

Über Metallfärbungen verkalkter Gewebeteile.

Von

Prof. Dr. Wilhelm Stoeltzner,

Direktor der Universitäts-Poliklinik für Kinderkrankheiten in Halle a. S.

Die Histologie kennt eine Reaktion auf phosphorsauren Kalk, die 1901 von Julius v. Kóssa angegeben worden ist.¹⁾ Sie besteht darin, daß die Schnitte, bei deren Präparation natürlich alle kalklösenden Flüssigkeiten vermieden werden müssen, bei Zutritt von hellem Tageslicht $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde lang in einer 1 bis 5 prozentigen Lösung von *Argentum nitricum* belassen werden; nach Ablauf dieser Zeit hat sich der Kalk tief schwarz gefärbt.

Die Methode hat den Nachteil,²⁾ daß die Schnitte nachdunkeln; man kann sich hiergegen zwar dadurch sichern, daß man die Präparate vor dem Einbetten auf kurze Zeit in eine Lösung von unterschwefligsaurem Natron überträgt; nunmehr entsteht aber die Schwierigkeit, daß die Färbung ihre Haltbarkeit verliert, wenn nicht das unterschwefligsaure Natron durch sehr sorgfältiges Auswaschen wieder vollständig entfernt wird. Weitere Mängel der Methode sind, daß sie helles Tageslicht voraussetzt und daß sie relativ viel Zeit beansprucht.

Mir ist nun eine bei weitem vollkommenere Methode der Kalknachweisung durch Silber schon seit dem Jahre 1899 bekannt.

Ich habe damals in Gemeinschaft mit Salge ausgedehnte Versuche darüber angestellt, was dabei herauskommt, wenn man histologische Schnitte denjenigen Manipulationen unterwirft, die man in der Photographie anwendet, um an belichteten Bromsilberplatten das photographische Bild hervorzurufen.³⁾

Wir haben damals mit Schnitten von rachitischen Knochen experimentiert; wir behandelten sie zunächst einige Minuten mit dünner *Argentum nitricum*-Lösung, übertrugen sie nach Auswaschen in destilliertem Wasser in Bromnatriumlösung und setzten nunmehr diese gesilberten Präparate, an denen zunächst von Färbung noch nichts zu sehen war, der Einwirkung von irgend einem der zahlreichen photographischen Entwickler aus. In dem Entwickler trat dann stets fast momentan eine sehr deutliche Silberfärbung hervor, die sich, ganz ebenso wie der Silberniederschlag im

1) Julius v. Kóssa, Über die im Organismus künstlich erzeugbaren Verkalkungen. Beiträge zur pathol. Anat. u. zur allgem. Pathol. Bd. 29, H. 2. 1901.

2) S. Schmorl, Die pathologisch-histologischen Untersuchungsmethoden. 2. Aufl. Leipzig 1901. F. C. W. Vogel.

3) Salge und Stoeltzner, Eine neue Methode der Anwendung des Silbers in der Histologie. Berliner klin. Wochenschr., 1900, Nr. 14.

photographischen Negativ, vergolden und platinieren, und mit Uran- und Quecksilber verstärken ließ.

Die mikroskopische Betrachtung ergab, daß sich auf diese Weise mit Silber dieselben Gewebeelemente färben lassen, wie etwa mit Hämatoxylin, also vor allem die Kerne; und in entkalkten rachitischen Knochen die verkalkt gewesene Knochengrundsubstanz.

Wir haben damals zahlreiche Versuche auch an durch mehrmonatiges Verweilen in Müllerscher Flüssigkeit nur unvollständig entkalkten rachitischen Knochen angestellt; das färberische Verhalten der vollständig entkalkten Präparate interessierte uns aber in jener Zeit so überwiegend, daß wir, als wir die Ergebnisse unserer Untersuchungen kurz veröffentlichten, die außerordentliche Brauchbarkeit der Methode für die Färbung verkalkter Partien nicht einmal erwähnten.

Ich möchte diese Unterlassungssünde, die wir damals begangen haben, noch nachträglich gutzumachen versuchen; denn in der Tat leistet die Methode gerade für die Färbung von Verkalkungen so Hervorragendes, daß es zu beklagen wäre, wenn sie nicht in weiteren Kreisen bekannt würde.

Färbt man gar nicht oder nur unvollständig entkalkte Präparate in der angegebenen Weise, so färben die kalkhaltigen Stellen sich außerordentlich intensiv, auch wenn die Färbung im übrigen nur sehr zart ausfällt. Geht man nun mit der Konzentration der Silberlösung mehr und mehr hinunter, so gelangt man sehr bald zu Präparaten, in denen sich die kalkhaltigen Stellen noch immer sehr intensiv gefärbt haben, während das übrige Gewebe vollständig ungefärbt geblieben ist. Wir haben dann also eine elektive starke Färbung der verkalkten Partien; und diese Präparate dunkeln weder nach noch blassen sie aus; auch gelingt die Färbung bei jeder Art von Beleuchtung.

Die ganze Prozedur gestaltet sich überaus einfach. Die Schnitte kommen aus destilliertem Wasser auf 5 Minuten in ein zweites Schälchen mit destilliertem Wasser, in dem man einige Tropfen einer Argentum nitricum-Lösung verteilt hat. Nach Abspülen in destilliertem Wasser überträgt man die Schnitte in eine dünne Lösung von z. B. Pyrogallol, in dieser tritt augenblicklich die Silberfärbung der verkalkten Stellen hervor, und man ist fertig.

Ich habe nun im Verlaufe des letzten Jahres die seinerzeit mit Salge angestellten Untersuchungen von neuem aufgenommen und wesentlich erweitert.

Ich legte mir die Frage vor, ob die Affinität der verkalkten Partien zum Silber eine isoliert dastehende Erscheinung sei, oder ob andere Metalle eine ähnliche Affinität besitzen.

Das allgemeine Verfahren, das ich einschlug, bestand darin, daß ich die Schnitte mit der wässrigen Lösung irgend einer Metallverbindung behandelte und dann nach gründlichem Auswaschen in destilliertem Wasser die so vorbehandelten Schnitte der Einwirkung eines Reagens aussetzte,

das mit der betreffenden Metallverbindung einen charakteristischen, möglichst dunklen Niederschlag gibt. Ohne über alle von mir in dieser Richtung angestellten Versuche zu berichten, beschränke ich mich darauf, kurz die hauptsächlichsten Ergebnisse mitzuteilen:

1. Vorbehandlung mit *Argentum nitricum*; Nachbehandlung mit Schwefelammonium. Resultat: gelbbraune Färbung ausschließlich der verkalkten Substanz, mit besonderer Hervorhebung der Konturen der Knochenkörperchen.

2. Vorbehandlung mit *Plumbum aceticum*, Nachbehandlung mit Schwefelammonium, oder dem weniger heftig stinkenden Schwefelkalium. Starke Färbung der verkalkten Substanz. Bei höherer Konzentration der Bleilösung auch starke Kernfärbung; die osteoide Substanz bleibt aber auch dann ungefärbt.

3. Kobaltnitrat-Schwefelammonium. Ausgezeichnete elektive Schwärzung der verkalkten Substanz.

4. Kupfersulfat-Schwefelammonium. Elektive Braunfärbung der verkalkten Substanz.

5. Eisenchlorid-Schwefelkalium. Schwarzgrüne Färbung der verkalkten Substanz. Bei stärkerer Konzentration der Eisenlösung tritt, wie bei diesen Metallfärbungen in der Regel, eine schwächere, in diesem Falle eine hellgrüne Färbung der Kerne und auch eine Anfärbung der osteoiden Substanz hinzu.

6. Eisenchlorid-Rhodankalium. Intensive zitronengelbe Färbung der verkalkten Substanz.

7. Eisenchlorid-Ferrocyankalium. Starke Berliner Blaufärbung der verkalkten Substanz.

8. Eisenchlorid-Tannin. Intensive Schwarzblaufärbung der verkalkten Substanz.

Alle mit Eisen gefärbten Präparate halten sich in destilliertem Wasser lange Zeit sehr gut; in Leitungswasser wird dagegen allmählich die spezifische Färbung durch eine gelblich-bräunliche ersetzt. Es handelt sich zweifellos um Bildung von Eisenoxydhydrat; die gleiche Umwandlung tritt sehr schnell ein, wenn man die mit Eisen gefärbten Schnitte in sehr verdünnte Kalilauge überträgt. Durch Wiederholung derjenigen Prozedur, welche nach der Vorbehandlung mit Eisenlösung die spezifische Färbung hervorgerufen hatte, läßt letztere sich an solchen Präparaten stets restituieren; vorausgesetzt, daß man selbstverständliche Kautelen beobachtet, also z. B. bei der Nachbehandlung mit Ferrocyankalium mit Salzsäure schwach ansäuert.

Es hat sich also ergeben, daß alle untersuchten Metalle eine starke Affinität zu verkalktem Gewebe haben, daß also die Affinität des Silbers zu demselben nur einen speziellen Fall einer viel allgemeineren Erscheinung darstellt.

Auf eine scheinbare Ausnahme stößt man, wenn man mit Ferrocyankalium vor- und mit Eisenchlorid nachbehandelt. Hat man zwischen

beiden Bädern gründlich ausgewaschen, so tritt keinerlei Färbung auf. Das Ferrocyanalz hat also zum verkalkten Gewebe keine Affinität. Das stimmt jedoch mit der allgemeinen chemischen Erfahrung durchaus überein. Bekanntlich hat das Eisenatom im Ferrocyanradikal seine metallischen Eigenschaften verloren; das Ferrocyanradikal reagiert ähnlich wie ein Halogenatom, die üblichen Eisenreaktionen versagen den Ferrocyanverbindungen gegenüber. Daß das Ferrocyankalium zu verkalktem Gewebe keine Affinität hat, ist also eine Ausnahme, die bei näherer Betrachtung in der Tat die Regel bestätigt.

Ohne Vorbehandlung mit Eisen gab die verkalkte Knochensubstanz in meinen, in Müllerscher Flüssigkeit unvollständig entkalkten Präparaten weder mit Schwefelammonium, noch mit Ferrocyankalium und Salzsäure eine Eisenreaktion.¹⁾

¹⁾ Vergl. Gierke, Über den Eisengehalt verkalkter Gewebe unter normalen und pathologischen Bedingungen. Dieses Archiv Bd. 167, H. 2. 1902.