

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM

Wissenschaftlicher Film C 1173/1975

Corticales Gefäß- und Tubulussystem der Rattenniere

Begleitveröffentlichung von

Prof. Dr. M. STEINHAUSEN, Heidelberg

Mit 13 Abbildungen

GÖTTINGEN 1976

Corticales Gefäß- und Tubulussystem der Rattenniere¹

M. STEINHAUSEN, Heidelberg

Allgemeine Vorbemerkungen²

In vorangegangenen Encyclopädie-Einheiten (E 966/1965, E 967/1965, E 1679/1971, E 1680/1971, E 1681/1971, STEINHAUSEN [12]—[16]) haben wir den tubulären Harnstrom und den peritubulären Blutstrom der Warmblütterniere dargestellt. Durch die Anfärbung des Blutplasmas mit dem in der Niere ausschließlich filtrierten Farbstoff Lissamingrün wurde die Bestimmung tubulärer Passagezeiten für die verschiedenen Abschnitte des Nephrons möglich. Damit war auflichtmikroskopisch eine direkte Funktionsanalyse der operativ freigelegten Niere möglich geworden (vgl. STEINHAUSEN [6]). Mit der von K. H. GERTZ [1] angegebenen Split-drop-Methode gelang es darüber hinaus, auch die tubuläre Reabsorption einer mikroskopischen Beobachtung direkt zugänglich zu machen (E 1680). Schließlich konnte mit Hilfe der Hochfrequenz-Mikrokinematographie (E 1679) auch der peritubuläre Blutstrom bei intravitalmikroskopischer Technik quantitativ analysiert werden. Hierbei wurden speziell diejenigen Mechanismen, welche bei dem in der menschlichen Pathologie bedeutsamen akuten Nierenversagen beteiligt sind, weiter aufgeklärt (STEINHAUSEN et al. [8]). In dem vorliegenden Film soll uns nun insbesondere die Lagebeziehung zwischen Harnkanälchensystem und Blutgefäßsystem in der Nierenrinde der Ratte interessieren. Eine filmische Dokumentation ist deshalb besonders angezeigt, weil wir kürzlich beobachteten, daß die Vorzugsrichtung des peritubulären Blutstromes der Strömungsrichtung des tubulären Harnstroms entgegengerichtet ist (STEINHAUSEN et al. [7]). Wir bezeichnen diese Anordnung als corticales Gegenstromsystem. Diese Anordnung bedingt Sauerstoff-

¹ Dieser Film wurde anlässlich der IX. World Conference der European Society for Microcirculation (Antwerpen—Belgien 5.—9. Juli 1976) mit dem MALPIGHI-Preis (Goldmedaille) ausgezeichnet.

² Angaben zum Film und kurzgefaßter Filminhalt (deutsch, englisch, französisch) s. S. 18 u. 19. — Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 90).

gradienten entlang des proximalen Konvulutes, wie wir zusammen mit M. KESSLER durch die Benutzung von sauerstoffempfindlichen Mikroelektroden direkt messen konnten (STEINHAUSEN et al. [9]). Dort, wo bevorzugt tubuläre Sekretionsprozesse stattfinden, erreicht das Blut zuerst mit den höchsten Sauerstoffkonzentrationen das proximale Kon-

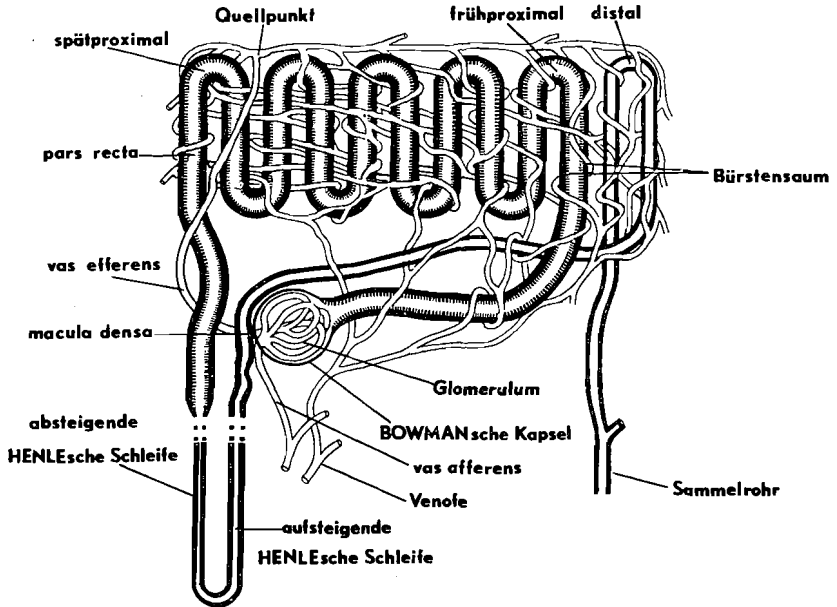


Abb. 1. Schematische Zeichnung eines Nephrons von der äußeren Nierenrinde der Ratte. Die HENLEsche Schleife ist hier viel zu kurz dargestellt, in Wirklichkeit übertrifft ihre Länge das gesamte proximale Konvolut. Der in vivo hell aufleuchtende Bürstensaum des proximalen Konvolutes ist hier gestrichelt angedeutet

(Aus STEINHAUSEN: Physiologie. Eine Einführung in das Basiswissen.)

volut, ebenso werden hier die aus dem Blut in das Nephron zu sezernierenden Substanzen zuerst angeboten. Zur Aufklärung der physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung einer derartigen Gegenstromanordnung, die wir nicht nur bei der Ratte, sondern u. a. auch beim Rhesusaffen beobachteten, wird es weiterer ausführlicher Experimente bedürfen, an dieser Stelle soll die strukturelle Anordnung als solche aufgezeigt werden. In dem vorliegenden Film wird hierzu einerseits die Darstellung des Gefäßsystems am toten Material benutzt, andererseits der tubuläre Harnstrom an der lebenden Niere in seinem Verhältnis zur An-

ordnung des Gefäßsystems gezeigt. Schließlich wird mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie an der lebenden Niere aufgezeigt, wie tubulär sezernierte Substanzen zuerst den spätproximalen Tubulusschlingen angeboten werden.

Eine schematische Zeichnung dieses Gegenstromsystemes, wie es insbesondere für die Nephronen der äußeren Nierenrinde typisch ist, gibt Abb. 1 wieder. Im Film wird der Blut- und Harnstrom einschließlich Farbstoffpassagen nach dieser Abbildung auch als Trickfilm dargestellt.

Zur Entstehung des Films

Die Untersuchungen erfolgten an 250—350 g schweren Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts. Als Narkosemittel diente das Barbiturat Inaktin (100 mg/kg, intraperitoneale Applikation). Die operative Technik wurde entsprechend unseren früheren Veröffentlichungen gehandhabt (vgl. Begleitveröffentlichung zu E 1679/1971 sowie STEINHAUSEN et al. [7]).

Zur Darstellung des Gefäßsystems wurde die Aorta unterhalb des Abganges der Nierenarterie kanüliert. Nach intravenöser Heparinisierung und proximaler Aortenunterbindung erfolgte zunächst eine Perfusion der Nieren mit isotoner, isoonkotischer und körperwarmer Plasmaersatzlösung (Hämaccel) für 2—3 min bei einem Druck von maximal 120 mm Hg. Diese Lösung wurde mit Sauerstoff angereichert. Anschließend wurden die Nieren bei gleichem Perfusionsdruck mit 1% Glutaraldehyd (isotomolar) für die Dauer von 5 min fixiert. Hieran schloß sich der eigentliche Gefäßausguß, für welches das flüssige Silikon Microfil (MV 112 und MV Diluent) sowie 3 Vol% des zugehörigen Polymerisationskatalysators benutzt wurden (Conton Biomedical Products, Boulder, Colorado — USA). Die Nieren wurden für die mikroskopische Beobachtung nach dem SPALTEHOLZ-Verfahren (1914) durchsichtig gemacht (Aufhellung durch Methylsalicylat nach Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe), vgl. auch ULLRICH [11]. Soweit Latex als Ausgußmaterial für Gefäße verwendet wurde, wurden die Nieren fixiert. Andersfarbiges Latex wurde in diesen Versuchen durch Mikropunktion in das Tubulussystem injiziert. Derartig gefüllte Nephronen wurden mit Rasierklingsplittern und Präpariernadeln unter dem Stereomikroskop herausgelöst, die Aufhellung dieser mikromazerierten Präparate erfolgte durch konzentrierte Kalilauge.

Die intravitalmikroskopische Beobachtung wurde in üblicher Weise durch Fixierung der linken Niere in einem sog. „Nierenlöffel“ (vgl. E 966/1965 bzw. E 1679/1971) ermöglicht. Als Mikroskop wurde das Ultropak-System (Leitz) verwendet, für die Fluoreszenzmikroskopie bedienten wir uns des Fluopak-Systems (Leitz). Die Beleuchtung erfolgte mit Xenonlicht, als Kamera benutzten wir eine Bolex-H-16-Kamera mit

Einzelbildschaltung. Als Filmmaterial diente Kodak-Ektachrome-Tageslichtfilm. Zur Darstellung des tubulären Harnstromes wurde der Triphenylmethanfarbstoff Lissamingrün SF verwendet. Dieser Farbstoff wird ausschließlich glomerulär filtriert und beeinflusst die tubulären Transportprozesse nicht (vgl. PAREKH et al. [2], POPA et al. [4], PAREKH et al. [3]). Lissamingrün wird als 10% Lösung in Mengen von jeweils 0,05 bis 0,1 ml intravenös im Stoß injiziert. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde im Film Acriflavin verwendet. Für diesen Stoff konnten wir in Clearance-Versuchen allerdings eine tubuläre Sekretion nicht nachweisen. Nach Fertigstellung des Films konnte für einen anderen Fluoreszenzfarbstoff (Sulfonfluorescein) eine echte tubuläre Sekretion nachgewiesen werden (vgl. STEINHAUSEN et al. [10]). Das intravitalmikroskopische Muster dieses Farbstoffes ist dem im Film gezeigten Muster außerordentlich ähnlich, insbesondere zeigt sich stärkste Fluoreszenz rund um die Quellpunkte, also in den spätproximalen Tubuli. Wir können daher davon ausgehen, daß sezernierte Substanzen im corticalen Gegenstrom transportiert werden.

Erläuterungen zum Film¹

Arterielle Gefäßausgüsse in Übersicht und bei stärkerer Vergrößerung

Das ist das arterielle Gefäßsystem der Rattenniere im Längs- und im Querschnitt (vgl. Abb. 2a+b). Man sieht die Markkrindengrenze deutlich (die Niere liegt in einer Aufhellungsflüssigkeit) — hier die Arteriae interlobares und hier die vasa recta der Papille des Nierenmarkes.

Bei stärkerer Vergrößerung lassen sich Einzelheiten der Nierenrinde erkennen.

Aus den von der rechten unteren Bildhälfte kommenden Arteriae radiatae entspringen die zu den Glomerula ziehenden vasa afferentia. Von den Glomerula zur Nierenoberfläche ziehen die vasa efferentia, die sich an ihren Enden charakteristisch verzweigen (vgl. Abb. 3a—c).

In Bildmitte liegt ein Glomerulum. Zu seinem Gefäßpol zieht von oben das vas afferens, von dort nach unten das vas efferens.

Auf der Nierenoberfläche läßt sich das Verzweigungssystem des vas efferens erkennen (vgl. Abb. 4). Nur dieser Bereich ist der Mikropunktion zugänglich.

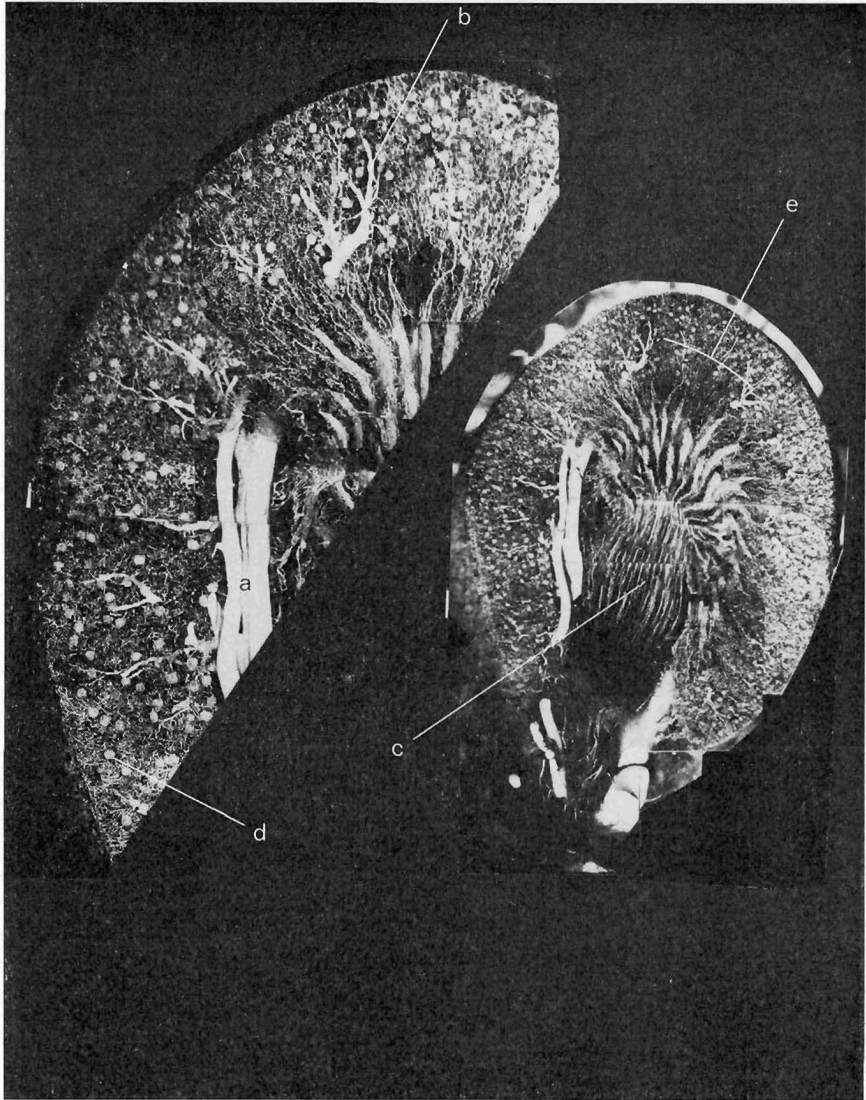
Am Ende eines vas efferens ist in Bildmitte der Quellpunkt als die Verzweigungsstelle dieses Gefäßes sichtbar.

Mikropunktion und Füllung eines proximalen Konvolutes

Das aufgehellte Tubulussystem kann auch im Ausgußpräparat punktiert werden (vgl. Abb. 5—7). Hier eine Füllung des proximalen Konvolutes eines

¹ Wortlaut des gesprochenen Kommentars. — Die Abbildungen sind nicht dem Film entnommen, sondern stellen Einzelbilder aus ähnlichen Untersuchungsreihen dar.

2 b



2 a

Abb. 2. Querschnitt durch ein arterielles Gefäßausgußpräparat der Rattenniere bei Übersichtsvergrößerung (2a) und bei stärkerer Vergrößerung (2b)
a: Arteria interlobaris; b: Arteria radiata; c: Vasa recta; d: Glomerulum; e: Markrindengrenze
(Aufhellungstechnik nach SPALTEHOLZ)

Nephrons mit Luftbläschen. Jedes Konvolut wird vorzugsweise von seinem eigenen Quellpunkt-System mit Blut versorgt.

Es wird noch etwas Luft nachinjiziert.

Das arterielle Gefäßsystem dieser nicht fixierten Rattenniere wurde mit rotem Latex gefüllt. Jetzt wird das Tubulussystem punktiert und das zugehörige proximale Konvolut mit weißem Latex gefüllt.

Die gleiche Stelle bei stärkerer Vergrößerung. Man kann quellpunktnahe und quellpunktferne Tubulusschlingen unterscheiden.

Die Punktionsstelle wurde unter dem Mikroskop aus ihrem Gewebeverband gelöst. Die spätproximalen Tubulusschlingen liegen um den Quellpunkt herum, während die frühproximalen — glomerulurnahen — Schlingen quellpunktfern gelegen sind.

Abb. 3 a

Abb. 3 b

Abb. 3 c

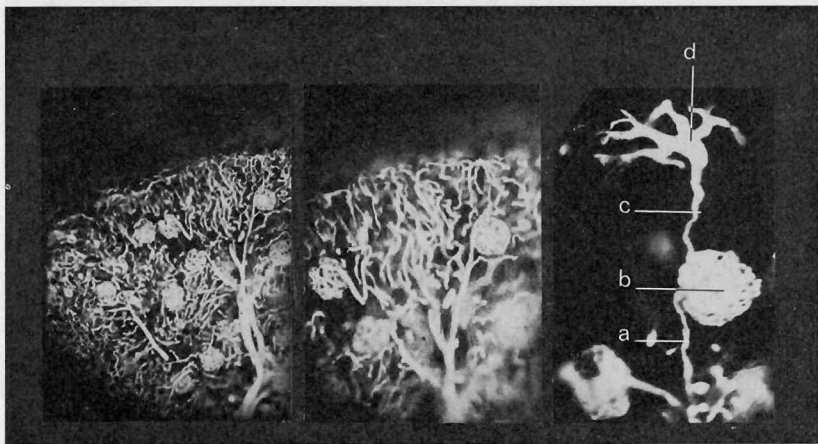


Abb. 3 a, b und c. Arterieller Gefäßausgußpräparat der äußeren Nierenrinde der Ratte bei unterschiedlicher Vergrößerung
a: Vas afferens; b: Glomerulum; c: Vas efferens; d: Quellpunkt

Arterieller Gefäßausguß und Füllung des Harnkanälchensystems vom Ureter her

Hier wurde nach arterieller Gefäßdarstellung weiße Kontrastmasse in das Nierenbecken gedrückt (vgl. Abb. 8). An einzelnen Stellen kommt es dabei zum Durchbruch in das aufsteigende Tubulussystem.

Hier die Kontrastmasse im Nierenbecken.

Mit dieser Technik ist das Gefäß- und Tubulussystem nach Aufhellung mit der SPALTEHOLZ-Technik gleichzeitig sichtbar geworden. Es sind vorwiegend spätproximale Tubulusschlingen gefüllt (vgl. Abb. 9). Die Lage der Quellpunkte — umgeben von spätproximalen Schlingen — ist mit dieser Technik gut zu analysieren.

Herausgebrochene Teile der Nierenrinde im Querschnitt zeigen ebenfalls die Anordnung von Gefäß- und Tubulussystem. Das vas efferens zieht zu den spätproximalen Tubulusschlingen.

Gefäß- und Tubulussystem eines Nephrons in Trickdarstellung (vgl. Abb. 1)

Die Beziehung zwischen dem corticalen Gefäß- und Tubulussystem der Rattenniere wird nun schematisch zusammengefaßt: Zum Glomerulum (Pfeil) gelangt der arterielle Blutstrom über das *vas afferens*.

Im Glomerulum wird rund $\frac{1}{10}$ des Blutes oder richtiger etwa $\frac{1}{5}$ des Blutplasmas unter Zurückhaltung der Plasmaeiweißkörper filtriert.

Vom Glomerulum fließt das Blut im *vas efferens* zum Quellpunkt (Pfeil), welcher bei der intravital-mikroskopischen Beobachtung an der Nierenoberfläche sichtbar ist und welcher die Verzweigungsstelle des *vas efferens* darstellt: von hier aus gelangt das Blut in die peritubulären Kapillaren und versorgt vorzugsweise sein zugehöriges proximales Harnkanälchen-System. Während seiner Passage durch das peritubuläre Kapillargebiet gibt das Blut Sauerstoff für tubuläre Transportprozesse ab, der intracapilläre Sauerstoff-Partialdruck sinkt mit der Entfernung vom Quellpunkt. Die blaue Farbe deutet den venösen Blutstrom an.

Das glomeruläre Filtrat fließt als tubulärer Harnstrom durch sein proximales Konvolut. Hierbei passiert der Harn zunächst die sog. „frühproximalen“ oder glomerulumnahen Tubulusschlingen (Pfeil), welche regelmäßig weit entfernt von den zugehörigen Quellpunkten gelegen sind. Fast 10 Sekunden später erreicht der tubuläre Harnstrom die sog. „spätproximalen“ oder glomerulumfernen Tubulusschlingen (Pfeil), welche nahe am Quellpunkt gelegen sind. Diese Anordnung bedingt eine gegensinnige Strömungsrichtung von tubulärem Harnstrom und peritubulärem Blutstrom, welche wir als „Cortikales Gegenstromsystem“ bezeichnen. Schließlich fließt der Harn über die *pars recta* in die hier extrem verkürzt angedeutete HENLESche Schleife.

Nach Passage der HENLESchen Schleife — in Wirklichkeit überragt ihre Länge das ganze proximale Konvolut — fließt der Harn durch das distale Konvolut und das Sammelrohrsystem zum hier nicht gezeigten Nierenbecken.

Nach Stoßinjektion von Lissamingrün in die Blutbahn des Tieres erfolgt die Farbstoffpassage zunächst durch das Gefäßsystem des Nephrons, gleichzeitig beginnt die glomeruläre Filtration des Farbstoffes.

Wenige Sekunden später zeigt der Blutstrom wieder seine normale Farbe. Der filtrierte Farbstoff fließt deutlich langsamer als der Blutstrom durch das Harnkanälchensystem. Hierbei färbt sich zunächst die erste der frühproximalen Tubulusschlingen.

Nach und nach erreicht der Farbstoff das Ende des proximalen Konvoluts. Durch tubuläre Reabsorption des Filtrates wird er langsam konzentriert.

Färbung der letzten spätproximalen Tubulusschlinge.

Über die *pars recta* erreicht der Farbstoff jetzt die HENLESche Schleife. Die Nierenoberfläche ist wieder entfärbt.

Nach Passage durch die HENLESche Schleife erreicht der Farbstoff nach etwa einer halben Minute über die *macula densa* das kürzere distale Konvolut und fließt von hier aus in das Sammelrohrsystem. Auf dem Weg bis zum distalen Konvolut ist das Filtrat zu rund 90% reabsorbiert, der Farbstoff also wesentlich konzentrierter.

Der Farbstoff selbst wird durch die Tubuli weder ausgeschieden noch reabsorbiert.

Abb. 4



Abb. 5



Abb. 6

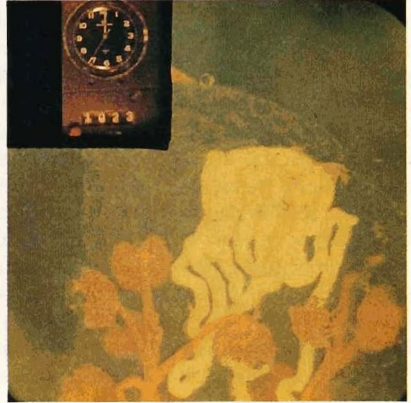


Abb. 7

Abb. 4. Arteriell Gefäßausgußpräparat der Rattenniere. Auflichtmikrophotogramm der Nierenoberfläche. Es sind die Quellpunkte mit ihren anschließenden Gefäßverzweigungen dargestellt

Abb. 5—7. Arterielle Gefäßausgüsse der äußeren Nierenrinde der Ratte. Im Anschluß an den Gefäßausguß wurde ein proximales Konvolut eines einzelnen Nephrons durch Mikropunktion mit weißer Kontrastmasse gefüllt

Abb. 5. Die Abbildung gibt ein Mikrophotogramm der Nierenoberfläche wieder. Die Glomerula sind als unscharfe Kreise in der Tiefe angedeutet. Spätproximale Schlingen liegen um den Quellpunkt herum, während eine frühproximale Schlinge davon weit entfernt gelagert ist

Abb. 6. Die Abbildung zeigt den Zustand nach Herauspräparation des Gewebsblockes quer zur Nierenoberfläche. Im Bilde unten zieht die pars recta von rechts nach links (vgl. Abb. 1) in die Tiefe



Abb. 8

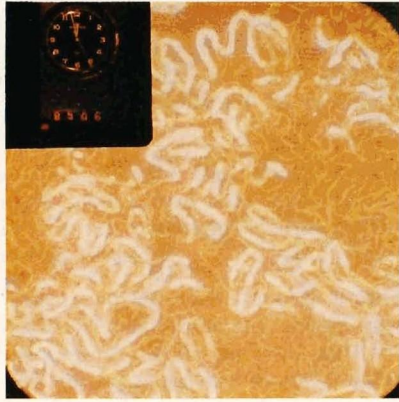


Abb. 9



Abb. 10



Abb. 11

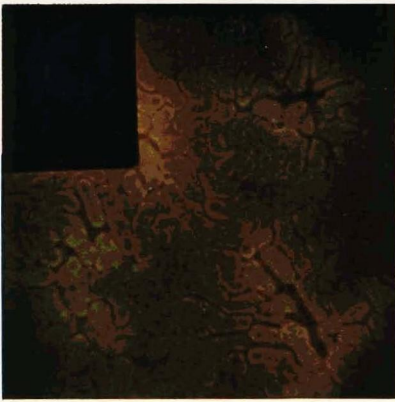


Abb. 12

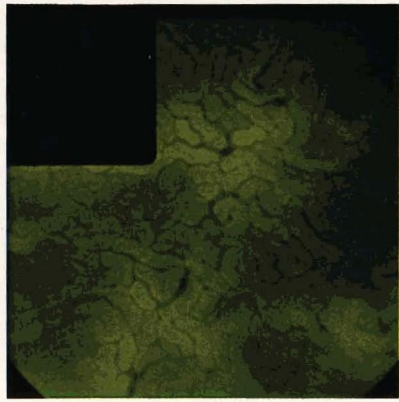


Abb. 13

Abb. 7. Die entsprechende Situation wie in Abb. 6 an einem anderen Mazerationpräparat, jedoch mit deutlicher Darstellung von vas afferens und vas efferens. Das vas efferens (vgl. Abb. 3c) ist hier dilatiert. Das proximale Konvolut ist bis zum Harnpol des Glomerulums in der unteren Bildmitte gefüllt

Abb. 8. Nach arteriellem Gefäßausguß (Kontrastmasse rot) wurde vom Nierenbecken aus weiße Kontrastmasse in die Niere gedrückt. Es kommt hierbei unter Umgehung der Nierenpapille zum Durchbruch der Kontrastmasse in das proximale Konvolut

Abb. 9. Am gleichen Präparat wie in Abb. 8 ist hier die Darstellung von proximalen Harnkanälchen (weiß) sowie Gefäßverzweigungen von den Quellpunkten aus (rot) an der Nierenoberfläche zu erkennen. Es sind vorwiegend spätproximale Schlingen gefüllt, welche vorzugsweise in der Nähe der Quellpunkte angeordnet sind

Abb. 10. Mikrophotogramm der Nierenoberfläche einer lebenden Ratte nach intravenöser Stoßinjektion von Lissamingrün. Der Farbstoff hat soeben die Quellpunkte erreicht. Außerdem wurden spätproximale Tubulusschlingen eines einzelnen Nephrons mit weißer Kontrastmasse gefüllt

Abb. 11. Nach Mikropunktionsergebnissen sowie Mikrophotogrammen gezeigter Ausschnitt der Nierenoberfläche. Für jedes proximale Konvolut eines Nephrons wurde eine eigene Farbe verwendet. Die eingetragenen Zahlen geben die jeweilige Anordnung der einzelnen Schlingen wieder, wobei 1 die glomerulumnächste frühproximale Schlinge darstellt, während die höchsten Zahlen den spätproximalen Schlingen dieses Nephrons entsprechen. Gleichzeitig sind die Quellpunkte sowie die Blutstromrichtung durch Pfeile angedeutet

(Nach STEINHAUSEN [7])

Abb. 12. Mikrophotogramm der Nierenoberfläche einer lebenden Ratte bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung nach intravenöser Acriflavin-Applikation. Der hell fluoreszierende Farbstoff lagert sich von den Quellpunkten aus an spätproximale Harnkanälchen

Abb. 13. Mikrophotogramm der Nierenoberfläche einer lebenden Ratte im Fluoreszenzmikroskop. Bei höheren Farbstoffgaben Fluoreszenzanreicherung in spätproximalen Tubulusschlingen

In vivo-Darstellung des tubulären Harnstromes durch Lissamingrün

Bei Auflichtmikroskopie läßt sich die Beziehung von Gefäß- und Tubulus-system auch in vivo darstellen. Nach intravasaler Stoßinjektion von Lissamingrün erreicht der Farbstoff die Gefäße der Nierenoberfläche von den Quellpunkten aus (vgl. Abb. 10). Gleichzeitig beginnt die glomeruläre Filtration des Farbstoffes. Es waren zuerst die frühproximalen-quellpunktfernen Tubulusabschnitte sichtbar. Anschließend sind die spätproximalen Tubulusabschnitte rund um die Quellpunkte mit Farbstoff gefüllt. Langsam entfärbt sich die Nierenoberfläche. Die distalen Tubulusabschnitte färben sich nach etwa einer halben Minute an — sie liegen an der Nierenoberfläche oft quellpunktfern, doch zeigen sie insgesamt eine größere Variation ihrer Lage als die proximalen Schlingen.

Nun wird die proximale Passage von Lissamingrün wiederholt. Man beachte die spätproximale Anordnung der Schlingen in Nestern rund um die Quellpunkte (vgl. Abb. 11).

Vergleichende Darstellung der Lissamingrünpassage mit dem Ausscheidungsmuster des sowohl glomerulär filtrierten als auch tubulär angereicherten Fluoreszenzfarbstoff Acriflavin

Der Fluoreszenzfarbstoff Acriflavin passiert das proximale Konvolut wie Lissamingrün, dabei ist eine Farbstoffanreicherung in den spätproximalen Tubulusschlingen rund um die Quellpunkte sichtbar.

Später fluoreszieren einige distale Tubuli — hier in Zeitraffung. —, Wiederholung der Fluoreszenzpassage durch das proximale Konvolut.

Bei stärkerer Vergrößerung ist in Bildmitte ein Quellpunkt besonders deutlich erkennbar. Es wird nochmals eine Lissamingrünpassage an der Nierenoberfläche unter gleichzeitiger Zeitdehnung gezeigt. Zuerst färben sich die Quellpunkte, anschließend passiert der Farbstoff quellpunktferne (aber glomerulumnahe) proximale Tubulusschlingen. Später erreicht der Farbstoff nach und nach die spätproximalen — rund um die Quellpunkte gelegenen — Tubulusschlingen.

Die Aufnahme wurde in Zeitdehnung ausgeführt. Zuletzt füllt sich die S-förmige Schlinge rechts neben dem im Zentrum gelegenen Quellpunkt.

Die gleiche Stelle im Fluoreszenzmikroskop nach intravenöser Stoßinjektion von Acriflavin in Zeitraffung.

Erneut intravenöse Stoßinjektion jetzt mit doppelter Farbstoffmenge — der Konzentrationsgradient zwischen Quellpunkt und Peripherie ist hier besonders deutlich.

Acriflavin-Anreicherung von den Quellpunkten aus an spätproximale Tubulusschlingen

Im folgenden werden Dauerinfusionen niedriger Fluoreszenzfarbstoff-Konzentrationen verwendet. Man erkennt die Farbstoffausbreitung von den Quellpunkten her (vgl. Abb. 12 und 13). Es gelingt dabei, in der Kombination von Mikromorphologie und Intravitalmikroskopie an der Nierenrinde der Ratte bevorzugte Strömungsrichtungen für den tubulären Harnstrom und den peritubulären Blutstrom festzustellen. Ihre Hauptströmungsrichtungen folgen dem Gegenstromprinzip.

English Version of the Spoken Commentary

The Cortical Vessel System and Tubular System of the Rat Kidney

Arterial casting of the rat kidney at low and high magnification

This shows the arterial vessel system of the rat kidney in longitudinal section and in cross section. You can clearly see the corticomedulullary junction (the kidney is in a clearing fluid)—here the interlobar arteries—and the vasa recta of the papilla of the renal medulla.

At a higher magnification we can see the details of the renal cortex.

From the interlobular artery in the right lower half of the picture arise afferent arterioles, which lead to glomeruli. The efferent arterioles lead from the glomeruli to the kidney surface.

At their ends we find a characteristic branching.

In the middle of the picture is a glomerulus. An afferent arteriole courses from above to the glomerular vascular pole, and an efferent arteriole leads away from it below.

On the kidney surface the branching system of the efferent arteriole is visible. Only this region is accessible to micropuncture.

In the middle of the picture can be seen the welling point at the end of an efferent arteriole. This is the place where this vessel branches.

Casting of a proximal convolution by micropuncture

The cleared tubular system of a cast preparation can also be punctured. Here is the filling of a proximal convolution of a nephron with air bubbles. Every proximal convoluted tubule is supplied chiefly by blood from its own welling point. Additional air is injected.

The arterial vessel system of this unfixed rat kidney was filled with red latex. Now the tubular system is punctured and a proximal convoluted tubule is filled with white latex.

The same place at a higher magnification. One can distinguish between tubular loops lying near and far from the welling point.

The puncture spot is now isolated from the tissue under microscopic control. The late proximal loops lie around the welling point, while early proximal loops (those near the glomerulus) lie far from the welling point.

Arterial casting and filling proximal tubules from the renal pelvis

Here, after filling the arterial vessels with red contrast medium, white contrast medium was forced into the renal pelvis. In some places it penetrates the ascending tubular system. Here the contrast medium in the renal pelvis.

After clearing the tissue with the SPALTEHOLZ method, we can observe the vessel and tubular system at the same time. Primarily late proximal tubular loops are filled. The position of the welling point, surrounded by late proximal loops, can be nicely analyzed with this technique.

Small pieces of kidney cortex in cross-section showed the arrangement of the vascular and tubular systems. The efferent arteriole supplies the late proximal tubular loops.

Schematic representation of the relation between cortical vessel and tubular system

In the following, the relations between the cortical vessel system and the tubular system of the rat kidney will be summarized schematically. The arterial blood stream leads to the glomerulus (arrow) by way of the afferent arteriole.

In the glomerulus roughly one tenth of the blood, or more correctly approximately one fifth of the blood plasma, is filtered. The plasma proteins are not filtered.

From the glomerulus the blood flows in the efferent arteriole to the welling point (arrow). The welling point is visible with intravital microscopy on the renal surface. It is the branching point of an efferent arteriole. From here the blood flows into the peritubular capillaries and preferentially supplies its own proximal tubular system.

During its passage through the peritubular capillary region, the blood gives up oxygen for tubular transport processes. The intracapillary oxygen tension decreases with increasing distance from the welling point. The blue color indicates venous blood flow.

The glomerular filtrate flows as tubular urine along its proximal convoluted tubule. The tubular urine passes first through the so-called "early proximal" loops (arrow). These are near the glomerulus, and are regularly located at a distance from the accompanying welling point. Almost 10 seconds later, the tubular urine reaches the so-called "late proximal" loops (arrow). These are distant from the glomerulus and lie near the welling point. This arrangement causes tubular urine and peritubular blood flow in opposite directions, which we designate as a "cortical countercurrent system". Finally the urine flows via the pars recta into the loop of HENLE, which is extremely shortened in this picture. Actually its length exceeds that of the entire proximal convoluted tubule.

After passage through the loop of HENLE, the urine flows through the distal convoluted tubule into the collecting duct system and then to the renal pelvis (which is not shown here).

After a bolus injection of lissamine green into the blood stream of an animal, the dye passes first through the vessel system of the nephron, and simultaneously is filtered by the glomeruli.

A few seconds later the blood stream shows its normal color. The filtered dye clearly flows slower in the tubular system than it does in the blood stream. Here the early proximal loops are colored first.

Gradually the dye reaches the end of the proximal convoluted tubule. Due to tubular reabsorption of water the dye is slowly concentrated.

Coloring of the last proximal tubular loops.

By way of the pars recta, the dye reaches the loop of HENLE. The dye has disappeared from the kidney surface.

About half a minute after passing through the loops of HENLE, the dye passes by the macula densa and reaches the short distal convoluted tubule. From here it flows into the collecting duct system. Up to the distal convoluted tubule about 90% of the filtrate was reabsorbed, so the dye is considerably concentrate.

The dye itself is not secreted or reabsorbed by the tubules.

Intravital microscopic observation of the tubular urine flow with lissamine green

With incident light microscopy the relation between the vessel system and tubular system can be seen in vivo. After intravascular injection of a bolus of lissamine green, the dye reaches the vessels of the kidney surface from the welling point. At the same time glomerular filtration of the dye begins. First the early proximal loops, those distant from the welling point are visible. Then the late proximal tubular loops around the welling point are filled with dye. The dye gradually disappears from the kidney surface.

The distal tubule segments, colored about half a minute later, lie on the kidney surface often at a distance from the welling point. Altogether they show a greater variation of their position than do the proximal loops.

The proximal passage of lissamine green is repeated. One can see the arrangement of late proximal loops clustered around the welling points.

Alternate observation of proximal passage of lissamine green and the fluorescent dye acriflavin, which is not only glomerularly filtered but also tubularly enriched

The fluorescent dye acriflavin passes along the proximal convoluted tubule like lissamine green, but in addition we see an enrichment of fluorescent dye concentration in the late proximal loops around the welling point. Later a few distal tubules fluoresce. A picture was taken every second.

Repetition of the fluorescent dye passage through the proximal convoluted tubule also shown in slow motion.

At a higher magnification a welling point in the middle of the picture is clearly visible. Using the same slow motion speed, we show here once again the passage of lissamine green on the kidney surface. First the welling points are colored. Then the dye passes through the proximal loops which are far from the welling point, but near the glomerulus. Later the dye gradually reaches the late proximal loops which lie around the welling point.

Here the picture were taken at 64 frames per second. Finally, the s-shaped loop to the right of the central welling point is filled.

The same place with a fluorescence microscope after the intravenous bolus injection of acriflavin. Pictures were taken a frequency of one per second.

A new intravenous bolus injection with double the usual quantity of dye. The concentration gradient between the welling point and periphery is clearly demonstrated here.

Enrichment of acriflavin in proximal tubules from the welling points

In the following we used a constant intravenous infusion of low concentrations of fluorescent dye. We see the dye spreading out from the welling point. In summary, by using a combination of micromorphology and intravital microscopy, we have demonstrated the counter-current flow of tubular urine and peritubular blood on the surface of the rat renal cortex.

Literatur und Filmveröffentlichungen

- [1] GERTZ, K. H.: Transtubuläre Natriumchloridflüsse und Permeabilität für Nichteletrolyte im proximalen und distalen Konvolut der Rattenniere. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **276** (1963), 336—356.

- [2] PAREKH, N., G. POPA and M. STEINHAUSEN: Renal Test Dyes I. Physical and Chemical Properties of some Dyes Suitable for Renal Passage Time Measurements. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **343** (1973), 1—9.
- [3] PAREKH, N., G. POPA and M. STEINHAUSEN: Renal Test Dyes III. Effect of Dyes Suitable for Renal Passage Time Measurements on Renal Function. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* in press (1976).
- [4] POPA, G., N. PAREKH and M. STEINHAUSEN: Renal Test Dyes II. Renal Handling of Dyes Suitable for Renal Passage Time Measurements. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **350** (1974), 273—280.
- [5] SPALTEHOLZ, W.: Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten. Hirzel, Leipzig 1914.
- [6] STEINHAUSEN, M.: Eine Methode zur Differenzierung proximaler und distaler Tubuli der Nierenrinde in vivo und ihre Anwendung zur Bestimmung tubulärer Strömungsgeschwindigkeiten. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **277** (1963), 23—45.
- [7] STEINHAUSEN, M., G. M. EISENBACH and R. GALASKE: A Counter-Current System of the Surface of the Renal Cortex of Rats. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **318** (1970), 244—258.
- [8] STEINHAUSEN, M., G. M. EISENBACH and W. BÖTTCHER: High-Frequency Microcinematographic Measurements on Peritubular Blood Flow under Control Conditions and after Temporary Ischemia of Rat Kidneys. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **339** (1973), 273—288.
- [9] STEINHAUSEN, M., M. KESSLER and N. PAREKH: Sauerstoffgradient im kortikalen Gegenstromsystem der Rattenniere. 9. Symposium der Gesellschaft für Nephrologie Basel (19.—22. 9. 1973).
- [10] STEINHAUSEN, M., P. MÜLLER and N. PAREKH: Renal Test Dyes IV. Intravital Fluorescena Microscopy and Microphotometry of the Tubularly Secreted. Dye Sulfonylfluorescein. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* in press (1976).
- [11] ULLRICH, F.: Das Strombett von Vas Afferens und Vas Efferens der Rattenniere. Ein Beitrag zur Klärung renaler Gefäßwiderstände. Inauguraldissertation, Heidelberg 1974.
-
- [12] STEINHAUSEN, M.: Lissamingrün-Passagen in der Nierenrinde, *Rattus norvegicus* (Muridae). Encyclopaedia Cinematographica Film E 966 (Teil I von Film D 886) des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1965. Begleitveröffentlichung 1970.
- [13] STEINHAUSEN, M.: Lissamingrün-Passagen in der Nierenpapille *Mesocricetus auratus* (Muridae). Film E 967 (Teil II von Film D 886) des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1965. Begleitveröffentlichung 1970.
- [14] STEINHAUSEN, M., und G. M. EISENBACH: Glomeruläre Filtration und Mikrozirkulation in der Rattenniere. Film E 1679 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1971. Begleitveröffentlichung 1972.

- [15] STEINHAUSEN, M.: Tubuläre Resorption an der Nierenoberfläche der Ratte (Split drop). Film E 1680 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1971. Begleitveröffentlichung 1972.
- [16] STEINHAUSEN, M., H. WEIDINGER und H. J. ROSS: Durchblutungsänderungen an der Nierenoberfläche unter Sympathicusreizung. Film E 1681 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1971. Begleitveröffentlichung 1972.

Anschrift des Verfassers:

Prof. Dr. M. STEINHAUSEN, I. Physiologisches Institut der Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 326, D-6900 Heidelberg.

Angaben zum Film

Der Film wurde 1975 veröffentlicht und ist für die Verwendung im Hochschulunterricht bestimmt. Tonfilm, 16 mm, farbig, 135 m, 12 ½ min (Vorführgeschw. 24 B/s).

Die Aufnahmen entstanden in den Jahren 1972 und 1973. Veröffentlichung aus dem I. Physiologischen Institut der Universität Heidelberg, Prof. Dr. M. STEINHAUSEN, und dem Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen, Dr. K.-H. HÖFLING. Für technische Assistenz ist Herrn R. DUSSEL zu danken. Der Trickteil des Films wurde nach Entwürfen des Autors durch Herrn R. LEHMANN, GEYER-Werke Hamburg, angefertigt. Für Zeichenhilfe bei den Entwurfzeichnungen ist auch Herrn Dr. med. W. BÖTTCHER, Heidelberg, zu danken. Für Übersetzungshilfe beim englischen Sprechtext danke ich Prof. Dr. G. TANNER, Indianapolis (USA).

Inhalt des Films

Es wird in einem I. Teil des Films das Gefäß-System der Ratte nach arteriellen Ausgußpräparaten in Übersicht und bei stärkerer Vergrößerung dargestellt. Mit Hilfe der Mikropunktionstechnik wird das Tubulussystem eines Nephrons gefüllt und nach Mikrodissektion die Gefäßversorgung des proximalen Konvolutes der äußeren Nierenrinde gezeigt. Auch die anschließende Kontrastmittelfüllung des proximalen Konvolutes über das Nierenbecken erlaubt die Zuordnung der Gefäßversorgung zu bestimmten Abschnitten des proximalen Harnkanälchensystems.

In einem II. Teil wird im Trickfilm die Gefäßversorgung des Nephrons in gegenläufiger Strömungsrichtung zum proximalen Harnkanälchensystem demonstriert, gleichzeitig wird schematisch die Passage des renalen Testfarbstoffes Lissamingrün durch das Nephron dargestellt.

Im III. Teil des Films wird die Beziehung zwischen Gefäß- und Tubulussystem an der lebenden Rattenniere unter Verwendung von Lissamingrün zur Markierung der tubulären Strömungsrichtung vorgeführt. Es schließt sich an die Beobachtung zum Teil identischer Abschnitte der Nierenoberfläche im Aufricht-Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung des fluoreszie-

renden Testfarbstoffes Acriflavin, welcher bei Dauerinfusion und niedriger
• Dosierung zuerst am Ende des proximalen Tubulussystems von den Gefäßen
her aufgenommen wird und damit besonders gut das kortikale Gegenstrom-
system erkennen läßt.

Summary of the Film

In the first part of the film vascular system in the rat kidney after an arterial casting, is shown at low and high magnifications. After filling tubular system by micropuncture technique and microdissection, the vessels surrounding the proximal convolutions in outer cortex are exhibited. The final filling of proximal convolutions from the pelvis of the kidney allows a representation of vascular system suppling late segments of proximal tubules.

In the second part the opposing flow directions in peritubular capillaries and in proximal tubules are demonstrated in a cartoon. Passage of the renal test dye, lissamine green through a nephron is also represented schematically.

In the third part of the film, the relation between capillary system and tubular system is shown by using lissamine green for staining tubular urine flow in alive rats. The following observations are partly done on the same sections of the kidney surface. During these observations with an incident light fluorescence microscope a renal test dye, acriflavin, was infused continuously. In the beginning acriflavin is accumulated from the vessels at the end of proximal convolutions, allowing a clear representation of the cortical countercurrent system.

Résumé du Film

La première partie du film donne une vue d'ensemble du système circulatoire du rat fortement grossi au microscope. La technique de la microponction permet d'injecter une substance dans le système tubulaire d'un néphron et de mettre ainsi en évidence après microdissection l'irrigation du tube contourné proximal du cortex. De la même manière, l'injection consécutive d'une substance contrastante dans le tube contourné proximal par le bassinnet permet de révéler la relation qui existe entre l'irrigation par les vaisseaux et certains segments du système des canaux urinaires proximaux.

La deuxième partie est constituée par un film d'animation qui illustre la disposition en contre-courant de l'irrigation du néphron et du système des canaux urinaires proximaux; en même temps, le passage du colorant-test rénal vert Lissamine dans le néphron se trouve représenté sous forme schématique.

La troisième partie fait apparaître la relation entre le système circulatoire et le système tubulaire dans un rein de rat vivant grâce à l'emploi de vert Lissamine, lequel permet de mettre en évidence le sens du courant du liquide intra-tubulaire. Ceci fait suite à l'observation au microscope à fluorescence de segments en partie identiques du cortex rénal à l'aide du colorant-test fluorescent Acriflavine qui, injecté de manière continue et à faible concentration, se trouve tout d'abord absorbé par les vaisseaux à l'extrémité du système tubulaire proximal et révèle donc avec une remarquable netteté la disposition en contre-courant dans le cortex.