

Aus der Medizinischen Forschungsanstalt — Biochemische Abteilung —
Max-Planck-Gesellschaft, Göttingen (Direktor: Prof. Dr. K. THOMAS)

Der Phasenkontrastmikroskopische Nachweis von Diatomeen in Lungen*

Von

H.-J. EINBRODT

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 11. Oktober 1956)

Für die Diagnostik des Ertrinkungstodes bedeutete es einen großen Fortschritt, als REVENSTORF 1904⁹ auf das Vorkommen von Diatomeen in den Lungen Ertrunkener aufmerksam machte. Später konnten den Diatomeenbefunden in den Lungen keine so erhebliche Bedeutung mehr zugemessen werden als weitere Untersucher festgestellt hatten, daß Diatomeen und andere corpusculäre Elemente auch in die Lungen eines Leichnams (postmortal) eindringen können. Auch die Anschauung, daß allein solche Diatomeen beweiskräftig seien, die sich in den subpleuralen Abschnitten der Lungen befänden, konnte auf Grund experimenteller Untersuchungen nicht aufrechterhalten werden.

Dagegen war die Feststellung von CORIN und STOCKIS¹ (1909), daß beim Ertrinken Partikelchen in die Capillaren der Lunge eindringen und von dort in den großen Kreislauf gelangen, sehr bedeutungsvoll. Sie fanden im *Herzblut* Ertrunkener bei der Untersuchung mit dem Polarisationsmikroskop kleinste Kristalle, die in HCl unlöslich waren, und hielten sie für Kieselerdekristalle. Sie suchten auch nach Kieselalgen, konnten aber keine finden, was sie darauf zurückführten, daß die Maas, aus welcher ihre Leichen gelandet wurden, nur wenig Algen enthielt. Die von CORIN und STOCKIS¹ beschriebenen Körperchen, welche diese Autoren nur im Herzblut von Leichen von Ertrunkenen nachweisen konnten, haben zwar auch FRAENCKEL und STRASSMANN³ beobachtet; sie fanden diese Körperchen aber nicht nur im Herzblut von Ertrunkenen, sondern auch bei Leichen von Personen, die an einer anderen Todesursache verstorben waren. Sie hielten daher den Nachweis dieser Körperchen für die Diagnostik des Ertrinkungstodes nicht für brauchbar. Damit war der Frage des Übertritts von corpusculären Elementen in die Blutbahn beim Ertrinkungstod in der Folgezeit keine besondere Aufmerksamkeit mehr geschenkt worden. Erst 1942 konnte INCZE⁴ an Hand von Tierversuchen zeigen, daß die Diatomeen während des Ertrinkungstodes die Alveolarwände passieren können und daher im Blut des linken Herzens und in den parenchymatösen Organen nachweisbar sind. MUELLER und GORGS⁵ stellten 1949 fest, daß die Diatomeen mit einer Größe bis zu 30 μ aus den Alveolen in die Blutbahn übergehen. Auch sie führten den Nachweis der Diatomeen nach Veraschung der Organe. WEINIG und PFANZ¹⁸

* Die Arbeit wurde mit dankenswerter Unterstützung der Bergbau-Berufsgenossenschaft — Bochum — durchgeführt. Für Anregung und Unterstützung danke ich den Herren Professoren Dr. TIMM und WEINIG.

empfehlen, zum Nachweis des Ertrinkungstodes die Untersuchung von Kieselalgen im „optisch leeren“ Schnitt (TIMM¹⁵) durchzuführen, da sich hierdurch Verunreinigungen leichter abgrenzen lassen. Als positive Befunde werden nur solche Kieselalgen anerkannt, die eindeutig in Gefäßen liegen.

Zu der Frage, ob auch durch Einatmen diatomeenhaltigen Staubes Kieselalgen in die Lungen gelangen können, hat NORDMANN 1952⁷ einen Beitrag geleistet, als er darauf aufmerksam machte, daß bei Kieselgurarbeitern im Lungengewebe Diatomeen vorkommen können. Er findet das Aufsuchen und die photographische Darstellung der Diatomeen äußerst mühsam. Er spricht von „Verkrusten“ der Diatomeen mit dem umliegenden Gewebe, ja sogar von Eiweißhüllen, die sich um die Diatomeen bilden sollen. NORDMANN arbeitete im Hellfeld.

Eigene Beobachtungen an Lungenstäuben

Ähnlich wie NORDMANN konnten wir bei der mikroskopischen Untersuchung der Lungenstäube von 8 Personen verschiedener staubreicher Betriebe und aus verschiedenen Gegenden Deutschlands zweimal Diatomeen nachweisen.

Im Gegensatz zu WEINIG und Mitarb.¹⁸, die mit der Timmschen Methode¹⁵ und im Dunkelfeld arbeiteten, untersuchen wir unser Material im Phasenkontrast. TIMM empfiehlt zur Erreichung eines optisch leeren Schnittes im Hell- oder Dunkelfeld als Einbettungsmittel Canadabalsam in Brombenzol gelöst. Die Mischung hat einen Brechungsindex von $n_D = 1,556$, ähnlich dem Brechungsindex des Gewebes. Wir arbeiten im Phasenkontrastmikroskop mit einem Einbettungsmittel aus Colophonium und Alcarin (Alcarin = 7,8%)*, gelöst in Nitrobenzol². Die Mischung hat nach dem Erhärten einen Brechungsindex von $n_D = 1,553$. Wir wählen den genannten Brechungsindex, da es uns in erster Linie auf den Nachweis von kristalliner Kieselsäure (Quarz) und bestimmten Silikaten ankommt. Nach VOIGT¹⁷ ist im Phasenkontrast jedoch kein optisch leerer Schnitt zu erreichen. Deshalb entfernen wir das störende Gewebe (s. NORDMANN) vorher nach der Thomasschen Formamidmethode¹²⁻¹⁴. Wir verarbeiten auf diese Weise ganze Organe und bekommen den gesamten Staubgehalt dieser Organe in Pulverform. Der statistisch naturgemäß unsichere Mittelwert aus einigen histologischen Schnitten fällt damit weg. Dieser Foramidaufschluß käme in etwa einer Anreicherung gleich, wie sie MUELLER und GORGS⁵ durchführen und wie sie WEINIG und PFANZ¹⁸ am Schluß ihrer Arbeit erwähnten. Der Gang des Formamidaufschlusses ist äußerst einfach und kann in jedem Labor ausgeführt werden. Er nimmt auch nicht viel Zeit in Anspruch¹⁴. Wir haben an annähernd 100 verschiedenen Organen die Methode geprüft

* Alcarin kann bezogen werden von der Firma Grübler & Co., früher Leipzig, jetzt Chroma-Gesellschaft Schmid & Co., Stuttgart-Untertürkheim.

und ausgebaut. Gegenüber der sonst üblichen trockenen Organveraschung hat die Formamidmethode den Vorteil, daß aus den gelösten Mineralien der Organe keine unlöslichen Produkte neu entstehen. Die Kristallbildungen, die nach feuchter Veraschung mit Schwefelsäure und Salpetersäure auftreten (Calciumsulfat und Silikate) und nach MUELLER⁶ nicht zu vermeiden sind, treten bei der Hydrolyse mit Formamid nicht auf.

Bei der Untersuchung der Fremdkörper im Phasenkontrastmikroskop sehen wir gegenüber der Timmschen Methode darin einen Vorteil, daß

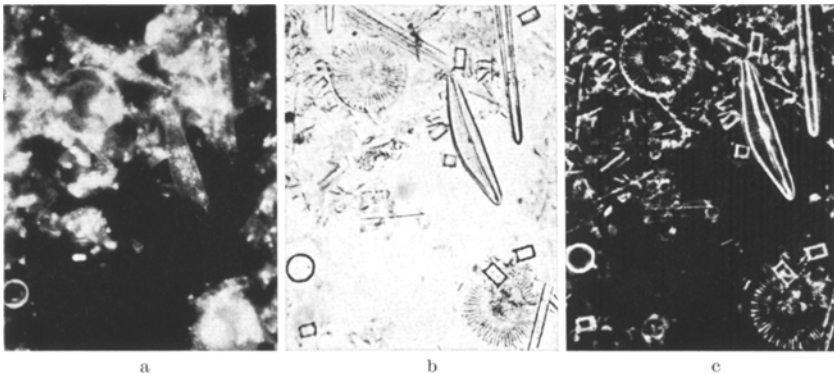


Abb. 1a—c. Kieselgur in Canadabalsam-Brombenzol eingebettet. Vergrößerung etwa 385fach. a Dunkelfeld. b Hellfeld. c Phasenkontrast

wir einen Teil der Begleitstäube gleich miterfassen, d. h. identifizieren können. *Kohle* z. B. erscheint in unserem Einbettungsmittel *braun*, *Quarz hellblau*, *Kaolin azurblau*. Diatomeen erscheinen weiß mit der für sie typischen Struktur. Die optische Färbung hängt von der optischen Dichte der Substanz ab^{8, 10, 11}.

Wir glauben, aus den Lungenstäuben nicht Ertrunkener mit einer gewissen Sicherheit schließen zu können, wo vermutlich die Person vor dem Tode längere Zeit gelebt oder gearbeitet hat und gerade diese Möglichkeit der Bestimmung erscheint uns für die gerichtliche Medizin von großer Bedeutung. Zum Beispiel finden sich in den Lungen von Landarbeitern, die viel in überschwemmten Wiesen zu tun hatten, oft Diatomeen¹⁶; daneben können auch Pollen nachweisbar sein, aber keine Kohle wie bei Großstädtern oder gar scharfkantiger Quarz, wie er bei den Bewohnern des Ruhrgebietes zu finden ist. Die Untersuchungen in dieser Richtung sind jedoch noch nicht abgeschlossen und sollen später mitgeteilt werden.

Die photographische Darstellung nach den verschiedenen mikroskopischen Methoden zeigen die Mikroaufnahmen Abb. 1a—c. Es handelt sich

dabei um Diatomeenerde, d. h. ungeglühte, technische Kieselgur, die nicht mit HCl ausgewaschen wurde.

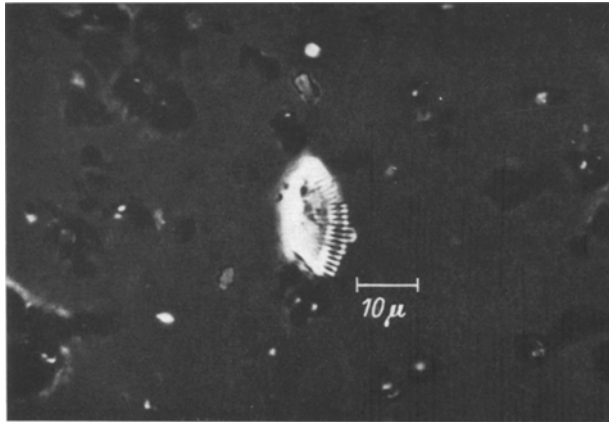


Abb. 2. Bruchstück einer Diatomee aus Lungenstaub, eingebettet in Colophonium-Alcaringemisch. Phasenkontrastaufnahme, Vergrößerung etwa 1000fach

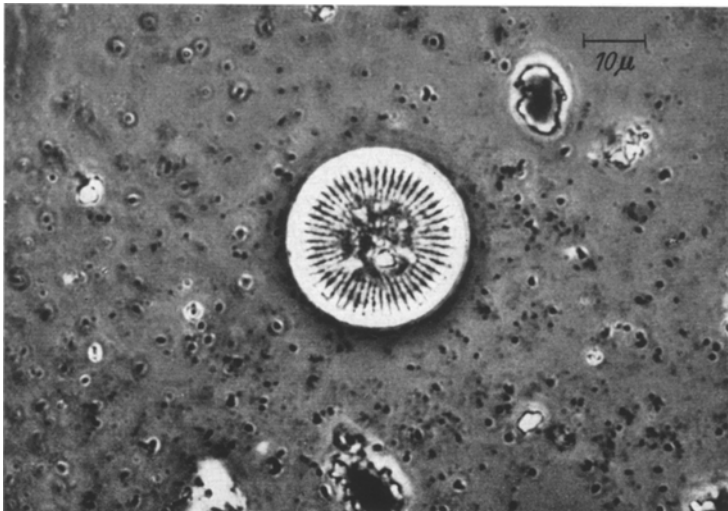


Abb. 3. Phasenkontrastaufnahme einer Diatomee Planktoniella aus dem Lungenschnitt eines Bergmanns im Salzgittergebiet. Vergrößerung etwa 1000fach

Wie schon erwähnt, fanden wir bei der Untersuchung von 8 Lungen aus den verschiedenen Bergbaugebieten in 6 Fällen weder im Schnitt noch im isolierten Gesamtstaub Diatomeen. In 2 Fällen konnten wir Diatomeen mit Sicherheit nachweisen.

Fall 1 (Nr. 46, S.Nr. 833/54, Heidelberg). Lungen eines 72jährigen Steinhauers aus Tauberbischofsheim. Der Mann hatte seit seiner frühen Jugend vorwiegend im Rotsandstein gearbeitet, vorübergehend auch im Muschelkalk, insgesamt 29 Jahre. Pathologisch-anatomisch bestand eine kleinknotige Silikose. Das Trockengewicht der Lungen nach Acetontrocknung betrug 270,0 g. Der Formamidauflösung dauerte 40 Std. 11,265 g Staub wurden isoliert, das sind 4,6% des staubfreien Trockengewichts der Lungen. Die chemische Analyse des Staubes ergab u. a. 12,5% SiO_2 .

In mehreren histologischen Schnitten konnten wir keine Diatomeen nachweisen. Nach längerem Suchen fanden wir im isolierten Gesamtstaub kleine und Bruchstücke von Diatomeen (Abb. 2).

Fall 2 (Nr. 48, S.Nr. 207/54, Bochum). Es handelt sich um die Lungen eines Bergmanns aus dem Eisenbergbau des Salzgittergebietes. Von Professor DI BLAS wurde die Diagnose Sidero-Siliko-Tuberkulose gestellt. Trockengewicht der Lungen: 236,40 g. Der Formamidauflösung dauerte etwa 50 Std. Das Trockengewicht des isolierten Staubes betrug 54,731 g, das sind 30% des staubfreien Trockengewichts der Lungen. Die chemische Analyse des Staubes ergab u. a. 4,5% SiO_2 .

In histologischen Schnitten konnten wir weder mit der Timmschen Methode, noch mit der Phasenkontrastmethode Diatomeen finden. Wir behandelten daher Schnitte auf dem Objektträger etwa 8 Std mit Formamid, bis das Gewebe entfernt war. Anschließend wurde der Schnitt im Tiegelofen bei 360° C verascht, um den Staub kohlefrei zu bekommen. In einem so behandelten Staubpräparat fanden wir eine Diatomee (Abb. 3). Im isolierten Gesamtstaub konnten wir weder vor noch nach dem Veraschen bei seiner Menge Diatomeen wiederfinden, die so intakt und und so gut darzustellen waren.

Diskussion

Aus den Beobachtungen von CORIN und STOCKIS, INCZE, MUELLER und GORGS, sowie WEINIG und Mitarb. geht hervor, daß Diatomeen und andere corpusculäre Elemente beim Ertrinkungstod über die Lungengefäße in den Kreislauf und in die parenchymatösen Organe gelangen können. Leider liegen keine Beobachtungen an Organen von Arbeitern vor, die mit Diatomeen während ihres Berufes in Berührung gekommen sind. Auch wir selbst haben bisher solche Organe nicht zur Verfügung gehabt. Die Untersuchung der Lunge ist zwar beim Beweis der intravitalen Aspiration von Ertrinkungsflüssigkeit nur von untergeordneter Bedeutung, da mit der Möglichkeit gerechnet werden muß, daß fremdkörperhaltiges Wasser erst postmortal in die Lungen eingedrungen ist. Dagegen scheint uns die Untersuchung des Lungenstaubes nach unserer Methode dann zweckmäßig, wenn es sich um die *Identifizierung einer unbekanntten Leiche* handelt. Es können dann unter Umständen Anhaltspunkte für *Herkunft* oder *Beruf* der Person erhalten werden. Bei reichlichem Vorhandensein von Quarz, Seriziten, Kaolin oder anderen Silikaten und gleichzeitigem Fehlen von Kohle bzw. nur geringen Kohlebefunden, ist daran zu denken, daß der Tote vor Buntsandstein oder anderen klastischen Gesteinen gearbeitet hat, während Eisenoxyd, Aluminiumoxyd und biogene Mineralien auf

längere Berührung mit Kalken, Dolomiten, Mergel oder anderen biogenen Sedimenten hinweisen.

Ob es sich bei den gefundenen Diatomeen um rezente oder fossile Formen handelt, ist nach dem Formamidaufschluß nicht mehr ohne weiteres zu beurteilen. Rezente Formen sind gegenüber den fossilen durch eine Gelbfärbung infolge des Gehalts ihrer Chromatophoren an Karotinoiden ausgezeichnet. Beim Formamidaufschluß werden diese Substanzen, genau wie alles organische Gewebe, mit Ausnahme der Cellulose, gelöst.

Zusammenfassung

1. Für den Aufschluß von Organen zum Nachweis von Diatomeen und mineralischen Schwemnteilchen wird das Thomassche Formamidverfahren empfohlen. Es hat gegenüber dem Säureaufschluß den Vorteil, daß sich keine neuen störenden Kongremente bilden.

2. Die phasenkontrastmikroskopische Untersuchung ist zum Auffinden von Diatomeen und zur Unterscheidung anderer Mineralbestandteile sehr gut geeignet.

3. Es wird darauf aufmerksam gemacht, daß Diatomeen in den Lungen nicht Ertrunkener vorhanden sein können, wenn diese mit Kieselgurerden oder anderem diatomeehaltigen Material länger in Berührung gekommen sind.

4. Die Untersuchung der Lungen nach der beschriebenen Methode kann auch bei Leichen unbekannter, nicht ertrunkener Personen Hinweise auf Beruf und Herkunft zum Zwecke der Identifizierung geben.

Literatur

- ¹CORIN et STOCKIS: Le diagnostic médico-légal de l'asphyxie par submersion. Bull. Acad. roy. Méd. Belg., Jan. 1909. — ²EINBRODT, H.-J.: Zur mikroskopischen Identifizierung von Quarz im Lungenstaub. Beitr. Silikoseforsch. 1955, H. 36, 3—18. — ³FRAENCKEL, P., u. G. STRASSMANN: Zur Diagnostik des Ertrinkungstodes. Vjschr. gerichtl. Med. 47, Suppl. 1, 334 (1914). — ⁴INCZE, G.: Fremdkörper im Blutkreislauf Ertrunkener. Verh. Ges. ungar. Path. 1941, 165. — ⁵MUELLER, B., u. D. GORGS: Stadien über das Eindringen von corpusculären Wasserbestandteilen aus den Lungenalveolen in den Kreislauf während des Ertrinkungsvorganges. Dtsch. Z. gerichtl. Med. 39, 715 (1948/49). — ⁶MUELLER, B.: Zur Frage des Ertrinkungstodes. Dtsch. Z. gerichtl. Med. 41, 400 (1952). — ⁷NORDMANN, M.: Die Staublung der Kieselgurarbeiter. Beiträge zur Silikoseforschung. Bericht über die Pathologen-Tagg, Sept. 1952, S. 59—64. — ⁸PILLER, H.: Die Phasenkontrastmikroskopie als Hilfsmittel zur Bestimmung feinkörniger, speziell dünner, transparenter Minerale. Heidelb. Beitr. Mineral. u. Petrogr. 3, 307—334 (1952). — ⁹REVENSTORF: Der Nachweis der aspirierten Ertrinkungsflüssigkeit als Kriterium des Todes durch Ertrinken. Vjschr. gerichtl. Med., III. F. 27, 274 (1904). — ¹⁰SCHMIDT, K. G.: Die Phasenkontrastmikroskopie in der Staubtechnik. Staub 1955, H. 41, 436. — ¹¹THAER, A.: Ein Beitrag zur lichtmikroskopischen Mineralbestimmung in Feinstäuben, insbesondere des Kohlenbergbaus. Staub 1954, H. 38, 555. — ¹²THOMAS, K., U. BAUMANN u. H.-J. EINBRODT: Eine

einfache Methode zur Auflösung von Lungengewebe unter milden Bedingungen und zur Darstellung seiner elastischen Fasern. Beiträge zur Silikoseforschung. Bericht über die medizinisch-wissenschaftliche Arbeitstag über Silikose 1951, S. 211. — ¹³THOMAS, K., u. H. STEGEMANN: Darstellung der Fremdstäube aus Lungen und ihre Eigenschaften. Beitr. Silikoseforsch. 1954, H. 28, 3. — ¹⁴THOMAS, K., u. H. STEGEMANN: Isolierung und Eigenschaften der Fremdstäube aus Lungen. Die Staublungenerkrankungen, Bd. II, Wiss. Forschungsber., Naturwiss. Reihe, Bd. 63, S. 172. 1954. — ¹⁵TIMM, F.: Neues zum Giftnachweis im Gewebe. Z. gerichtl. Med. 20, 582—588 (1933). — ¹⁶TIMM, F.: Mündliche Mitteilung, 1. Jan. 1956. — ¹⁷VORGT, G. E.: Das Phasenkontrastverfahren zur Untersuchung menschlicher Haare. Zbl. Path. 85, 369 (1949). — ¹⁸WEINIG, E., u. H. PFANZ: Zur Diagnostik des Ertrinkungstodes durch den Nachweis von Diatomeen im „optisch leeren“ Gewebsschnitt. Dtsch. Z. gerichtl. Med. 40, 664—668 (1951).

H.-J. EINHRODT, Wiss. Mitarb. an der Medizinischen Forschungsanstalt
der Max-Planck-Gesellschaft Göttingen, Bunsenstr. 10