

Aus dem Pathologischen Institut (damaliger Direktor: Prof. Dr. H.-W. ALTMANN)  
und dem Seminar für medizinische Statistik (Direktor: Prof. Dr. K. FREUDENBERG)  
der Freien Universität Berlin

## **Karyometrische und karyologische Untersuchungen an den Hauptstückepithelien der Rattenniere bei experimenteller Eiweißnephrose**

Von

**CHR. POLSTER**

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. August 1959)

### **Einleitung**

Das von BENNINGHOFF<sup>5</sup> als funktionelle Kernschwellung bezeichnete Verhalten des Zellkernes als Hinweis auf einen gesteigerten Funktionszustand der Zelle ist durch zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen gesichert worden (z.B. <sup>6-10, 20, 33, 34</sup>). Die in den letzten Jahren durchgeführten Arbeiten zielten darauf ab, an Hand funktionell geschwollener Kerne Zellen oder Zellgruppen herauszufinden, die für gewisse, eng umschriebene Funktionen zuständig sind (z.B. <sup>4, 9, 42</sup>).

Wir selbst hatten uns die Aufgabe gestellt, in Tierversuchen zu prüfen, ob bei der intracellulären Verarbeitung resorbierter Eiweißstoffe in den Hauptstückepithelien der Nieren eine volumetrisch erfaßbare Vergrößerung der Kerne nachweisbar ist, die in gleicher Weise als Ausdruck einer gesteigerten nuclearen Aktivität gedeutet werden kann, mit anderen Worten, ob der Kern an dieser morphologisch gut kontrollierbaren Partialfunktion der Nierenzelle beteiligt ist.

Nach dem Beginn unserer Untersuchungen erschien eine unserer Arbeit thematisch nahestehende Veröffentlichung von BUCHER und GAILLOUD<sup>9</sup>, die, von einschlägigen Beobachtungen am menschlichen Sektionsgut einmal abgesehen, ein positives Resultat von vornherein wahrscheinlich machte. Denn die genannten Autoren haben sicher nachgewiesen, daß bei gesteigerter Funktion der Nierenkanälchen von weißen Mäusen eine solche Kernschwellung zu beobachten ist. Allerdings haben sie die Zellbelastung mit anderen Substanzen — Trypanblau, Glucose und Tyrodelösung — durchgeführt, so daß unsere Eiweißversuche, zumal im Hinblick auf die menschliche Pathologie und die bevorzugte Bearbeitung des mitochondrialen Anteiles an der dabei verwirklichten Zelleistung, doch als eigener und andersartiger Beitrag zu den angeschnittenen Fragen gewertet werden können.

### **Untersuchungsgut und Untersuchungsart**

Nach einzelnen orientierenden Experimenten mit den Methoden, die OLIVER<sup>28</sup>, RÜTTIMANN<sup>32</sup> und ZOLLINGER<sup>43</sup> (vgl. auch <sup>17, 26, 31</sup>) zur Erzeugung hyaliner Tropfen in den Nieren weißer Ratten bzw. weißer Mäuse verwandt haben, legten wir uns in einer ersten Versuchsreihe auf folgendes Verfahren fest: 16 männlichen weißen Ratten von 200—250 g Gewicht injizierten wir jeweils ein Zehntel ihres Körpergewichtes Hühnereiweiß intraperitoneal und

töteten je zwei Tiere 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72 und 84 Std danach durch Dekapitation. Darauf haben wir in einer zweiten, später (S. 425) näher zu schildernden Versuchsreihe an insgesamt 8 Tieren diese Eiweißbelastung mehrfach wiederholt. In jedem Falle wurden die so gleich gewonnenen Nieren nach Entkapselung in Bouin und 10%igem Formalin 24 Std lang fixiert und dann in einem Autotechnikon über Methylbenzoat in Paraffin eingebettet. Die  $6\mu$  dicken Schnitte wurden mit HE, PAS, PAS-Hämatoxylin, v. Gieson, Kresyl, Goldner, Feulgen, Feulgen-Lichtgrün gefärbt.

Für die karyometrischen Untersuchungen benutzten wir durchweg die in Bouin fixierten, mit PAS-Hämatoxylin gefärbten Schnitte, weil in ihnen bei jeder Vergrößerung das Auffinden der Hauptstückepithelien durch die gute Darstellung des Bürstensaumes erleichtert wird.

Die Nierenpräparate der Versuchstiere wurden mit denen von 10 Kontrolltieren verglichen. Dabei führten wir die Kernmessungen an völlig gleichförmig behandelten Nierenschnitten durch, um Kerngrößenschwankungen infolge unterschiedlicher Bearbeitung des Materiales von vornherein auszuschließen (vgl. <sup>13, 14, 22</sup> u. a.).

Für die Ermittlung der Kernflächen haben wir die Hauptstückepithelien mit einer Zeiss-Aufsetzkamera bei 320facher Vergrößerung photographiert und die Negative mit einem Lesegerät (Gesamtvergrößerung 3260fach) projiziert, gezeichnet und mit einem Planimeter der Firma Ott, Kempten, ausgemessen <sup>3, 18</sup>. Die errechneten Volumenwerte <sup>39</sup> der ermittelten Kernschnittflächen haben wir in die in der Karyometrie übliche geometrische Klasseneinteilung eingeordnet <sup>7-10, 19-21, 23, 24, 39, 41</sup>. Die variationsstatistische Auswertung der Ergebnisse verdanken wir Herrn Prof. FREUDENBERG, dem auch an dieser Stelle nochmals herzlich gedankt sei. „Bei Aussagen über die Signifikanz der Ergebnisse mußte freilich in Rechnung gestellt werden, daß in Gewebsverbänden ermittelte Meßergebnisse, wie beispielsweise in den Hauptstückepithelien der Nieren, nicht voll den üblichen Voraussetzungen der statistischen Berechnung entsprechen. Denn es handelt sich bei den einzelnen Epithelzellen nicht um völlig voneinander unabhängige Individuen. Die hier vorliegende, vom Organismus und von gewissen Genfaktoren abhängige, statistisch durchaus faßbare Konstanz hätte indes nur durch Untersuchung sehr großer Kontrollserien ermittelt werden können“ (FREUDENBERG<sup>16</sup>). Mit Rücksicht hierauf wurde ein ermittelter Wert nur dann als signifikant anerkannt, wenn er erheblich größer als das Dreifache der — unter der Voraussetzung der Unabhängigkeit der Einzelzellen errechneten — mittleren Abweichung war. Angaben über die Quantität der intracellulären Eiweißtropfen beruhen auf dem optischen Eindruck, wobei in wiederholten Untersuchungen sowohl die Größe wie die Zahl dieser Gebilde bewertet und in — hier nicht wiedergegebenen — Tabellen zusammenfassend dargestellt wurde.

## Ergebnisse

### *I. Die Kerngrößenverteilungskurve der Hauptstückepithelkerne bei Kontrolltieren*

Die Angaben in der Literatur über Kernmessungen an Rattennieren sind recht spärlich. SULKIN<sup>34</sup> fand in den proximalen Tubuli contorti seiner von weißen Ratten gewonnenen Kontrollnieren drei Kerngrößeklassen, die sich in ihrem Volumen wie 1:2:4 verhielten. WERMEL und IGNATJEWA<sup>40</sup> teilten mit, daß Hauptstückepithelkerne in Rattennieren zu meist eine annähernd gleiche Größe haben. Entsprechende Messungen bei anderen Laboratoriumstieren erwähnte FREERKSEN<sup>15</sup>. Er fand bei Kaninchen und Meerschweinchen in den gewundenen Tubuli der Haupt- und Mittelstücke zweigipflige Kernverteilungskurven. JACOBI<sup>23</sup> ermittelte bei weißen Mäusen in der Rindenzone der Tubuli contorti eine Kerngrößenverteilungskurve, die nur einen bei  $6,56\mu$  Durchmesser liegenden Gipfel aufwies, nimmt jedoch an, daß sich ein zweiter Gipfel durch gesonderte Auszählung der Großkerne darstellen ließe. In der erst kürzlich von BUCHER und GAILLOUP<sup>9</sup> veröffentlichten Untersuchung über das Verhalten der Zellkerne bei verschiedenen Funktionszuständen der Hauptstückepithelien weißer Mäuse wird eine eingipflige Kerngrößenverteilungskurve angegeben, die auf 2250 Kernmessungen beruht. Nach länger dauernder Belastung mit Trypanblau war auch hier bei manchen Tieren die Andeutung eines zweiten Kerngipfels zu erkennen. Dieser Darstellung liegt wie der unseren die logarithmische Klasseneinteilung zugrunde,

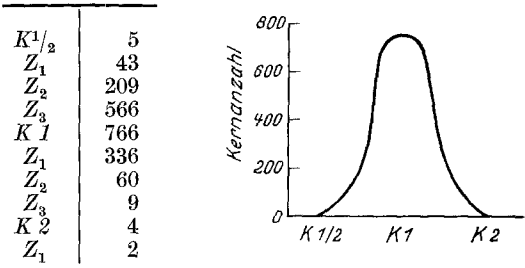
die sich in der Karyometrie neuerdings durchgesetzt hat. Denn hierdurch nähern sich die Verteilungen weit stärker den sog. Normalverteilungen.

In den eigenen Untersuchungen der Kontrollnieren konnten wir aus 2000 Kernmessungen an den Hauptstückepithelien eine Normalverteilung der Kerngrößen ermitteln, die der von BUCHER und GAILLOUD<sup>9</sup> angegebenen Kurve durchaus entspricht. Es handelt sich dabei um eine eingipfelige Kurve. Ein zweiter Gipfel

war nicht zu erkennen. Doch: Großkerne kommen vor, sind aber selten. Die Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen sind in der Tabelle I zusammengefaßt. Die Zeichnung gibt eine Frequenzkurve der Kerngrößen wieder; dabei sind auf der logarithmisch eingeteilten Abszisse die aus planimetrisch bestimmten Projektionsflächen errechneten Volumenwerte eingetragen, während auf der numerisch gegliederten Ordinate die Summen der den einzelnen Klassen zugehörigen Kerne angegeben sind. Die Zahlen für die einzelnen Kerngrößen sind dann im unteren Teile der Tabelle zur bequemerem Berechnung der Klassen so dargestellt, daß die Klasse 0 dem erkennbaren Gipfel, also  $K_1$ , entspricht und die anderen sich sinngemäß nach unten und oben anschließen. Hierbei entspricht also, da auch wir

Planimetrisch ermittelte Ergebnisse

Tabelle 1. Kerngrößenfrequenzkurve (Hauptstückepithel weißer Ratten). Auf der logarithmisch eingeteilten Abszisse: die aus planimetrisch bestimmten Projektionsflächen errechneten Volumenwerte; auf der numerisch eingeteilten Ordinate: die Summen der in den einzelnen Klassen erfaßten Kerne



Variationsstatische Berechnung mit Anwendung der Sheppard'schen Korrektur

Klasse			
x	n	nx	nx <sup>2</sup>
-4	5	- 20	80
-3	43	- 129	387
-2	209	- 418	836
-1	566	- 566	566
0	766	0	0
1	336	336	336
2	60	120	240
3	9	27	81
4	4	16	64
5	2	10	50
$\sum$	2000	- 624	2640
$\frac{\sum}{N}$		- 0,312	1,3200
			- 0,0973
			$\sigma^2 = 1,2227$

$\sigma^2 = 1,2227$   
 $\sigma^2_{SH} = 1,1394$   
 $\sigma_{SH} = 1,07$   
 $\sigma^2_M = 0,0006$   
 $\sigma_M = 0,0239$

3 Zwischenklassen gewählt haben<sup>7-10, 19, 20</sup>, eine Halbierung bzw. Verdoppelung des Kernvolumens 4 Klassen. Das Verhältnis zwischen den Kernvolumina zweier benachbarter Klassen ist daher  $\sqrt[4]{2}:1$ . In den so festgelegten Klassenbreiten ausgedrückt, findet man als arithmetisches Mittel der Logarithmen aller Kernvolumina, d.h. deren geometrischem Mittel entsprechend, den Wert  $M = -0,312$ . Die Berechnung der mittleren Abweichung  $\sigma$  erfolgt dann nach der Formel:

$$\sigma^2 = \frac{\sum n_i x_i^2}{N} - M^2.$$

Hierbei bedeutet  $n_i$  die Anzahl der Varianten in der Klasse  $x_i$  und  $N$  die Gesamtzahl aller Varianten. Auf diese Weise erhält man  $\sigma^2$ . Dieses wird der Art der vorliegenden Aufgabe entsprechend noch durch die Sheppardsche Korrektur exakter gemacht. Diese besteht darin, daß man von dem zunächst gefundenen  $\sigma^2$  den Wert  $k^2/12$  abzieht, wobei  $k$  die Klassenbreite in den verwendeten Einheiten ausdrückt, so daß also hier  $k=1$  ist. Die solcherart endgültig berechnete mittlere Abweichung der Gesamtverteilung beläuft sich auf 1,07 Klasseneinheiten (wieder im logarithmischen Maßstabe).

Die mittlere Abweichung des Mittelwertes (auch mittlerer Fehler des Mittelwertes genannt)  $\sigma_M$  errechnet sich nach der Formel

$$\sigma_M = \frac{\sigma}{\sqrt{N}}$$

und beläuft sich hier auf 0,0239 Klasseneinheiten. Hierbei ist, wie schon erwähnt, zu beachten, daß diese letztgenannte Formel unter der Voraussetzung abgeleitet ist, daß die  $N$  einzelnen Varianten voneinander unabhängig sind. Da dies hier offenbar nicht der Fall ist, bedeutet das gefundene  $\sigma_M$  einen Minimalwert des wirklichen, und es muß mit einem größeren Wert gerechnet werden, der aber nicht exakt bestimmbar ist, weil hierfür kein genügend großes Beobachtungsmaterial zur Verfügung steht.

## II. Das volumetrische Verhalten der Hauptstückepithelkerne nach einmaliger Eiweißbelastung

Jegliches Eiweiß, das aus irgendwelchen Gründen (vgl. <sup>28, 30</sup>) das glomeruläre Filter passiert, wird zu einem beträchtlichen Teil aus dem Primärharn in den proximalen Anteilen der Tubuli contorti I rückresorbiert. Diese Eiweißrückresorption läßt sich morphologisch sehr gut erfassen, wenn sie so stark ist, daß sog. hyaline Tropfen in der Zelle entstehen. Nach einer gewissen Zeit sind diese Tropfen jedoch nicht mehr nachweisbar, und zwar infolge eines intracellulären Abbaues (vgl. <sup>28, 30</sup>), wofür auch elektronenoptische Untersuchungen sprechen<sup>17, 26, 31</sup>. In den von OLIVER<sup>28</sup> an weißen Ratten durchgeführten Experimenten beispielsweise traten 10—17 Std nach intraperitonealer Eiweißinjektion hyaline Tropfen auf, die in den nächsten zwei bis drei Tagen wieder verschwanden.

Mit wesentlich höheren Eiweißdosen haben ZOLLINGER<sup>43</sup> und RÜTTIMANN<sup>32</sup> derartige tropfige Ablagerungen bei weißen Mäusen erzeugt, indem sie ihnen Eiklar in einer Menge von 10% des Körpergewichtes intraperitoneal injizierten. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stimmen mit den Beobachtungen von OLIVER<sup>28</sup> überein: Die eiweißhaltigen Tropfen in den Hauptstückepithelien wurden in den ersten 8—24 Std sehr groß und waren nach etwa 72 Std völlig rückgebildet.

In den eigenen Versuchen konnten diese Versuchsergebnisse auf die eingangs erwähnte Weise reproduziert werden. Bei der folgenden karyometrischen Erfassung von 200 Hauptstückepithelkernen jedes einzelnen Tieres haben wir die in der Tabelle 2 zusammengefaßten Werte ermittelt, die jeweils den absolut gezählten Kernen der betreffenden Klasse oder Zwischenklasse entsprechen. In Abb. 1 haben wir die gleichen Verhältnisse als Kurve dargestellt, wobei auf der Abszisse die Zeit, auf der Ordinate die durchschnittliche Kerngröße aufgetragen wurde.

Für die Auswertung der Tabelle 2 ist einerseits von den Differenzen gegenüber dem Ausgangswerte auszugehen, und andererseits ist die mittlere Abweichung (mittlerer Fehler) dieser Differenzen zu bestimmen. Bezeichnet man die

mittlere Abweichung einer Differenz mit  $\sigma_A$ , so lautet die Formel für deren Quadrat:  $\sigma_A^2 = \sigma_1^2 + \sigma_2^2$ , wobei  $\sigma_1$  und  $\sigma_2$  die mittleren Abweichungen der beiden Mittelwerte bedeuten, deren Differenz hinsichtlich ihrer Signifikanz geprüft

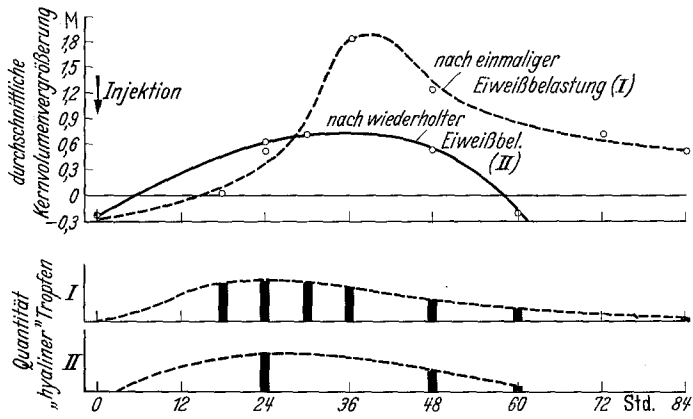


Abb. 1. Kerngrößenzunahme nach einmaliger und nach wiederholter Eiweißbelastung

Tabelle 2

	Stunden nach Injektion															
	18		24		30		36		48		60		72		84	
	Ratte															
	30A	30C	32A	32C	34A	34C	35A	35C	36A	36C	37A	37C	38A	38C	39A	39C
$K^{1/2}$																
$Z_1$	3	2			1	1								1	2	
$Z_2$	4	10	4	4	3	6			2	4	1	2	3	1	6	9
$Z_3$	47	40	17	23	17	21		4	7	8	16	16	18	16	43	52
$K_1$	89	99	73	82	45	70	9	18	32	49	51	33	56	72	80	79
$Z_1$	49	40	86	68	79	85	53	71	65	85	77	74	75	90	64	48
$Z_2$	8	7	18	19	35	17	85	79	72	40	45	50	37	18	4	9
$Z_3$		1	0	4	11		42	24	19	8	7	14	8	2	1	3
$K_2$		1	2		6		10	1	3	5	3	8	2			
$Z_1$					1		1	3		1		3	1			
$Z_2$					1											
$M$	-0,01		0,48		0,70		1,78		1,16		1,06		0,68		0,48	
$N$	400		400		400		400		400		400		400		400	

wird. Da mit Ausnahme des Ausgangswertes die Mittelwerte nur auf  $N$  von je 400 beruhen, sind deren tatsächliche mittlere Abweichungen stärker vom Zufall abhängig. Daher wird durchweg das gefundene  $\sigma_M$  des Ausgangswertes zugrunde gelegt, so daß jedes  $\sigma_A = \sigma_M / \sqrt{2} = 0,0338$  ist. Wie schon wiederholt gesagt wurde, ist in Wirklichkeit mit einem größeren Werte zu rechnen, und vorsichtigerweise kann man deshalb die Signifikanz einer Differenz noch nicht annehmen, wenn diese 2- oder selbst 3mal so groß ist wie  $\sigma_A$ , sondern muß wohl zur Annahme einer Signifikanz fordern, daß die Differenz ungefähr 0,20 Klasseneinheiten überschreitet.

Auch unter diesen Voraussetzungen zeigt die variationsstatistische Auswertung der Ergebnisse eine signifikante Kerngrößenzunahme bereits nach 18 Std.

Denn die Differenz beträgt 0,30 Klasseneinheiten ( $M$  [Ausgangswert] =  $-0,31$ ;  $M$  [Wert nach 18 Std] =  $-0,01$ ). Die Kerngröße nimmt bis zu der nach 36 Std untersuchten Tiergruppe noch weiter zu und fällt danach allmählich wieder ab. Das Maximum der Tropfenbildung ist bereits nach 18 Std erreicht. Die Menge des intracellulär abgelagerten Eiweißes nimmt also bereits wieder ab, bevor die stärkste Kerngrößenzunahme beobachtet wird.

### III. Das volumetrische Verhalten der Hauptstückepithelkerne nach wiederholter Eiweißbelastung

In der zweiten Versuchsreihe haben wir 8 Tiere wiederholt mit der gleichen Eiweißmenge belastet, und zwar in Abständen von 60 Std. Nach dieser Zeit war das in die Bauchhöhle eingespritzte Eiweiß erfahrungsgemäß total resorbiert. Von den Versuchstieren töteten wir zwei zum Zeitpunkt der dritten Eiweißinjektion der übrigen 6 Tiere. Je weitere zwei Tiere wurden 24, 48 und 60 Std später getötet.

Die ermittelten karyometrischen Meßergebnisse sind in der Tabelle 3 zusammengestellt.

Eine Gegenüberstellung mit den Ergebnissen der ersten Experimente zeigt ein differentes Verhalten der Kerngrößenzunahme nach *einmaliger* und nach *wiederholter* Eiweißbelastung (vgl. Abb. 1): Im Gegensatz zur einmaligen Eiweißgabe findet sich nach wiederholter Zufuhr eine signifikant geringere und kürzer andauernde Kernvolumenvergrößerung. Auch nimmt die Quantität der Eiweißablagerungen rascher wieder ab. Auf die Interpretation dieses Unterschiedes möchten wir später eingehen.

### IV. Karyologische Beobachtungen an den mit Hühnereiweiß belasteten Hauptstückepithelien

Um das Verhalten der funktionell belasteten Hauptstückepithelien weiter zu analysieren, haben wir die Nierenschnitte auf Vorkommen von 1. Mitosen, 2. Einzelzellnekrosen und 3. doppelkernigen Zellen untersucht. Vergleichbare Werte haben wir aus jeweils 10 Gesichtsfeldern bei 500facher Vergrößerung gewonnen.

*Mitosen* kommen in Nieren ausgewachsener Versuchstiere äußerst selten vor. Wir fanden bei der Durchsicht von 100 Gesichtsfeldern bei den Kontrolltieren nur eine einzige Kernteilungsfigur. Diese Angaben stimmen mit Beobachtungen des Schrifttumes<sup>9, 11, 27, 35, 36, 40</sup> überein. BUCHER und GAILLOUD geben in den Nierenhauptstücken weißer Mäuse eine Mitosehäufigkeit von  $0,4\%$  an; nach der von ihnen gewählten Art der funktionellen Belastung lag sie zwischen  $0-1\%$ . In den Nieren unserer Versuchstiere ließ sich eine signifikante Zunahme der

Tabelle 3

	Stunden nach Injektion							
	0		24		48		60	
	Ratte							
	41B	41C	42B	42C	43B	43C	44B	44C
$K^{1/2}$			1		1		2	1
$Z_1$	2	4	2		1		2	1
$Z_2$	14	32	8		2	4	8	16
$Z_3$	62	59	22	12	18	21	44	72
$K_1$	67	70	62	70	88	80	96	93
$Z_1$	38	29	62	88	70	64	40	18
$Z_2$	14	4	37	23	16	22	6	
$Z_3$	2	0	4	4	2	5	2	
$K_2$	0	2	0	1	2	4	1	
$Z_1$	1		2	1			1	
$Z_2$				1				
$M$	-0,27		0,64		0,49		-0,25	
$N$	400		400		400		400	

Mitosenhäufigkeit 60 bzw. 72 Std nach *einmaliger* und 48 bzw. 60 Std nach *wiederholter* Belastung erkennen. Dabei handelte es sich in der Regel um Pro- und Metaphasen.

In der Literatur finden sich Angaben über das gehäufte Auftreten von Mitosen nach ausgedehnter Zerstörung der Tubulusepithelien, z.B. nach Sublimatvergiftung oder nach Vergiftung mit chromsaurem Kalium (vgl. <sup>36, 37</sup>). Besonders interessant ist die Tatsache, daß sie auch nach einer gewissen Latenz in der verbliebenen, sich kompensatorisch vergrößernden Niere nachzuweisen sind, in den von SULKIN<sup>34</sup> an weißen Ratten durchgeführten Experimenten beispielsweise 72—240 Std nach der einseitigen Nephrektomie. Hier wie auch in unseren Versuchen geht der gesteigerten Mitoseaktivität eine starke funktionelle Belastung voraus. Es liegt auf der Hand, daß es sich auch in unserem Fall um eine regeneratorsche Zellvermehrung handelt, da offensichtlich als Folge einer cellulären Überbelastung immer wieder *Einzelzellnekrosen* im Schnitt beobachtet werden konnten.

Derartige mit homogenisiertem Plasma und mehr oder weniger pyknotischen Kernen versehene untergehende oder untergegangene Epithelien liegen zunächst noch im Zellverband, lösen sich aber bald ab und werden mit dem Harnstrom fortgespült. Sie können daher oft frei im Lumen der Harnkanälchen oder der Sammelrohre beobachtet werden. Während wir in den Kontrollschnitten nur zwei Nekrosen in 100 Feldern gefunden hatten, waren sie bereits 18 Std nach Eiweißbelastung reichlich nachzuweisen. Ihre Zahl nahm nach wiederholter Eiweißbelastung jedoch nicht weiter zu, man kann nur sagen, daß sie während der ganzen Zeit der Eiweißbelastung gegenüber der Norm deutlich vermehrt auftreten.

*Doppelkerne.* Wegen der Schwierigkeit, die einzelnen Hauptstückepithelien gegeneinander abzugrenzen, ist die Diagnose echter Doppelkerne oft nicht sicher. Wir haben uns deshalb bei der Auszählung auf solche Fälle beschränkt, in denen die Kerne unmittelbar nebeneinander lagen. Daß man bei jeglicher Auszählung doppelkerniger Zellen nur einen Bruchteil der im Schnitt wirklich vorhandenen erfaßt, hat PRÜHL<sup>29</sup> ausführlich dargelegt. Wir haben jedoch auf die Berechnung ihrer wirklichen Anzahl verzichtet, da es uns lediglich auf Überschlagswerte ankam und da wir außerdem bei unseren Messungen nur mit relativen und nicht mit den für die Pfuhschen Formeln nötigen absoluten Zahlenwerten gearbeitet haben.

Bei diesem Vorgehen konnten wir in den nach 60, 72 und 84 Std gewonnenen Nieren *einmal* belasteter Tiere eine signifikante Zunahme der doppelkernigen Zellen nachweisen, denn ihre Zahl war gegenüber dem in Kontrollnieren ermittelten Durchschnitt von 16 auf 35 pro 10 Gesichtsfelder angestiegen. In den *wiederholt* mit Eiweiß belasteten Nieren lag der ermittelte Durchschnittswert bei 26, also ebenfalls noch signifikant höher als in den Kontrollnieren. SULKIN<sup>34</sup> fand ähnliche Verhältnisse nach einseitiger Nephrektomie: Die Zahl der doppelkernigen Zellen stieg gegenüber den in Kontrollnieren gefundenen Werten um das Zwei- bis Dreifache an. Auch BUCHER und GAILLOUD<sup>9</sup> stellten nach funktioneller Belastung bei weißen Mäusen eine gesicherte Zunahme der zweikernigen Zellen fest. Bei der planimetrischen Bestimmung der Kerngrößen solcher Zellen ergab sich uns, daß jeder Nucleus stets dem Volumen  $K_1$  entsprach. Überdies

ließ sich nachweisen, daß die in den gleichen Schnitten vorkommenden Großkerne, die nur bei einer das ganze Präparat umfassenden Sonderauszählung zahlenmäßig hervortreten, der Klasse  $K_2$  angehören, also ebenso groß sind wie die beiden Kerne binucleärer Zellen zusammen. Diese Tatsache legt den Gedanken nahe, diese doppeltgroßen, in ihrer Chromatindichte aber denen der Regelklasse entsprechenden Kerne möchten das Resultat einer endomitotischen Chromosomenvermehrung und die zweikernigen Elemente die Folge einer anschließenden äqualen Amitose sein (vgl. <sup>9, 11, 35, 40</sup>). Dabei wäre dann noch

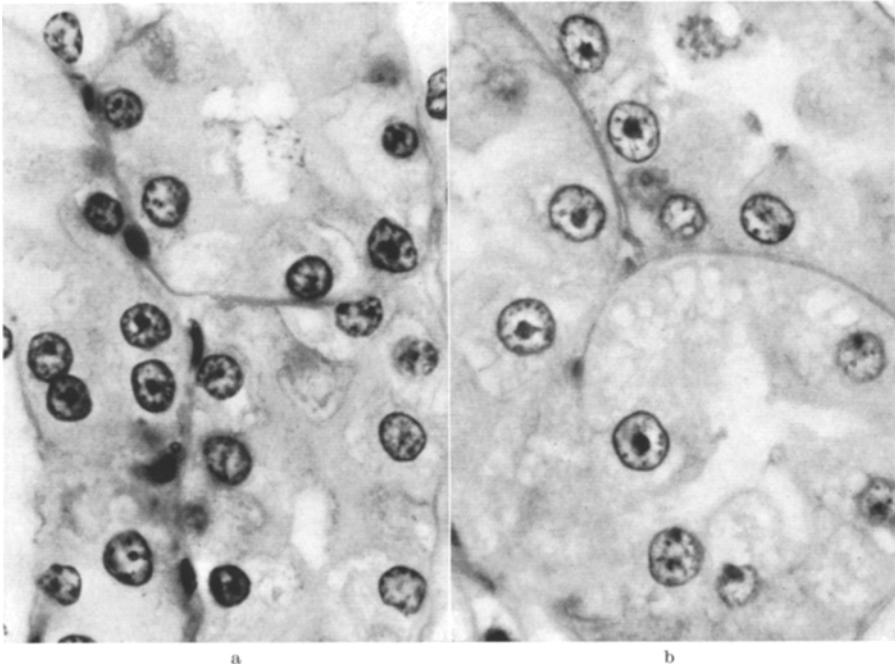


Abb. 2a u. b. Hauptstückepithelien weißer Ratten. a Normales Kontrolltier. b Tier 35 A, 36 Std nach intraperitonealer Eiweißinjektion, Bouin, van Gieson, 1500fach

darauf hinzuweisen, daß eine solche Kerndurchschnürung eine Oberflächenvergrößerung mit sich bringt, welche den Stoffaustausch zwischen Kern und Cytoplasma erleichtert und daher gerade für funktionell besonders beanspruchte Zellen mit gesteigerter nuclearer Aktivität von Vorteil sein muß.

Daß in unserem Falle mit einer solchen nuclearen Leistungssteigerung gerechnet werden darf, dafür spricht auch die Änderung im nuclearen Feinbau (vgl. <sup>1, 2</sup>), die in der Abb. 2 mit ihrer Gegenüberstellung normaler und belasteter Hauptstückepithelien gut zum Ausdruck kommt. Die Kerne der Kontrolltiere sind vergleichsweise klein, chromatindicht und mit einem kleinen, ebenfalls recht dichten Nucleolus von meist zentraler Lagerung versehen, der von einer kontinuierlich erscheinenden, allenfalls hier und da körnig verdickten „Chromatinschale“ umgeben ist. Demgegenüber sind die Kerne behandelter Tiere — besonders gut erkennbar 36 Std nach der Eiweißinjektion — sehr viel lockerer gebaut, weshalb sich das Kernkörperchen auch weit besser abhebt. Überdies ist es ebenfalls merklich vergrößert und stellenweise sogar vacuolisiert, ferner oftmals unregel-

mäßig gestaltet und etwas ausgezackt. Dabei weist die DNS-haltige chromosomale Begrenzung jetzt eine diskontinuierliche, deutlich körnige Beschaffenheit auf. Auch membranwärts gerichtete Ausläufer sind zu erkennen, manchmal einer, manchmal zwei oder drei, und ebenso scheint eine randständige Lagerung des gesamten Kernkörperchens etwas häufiger zu sein.

### Besprechung

Nach dem geschilderten morphologischen Bild der Zellkerne kann es keinem Zweifel unterliegen, daß in den eiweißbelasteten Nieren Kernveränderungen gefunden werden, die als Ausdruck einer gesteigerten Funktion gewertet werden müssen. Damit ist gleichzeitig bewiesen, daß die variationsstatistisch gesicherte Kerngrößenzunahme während des intracellulären Eiweißabbaues als funktionelle Kernschwellung im Sinne BENNINGHOFFS<sup>5</sup> zu interpretieren ist und durch eine gesteigerte Hydratation und Entspiralisation der Ruhekern-Chromosomen zustande kommt (vgl. <sup>1, 2</sup>). Eine solche Aktivitätserhöhung des Kernes könnte damit zusammenhängen, daß er die Bildung der für die beanspruchte Zellfunktion notwendigen eiweißhaltigen Fermente induziert. Obschon der intracelluläre Eiweißabbau gewiß eine komplexe Leistung der ganzen Zelle darstellt, bei der die Mitochondrien eine sehr bedeutsame Rolle spielen (<sup>17, 26, 28, 30, 31, 43 u. a.</sup>), so bleibt der Einfluß des Zellkernes offenbar doch unentbehrlich (vgl. <sup>12, 38</sup>), vornehmlich dann, wenn von der Zelle eine ungewohnte Leistung gefordert wird, auf die sie noch nicht eingestellt ist. Damit dürfte es zusammenhängen, daß die Volumenvermehrung der Kerne nach der ersten Zufuhr des körperfremden Eiweißes so besonders augenfällig ist, hatte sich in unserer zweiten Versuchsreihe doch gezeigt, daß nach wiederholter Eiweißbelastung keine so deutliche Kernschwellung mehr zu beobachten ist. Daß dies nicht auf einen Erschöpfungszustand der Zelle deutet, bei dem weniger Eiweiß aufgenommen wird, läßt sich daran erkennen, daß auch unter diesen Bedingungen zahlreiche intracelluläre Eiweißtropfen sichtbar werden. Bei der nachfolgenden schnelleren Umsetzung der Eiweißtropfen handelt es sich daher offenbar um das Ergebnis einer inzwischen eingetretenen Anpassung der Zelle an die von ihr geforderte spezielle Aufgabe.

### Zusammenfassung

Durch karyometrische Untersuchungen an Hauptstückepithelien weißer Ratten wird nach experimentell erzeugter Eiweißnephrose eine Kernschwellung nachgewiesen, die bei der angewandten Versuchsanordnung nach 84 Std noch nicht wieder völlig abgeklungen ist.

Nach wiederholter Eiweißbelastung ist die Kernvolumenvergrößerung geringer und hält kürzere Zeit an.

Das differente Verhalten der Zellkerne nach einmaliger und nach wiederholter Eiweißbelastung wird als Ausdruck einer Anpassung der Zelle an eine ihr aufgezwungene Leistung gedeutet. Auf die statistisch gesicherte Zunahme zweikerniger Zellen und Mitosen wird hingewiesen.

Die karyologischen Beobachtungen sprechen dafür, daß es sich bei der Kernvergrößerung um eine funktionelle Kernschwellung handelt.

### Summary

In experimentally induced protein nephrosis in white rats, by means of karyometric studies on the proximal convoluted tubule epithelium, a nuclear swelling can be demonstrated. With the experimental conditions employed the nuclear swelling has not completely disappeared after 84 hours.

With repeated overloading of protein the nuclear enlargement becomes less and lasts for a shorter period.

This different behavior of the cell nucleus after a single and after repeated protein overloadings is interpreted as indicating an adaptation of the cell to a function forced upon it. Reference is made to the increase of bi-nucleated cells and mitoses, supported by statistical counts.

The karyological observations support the concept, that the nuclear enlargement is a functional swelling.

### Literatur

- <sup>1</sup> ALTMANN, H.-W.: Zur Morphologie der Wechselwirkung von Kern und Cytoplasma. *Klin. Wschr.* **33**, 306—314 (1955). — <sup>2</sup> ALTMANN, H.-W.: Allgemeine Morphologie der Zelle. In *Handbuch der gesamten Hämatologie*, 2. Aufl., Bd. I/1, S. 85—128. München, Berlin u. Wien: Urban & Schwarzenberg 1957. — <sup>3</sup> AMBROSIUS, H.: Über die Genauigkeit und zeitliche Rentabilität von Zellkern-Meßmethoden. *Mikroskopie* **8**, 95—102 (1953). — <sup>4</sup> BACHMANN, K. D.: Über die Nierenfunktion bei Durst und Diurese. *Ärzt. Forsch.* **4**, 577—583 (1950). — <sup>5</sup> BENNINGHOFF, A.: Funktionelle Kernschwellung und Kernschrumpfung. *Anat. Nachr.* **1**, 50—52 (1949/51). — <sup>6</sup> BRÜGGER, W.: Funktionsbedingte Unterschiede der Kerngröße im Schmelzorgan. *Acta anat. (Basel)* **7**, 345—365 (1949). — <sup>7</sup> BUCHER, O.: Zur Methodik karyometrischer Untersuchungen an Gewebekulturen. *Mikroskopie* **5**, 124—131 (1950). — <sup>8</sup> BUCHER, O.: Caryometric studies of tissue cultures. *Int. Rev. Cytol.* **3**, 69—111 (1954). — <sup>9</sup> BUCHER, O., u. C. GAILLOUD: Zum Verhalten der Zellkerne bei verschiedenen Funktionszuständen der Nierenkanälchen. *Bull. schweiz. Akad. med. Wiss.* **14**, 254—272 (1958). — <sup>10</sup> BUCHER, O., u. R. GATTIKER: Karyometrische Untersuchungen an Gewebekulturen. V. Beitrag zur statistischen Verarbeitung des Zahlenmaterials. *Z. Zellforsch.* **37**, 56—88 (1952). — <sup>11</sup> CLARA, M.: Untersuchungen über Wachstum und Regeneration der Nierenepithelien. *Z. Anat.* **104**, 103—132 (1935). — <sup>12</sup> CLARK, A. M.: Some physiological functions of the nucleus in amoeba, investigated by micurgical methods. *Austral. J. exp. biol. med. Sci.* **21**, 215—280 (1943). — <sup>13</sup> DIEFENBACH, H., u. K. FEDERKIN: Vergleichende Kernmessungen an lebensfrischen und verschieden fixierten Leberzellen. *Frankfurt. Z. Path.* **66**, 16—23 (1955). — <sup>14</sup> FEDERKIN, K., u. E. KÖSTER: Einfluß der verschiedenen Fixierungsmittel auf die Kerngröße. *Frankfurt. Z. Path.* **65**, 493—502 (1954). — <sup>15</sup> FREERKSEN, E.: Ein neuer Beweis für das rhythmische Wachstum der Kerne durch vergleichende volumetrische Untersuchungen an Zellkernen von Meerschweinchen und Kaninchen. *Z. Zellforsch.* **18**, 362—399 (1933). — <sup>16</sup> FREUDENBERG, K.: Persönliche Mitteilung. — <sup>17</sup> GANSLER, H., u. C. ROULLER: Modifications physiologiques et pathologiques du Chondriome. *Schweiz. Z. Path.* **19**, 217—243 (1956). — <sup>18</sup> HENNIG, A.: Das Problem der Kernmessung, eine Zusammenfassung und Erweiterung der mikroskopischen Meßtechnik. *Mikroskopie* **12**, 174—202 (1957). — <sup>19</sup> HINTZSCHE, E.: Statistische Probleme aus der Kerngrößenforschung. *Experientia (Basel)* **1**, 103—110 (1945). — <sup>20</sup> HINTZSCHE, E.: Über Normalkurven der Kerngrößenverteilung. *Mitt. naturforsch. Ges. Bern, N. F.* **4**, 19—27 (1946). — <sup>21</sup> HINTZSCHE, E., u. E. TANNER: Über Beziehungen zwischen Nahrungsaufnahme und Kerngröße des Darmepithels. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **42**, 165—192 (1937). — <sup>22</sup> INKE, G., M. PALKOVITS, I. GYÁRFÁS u. A. BAJTAR: Über methodische Fragen der Kernvariationsstatistik. IV. Wirkung der verschiedenen Fixier- und Einbettungsmethoden auf das Kernvolumen. *Acta morph. Acad. Sci. hung.* **8**, 233—251 (1958). — <sup>23</sup> JACOBI, W.: Über das rhythmische Wachstum der Zellen durch Verdoppelung ihres Volumens. *Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org.* **106**, 124 bis 192 (1925). — <sup>24</sup> JACOBI, W.: Volumetrische Untersuchungen an den Zellkernen des Menschen und das allgemeine Problem der Zellkerngrößen. *Anat. Anz.* **72**, Erg.-H., 236—247

(1931). — <sup>25</sup> KRANTZ, H.: Kern und Funktion I: Die Kerngröße und ihre Abhängigkeit von äußeren und inneren Faktoren. *Z. Zellforsch.* **35**, 425—475 (1951). — <sup>26</sup> MILLER, F., u. H. SITTE: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Mäusenieren nach intraperitonealen Eiweißgaben. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **39**, 183—190 (1956). — <sup>27</sup> MÖLLENDORFF, W. v.: Exkretionsapparat. Niere. In *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Bd. VII/1, S. 1—257. Berlin: Springer 1930. — <sup>28</sup> OLIVER, J., McDOWELL and M. YIN CHEN LEE: The structural aspects of proteinuria; tubular absorption, droplet formation and disposal of proteins. *J. exp. Med.* **99**, 589—604 (1954). — <sup>29</sup> PFUHL, W.: Untersuchungen über zweikernige Zellen. I. Die Berechnung der zweikernigen Zellen nach der Auszählung im mikroskopischen Schnitt. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **22**, 557—578 (1930). — <sup>30</sup> RADERATH, E., u. A. BOHLE: Die Pathomorphologie der Nierenausscheidung. In *Handbuch der allgemeinen Pathologie*, Bd. V/2, S. 140—293. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959. — <sup>31</sup> RHODIN, J.: Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. An electron microscopic study including an experimental analysis of the conditions for fixation of the renal tissue for high resolution electron microscopy. Stockholm 1954. — <sup>32</sup> RÜTTIMANN, A.: Über Aufbraucherscheinungen und Neubildung der Mitochondrien in den Nierenhauptstücken nach Speicherung. *Schweiz. Z. Path.* **14**, 373—387 (1951). — <sup>33</sup> SCHMIEDT, E.: Zellkerngröße und sog. kompensatorische Hypertrophie der Mäuseniere. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **57**, 249 bis 275 (1951). — <sup>34</sup> SULKIN, M.: Cytologic studies of the remaining kidney following unilateral nephrectomy in the rat. *Anat. Rec.* **105**, 95—107 (1949). — <sup>35</sup> STAEMMLER, M.: Über physiologische Regeneration und Gewebsverjüngung. *Beitr. path. Anat.* **80**, 512—567 (1928). — <sup>36</sup> STAEMMLER, M.: Die Harnorgane. In *Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie*, begr. v. E. KAUFMANN, Bd. 2, S. 405—899. Berlin: Walter de Gruyter 1957. — <sup>37</sup> THOREL, C.: Pathologisch-anatomische Beobachtungen über Heilungsvorgänge bei Nephritis. *Dtsch. Arch. klin. Med.* **77**, 29—68 (1903). — <sup>38</sup> VERWORN, M.: Die physiologische Bedeutung des Zellkernes. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **51**, 1—118 (1891). — <sup>39</sup> VOSS, H.: Volumetrische Bestimmung kugelförmiger Kerne mit der indirekten oder Planimetermethode. *Anat. Anz.* **98**, 41—46 (1951). — <sup>40</sup> WERMEL, E. M., u. Z. P. IGNATJEWA: Studien über Zellengröße und Zellenwachstum. I. Mitt. Über die Größenvariabilität der Zellkerne verschiedener Gewebsarten. *Z. Zellforsch.* **16**, 674—688 (1932). — <sup>41</sup> WILFINGSEDER, P.: Karyometrik. *Mikroskopie* **3**, 243—250 (1948). — <sup>42</sup> WÜSTENFELD, E., u. F. H. SPRENGER: Variationsstatistische Untersuchungen an den Sinneszellkernen des Cortischen Organes von Meeresschweinchen. *Z. Zellforsch.* **48**, 720—734 (1958). — <sup>43</sup> ZOLLINGER, H.: Über hyalintropfige Veränderungen der Nierenhauptstücke als Ausdruck von Eiweißspeicherung. *Schweiz. Z. Path.* **13**, 147—163 (1950).

Dr. CHRISTOPH POLSTER,  
Pathologisches Institut der Freien Universität Berlin  
Westend-Krankenhaus, Spandauer Damm 130