach der Fixierung der Schrumpfungsprozess mit einer geringen Streuungsbreite und gleichmäßiger erfolgt. Zum Teil ist aber auch bei der Frischvolumenbestimmung mit einer größeren Fehlerbreite der Methode zu rechnen. Vergleicht man den Schrumpfungsgrad mit dem Protoplasma der Leberzellen am Schnitt, so gewinnt man den Eindruck, daß Leberzellen mit wabigem Protoplasma von pflanzenzellähnlichem Charakter etwas

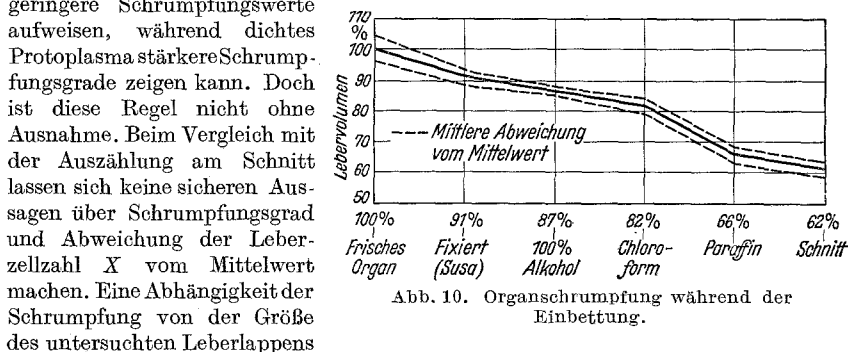


Abb. 10. Organschrumpfung während der Einbettung.

geringere Schrumpfungswerte aufweisen, während dichtes Protoplasma stärkere Schrumpfungsgrade zeigen kann. Doch ist diese Regel nicht ohne Ausnahme. Beim Vergleich mit der Auszählung am Schnitt lassen sich keine sicheren Aussagen über Schrumpfungsgrad und Abweichung der Leberzellzahl X vom Mittelwert machen. Eine Abhängigkeit der Schrumpfung von der Größe des untersuchten Leberlappens war nicht festzustellen. In unseren Schrumpfungsbestimmungen ist nur die Gesamtschrumpfung enthalten. Wie sich das Verhältnis von Kernvolumen und Plasmavolumen während der Schrumpfung verhält, können wir mit unserer Methode nicht erfassen. Nach unseren Untersuchungen möchten wir aber annehmen, daß auch dieses Verhältnis höchstens geringfügige Differenzen aufweist, die für die Fehlerbreite unserer Berechnungen ohne Belang sind.

In einer gesonderten Untersuchung wurde die Einwirkung bis zum eingedeckten Schnitt verfolgt. Am angeschnittenen Paraffinblock wurden in Längs- und Querrichtung 4 Markierungspunkte mit einer feinen Nadel senkrecht in das Lebergewebe eingestochen, deren Abstände genau am Block gemessen wurden. Die Messungen wurden nach dem Schnitt sowie nach der Streckung des Schnittes in Wasser verschiedener Temperatur und nach Färbung am eingedeckten Präparat wiederholt und an zahlreichen Schnitten durchgeführt. Die Ergebnisse waren sehr gleichmäßig und zeigten eindeutig, daß parallel zur Messerkante keine Änderung beim Schnitt auftritt und auch bei Streckung im Wasser bei Temperaturen zwischen 35 und 50° (Schmelzpunkt des Paraffins 48°) keine Ausdehnung erfolgt. Dagegen besteht in der Schnittrichtung ein deutlicher Stauchungseffekt der zu einer Verkürzung von 1 auf 0,92 führt. Bei der Streckung in Wasser wird diese Stauchung innerhalb des genannten Temperaturbereiches nur zu einem kleinen Teil ausgeglichen, so daß das endgültige Verhältnis bis zum eingedeckten Schnitt 1 zu 0,94 beträgt. Diese Verkürzung wird vermutlich mehr das Plasma und den Capillarspalt betreffen als die Kerne.

Unter Einberechnung dieser Bestimmungen betragen daher die für den Schnitt gültigen Schrumpfungsmaße (Tabelle 5).

Die Schrumpfungsbestimmungen zeigen bei 48 Untersuchungen eine Streuung von $\pm 4,2\%$. Diese gibt für K Werte innerhalb der Streubreite

Tabelle 5.

Schrumpfung	Frische Leber	Leber in Paraffin	Leber im Schnitt
Volumenschrumpfung . .	100 mm ³ (μ^3)	66 mm ³ (μ^3)	62 mm ³ $\sigma \pm 4,2\%$
Flächenschrumpfung . .	100 mm ² (μ^2)	75 mm ² (μ^2)	71 mm ² $\sigma \pm 2,6\%$
Lineare Schrumpfung . .	100 mm (μ)	87 mm (μ)	$\begin{pmatrix} 87 \text{ mm } (\mu) \\ 81 \text{ mm } (\mu) \end{pmatrix}$ $M \sim 85 \text{ mm } \sigma \pm 1,6\%$

der Methode und läßt eine eindeutige systematische Abweichung vermissen. Wir können daher die Schrumpfung *I* mit einem Mittelwert von 0,62 und einer mittleren Abweichung von $\pm 4,2\%$ bei einem mittleren Fehler des Mittelwertes von $\pm 0,004$ als konstant ansehen.

3. Der Gefäßfaktor.

Zur Ermittlung des Verhältnisses des Volumens größerer Gefäße zum Gesamtlebervolumen benutzten wir das Wägeverfahren. Da wir bei unseren bisherigen Messungen nur Capillarraum und kleinere Zentralvenen mit erfassen, sollten in dieser Bestimmung Gefäß- und Bindegewebsraum aller Gefäße größerer Ordnung mit dem zugehörigen Bindegewebe gemessen werden. Da diese aber im Leberlappen nicht gleichmäßig verteilt sind, sondern im Zentrum die größeren Gefäße liegen, wurde ein Leberlappen einer Leber von 1000 mg Gewicht in Serien geschnitten (10μ) und jeder 5. Schnitt untersucht, um so eine proportionale Verteilung zu erhalten. Es wurden sämtliche 72 Schnitte bei gleicher Vergrößerung auf Papier gleicher Dicke projiziert und Schnittumriß sowie die Umrisse aller größeren Gefäße des Bindegewebes eingezeichnet. Mittels des Wägeverfahrens wurden dann die ausgeschnittenen Leberumrisse als Gesamtvolumen gewichtsmäßig erfaßt und nach Ausschneiden aller Gefäßbindegewebsräume der Gewichtsverlust und damit der prozentuale Anteil des Gefäßbindegewebsvolumens bestimmt.

Es beträgt $\frac{\text{Gefäßvolumen}}{\text{Lebervolumen}} = \frac{V_g}{V} = \frac{11,86 \text{ g}}{206,73 \text{ g}} = 0,057$. Der Gefäßraum, den die größeren Gefäße in der Leber einnehmen, beträgt daher 5,7% des Gesamtlebervolumens. Es ist daher:

$$V_p = V \cdot (1 - k) = 0,94 \cdot V.$$

Aus naheliegenden technischen Gründen konnte diese sehr mühsame Untersuchung nicht auf eine größere Anzahl von Tieren ausgedehnt werden. Wir haben mit dieser einen sorgfältig durchgeführten Bestimmung keine Konstanz des Faktors *K* bewiesen. Doch werden bei der Größenordnung von 5,7% des Gesamtvolumens der Leber, auch wenn wir gewisse Schwankungen während des Wachstums annehmen wollten, diese sich nur sehr gering auswirken und keine systematische Abweichung bedingen. Bei dem geringen Prozentsatz würden solche

Abweichungen noch völlig innerhalb der Streubreite von K liegen. Wir halten daher die Bestimmung der Größenordnung des Verhältnisses von Gefäßraum zu Gesamtvolumen für unsere Untersuchungen für ausreichend.

4. Die Kern-Plasmarelation an der Leberzelle.

Nachdem wir in unseren bisherigen Überprüfungen der Teilfaktoren der Konstantengleichung keine systematische Abweichung, die die Fehlerbreite für die Konstante K überschreiten würde, feststellen konnten, kommt der Kern-Plasmarelation für die Bestimmung der Konstantenfaktoren ϱ und $\frac{2 \cdot c \cdot r_w + h}{2 \cdot r_w + h}$ grundlegende Bedeutung zu.

Wir haben die Kern-Plasmarelation mit besonderer Methodik unter gleichzeitiger Verwendung der Kernvariationskurve untersucht. Die Ergebnisse seien hier soweit sie für die mathematischen Betrachtungen erforderlich sind, vorweggenommen. Das Ergebnis dieser sehr mühsamen Untersuchungen an rund 40 Lebern

verschiedener Gewichtsklassen war für uns zu Beginn selbst überraschend und führte eigentlich erst auf die dargelegten Vorstellungen vom Wachstum der Leber.

a) *Der mittlere Kernhalbmesser der Leberzelle während des Wachstums.* Als wichtigstes Ergebnis fanden wir, daß die Kernfläche in einer Flächeneinheit innerhalb aller Gewichtsklassen bei einer Streuung von $\sigma \pm 8,6\%$ konstant bleibt. Auf das Meßquadrat $a^2 = 71820 \mu^2$ umgerechnet beträgt diese Kernfläche im Mittel $8274 \mu^2$ ($\sigma \pm 8,6\%$, $m \pm 1,1\%$). Da innerhalb der Gewichtsklasse von 300 mg bis 1400 mg keine systematische Abweichung auftritt, ist es daher möglich, aus diesem Mittelwert und der mittleren Leberzellzahl X in a^2 — errechnet aus dem Mittelwert der Konstanten K und dem Lebergewicht — den mittleren Kernhalbmesser für die verschiedenen Gewichtsklassen zu errechnen.

Es gilt:

$$r_m = \sqrt[2]{\frac{8274}{X \cdot \pi}} \quad (20)$$

da $r_m^2 \pi \cdot X$ = der Gesamtkernfläche in a^2 ist.

Tabelle 6.

Lebergewicht G (mg)	$X = \frac{12230}{\sqrt[3]{G^3}}$	Mittlerer Kernhalbmesser r_m (μ)
200	357	2,71
300	273	3,10
400	225	3,42
500	197	3,65
600	172	3,92
700	155	4,12
800	142	4,30
900	131	4,48
1000	122	4,64
1100	115	4,78
1200	108	4,93
1300	103	5,05
1400	98	5,18
1500	93	5,32

An den Grenzwerten von 200 und 1400 mg Lebergewicht ergibt sich durch das Verhalten von Z/X und ϱ bei gleicher Schnittdicke eine gewisse Verschiebung im Sinne einer Nivellierung, die wir aber hier vernachlässigen dürfen.

b) *Die Kern-Plasmarelation.* Wie wir bereits ausführten, ist das Verhältnis der Leberzellzahl Z in a^2 zu den mit Kern geschnittenen Leberzellen X in a^2 einer gewissen systematischen Abweichung unterworfen, die bei konstanter Schnittdicke durch die Änderung des mittleren Kernhalbmessers gegeben ist. Nachdem wir nun die Größenordnung kennen, in der sich der mittlere Kernhalbmesser während des Wachstums ändert, ist es möglich, sowohl Z/X wie auch die Kern-Plasmarelation c und den Faktor ϱ auf Grund der errechneten Mittelwerte zu bestimmen. Bei konstanter Kernfläche in der Flächeneinheit ist das Verhältnis

$$Q = \frac{a^2}{\text{Gesamtkernfläche in } a^2} = \frac{71\,820\,\mu^2}{8274\,\mu^2} = 8,68, \quad (21)$$

$$\sigma \pm 0,74\,m = \pm 0,1.$$

Die Beziehung des Quotienten Q zur Kern-Plasmarelation ist wie folgt gegeben:

$$Q = \frac{\text{Flächeneinheit } a^2}{\text{Gesamtkernfläche in } a^2} = \frac{Z \cdot R_m^2 \pi}{X \cdot r_m^2 \pi} \quad (22)$$

$$Q = \frac{Z}{X} \cdot \left(\frac{R_m}{r_m}\right)^2. \quad (22')$$

Da aber

$$\frac{R_m}{r_m} = \frac{\varrho \cdot R_w}{\varrho' \cdot r_w}$$

und

$$\frac{R_w}{r_w} = c \text{ ist, folgt}$$

$$Q = \frac{Z}{X} \cdot c^2 \cdot \left(\frac{\varrho}{\varrho'}\right)^2 \quad (23)$$

ϱ/ϱ' ist für unsere Gewichtsklassen konstant und beträgt 0,95.

$$\left(\frac{\varrho}{\varrho'}\right)^2 = 0,90.$$

Nach (18) ist $\frac{Z}{X} = \frac{(2 \cdot c \cdot r_w + h)}{2 r_w + h}$ eingesetzt in (23) ergibt

$$Q = \frac{(2 \cdot c \cdot r_w + h)}{(2 \cdot r_w + h)} \cdot c^2 \cdot 0,90. \quad (24)$$

Da nach unseren bisherigen Ergebnissen der Geltungsbereich unserer Voraussetzungen die Gewichtsklassen zwischen 200 und 1500 mg Lebergewicht umfaßt, bei der Konstanten Q infolge der großen Streubreite von $\pm 8,6\%$ eine systematische Abweichung innerhalb der Gewichtsklassen nicht erkennbar wird, so müssen wir die Kern-Plasmarelation c

für eine mittlere Gewichtsklasse bestimmen, da wir auch hier für Z/X einen Mittelwert erwarten dürfen.

Ein Einsetzen der verschiedenen Kernhalbmesser würde nur eine scheinbare Änderung der Kern-Plasmarelation ergeben, in Wirklichkeit handelt es sich dabei um die Grenzwerte der Fehlerbreite von c .

Für $r_w = 4,8 \mu$ ergibt sich aus der beiliegenden Kurve (Abb. 11) $c = 2,34 \sigma \pm 0,07$ (2,9%) und $m = 0,01$ ($\pm 0,4\%$). Dabei ist in R_w noch der Capillarraum mit einbegriffen. Nach Untersuchungen von STOWELL umfaßt das gesamte Gefäßbindegewebe einschließlich großer Gefäße, Capillarlumen und Bindegewebe bei der Rattenleber im Mittel etwa 28% des Gesamtlebervolumens. Übertragen wir diese Größen zur Veranschaulichung des Capillarspalt auf die Maus und ziehen 5% des Volumens der größeren Gefäße ab, so bleiben für den Capillarraum noch 23%. Da bei

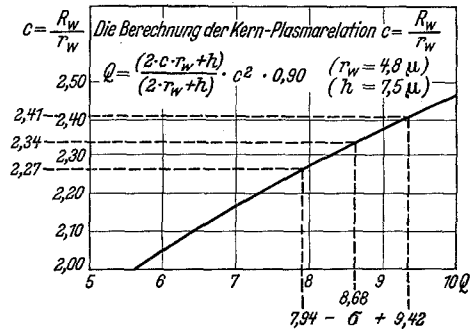


Abb. 11.

unserem mittleren Zellvolumen V'_z der Capillarraum mit einberechnet ist, würde sich für den eigentlichen Zellhalbmesser R ohne Capillarspalt folgender Wert ergeben:

$$\begin{aligned} \frac{\frac{4}{3} \pi R_w^3}{\frac{4}{3} \pi R^3} &= \frac{100}{100-23} = \frac{100}{77} \\ \frac{R_w}{R} &= \sqrt[3]{\frac{100}{77}} = 1,09 \\ R &= \frac{R_w}{1,09} = \frac{2,34}{1,09} = 2,15. \end{aligned}$$

Es verhält sich also $r_w : R : R_w = 1 : 2,15 : 2,34$. Das tatsächliche Verhältnis $\frac{\text{Zellvolumen}}{\text{Kernvolumen}}$ beträgt damit $\frac{9,9}{1} \approx \frac{10}{1}$ und damit das Verhältnis $\frac{\text{Kern}}{\text{Plasma}} \approx \frac{1}{9}$.

Dieses Verhältnis gibt natürlich nur Annäherungswerte, ist aber in der Größenordnung durchaus anschaulich und zeigt wie schmal der Capillarspalt trotz des verhältnismäßig großen räumlichen Anteils des Capillarraumes ist, wobei natürlich noch zu bedenken ist, daß in Wirklichkeit nicht jede einzelne Leberzelle ganz von einem Capillarmantel umgeben ist. Es wird daraus auch verständlich, daß gewisse Schwankungen in der Capillarweite sich nur unwesentlich auf die Fehlerbreite unserer Messung auswirken. Weiter geht daraus hervor, daß der Capillarspalt mit zunehmendem Zellvolumen wächst, dafür aber weiter

Tabelle 7.

r_w μ	$R_w = r_w \cdot c$	$\varrho = \frac{\pi \cdot R_w + 2h}{4 \cdot R_w + 2h}$	$(\varrho)^2$	$\frac{Z}{X} = \frac{2 \cdot R_w + h}{2 \cdot r_w + h}$	$\varrho^2 \cdot \frac{Z}{X}$
3	7,02	0,859	0,737	1,59	1,17
4	9,36	0,846	0,715	1,68	1,20
4,8	11,23	0,838	0,702	1,74	1,21
5	11,70	0,836	0,698	1,76	1,22
6	14,04	0,832	0,692	1,82	1,25

auseinandergedrängt wird, so daß im Flächenquadrat trotzdem eine konstante Capillarfläche vorhanden ist, die sich nur aus feinen einem Maschenwerk in ein gröberes Netzwerk bei großen Lebern umwandelt. Da das Volumen der Capillarendothelien nicht wesentlich zunimmt, und ihre Zahl in der Flächeneinheit konstant bleibt, ist einer bestimmten Leberzellmasse (nicht einer einzelnen Leberzelle) normalerweise eine bestimmte Zahl Endothelien als Ausdruck des Capillarraumes zunächst zugeordnet. Dieses Verhältnis kann sich unter bestimmten Stoffwechselbelastungen ändern, doch ändert sich hierbei offenbar die Capillarweite zunächst nicht, die Endothelzellen liegen eben dann nur dichter aneinandergedrängt.

c) *Das Verhalten der Faktoren Z/X und ϱ während des Wachstums.* Wir sind mit diesen Berechnungen nun in der Lage, das Verhalten der Faktoren Z/X und ϱ innerhalb der verschiedenen Gewichtsklassen zu prüfen.

$$\frac{Z}{X} = \frac{(2 \cdot c \cdot r_w + h)}{(2 \cdot r_w + h)}$$

$\varrho = \frac{R_m}{R_w}$ errechnet sich nach der Ableitung, für die wir Herrn Dipl.-Math. REICHARDT¹ zu Dank verpflichtet sind, wie folgt

$$\varrho = \frac{\pi \cdot R_w + 2h}{4R_w + 2h}.$$

Wir können daraus ersehen, daß $\varrho^2 \cdot \frac{Z}{X}$ in der Konstanten K innerhalb der äußeren Grenzen unserer Gewichtsklassen eine systematische Abweichung erkennen läßt, die bei einem Mittelwert von 1,21 eine Abweichung von

$$\alpha = \begin{array}{l} + 0,04 \text{ für } r_w = 6 \mu \\ - 0,04 \text{ für } r_w = 3 \mu \end{array}$$

zeigt. ϱ und Z/X verschieben sich dabei also gegensinnig. Die Abweichung beträgt an den Grenzen $\pm 3,2\%$, die Konstante K verschiebt sich dabei an den Grenzen nicht über die einfache mittlere Abweichung, so daß

¹ Wir möchten an dieser Stelle Herrn Dipl.-Math. REICHARDT, Tübingen, für freundliche Ratschläge und Überprüfung der mathematischen Ableitungen herzlich danken.

wir diese geringe Abweichung für unsere Berechnungen vernachlässigen dürfen, die allein durch die konstante Schnittdicke verursacht wird. Lassen wir sie unendlich klein werden, so entfällt diese geringe Verschiebung. Nur bei der Bewertung der Grenzen unserer Gewichtsklassen müssen wir diese Verschiebung in Betracht ziehen, so daß wir bei Lebern mit 200 mg und über 1400 mg nach unseren Ergebnissen eine gewisse Zellvermehrung nicht ausschließen können.

d) Der Schnittdicke h kommt eine geringe Bedeutung zu, da wir auch bei einer angenommenen Fehlerbreite von etwa $\pm 0,5 \mu$ ($\pm 6\%$) eine Abweichung der Konstanten von höchstens $\pm 1\%$ haben.

5. Zusammenfassung.

Fassen wir das bisherige zusammen, so ergeben sich für die verschiedenen Teilfaktoren der Konstanten K folgende Werte:

$$K = X \cdot \sqrt[3]{G^2} = 12230 \sigma \pm 3,08\% \quad 3 \sigma \pm 9,24\%$$

$$m = \pm 35 (0,28\%)$$

$$a^2 = 71820 \mu^2$$

$$h = 7,5 \mu$$

$$I = 0,62, \sigma \pm 0,028 (4,2\%), \quad m = \pm 0,004$$

$$s = 1,09, \sigma \pm 0,02 (\pm 1,8\%), \quad m = \pm 0,0017$$

$$k = 0,057$$

$$\frac{Z}{X} \cdot \varrho^2 = 1,21 \alpha \pm 0,04 (\pm 3,2\%)$$

$$c = \frac{R_w}{r_w} = 2,34 \pm 0,07 (2,9\%)$$

$$Q = \frac{a^2}{\text{Gesamtkernfläche in } a^2} = 8,68 \sigma \pm 0,74 \quad m = \pm 0,1.$$

Der Wert der noch unbekannten Gesamtleberzellzahl C errechnet sich bei den angegebenen Werten mit $C = 0,066 \frac{\text{mm}^3}{\mu^3} = 66000000$ Leberzellen. Bei dem Verhalten der übrigen Teilfaktoren der Konstanten muß auch dieser Wert innerhalb der Fehlerbreite eine Konstante darstellen.

Wir sehen, daß für alle Teilfaktoren der Konstanten die Fehlerbreite der 3- σ -Grenze für X nicht erreicht wird, wobei zu bedenken ist, daß die Streuung der Teilfaktoren zu einem Teil durch die Fehlerbreite der Methode bedingt ist. Die einzige systematische Abweichung, die die Konstante erfährt, ist durch das Verhältnis $\frac{Z}{X} \cdot \varrho^2$ gegeben. Dieses ist aber für Gewichtsklassen zwischen 300 und 1400 mg ohne Bedeutung. Dagegen können wir bei den Grenzwerten von 200 mg Lebergewicht eine gewisse Zellvermehrung im Leberwachstum noch nicht ganz ausschließen, ebenso sehen wir bei Tieren über 1400 mg Lebergewicht — Gewichte, die wir nur unter besonderer Stoffwechselbelastung auftreten sehen — wieder eine leichte Zellvermehrung einsetzen, die aber

noch nicht durch die Fehlerbreite der Methode manifest wird. In Analogie zu LINZBACH möchten wir daher annehmen, daß die normale Leber der Maus bei 1400 mg Gewicht ihr kritisches Gewicht und die Grenze der reinen Hypertrophie erreicht.

Nach Überprüfen der wichtigsten Teilfaktoren unserer Formeln und der Tatsache, daß unsere empirisch gefundenen Werte innerhalb der genannten Gewichtsklassen zwischen 200 und 1400 mg Lebergewicht mit der abgeleiteten Kurve übereinstimmen, dürfen wir damit auch die Voraussetzung unserer Formel über das Wachstum der Leber als statistisch gesichert und bewiesen ansehen.

Einzuwenden wäre, daß die Konstante des Gefäßfaktors nur an einem Tier bestimmt wurde und daß der Capillarraum noch nicht gesondert methodisch miterfaßt worden ist. Nachdem das Volumen der großen Gefäße aber nur einen sehr geringen Prozentsatz des Gesamtvolumens ausmacht, sind eventuelle Schwankungen während des Lebens noch innerhalb der Fehlerbreite der Methode. Die Bestimmung des Capillarraumes war uns bisher methodisch noch nicht möglich, da uns ein Integrationsstrich nicht zur Verfügung stand. Wir glauben aber, daß wir aus dem Verhalten der Zahl der Endothelkerne bei Normaltieren während des Wachstums der Leber die dargelegten Schlüsse ziehen dürfen, zumal sie indirekt wieder durch das Verhalten von X und Q bewiesen werden, da der Capillarraum in Gleichung und Messung mit enthalten ist. Feinere Schwankungen der Kern-Plasmarelation an einzelnen Zellen können mit dieser Methode nicht erfaßt werden.

Unsere Ergebnisse und die Gleichung entsprechen zu einem Teil den Tatsachen, die LINZBACH an ähnlichen Untersuchungen über die Herzmuskelfaser gefunden hat. LINZBACH hat für das Herz als erster die Zellzahlkonstanz nachgewiesen. Seine mathematische Formulierung ist etwas anders abgeleitet. Die Ähnlichkeit der Befunde, sowie die Tatsache, daß die mathematischen Voraussetzungen der Ergebnisse LINZBACHS von SCHLOMKA nicht unwidersprochen blieben, machen es notwendig, kurz dazu Stellung zu nehmen.

Wenn wir unsere Gedankengänge auf die LINZBACHSchen Ergebnisse anwenden, dann bedeutet die Tatsache, daß die Zahl der Herzmuskelfasern und der Herzmuskelkerne in einem Meßquadrat konstanter Fläche gesetzmäßig mit dem Herzgewicht abnehmen, daß bei gleichbleibender Zahl der Herzmuskelfasersegmente die Volumenzunahme des Gesamtherzens auf der Vergrößerung des einzelnen Herzmuskelfasersegmentes beruht und dabei das Verhältnis von Länge und Breite in den Einzelsegmenten konstant bleibt, was LINZBACH auch aus seinen Überlegungen geschlossen hat. Die Zahl der im Meßquadrat geschnittenen Faserscheiben steht in direktem Verhältnis zum mittleren Volumen der Fasersegmente. LINZBACH hat für diese zunächst einen willkürlichen Wert angenommen. Nach unseren Überlegungen entsprechen die einzelnen Segmente der einzelnen Herzmuskelzelle im Syncytium

mit zugehörigem Plasma und Kern. Für diese Einheit besteht ein gleichbleibendes Verhältnis von Länge zur Breite. Damit erklärt sich dann von selbst, daß die Kernzahl in der Flächeneinheit der gleichen Kurve folgt, die Differenz beider Kurven ist ein direkter Ausdruck nicht nur des Verhältnisses von Länge zu Breite, sondern auch der Konstanz der Kern-Plasmarelation, die LINZBACH damit auch für das Herz eindeutig nachgewiesen hat.

Der Herzmuskel wächst also wie die Leber der weißen Maus durch Volumenzunahme der einzelnen Parenchymzellen bei Konstanz der Kern-Plasmarelation und der Zellzahl. Die Zahl der geschnittenen Herzmuskelfasern und Kerne je Flächeneinheit drückt das *mittlere Zellvolumen* des Herzmuskels für das jeweilige Gewicht aus. Damit entfällt von selbst ein Einwand von SCHLOMKA, der in seinen Berechnungen eine gleiche Länge der Herzmuskelfasern angenommen hatte. Dies ist aber weder von LINZBACH behauptet, noch in der Formel enthalten. Vergleiche des mittleren Zellvolumens mit dem Organvolumen setzen aber voraus, daß die vorgenommene Messung ein Spiegelbild des ganzen Herzens gibt, d. h. diese muß im ganzen Herzen gleich sein oder wenn sie wie LINZBACH es tut, nur an einem bestimmten Teil des Herzens (linker Papillarmuskel) jeweils vorgenommen wurde, muß diese Zahl immer im gleichen Verhältnis zu den übrigen Herzmuskelteilen stehen. Dies ist der Ähnlichkeitssatz, von dem LINZBACH spricht. Diese Frage ist aber entscheidend wichtig zur Beurteilung des hyperplastischen Herzens, denn eine Hyperplasie kann dadurch vorgetäuscht werden, daß das normalerweise konstante Verhältnis des mittleren Zellvolumens zwischen linkem und rechtem Ventrikel sich verschiebt und die nicht dem linken Herzmuskelfaservolumen entsprechende Gewichtsvergrößerung des Herzens durch eine entsprechende Gewichtsvergrößerung des rechten Herzens bedingt ist. Wir müssen daher fordern, daß für normale Herzen das Verhältnis der Messungen am rechten und linken Papillarmuskel in allen Gewichtsklassen konstant ist, eine Hyperplasie wäre mathematisch dann einwandfrei bewiesen, wenn die Faserzahl bei gleichbleibendem Verhältnis von rechtem zu linkem Ventrikel für das Organgewicht zu hoch wäre.

Die Zahl der *Endothelzellen* in der Flächeneinheit verhält sich am Herzmuskel während des Wachstums anders als in unseren Untersuchungen an der Leber. Da das Volumen der einzelnen Endothelzellen auch am Herzmuskel sich nicht wesentlich vergrößert, muß angenommen werden, daß es für größere Herzgewichte zu einem Mißverhältnis zwischen Herzmuskelfasern und zugehörigem Capillarovolumen kommt, wie LINZBACH mit Recht schließt. Im Unterschied zu unseren Untersuchungen an der Leber bleibt also während des Wachstums des Herzens das Verhältnis von Capillarovolumen zu Parenchymvolumen

nicht konstant. Da aber das Parenchymvolumen gegenüber dem Capillarovolumen einen wesentlich größeren Raum einnimmt, kann dies in der Verschiebung der Konstanten nicht viel ausmachen. Da die *Konstante* nach der LINZBACHSchen Formulierung ein *konstantes Verhältnis* von *Capillarovolumen* zu *Parenchymvolumen* voraussetzt, das Capillarovolumen aber tatsächlich mit zunehmendem Herzgewicht relativ kleiner wird, muß die Konstante mit der Vergrößerung des Herzgewichtes etwas zunehmen. Wir möchten annehmen, daß dies die Ursache der von SCHLOMKA gefundenen geringgradigen Vergrößerung der Konstanten ist. Dies würde die Genauigkeit der LINZBACHSchen Untersuchungen nur bestätigen.

IV. Die Kern-Plasmarelation und die Verschiebung der Kerngrößenvariation während des Wachstums der Leber.

A. Einleitung und Literatur.

Auf Grund einer theoretischen Untersuchung über die Beziehungen zwischen seiner Protomerentheorie und der von HERTWIG aufgestellten Kern-Plasmaregel stellte HEIDENHAIN 1912 die bekannte Wachstumsformel

$$\frac{MK}{MP} = \frac{2 MK}{2 MP} = \frac{4 MK}{4 MP} = \frac{8 MK}{8 MP} \quad \begin{array}{l} \text{(Masse Kern)} \\ \text{(Masse Plasma)} \end{array}$$

usw. auf.

JACOB — von ganz anderer Fragestellung ausgehend — entdeckte 1925 durch Einführung einer subtilen Meßtechnik und durch seine variationsstatistische Methode das Gesetz vom Wachstum der Zellkerne in der geometrischen Reihe 1:2:4:8 usw. und erbrachte damit, von anderer Seite kommend, den induktiven Beweis für die HEIDENHAINsche Protomerentheorie.

In seinen ersten Untersuchungen an den Leberzellkernen der weißen Maus bekam JACOB eine viergipfelige Variationskurve mit den Gipfelvolumina V1, V2, V4, V8, wobei V2 mit seiner Kerngröße K2 den höchsten Gipfel der Kurve erreichte und deshalb als Regelzelle bezeichnet wurde.

Gleich in seinen allerersten Arbeiten hat sich JACOB über die Bedeutung von Kern- bzw. Zellgröße und Funktion Gedanken gemacht. — Allein schon die Verteilung der Größenklassen innerhalb der kleinsten Lebereinheit, des Hepatons ergab hierfür wichtige Hinweise.

So stellte er fest, daß die kleinste Zellform V1 fast immer nur im Zentrum und der Peripherie des Leberläppchens — große Formen V4 und V8 hauptsächlich in der intermediären Zone zu finden waren, während er die häufigste Zellform V2 als „Regelzelle“ diffus über das ganze Läppchen verteilt fand. Diese charakteristische Lokalisation war nur bei Lebern festzustellen, welche Läppchen mit radiärer Struktur der Zellbalken und Gefäße besitzen. Bei Lebern ohne diese Struktur (Amphibien, Echidna, Säugetierembryonen) fand er nur eine einzige Zellklasse.

Mit der radiären Anordnung der Blutgefäße aber sind auch die Bedingungen für *verschiedene Stoffwechselverhältnisse* gegeben und JACOB hat gleich im Anschluß an seine ersten Untersuchungen auf die Bedeutung dieser Dinge hingewiesen. Später konnte auch sein Schüler BIRKENMAYER belegen, daß sich unmittelbar um Gefäße herum stets große Zellklassen mit großen Kernen finden und in den zahlreichen Arbeiten, die sich in der Folgezeit zur Aufgabe gemacht hatten, Funktion und Kerngrößenvariation zueinander in Beziehung zu setzen,

konnte von den verschiedensten Untersuchern der Nachweis erbracht werden daß sich das Bild der Kerngrößenvariation insofern ändern kann, als eine Zunahme der Funktion in entsprechender Weise mit der Bildung höherer Kernklassen verbunden ist.

In JACOBJS umfassender Arbeit „Über die verschiedenen Arten des gesetzmäßigen Zellwachstums und ihre Beziehungen zur Zellfunktion ... (1942)“ ist eine weitgehende Übersicht über alle Forschungsergebnisse in dieser Richtung gegeben und wir halten uns daher für berechtigt, nur soweit auf diese Literatur einzugehen, als sie zur Beleuchtung unserer Fragestellung notwendig erscheint.

Wichtig ist die Tatsache, daß Kern- und damit Zellgröße eines jeden funktionsbeanspruchten Organs zunehmen.

HINTZSCHE und TANNER untersuchten in verschiedenen Zeitabständen nach Futteraufnahme die Größe der Darmepithelzellen. Sie stellten dabei fest, daß sich der Anteil der kleinen Zellkerne mit zunehmender Tätigkeitsdauer vermindert, während sich der Anteil der größeren Kernklassen beträchtlich vermehrt. Interessant ist dabei noch, daß im Colon — entsprechend dem späteren Eintreten der Inanspruchnahme des Epithels — eine Kernvergrößerung erst später eintritt.

Auf der anderen Seite führt eine geringe Inanspruchnahme der Zellen zur Abnahme der größeren — und einer entsprechenden Zunahme der kleineren Zellkerne.

Da uns im Speziellen die Leber interessiert, erscheint uns besonders auch die Arbeit von CASPERSSON und HOLMGREN von Bedeutung, welche nachweisen konnten, daß die Variation der Leberkerngröße während der verschiedenen Phasen der Leberarbeit schon wechselt. Sie kombinierten die chemische Leberglykogenbestimmung mit der variationsstatistischen Zellkernmessung und stellten fest, daß die Variation der Leberkerngröße der Variation des von ihnen gleichzeitig bestimmten Leberglykogens folgt, d. h. daß bei gesteigerter Leberfunktion — charakterisiert durch den Glykogengehalt — die Kerngröße zunimmt oder umgekehrt.

In zusammenfassender Form folgert JACOB (1942), wo er zahlreiche weitere Arbeiten mit entsprechenden Ergebnissen anführt, daß „im Zelleben unter physiologischen wie pathologischen Bedingungen jede ausgiebige spezifische Zelltätigkeit, welche in besonders starkem Umfang das Gesamtplasma der Zelle in Beschlag nimmt, zu einer entsprechenden Kern- und Plasma-gleichzeitig betreffenden Wachstumszunahme der Zellen führt, welche — soweit untersucht — jeweils nach Art des *rhythmischen Verdoppelungswachstums* abläuft“.

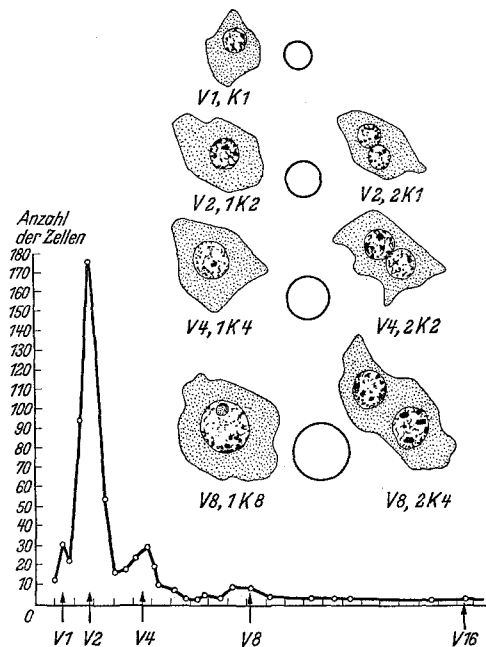


Abb. 12. Kernvariationskurve nach JACOB (1926) mit Abbildung der Kern- und Zellgrößen.

Er nannte dieses Wachstum das „*Arbeits- oder Leistungswachstum*“, weil in all diesen Fällen eine „besondere Zellarbeit oder Zelleistung“ nachgewiesen werden konnte.

So ist es verständlich, daß wir uns im Rahmen unserer Untersuchungen an Mäuselebern gerne der von JACOBJ angegebenen Methode bedienten, um mit ihrer Hilfe Rückschlüsse auf den Funktionszustand der jeweils untersuchten Leber ziehen zu können¹.

B. Vorversuche (Variationsstatistik nach JACOBJ).

Bei rund 20 Tieren, die nach dieser Methode zur Untersuchung kamen, erhielten wir das Bild der typischen Variationskurven. Wie andere Untersucher bei anderen Versuchsbedingungen (s. JACOBJ 1942) stellten wir fest, daß oft Verschiebungen der Häufigkeitsmaxima auftreten. Vorwiegend erhielten wir bei eiweißgefütterten Tieren eine Verschiebung nach rechts —, auffallenderweise aber auch in einzelnen Fällen nach links, so daß wir zunächst nicht in der Lage waren, ganz bestimmte, für eine spezielle Versuchsbedingung (z. B. Hafer- oder Eiweißfütterung) typische Schlußfolgerungen aus dem Ergebnis der Variationsstatistik zu ziehen.

Wir hielten es deshalb für richtig, die Leber von Normaltieren sehr eingehend — und *von verschiedensten Gesichtspunkten aus* (s. Einleitung) zu studieren. Aus den dort bereits beschriebenen Versuchen wählten wir typische Tiere aus und stellten dann wieder unsere karyometrischen Untersuchungen an. Vor allem erschien es uns auch von Bedeutung die HERTWIGSche Kern-Plasmarelation in jedem unserer Fälle ebenfalls zu kontrollieren, um jeweils die Konstante „*c*“ bestätigt zu bekommen.

C. Kern-Plasmarelation.

PFUHL berichtet, daß die Kern-Plasmarelationsbestimmung an Leberzellen immer sehr zweifelhafte Werte bringt. Er erwähnt PLENK, der nach der Geburt zunächst eine Verkleinerung der Leberzellen und später eine Größenzunahme beobachtet hat, wobei sich der Kern am Wachstum weniger beteiligt als die Zelle. Auch L. KAUFMANN stellte eine Änderung des Kern-Plasmaverhältnisses während des Wachstums bei Taubenlebern fest, und zwar nimmt nach ihrer Untersuchung in den ersten Tagen nach dem Ausschlüpfen aus dem Ei das Plasma an Masse relativ stark zu, während es bei alten Tauben wieder abnimmt. In ähnlicher Weise berichtet LATYSCHESKY von einer Änderung der Kern-Plasmaverhältnisse.

Es ist das Verdienst von v. VOLKMANN zusammen mit v. MARCK, eine Methodik entwickelt zu haben, mit Hilfe derer es erstmalig gelang, differenzierte Gewebezellen dreidimensional zu vermessen. Sie bestimmten aus jeder einzelnen Zelle das Kern- und Plasmavolumen und errechneten hieraus die Kern-Plasmarelation. Als Versuchsobjekt diente ihnen unter anderen die Leber des Frosches und dabei konnten sie feststellen, daß die Kern-Plasmarelation sowohl beim gut-

¹ An dieser Stelle sei Herrn Prof. JACOBJ für Überlassung des Mikro-Zeichnapparates sowie für all seine freundliche Unterstützung und Ratschläge herzlichst gedankt.

ernährten wie beim hungernden Frosch *konstant* bleibt. Als häufigsten Wert der Kern-Plasmarelation bei der Leber des Frosches fanden sie das Verhältnis 1:8. Außerdem konnten sie mit ihrer Methode auch das von JACOB¹ aufgestellte Verdoppelungsgesetz bestätigen.

Für uns war es nun wichtig, eine Methode zu entwickeln, die es ermöglicht, am gleichen Organ die Kern-Plasmarelation zu bestimmen, die Kernvariation zu untersuchen und gleichzeitig durch Auszählungen, Gewichtsbestimmungen usw. alle Faktoren zu ermitteln, welche wir in die bereits erläuterten mathematischen Ableitungen und Gleichungen einsetzen konnten.

Es war daher unerlässlich, am Schnittpräparat zu arbeiten, und wir waren uns von vorneherein im klaren, daß eine Methode, welche aus noch so exakten Messungen am histologischen Schnitt Rückschlüsse auf die Verhältnisse in der 3. Dimension zieht, einer gewissen Fehlerbreite unterworfen sein muß.

In Analogie zu dem von uns verwandten Flächenquadrat, das zur Auszählung der Zellkerne am Schnitt verwandt wurde, gingen wir daher so vor, daß wir zur Zeichnung und Ausmessung der mit dem ZEISSschen Zeichenapparat auf das Reißbrett projizierten Kerne ein stets gleich großes Zeichenblatt (62245 mm²) verwandten.

Ausgehend von dem Gedanken, daß die Kern-Plasmarelation trotz wechselnder Zellzahl je Flächeneinheit und trotz wechselnder Kerngröße konstant bleiben muß, sofern die Leber ein zellkonstantes Organ ist, folgerten wir, daß die Summe aller auf einer konstant bleibenden Zeichenblattfläche gezeichneten Kernflächen (= Gesamtkernfläche je Blatt) stets die gleiche bleiben muß (s. math. Ableitung).

Die Kern-Plasmarelation ließe sich also errechnen aus

$$Q = \frac{\text{Zeichenblattfläche (= Zellfläche + Capillarraum + intralobuläres Bindegewebe)}}{\text{Kernfläche je Zeichenblatt}}.$$

Wir verwandten je Präparat 8 Zeichenblätter und errechneten daraus die Gesamtkernfläche je Blatt im Mittel.

Wir halten es für angezeigt, im folgenden die Fehlermöglichkeiten bzw. deren Vermeidung zu besprechen.

Grenzen der Methodik.

1. Die zur Untersuchung kommenden Organe müssen alle gleichmäßig ausgeblutet, lebensfrisch fixiert und unter gleichen Bedingungen bis zur Färbung des Schnittes behandelt sein.
2. Es müssen grundsätzlich *alle auf das Zeichenblatt projizierten Kerne* gezeichnet werden, wobei zu berücksichtigen ist, daß zu diesem Zweck die Bedienung der Mikrometerschraube unerlässlich ist, um den 7,5 μ dicken Schnitt in allen Schichten zu durchmustern und so auch die tiefer liegenden Kerne zu erfassen.
3. Wie bei der Leukocytenauszählung in der Zählkammer erfaßt man die vom Blattrand geschnittenen Kerne so, daß man z. B. die rechts und unten liegenden Kerne mitzeichnet, links und oben aber wegläßt. Man kann aber weitgehend

schon durch die Verschiebung des Zeichenblattes auf dem Reißbrett solche ungünstig liegenden Kerne vermeiden. Selbstverständlich darf weder das Blatt noch das

Präparat während des Zeichnens verschoben werden.

4. Die doppelkernigen Zellen werden gekennzeichnet. Durch Manipulieren mit der Mikrometerschraube kann man bei Azanfärbung leicht die Zellgrenzen erkennen.

5. Die Konstanz der Schnittdicke hat zur Folge, daß bei einem Überwiegen der großkernigen Zellen die Chance für die Messung des Zellkernes in seinem optimalen Durchmesser geringer wird (s. Abb. 13).

6. Kernkalotten werden mitgezeichnet, um Kernzahl und Kernfläche im Schnitt völlig zu erfassen.

7. Die „Bindegewebskomponente“ kann weitgehend dadurch ausgeschaltet werden, daß bei der angegebenen 2000fachen Vergrößerung das gewählte Zeichenblattformat stets zwischen Zentralvene und GLISSON'sches Dreieck fällt, so daß also nur das intralobuläre Bindegewebe in der „Plasmafläche“ mit inbegriffen ist.

Tabelle 8. Beispiel (Tier Nr. C 8).

Zeichenblattfläche 62 245 mm ²	Kern- fläche mm ²	Zellzahl	Zahl der doppel- kernigen Zellen
1. Blatt.	7233	27	3
2. Blatt.	7586	34	5
3. Blatt.	7116	28	3
4. Blatt.	7221	28	4
5. Blatt.	6468	25	4
6. Blatt.	7094	30	2
7. Blatt.	7611	33	6
8. Blatt.	6719	28	1
Summe	57048	233	28

Mittlere Kernfläche je Blatt: $\frac{57048}{8} = 7131 \text{ mm}^2$.

$$Q = \frac{62\,245 \text{ mm}^2}{7131 \text{ mm}^2} = 8,7.$$

7. Die „Bindegewebskomponente“ kann weitgehend dadurch ausgeschaltet werden, daß bei der angegebenen 2000fachen Vergrößerung das gewählte Zeichen-

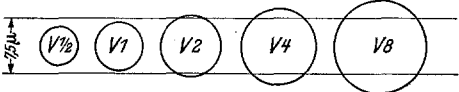


Abb. 13. Die vorkommenden Kerngrößen im Vergleich zur konstanten Schnittdicke.

Ergebnis.

Trotz mancher bei der Messung am histologischen Schnitt nicht zu vermeidenden Fehler, erhielten wir auffallend gleichmäßige Resultate. Aus Untersuchungen an 42 Lebern verschiedener Gewichtsklassen (Abb. 14) ergibt sich der Mittelwert des Quotienten *Q* als Ausdruck der Kern-Plasmarelation

$$Q = \frac{\text{Zeichenfläche}}{\text{Kernfläche je Zeichenblatt}} = 8,68.$$

Mittlere Abweichung vom Mittelwert $\sigma = \pm 0,74 = \pm 8,6\%$
 $2 \sigma = \pm 1,48 = \pm 17,2\%$
 $3 \sigma = \pm 2,22 = \pm 25,8\%$

Mittlerer Fehler des Mittelwertes bei 42 Untersuchungen:

$$m = \pm 0,11 = \pm 1,2\%.$$

Der Mittelwert der Kernfläche je Blatt (*Kb*) errechnet sich wie folgt:

$$Q = 8,68 = \frac{62\,245 \text{ mm}^2}{Kb} = \frac{\text{Zeichenblattfläche}}{\text{Kernfläche je Blatt}}$$

$$Kb = \frac{62245}{8,68}$$

$$Kb = 7171 \text{ mm}^2.$$

Mittlerer Fehler = $\pm 8,6\%$

= $\pm 616 \text{ mm}^2$

das bedeutet 4,3 Kerne der Klasse (V 1/K 1)

oder 2,7 Kerne der Klasse (V 2/K 2).

Bewertung der Ergebnisse.

1. Wir konnten bei der Ausmessung der Kernfläche je Flächeneinheit feststellen, daß ihre Größenordnung mit einer mittleren Abweichung von $\sigma = \pm 8,6\%$ und einem mittleren Fehler des Mittelwertes von 1,2% und damit der errechnete Quotient Q als Ausdruck der Kern-Plasmarelation innerhalb derselben Streubreite konstant bleibt, d. h. bei den 42 von uns untersuchten Lebern kann mit der angegebenen Methode die HERTWIGSche Kern-Plasmaregel bestätigt werden.

In einem einzigen Fall, bei einem Lebergewicht von 180 mg erhielten wir einen Extremwert mit $Q = 5,8$, die Kernfläche ist also wesentlich zu groß.

Hierbei muß natürlich die Frage aufgeworfen werden, ob in diesem Falle eine Störung der Kern-Plasmarelation vorliegt, etwa in der Form, wie dies PLENK und L. KAUFMANN bei nicht ausgewachsenen Tieren festgestellt haben. Dafür spricht, daß dieser Wert *außerhalb der 3- σ -Grenze* liegt, während die Zellzahl je Flächeneinheit noch innerhalb der 1- σ -Grenze liegt. Man muß allerdings dabei berücksichtigen, daß für diesen extremen Wert die Konstante K , wie wir bereits erörtert haben, mit einer Abweichung von 3% eingerechnet werden muß. Bei den kleinen Leberkernklassen, wie sie in diesem Fall vorliegen, liegt das Schnittoptimum wesentlich günstiger als bei den größeren Kernklassen und es werden relativ mehr Zellen mit Kern geschnitten als bei großen Lebern, so daß also die relativ große Kernfläche zum Teil auf die Verschiebung der Faktoren q' und Z/X (s. mathematische Ableitungen) zurückzuführen ist.

Die zu große Kernfläche braucht also durchaus nicht noch eine Verschiebung der Kern-Plasmarelation bei kleinem Lebergewicht bedeuten. Wir haben es dabei also mit dem bereits besprochenen Fehler zu tun, der durch die wechselnde Kerngröße bei konstanter Schnittdicke verursacht wird, der aber nur bei extremen Grenzwerten offensichtlich werden kann.

Man sieht daraus, daß für Grenzwerte aus dieser Messung noch keine sicheren Schlüsse auf die Störung der Kern-Plasmarelation gezogen werden dürfen. Vielmehr müßte noch für die Beurteilung dieser Frage eine größere Tierzahl derselben Gewichtsklasse untersucht werden.

Im übrigen decken sich die gewonnenen *Zellzahlen* in der hier verwandten Flächeneinheit bei entsprechender Umrechnung mit den vorausgegangenen Auszählungen, wobei allerdings die mittlere Abweichung etwas größer wird, weil die ausgezählte Gesamtfläche kleiner ist und die bei der Zeichnung benutzte Flächeneinheit im ganzen einen wesentlich kleineren Querschnitt durch das mikroskopische Bild der Leber erfaßt, als das von uns zur Auszählung benutzte Meßquadrat.

Zusammenfassend können wir also feststellen, daß die Kern-Plasma-relation im Prinzip konstant bleibt und daß wir Abweichungen bis außerhalb der 3σ -Grenze nur in einem Falle (bei einem Lebergewicht

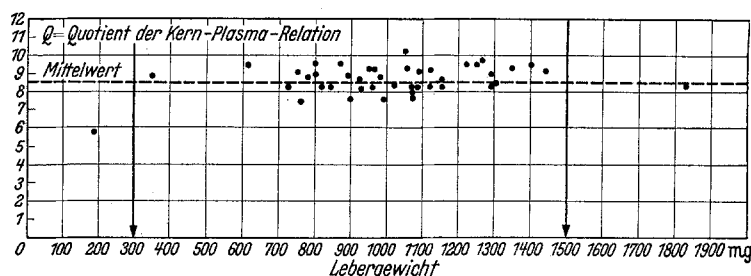


Abb. 14. Die Kern-Plasmarelation, ausgedrückt durch den Quotienten Q bei verschiedenen schweren Lebern.

unter 300 mg) festgestellt haben. Folgende Punktschar gibt im Diagramm die von uns gewonnenen Ergebnisse bei der Bestimmung der Kern-Plasmarelation wieder (Abb. 14).

D. Die Kerngrößenvariation.

Wie wir bereits berichtet haben, konnten wir in unseren karyometrischen Voruntersuchungen wie zahlreiche andere Untersucher gelegentlich Verschiebungen der Häufigkeitsmaxima innerhalb der JACOBJschen Variationskurve beobachten. Dies hat uns veranlaßt, bei einer Auswahl von normalen Tieren verschiedener Alters- und Gewichtsklassen unter gleichzeitiger Berechnung der Kern-Plasmarelation und Auszählung der Zellen und Kerne, die variationsstatistische Auswertung am Schnitt weiterzuführen und unter entsprechender Abänderung die bisher übliche Methodik auf eine funktionelle Problemstellung auszurichten.

Nach der von JACOBJ angegebenen Methode erhält man eine Variationskurve, welche mit ihren Kulminationspunkten die verschiedenen Größenklassen V 1, V 2, V 4, V 8 usw. herausstellt.

Unter der Voraussetzung, daß die Kern-Plasmarelation konstant bleibt, kann man aus der Größenzunahme des Kernes auf das Wachstum der Zelle schließen.

Als Konstante für die Variationsstatistik nimmt man nach JACOBJ die Kern- bzw. Zellzahl (entweder 200 oder 250) und erhält dann die Verteilung auf die einzelnen Größenklassen. Wohl fordert JACOBJ, daß

jeweils alle Kerne im Gesichtsfeld gezeichnet werden, um eine subjektive Auswahl der Kerne zu vermeiden. Wir konnten jedoch immer wieder feststellen, daß bei einer 2. und 3. Ausmessung und Auswertung desselben Präparates eine verschiedene Verteilung auf die einzelnen Größenklassen ermittelt wurde.

Für die Bestimmung der Kern-Plasmarelation waren wir gezwungen, bei jeder Leber eine konstante *Flächeneinheit* auszumessen und hatten dadurch die Möglichkeit, in unserer Kerngrößenvariation als Konstante

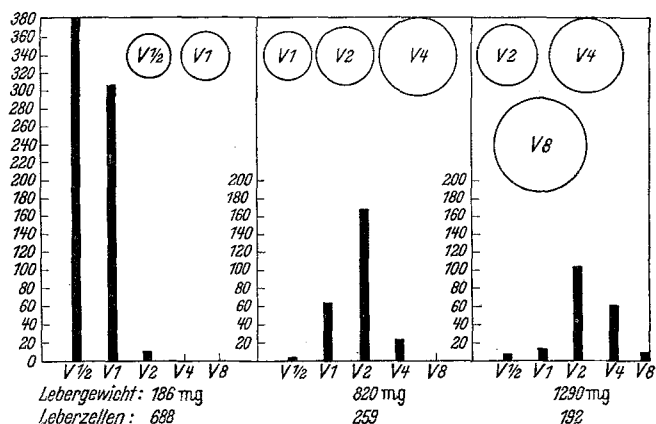


Abb. 15. Die Verteilung der Kerngrößenklassen bei verschiedenem Lebergewicht. (Man beachte die Abnahme der Leberzellzahl mit zunehmendem Lebergewicht in stets gleichbleibender Zeichenfläche und die entsprechende Verschiebung der Kernvariation zu größeren Kernklassen.)

nicht eine bestimmte Anzahl von Kernen oder Zellen (also 200 oder 250) sondern eine *konstante Schnittflächeneinheit* zu benutzen, die wir zweckmäßigerweise so gewählt haben, daß für die Variationsstatistik eine Mindestzellzahl von etwa rund 200 Zellen erreicht wurde.

Wir haben deshalb mit der Zellzahl gearbeitet, weil wir das Zellwachstum ermitteln wollten, welches ebensogut durch die *Vergrößerung des Kernes* z. B. (V1/K1) zu (V2/K2), wie durch das *Entstehen von doppelkernigen Zellen* (V1/K1) zu (V2/2K1) gegeben sein kann (Abb. 13).

Rein methodisch hat es sich für uns als gleichgültig erwiesen, ob man für die Variationsstatistik mit dem Kernvolumen oder dem Kerndurchmesser arbeitet, denn wir haben für unsere Vergleiche der Variationsstatistik nicht die Höhe der Variationsgipfel verwandt, welche man nach HINTZSCHE ermitteln müßte, um symmetrische Gipfel zu erreichen, sondern wir haben einfach die Zellzahl der einzelnen Größenklassen miteinander verglichen. Sie wird aus der Variationskurve ermittelt, indem man die einzelnen Klassen voneinander trennt und die Zahl der in der betreffenden Größenklasse vorkommenden Zellen in Säulen darstellt.

Die doppelkernigen Zellen müssen wir zu diesem Zweck gesondert behandeln und bei der Aufstellung der Variationsstatistik der ihnen entsprechenden Größenklasse zuordnen, z. B. $(V4/2K2) = (V4/K4)$.

Stellt man nun die Kernvolumina innerhalb der einzelnen Klassen entsprechend der Variationskurve zusammen, so finden wir beim normalen Tier bereits große Schwankungen, die sich im Extremen so darstellen, daß einmal der Gipfel mehr links (bei V1 und V2), das andere Mal mehr rechts (bei V8 und V16) zu liegen kommt.

Entsprechend dieser Verschiebung der Kerngrößen ändert sich auch die Zellzahl, wie dies ja bei der Konstanz der Kern-Plasmarelation zu erwarten ist (s. Abb. 15).

Die Darstellung ist so zu verstehen, daß bei V8 und darüber hinaus wesentlich weniger Zellen notwendig sind als etwa bei V1 und V2, um dasselbe Gesamtkernvolumen zu erreichen, z. B. $(V8/K8) = 8 (V1/K1)$.

Die in ihrem Variationsbild völlig verschiedenen Normaltiere unterscheiden sich bei absolut normalem histologischem Befund praktisch nur durch ihr *Lebergewicht*, d. h. kleine Lebern haben kleine Kerne, große Lebern haben große Kerne. Anders ausgedrückt, entsprechend der bereits angestellten Erörterungen über den mittleren Kernhalbmesser: r_m , errechnet aus der Gesamtkernfläche je Blatt, wird mit zunehmendem *Lebergewicht* größer (vgl. S. 557 Tabelle 6).

E. Zusammenfassung.

a) Die Ergebnisse der empirischen Messung (Variationsstatistik) stimmen mit unseren mathematischen Betrachtungen durchaus überein. Allerdings ist bei der empirischen Messung die Fehlerbreite eine größere.

b) Die bisher unter funktionellen Gesichtspunkten studierten Kerngrößenvariationen haben das Lebergewicht mit den Verschiebungen der Variationskurve nie in Beziehung gesetzt. Nach unseren Untersuchungen ist anzunehmen, daß die Unterschiede der Variationskurve *gewichtsbedingt* sind, oder anders ausgedrückt, daß schwereren Lebern größere Kerne entsprechen, so daß also die Frage der gewählten Versuchsbedingungen auf das absolute und relative Lebergewicht verlegt wird, dem unserer Ansicht nach die entscheidende Bedeutung zukommt.

Der JACOBSsche Begriff des *Leistungswachstums*, der sich auf Kern, Zelle und Gesamtorgan bezieht, erfährt durch diesen neuen Gesichtspunkt seine Bestätigung.

V. Schlußbetrachtung und Zusammenfassung.

Wir haben durch unsere Untersuchungen mit einer mathematischen Beweisführung gezeigt, daß das Wachstum der Leber bei der weißen Maus bestimmten Gesetzen von allgemein biologischer Bedeutung unterworfen ist.

Das *relative Lebergewicht*, ausgedrückt durch das Verhältnis von Lebergewicht zu Körpergewicht nimmt während des Wachstums nur

geringfügig zu und schwankt bei unbehandelten mit normalem Mischfutter oder Hafer gefütterten Tieren um einen Mittelwert größerer physiologischer Streubreite, eiweißgefütterte Tiere zeigen etwas schwerere relative Lebergewichte.

Das *Wachstum der Leber* durch Zellvermehrung hört nach der Geburt auf, ist aber in den ersten Wochen doch noch deutlich nachweisbar, während das Wachstum durch Volumenvergrößerung der Zellen bereits einsetzt. Nach dem Übergang vom Saugen auf die normale Mischfütterung, der nach unseren Beobachtungen gerade bei Tieren von etwa 200—300 mg Lebergewicht stattfindet, bleibt die Gesamtleberzellzahl während der Zeit des stärksten Wachstums bis zu einem Lebergewicht von etwa 1400 mg bei ausgewachsenen Mäusen konstant, wobei auch unter den einzelnen Lappenteilen der Leber ein konstantes Verhältnis besteht. Normalerweise stehen also Zellanbau und Zellabbau in dieser Zeit in einem konstanten Verhältnis zueinander. Die Seltenheit der Mitosen läßt auf eine normalerweise *langsame* Dynamik dieser Umbauvorgänge schließen. Lebergewichte über 1400 mg sehen wir nur unter besonderen Stoffwechselbelastungen, so daß wir in Analogie zu LINZBACH in dieser Gewichtsklasse von 1400 mg von einem kritischen Lebergewicht sprechen können. Die Gewichtszunahme der Leber während des größten Teils ihres Wachstums beruht also auf der Volumenzunahme der einzelnen Leberzelle allein, wobei das mittlere Zellvolumen entsprechend der Größenzunahme des Gesamtorgans um das 5—7fache wächst. — Die *Kern-Plasmarelation* in der Leber bleibt während dieser Zeit im Mittel konstant, feinere Schwankungen können wir methodisch noch nicht erfassen. Das Verhältnis von Kernmasse zu Plasmamasse beträgt nach Abzug des zugehörigen Capillarraumes etwa 1:9. Die *Kernvariationskurve*, welche auf die Flächeneinheit bezogen wurde, zeigt während des Wachstums eine deutliche Verschiebung von den kleinsten zu den großen Kernklassen. — Der *Capillarraum* und wie wir annehmen können auch der *Gesamtgefäßraum* wächst proportional zum Parenchymvolumen durch Vermehrung der Endothelien und Bindegewebszellen. — Aus der Zahl der doppelkernigen Leberzellen können wir wohl auf eine augenblickliche erhöhte Stoffwechselfunktion schließen, da sich bei gleichbleibendem mittlerem Zellvolumen die Grenzfläche zwischen Kernmasse und Plasmamasse vergrößert. Doch können wir aus diesen Versuchen allein keine besondere Regel ableiten.

Die zusammenfassende Betrachtung von relativem und absolutem Lebergewicht, der Leberzellzahl im Meßquadrat als Ausdruck des mittleren Zellvolumens sowie der Kernvariationskurve und der Kern-Plasmarelation kann uns zusammen mit cytomorphologischen Beobachtungen quantitative Aussagen über Funktion und Stoffwechsel der Leberzellen ermöglichen. Wir sind damit in der Lage, Vergrößerungen des relativen Lebergewichtes wie auch des Gesamtlebergewichtes, die

sich unter bestimmten Stoffwechselbedingungen ergeben können, als *hyperplastische* oder *hypertrophische* Vorgänge zu unterscheiden. Außerdem ergibt sich die Möglichkeit, die intracapilläre Zellvermehrung und das Auftreten von mesenchymalen Proliferationsherden als empfindlichen Test für Reizung des Mesenchyms quantitativ zu verwerten. Diesbezügliche Untersuchungen, die bereits abgeschlossen sind, sollen im Rahmen einer Arbeitsgruppe anschließend veröffentlicht werden.

Die Zellzahlkonstanz, die LINZBACH für das menschliche Herz erstmalig nachgewiesen hat, besteht also nach unseren Untersuchungen auch für die Leber der weißen Maus, mit dem Unterschied, daß der Capillarraum des menschlichen Herzens sich nicht im gleichen Verhältnis zum Parenchymvolumen vergrößert, während dieses Verhältnis in der Leber der weißen Maus gewahrt bleibt.

Einer freundlichen Anregung von Dr. FRIEDRICH-FREKSA (Kaiser-Wilhelm-Institut für Biochemie) folgend, möchten wir zum Unterschied von Geweben wie dem Nervensystem, bei denen keine Zellteilung mehr stattfindet und der Leber, bei der noch deutlich Umbauvorgänge festzustellen sind, von einer *dynamischen Zellzahlkonstanz* der Leberparenchymzellen sprechen.

Die in bezug auf die Zellzahlkonstanz gleichen Ergebnisse an verschiedenen Organen beim Menschen und beim Tier legen den Gedanken an ein allgemeines Wachstumsgesetz höher differenzierter Organe nahe. Mit Verfeinerung der Methode werden auf diesem Wege vermutlich noch manche im Hinblick auf die Funktion wichtige Fragen gelöst werden können.

Literatur.

- BIRKENMAIER, O.: Z. Anat. **102**, 794 (1934). — BRUES and MARBLE: J. of exper. Med. **65**, 15 (1937). — FORSGREN: Zit. nach PFUHL, S. 319 u. f. — GEBELEIN, H.: Zahl und Wirklichkeit. Leipzig 1943. — HEIBERG: Anat. Anz. **31**, 306 (1907). — HEIDENHAIN, M.: Formen und Kräfte in der lebendigen Natur. In der Sammlg.-Reihe: Vorträge und Aufsätze über Entwicklungsmechanik der Organismen. Herausgeb. ROUX. H. 32. Berlin: Springer 1923. — HERTWIG, G.: Z. mikrosk.-anat. Forschg **23**, 484. — HERTWIG, R.: Biol. Zbl. **23**, 49, 108 (1903). — HINTZSCHE, E.: Mitt. naturforsch. Ges. Bern, N. F. **4**, 21 (1946). — HINTZSCHE u. TANNER: Z. mikrosk.-anat. Forschg **39**, 45 (1936). — HOLMGREN, H.: Zit. nach PFUHL, S. 319 u. f. — HOLMGREN, H., u. T. CASPERSSON: Anat. Anz. **79**, 53 (1934). — ILLING, G.: Anat. Anz. **26**, 177 (1905). — JACOB, W.: Z. Anat. **81** (1926). — Z. mikrosk.-anat. Forschg **1935**. — Roux' Arch. **106** (1925); **141**, 585 (1942). — KAUFMANN, L.: Ref. Anat. Ber. **8**, 71 (1927). — LINZBACH, A. J.: Virchows Arch. **314**, 535 (1947); **316**, 454 (1949). — PATTEN u. PHILPOT: Zit. nach WASSERMANN, Handbuch der mikroskopischen Anatomie, Bd. I/2. — PFUHL, W.: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. V/2, S. 235 u. f. 1932. — PLENK, H.: Arb. zool. Inst. Wien **19** (1911). — RÖSSLE u. ROULET: Maß und Zahl in der Pathologie. Berlin: Springer 1932. — SCHLOMKA, G.: Virchows Arch. **316**, 439 (1949). — SCHMIDT, M. B.: Beitr. path. Anat. **11**, 199 (1892). — STOWELL, R. E.: Arch. of Path. **1948**, 164. — VOLKMANN, v. u. E. v. MARCK: Z. Zellforschg **32**, 545 u. 557 (1943).

Dr. MANFRED SLESS, Tübingen, Pathologisches Institut der Universität.