

Aus dem Department of Pathology, Dartmouth Medical School Hanover,
New Hampshire, USA

Phenolrotausscheidung und Trypanblauspeicherung bei der Blei-Nephropathie der Ratte* **

Von

FREDERICK D. DALLENBACH

Mit 8 Textabbildungen, davon 3 farbigen

(Eingegangen am 13. Juli 1964)

Die nach chronischer Bleivergiftung in den Tubulusepithelien der Niere bei Mensch und Tier auftretenden *Kerneinschlüsse* sind oft beschrieben worden (BLACKMAN; FINNER und CALVERY; FAIRHALL und MILLER; CHIODI und CARDEZA; WACHSTEIN; ZOLLINGER; ZAK und FINKELSTEIN; TÖNZ; BRACKEN et al.; ISING und VOIGT; LANDING und NAKAI; BEAVER; ANGEVINE et al.; BOYLAND et al.; VAN ESCH et al.; KILHAM et al.; MÜLLER und v. RAMIN; s. Abb. 1 und 2). Über ihre Zusammensetzung, Entstehung und Bedeutung ist bisher wenig bekannt.

Der *direkte histochemische Nachweis von Blei* in den Kerneinschlüssen nach Bleivergiftung ist bis heute nicht gelungen, vor allem wohl deshalb nicht, da die in den Einschlüssen enthaltene Bleimenge offenbar zu klein ist und sich so dem histochemischen Nachweis entzieht (TÖNZ; LANDING und NAKAI; BEAVER).

Dagegen gelingt der indirekte Nachweis von unspezifischen Schwermetall-sulfiden in diesen Einschlüssen (TIMM und NETH; ISING und VOIGT; VOIGT und JONSSON). Vor kurzem durchgeführte eigene *radioautographische Untersuchungen* (DALLENBACH et al.) mit radioaktivem Blei (Pb^{210}) zeigen, daß die Kerneinschlüsse Blei enthalten (Abb. 3). An ihrer Bildung muß also entweder Blei selbst oder eine vielleicht im Körper daraus entstandene Bleiverbindung, die vom Zellkern aufgenommen wird, beteiligt sein.

Die Kerneinschlüsse enthalten ferner wechselnde Mengen von RNS (ZOLLINGER; DALLENBACH und KILHAM; s. Abb. 6) sowie Proteine, Lipide (WACHSTEIN; WOLMAN) und gelegentlich spärliche Kohlenhydrate, aber keine DNS (WOLMAN; KILHAM et al.), wie früher angenommen (BRACKEN et al.). Diese Ergebnisse machen es sehr wahrscheinlich, daß die Einschlüsse entweder durch Blei veränderte Nucleoli (WACHSTEIN; ZOLLINGER) sind oder nucleäre Boten-RNS und Histone, die in irgendeiner Weise durch das vom Kern aufgenommene Blei präcipitiert werden, oder RNS-haltige Cytoplasmaintülpungen.

Die Literatur der letzten Jahre enthält zahlreiche Untersuchungen über die Bedeutung des Nucleolus für die Funktion der Zelle. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen legen es sehr nahe, daß der Nucleolus durch seine RNS aktiv an der Regulierung der Proteinsynthese in der Zelle beteiligt ist (HYDÉN; CASPERSSON; STOCKINGER; OHNO und KINOSITA; HERTL; McMMASTER-KAYE und TAYLOR; STICH; AMANO und LEBLOND; BEERMANN; LONGWELL und SVIHLA; PERRY; ERRERA et al.; OEHLMER; PERRY et al.; SCHULTZE et al.; SIRLIN et al.; SIRLIN; BIRNSTIEL et al.; CASPERSSON et al.; CHIPCHASE und BIRNSTIEL; WATSON; HARRIS). Umgekehrt wird die Bildung der nucleären RNS höchstwahrscheinlich vom Cytoplasma aus reguliert.

* Herrn Prof. HAMPERL zum 65. Geburtstag gewidmet.

** Diese Arbeit wurde mit Mitteln des United States Public Health Service, Grant GM-10210 durchgeführt.

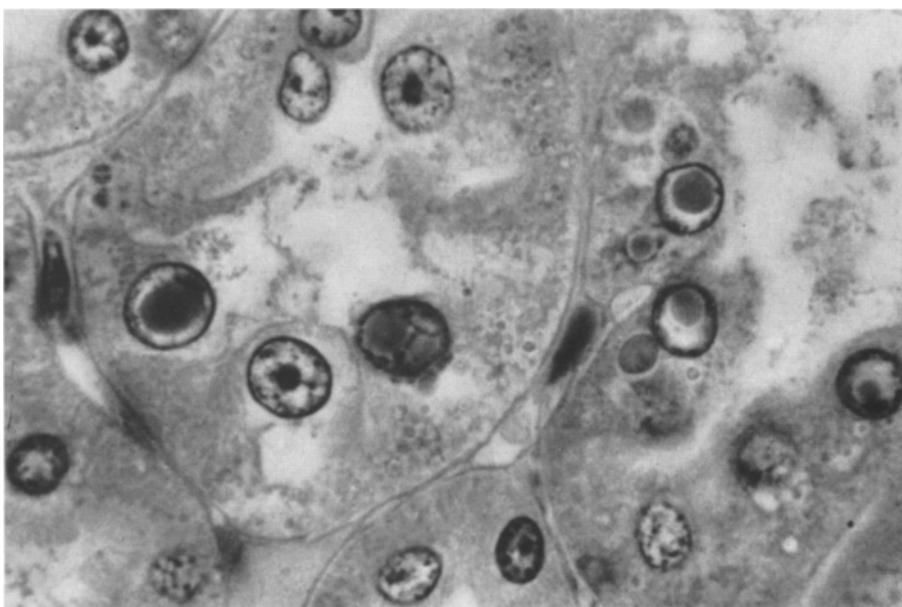


Abb. 1. Querschnitte durch Hauptstückkanälchen aus der Pars recta von einer Ratteniere nach chronischer Bleivergiftung. Glasig-homogene Einschlüsse in vielen Kernen der Tubulusepithelien, deren Cytoplasma eine körnig-vacuolige Degeneration aufweist. Färbung: Hämatoxylin-Eosin. Vergr. 1200mal

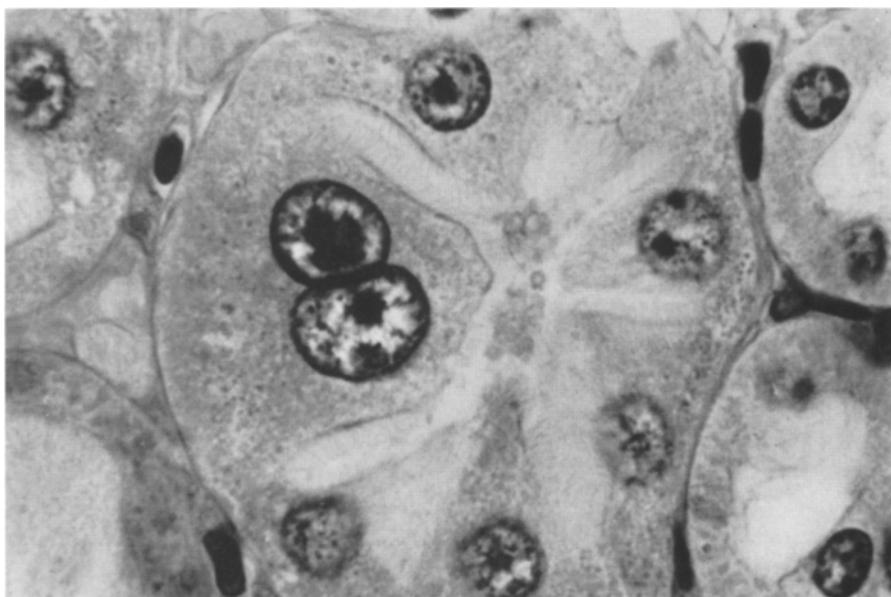


Abb. 2. Hauptstückkanälchen (Pars recta) aus einer Ratteniere nach chronischer Bleivergiftung. Stark vergrößerte Tubuluszelle mit zweigroßen, atypischen Kernen (Endomitose) und körnigem Cytoplasma. Färbung: Hämatoxylin-Eosin. Vergr. 1200mal

Ausgehend von diesen Befunden und im Hinblick auf die Tumorentwicklung in bleigeschädigten Nieren erschien es von Interesse, die funktionelle Kapazität

der mit großen Kerneinschlüssen beladenen Nierentubulusepithelien mit Hilfe der Vitalspeicherung und Ausscheidung von Farbstoffen zu untersuchen. Da die Einschlüsse RNS enthalten, lag die Annahme nahe, daß zumindest die Funktion solcher Zellen gestört sei und sich dieses z. B. in einer Unfähigkeit des Farbstofftransports äußern würde. Von den sie umgebenden Epithelzellen ohne Kerneinschlüsse dagegen war eine normale Farbstoffverarbeitung zu erwarten. Eine über lange Zeit gestörte Zellfunktion bei erhaltener Lebensfähigkeit der Zelle würde

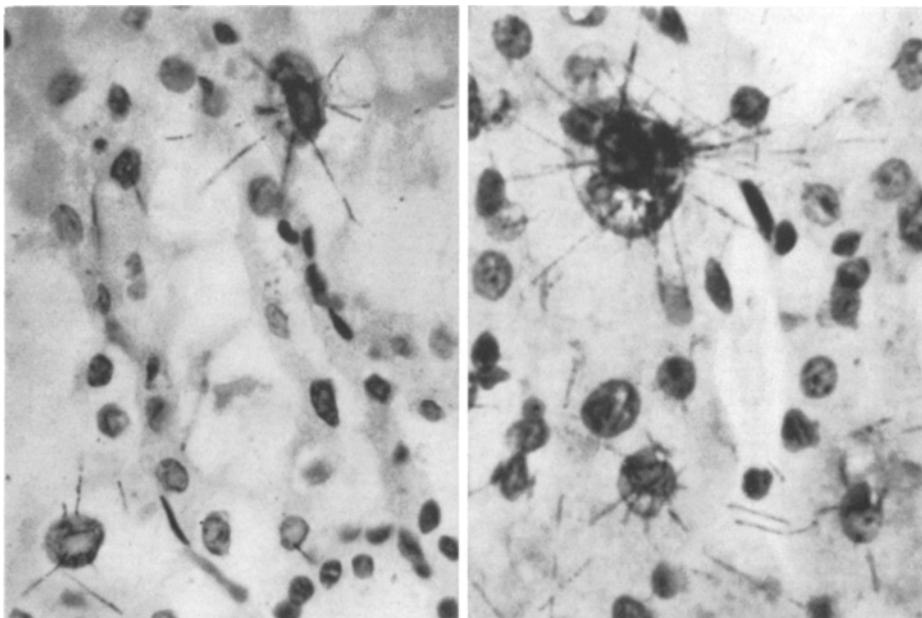


Abb. 3. Radiohistogramm einer Rattenniere nach 10monatelangem Zusatz von 1%igem Bleiacetat zum Trinkwasser und 4 Wochen lang jeden 2. Tag durchgeführten intraperitonealen Injektionen von je 1 ml radioaktiven Bleis ($Pb\ 210$, 9 uc/ml). Konzentrisch von den Kerneinschlüssen in vergrößerten Epithelkernen der Tubuli ausgehende Silberkornstrahlen (α -Strahlen). Vergr. 480mal

möglicherweise ein Licht auf die Tumorentwicklung im Bereich der durch Bleivergiftung geschädigten Nierentubuli werfen können.

Da die normale Ausscheidung von Phenolrot (GERSH; TAGGART und FORSTER, ROLLHÄUSER; ROLLHÄUSER und VOGELL; WÖLKER) und die Vitalspeicherung von Trypanblau (HÖBER; SUZUKI; v. MÖLLENDORF; PFUHL; ZIMMERMANN et al.; TRUMP) durch die Nierentubulusepithelien schon genau untersucht worden sind, wurden diese beiden lichtmikroskopisch gut verfolgbaren Farbstoffe zur Prüfung von Ausscheidungsfunktion und Speicherungsfähigkeit der Nierenepithelien mit Kerneinschlüssen nach chronischer Bleivergiftung angewandt.

Material und Methode

A. Ausscheidung von Phenolrot

Sechs männliche und 4 weibliche Sprague-Dawley-Ratten zwischen 211 und 451 g Körpergewicht hatten $20^{1/2}$ —25 Monate lang als Trinkwasserzusatz basisches Bleiacetat (1%ig in Aq. dest.) erhalten und zusätzlich die handelsübliche Rattentrockenfütterung. Je 1 ml/200 g Körpergewicht einer sterilen physiologischen Kochsalzlösung, der pro Milliliter 6 mg Phenolrot

zugesetzt waren (0,6%ige Phenolrotlösung von Hynson, Westcott & Dunning, Inc.) wurde den Tieren unter Äthernarkose¹ in die Zungenvenen, Femoralvenen oder Vena cava inferior innerhalb von 5—10 sec injiziert. 45—60 sec nach der Injektion wurden die Arterien und Venen der linken Niere abgeklemmt, die Niere sofort herauspräpariert und mit Rasierklingen in 7—8 jeweils 2 mm dicke Scheiben zerlegt. 5—7 mm im Quadrat messende Teile dieser Scheiben wurden dann auf $\frac{1}{12}$ mm dicke Kupferplättchen gelegt, die vibrations- und lärm-sicher geformt waren. Das Gewebe wurde auf diesen Plättchen, die der Plattform des Gefrierapparates (nach THORNBURG) auflagen, in einem Strom von Stickstoffgas bei -190°C gefroren (Durchströmungsdruck $68,9 \times 10^4 \mu\text{b}$). Die Zeit des Gefrierens schwankte von 2—7 sec je nach Größe der Gewebestücke, wobei die dem Kupferplättchen aufliegenden Anteile zuerst einfroren. Die so gefrorenen Gewebestücke wurden bei -65°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. 4—5 min nach der Phenolrotinjektion wurden die Gefäße der rechten Niere abgeklemmt, diese Niere ebenfalls herauspräpariert und in gleicher Weise weiterverarbeitet wie die linke Niere. Die rechte Niere erschien bei allen Tieren etwas röter als die linke. Die Ratten wurden danach durch Aortenpunktion exsanguiniert und das Blutserum zur Bestimmung des Blutharnstickstoffs benutzt.

Zur Kontrolle dienten 3 männliche und 2 weibliche Ratten von 253—462 g Körpergewicht, die normales Trinkwasser und die gleiche Ernährung wie die Versuchstiere erhalten hatten. Die Injektion von Phenolrot und die Weiterverarbeitung erfolgte in der gleichen Weise wie bei den Versuchsratten.

Von der Aufbewahrung bei -65°C gelangten die Gewebestücke in eine Trockenkammer bei -75°C , die auf ihrem Boden Paraffin enthielt. Die Trockenkammer war an einen Gefriertrockenapparat angeschlossen, der 72 Std lang bei -40°C und in einem Vakuum von 10^{-4} mm Hg lief (GERSH; GERSH und STEPHENSON; NEUMANN); anschließend Einbettung der Gewebestücke in dem in der Trockenkammer befindlichen Paraffin. 8—20 μ dicke Schnitte, etwa 50 pro Gewebsstück, wurden nach der Methode von ROLLHÄUSER mit Ammoniakdämpfen behandelt und sofort mikroskopisch untersucht.

B. Vitalspeicherung von Trypanblau

Sieben männliche und 9 weibliche Sprague-Dawley-Ratten zwischen 222 und 415 g Körpergewicht hatten 19—23 Monate lang den gleichen Zusatz von basischem Bleiacetat zum Trinkwasser und die gleiche Ernährung erhalten wie die Tiere der Gruppe A. 48 und 24 Std vor dem Tode erhielten sie je eine intraperitoneale Injektion von 1 ml/200 g Körpergewicht einer sterilen physiologischen Kochsalzlösung, der pro Milliliter 10 mg Trypanblau (diamine blue 3 B, C.I. 477, Allied Chemical Corp.) zugesetzt waren (1%ige Lösung). Die Tiere wurden in Äthernarkose durch die Aorta exsanguiniert, das Blutserum zur Bestimmung des Blutharnstickstoffs benutzt und die Nieren in frisch zubereiteter Susalösung fixiert zur Erhaltung des Farbstoffes im Gewebe (PFUHL; SCHMIDT).

Zur Kontrolle dienten 3 männliche 291—450 g schwere Ratten, die normales Trinkwasser und die gleiche Rattenfütterung wie die Versuchstiere erhalten hatten.

Ergebnisse

A. Ausscheidung von Phenolrot

1. Ratten nach chronischer Bleivergiftung. Die Nieren dieser Tiere zeigen mehr oder weniger hochgradige Erweiterungen der Tubuli bis zur Cystenbildung (Abb. 4), Hyperplasien der Tubulusepithelien bis zur Bildung von Adenomen, Ablagerung von Blutpigment im Cytoplasma der Tubulusepithelien, interstitielle Fibrose, chronische Entzündung, Gefäßveränderungen, und Kristall- und Stein-

¹ Der Äthernarkose wurde der Vorzug gegeben, da während dieser die Injektion, Freilegung und Abklemmung der Gefäße mit Unterbindung der Blutzufuhr zur Niere zeitlich genau kontrolliert werden konnte. Außerdem waren die Tiere während der Narkose nicht erregbar, was sich ungünstig auf die Ausscheidungsverhältnisse hätte auswirken können. Bei einer Tötung durch Nackenschlag schlägt erfahrungsgemäß das Herz eine unbestimmte Zeit lang weiter.

bildungen in den Tubuli. Der Grad dieser pathologischen Veränderungen schwankt nicht nur von Tier zu Tier, sondern auch innerhalb einer Niere.

Die Tubuli dieser Nieren weisen nach Phenolrotinjektion in den gefriergetrockneten Schnitten eine mit der *Lupenvergrößerung* erkennbare verschiedengradige Rotfärbung auf, obwohl der Farbstoff allen Tieren in ganz konstanter, zum Körpergewicht proportionaler Menge injiziert worden war. Bei einigen Tieren erscheint diese Färbung selbst in den nur $8\text{ }\mu$ dicken Schnitten intensiv rot und bleibt mehr als 24 Std lang gut lokalisiert, während sie bei anderen Tieren und zum Teil in anderen Abschnitten der gleichen Niere weniger deutlich ist und trotz anhaltend zugeführter Ammoniakdämpfe auf Schnitt und Eindeckungsmedium bereits nach 15—20 min orange-gelb wird. Die somit von Tier zu Tier und auch innerhalb der gleichen Niere schwankende Intensität der Rötung erscheint in erster Linie abhängig zu sein vom Schweregrad der pathologischen Veränderungen, d. h. von der Ausdehnung der Gefäßveränderungen (mangelhafte Blutzufuhr) sowie von Zahl und Sitz der Adenome und Cystenbildungen (Verschluß von Kanälchen). Ein nennenswerter Unterschied in der Farbintensität der 1 min nach der Phenolrotinjektion entnommenen linken und der 5 min später entnommenen rechten Niere findet sich nicht. Ebenfalls finden sich keine Unterschiede zwischen den Nieren der männlichen und denen der weiblichen Tiere. Durch hochgradige Erweiterung der Tubuli ist die normale Nierenarchitektur stellenweise so weitgehend zerstört, daß die Identifizierung von Nephronabschnitten nur noch auf Grund ihrer Lage möglich ist. Im allgemeinen ist aber in allen Nieren die Rotfärbung der Tubuli im Bereich der Pars recta der Hauptstücke (in den Markstrahlen und im Außenstreifen des Marks) am stärksten (Abb. 7b).

Mit stärkerer und stärkster Vergrößerung des Lichtmikroskops lassen sich in Richtung des Ausscheidungsweges folgende Befunde erheben: Nur wenige *Glomeruli* sind rosa gefärbt, während andere in ihrer direkten Nachbarschaft ungefärbt erscheinen. Die Farbverteilung ist diffus über die Capillarschlingen ausgebreitet. Eine *Basalmembran* läßt sich färberisch nicht sicher von den übrigen Zellstrukturen abgrenzen. Auch die Mitochondrien können von den Faltungen der Basalmembran und den „*Filtrationsspalten*“ (Doppellamellen) des Cytoplasmas (ROLLHÄUSER) lichtoptisch weder in dünnen noch in dickeren Schnitten sicher differenziert werden.

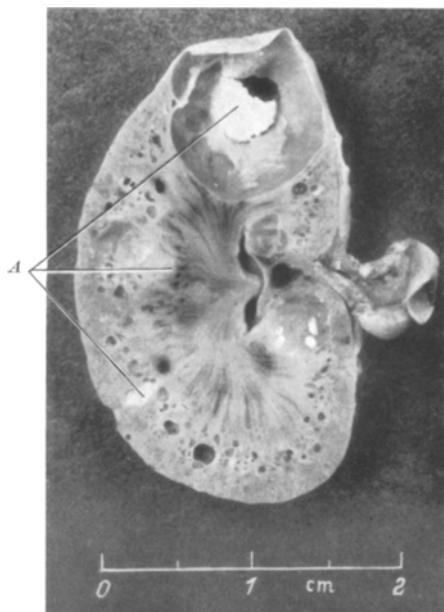


Abb. 4. Niere einer Ratte nach chronischer Bleivergiftung. In der Rinde zahlreiche Cysten und Adenome (A) verschiedenster Größe

Die *Epithelien* der den meisten Farbstoff aufweisenden Pars recta der *Hauptstücke* sind durchschnittlich karminrot bis dunkelrosa gefärbt (Abb. 7c). Sie bilden somit einen deutlichen Kontrast zu den benachbarten ungefärbten Querschnitten der distalen Tubuli. Viele der aus Tubulusabschnitten der Pars recta der Hauptstücke entstandenen Cysten werden von rosa bis rot gefärbten, flachen Epithelien ausgekleidet; ihr Lumen enthält reichlich rot gefärbte amorphe Substanzen. In fast allen Nieren ist außerdem eine deutliche Rosafärbung der Epithelien in der Pars contorta der Hauptstücke zu erkennen, die bis zum Glomerulus reicht. Ihr Bürstensaum ist durch seine Dunkelrosafärbung vom heller rosa-

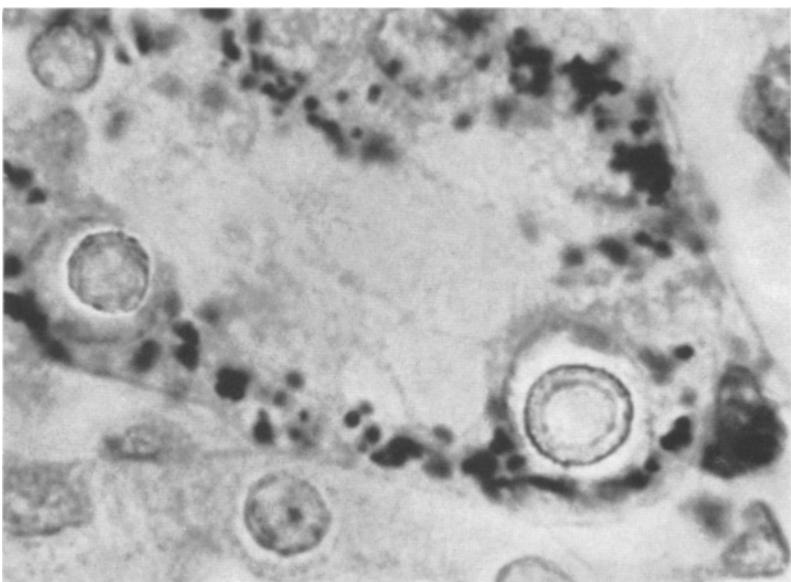


Abb. 5. Ratteniere nach chronischer Bleivergiftung und Injektion von Trypanblau. Vitalspeicherung von Trypanblaupartikeln (schwarz) in den Tubulusepithelien aus der Pars recta des Hauptstücks. Zwei Zellen mit großen Kerneinschlüssen, aufgeblähtem Kern und schmalem Cytoplasmasaum enthalten nur vereinzelt Partikel an der Zellbasis. Gegenfärbung mit Kernechtrot. Vergr. 1200mal

farbenen Cytoplasma abgesetzt. Das enge Lumen beider Kanälchenabschnitte erscheint leer und farblos. Das *Cytoplasma* der gefärbten Hauptstückepithelien ist sowohl in der Pars recta als auch in der Pars contorta diffus rot (Abb. 7c). Davon ausgenommen sind nur die Cytoplasmaanteile, die Ablagerungen von feingranulärem phagocytiertem Blutpigment enthalten. Die Pigmentkörnchen haben also den Farbstoff offensichtlich nicht aufgenommen, oder zumindest nicht in genügendem Maße, um eine Farbänderung zu bewirken. Das Cytoplasma zeigt außerdem eine feine Streifung, die in den schwächer gefärbten Epithelien der Pars contorta deutlicher erkennbar ist als in der Pars recta. In allen gefärbten Epithelien weist die Innenzone die stärkste Rotfärbung auf. Die *Zellkerne* zeigen den gleichen Farbton wie das Cytoplasma und lassen sich nur durch die besondere Lichtbrechung des Chromatins vom Cytoplasma unterscheiden. Die für die Bleivergiftung charakteristischen *Kerneinschlüsse* finden sich in zahlreichen Kernen aller Hauptstückepithelien, vor allem der Pars recta, sowie auch in einigen Epithelzellkernen des aufsteigenden Teils der Henleschen

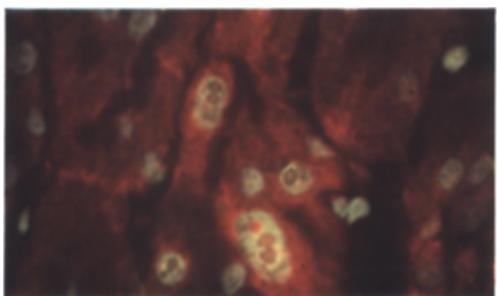


Abb. 6

Abb. 6. Hauptstück (Pars recta) aus einer Ratteniere nach chronischer Bleivergiftung. Färbung: Acridin-Orange (Methode nach SCHÜMMELFEDER et al.), Fluoreszenzbild. Rötlich gefärbtes Cytoplasma (RNS). In den grün gefärbten Kernen (DNS) größtenteils rötliche Kerneinschlüsse und kleinere, leuchtend rote Nucleolen

Abb. 7 a—c. Nierentubuli nach Injektion von Phenolrot. a Normale Ratteniere. Die Epithelien der Hauptstückkanälchen gleichmäßig rot durchtränkt. b Ratteniere nach chronischer Bleivergiftung. Unregelmäßige Weite und Rotfärbung der Kanälchen. c Querschnitt durch die Pars recta des Hauptstücks. Große rote Kerneinschlüsse in vergrößerten Tubulusepithelien mit granulärem Cytoplasma

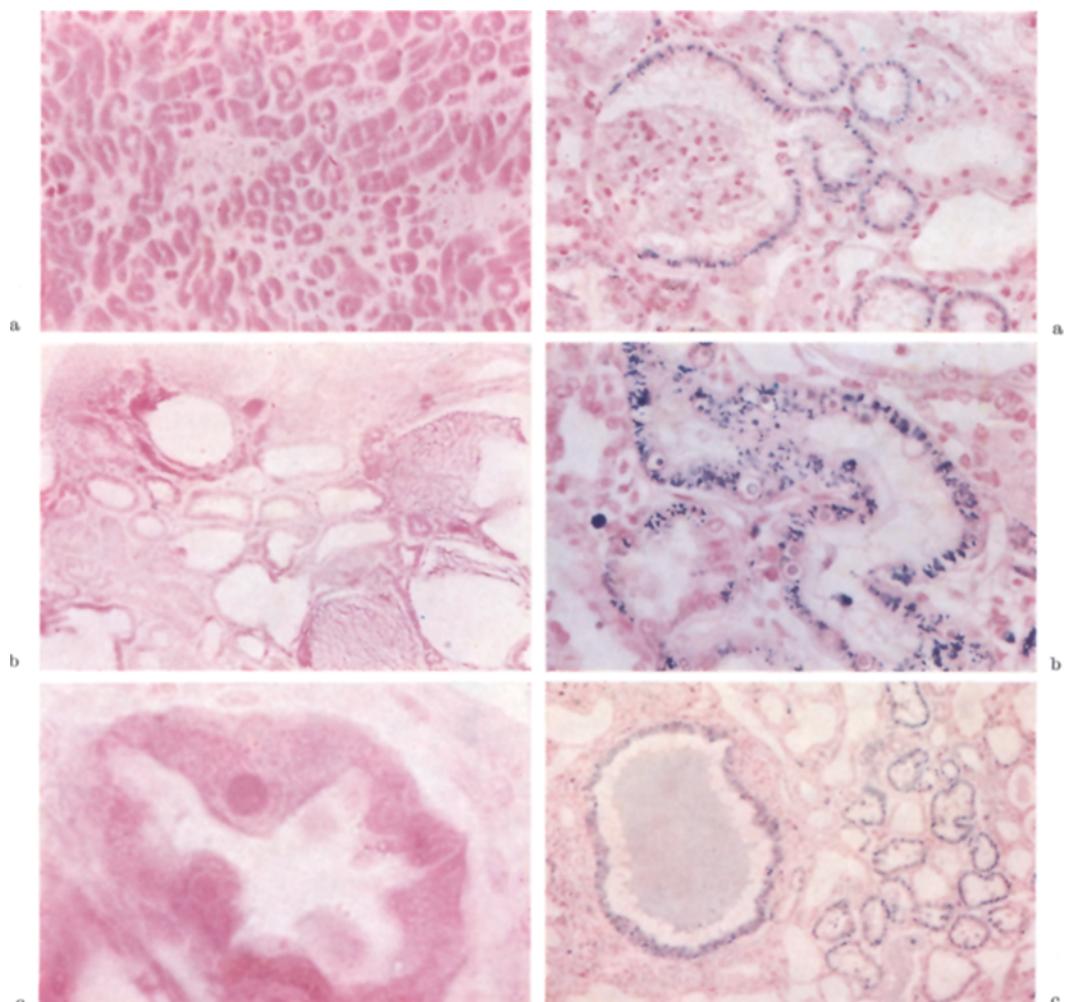


Abb. 7

Abb. 8

Abb. 8 a—c. Nierentubuli bleivergifteter Ratten nach Vitalspeicherung von Trypanblau. a Glomerulus mit Trypanblaupartikeln in den Epithelien der Bowmanschen Kapsel; gleiche Partikel im Epithel der angrenzenden Kanälchen. b Querschnitt durch Pars recta des Hauptstücks. Zahlreiche Trypanblaupartikel in den Epithelien, auch in denen mit großen Kerneinschlüssen. Die Einschlüsse größtenteils ungefärbt, zum Teil bläulich. c Tubulusezyste, von hohem Epithel ausgekleidet, das Farbstoffpartikel gespeichert hat

Schleife. Ein Kern enthält jeweils einen großen oder bis zu 5—6 kleinere Einschlüsse. Diese zeigen eine rötliche Anfärbung, die in den kleineren Einschlüssen besonders intensiv und gleichmäßig ist (Abb. 7c). Die großen, ebenfalls rot getränkten Einschlüsse lassen ihre konzentrische Ringbildung häufig noch erkennen. Diese Rotfärbung der Kerneinschlüsse findet sich oft selbst in den Epithelzellen im Bereich der Pars contorta, deren Cytoplasma und Kern noch schwach oder gar nicht gefärbt sind, und ist daher dort besonders auffallend. In den Bezirken der Tubuli mit bereits diffuser Anfärbung der Epithelzellen ist das Cytoplasma selbst derjenigen Zellen, deren Kerne große Einschlüsse enthalten, intensiv rot. Eine Ausnahme davon machen nur die schon stark aufgequollenen Epithelzellen mit den Kern ausfüllenden Einschlüssen, deren gekörntes oder vakuolisiertes Cytoplasma die normale Streifung verloren und weniger Phenolrot aufgenommen hat.

In einem Teil der *Mittelstücke* und *Sammelrohre* erkennt man im Lumen flockige Ablagerungen eines dunkelrot gefärbten homogenen Materials als Urinfiltrat. Daneben finden sich aber auch viele distale Tubuli ohne jegliche Ablagerungen im Lumen. Die rotes Filtrat enthaltenden Tubuli sind teils normal weit, teils auch dilatiert, die anliegenden Epithelzellen der Mittelstücke und Sammelrohre in ihren apikalen Cytoplasmaanteilen ebenfalls intensiv rot gefärbt.

Sowohl die gut differenzierten tubulären als auch die undifferenzierten *Adenome* zeigen keinerlei Anfärbung mit Phenolrot.

2. Kontrolltiere. Die Nieren dieser gesunden Ratten sind makroskopisch und mikroskopisch frei von pathologischen Veränderungen. Mit ihren natürlichen Altersveränderungen (WILGRAM und INGLE; DURAND et al.) sind sie ein Maßstab für das Ausmaß solcher auch bei den bleivergifteten Ratten zu berücksichtigenden Befunde. Eine Minute nach der Phenolrotinjektion sind die Tubulusepithelien der Pars recta der Hauptstücke fast gleichmäßig dunkelrosa gefärbt (Abb. 7a) und bilden einen scharfen Kontrast zu den benachbarten ungefärbten Epithelien der distalen Kanälchenabschnitte. Die Lumina der Mittelstücke und der Sammelrohre enthalten großenteils sich dunkelrosa färbende Massen, wenn der Farbstoff in dem betreffenden Nephron bereits durch die Pars recta der Hauptstücke ausgeschieden war. Dieses Urinfiltrat ist viel gleichmäßiger verteilt und schwächer angefärbt als in den Nieren nach chronischer Bleivergiftung. Im Gegensatz zu den Befunden bei den bleivergifteten Ratten unterbleibt die Anfärbung der Glomeruli und der Pars contorta der Hauptstücke.

B. Vitalspeicherung von Trypanblau

1. Ratten nach chronischer Bleivergiftung. In den Nieren dieser Tiere finden sich die gleichen durch die chronische Bleivergiftung bedingten pathologischen Veränderungen wie in den Nieren der mit Phenolrot injizierten Ratten. Diese Abweichungen von der normalen Nierenstruktur bedingen auch hier eine Abhängigkeit der Intensität und Ausdehnung der Trypanblauspeicherung von Sitz, Grad und Ausdehnung der pathologischen Veränderungen (Cysten, Adenome, Fibrose usw.).

In zahlreichen *Glomeruli* sind großkernige Zellen, die ihrer Lage nach sowohl Epithel- als auch Mesangium-Zellen sein könnten, mit großen Trypanblaukörnchen beladen. Die Bowmansche Kapsel vieler Glomeruli weist kubische, dicht mit groben Farbstoffpartikeln angefüllte Epithelzellen auf (Abb. 8a).

Bei allen Versuchstieren sind die Epithelien der *Hauptstücke* von ihrem Ursprung am Glomerulus bis zur Henleschen Schleife mit phagocytierten Trypanblauteilchen beladen (Abb. 5). Dabei nehmen die Ablagerungen distalwärts mehr

und mehr ab. Bei den meisten Tieren enthalten aber auch die Epithelien des Überleitungsstücks (dünner Schleifenteil) und des dicken Teils der *Henleschen Schleife* noch feine Farbstoffpartikel. In seltenen Fällen, wenn die Hauptstückepithelien mit Trypanblau überladen sind, finden sich feine Farbstoffpartikel sogar noch in den Epithelien der *Schaltstücke* und der proximalen Abschnitte der *Sammelrohre*. Die Lumina einiger Schaltstücke und Sammelrohre sind von blaßblauen homogenen Massen ausgefüllt. Im Gegensatz zur intensiven Phenolrotfärbung der flachen Epithelauskleidung vieler *Tubuluscysten*, enthalten diese flachen Cystenepithelien nach Trypanblauinjektion oft keinen Farbstoff. Dagegen weisen die von großen und zum Teil mehrschichtig proliferierten Zellen auskleideten Cysten oft eine intensive Anreicherung von Trypanblau in diesen hyperplastischen Epithelien auf (Abb. 8c).

Einige *Adenome* enthalten kein Trypanblau, obwohl sie aus gut differenzierteren tubulären Strukturen aufgebaut sind; andere des gleichen Tieres zeigen eine schwache Trypanblauspeicherung: feine Farbstoffpartikel sind spärlich über das Cytoplasma der Tumorzellen verteilt. Dabei haben nicht nur die in der Nähe von Blutgefäßen gelegenen Tumorzellen den Farbstoff aufgenommen, sondern ziemlich gleichmäßig alle Zellen des Adenoms.

Im *Interstitialium* aller Nierenabschnitte, im Bindegewebe der Nierenkapsel und der Papillen finden sich mehr oder weniger zahlreiche mit Trypanblau beladene Histiocyten, und zwar um so mehr, je stärker die chronisch entzündlichen Veränderungen in dem betreffenden Bereich sind.

Art und Ausdehnung der Trypanblauspeicherung im Cytoplasma. Die gröbsten Trypanblauaggregate finden sich in den Epithelien der proximalen Anteile des Nephron und in den kubischen Epithelien der Bowmanschen Kapsel. Die Partikel sind hier oft übereinandergelagert und zum Teil zu unregelmäßigen Klumpen zusammengeballt. In einigen Zellen ist das ganze Cytoplasma von diesen Farbstoffmassen ausgefüllt, die Kerne erscheinen entweder geschrumpft oder in Auflösung begriffen, und der Bürstensaum ist nur noch als amorphe Masse andeutungsweise erkennbar. Dort, wo das Cytoplasma zwischen den Farbstoffmassen noch sichtbar ist, hat es seine normale Struktur ebenfalls verloren. Diese zugrundegehenden Zellen lösen sich schließlich aus dem Epithelverband, und einige füllen als amorphe, trypanblaugefärzte Massen das Tubuluslumen aus. In den Epithelien der proximalen Tubuli, die etwas weniger Trypanblaupartikel enthalten, sind diese vorwiegend paranuklear angehäuft (Abb. 8b). Die Partikel bleiben auch dann in diesem Zellabschnitt liegen, wenn die sie beherbergende Zelle sich vergrößert und sich in das Tubuluslumen vorbuchtet. Die einzeln im Cytoplasma liegenden Partikel lassen oft eine sie umgebende kleine Vacuole erkennen. In den Epithelien der distalen Kanälchenabschnitte werden die Farbstoffpartikel allmählich immer kleiner und erscheinen schließlich nur noch als feine, „schütter“ über das Cytoplasma verteilte Stippchen.

Diejenigen Epithelzellen der Pars contorta der Hauptstücke, die reichliche intracytoplasmatische Ablagerungen von *Blutpigment* aufweisen, enthalten gar keine oder nur wenige Trypanblaupartikel, trotz reichlicher Trypanblauspeicherung im Cytoplasma der benachbarten Epithelien. Nur in einigen Epithelzellen erkennt man eigentümliche eckige Körnchen von grüner bis grünblauer Farbe, die an eine Verklumpung des Trypanblau mit dem Blutpigment denken lassen.

Außerdem enthalten vereinzelte Epithelien der Pars contorta der Hauptstücke hellblau angefärbte *Hyalintropfen* zwischen den etwa gleich großen Trypanblau-partikeln.

Die *Kerneinschlüsse* enthaltenden Tubulusepithelien, vor allem in der Pars recta der Hauptstücke, haben zahlreiche Trypanblaupartikel phagocytiert (Abb. 5, 8 b). In einigen Tubuli sind die Epithelien mit Kerneinschlüssen die einzigen, die Trypanblau gespeichert haben, während ihre Nachbarzellen ohne diese Einschlüsse keinen Farbstoff aufweisen. Nur bei den Kern ausfüllenden Einschlüssen mit resultierender Aufquellung des Cytoplasmas, das jetzt blaß, feinkörnig oder vacuolisiert erscheint, enthält dieses keine Farbstoffpartikel. Ein Teil der Kerneinschlüsse, vor allem die kleineren, sind blau angefärbt, während die großen häufig farblos glasig und stark lichtbrechend erscheinen oder mit Kernechtrot schwach rötlich gefärbt sind (Abb. 8 b).

2. Kontrolltiere. Die Nieren dieser gesunden Tiere zeigen keinerlei pathologische Veränderungen. Im Vergleich zur Verteilung der Trypanblauspeicherung bei den bleivergifteten Ratten ist die viel gleichmäßige Ausbreitung des vorwiegend in den Hauptstücken phagozytierten Farbstoffs besonders auffallend. Mit Ausnahme von sehr geringfügigen Ablagerungen in einzelnen Glomeruli einer Ratte sind die Glomeruli aller übrigen Kontrolltiere frei von Trypanblau. Die regelmäßig flachen bis niedrig kubischen Epithelien der Bowmanschen Kapsel enthalten nur ganz vereinzelt spärliche Trypanblauteilchen. Die Zahl und Dichte der Trypanblaupartikel sind in der Pars contorta der Hauptstücke deutlich geringer als in den Nieren der bleivergifteten Ratten. Die Farbstoffpartikel finden sich auch bei den gesunden Tieren hauptsächlich im mittleren Anteil der Epithelzellen kranzförmig um den Zellkern angeordnet, und die größeren Partikel liegen innerhalb deutlich erkennbarer Vacuolen des Cytoplasmas. In der Niere eines Kontrolltieres erkennt man zwischen den Trypanblau-teilchen außerdem kleine bläulich gefärbte „*Hyalintropfen*“ im Cytoplasma der Hauptstückepithelien der Pars contorta. Vereinzelte Epithelien der Pars contorta enthalten weiterhin wenige kleine gelbe bis gelbbraune Blutpigmentkörnchen. Die Zahl und Größe der gespeicherten Farbstoffpartikel nimmt in den Epithelzellen der Pars recta distalwärts schnell ab.

Besprechung

1. Ausscheidung von Phenolrot. Die im Vergleich zur Norm (ROLLHÄUSER 1960) gefundenen Abweichungen in der renalen Farbstoffausscheidung von Phenolrot bei der Ratte nach chronischer Bleivergiftung sind im wesentlichen durch die ausgedehnten pathologischen Veränderungen in diesen Nieren bedingt. Da durch Verschluß oder Zerstörung eines großen Teils der Henleschen Schleifen und der Schaltstücke die entsprechenden proximalen Anteile der Tubuli cystisch erweitert sind, können die noch erhaltenen Pars-recta-Anteile der Hauptstücke den an sie herangetragenen Farbstoff nicht allein ausscheiden, da ihre exkretorische Fähigkeit begrenzt ist. Je nach der im Blutplasma noch verbleibenden Farbstoffkonzentration werden daher mehr oder weniger große Anteile der Pars contorta der Hauptstücke und gelegentlich sogar die Glomeruli und die kubischen Epithelien der Bowmanschen Kapsel zur zusätzlichen Ausscheidung mit herangezogen. Weiterhin mag auch die auf Grund der pathologischen Veränderungen unregelmäßige Blutzufuhr mit verantwortlich sein für den ungleichmäßigen Transport des Phenolrot durch die Tubuli. Zu der örtlichen Verschiebung in der Farbstoffausscheidung kommt eine zeitliche: die rechte Niere, obwohl 5 min später von der Blutzufuhr getrennt als die linke, zeigt noch das gleiche Ausscheidungsbild, während ROLLHÄUSER bei seinen normalen Ratten bereits nach 3 min nur noch eine Rotfärbung der Markstrahlen und des Außenstreifens fand.

Die geschädigten Nieren brauchen also längere Zeit zur Ausscheidung. — Zusammengefaßt ist die Transportfähigkeit der Kanälchenepithelien vom Farbstoffspiegel des an sie herangeführten Blutes abhängig.

Warum das Phenolrot trotz Behandlung mit Ammoniakdämpfen in einigen Nieren nur wenige Minuten festgehalten werden konnte, in anderen dagegen sich stunden- bis tagelang in den histologischen Schnitten hielt, ist schwer zu erklären. Die Gelbfärbung des Phenolrots läßt an ein schnelles Absinken des pH denken, das möglicherweise durch eine schwere Urämie oder Acidose dieser bleivergifteten Tiere bedingt sein könnte.

Während die Glomerulusschlingen und die Bowmansche Kapsel sich in den Nieren nach chronischer Bleivergiftung mit Phenolrot zuweilen ungewöhnlich deutlich darstellen, sind die Basalmembranen der Glomeruli und Tubuli und die intraplasmatischen Doppellamellen, die ROLLHÄUSER in den normalen Rattenieren als Farbstoffstraßen deutlich rot gefärbt fand, nicht sicher erkennbar. Dieser Unterschied war nicht von der Schnittdicke abhängig und bleibt schwer zu erklären.

Die von flachem, kräftig rot gefärbtem Epithel ausgekleideten größeren *Cysten* sind sicher an der Farbstoffausscheidung beteiligt. Dafür spricht auch die Anfüllung ihrer Lumina mit rötlichem Material. Daß andere, ebenfalls von flachem Epithel ausgekleidete *Cysten* in ihrer Nähe keinen Farbstoff aufweisen, könnte daran liegen, daß ihnen kein Phenolrot-haltiges Blut zugeführt wurde, oder wahrscheinlicher daran, daß ihre Epithelzellen die zur Farbstoffaufnahme erforderlichen Membransysteme oder Micellen eingebüßt haben, wie dies an flächenhaft wachsenden Nierenzellen aus Hühnerembryonen in der Gewebekultur beobachtet wurde (CAMERON).

Die durch Bleivergiftung erzeugten *Kerneinschlüsse* scheinen den Transport von Phenolrot durch die Tubulusepithelien im allgemeinen wenig zu beeinflussen. Farblos sind nur die Zellen mit außergewöhnlich großen Einschlüssen in hochgradig geschwollenen Kernen und mit onkocytenähnlichem, fein granuliertem Cytoplasma, das seine normale Streifung verloren hat. Die Kernschwellung ist höchstwahrscheinlich die Folge der großen Einschlüsse in diesen offensichtlich degenerierenden Zellen. — Die oft ziemlich intensive Rotfärbung gerade der Kerneinschlüsse bei zuweilen ungefärbtem Cytoplasma spricht für ihre größere Affinität dem Farbstoff gegenüber und damit für ihren Gehalt an maskierten Lipoiden, an denen sich das lipophile Ende des sauren organischen Phenolrot verankern kann (HÖBER).

Zusammenfassend haben also die Kerneinschlüsse das Cytoplasma weder strukturell noch funktionell weit genug verändert, um den aktiven Transport von Phenolrot durch die Nierentubuluszelle zu verhindern. Man hätte erwarten können, daß das von der Zelle aufgenommene Blei mit den intracellulären SH-Gruppen reagieren und auf diese Weise durch Hemmung des Zellstoffwechsels den Farbstofftransport blockieren würde (HAMMETT; BEYER et al.; FORSTER). Das ist aber offenbar nicht der Fall. Nimmt man an, daß Transport und Ausscheidung von Phenolrot gebunden ist an aerobe Phosphorylierungsvorgänge (SHIDEMAN und RENE; TAGGART und FORSTER) und an das Lipoid-Wasser-Schichtensystem der Doppelmembranen (ROLLHÄUSER und VOGELL), so werden zumindest diese Vorgänge offensichtlich durch den Eintritt von Blei in die Zelle

und durch die Bildung der Kerneinschlüsse nicht wesentlich gestört. Interessanterweise fand PARDOE (1952) bei ihren 4 Monate lang mit Blei vergifteten Ratten den TM_{PAH} -Wert wesentlich erhöht. Andererseits ist eine durch Bleivergiftung bedingte tubuläre Dysfunktion klinisch beschrieben worden (McKHANN; WILSON et al.; CHISOLM et al.). Dabei handelt es sich aber nur um eine Resorptionsstörung von Glucose, Aminosäuren und Phosphaten, deren Aufnahme in die Zelle andere Wege beansprucht als die Ausscheidung von Phenolrot.

2. Vitalspeicherung von Trypanblau. Die Ergebnisse der hier beschriebenen Untersuchungen sowohl an den bleivergifteten als auch an den normalen Ratten scheinen die Annahme von GÉRARD zu widerlegen, daß die distalen Anteile der Tubuli die größeren Farbstoffpartikel aufnehmen: In allen von uns untersuchten Nieren finden sich die größten und meisten Partikel in den proximalen Tubuli, die feinsten und wenigsten in den distalen Kanälchen (s. auch SUZUKI und v. MÖLLENDORF). Bei den groben Partikeln in den proximalen Tubulusepithelien handelt es sich höchstwahrscheinlich zumindest teilweise um Verklumpungen zahlreicher kleinerer Teilchen, wie dies auch SCHMIDT und TRUMP elektronenmikroskopisch gesehen haben.

Da die Zahl der noch funktionstüchtigen Nephrone in den bleivergifteten Nieren reduziert ist, finden sich phagocytierte Trypanblaupartikel auch dort, wo sie bei der Farbstoffspeicherung in normalen Nieren nicht vorkommen: in den Epithelien der Bowmanschen Kapsel und der distalen Tubuli. Darüber hinaus kann die Zahl der von einer Epithelzelle aufgenommenen Partikel in diesen pathologischen Nieren wesentlich größer sein als normalerweise. Die mit Trypanblaupartikeln überladenen Epithelien in einzelnen Tubuli der Versuchstiere erwecken den Eindruck, daß diese Zellen weit über ihre Kapazität hinaus phagocytiert haben, was sich in Zellauflösung und schließlich Nekrose äußert. Ob diese Überladung der Zellen Folge ihres Alterns ist, oder der durch die Bleivergiftung bedingten Nierenschädigung, oder der schädigenden Wirkung des Trypanblau selbst, kann nach diesen Untersuchungen nicht sicher entschieden werden. In der angewandten Dosierung wirkt Trypanblau im allgemeinen nicht cytotoxisch. Außerdem weisen die Kontrolltiere keine durch Überladung mit Farbstoff nekrotisch gewordenen Tubuluszellen auf.

Die Kerneinschlüsse enthaltenden Epithelien der proximalen Tubuli sind fast ebenso stark mit Trypanblaupartikeln beladen wie ihre Nachbarzellen ohne Kerneinschlüsse. Nur die Zellen mit sehr großen Einschlüssen, aufgeblähten Kernen und aufgedunsem, blassem, feinkörnig oder vacuolisiert erscheinendem Cytoplasma enthalten deutlich weniger oder zuweilen gar keine Farbstoffpartikel. Solange die Kerneinschlüsse enthaltenden Epithelien also nicht offensichtlich degeneriert sind, besteht keine Beziehung zwischen der Anwesenheit von Einschlüssen und der Menge des gespeicherten Farbstoffs. Sind die Zellen aber, höchstwahrscheinlich infolge der Kerneinschlüsse, degeneriert, so ist die Aufnahme von Farbstoffpartikeln offenbar sehr erschwert. Da mit der Aufblähung der Zelle ihr Bürstensaum verlorengeht, wäre es denkbar, daß sie damit auch ihre Fähigkeit zur Farbstoffaufnahme einbüßt.

Ein weiterer Faktor, der die Trypanblaupspeicherung wesentlich beeinträchtigen kann, ist die Anwesenheit von *Blutpigment* (Hämösiderin-Aposiderin-Körnchen, TÖNZ; SONNEKALB) im Cytoplasma der Tubulusepithelien. Die Annahme

liegt nahe, daß in den reichlich Blutpigmentkörnchen enthaltenden Epithelzellen kein Platz mehr für eine zusätzliche Speicherung von Trypanblau ist, bzw. daß das Aufnahme- und Transportsystem der Zelle bereits mit der Pigmentspeicherung voll ausgelastet war. Offenbar werden beide Substanzen durch die gleichen Cytosomen abgeschieden.

Die blaue Anfärbung der *Hyalintropfen* in den etwas weniger dicht mit Farbstoff beladenen Epithelien der proximalen Tubuli einiger Kontroll- und Versuchstiere zeigt eindeutig, daß der Farbstoff von diesen Strukturen aufgenommen wird. Sie erinnern an die durch Aufnahme von Serumproteinen entstandenen Hyalintropfen (ZIMMERMANN et al.).

3. Zur Entstehung und Bedeutung der Kerneinschlüsse. Seit den Untersuchungen von HAMMETT (1929) an den wachsenden Wurzelspitzen verschiedener Pflanzen ist bekannt, daß Bleisalze einen Einfluß auf Zellwachstum und Mitose haben können. HAMMETT vermutete, daß gerade die in Mitose befindlichen Kerne besonders anfällig für die Bleiwirkung seien. Die Art der Mitosenschädigung durch Blei ist aber nicht ganz klar.

LEVAN beschrieb bei Allium cepa eine cholchicin-ähnliche Hemmwirkung des Bleis auf die Mitosen der Wurzelspitzen; er glaubte, daß die nach Bleizufuhr beobachteten Spindel-anomalien typisch für die Colchicin-Mitose seien. Auch OEHLKERS und VON ROSEN zeigten, daß bei Pflanzen nach Zufuhr von Schwermetallen eine Chromosomenschädigung auftritt. MANGENOT und CARPENTIER fanden, daß beim Blei im Gegensatz zu anderen Zellgiften der pyknotische Effekt sehr viel später auftrat als der mitoklastische. AHLSTRÖM nahm an, daß Blei in der frühen Prophase angreift und Pyknose oder Karyorrhexis erzeugt, indem es durch Blockierung von freien SH-Gruppen, die gerade vor der Zellteilung ihren Gipfel erreichen, enzymhemmend wirkt.

Wie BEHRENS und BAUMANN zeigten, durchquert Blei offenbar die proximalen Tubuli von der Zellbasis bis ins Lumen. Sie fanden außerdem in Übereinstimmung mit AUB et al. und AUB, daß Blei sich dort ablagert, wo Calciumdepots mobilisiert werden, wahrscheinlich deshalb, weil Blei für das PO_4^- -Ion eine größere Affinität besitzt als das Calcium.

Wie und warum Blei Kerneinschlüsse in den Tubulusepithelien der Niere bildet, ist zur Zeit noch ungeklärt. Die Annahme von ZOLLINGER, daß die Einschlüsse veränderte Nucleoli sind oder aus Nucleolarsubstanz aufgebaut werden, erscheint logisch im Hinblick auf den Gehalt beider Strukturen an RNS, Histonen bzw. histonähnlichen Proteinen, maskierten Lipoiden und Kohlenhydraten (DALLENBACH und KILHAM). Ferner sind die Nucleoli reich an SH-Gruppen (SANDRITTER und KRYGIER) und an freien Phosphaten (SIRLIN), die beide eine Affinität für Blei besitzen. Bedenkt man, welch eingreifende chemische Reaktionen durch Blei ausgelöst werden können, so überrascht es wenig, daß die Bleieinschlüsse elektronenmikroskopisch anders aussehen als die Nucleolen. Man kann jedoch diesen Unterschied nicht dahingehend deuten, daß Einschlüsse und Nucleolen nichts mit einander zu tun hätten, wie ANGERINE et al. und BEAVER es taten. Wie BORYSKO und BANG (1951) gefunden haben, kann der Nucleolus im Laufe seines funktionellen Cyclus eine Transformation von einer homogenen Masse zu einem fädigen Gebilde durchmachen, das etwa dem elektronenmikroskopischen Bild der Kerneinschlüsse entspricht. Auch BERNHARD et al., HORSTMANN und KNOOP und DAVIS konnten zeigen, daß der Nucleolus zum Teil aus dicken Fäden aufgebaut ist (Nucleolonemata von ESTABLE und SOTELO). Die Annahme, daß

die Einschlüsse nucleolärer Herkunft sind, wird weiterhin unterstützt durch die Beobachtung von zuweilen zahlreichen kleinen über das Kernchromatin verstreuten Einschlüssen. Diese Verteilung erinnert sehr an die Bildungsorte der Nucleolen (STOCKINGER; BEERMANN; SIRLIN). Das gleichzeitige Vorkommen von Nucleolus und Kerneinschluß im selben Kern könnte bedeuten, daß der Nucleolus schon vor Beginn der Bleivergiftung gebildet wurde, oder während der Bleivergiftung in einer Phase, in der gerade keine Blei-Ionen im Kern vorhanden waren, oder daß der Nucleolus aus irgendeinem Grund das angebotene Blei nicht aufnehmen konnte. Wenn die Einschlüsse aus nachweisbarem säurefestem Material bestehen sollten, das vom Tubuslumen in den Kern wandert (ANGEVINE et al.), so müßte man erwarten, dieses Material auf dem Durchgang im Cytoplasma zu finden, was nicht der Fall ist. Eine Trägersubstanz, ähnlich wie GEDIGK und PROCH sie in mesenchymalen Zellen bei Speicherung von Schwermetallen beschrieben, ist in den Tubulusepithelien noch nicht gesehen worden.

Im Hinblick auf die von WATRACH nach Bleivergiftung in der Schweineleber beobachtete Degeneration von Mitochondrien muß noch in Betracht gezogen werden, daß es sich bei den Kerneinschlüssen auch um Einstülpungen des Cytoplasmas in den Kern handeln könnte. MÜLLER und v. RAMIN sowie MÜLLER und STÖCKER beschrieben nach Bleivergiftung in der Ratteniere neben den direkten Kerneinschlüssen aus Cytoplasma bestehende sog. indirekte Einschlüsse, wie sie WESSEL sowie ALTMANN und HAUBRICH nach Colchicin-Vergiftung sahen. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen (BEAVER; ANGEVINE et al.; KILHAM et al.) zeigen aber keine cytoplasmatische Brücken zwischen Einschluß und Kernmembran und keine Anzeichen für einen Gehalt der Kerneinschlüsse an degenerierenden Membransystemen oder Bläschen aus dem Cytoplasma. Außerdem haben Zellfraktionierungsuntersuchungen (DALLENBACH und KILHAM) an Nieren bleivergifteter Ratten, die wochenlang in hypotonischer Lösung gehalten wurden, keinen Verlust oder Veränderung der Einschlüsse ergeben. Wenn es sich um Einstülpungen des Cytoplasma handelte, wären solche Veränderungen zu erwarten gewesen.

Zusammenfassend sprechen zahlreiche Befunde dafür, daß die bleihaltigen *Kerneinschlüsse veränderte Nucleolen* sind. Ihr zuweilen unterschiedliches Aussehen und Verhalten gegenüber histochemischen und Farbreaktionen, wie z. B. die Schwankungen im RNS-Gehalt, lassen sich durch zeitlich und örtlich unterschiedliche Blei-Ionen-Konzentrationen einerseits und Aktivität der Nucleolusbildungsorte andererseits erklären, die wiederum von zahlreichen anderen Faktoren abhängig sind.

Die hier beschriebenen Untersuchungen zeigen, daß die meisten Tubulusepithelien trotz zum Teil prominenter Kerneinschlüsse mit anhaltendem Verlust von RNS ihre Funktion, zumindest soweit sie durch Phenolrotausscheidung und Trypanblauspeicherung meßbar ist, aufrecht erhalten können. Dieses Ergebnis ist umso interessanter, wenn man berücksichtigt, daß bei anhaltender Bleivergiftung mehr und mehr Nephrons durch die ausgedehnte Nierenschädigung ausfallen und somit die noch funktionsfähigen Nephrons zunehmend mehr überlastet werden. Erst sehr spät, bei schon weitgehender Ausfüllung des Kernvolumens durch einen oder mehrere Einschlüsse, kommt es zu sichtbaren morphologischen und funktionellen Störungen der Tubuluszelle. Dabei muß diese

Störung noch nicht mal ausschließlich durch den Kerneinschluß verursacht sein. Die durch den Ausfall zahlreicher Nephrone bedingte chronische Mehrbelastung der erhaltenen Tubuli führt von sich aus zur Zellschädigung, die sich dann an den durch Kerneinschlüsse „vorbelasteten“ Zellen logischerweise zuerst auswirken wird. Interessanterweise sind, abgesehen von den Tumorbildungen, in den Tubulusepithelien der chronisch bleivergifteten Nieren Mitosen äußerst selten (s. auch TÖNZ), ganz im Gegensatz zu der von NOLTENIUS (s. BÜCHNER et al.) gefundenen Vermehrung der Mitosen bei der tubulären Belastung. Diese Beobachtung wird im Hinblick auf den mitoklastischen Effekt des Bleis verständlich.

Diese Gedankengänge führen uns zurück zu der eingangs gestellten Frage nach der möglichen *Bedeutung der Kerneinschlüsse* und der sie begleitenden Zellschädigung *für die Tumorentstehung* in der Niere nach chronischer Bleivergiftung. Ein Zusammenhang zwischen der chronischen Bleivergiftung und der Tumorentstehung ist in diesen Nieren wohl als sicher anzunehmen (ZOLLINGER; DUKES; BOYLAND et al.; VAN ESCH et al.; KILHAM et al.), zumindest dann, wenn genetische Faktoren (EKER) ausgeschlossen werden können. Welcher der vielen durch die Bleivergiftung bedingten und zur chronischen Schädigung der Niere führenden Faktoren im wesentlichen für die Tumorauslösung verantwortlich ist, und ob die Kerneinschlüsse selbst daran beteiligt sind, läßt sich schwer entscheiden.

Die nachgewiesene Mitoseschädigung könnte durch direkten Einfluß des Bleis auf die DNS zustande kommen (VENNER und ZIMMER) mit „irreversibler Schädigung des genetischen Informations-Code“ (ARLEY und EKER). Andererseits wäre auch eine sekundäre Beeinflussung der DNS nach primärer hochgradiger Verarmung des Kerns an RNS möglich. Ein RNS-Verlust des Kerns ist nun gerade in den bleivergifteten Zellen auf 2 Wegen denkbar; einerseits durch Aufnahme von RNS in die Kerneinschlüsse und damit Unbrauchbarmachung, andererseits durch Ausschleusung in das Cytoplasma bei Überbelastung der Zelle im Sinne BÜCHNERS (BÜCHNER et al.; NOLTENIUS et al.). Auch eine Regulationsstörung der Nucleolusbildungsorte mit resultierender nucleolärer Autonomie ist nicht auszuschließen (HERICH; NORDSIEK und KOPAK).

Die hier geschilderten Untersuchungen lassen alle Möglichkeiten offen. Da sich jedoch eine schwerere Funktionsstörung nur in vereinzelten Tubulusepithelien nachweisen ließ, ist, wenn man von einer primären Beeinflussung der DNS absehen will, die Annahme einer Blockierung der nucleären RNS durch die Kerneinschlüsse wahrscheinlicher als die einer RNS-Ausschleusung in das Cytoplasma. Höchstwahrscheinlich wirken aber mehrere Faktoren bei der Tumorentstehung durch Blei zusammen, deren örtliche und zeitliche Aufeinanderfolge wir noch nicht genau überblicken können. Trotz der Fülle von Arbeiten, die in den letzten Jahrzehnten über die Einwirkungen von Blei auf das Gewebe erschienen sind (s. FLURY; EGER; MAYERS; McLEAN et al.; KEHOE u. a. m.) blieben unsere Kenntnisse über den grundlegenden Wirkungsmechanismus des Blei auf die lebende Struktur bis heute überraschend gering. So konnten unsere bisherigen Untersuchungen im wesentlichen viele noch unbeantwortete Fragen herausstellen, die zu weiteren Arbeiten anregen mögen.

Zusammenfassung

Ratten entwickeln bei chronischer Bleivergiftung eine schwere Nephropathie, bei der Kerneinschlüsse in vielen Zellen der proximalen Tubuli ein wesentlicher Befund sind. Diese Einschlüsse enthalten RNS, Proteine, maskierte Lipoide,

spärliche Kohlenhydrate und, wie radiohistographisch gezeigt werden konnte, Blei (Aufnahme von Pb²¹⁰). Es ist daher anzunehmen, daß diese Einschlüsse das Ergebnis einer Reaktion zwischen Blei und Nucleolarsubstanz und Vorläufern der Ribosomen darstellen.

Um abzuklären, ob der Verlust von Nucleolarsubstanz die aktive Transportfunktion des Cytoplasmas beeinträchtigt, wurden die Ausscheidung von Phenolrot und die Vitalspeicherung von Trypanblau morphologisch an chronisch bleivergifteten Ratten untersucht. Dabei hat sich ergeben, daß die Zellen mit sehr großen Kerneinschlüssen und aufgequollenem, granulärem Cytoplasma die einzigen sind, die die Farbstoffe schlecht oder gar nicht transportieren. Theorien über die Wirkung des Bleis auf die Zelle, und zwar einerseits sein mitosehemmender Effekt, andererseits seine carcinogene Wirkung, werden diskutiert.

The excretion of Phenol Red and the Uptake of Trypan Blue in Lead Nephropathy of the Rat

Summary

Rats chronically poisoned with lead develop a severe nephropathy. A prominent feature is the nuclear inclusions of many of the cells of the proximal tubule. These inclusions contain RNA, proteins, masked lipids, scanty carbohydrate, and as shown by radiohistographs, the incorporate Pb²¹⁰. It is assumed, therefore, that these inclusions represent the interaction of lead with nucleolar material and ribosomal precursors.

In an attempt to learn whether the loss of nucleolar substance effects the ability of the cytoplasm to transport actively, the excretion of phenol red and the uptake of trypan blue were studied morphologically in groups of rats chronically poisoned with lead. The results indicate that the cells with large nuclear inclusions and swollen granular cytoplasm are the only cells that transport the dyes poorly or not at all. Theories as to the action of lead on the cell are discussed; its mitosis inhibiting effect on the one hand, and its carcinogenic effect on the other.

Literatur

- AHLSTRÖM, C. G.: A short review of mitotic poisons. *Acta path. mikrobiol. scand.*, Suppl. **91**, 52 (1951).
- ALTMANN, H.-W., u. J. HAUBRICH: Zur Genese hepatocellulärer Kerneinschlüsse bei Colchicinvergiftung. *Experientia (Basel)* **20**, 319 (1964).
- AMANO, M., and C. P. LEBLOND: Comparison of the specific activity time curves of RNA in chromatin, nucleolus, and cytoplasm. *Exp. Cell Res.* **20**, 250 (1960).
- ANGEVINE, J. M., A. KAPPAS, R. L. DE GARVIN, and B. H. SPARGO: Renal tubular nuclear inclusions of lead poisoning. *Arch. Path.* **73**, 486 (1962).
- ARLEY, N., and R. EKER: Mechanism of carcinogenesis. *Advanc. biol. med. Phys.* **8**, 375 (1962).
- AUB, J. C.: The biochemical behavior of lead in the body. *J. Amer. med. Ass.* **104**, 87 (1935).
- AUB, Y. C., A. MINOT, L. FAIRHALL, and P. REZNIKOFF: Recent investigation of absorption and excretion of lead in the organism. *J. Amer. med. Ass.* **83**, 588 (1924).
- BEAVER, D. L.: The ultrastructure of the kidney in lead intoxication with particular reference to intranuclear inclusions. *Amer. J. Path.* **39**, 195 (1961).
- BEERMANN, W.: Der Nukleolus als lebenswichtiger Bestandteil des Zellkernes. *Chromosoma (Berl.)* **11**, 262 (1960).

- BEHRENS, B., u. A. BAUMANN: Zur Pharmakologie des Bleies IX. Mitteilung. Weitere Untersuchungen über die Verteilung des Bleis mit Hilfe der Autohistoradiographie. *Z. ges. exp. Med.* **92**, 241 (1933).
- BERNHARD, W., A. BAUER et A. GROPP: L'ultrastructure du nucléole de cellules normales et cancéreuses. Etude au microscope électronique. *Exp. Cell Res.* **9**, 88 (1955).
- BEYER, K. H., H. R. PAINTER, and V. D. WIEBELHAUS: Enzymatic factors in renal tubular secretion of phenol red. *Amer. J. Physiology* **161**, 259 (1959).
- BIRNSTIEL, M. L., M. I. H. CHIPCHASE, and B. B. HYDE: The nucleolus, a source of ribosomes. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **76**, 454 (1963).
- BLACKMAN, S. S.: Intranuclear inclusion bodies in the kidney and liver caused by lead poisoning. *Bull. Johns Hopk. Hosp.* **58**, 394 (1936).
- BORYSKO, E., and F. B. BANG: Structure of the nucleolus as revealed by the electron microscope. *Bull. J. Hopk. Hosp.* **89**, 468 (1951).
- BOYLAND, E., C. E. DUKES, P. L. GROVER, and B. C. V. MITCHLEY: The induction of renal tumors by feeding lead acetate to rats. *Brit. J. Cancer* **16**, 283 (1962).
- BRACKEN, E. C., D. L. BEAVER, and C. C. RANDALL: Histochemical studies of viral and lead induced intranuclear bodies. *J. Path. Bact.* **75**, 253 (1958).
- BÜCHNER, V. F., W. OEHLERT u. H. NOLTENIUS: Desoxyribonukleinsäure, Ribonukleinsäure und Protein bei der Regeneration und Kanzerisierung im Experiment. *Dtsch. med. Wschr.* **88**, 2277 (1963).
- CAMERON, G.: Evidence for retention of physiological differentiation in outgrowing epithelial sheets in tissue culture. *Anat. Rec.* **100**, 646 (1948).
- CASPERSSON, T., S. FARBER, G. E. FOLEY, and D. KILLANDER: Cytochemical observations on the nucleolus-ribosome system. *Exp. Cell Res.* **32**, 529 (1963).
- CASPERSSON, T. O.: Cell growth and cell function. A cytochemical study. New York: W. W. Norton Co. 1950.
- CHIODI, H., and A. F. CARDEZA: Hepatic lesions produced by lead in rats fed a high fat diet. *Arch. Path.* **48**, 395 (1949).
- CHIPCHASE, M. I. H., and M. L. BIRNSTIEL: On the nature of nucleolar RNA. *Proc. nat. Acad. Sci.* **50**, 1101 (1963).
- CHISOLM, J. J., H. C. HARRISON, W. R. EBERLEIN, and H. E. HARRISON: Amino-aciduria, hypophosphatemia and rickets in lead poisoning. *Amer. J. Dis. Child.* **89**, 159 (1955).
- DALLENBACH, F., A. BOTTONE, and A. JONES: The uptake of radioactive lead 210 by the epithelium of the renal tubule. (In preparation.)
- , and L. KILHAM: The histochemistry of the lead induced inclusions in the epithelium of the renal tubule. (In preparation.)
- DAVIS, J. M. G.: A series of structural changes found in the mammalian nucleolus just before the prophase of mitosis. *Europ. Reg. Conf. on Electr. Micr.*, Delft, **1960**, S. 739.
- DUKES, C. E.: Clues to the causes of cancer of the kidney. *Lancet* **1961 II**, 1157.
- DURAND, A. M. A., M. FISHER, and M. ADAMS: Histology in rats as influenced by age and diet. *Arch. Path.* **77**, 268 (1964).
- EGER, W.: Experimentelle Bleischrumpfniere. *Virchows Arch. path. Anat.* **299**, 654 (1937).
- EKER, R.: Familial renal adenomas in wistar rats. *Acta path. microbiol. scand.* **34**, 554 (1954).
- ERRERA, M., A. HELL, and R. P. PERRY: The rôle of the nucleolus in RNA and protein synthesis. II. Amino acid incorporation into normal and nucleolar inactivated hela cells. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **49**, 58 (1961).
- ESCH, G. J. VAN, H. VAN GENDEREN, and H. H. VINK: The induction of renal tumours by feeding of basic lead acetate to rats. *Brit. J. Cancer* **16**, 289 (1962).
- FAIRHALL, L. T., and J. W. MILLER: The deposition and removal of lead in the soft tissues (liver, kidney and spleen). *Publ. Hlth Rep. (Wash.)* **56**, 1641 (1941).
- FINNER, L. L., and H. O. CALVERY: Pathologic changes in rats and in dogs fed diets containing lead and arsenic compounds. *Arch. Path.* **27**, 433 (1939).
- FLURY, F.: Blei. In: *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, Bd. III/3, S. 1574. Berlin: Springer 1934.
- FORSTER, R. P.: Kidney cells. In: J. BRACHET, *The cell: biochemistry, physiology, morphology*, S. 89. New York and London: Academic Press 1961.

- GEDIGK, P., u. W. PIOCH: Über die Speicherung von Schwermetallverbindungen im mesenchymalen Gewebe. *Beitr. path. Anat.* **116**, 124 (1956).
- GÉRARD, P.: Comparative histophysiology of the vertebrate nephron. *J. Anat. (Lond.)* **70**, 354 (1936).
- GERSH, I.: The tubular elimination of phenol red in the rabbit kidney. *Amer. J. Physiol.* **108**, 355 (1934).
- Some recent experiments in fixation by freezing and drying. In: *Freezing and drying* (R. J. C. HARRIS). London: The Institute of Biology 1951. New York: Hafner Publ. Co.
- , and J. L. STEPHENSON: Freezing and drying of tissues for morphological and histochemical studies. In: *Biol. Appl. of freezing and drying*, S. 329. New York: Academic Press Inc. 1954.
- HAMMETT, F. S.: Studies in the biology of metals. III. The localisation of lead within the cell of the growing root. *Protoplasma (Wien)* **5**, 135 (1929).
- Influence of lead on mitosis and cell size in the growing root. *Protoplasma (Wien)* **5**, 535 (1929).
- The nature of the lead compound deposited in the growing root. *Protoplasma (Wien)* **5**, 547 (1929).
- HARRIS, H.: Function of the short-lived ribonucleic acid in the cell nucleus. *Nature (Lond.)* **201**, 863 (1964).
- HERICH, R.: Influence of colchicine on nucleoli. *Caryologia (Pisa)* **16**, 521 (1963).
- HERTL, M.: Zum Nucleolus-Problem. *Z. Zellforsch.* **46**, 18 (1957).
- HÖBER, R.: Die Durchlässigkeit der Zellen für Farbstoffe. *Z. Biochem.* **20**, 56 (1909).
- Correlation between the molecular configuration of organic compounds and their active transfer in living cells. *Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **8**, 40 (1940).
- HORSTMANN, E., u. A. KNOOP: Zur Struktur des Nucleolus und des Kerns. *Z. Zellforsch.* **46**, 100 (1957).
- HYDÉN, H.: Die Funktion des Kernkörperchens bei der Eiweißneubildung in Nervenzellen. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **54**, 96 (1943).
- ISING, U., u. G. E. VOIGT: Histochemical Untersuchungen über die Verteilung des Bleis bei experimentellen Bleivergiftungen. *Acta histochem. (Jena)* **6**, 44 (1958).
- KEHOE, R. A.: The metabolism of lead in man in health and disease. *J. roy. Inst. publ. Hlth* **24**, 81, 101, 129, 177 (1961).
- Symposium on lead. *Arch. environm. Hlth* **8**, No 2 (1964).
- KILHAM, L., R. J. LOW, S. F. CONTI, and F. D. DALLENBACH: Intranuclear inclusions and neoplasms in the kidneys of wild rats. *J. nat. Cancer Inst.* **29**, 863 (1962).
- LANDING, B. H., and H. NAKAI: Histochemical properties of renal lead inclusions and their demonstration in urinary sediment. *Amer. J. clin. Path.* **31**, 499 (1959).
- LEVAN, A.: Cytological reactions induced by inorganic salt solutions. *Nature (Lond.)* **156**, 751 (1945).
- LONGWELL, A. C., and G. SVIHLA: Specific chromosomal control of the nucleolus and of the cytoplasm in wheat. *Exp. Cell Res.* **20**, 294 (1960).
- MANGENOT, G., et S. CARPENTIER: Le plomb et le mercure, poisons mitoclasique. *C. R. Soc. biol. (Paris)* **139**, 268 (1945).
- MAYERS, M. R.: Lead poisoning. Oxford medicine, vol. IV/3, H. A. CHRISTIAN ed. New York: Oxford University Press 1951.
- MCKHANN, C. F.: Lead poisoning in children. *Amer. J. Dis. Child.* **321**, 386 (1926).
- MCLEAN, R., J. A. CALHOUN, and J. C. AUB: Migration of inorganic salts in bone as measured by radioactive lead and by alizarin. *Arch. industr. Med.* **9**, 113 (1954).
- McMASTER-KAYE, R., and J. H. TAYLOR: Evidence of two metabolically distinct types of ribonucleic acid in chromatin and nucleoli. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 5 (1958).
- MÖLLENDORFF, W. v.: Vitale Färbung an tierischen Zellen. *Ergebn. Physiol.* **18**, 141 (1920).
- Der Exkretionsapparat. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Bd. VII/1, S. 1. Berlin: Springer 1930.
- MÜLLER, H.-A., u. D. v. RAMIN: Morphologie und Morphogenese der durch Schwermetalle (Pb, Bi) hervorgerufenen Kerneinschlüsse in den Hauptstückepithelien der Rattenniere. *Beitr. path. Anat.* **128**, 445 (1963).

- MÜLLER, H.-A., u. E. STÖCKER: Autoradiographische Befunde an den „direkten“ Kerneinschlüssen im Hauptstückepithel der Ratteniere nach experimenteller Bleivergiftung. *Experientia (Basel)* **20**, 379 (1964).
- NEUMANN, K.: Anwendung der Gefriertrocknung für histochemische Untersuchungen. In: *Handbuch der Histochemie*, Bd. I, S. 1. Stuttgart: Gustav Fischer 1958.
- NOLTENIUS, H., H. KEMPERMANN u. W. OEHLMERT: Histoautoradiographische Untersuchungen mit ^3H -Thymidin zur experimentellen Nierenvergrößerung nach unilateraler Nephrektomie bei Ratten. *Naturwissenschaften* **51**, 63 (1964).
- NORDSIEK, F. W., and M. J. KOPAC: Nucleolar aberrations in frog kidney and tumour cells. *Nature (Lond.)* **201**, 840 (1964).
- OEHLMERT, W.: Autoradiographische Untersuchungen zur Ribonukleinsäure-Synthese in den verschiedenen Strukturen der Zelle. *Beitr. path. Anat.* **124**, 311 (1961).
- OEHLKERS, F.: Chromosome breaks influenced by chemicals. *Heredity* **6**, Suppl. S. 95 (1953).
- OHNO, S., and R. KINOSITA: On the nucleolus-associated chromatin. *Exp. Cell Res.* **10**, 66 (1956).
- PARDOE, A. U.: Renal function in lead poisoning. *Brit. J. Pharmacol.* **7**, 349 (1952).
- PERBY, R. P.: On the nucleolar and nuclear dependence of Cytoplasmic RNA synthesis in hela cells. *Exp. Cell Res.* **20**, 216 (1960).
- A. HELL, and M. ERRERA: The role of the nucleolus in ribonucleic acid and protein synthesis. I. Incorporation of cytidine into normal and nucleolar inactivated hela cells. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **49**, 47 (1961).
- PFUHL, W.: Untersuchungen über die Fixierung der vitalen Trypanblauspeicherung. *Z. Zellforsch.* **13**, 783 (1931).
- ROLLHÄUSER, H.: Histologische und cytologische Untersuchungen über den Mechanismus der tubulären Farbstoff-Ausscheidung in der Ratteniere. *Z. Zellforsch.* **46**, 52 (1957).
- Untersuchungen über den örtlichen und zeitlichen Ablauf der Phenolrotausscheidung in den Tubuli der unbeeinflußten Ratteniere. *Z. Zellforsch.* **51**, 348 (1960).
- , u. W. VOGELL: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die aktive Stoffausscheidung in der Niere. *Z. Zellforsch.* **47**, 53 (1957).
- — Die tubuläre Phenolrotausscheidung und die Feinstrukturveränderung der Glomerula bei der Ratteniere im traumatischen Schock. *Z. Zellforsch.* **52**, 549 (1960).
- ROSEN, G. v.: Mutations induced by the action of metal ions in Pisum II. *Hereditas (Lund)* **51**, 89 (1964).
- SANDRITTER, W., u. A. KRYGIER: Cytophotometrische Bestimmungen von proteingebundenen Thiolen in der Mitose und Interphase von Hela-Zellen. *Z. Krebsforsch.* **62**, 596 (1959).
- SCHMIDT, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Speicherung von Trypanblau in den Zellen des Hauptstückes der Niere. *Z. Zellforsch.* **52**, 598 (1960).
- SCHÜMMELFEDER, N., R. E. KROGH u. K. J. EBSCHNER: Färbungsanalysen zur Acridin-orange-Fluorochromierung. *Histochemie* **1**, 1 (1958).
- SCHULTZE, B., W. OEHLMERT u. W. MAURER: Über eine allgemeine Beziehung zwischen der Umsatzrate der Ribonukleinsäure und des Eiweißes im Organismus von Maus und Ratte. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **49**, 35 (1961).
- SHIDEMAN, F. E., and R. M. RENE: Succinate oxidation and krebs cycle as an energy source for renal tubular transport mechanisms. *Amer. J. Physiol.* **166**, 104 (1951).
- SIRLIN, J. L.: The nucleolus. Progress in biophysics and biophysical chemistry, vol. 12. New York-Oxford-London-Paris: Pergamon Press 1962.
- K. KATO, and K. W. JONES: Synthesis of ribonucleic acid in the nucleolus. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **48**, 421 (1961).
- SONNEKALB, G.: Experimentelle histologische, cytologische und okular-mikrometrische Untersuchungen über die Hämoglobinspeicherung in der Ratteniere. Inaug.-Diss. Justus Liebig-Universität Gießen 1958.
- STICH, H. F.: Changes in nucleoli related to alterations in cellular metabolism. *Developmental Cytology*, S. 105. New York: Ronald Press 1959.
- STOCKINGER, L.: Das Kernkörperchen. *Protoplasma (Wien)* **42**, 365 (1953).
- SUZUKI, T.: Zur Morphologie der Nierensekretion unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Jena: Gustav Fischer 1912.

- TAGGART, J. V., and R. P. FORSTER: Renal tubular transport: effect of 2,4-Dinitrophenol & related compounds on phenol red transport in the isolated tubules of the flounder. *Amer. J. Physiol.* **161**, 167 (1950).
- THORNBURG, W.: Persönliche Mitteilung.
- TIMM, F., u. R. NETH: Die normalen Schwermetalle der Niere. *Histochemistry* **1**, 403 (1959).
- TÖNZ, O.: Nierenveränderungen bei experimenteller chronischer Bleivergiftung (Ratten). *Z. ges. exp. Med.* **128**, 361 (1957).
- TRUMP, B. F.: An electron microscope study of the uptake, transport and storage of colloidal materials by the cells of the vertebrate nephron. *J. Ultrastruct. Res.* **5**, 291 (1961).
- VENNER, H., u. CH. ZIMMER: Effekte von Schwer-Metallionen auf den Helix-Knäuel-Übergang der DNS. *Naturwissenschaften* **51**, 173 (1964).
- VOIGT, G. E., u. N. JONSSON: Das Sulfidsilberbild der Rattenniere bei akuten Metallsalzvergiftungen. *Beitr. path. Anat.* **124**, 351 (1961).
- WACHSTEIN, M.: Studies on inclusion bodies. *Amer. J. clin. Path.* **7**, 608 (1949).
- WATRACH, A. M.: Degeneration of mitochondria in lead poisoning. *J. Ultrastruct. Res.* **10**, 177 (1964).
- WATSON, J. D.: Involvement of RNA in the synthesis of proteins. *Science* **140**, 17 (1963).
- WESSEL, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen von intranukleären Einschlüssekörpern. *Virchows Arch. path. Anat.* **331**, 314 (1958).
- WILGRAM, G. F., and D. J. INGLE: Renal-cardiovascular pathologic changes in aging female breeder rats. *Arch. Path.* **68**, 690 (1959).
- WILSON, V. K., M. L. THOMSON, and C. E. DENT: Amino-aciduria in lead poisoning: a case in Childhood. *Lancet* **1953 II**, 66.
- WÖLKER, G.: Histologische Untersuchungen über die Phenolrotausscheidung während der kompensatorischen Hypertrophie der Rattenniere. *Z. Zellforsch.* **53**, 658 (1961).
- WOLMAN, M.: On the absence of desoxyribonucleic acid from some chemically-induced cytoplasmic and intranuclear inclusions, with reference to a special type of false positive staining by Feulgen's nuclear technique. *J. Path. Bact.* **68**, 159 (1954).
- ZIMMERMANN, H., G. SONNEKALB u. CH. WATZ: Experimentelle Untersuchungen über die Speicherungsfunktion der Rattenniere unter normalen Bedingungen und nach temporärer Ischämie. *Beitr. path. Anat.* **122**, 238 (1960).
- ZOLLINGER, H. U.: Beitrag zur Pathogenese der Einschluskörper. *Schweiz. allg. Path. Bakt.* **14**, 446 (1951).
- Durch chronische Bleivergiftung erzeugte Nierenadenome und -carcinome bei Ratten und ihre Beziehungen zu den entsprechenden Neubildungen des Menschen. *Virchows Arch. path. Anat.* **323**, 694 (1953).

Prof. Dr. F. D. DALLENBACH,
Dept. of Pathology, Dartmouth Medical School, Hanover, New Hampshire, USA.