

Aus der Medizinischen Forschungsanstalt der Max-Planck-Gesellschaft zu Göttingen
(Direktor: Professor Dr. K. THOMAS)

Zur Histochemie der Schwermetalle Das Sulfid-Silberverfahren*

Von
F. TIMM

Mit 4 Textabbildungen
(Eingegangen am 4. Juni 1957)

Die Gelegenheit, nach so vielen Jahren wieder an unserer Tagung teilnehmen zu können, will ich benutzen, Ihnen über Untersuchungsergebnisse aus den Jahren 1938—1945 in Leipzig und Jena zu berichten. Dabei will ich besonders auf das Sulfid-Silberverfahren eingehen, das bereits in einigen Dissertationen erwähnt worden und der Ausgangspunkt der Untersuchungen von VOIGT¹¹ gewesen ist.

Bei der Beurteilung einer Vergiftung wird der Sprung zwischen den ärztlichen Feststellungen an der Leiche und dem Ergebnis der chemischen Untersuchungen nicht selten als eine mißliche Lücke empfunden. Sie auszufüllen muß Aufgabe der Histochemie sein mit dem Ziel, das Gift im Gewebe ortsrichtig darzustellen und zu erkennen. Für den ortsrichtigen Nachweis der Schwermetalle hat sich die Dunkelfeldbetrachtung optisch leerer Schnitte in Schwefelwasserstoff-Alkohol fixierter Gewebsstücke als geeignet erwiesen (TIMM¹⁰). Mit diesem Verfahren ist dem feineren Verbleib einverleibter Schwermetalle im Organismus nachgegangen worden. Die Ergebnisse sind zumeist in Dissertationen niedergelegt, eine zusammenfassende Darstellung hat aus den Ihnen bekannten Gründen bisher nicht erfolgen können.

Im Verlauf dieser Untersuchungen ergab sich die Notwendigkeit, den normalen Ablagerungen von Schwermetallen im menschlichen und tierischen Gewebe, den sog. Spurenelementen, besondere Aufmerksamkeit zu widmen. Denn es zeigte sich, daß über die seit langem als Stapelplätze für Schwermetalle bekannten Leber und Milz hinaus auch in anderen Organen Anhäufungen von Schwermetallen normal vorhanden sind, in den Hartgeweben (TIMM¹⁰), in den Epithelien der Nierenkanälchen, der Prostata, in den Ganglienzellen, in den Inselzellen usw.

In all diesen Fällen leuchten die durch Fixierung des Gewebstücks in Schwefelwasserstoff-Alkohol in Sulfide umgewandelten Ablagerungen

* Vorgetragen auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für gerichtliche und soziale Medizin, Oktober 1956 in Marburg.

im Dunkelfeld als helle Teilchen auf. Einzelnen sind sie vielfach so winzig, daß sie im Hellfeld nicht mehr mit Sicherheit erkannt werden können und lediglich bei dichterem Lagerung das Gewebe an dieser Stelle bräunlich verfärben.

Die Identifizierung der Teilchen ist daher durch die bekannten hochempfindlichen mikrochemischen Reaktionen nur in besonders günstigen Fällen möglich und muß auf andere Weise geführt werden. Als aussichtsreich hat sich die Anwendung komplexbildender Reagentien zur Abtrennung einzelner Schwermetalle aus den Ablagerungen erwiesen.

Um bei den Untersuchungen nicht auf die morphologisch wenig ergiebigen und zum Teil auch mehrdeutigen Dunkelfeldbilder angewiesen zu sein — es leuchten im Dunkelfeld nicht nur die Schwermetallsulfide sondern auch gewisse andere Inhaltsstoffe gelegentlich auf, z. B. Pigmente, die zwar durch Vergleich mit alkoholfixierten Gewebsschnitten gegenüber dem Sulfidbild erkannt werden können —, so ist es doch günstiger, die Schwermetallsulfidablagerungen bei der Hellfeldbetrachtung des Schnittes sehen zu können. Das ist möglich. Denn Schwermetallsulfide sind argyrophil. Auf die Argyrophilie des Schwefelsilberkeims hat ZEIGER¹³ hingewiesen. Als Argyrophilie bezeichnet man bei den Nachversilberungen die Neigung der durch Vorbehandlung im Gewebe erzeugten Keime, aus einer Silberlösung mit einem Reduktionsmittel Silber anzulagern, wodurch bestimmte Gewebsteile usw. geschwärzt werden (ROMEIS, LISON^{5, 9}). Argentaffin hingegen nennt man Substanzen, die Silberion direkt entladen, wobei Silber an ihrer Stelle liegen bleiben und sie so erkennbar machen soll. Als argentaffine Substanzen z. B. gelten Polyphenole, Polyamine, Ascorbinsäure. Die argentaffine Reaktion wird daher als eine histochemische Reaktion angesehen, während der Argyrophilie eine histochemische Bedeutung nicht zuerkannt wird. Schwermetallsulfide verhalten sich wegen ihrer Argyrophilie demnach wie die Keime des latenten photographischen Bildes, die auch durch physikalische Entwicklung sichtbar gemacht werden können (ANGERER¹). Auf die Bedeutung des physikalischen Entwicklungsvorgangs bei den histologischen Nachversilberungsverfahren nach CAJAL, BIELSCHOWSKI u. a. hat LIESEGANG⁴ vielfach hingewiesen. Die physikalische Entwicklung wird in der mikrochemischen Tüpfelanalyse zum Nachweis von Silberspuren mit einer Erfassungsgrenze von 0,005 γ und einer Grenzkonzentration von 1:10 000 000 benutzt (FEIGL²). ROBERTS⁸ hat mit ihr Goldspuren im Gewebe nachgewiesen, wie auch QUERIDO⁷.

Zur physikalischen Entwicklung geeignete Lösungen sind im photographischen Schrifttum vielfach angegeben worden. Wir haben zumeist mit dem von LÜPPO-CRAMER⁶ angegebenen physikalischen Hydrochinon-Entwickler — der Gummi arabicum als Schutzkolloid und Citronensäure zur Dämpfung der Reduktionskraft des Hydrochinons enthält

und der auch von LIESEGANG verwendet worden ist — die physikalische Entwicklung vorgenommen, während des Krieges, als Gummiarabicum nicht mehr zu erhalten war, auch Tylose als Schutzkolloid verwandt. Auch Gelatine und die modernen Kunststoffkolloide lassen sich, wenn auch zum Teil mit gewissen Einschränkungen verwenden. Die Zusammensetzung der Lösung läßt sich erheblich variieren, was Konzentration der Gummi arabicum-Lösung und die Menge der in der Lösung vorhandenen Citronensäure und das Reduktionsmittel anlangt. Citronensäure kann auch im Ansatz fehlen. Dann laufen die nachstehend geschilderten Erscheinungen in der Lösung erheblich schneller ab. Die Citronensäure bedingt einen erheblichen Säuregrad des Entwicklers, der sich ungünstig, d. h. lösend auf säureempfindliche Sulfide auswirken kann, so daß für bestimmte Zwecke es sich empfiehlt, sie wegzulassen.

Als Beispiel einer gebräuchlichen Entwicklerlösung sei angeführt:

Zu 10 ml einer 15—25%igen Gummi arabicum-Lösung fügt man 0,1 ml molarer Silbernitratlösung und 2 ml einer Lösung von 2 g Hydrochinon und 5 g Citronensäure in 100 ml Wasser. Die Mischung wird gut geschüttelt und nach frühestens 30 sec über die Präparate geschüttelt. Im hellen Sonnenlicht bräunt sich die Lösung bald, im diffusen Tageslicht ist sie nach 20 min teefarben, nach 40 min tabakbraun und später kaffeebraun bis schwarz. Völlig im Dunkeln gehalten verfärbt sich die Lösung auch in 2—3 Std nicht, lediglich ein feines Silberhäutchen kann sich an der Oberfläche bilden. Die Anlagerung von Silber an die argyrophilen Teilchen beginnt schnell, schon ehe überhaupt eine Verfärbung der Entwicklerlösung wahrnehmbar wird, und ist mit Lupe oder Mikroskop leicht zu verfolgen, zum Teil auch mit bloßem Auge wahrnehmbar. Mit der Zeit kommt es durch zunehmende Anlagerung von Silber an die Einzelteilchen leicht zu einer Verschmelzung mehrerer dicht beieinanderliegender Teilchen und damit zur Bildung größerer Körnchen, so daß es sich nicht empfiehlt, die Entwicklung zu weit zu treiben. Orte massiverer Ablagerung argyrophiler Teilchen erscheinen dann als dichte schwarze Bezirke. Die wesentliche Entwicklung ist im allgemeinen nach 20—30 min abgelaufen, so daß die Beobachtung des Entwicklungsvorgangs durch die zunehmende Verfärbung der Lösung nicht gestört wird. Die Entwicklung wird unterbrochen durch Übertragen des Schnittes im Wasser. Vielfach ist es bei Versilberungen üblich, eine Nachbehandlung mit Thiosulfat anzuschließen; sie ist nicht unbedingt notwendig, wenn ausreichend gewässert wird, und nicht ungefährlich. Denn selbst dünne neutrale Thiosulfatlösungen lösen gerade die feinsten Silberanlagerungen schnell auf, so daß die Thiosulfateinwirkung sich nur über einige Minuten erstrecken sollte. Auch eine nachfolgende Vergoldung führt zu Umlösungen. VOIGT¹¹ hat die Citronensäure im Entwickler durch Borsäure ersetzt und meint, damit klarere Versilberungen erreichen zu können. Die von ihm angegebene Lösung hat folgende Zusammensetzung: Zu 7,2 Teilen 20% Gummi arabicum-Lösung fügt man 1,1 Teile einer 1,2% Borsäure, 0,3 Teile 10% Silbernitratlösung und 1,2 Teile 2% Hydrochinonlösung.

Mit der als Sulfid-Silberverfahren bezeichneten Anwendung von Schwefelwasserstoff-Fixierung in Kombination mit einer physikalischen Entwicklung sind die Ablagerungen der normalen und der ungehörigen Schwermetalle in ihrer Gesamtheit der Hellfeldbetrachtung zugänglich geworden, z. B. die Ablagerungen des normalen Bleis in den Hartge-

weben (Abb. 1), deren Dunkelfeldbilder bereits früher mitgeteilt sind (TIMM¹⁰). Abb. 2 zeigt die Ablagerungen normaler Schwermetalle in der Niere; in normalen Nieren ist nicht einmal Eisen mit Sicherheit histochemisch nachweisbar (HENRIQUES und OKKELS³). Außer Eisen ist auch Zink in den Epithelien der Nierenkanälchen vorhanden. In den Ganglienzellen sind Eisen, Zink und Kupfer vorhanden. Ihre Sulfide sind die entwickelbaren Körnchen. Durch einen besonders hohen

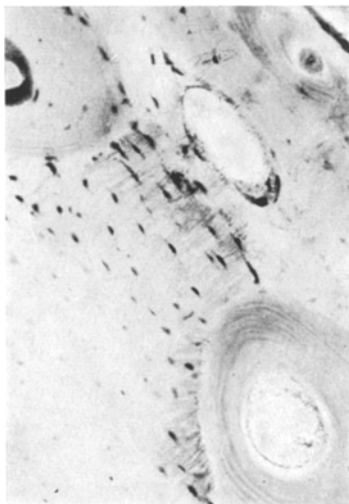


Abb. 1. Sulfidsilberbild des H₂S-entkalkten Knochens. Blei

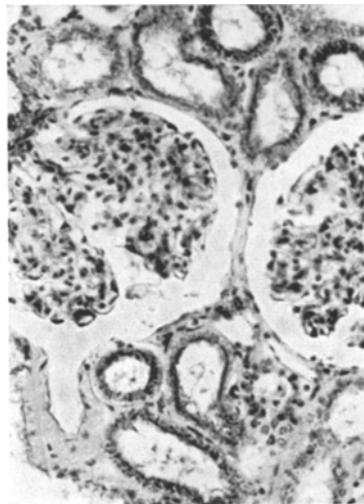


Abb. 2. Sulfidsilberbild der normalen Niere. Kernfärbung mit Hämatoxylin

Zinkgehalt sind die Inselzellen der Bauchspeicheldrüse (WEITZEL¹²) und die Epithelien der Prostata ausgezeichnet. Die entsprechenden Sulfid-Silberbilder zeigen die Abb. 3 und 4.

Schon diese Befunde lassen die hohe Bedeutung des Sulfid-Silberverfahrens für den Nachweis der Schwermetalle im Gewebe nicht nur für die Toxikologie, vielmehr darüber hinaus auch für den histochemischen Nachweis der Spurenelemente erkennen, deren biologische Bedeutung mehr und mehr gewinnt. Die argyrophile Reaktion hat aber nicht nur für den Nachweis der Schwermetalle im Gewebe in toxikologischer Hinsicht, vielmehr darüber hinaus eine allgemeine histochemische Bedeutung. Denn es gibt im Gewebe autochthone chemisch wohldefinierte Verbindungen, die sich durch physikalische Entwicklung spezifisch nachweisen lassen. Als Beispiel hierzu soll die argyrophile Substanz in den Inselzellen angeführt werden.

Läßt man eine physikalische Entwicklerlösung, wie sie voranstehend angegeben worden ist, auf einen Pankreasschnitt einwirken, es kann sich

um native Gefrierschnitte oder Paraffinschnitte nach Alkoholfixierung und auch nach kurzer Formalinfixierung handeln — bei längerer Formoleinwirkung wird die Substanz herausgelöst, ebenso durch alle sauren Fixierungsgemische —, so werden die Inseln selektiv dargestellt. In den Inselzellen sind jetzt genau wie im Sulfid-Silberbild zahllose schwarze bis braunschwarze Körnchen durch Silberanlagerung sichtbar geworden. Es kann vermutet werden, daß diese als argyrophile Körnchen in den Inselzellen enthaltene Substanz die von WEITZEL in den Inselzellen nachgewiesene komplexe Zink-Insulinverbindung ist. Nicht alle Tiere

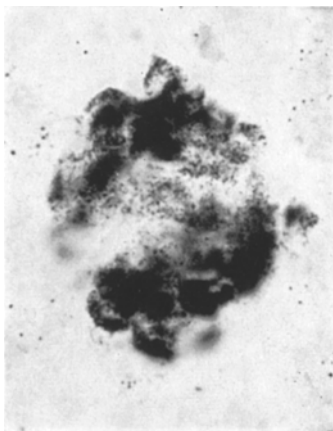


Abb. 3. Sulfidsilberbild der Insel im Pankreas

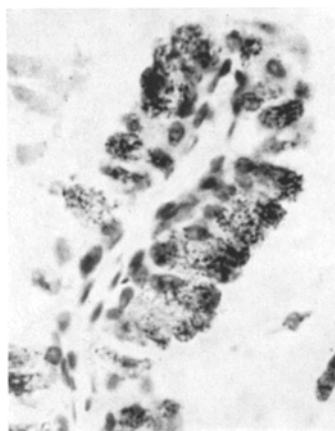


Abb. 4. Sulfidsilberbild des Epithels der Prostata. Kernfärbung mit Hämatoxylin

enthalten eine solche Substanz in den Inselzellen gespeichert, sie ist z. B. in gleichem Maße nicht nachweisbar bei Wiederkäuern, worüber gesondert berichtet werden wird.

Im Laufe der letzten Jahre hat die Elektronenmikroskopie auch in der Histologie große Fortschritte gemacht. Eine chemische Deutung der Bilder ist bisher nur in bescheidenem Umfang möglich geworden. Fortschritte in der Histochemie werden wesentlich zur Deutung der elektronenoptischen Bilder beitragen und so weitergehende Einblicke in das biochemische Geschehen vermitteln können.

Für uns ist das Sulfid-Silberverfahren zunächst wichtig, weil es ermöglicht, dem feineren Verbleib von Schwermetallgiften im Gewebe nachzugehen, die histologische Erkennung ungehöriger Ablagerungen in Gewebe erhoffen läßt und so geeignet sein kann, die zu Beginn der Ausführungen aufgezeigte Lücke in der Beweisführung der Vergiftungen zu schließen.

Daß es darüber hinaus auch für die Klärung allgemeiner biologischer Probleme bedeutungsvoll werden kann, zeigen die Befunde an den Inselzellen.

Die Entwicklung der Anatomie, Physiologie, physiologischen Chemie und Biochemie hat gezeigt, daß das mit dem Skalpell und Reagensglas Erforschbare weitgehend erschlossen ist. In allen Disziplinen wendet man sich der Erforschung der Feinstruktur und der Dynamik zu. Elektronenmikroskop und elektronisch verstärkte hochempfindliche physikalische und neuere chemische Untersuchungsmethoden erlauben Produkte nachzuweisen und im Gewebe ablaufende Prozesse zu verfolgen, die noch vor einigen Jahrzehnten utopisch galten. Hierbei kommt der Histochemie eine steigende Bedeutung zu. Wie wenige Disziplinen verfügen wir über ein vielseitiges Untersuchungsgut zur histochemischen Erforschung des normalen und krankhaften Geschehens wie auch der Leichenveränderungen. Nützen wir das.

Literatur

- ¹ ANGERER, E. v.: Wissenschaftliche Photographie, 5. Aufl. Leipzig 1952. — ² FEIGL, F.: Qualitative Analyse mit Hilfe von Tüpfelreaktionen, 2. Aufl. Leipzig 1935. — ³ HENRIQUES, J., u. H. OKKELS: Histochemische Untersuchungen über das Verhalten verschiedener Eisenverbindungen innerhalb des Organismus. Biochem. Z. **210**, 118 (1929). — ⁴ LIESEGANG, R. E.: Histologische Versilberungen. Z. wiss. Mikrosk. **45**, 273 (1928). — LIESEGANG, R. E., u. W. RIEDER: Versuche mit einer Keimmethode zum Nachweis von Silber in Gewebsschnitten. Z. wiss. Mikrosk. **38**, 334 (1921). — ⁵ LISON, L.: Histochemie et Cytochimie animales, 2. Aufl. Paris 1953. — ⁶ LÜPPO-CRAMER, DR.: In J. M. EDERS Handbuch der Photographie, Bd. 2, S. 1. 1927. — ⁷ QUERIDO, A.: Gold intoxications of nervous elements on the permeability of the blood-brain-barrier. Acta psychiatr. (Københ.) **22**, 97 (1947). — ⁸ ROBERTS, W. J.: Proceedings **38**, 540 (1935). — ⁹ ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik, 15. Aufl. München 1948. — ¹⁰ TIMM, F.: Zellenmikrochemie der Schwermetalle, Habil.-Schr. Leipzig 1932. — Neues zum Giftnachweis im Gewebe. Dtsch. Z. gerichtl. Med. **20**, 582 (1933). — Der histochemische Nachweis des „normalen“ Bleis in menschlichen Hartgeweben. Virchows Arch. **297**, 502 (1936). — Mikrochemie, Histochemie, Zellmikrochemie. Jena. Z. Med. u. Naturwiss. **76**, 17 (1943). — ¹¹ VOIGT, G. E.: Histologische Versilberungen. Habil.-Schr. Jena 1953. — Gewebs-eigene Keime (Primärkeime) bei histologischen Versilberungen. Z. wiss. Mikrosk. **61**, 1 (1952/53). — ¹² WEITZEL, G., STRECKER, F.-J., ROESTER, U., FRETZDORFF, A.-N., u. E. BUDECCLE: Zink und Insulin im Pankreas von Knochenfischen. Z. physiol. Chem. **295**, 83 (1953). — ¹³ ZEIGER, K.: Physikochemische Grundlagen der histologischen Methodik. Wiss. Forschungsber. **48** (1938).

Prof. Dr. Dr. FRIEDRICH TIMM, Göttingen, Bunsenstr. 10