

Literatur.

1. Arnold, J., Untersuchungen über Staubinhalation und Staubmetastase. Leipzig 1885. — 2. Askanazy, M., Zur Staubverschleppung und Staubreinigung in den Geweben. Ztbl. f. allg. Path. u. path. Anatomie Bd. 17, 1906. — 3. Beitzke, Über den Ursprung der Lungenanthrakose. Virch. Arch. Bd. 187, 1907. — 4. Fleiner, W., Über die Resorption korpuskulärer Elemente durch Lungen und Pleura. Virch. Arch. Bd. 112, 1888. — 5. v. Ins, A., Einige Bemerkungen über das Verhalten des inhaliierten Staubes in den Lungen. Virch. Arch. Bd. 73, 1878. — 6. Kaufmann, E., Lehrbuch d. spez. path. Anatomie. Berlin 1907. — 7. Knauff, Das Pigment der Respirationsorgane. Virch. Arch. Bd. 39, 1867. — 8. Lubarsch, O., Über den Infektionsmodus bei der Tuberkulose. Fortschritte d. Med. Bd. 22. Berlin 1904. — 9. Maximow, A., Experimentelle Untersuchungen über die entzündliche Neubildung von Bindegewebe. Zieglers Beitr. z. path. Anat. u. z. allgem. Path. V. Suppl. 1902. — 10. Oberndorfer, S., Pigment und Pigmentbildung. Ergebnisse über allgemeine Pathologie und path. Anatomie des Menschen und der Tiere. 12. Wiesbaden 1908. — 11. Orth, J., Pathologisch-anatomische Diagnostik usw. Berlin 1909. — 12. Derselbe, Lehrbuch der spez. path. Anatomie I. Berlin 1887. — 13. Ruppert, Experimentelle Untersuchungen über Kohlenstaubinhalation. Virch. Arch. Bd. 72, 1878. — 14. Schlotdtnann, W., Ein Beitrag zur Staubinhalationslehre. Ztbl. f. allgem. Path. u. path. Anat. 6. 1895. — 15. Schmori, G., Die pathologisch-histologischen Untersuchungsmethoden. Leipzig 1907. — 16. Schottelius, M., Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung inhalierter Substanzen. Virch. Arch. Bd. 73. 1878. — 17. Slavjansky, K., Experimentelle Beiträge zur Pneumonokoniosislehre. Virch. Arch. Bd. 48, 1869. — 18. Shing u, S., Beiträge zur Physiologie des künstlichen Pneumothorax und seiner Wirkung auf die Lungentuberkulose. Beitr. z. Klinik d. Tuberkulose. 11. Würzburg 1908. — 19. Sikorsky, Über die Lymphgefäße der Lunge. Ztbl. f. d. med. Wissensch. 1870. — 20. Stöhr, Ph., Lehrbuch der Histologie und der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Jena 1906. — 21. Ziegler, E., Lehrb. d. allgem. Path. u. path. Anatomie. Jena 1906.

XIV.

Zur Frage der Eisenreaktion kalkhaltiger Gewebe, insbesondere des Knochens.

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Göttingen.)

Von

Dr. Masao Sumita,
Fukuoka, Japan.
(Hierzu Taf. IV.)

Im Gegensatz zu mehreren Untersuchungen, die von vornherein auf das Blut als die Quelle des deponierten Eisens in den verschiedenen Geweben des menschlichen und tierischen Körpers

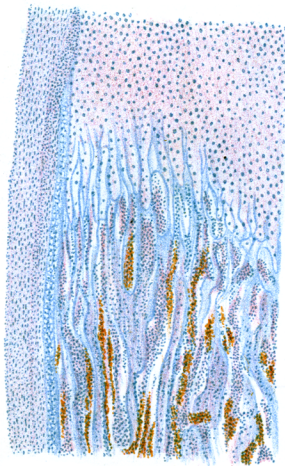


Fig. 1.

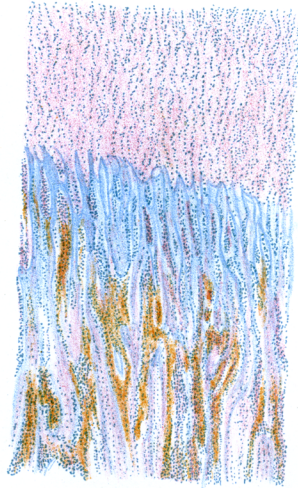


Fig. 2.

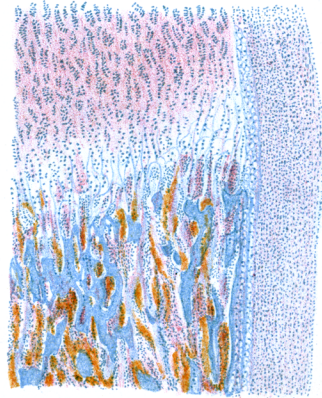


Fig. 3.

E. R. Bieding del.

Fig. 4.



Fig. 5.

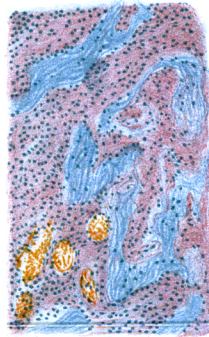
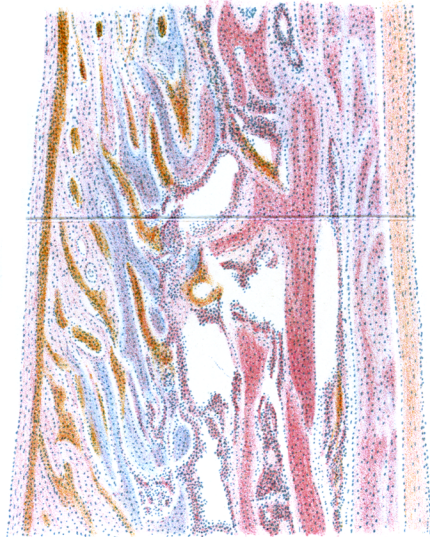


Fig. 6.



J. J. Thomas del. Inst. Berlin. S. 53

hinweisen, hat R. Schneider¹⁾ in den Jahren 1888 bis 1895 die Resultate seiner eingehenden Untersuchungen in mehreren Abhandlungen niedergelegt.

Auf Grund derselben hat er eine bis dahin unbekannte Verbreitung des Eisens in den Geweben und Organen des tierischen Organismus, und zwar in fast allen Bindesubstanzen nachgewiesen und dabei dem Eisen eine histomechanische Bedeutung ähnlich wie dem Kalk zugeschrieben. In diesem Zusammenhang weist er auf das manchmal beobachtete Zusammentreffen von Kalk und Eisen hin, sowie auf einen gewissen Ersatz des Kalkes durch Eisen, wenn es sich für die Natur darum handelt, einigen Stützorganen die nötige Festigkeit bei erhaltener Elastizität zu verleihen.

In ähnlicher Weise konnte Gierke²⁾ an verschiedenen physiologischen und pathologischen verkalkten Organen und Geweben mikroskopischen Eisengehalt nachweisen. So im ganzen Skelettsystem, soweit Verkalkung eingetreten ist, der Embryonen und Neugeborenen von Mensch, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen und weißen Mäusen; ferner erweist sich beim Menschen ein großer Teil der physiologischen und pathologischen verkalkten Gewebe als eisenhaltig, während sich an andern pathologischen Geweben kein Eisengehalt nachweisen läßt.

Die Eisenverhältnisse der Knochen im extrauterinen Leben konnte Gierke auf Grund seiner Untersuchungen nicht mit Sicherheit entscheiden, doch hat er den Eindruck gewonnen, daß der Eisengehalt gegenüber dem embryonalen Verhalten bedeutend vermindert, wenn nicht gar aufgehoben ist.

Jedenfalls haben die Untersuchungen Gierkes eine weitgehende Beachtung gefunden, denn alle Untersucher der Folgezeit beziehen sich auf ihn und bringen neue Bestätigungen und Erweiterungen seiner Befunde.

So hat Aschoff³⁾ im Jahre 1902 in seinem Artikel „Verkalkung“ den von Gierke angegebenen Eisengehalt in Knochen und sonstigen verkalkten Geweben bestätigt gefunden. Besonders wichtig ist die Arbeit von

¹⁾ Schneider, Über Eisenresorption in tierischen Organen und Geweben. Abh. d. Berl. Akad. d. Wissensch. 1888. — Neue histologische Untersuchungen über die Eisenaufnahme in den Körper des Proteus. Sitzungsber. d. Kgl. Preuß. Akad. d. Wiss. zu Berlin 1890. — Verbreitung und Bedeutung des Eisens im animalischen Organismus. Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. 1890. — Verbreitung und Bedeutung des Eisens in animal. Körper. Verh. d. Ges. deutsch. Naturforscher und Ärzte f. Zool. 1891. — Neueste Beobachtungen über natürliche Eisenresorption. Mitteil. d. Zool. Station in Neapel Bd. 12, 1895

²⁾ Gierke, Über den Eisengehalt verkalkter Gewebe unter normalen und pathologischen Bedingungen. Virch. Arch. Bd. 167, H. 2, 1902.

³⁾ Aschoff, Verkalkung. Ergebn. d. allg. Path. u. path. Anat. Bd. 8, 1902.

Schmorl¹⁾ 1904 über das durch Knochenneubildungsprozesse charakterisierte Material wie Knochenkallus, Schwangerschaftsosteophyten, Knochentumoren, Ostitis deformans, Osteomalazie und Rachitis, wobei sich ergab, daß am fertigen ausgebildeten Knochengewebe eine Eisenreaktion nicht zu erzielen ist, daß aber überall da, wo eine Neubildung von kalkhaltigem Knochengewebe stattfindet, die jüngsten Knochenteile eine deutliche, wenn auch verschieden starke Eisenreaktion geben.

Außerdem ist das manchmal beobachtete Zusammentreffen von Kalk und Eisen von mehreren Autoren bewiesen; so von Kockel²⁾ bei Kalkinkrustationen des Lungengewebes, Rona³⁾ an den elastischen Fasern der Riesenzellen, Askanazy⁴⁾ an Kalkmetastase, Best⁵⁾ bei der intraokularen Knochenbildung, Hoffmann⁶⁾ an Rippenknochen der an Barlow'scher Krankheit Gestorbenen, Orth⁷⁾ an Kallusgewebe und Ehrlich⁸⁾ an verschiedenen Geweben, insbesondere den elastischen Fasern.

Während also die Ansichten Gierkes vielfach bestätigt wurden, sprechen ihnen zwei Arbeiten aus der neuesten Zeit jede Beweiskraft ab.

Hück⁹⁾ hat im großen und ganzen ähnliches Material wie Gierke, aber immer unmittelbar nach der Sektion, also ohne irgendeine Konservierung in differenten Flüssigkeiten, untersucht. Er machte von verkalkten Arterienwänden, Lymphdrüsen, Tumoren u. a. und vor allem von normalen und rachitischen Knochen einfach mit einem starken Messer möglichst dünne Schnitte und tauchte dann die ganzen Gewebsstücke in die Reaktionsflüssigkeiten. In andern Fällen benutzte er die Kochgefriermethode oder auch Gefrierschnitte

¹⁾ Schmorl, Über feine Knochenstrukturen und über den Eisengehalt des Knochengewebes unter pathologischen Verhältnissen. Verh. d. D. Path. Ges. 2, 1904.

²⁾ Kockel, Über die Kalkinkrustationen des Lungengewebes. D. Arch. f. klin. Med. Bd. 64, 1899.

³⁾ Rona, Über das Verhalten der elastischen Fasern in Riesenzellen. Zieglers Beitr. z. path. Anat. Bd. 27, 1900.

⁴⁾ Askanazy, Beiträge zur Knochenpathologie. (Über Kalkmetastase und progressive Knochenatrophie.) Festschr. zur Feier des 60. Geburtstages von Max Jaffe S. 208, 1901.

⁵⁾ Best, Über die regressiven Ernährungsstörungen. Deutschmanns Beitr. z. Augenheilkunde Bd. 5, 1900.

⁶⁾ Hoffmann, Untersuchung eines Falles von Barlow'scher Krankheit. (Festschr. f. Prof. Arnold.) Zieglers Beitr. Suppl. H. 7, 1905.

⁷⁾ Orth, Ein Beitrag zur Kenntnis des Knochenkallus. Gedenkschr. f. v. Leuthold Bd. 2, Berlin 1905.

⁸⁾ Ehrlich, Eisen- und Kalkimprägnation in menschlichen Geweben, insbesondere den elastischen Fasern. Ztbl. f. allg. Path. u. path. Anat. Bd. 17, 1906.

⁹⁾ Hück, Über den angeblichen Eisengehalt kalkhaltiger Gewebe. Arb. a. path. Anat. aus Tübingen Bd. VI. (Festschr. f. Prof. Baumgarten.) 1908.

von in Formalin fixiertem Material, und ferner möglichst schnell eingebettete Paraffinschnitte.

Zum Eisennachweis gebrauchte er Schwefelammonium, Turnbullblau-Reaktion und Berlinerblau-Reaktion. Dadurch kam er zu folgendem Resultate:

Im frischen Zustande untersucht, läßt sich in keiner Weise das behauptete gleichzeitige Vorkommen von Kalk und Eisen nachweisen. In der ganzen Versuchsreihe ist kein einziger Befund, der seiner Ansicht nach auch nur annähernd dafür spräche, daß sich tatsächlich am Orte der Kalkablagerung intravital auch Eisen abgelagert habe. Und weil er nun an frischen Präparaten niemals Eisenreaktion an den kalkhaltigen Stellen erzielte, hält er die Behauptung von dem gleichzeitigen Vorhandensein von Kalk und Eisen unter normalen Verhältnissen intravital heute noch nicht für bewiesen, und alle weiteren hieraus gezogenen Schlüsse von engen biologischen Beziehungen zwischen Kalk und Eisen für noch zu wenig gestützt. Er kommt zu dem Schluß, daß alle bisherigen Eisennachweise als postmortale Imbibition (also Kunstprodukte) aufgefaßt werden müßten; wenn man deshalb einen einwandfreien Nachweis für das Zusammentreffen von Kalk und Eisen liefern wolle, müßten folgende Bedingungen erfüllt sein:

Eine genaue Angabe, in welchen und wie lange die Präparate in den einzelnen Flüssigkeiten und Glasgefäßen gelegen haben.

Der exakte chemische Nachweis, daß sämtliche Flüssigkeiten, die in Anwendung kamen, zu jeder Zeit eisenfrei waren.

Es müssen genaue Kontrollreihen angelegt werden, die beweisen, daß durch das Verweilen der Flüssigkeiten und Präparate in den Gläsern zu keiner Zeit des Versuches irgendwo eine Spur von Eisen aufgetreten ist. Wird dieser exakte Beweis nicht bis ins Kleinste geliefert, so ist in jedem Falle mit Recht der Zweifel erlaubt, ob die etwa erhaltene Eisenreaktion des Kalkes nicht doch im letzten Grunde als Kunstprodukt anzusehen sei.

Noesske¹⁾, der, um möglichst alle postmortalen Veränderungen auszuschließen, nur lebendfrisches normales und pathologisches Knochen- und Kalkgewebe, teils frischer menschlicher und tierischer Föten, teils neugeborener Kinder und jugendlicher Individuen verwandte, kam dabei wie Hück zu dem Ergebnis, daß der normale fötale Knochen in frischem Zustande keine Eisenreaktion gibt, während pathologisches Knochen- und Kalkgewebe bisweilen deutlichen Eisengehalt zeigt.

So ist er der Meinung: die Diffusion eisenhaltiger Gewebssäfte und die große Affinität des verkalkten Gewebes zum Eisen sind die beiden wichtigen Faktoren für das Zustandekommen der Eisenreaktion des Knochens im ungehärteten Untersuchungsmaterial.

Also Hück ist der Meinung, daß das Zusammentreffen des Eisens und Kalkes ein Kunstprodukt sei, hervorgerufen durch die Anwendung von eisenhaltigen Flüssigkeiten; Noesske glaubt, daß

¹⁾ Noesske, Über Vorkommen und Bedeutung von Eisen in verkalkten Geweben, insbesondere dem Knochen. Ztbl. f. allg. Path. u. path. Anat. Bd. 20, Nr. 2, 1909.

das Eisen aus eisenhaltigen Geweben der Umgebung in die Härtingsflüssigkeiten diffundiert und sehr bald von dem Kalk, dank seiner Affinität zu Metallsalzen, absorbiert wird.

Sieht man beide letzterwähnten Arbeiten genauer an, so scheint zunächst die darin ausgesprochene Annahme, daß das Eisen postmortal von außen imbibiert worden ist, durchaus einleuchtend, aber bei näherem Studium tritt uns der Widerspruch der in Begründung und Erscheinung der Tatsachen liegt, klar entgegen. Meines Erachtens liegt der Widerspruch in folgenden Punkten:

a) Da die Imbibierung des Eisens durch die große Affinität zum Kalk kommen soll, müßte, je mehr Kalk im Körper ist, desto mehr Eisen imbibiert werden; nun ist es aber Tatsache, daß die Knochen von Erwachsenen fast konstant negativen Gehalt von Eisen zeigen und auch in pathologischen Verkalkungen die Befunde ganz inkonstant sind.

b) Nach Schmorl geht der Gehalt von Kalk und Eisen nie parallel, je jünger die kalkhaltigen Gewebe sind, desto reichhaltiger ist der Eisengehalt; demnach hätte der jüngste Knochen das meiste Eisen. Diese Befunde kann man nicht nur durch Affinität zwischen Kalk und Eisen erklären.

c) Von Noesskes Material ist denkbar lebendfrisch bei Menschen fast nur das operative, und gerade bei dem pathologischen Material war der Befund oft positiv, wo ältere Autoren übereinstimmend trotz des nur gewöhnlichen Materials inkonstante Befunde konstatiert haben.

Bei diesen Widersprüchen der Tatsachen und der Deutung muß die Fehlerquelle, meiner Ansicht nach, anderswo gesucht werden. Die inkonstanten Befunde der bisherigen Autoren können vielleicht möglicherweise von einer ungenügenden Untersuchungsmethode herrühren.

Bei meinen Untersuchungen, welche ich auf Anregung von Prof. E. Kaufmann und mit Unterstützung von Privatdozent Dr. W. Schultze unternommen habe, versuchte ich zunächst, mir folgende Fragen klarzumachen:

1. Gibt es überhaupt eine einwandfreie Methode zum sicheren Nachweis von Eisen im verkalkten Gewebe?

2. Kann das von Gierke und Schmorl beschriebene

Zusammentreffen des Kalks und des Eisens wirklich durch eine ganz einwandfreie Methode bewiesen werden?

3. Wenn man Eisengehalt durch eine von allen Zufälligkeiten freie Methode konstatieren kann, stimmt dann das Bild der Präparate auch genau mit den absichtlich in eisenhaltige Flüssigkeit getauchten Präparaten überein?

4. Wenn das Eisen nur durch Affinität zwischen Kalk und Eisen imbibiert würde, könnte man dann eine genaue Übereinstimmung von Kalk- und Eisenbildern, so wie Orth sie angegeben hat, erzielen?

5. Welche Bedeutung hätte es denn, wenn man Eisen durch eine einwandfreie Methode nachweisen könnte?

6. Kommen gewisse Veränderungen des Eisengehaltes zwischen den Materialien und Flüssigkeiten im Glase vor (also wie verhält sich die Brauchbarkeit der alten Präparate zum genauen Eisennachweis)?

Untersuchungsmethode.

a) Übersicht der bisherigen Methoden.

Zum Eisennachweis organischer Gewebe sind bisher folgende drei Methoden bekannt; erstens die von Meyer 1850 beim Eisennachweis der Darmschleimhaut benützte Methode mit Schwefelammonium, zweitens die im Jahre 1868 von Perls¹⁾ gefundene mikroskopische Methode der Berlinerblau-Reaktion, zuletzt ist noch eine Methode von Kobert und seiner Schüler²⁾ ³⁾ als Turnbullblau-Reaktion angegeben. Diese drei Methoden stimmen darin überein, daß von den verschiedenen Eisenverbindungen im Organismus nur oxydische und oxydulische Salze nachgewiesen werden. Sie leiten sich alle von der gut bekannten chemischen Tatsache her, daß Schwefelammonium in Gegenwart der Ferro- und Ferriverbindungen das Eisen vollständig als schwarzes Ferrosulfid ausfallen läßt, und daß Ferrozyankalium und Salzsäure in Ferrisalzlösungen eine intensiv blaue Färbung von Berlinerblau (Ferrisalz der Ferrozyanwasserstoffsäure) erzeugt.

Alle drei Methoden haben gewisse Vorteile und Nachteile bei der Anwendung und sind von verschiedenen Seiten von verschiedenen Autoren empfohlen.

¹⁾ Perls, Nachweis von Eisenoxyd in gewissen Pigmenten. Journ. f. prakt. Chem. Bd. 105, H. 5, 1868.

²⁾ Tirmann, Über Eisenablagerung (Inaug.-Diss.) Dorpat 1896.

³⁾ Schmelzer, Studie über den pathologisch-anatomischen Befund bei Wismutvergiftung. (Inaug.-Diss.) Dorpat 1896.

Quincke (1868¹⁾ — 1896²⁾) empfahl die Schwefelammonium-Methode und schrieb: „Die Schwefeleisenfärbung ist nicht nur viel empfindlicher, sondern auch zuverlässiger und unzweideutiger als jene“, und hält sie als ein viel vorzüglicheres Reagens, sowohl für makroskopische wie für mikroskopische Zwecke. Nach seiner Angabe soll die Berlinerblau-Reaktion durch leicht Diffuswerden der blauen Färbung und durch unsichere Reaktion von der Seite des aus Ferrozyankalium selbst sehr oft freiwerdenden Eisens nachteilig sein. Er schreibt dazu: „Wichtig für das Gelingen der Eisenreaktion ist die Beschaffenheit der Schwefelammonium-Lösung; frisch bereitetes, noch farbloses NH_4S ist nicht so brauchbar wie das ältere gelbgewordene der Laboratorien; man kann statt dessen in der frischen, farblosen Flüssigkeit etwas Schwefel lösen; ein zu altes Reagens ist andererseits wegen der leicht eintretenden milchigen Trübung durch ausfallenden Schwefel unzweckmäßig.“

Ferner schreiben Hall 1896³⁾ von der Unsicherheit der Ferrozyankaliumreaktion und Brauchbarkeit der sicheren Schwefelammonium-Reaktion, und Abderhalden⁴⁾ 1899, daß die Schwefelammonium-Reaktion zum Nachweis des wirklichen Vorhandenseins der betreffenden Eisenverbindungen vorteilhaft ist.

Tirmann⁵⁾ 1896 denkt, daß Ferrozyankalium-Reaktion nur für oxydische Verbindungen, während Schwefelammonium + Ferrizyankalium (Turnbullblaureaktion) gleichzeitig für oxydisches und oxydulisches Salz gelten, und glaubt bei seinen Untersuchungen ein viel größeres Bild mit der Turnbullblau-Reaktion im Gegensatz zu dem Berlinerblaubilde beobachtet zu haben. Er empfiehlt dabei sehr warm die Turnbullblau-Reaktion der Kobertschen Schule. Nach seiner Vorschrift verbleiben Schnitte in gelbem, nicht über drei Wochen altem Schwefelammonium etwa 5 bis 30 Minuten, werden dann in destilliertem Wasser, welchem einige Tropfen Schwefelammonium hinzugefügt worden waren, oder in Glycerin abgespült. Dann werden sie auf etwa eine Minute in mit Salzsäure schwach angesäuerte 20 prozentige Ferrizyankalium-Lösung getan. (Diese Lösung muß immer frisch bereitet werden, und man vermeide solche mit einem grünen oder grauen Belag. Salzsäure fügt man erst kurz vor dem Gebrauch hinzu. Eine solche Lösung hält sich bis 15 Minuten völlig unzersetzt.)

¹⁾ Quincke, Über das Verhalten der Eisensalze im Tierkörper. Du Bois-Reymonds Arch. f. Anat. u. Physiol. 1868.

²⁾ Quincke, Über direkte Eisenreaktion in tierischen Geweben. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. 37, 1896.

³⁾ Hall, Über das Verhalten des Eisens im tierischen Organismus. Arch. f. Anat. u. Phys., Phys. Abt., 1896.

⁴⁾ Abderhalden, Die Resorption des Eisens, sein Verhalten im Organismus, und seine Ausscheidung. Ztschr. f. Biol. Bd. 39 n. F. 21 H. 1, 1899.

⁵⁾ a. a. O.

Hück (1905¹⁾, 1908²) hat die Meinung geäußert, daß Schwefelammonium für die makroskopische Reaktion und die von der Kobertschen Schule und besonders von Tirmann angegebene Turnbullblau-Reaktion für mikroskopische Untersuchung durch ihre Genauigkeit und Intensität der Farbe und Haltbarkeit warm zu empfehlen sei. Er hebt auch als Nachteil der Ferrozyankalium-Reaktion hervor, daß sie nur an oxydischen Salzen wirkt, und da in der menschlichen Leiche nun außerdem sehr starke Reduktionsvorgänge sich abspielen, wenigstens bis zur Sektion und beim Beginn der Härtung, so ist es nicht undenkbar, daß oft auch noch ein Teil des präformiert vorhandenen Oxydes in Oxydul übergeführt wird und daß der Ausfall dieser Reaktion also beim Menschen noch mehr Zufälligkeiten unterworfen ist.

Trotzdem wird die Berlinerblau-Reaktion von vielen Autoren, die an diesem Thema gearbeitet haben, wie Schneider, Zaleski³), Gierke, Arnold⁴) und Schmorl usw. vorgezogen. Alle von vielen Autoren angegebenen Nachteile dieser Reaktion können mit vorsichtiger Technik und mit gleichzeitiger Anwendung der andern Kontrollpräparate fast sicher verhütet werden.

Allerdings stimmen die Anschauungen der Autoren über die Brauchbarkeit der Schwefelammonium-Reaktion für makroskopische Präparate fast überein. Als Nachteile des Schwefelammoniums sind Unhaltbarkeit der Farbe, Unzweckmäßigkeit zur Gegenfärbung und überhaupt kein farbenschönes mikroskopisches Bild usw. bekannt. Bei dem Ferrozyankalium ist eine nachteilige Eigenschaft, daß es sehr oft diffundiert und daß es bisweilen, besonders bei gleichzeitiger Anwendung von Ferrozyankalium und Salzsäure, von selbst Berlinerblau bildet und sehr leicht zu Irrtümern führen kann. Diese nachteiligen Eigenschaften der Ferrozyankalium-Anwendung könnte man sehr leicht durch Vergleich von Schwefelammonium-Präparaten oder dadurch, daß die Schnitte nicht zu lange in der Ferrozyankali-Salzsäuremischung liegen oder durch längeres Liegenlassen der Schnitte in Ferrozyankalium-Lösung und nur sehr kurze Zeit in sehr dünner, 0,5—0,2 prozentiger Salzsäure-Lösung usw. ergänzen.

Leicht zugängliche Gegenfärbung (Nach- oder Vorfärbung mit Karmin) und Dauerhaftigkeit des farbenschönen Bildes sind dagegen vorzügliche Eigenschaften der Berlinerblau-Reaktion.

b) Auswahl der Methode für Eisennachweis. Unsere Vorschriften.

Was nun die Auswahl der Methode betrifft, muß man obengenannte drei Methoden — Ferrozyankali-Salzsäure- oder Berlinerblau-Reaktion, Schwefelammonium-Methode und Turnbullblau-Reaktion — vergleichen,

¹) Hück, Beiträge zur Frage über die Aufnahme und Ausscheidung des Eisens im tierischen Organismus. (Inaug.-Diss.) Rostock 1905.

²) a. a. O. 1908.

³) Zaleski, Die Vereinfachung von makro- und mikrochemischen Eisenreaktionen. Ztschr. f. physiol. Chemie Bd. 14 H. 3, 1889.

⁴) Arnold, Über Siderosis und siderofere Zellen, zugleich ein Beitrag zur „Granulalehre“. Virch. Arch, Bd. 161 H. 2, 1900.

Die von Quincke sehr warm empfohlene Schwefelammonium-Reaktion ist keine zur eingehenden langdauernden Forschung anwendbare Methode, weil die Schwierigkeit, eine gute und frische Lösung zu bekommen, die Unmöglichkeit einer Gegenfärbung mit kernfärbenden Mitteln, ganz kurze Haltbarkeit des Farbenbildes und der bekannte unangenehme Geruch des Reagens usw. zu große Nachteile bedeuten.

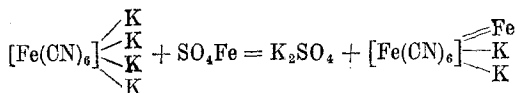
In bezug auf die Empfindlichkeit der Reaktion verhält sie sich sehr zweifelhaft, trotz der Beschreibung Quinckes: „Aber nicht nur weniger empfindlich ist die Ferrozyankalium-Reaktion für den mikrochemischen Nachweis des Eisens, sie kann auch direkt irreleiten. Schwefelammonium dagegen ist nicht nur viel empfindlicher, sondern auch zuverlässiger und unzweideutiger als jene usw.“

Tirmann gibt in seiner Arbeit die von Neumann angegebene Tabelle der Empfindlichkeitsgrenze für Metalle bei Reaktionen (die Zahlen entstammen der kolorimetrischen Bestimmung im Reagenzglas, und wenn nun auch die Verhältnisse für eine Reaktion als in mikroskopischen Schnitten, wo man es mit eiweißhaltigen Verbindungen zu tun hat, wesentlich andere sind) folgendermaßen:

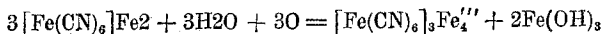
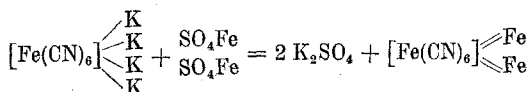
| | Reagens | Empfindlichkeit |
|-------------|------------------|-----------------|
| Eisenoxyd | Ferrozyankalium | 1 : 500 000 |
| | Rhodankalium | 1 : 1 600 000 |
| | Schwefelammonium | 1 : 2000 |
| Eisenoxydul | Ferrizyankalium | 1 : 440 000 |
| | Schwefelnatrium | 1 : 700 000. |

Aus dieser Empfindlichkeitstabelle kann man ersehen, daß die Empfindlichkeit des Ferrizyankaliums in Reagenzgläsern an Eisenoxyd mindestens 250 mal so empfindlich ist als die des Schwefelammoniums.

Ein anderer als Nachteil der Ferrozyankalium-Reaktion beschriebener Punkt, daß die letztere nur an oxydischem Salze, während Schwefelammonium an oxydischem und oxydulischem Salze wirkten, scheint mir sehr zweifelhaft, wenn man sich überlegt, daß das Ferrozyankalium mit Eisenoxydul nur bei völligem Luftabschluß ein weißes Ferrokalinum-Ferrozyanid oder Ferro-Ferrozyanid produziert, daß man es vielmehr doch fast immer hellblau erhält, weil diese Verbindungen an der Luft sofort oxydiert werden. So schreibt Treadwell¹⁾ in seinem Buche diese Reaktion in folgenden Formeln:

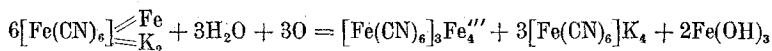


oder



¹⁾ Treadwell, Lehrbuch der analytischen Chemie Bd. I S. 93.

Auch das weiße Ferrokaliurn-Ferrozyanid geht an der Luft rasch in Berlinerblau über.



Diese Verhältnisse könnten natürlich bei tierischen Gewebsschnitten etwas anders sein, aber es ist höchst wahrscheinlich, daß im ganzen Vorgang der Schnittbehandlung eine derartige Oxydation stattfindet.

Außerdem kommt das Eisen im organischen Gewebe wirklich sehr selten als oxydulisches Salz vor. Aus diesem Grunde kann man bei Anwendung der Ferrozankaliurn-Reaktion keineswegs so bedeutende Nachteile als bei andern Methoden haben.

Wodurch kann man denn die Ferrozankaliurn-Methode ganz einwandfrei gestalten?

Wie Stöltzner¹⁾ in seiner Untersuchung bestätigt hat, hat das Eisenatom im Ferrozankaliurnradikal bekanntlich seine metallischen Eigenschaften verloren, und die üblichen Eisenreaktionen versagen den Ferrozankaliurnverbindungen gegenüber. Wenn durch die Ferrozankaliurn-Methode also Eisen nachgewiesen wird, so müßte es sicher im Gewebe vorhandenes Eisen sein. Jedoch ist diese Vorstellung nicht in allen Fällen richtig, und deshalb konnte die bisherige Anwendungsweise sehr oft irre führen.

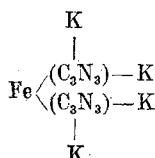
Über die näheren Eigenschaften des Ferrozankaliurns hat Autenrieth²⁾ eingehende Studien angestellt. Er schreibt, daß von den Zyaniden der Schwefelmetalle keine zusammengesetzte Zyanide mit verdünnten Säuren Blausäure abspalten und allgemein als die Salze komplizierter Metallzankaliurnwasserstoffsäuren aufgefaßt werden, wie das Kaliurnferro- und Ferrizankaliurn als die Kaliurnsalze der Ferro- bzw. Ferrizankaliurnwasserstoffsäure. Diese Salze zeichnen sich durch große Beständigkeit gegen die Einwirkung von Säuren aus; und auch das gelbe Blutlaugensalz galt wohl bisher allgemein für eine gegen verdünnte — zumal schwache — Säuren recht beständige Verbindung. Nach seiner Untersuchung an Blausäure und an einfachen Zyaniden neben Blutlaugensalz ist das gelbe Blutlaugensalz keineswegs gegen verdünnte und schwache Säuren beständig, sondern kann durch die schwächsten Säuren unter Bildung von Blausäure eine partielle Zersetzung erleiden. Dieses Verhalten gilt auch für eine ganze Reihe von organischen, negative Gruppen enthaltenden Verbindungen in bezug auf das gelbe Blutlaugensalz, und zwar bei Temperaturen, welche unterhalb der Siedetemperatur des Wassers liegen; es wird dabei ein weißer Niederschlag von Kaliurnferroferrozankaliurn $\text{K}_2\text{Fe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ durch Freiwerden der Blausäure gebildet.

Autenrieth benutzte 1prozentige Blutlaugensalzlösung und erhitzte sie allmählich, unter Einleitung eines mäßigen Stromes gut gewaschener Kohlen-

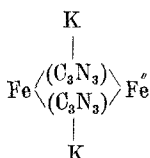
¹⁾ Stöltzner, Über Metallfärbungen verkalkter Gewebeteile. Virch. Arch. Bd. 180, 1905.

²⁾ Autenrieth, Zur Kenntnis des gelben Blutlaugensalzes und über den Nachweis von Blausäure neben Ferrozankaliurnen. Arch. d. Pharmazie. (Ztschr. d. D. Apoth.-Vereins) Bd. 231 H. 2, 1893.

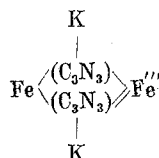
säure. Bei 72—75° C. bemerkte er eine Trübung der Flüssigkeit und konstatierte starke Berlinerblau-Reaktion im aufgesammelten Destillat. Er glaubt in seinen verschiedenen Versuchen mit Blutlaugensalz und Säure stets eine Bildung von Kaliumferroferrocyanid sicher konstatiert zu haben. Die Beständigkeit des letzteren im Gegensatz zum Kaliumferrocyanid soll nach seiner Ansicht von der Konstitution ringförmiger Anordnung der Atome abhängig sein.



Kaliumferrocyanid
(unbeständig)



Kaliumferroferrocyanid
(beständig)



Kaliumferriferrocyanid
(beständig)

Aus diesem Grunde könnte man die Anwendung der mit Salzsäure versetzten Ferrozyankalium-Lösung zum Eisennachweis als sehr unsicher auffassen. Also ist es viel sicherer, daß man die Schnitte erst eine gewisse Zeit lang in Ferrozyankalium-Lösung ohne Säurezusatz legt, um sie dann noch nach kurzem Waschen in verdünnte Säure zu bringen. Salzsäure zu diesem Zweck muß man — nach bisheriger Erfahrung — möglichst in dünner Lösung und sicherheitswegen nur kurze Zeit anwenden, um damit das Diffundieren der blauen Farbe sicher verhüten zu können.

Schneider¹⁾ hat schon auf diesen Punkt aufmerksam gemacht, und er hat erst die längere Einwirkung der 1- bis 2 prozentigen Ferrozyankalium-Lösung, dann eine sehr kurze Einwirkung der 0,2- bis 0,5 prozentigen Salzsäure empfohlen. Aus ähnlichem Grunde hat Hück²⁾ die Vorschrift gegeben, die Schnitte einer ½ bis 24 Stunden langen Einwirkung der kaltgesättigten Ferrozyankalium-Lösung auszusetzen und dann nach kurzem Abspülen wenige Minuten in stark verdünnte Salzsäurelösung zu bringen.

Bei meiner Untersuchung habe ich eine möglichst sicher wirkende und einwandfreie Methode ausgewählt und dabei im Gegensatz zu Hück und zu Noesske³⁾ sehr interessante Erfolge erzielt.

Meine Vorschriften sind folgende:

Berlinerblau-Reaktion. Schnitte in gesättigter Ferrozyankalium-Lösung 1 bis 1½ Stunden bei Brutofentemperatur. Kurzes Auswaschen in Wasser. Wenige Minuten in stark verdünnter Salzsäurelösung (gewöhnlich 2 bis 3 guttae Salzsäure in eine Schale Wasser von etwa 20 ccm). Gründliches Ausspülen in reichlichem Wasser. Nachfärben der Präparate in Alaunkarmin-Lösung. Ausspülen in Wasser. 70 prozentiger, 97 prozentiger absoluter Alkohol, Karbolxylol, Balsam.

Als Kontrolle benutzte ich immer gewöhnliche Hämatoxylin-Eosinpräparate, Kalkreaktionspräparate nach Kossa (Schnitte in 1- bis 5 prozentigem

¹⁾ a. a. O. 1890.

²⁾ a. a. O. 1908.

³⁾ a. a. O. 1909.

Argent. nitr. in hellem Tageslicht 10 bis 30 Minuten, Auswaschen in Wasser, Kernfärbung mit Alaun- oder mit Lithion-Karmin) und ab und zu die Schwefelammonium-Präparate (nach Quinckes Angabe). Außerdem benützte ich immer eine streng parallele Kontrolle von Oxalsäure-Präparaten (die Methode folgt nachher).

Betreffs obengenannter Vorschrift ist es wichtig, das Ferrozyankalium in sicher garantiert eisenfreiem Aqua destillata zu lösen und das angewandte Reagens jedesmal nach dem Gebrauch zu erneuern und jeden Schnitt in einem besonderen Gefäß in den Brutofen zu bringen. In der Glasflasche aufbewahrte Ferrozyankalium-Lösung darf man nicht zu lange stehen lassen, es ist besonders wichtig, von Zeit zu Zeit auf die Farbe der Lösung zu achten, leicht bläuliche Veränderung der Farbe ist ein Zeichen von Blausäureabspaltung.

Eine Stunde lange Einwirkung des Reagens in Brutofentemperatur ist bekanntlich viel sicherer und einfacher zur Wirkung als das 24 Stunden lange Stehenlassen bei Zimmertemperatur, wie es bei andern Färbungen der Fall ist. Ferrozyankalium-Lösung ohne Säurezusatz in dieser Temperatur ist natürlich unersetzlich, aber wenn man die Angabe Autenrieths¹⁾ annimmt, daß er in der Ferrozyankalium-Lösung mit Pepton bei langem Stehenlassen in Körpertemperatur geringe positive Reaktion von Berlinerblau nachgewiesen hat, so muß man doch sehr vorsichtig sein, die Ferrozyankalium-Lösung bei Brutofentemperatur in Gegenwart der eiweißhaltigen Gewebestücke zu lang stehen zu lassen.

Aus diesem Grunde ist eine jedesmalige Erneuerung des Reagens und die Benutzung besonderer Gefäße für jeden Schnitt sehr wichtig. Auch in diesen Punkte sind Oxalsäurepräparate als wichtige, beweiskräftige Kontrolle der Reaktion unentbehrlich. So in Ferrozyankalium-Lösung behandelte Präparate werden in eisenfreiem Wasser nur kurze Zeit ausgespült und dann in ganz schwach mit sicher eisenfreier Säure angesäuerte eisenfreies Aqua destillata gebracht. Bei dieser kurzen Anwendung der schwachen Salzsäurelösung tritt meistens eine schöne blaue Farbe auf. Nach gründlichem Auswaschen in eisenfreiem Aqua destillata kommt es zur Nachfärbung in Alaunkarmin oder besser in Lithionkarmin. Nachfärbung der Berlinerblau-Präparate ist sicherer und vorteilhafter als Vorfärbung, damit die Präparate vor der Bildung des beständigen Berlinerblau nicht mit den verschiedenen differenten Flüssigkeiten in Kontakt kommen und um gleichzeitig den Grad der Kernfärbung der Intensität der blauen Farbe entsprechend beliebig einrichten zu können.

Kalkreaktionspräparate von Argentum nitricum bilden eine sehr einfache und wichtige Kontrolle bei der Eisenreaktionuntersuchung, und man kann häufig sehr interessante Ergebnisse beim Vergleich der Berlinerblau-Reaktion mit diesen Präparaten erzielen. Man kann, worauf Hück schon aufmerksam gemacht hat, die Salzsäurekonzentration bei Berlinerblau-Reaktion je nach der Stärke der Kalkreaktion mäßigen.

Die von Quincke und von andern Autoren empfohlene Kontrolle der makroskopischen Schwefelammonium-Präparate scheint mir nicht so wichtig,

¹⁾ a. a. O.

weil das Schwarzwerden der makroskopischen Knochenpräparate nicht immer die vom Knochen selbst hervorgerufene Eisenreaktion ist, sondern man kann sehr häufig durch Knochenmarksreaktion getäuscht werden. Ich ziehe deshalb für Schwefelammonium-Präparate bei jedem Knochen erhältliche dünne mikroskopische Scheiben vor, welche fast ausnahmslos zur schwachen mikroskopischen Vergrößerung brauchbar sind (siehe später).

Jetzt komme ich nochmals auf die wichtigen Oxalsäurepräparate, durch die ich ganz sicher jeden Irrtum bei der Ferrozyankalium-Reaktion, wie ihn *Autenrieth* angegeben hat, verhüten zu können glaube.

*Röhl*¹⁾ (1905) hat in seiner Arbeit „Kalkablagerung in der Niere“ die von *Leutert*²⁾ (1895) angegebene, für Kalk sehr charakteristische Unlöslichkeit in Oxalsäure und die bekannte Löslichkeit des Eisens in derselben Säure benutzt. Er brauchte die Oxalsäure zur Entfernung des Eisens aus seinen Präparaten, um eine sichere Kalkreaktion anstellen zu können. Seine Vorschrift lautet folgendermaßen: „Einlegen in wässrige Oxalsäure-Lösung, konzentriert oder besser zur Schonung des Schnittes auf die Hälfte verdünnte, bis man sicher sein kann, daß kein mikrochemisch nachweisbares Eisen mehr im Schnitt vorhanden ist, etwa $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ Stunde je nach Dicke und Beschaffenheit der Schnitte.“ Die von *Röhl* angegebene Vorschrift aber ist nicht so sicher zur Eisenentfernung aus dem Schnitt, da ich durch meine Methode sehr häufig positive Eisenbefunde an nach *Röhl* behandelten Präparaten gefunden habe. Ich ließ die Oxalsäure noch viel stärker auf die Präparate einwirken und konnte fast bei jedem Fall konstante absolute Eisenfreiheit bekommen.

Schnitte in konzentrierte oder halb mit *Aqua destillata* verdünnte Oxalsäurelösung eine Stunde bei Brutofentemperatur³⁾. Gründliches Auswaschen in reichlichem, absolut eisenfreiem Wasser.

Dann behandelt man die Schnitte weiter streng parallel mit den andern Schnitten in Ferrozyankalium-Lösung.

Diese Oxalsäure-Präparate muß man immer bei Untersuchungen des Eisens als sicherste Kontrolle anwenden, um zu den mikroskopischen Präparaten die so angenehme Berlinerblau-Reaktion als genaue und unzweideutige Methode benutzen zu können.

Durch oben erwähnte verschiedene Technikangaben kann der mikrochemische Eisennachweis ganz einwandfrei gelingen, und man kann damit die bei der Ferrozyankalium-Salzsäuremethode bisher bekannten Fehlerquellen am sichersten beseitigen.

Bevor ich die Besprechung der Eisennachweismethoden zum Abschluß bringe, möchte ich einige Worte über die von *Kobert* und seiner Schule⁴⁾

¹⁾ *Röhl*, Über Kalkablagerung und Kalkausscheidung in der Niere. (Festschr. f. Prof. J. Arnold.) *Zieglers Beitr.* 7. Suppl.-H. S. 456, 1905.

²⁾ *Leutert*, Sublimatniere. *Fortschritte der Med.* 13, 1895.

³⁾ In dieser Anwendung der Oxalsäure kommt natürlich bei dem Präparat eine teilweise Entkalkung, aber niemals eine vollständige Entkalkung vor.

) a. a. O.

angegebene und von Hück¹⁾ warm empfohlene Turnbullblau-Reaktion sagen. Zur Frage, ob sie zum Nachweis der oxydischen und gleichzeitig oxydulischen Salze geeignet ist, ist es nicht ohne Nutzen, die Beschreibung Hücks, ferner die von Tirmann einmal genauer zu betrachten. Hück schreibt, daß die Präparate, welche eine makroskopisch ganz unzweifelhafte Eisenreaktion durch Schwefelammonium ergaben, eine solche mikroskopisch bei Paraffinbehandlung und Anstellung der Ferrozyankalium-Reaktion nicht erkennen ließen, und er glaubt, daß die Wirkung des Ferrozyankaliums schuld daran ist. Tirmann schreibt: „Was den dritten Punkt (Vergleich der Turnbullblau-Reaktion mit Berlinerblau-Reaktion) anbelangt, so fand ich bei einigen Fällen in den Schnitten die Menge der blauen Körnchen und Konglomerate bei Turnbullblau-Reaktion viel größer als bei Behandlung mit Ferrozyankalium und Salzsäure. Dieses kann nur wohl so erklärt werden, daß in dem betreffenden Organ auch oxydulisches Eisen vorhanden war, welches durch die Turnbullblau-Reaktion sichtbar gemacht wurde, während es bei der Berlinerblau-Reaktion trotz der bei der mikroskopischen Technik nach Ansicht einiger Autoren zustande kommenden Ozonisation unbeeinflusst blieb“ usw. (Er schreibt nichts von der Behandlungsart der Schnitte bis zur Eisenreaktion.)

Trotz dieser Beschreibung möchte ich keine Nachteile der Ferrozyankalium-Reaktion in diesem Punkte erblicken (siehe meine Beschreibung an anderer Stelle), und ich möchte noch eine zur Verstärkung dieser Auffassung dienende Tatsache hier hinzufügen.

Bei meinen Untersuchungen an pathologischen Präparaten habe ich eine Gelegenheit zum Vergleich der verschieden behandelten Präparate gehabt. Das war ein verkalktes Lymphdrüsenpräparat, bei dem anfangs das Eisen als negativ und nach 1½ monatlichem Stehenlassen in Formalinlösung als deutlich positiv nachgewiesen werden konnte. Ich wollte an diesem Präparat die Reaktionsstärke am Gefrier-, Paraffin- und Zelloidinschnitte vergleichen. In diesem Falle behandelte ich in ganz gleicher Zeitdauer Paraffin- und Zelloidinschnitte, und habe alle mit meiner vorhin angegebenen Ferrozyankalium-Methode geprüft. Dabei war die Reaktion am Gefrierschnitt und am Zelloidinschnitt deutlich positiv, und nur die am Paraffinschnitt war vollständig negativ. Anfangs war ich der Meinung, daß bei Paraffineinbettung wegen des unvermeidlichen Aussetzens in hoher Temperatur an irgendeiner Stelle etwa eine Reduktion oder eine sonstige Veränderung des vorhandenen Eisens hätte stattfinden können. Ich wandte auf diese Paraffinschnitte verschiedene Oxydationsmittel, z. B. übermangansaures Kali, Wasserstoffsuperoxyd usw., in verschiedener Methode an, in der Hoffnung, daß ich dadurch das nicht reagierende Eisen wieder zu einer reagierenden Form bringen könnte. Es blieb aber immer bei dem gleichen Erfolg; die Paraffinschnitte zeigten niemals positive Eisenreaktion.

Die Fehlerquelle in diesem Fall konnte ich schließlich bei einer andern Gelegenheit finden, welche ich später bei der Vorbereitung der Präparate beschreiben werde.

¹⁾ a. a. O. 1905.

Durch diese zufälligen Befunde komme ich zu der Meinung, daß der von Hück und Tirmann beschriebene große Unterschied beider Präparate vielleicht von der Verschiedenheit der Vorbereitung kommt, aber nicht in der Reaktionsverschiedenheit zu suchen ist.

In folgender Beschreibung Hücks¹⁾ ist das auch ziemlich klar ausgedrückt, er schreibt: „Jedoch auch mit ihr (Turnbullblau-Reaktion) konnte ich nicht völlige Übereinstimmung des mikro- und makroskopischen Befundes (Schwefelammonium-Reaktion) erzielen usw. Also hat die Berlinerblau-Methode gegen Turnbullblau-Reaktion höchst wahrscheinlich keinen Empfindlichkeitsunterschied.

Bei Turnbullblau-Reaktion dagegen sind die Präparate in Ferrizyankalium + Salzsäure einer großen Gefahr ausgesetzt, wie sie Autenrieth bei Ferrizyankalium festgestellt hat und wie sie Tirmann²⁾, wie aus folgender Beschreibung ersichtlich, sehr gefürchtet hat. Diese Lösung (Ferrizyankalium-Lösung mit Salzsäure), schreibt der letztere, muß immer frisch bereitet werden, und vermeide man solche mit einem grünen oder grauen Belag. Ferner sagt er, daß die mit Salzsäure zugesetzte Ferrizyankalium-Lösung sich nur bis 15 Minuten völlig unzersetzt erhält usw. Kurz, man kann die Turnbullblau-Reaktion nicht der vorsichtigen Berlinerblau-Reaktion vorziehen.

c) Auswahl und Vorbereitung des Materials zum Eisennachweis.

Um durch eine einwandfreie Methode das intra vitam vorhandene Zusammentreffen des Eisens und des Kalkes nachzuweisen, muß man nicht nur der Reaktionsmethode, sondern auch noch andern verschiedenen Punkten bei der Untersuchung (Auswahl und Vorbereitung des Materials, Prüfung der gebräuchlichen Flüssigkeiten und Gerätschaften usw.) große Aufmerksamkeit zuwenden.

Wie von Hück und Noesske angegeben, muß man möglichst frisches Material (womöglich an lebendfrischen Präparaten) ohne irgendeine Vorbehandlung in differenten Flüssigkeiten untersuchen. Schon lange Zeit in differenten Flüssigkeiten aufbewahrte Präparate zeigen sehr häufig ganz andere Eisenverhältnisse als die der frischen Untersuchung. Hück ist der Erste, welcher die volle Aufmerksamkeit auf diesen Punkt gelenkt hat. Die Tatsache an sich ist aber in verschiedenen früheren Arbeiten zu diesem Thema unbemerkt beschrieben worden. So hat Quincke³⁾ 1896 in seiner Arbeit „Über direkte Eisenreaktion in tierischen Geweben“ geschrieben: „Zuweilen ist die Eisenreaktion an dem frischen Organ gar nicht oder unvollkommen zu erzielen, während sie an dem mit Alkohol gehärteten schneller und deutlicher hervortritt.“

Hall⁴⁾ (1896) hat in seiner Arbeit eine Methode als ein neues Verfahren, das in den Zellen enthaltene Eisen nachzuweisen, angegeben. Dasselbe besteht

¹⁾ a. a. O. 1905.

²⁾ a. a. O.

³⁾ a. a. O. 1896.

⁴⁾ a. a. O.

darin, in den ersten 24 Stunden der Alkoholhärtung, der Lösung 5 bis 30% Schwefelammonium zuzusetzen; es sollen dadurch gewisse Eisenverbindungen, die bei gewöhnlicher Alkoholhärtung in Lösung gingen, unlöslich fixiert und dadurch für die spätere mikrochemische Reaktion zugänglich gemacht werden. Daraus geht also klar hervor, daß ein zuweilen bemerkbarer Unterschied der Eisenverhältnisse zwischen frischen und alten Präparaten eine schon länger bekannte Tatsache ist. Aber viele Autoren, wie Gierke und Schmorl, haben leider diesem Punkte keine besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

Hück¹⁾ hat 1908 in seiner Arbeit sehr wichtige Einwände an Gierkes und an vielen bisherigen Arbeiten gemacht. Er glaubt, daß bei längerem Verweilen in der Lösung die Präparate einer großen Gefahr ausgesetzt sind und daß die aus solchen Methoden gezogenen Ergebnisse sehr fraglich sind. Er untersuchte das Material womöglich sofort nach der Sektion, also ohne irgendeine Konservierung, und benützte aus ähnlichen Gründen meistens Gefrierschnitte oder schnell in Paraffin eingebettete Präparate zum Eisennachweis. Er kam zu folgendem Ergebnis: „Das Resultat meiner Untersuchungen ist also dies, daß ich in den Fällen, wo die übrigen Autoren Eisenreaktion kalkhaltiger Partien feststellten, eine solche Reaktion nicht erhielt bei frischen oder rasch vorbehandelten Objekten; dagegen erhielt ich die Eisenreaktion in der gleichen schönen Weise, wenn die Objekte entweder in absichtlich mit Eisen verunreinigten Lösungen behandelt waren oder in nicht zweifellos eisenfreien Medien gelegen hatten.“ Er meint daher, daß alle Präparate zu dieser Untersuchung nicht passen und alle weiteren hieraus gezogenen Schlüsse von engen biologischen Beziehungen zwischen Kalk und Eisen noch zu wenig gestützt sind.

Noesske²⁾ (1909) glaubt, daß das Eisen aus diffundierten eisenhaltigen Gewebssäften stammt. Er schließt das aus seinem Untersuchungsergebnis, daß bei frischem Material die Eisenreaktion meistens negativ war, während sie bei fixiertem oder gehärtetem Material sehr häufig positiv war; ferner daraus, daß die im frischen Zustande gegenüber der Eisenreaktion sicher negative Knochen nach langem Verweilen in destilliertem, absolut eisenfreiem Wasser positiv geworden waren und sich die Eisenreaktion dann nicht nur an den Knochen, sondern auch häufig am Periost finden läßt.

So ist es klar, daß man bei der Untersuchung des Eisens um alle postmortalen Veränderungen auszuschließen, nur möglichst frisches normales und pathologisches Material nehmen muß. Über die Brauchbarkeit der alten Präparate zum Eisennachweis habe ich eingehende Untersuchungen gemacht, die Resultate derselben sind später zu sehen.

Die Auffassung von Hück und Noesske, daß das Eisen nachträglich in den Knochen imbibiert sei, gemäß der von vielen Autoren (Arnold³⁾, Best⁴⁾, Stöltzner⁵⁾ usw.) bewiesenen Affinität zwischen Kalk und

¹⁾ a. a. O. 1908.

²⁾ a. a. O.

³⁾ a. a. O.

⁴⁾ Best, Über mikroskopische Eisenreaktion. Verh. d. D. Path. Ges. 2, 1904.

⁵⁾ a. a. O.

Eisen, scheint mir sehr unwahrscheinlich, weil das Zusammentreffen von Eisen und Kalk bei gleichen Bedingungen der Gewebe und der Umgebung keineswegs parallel geht, es ist sogar sehr häufig genau umgekehrt, und weil die Tatsache, daß das Eisen fast konstant in Knochen von Erwachsenen und sehr häufig in pathologischer Verkalkung fehlte, was fast übereinstimmend von vielen Autoren nachgewiesen worden ist.

Ich habe bei meiner Untersuchung mein Material möglichst streng nach der Angabe H ü c k s und N o e s s k e s ausgewählt, so daß wir sagen können, daß unser Material betreffs postmortalen Veränderungen ebenso einwandfrei ist wie das dieser beiden Autoren. Unter meinem Material sind Embryonen verschiedener Tiere, welche ich vom Göttinger Schlachthause täglich ganz frisch bekam, und Leichen von Neugeborenen und eines frühgeborenen Kindes, die uns direkt von der hiesigen Frauenklinik in möglichst frischem Zustand überlassen wurden. Bei solchen Leichen habe ich gewöhnlich mehrere Stücke von verschiedenen Knochenteilen herausgeschnitten (Knorpelknochengrenze von Rippen, Epiphysenteile der großen Röhrenknochen, Schädelknochen, Zehen und Fingerknochen usw.). Von Leichen von größeren Kindern, Erwachsenen und von Greisen, welche hier im Pathologischen Institut zur Sektion kamen, habe ich möglichst frisch die Knochenknorpelgrenze der Rippe herausgeschnitten (mit derselben Vorsicht wie bei neugeborenen Leichen). Das pathologische Material wurde unter den gleichen Bedingungen direkt nach der Sektion herausgeschnitten. Eine Schwierigkeit in der Vorbereitung des Materials zum Eisennachweis liegt, wie es G i e r k e und andere beschrieben haben, in dem Zwange, die verkalkten Gewebe ohne vorherige Entkalkung schneiden zu müssen (Säure zur Entkalkung löst die abgelagerten Eisenverbindungen auf). Daher wird die Untersuchung an den Knochen von Erwachsenen und dem pathologischen Material besonders schwierig.

Zur Eisenreaktion an den Knochen der Embryonen oder der Neugeborenen habe ich die von H ü c k angegebene und betreffs einer postmortalen Imbibition einwandsfreieste Kochgefriermethode angewandt. Dieselbe besteht darin (nach Vorschrift von H ü c k): Organstück wenige Minuten lang in kochendes, absolut eisenfreies Wasser gelegt, dann wird es nach kalter Abspülung am Gefriertisch geschnitten und, ohne zu lange im Wasser liegen zu lassen, untersucht.

Eine kleine Anzahl wird nach kurzer (6 bis 12 Stunden) Fixation des Materials in 4- bis 5prozentiger, absolut eisenfrei garantierter Formalinlösung am Gefriertisch geschnitten. Die für Gefrierschnitte fast unbrauchbaren zarten Embryonen werden möglichst schnell in aufsteigender Alkoholhärtung, Chloroform, Paraffin eingebettet und geschnitten. Nur einiges von unserem Material wurde für besondere Zwecke möglichst schnell in Zelloidin eingebettet. Bei den Knochen von Erwachsenen, für welche die übliche Methode der Schnittherstellung auf Gefriermikrotom versagt, wandte ich statt Zupf- oder abgebrochenen Knochenbalkenpräparaten eine bestimmte Methode an und konnte sie so mit schwacher Vergrößerung mikroskopisch untersuchen. Zu diesem Zweck legt man das einige Millimeter dicke Knochenstück auf den Kohlensäuregefrier-

tisch, und nach vollständigem Frieren kann man ohne besondere Mühe eine mikroskopisch für schwache Vergrößerung anwendbare dünne Scheibe durch sägenden Zug mit dem starken Skalpell bekommen. Ich konnte daher fast alles Material samt den Kontrollpräparaten mikroskopisch untersuchen. Den makroskopischen Nachweis der Eisenreaktion an Gewebstücken halte ich für unsere Zwecke (besonders bei den Knochen) für unsicher.

d) Bemerkungen über die gebräuchlichen Flüssigkeiten und Gerätschaften zu diesen Untersuchungen.

Sämtliche zu benutzende Flüssigkeiten, wie Formol, Salzsäure, Alkohol, Chloroform usw., und vor allen Dingen das Wasser, und — falls man vorherige Kernfärbung anwenden will — die Farblösungen müssen absolut eisenfrei bleiben. Zum Eisennachweis in gebräuchlichen Flüssigkeiten benutze ich nach vorheriger leichter Ansäuerung gewöhnlich die direkte Rhodankalium-Probe. Falls sie nicht anwendbar war, habe ich das Eisen in der Flüssigkeit durch Abdampfung indirekt nachgewiesen. Es ist sehr wichtig, daß man bei der Rhodankalium-Probe immer überschüssiges Reagens zu der vorhandenen Eisenmenge hinzugießt. Schüttelt man nachher die Lösung mit Äther aus, so geht das Rhodaneisen — $\text{Fe}(\text{CNS})_3$ in den — Äther über, und man kann sehr leicht die rote Farbe der Eisenverbindung wahrnehmen. Alle absolut eisenfrei garantierten Flüssigkeiten, insbesondere die Salzsäure, Aqua destillata und die in eisenfreiem Wasser gemischte Formalinlösung, muß man in einer Flasche aus dem als eisenfrei bekannten Jenaer Gerätglas aufbewahren. Sonst können sie sehr rasch, sogar schon am nächsten Tage, als eisenhaltig nachgewiesen werden.

Außerdem muß man jede Flüssigkeit jedesmal vor Gebrauch auf Eisengehalt prüfen. Das zum Schneiden der Gewebe in Anwendung kommende eiserne Messer kann man nicht vermeiden. Man kann indes vom Messer stammendes Eisen, wie schon Gierke und Hück betonten, durch die Unregelmäßigkeit von der typischen präformierten Eisenablagerung sehr leicht unterscheiden. Eisenhaltige Gegenstände dürfen natürlich mit den Flüssigkeiten nicht in Berührung kommen.

Untersuchungen.

a) Eisenreaktion der Knochen bei Embryonen.

Wir benutzten zur Untersuchung viele Embryonen verschiedener Tierarten, welche wir vom Göttinger Schlachthause jedesmal in ganz frischem Zustande bekamen. Es waren sechs Embryonen vom Schaf, verschiedener Größe (65 mm bis 27 cm Scheitel-Steißlänge), 4 Rinderembryonen (104 mm bis 50 cm Scheitel-Steißlänge), zwei Schweineembryonen (32 mm, 45 mm) und ein 32 cm langer Fötus von einer Ziege. Viele von diesen Embryonen habe ich in möglichst frischem Zustande nach der Kochgefriermethode (in absolut eisenfreiem Wasser) behandelt und 20 bis 25 μ dicke Knochenschnitte bekommen; alle diese Präparate habe ich hauptsächlich nach der Berlinerblau-Methode, mit streng paralleler Kontrolle von Oxalsäure-Präparaten, untersucht. Für die kleineren

Embryonen gebrauchte ich eine kurze Härtung (6 bis 12 Stunden) in 4- bis 5 prozentigem, eisenfreiem Formol und dann eine möglichst schnelle Chloroform-Paraffineinbettung (im ganzen dauert sie höchstens $2\frac{1}{2}$ Tage).

Zu Kochgefrierschnitten nahm ich bei größeren Embryonen fast immer die Verkalkungsgrenze der Schenkelknochen, und bei Paraffineinbettung habe ich fast an allen kleineren Embryonen einen Frontalschnitt des Schädels, einen Querschnitt des Brustkorbes und einen Längsschnitt der Extremitäten untersucht. Bei zwei der größten Embryonen von Rind und Ziege konnte ich genau die Knochenknorpelgrenze des Schenkels und der Rippen herausschneiden und schöne Gefrierschnitte bekommen. Alle Eisen- und Oxalsäurepräparate habe ich nachher in Lithion- oder in Alaun-Karmin nachgefärbt. Außerdem benutzte ich immer die Hämatoxylin-Eosinmethode, die Kalkreaktionsmethode nach K o s s a und sehr häufig die Kontrolle mit der Schwefelammonium-Reaktion.

In allen meinen Fällen (ausnahmsweise war ein 24 cm langer Schafembryo negativ) war die Eisenreaktion, soweit die Kalkablagerung aufgetreten ist, immer positiv. Die Oxalsäure-Kontrollpräparate blieben, trotzdem ich sie ganz genau parallel behandelte, fast immer absolut negativ. An einem 32 mm langen Schweineembryo konnte ich bei meinen verschiedenen Quer- und Längsschnitten nur ganz kleine Knochenkerne in der Mitte der Wirbelkörper treffen, sie waren nur als kleine blaue Punkte sichtbar. Die Eisenreaktion der verschiedenen behandelten Präparate war durchschnittlich am Gefrierschnitte sehr stark und an Paraffinschnitten relativ schwach. Das kann natürlich von der Dicke der Schnitte abhängig sein, aber wie mir scheint, und wie ich es bei anderen Fällen festgestellt habe, hängt es von der Verschiedenheit der Vorbereitung ab.

An vielen deutlich blau reagierenden Präparaten, wie es sehr häufig an größeren Extremitätenknochen-Präparaten besonders ausgeprägt erscheint, sind es die Knorpelverkalkungszone und die Osteoblastenschicht des Periosts, welche am stärksten reagieren; allmählich wird diaphysenwärts die Blaufärbung etwas schwächer. Dieser Unterschied der Farbenstärke ist natürlich nicht so deutlich, wie das beim Knochen Neugeborener der Fall ist. Besonders schön ist die blaue Färbung der Knorpelgrundsubstanz zwischen unregelmäßig gewucherten größeren Knorpelzellen in der Knorpelverkalkungszone. Hier reicht die Blaufärbung ziemlich weit in den Knorpel hinein und scheint mir viel weiter eingedrungen, als das Bild der Kalkreaktion zeigt. Noch schöner ist die Blaufärbung der schon verkalkten oder vielleicht direkt vor der Verkalkung stehenden Knorpelgrundsubstanz zwischen vergrößerten und vermehrten Knorpelzellen an einem schräg getroffenen Rippenschnitte von einem relativ kleineren Embryo. Ein Vergleich von Eisenpräparaten und Kalkpräparaten solcher Bilder ist nicht immer so leicht, aber man kann bei vielen ähnlichen Vergleichen wahrscheinliche Schlüsse ziehen, daß die blaue Färbung nicht nur an verkalkten Stellen, sondern auch an noch nicht verkalkter Knorpelgrundsubstanz sichtbar ist. Solchen Befund kann man zuweilen relativ leicht aus dem Vergleich der Kalk- und Eisenpräparate durch die Zahl der gewucherten Knorpelzellen, welche von der Knorpelgrundsubstanz umgeben sind, konstatieren. An einigen Paraffinpräparaten, bei welchen die Eisenreaktion sehr

schwach eingetreten ist, ist die Blaufärbung häufig nur an der Verkalkungsgrenze des Knorpels sichtbar und an anderen Stellen des Knochengewebes nicht mehr zu erkennen.

Bei jeder Blaufärbung kann man, auch wenn die Stärke sehr verschieden ist, als gemeinsame Erscheinung bemerken, daß die Blaufärbung gegen das Periost ganz scharf begrenzt ist, während sie an der Knorpelgrenze ziemlich weit in die Knorpelgrundsubstanz hineindringt und dort allmählich abnimmt. In Silberpräparaten zeigen die Kalkbilder bei starker Vergrößerung immer eine körnige Beschaffenheit, besonders deutlich in dem peripherischen Teil der Verkalkungszone. Die Blaufärbung der Eisenreaktion ist aber fast niemals körnig, sondern immer mehr diffus.

An solchen Verkalkungszonen embryonaler Knochen habe ich niemals das Bild von Blutkörperchenneubildung gesehen, wie es Mühlmann¹⁾ und andere²⁾ zu sehen glaubten.

Oxydationsversuche verschiedener Paraffinschnitte mit Wasserstoffsuperoxyd oder übermangansaurem Kali ergaben niemals merkbare Unterschiede in der Eisenreaktion. Das Deutlich- und Diffuswerden der Eisenbilder an verschiedenen Präparaten nach längerer Konservierung in Formollösung wurde häufig konstatiert.

b) Eisenreaktion der Knochen bei Neugeborenen.

Die mir zum Eisennachweis zur Verfügung stehenden Leichen Neugeborener inklusive eines etwa 35 cm langen frühgeborenen Kindes waren 16 an der Zahl. Bei jeder Leiche habe ich fast immer die Knochenknorpelgrenze der Rippen, Zehen, Finger, Epiphysenteil der Schenkelknochen und Schädelknochen usw., im allgemeinen möglichst rasch wachsender Partien der Knochen herausgeschnitten. Fast alle so ausgeschnittenen Knochen, welche ich zur Eisenreaktion benutzte, habe ich gleich in eisenfreies Aqua destillata gelegt und Kochgefrierschnitte hergestellt. Außerdem habe ich sehr häufig, um ein Präparat zu bekommen, die Knochen kurze Zeit in eisenfreie Formollösung gebracht und dann in gefrorenem Zustande geschnitten. Bei jeder Untersuchung der Eisenreaktion habe ich zur Kontrolle stets Hämatoxylin-Eosin-, Silbernitrat- und Oxalsäurepräparate verglichen.

Bei fast allen Präparaten, seien es Kochgefrierschnitte oder Formalin-gefrierschnitte, war die Eisenreaktion im allgemeinen viel stärker als bei dem Paraffinpräparate der Embryonen. An verschiedenen Präparaten war die Verbreitung des Eisengehaltes in der Knorpelgrundsubstanz der Verkalkungszone sehr verschieden; ebenfalls war die Differenz zwischen blauer Eisenreaktion und brauner Kalkreaktion an den Präparaten Neugeborener sehr verschieden ausgeprägt. Es ist an dem Knochen der Neugeborenen besonders deutlich, daß die Eisenreaktion in der Verkalkungszone und an der Osteoblastenschicht des

¹⁾ Mühlmann, Über die Ursache des Alters. Wiesbaden 1900.

²⁾ Bayerd, Entstehung roter Blutkörperchen im Knorpel am Ossifikationsrande. Arch. f. mikrosk. Anat. Bd. 23, 1884.

Periostes am stärksten ist und nach den älteren Knochenbälkchen der Diaphyse zu allmählich abnimmt.

An den stärkeren Knochenbälkchen ist die Blaufärbung nur an der Randzone der Balken stark, und die mittlere Partie zeigt immer eine mehr rote Karminfarbe. Diese Abschwächung der blauen Färbung und das Hervortreten der Karmingegenfärbung nimmt nach der Diaphyse ständig zu (Fig. 1, Taf. IV). Das gerade Gegenteil bietet das Kalkbild von Silberpräparaten an der Verkalkungszone, nämlich in den jüngsten Teilen relativ schwache, nach der Diaphyse immer stärker werdende Kalkreaktion.

Alle diese Verhältnisse sind besonders deutlich an einem Knochenpräparate, bei welchem die Knorpelzellenwucherung nicht so mächtig und die Eisenreaktion der Verkalkungszone nicht so weit wie sonst in die Knorpelgrundsubstanz hineinging, dementsprechend ist auch die Abweichung des Eisen- und Kalkbildes nicht so ausgeprägt. An solchen Präparaten ist der Farbenunterschied der jüngeren und älteren Knochenbalken sehr auffallend, ältere Balken der Diaphyse nehmen fast gar keine blaue Färbung mehr an, und im Vergleich zum Kalkbild ist das erwähnte umgekehrte Verhältnis besonders deutlich (Fig. 2, Taf. IV). Überhaupt zeigt das Eisenbild bei den Knochen Neugeborener einen großen Unterschied zwischen relativ langsam und relativ rasch wachsenden Knochen. (Dieses Verhältnis kann man sehr leicht durch Verschiedenheit des Wucherungsbildes der Knorpelzellen unterscheiden ¹⁾). Bei letzteren ist die blaue Färbung der Verkalkungszone bedeutend weiter in die Knorpelgrundsubstanz hineingedrungen.

An Oxalsäurepräparaten ist die Eisenreaktion absolut negativ, ganz wie bei Embryonen. Stärkerwerden der Eisenbilder nach längerer Konservierung der Präparate in Formalinlösung wurde auch bei Neugeborenen sehr häufig beobachtet. Bei solchen Präparaten konnte ich eine sehr interessante Erscheinung veränderter Eisenreaktion finden. Das war ein Rippenknochenpräparat, welches anfangs nur ganz schwache Reaktion und dann nach 1½ Monate langer Konservierung sehr deutliche Eisenreaktion zeigte. Die Beschaffenheit der blauen Farbe in diesem nachträglich mit Eisen imbibierten Präparate zeigt ganz andere Verhältnisse als die von Anfang an deutlichen Eisengehalt zeigenden Präparate. Letztere zeigen ganz regelmäßige Reaktionsstärke und Verbreitung in dem schon erwähnten Verhältnisse, während die anderen unregelmäßige und eine geradezu entgegengesetzte Stärke und Verbreitung des Eisenbildes zeigten. Bei den nachträglich imbibierten Präparaten ist das ganze Bild des Eisengehaltes fast nur durch Affinität zwischen Eisen und Kalk zu erklären, das heißt, der stärkste Eisengehalt ist an den stärksten Knochenbälkchen sichtbar, also im ganzen parallel dem Kalkreaktionsbilde (Fig. 3, Taf. IV). Dieses Präparat ist ein wichtiger Beweis, daß die alten in differenten Flüssigkeiten konservierten Präparate häufig Irrtümer veranlassen können,

¹⁾ An energisch wachsendem Knorpel wechseln die Knorpelzellen ihre unregelmäßige Anordnung, indem sie sich in langen Ketten einander anschließen. Die Kerne zeigen zahlreiche Teilungsfiguren. (M ü h l m a n n: Ursache des Alters.)

und daß der im frischen Zustande gefundene Eisengehalt ganz anders ist als der durch nachträgliche Imbibition zustandegekommene.

c) Untersuchung der Knochen von größeren Kindern und von Erwachsenen.

Die Knochen von größeren Kindern und von Erwachsenen wurden bisher für mikroskopische Untersuchung ohne Entkalkung für unbrauchbar angesehen. Solches Material ist nur vermittelst makroskopischer Reaktion mit Schwefelammonium oder an abgebrochenen Knochenbalkenpräparaten unvollständig untersucht worden. Es gelang mir durch die erwähnte Methode, relativ dünne, für mikroskopische Untersuchungen zugängliche Schnitte zu bekommen. Das Material stammte von den Leichen zweier Knaben, sechs Personen mittleren Alters und zweier Greise. Von allen diesen Leichen habe ich möglichst frisch die Knorpelknochengrenze der Rippen zur Eisenreaktion herausgeschnitten.

Die Eisenreaktion war nun an allen von diesem Material stammenden Schnitten fast konstant negativ, und die Knochenbalken waren immer nur mit Karmin rot gefärbt.

Die durch 1 bis $1\frac{1}{2}$ Stunden lange Schwefelammoniumwirkung etwas schwarzgrüne Färbung der Präparate stellt keine Eisenreaktion der Knochenbalken selbst dar, aber sie ist fast immer eine von Knochenmark hervorgerufene Reaktion; dieses Verhältnis konnte ich sehr leicht durch mikroskopische Untersuchung feststellen. Diese übereinstimmende negative Eisenreaktion an Knochen von größeren Kindern und Erwachsenen (also nicht so schnell oder nicht mehr wachsenden Knochen) ist nicht nur als Tatsache selbst wertvoll, sondern sie ist ein Beweis, daß die positiven Resultate an embryonalen oder kindlichen Knochen als ein sicheres Zeichen präformierten Eisengehaltes der Knochen anzusehen sind.

d) Eisenreaktion an pathologischen Knochen und an pathologischen Verkalkungen.

Bei unseren Untersuchungen war der Eisengehalt des pathologischen Materials besonders an Verkalkungen und am pathologischen Zerstörungsprozeß der Knochen sehr inkonstant. Es scheint mir, als wenn sie keinen so konstanten Eisengehalt haben, wie es bei wachsenden Knochen (physiologisch und pathologisch) der Fall ist, und als ob dort kein so strenger biologischer Zusammenhang vorhanden ist.

Unser Material dieser Kategorie war außer solchen von Knochenneubildungen wie Osteophytingewebe bei Osteomyelitis, Rachitis usw. je ein Fall von Milzverkalkung, verkalkte tuberkulöse Lymphdrüsen von Rinden, Milzsystemwandverkalkung, tuberkulöse Knochenkaries, Uterusgefäßverkalkung, Herzmuskelverkalkung, Schilddrüsenverkalkung, verkalkte Aneurysmawand und zwei Fälle von Aortenwandverkalkung. In diesen pathologischen Verkalkungen ist Eisengehalt vorhanden in Milzverkalkung, Uterusgefäßverkalkung, Herzmuskelverkalkung, Schilddrüsenverkalkung, Aneurysmawandverkalkung und in einem Fall von Aortenwandverkalkung, während er fehlte an verkalkten tuberkulösen Lymphdrüsen vom Rind, an der verkalkten Milzsystemwand und an

dem zweiten Fall von Aortenwandverkalkung. Von pathologischen Knochenzerstörungsprozessen wurde nur ein Fall von tuberkulöser Wirbelkaries untersucht; hier war die Reaktion negativ.

So kann man sehen, daß die Eisenreaktion an solchem pathologischen Material, welches der größten Möglichkeit der Imbibition aus umgebenden Blutungsherden ausgesetzt ist, keine konstante ist. Bei solchen Fällen ist es eine sehr schwierige Aufgabe, einen biologisch innigen Zusammenhang zwischen Kalk und Eisen zu erkennen. Aus diesem Grunde möchte ich auf solches pathologisches Material außer meiner einfachen Beschreibung an anderer Stelle nicht weiter eingehen, weil nach meinem Dafürhalten das Eisen nur an physiologischen und pathologischen Knochenneubildungen und -wachstum einen biologischen Zusammenhang zeigen kann.

Im Gegensatz zu solchem an Eisengehalt ganz inkonstanten Material ist der Eisenbefund an Knochenbildungsprozessen wie bei Osteophyten bei Osteomyelitis femoris und in zwei Fällen von Rachitis fast konstant und bedeutungsvoll.

All unser pathologisches Material wurde unter den gleichen Vorichtsmaßregeln untersucht wie die normalen Knochen.

Danach lassen Präparate von periostalem Osteophytengewebe bei Osteomyelitis femoris positiven Eisenbefund erkennen. Alle neugebildeten Knochenbälkchen sind fast gleichmäßig diffus blau gefärbt, nicht körnig, wie es bei Kalkreaktionspräparaten sichtbar ist. Im Vergleich mit Kontrollpräparaten von Kalkreaktion kann man an verschiedenen Stellen der Präparate sehen, daß die Knochenbälkchen der Osteophyten bei Eisenreaktionspräparaten deutlich größer als die betreffenden Balken bei Kalkreaktionsbildern sind. Dieser Unterschied der Knochenbalkengrenze ist in der mangelhaften Kalkablagerung an der äußersten Schicht des neugebildeten Knochenbalkens und in dem deutlich nachweisbaren Eisengehalt der ganzen Bälkchen samt der noch nicht ganz verkalkten äußersten Schichten der Knochenbalken zu suchen. Die Bilder der Eisenreaktion sind also viel größer als die der Kalkreaktion, im Gegensatz zu den Bildern, die O r t h bei der Untersuchung des Kallus gefunden hat. Diesen Größenunterschied der Eisenbilder und Kalkbilder kann man nicht mit Diffusion der Berlinerblau-Farbe erklären, welche bei unvorsichtiger Ferrozynkalium-Reaktion stattfinden könnte, weil die blaue Farbe sich ganz regelmäßig und scharf gegen ihre Umgebung abgrenzt und keine solche Bilder an anderen Stellen der Präparate sichtbar sind. Aus diesem Befunde kann man die äußersten schmalen Säume der Bälkchen als direkt vor der Verkalkung stehende, nur mit Eisen beladene jüngste Partien der Knochen erkennen (Fig. 4 und 5, Taf. IV).

An frischen Rachitidfällen habe ich nur dreimal Gelegenheit gehabt Untersuchungen anzustellen; bei diesen drei Fällen konnte ich die Knorpelknochengrenze der Rippe und in zwei Fällen außerdem noch ausgeprägte Schädelosteophyten untersuchen. An allen diesen im frischen Zustande durch die Kochgefrier- oder Formolgefriermethode geschnittenen Präparaten traten die Eisenreaktionen im allgemeinen in ganz beschränktem Gebiete positiv auf. Bei meinem Fall reagierte die Eisenreaktion nur an neugebildeten und im Beginn

der Kalkablagerung stehenden Knochenpartien mit positivem Resultat, während sie an alten, mit osteoiden Säumen umgebenen Knochenbalken diaphysenwärts absolut negativ blieb. An den Schädelosteophyten war es sehr leicht, die neugebildete äußere schneidbare Schicht und die alte innere Schicht zu unterscheiden. Diese neugebildeten, soeben in Verkalkung oder vor der Kalkablagerung stehenden, am stärksten Eisenreaktion zeigenden Bälkchen sind bei Silberpräparaten nur ganz schwach mit braunen Kalkkörnern beladen und als wenig kalkhaltige Teile erkennbar. Die Eisenreaktion an stärkeren älteren Knochenbalken, welche bei Silberpräparaten als am meisten kalkhaltig erschienen, ist natürlich fast absolut negativ (Fig. 6, Taf. IV).

Also ist hier auch die Eisenreaktion nur an eben mit Kalk beladenen oder direkt vor der Verkalkung stehenden Partien am stärksten, während sie am alten, stärkeren Balken und an jüngstem Osteoidgewebe vollständig negativ bleibt. Also die Kalk- und Eisenbilder zeigen keineswegs einen übereinstimmenden Charakter, weder in Ausdehnung noch in Stärke der Reaktion. Eine solche Erscheinung kann man deshalb nicht durch eine gleichzeitige Ablagerung von Eisen an die eben verkalkten Knochenbalken, wie es Orth¹⁾ annimmt, erklären. Das Vorgehen der Eisenbilder vor den Kalkbildern ist dagegen, wie Schmorl glaubt, sehr wahrscheinlich. Diese Erscheinung ist besonders an Rachitispräparaten ausgeprägt zu sehen, weil sich hier der Kontrast von neugebildeten und alten Knochenbalken in einem Gesichtsfeld klar präsentiert.

Im allgemeinen sind unsere Untersuchungsmaterialien pathologischer Verkalkungen nicht genügend und die Resultate keine einheitlichen. Es bedarf noch weiterer Forschungen, bevor ich eine bestimmtere Deutung und Schlußfolgerung daraus ziehen kann. Nur bei den Knochenneubildungsprozessen sind die positiven Befunde in allen drei Fällen gemeinsam, und alle diese sind sehr interessant zur Bedeutungsbestimmung des Eisengehaltes.

Ein Beispiel von nachträglich von außen imbibiertem Eisen habe ich schon in der Beschreibung des Eisenbefundes bei Neugeborenen beschrieben. Es gibt noch ein interessantes Beispiel von nachträglich imbibiertem Eisen unter meinen pathologischen Verkalkungspräparaten. Bei der Verkalkung von tuberkulösen Lymphdrüsen vom Rinde war die Eisenreaktion anfangs ganz negativ, und nach 40 Tagen wurde sie sehr deutlich positiv. An diesem Präparate stimmt das Eisenbild genau mit dem Kalkbild überein, und außerdem kann man eine leichte diffuse Färbung der umgebenden Gewebe konstatieren. Etwa eine Stunde in Oxalsäurelösung bei Brutofentemperatur getauchte Präparate waren vollständig negativ, und ein so enteisenter Schnitt ist nach zweitägiger Konservierung in eisenhaltig nachgewiesener Formollösung wieder sehr deutlich positiv geworden ²⁾).

¹⁾ a. a. O.

²⁾ Das ist ein Beweis, daß die vollständige Entkalkung bei einer Stunde langen Behandlung der Schnitte in Brutofentemperatur niemals stattfinden kann, und gleichzeitig ist es ein Beweis, daß sich kalkhaltige Stellen nachträglich bei der Konservierung sehr rasch mit Eisen imbibieren können.

Noch einen interessanten Zufall habe ich bei diesem Präparat getroffen; das war der sehr deutliche Reaktionsunterschied derselben Präparate zwischen Gefrier-, Zelloidin- und Paraffinschnitten. Zum Vergleich der Reaktion an drei verschiedenen Schnittarten benutzte ich meine verkalkten Lymphdrüsenpräparate nach 40 tägiger Konservierung in Formol. Die Eisenreaktion wurde in der angegebenen Weise geprüft, und die Resultate waren bei Gefrier- und Zelloidinschnitten deutlich positiv, während sie bei Paraffinschnitten vollständig negativ waren. Ich habe diese Zelloidin- und Paraffineinbettung absichtlich genau in demselben Zeitraum fertiggemacht, und doch waren die Resultate ganz anders. Weil ich anfangs der Meinung war, daß bei Paraffineinbettung durch die Wärmeeinwirkung oder durch irgendeine Veränderung, etwa Reduktion des Eisens, eintreten könnte, habe ich vor der Ferrozyankalium-Behandlung verschiedene Oxydationsmittel in verschiedener Weise probiert (übermangansaures Kali, Perhydrol usw. dabei angewendet!). Die Eisenreaktion aber blieb immer negativ. Schließlich konnte ich ziemlich deutliche Eisenreaktion in dem zur Einbettung benutzten Chloroform nachweisen. Daraus kann man schließen, daß die negative Eisenreaktion bei Paraffinpräparaten durch die höhere Temperatur in Chloroform verursacht werden kann. Dies gibt eine Erklärung für die sehr häufig beobachtete negative oder schwächere Eisenreaktion bei Paraffinschnitten, während sie bei anderen, z. B. Gefrier- oder Zelloidinschnitten, sehr deutlich nachgewiesen werden kann.

Ein solches Verhalten hat H ü c k ¹⁾ auch einmal erfahren und glaubte, daß sie von der verschiedenen Zeitdauer der Behandlung (kürzere Paraffineinbettung und längere Zelloidineinbettung) käme. Das paßt aber nicht bei meinem Fall, wo der Gefrier- und Zelloidinschnitt positiv und ein bei gleicher Zeitdauer behandelter Paraffinschnitt negativ war. Es besteht wohl kein Zweifel, daß das Eisen bei höherer Temperatureinwirkung bei gewissen Gelegenheiten in das Chloroform übergehen kann. So kann man sagen, daß der Paraffinschnitt für Eisennachweis sehr unsicher ist.

e) Brauchbarkeit der alten Präparate zum genauen Eisennachweis.

Seit H ü c k (1908) und Noesske (1909) auf die große Fehlerquelle der bisherigen Beobachtungen für den Eisennachweis aufmerksam gemacht haben, wurde die Frage nach der Brauchbarkeit der alten, in differenten Flüssigkeiten konservierten Präparate zum genauen Eisennachweis ein wichtiger Streitpunkt. Diese Frage richtig und gründlich zu lösen, habe ich einerseits bei meinen Untersuchungen verschiedene Zufälle von der Seite der Präparate beachtet und andererseits direkt die Konservierungsflüssigkeit in vielen Fällen geprüft. Ich habe schon an verschiedenen Stellen über die Veränderung des Eisengehaltes der Präparate nach längerer Konservierung in differenten Flüssigkeiten geschrieben. Konservierungsflüssigkeiten habe ich im Göttinger Pathologischen Institut an über 100 verschiedenen Fällen (2 Monate bis 3 Jahre alte Präparate) auf Eisengehalt geprüft. Die Nachweismethode des Eisens ist

¹⁾ a. a. O. 1908.

sehr einfach; nach leichter Ansäuerung der Flüssigkeit mit eisenfreier Salzsäure gießt man den Überschuß von der Rhodankaliumlösung hinein, dann schüttet man in Äther aus.

Die zur Untersuchung gelangten Flüssigkeiten waren in 25 Fällen die Konservierungsflüssigkeiten von meinen zum Eisennachweis benutzten embryonal- und neugeborenen Knochenpräparaten. 6 von diesen Präparaten sind nach Härtung mit eisenfreier Formollösung in Alkohol, andere 19 sind nur in eisenfreier Formollösung konserviert (die neueste ist nun zwei Wochen alt). Eisenreaktion war in 11, also 44% positiv (Alkohol und Formol geben dabei keinen großen Unterschied).

Von anderen 80 Flüssigkeiten waren 25 positiv, also 31%. Dieses waren meistens Geschwülste und gemischte Präparate. Es ist sehr bemerkenswert, daß fast alle diese 80 Präparate schon über 1 Jahr lang konserviert und nur 31% positiv waren, während bei meinen Knochenpräparaten, trotzdem sie anfangs in absolut eisenfreien Flüssigkeiten konserviert und alle nicht älter als einige Monate waren, 44% positiv waren. Angesichts dieser merkwürdigen Erscheinung dachte ich, daß das Eisen nicht, wie H ü c k glaubt, von den Konservierungsgefäßen allein abstammen, sondern auch aus dem Gewebe heraustrreten könne. Diese Frage genauer zu beantworten, habe ich andere vergleichende Beobachtungen gemacht; einerseits nahm ich fünf gewöhnliche Gläser mit absolut eisenfreier Formollösung ohne Präparate, und andererseits fünf Jenaer Gerätglas-Reagenzgläser (bekanntlich fast absolut eisenfrei) mit eisenhaltigen Knochenpräparaten in absolut eisenfreier Formollösung. Schon nach einer Woche konnte ich bei der Eisenprüfung in der Flüssigkeit zweimal in ersteren, dreimal in letzteren positive Resultate konstatieren. Nach zwei Wochen waren die Resultate fast dieselben.

Also möchte ich mit der größten Wahrscheinlichkeit behaupten, daß das Eisen, worauf H ü c k ¹⁾ aufmerksam gemacht hat, vom Glas in die differente Flüssigkeit und im eisenfreien Glas, wie N o e s s k e ²⁾ es gesagt hat, vom eisenhaltigen Gewebe in die Flüssigkeit übergehen kann. Also wenn in der Nähe des Eisens kalkhaltiges Gewebe liegt, so ist es denkbar, daß wegen der großen Affinität nach kurzer Zeit das Eisen in den Kalk imbibieren kann. Gleichzeitig ist es auch denkbar, daß die eigentlich eisenhaltigen Gewebe dagegen gleich ihren Eisengehalt verlieren können.

Also Eisengehalt im Gewebe direkt nachzuweisen ist bei alten, schon lange Zeit in Flüssigkeit konservierten Präparaten sehr unsicher und kann leicht zu Irrtümern führen. So ist die Angabe H ü c k s und N o e s s k e s, daß das Material zum genauen Eisennachweis ein möglichst frisches und noch nicht lange konserviertes Präparat sein muß, zu Recht bestehend. Ob die von H a l l ³⁾ (1896) angegebene Methode, alte Präparate noch zum Eisennachweis brauchbar erhalten zu können, tauglich ist, bedarf noch weiterer Forschung. H a l l hat in seiner Arbeit ein neues Verfahren, das in der Zelle enthaltene Eisen nachzuweisen, angegeben; dasselbe besteht darin, in den ersten 24 Stunden der Alkohol-

¹⁾ a. a. O. 1908.

²⁾ a. a. O.

³⁾ a. a. O.

härtung der Lösung 5 bis 30% Schwefelammonium zuzusetzen; es sollen dadurch gewisse Eisenverbindungen, die bei gewöhnlicher Alkoholhärtung in Lösung gehen, unlöslich fixiert und dadurch für die spätere mikrochemische Reaktion zugänglich gemacht werden.

Aus der Literatur hat Gierke¹⁾ auf den Eisengehalt der Knochen Neugeborener und der Embryonen in folgender Weise aufmerksam gemacht: „Bei allen fand sich völlig übereinstimmend Eisengehalt des ganzen Skelettsystems, soweit Verkalkung eingetreten war, am ausgesprochensten an den Ossifikationsstellen.“ Ferner: „Mikroskopisch erkennt man, daß das Eisen genau an den Stellen, in denen laut Nachweis mit Hämatoxylin und den spezifischen Kalkfärbemethoden körnige Verkalkung der Knorpelgrundsubstanz beginnt, nachweisbar ist.“ „Auch die neugebildeten Knochenbalken nehmen, besonders an den Rändern, Blaufärbung an; diese wird nach dem Zentrum des Knochens geringer; wir sehen hier also nicht völlige Kongruenz mit dem steigenden Kalkgehalt gewahrt und das Eisen, besonders an den Stätten der Knochenbildung, aufgespeichert“ usw.

Außerdem sagt Best²⁾ in seiner Arbeit, daß sehr häufig, aber nicht immer, embryonaler Knochen die Eisenreaktion gibt. Im Gegensatz zu den letztgenannten Autoren ist Hück³⁾ der Meinung, daß er durch seine Untersuchungen an Embryonen festgestellt habe, daß frische, nicht vorbehandelte Präparate an den kalkhaltigen Teilen des Skelettsystems sich stets als völlig eisenfrei bei den gebräuchlichen Reaktionen erweisen. Ferner ist jüngst Noesske⁴⁾, der an lebendfrischen normalen und pathologischen Knochen von Föten, Kindern usw. und an Kalkgeweben die Eisenreaktion untersuchte, dabei wie Hück zu dem überraschenden Ergebnis gekommen, daß der normale fötale Knochen in frischem Zustande keine Eisenreaktion gibt. Er faßt also die ganze Eisenreaktion fötaler und kindlicher Knochen vielleicht nicht anders auf, als daß es eine Imprägnation des Knochens mit löslichem, aus den inneren Organen und Geweben bzw. dem Blute stammendem Eisen sein könnte und daß die Diffusion eisenhaltiger Gewebssäfte und die große Affinität des verkalkten Gewebes zum Eisen die beiden wichtigsten Faktoren für das Zustandekommen der Eisenreaktion des Knochens im ungehärteten Untersuchungsmaterial sind.

Von meinen Untersuchungen zeigen, wie ich es schon an verschiedenen Stellen sagte, die embryonalen und kindlichen Knochen, trotzdem ich am genauesten die Bedingungen der vorher genannten Autoren erfüllt habe, fast konstante positive Eisenreaktion. Diese Eisenreaktion ist am stärksten an der Knorpelknochengrenze und an der innersten Schicht des Periosts, und blaßt allmählich,

¹⁾ a. a. O.

²⁾ a. a. O. 1904.

³⁾ a. a. O. 1908.

⁴⁾ a. a. O.

nach der Diaphyse und ebenso nach der knorpelwärts weit in Grundsubstanz zwischen gewucherten und vergrößerten Knorpelzellensäulen ab. Diese Verhältnisse sind besonders deutlich und relativ rasch an nicht so schnell wachsenden (mit geringeren Knorpelzellenwucherungsfiguren) Knochen sichtbar. Die Grenze der blauen Färbung der Knorpelgrundsubstanz überschreitet peripherwärts ziemlich weit die des Kalkgehaltes. Außerdem ist die Erscheinung, daß überhaupt das Eisenreaktionsbild nicht parallel zum Kalkreaktionsbild ist, sehr bemerkenswert. Die Verhältnisse im großen und ganzen sind häufig umgekehrt; die schwächste Eisenreaktion findet sich am stärksten Knochenbalken der Diaphyse, wo der Kalkgehalt am reichlichsten ist, während die stärkste Eisenreaktion an der Knorpelverkalkungszone oder an der Osteoblastenschicht des Periosts auftritt, wo die Knochen am jüngsten und der Kalkgehalt am schwächsten ist. Dieses Bild der Kalk- und Eisenreaktion kann man niemals nur durch postmortale Imbibition gemäß Affinität von Kalk und Eisen erklären, sei es, daß das Eisen aus den Flüssigkeiten (H ü c k) stamme, sei es aus umgebenden eisenhaltigen Geweben (N o e s s k e) oder schließlich aus Blutungsherden der Umgebung.

Im Gegensatz dazu habe ich schon an anderen Stellen einen interessanten Fall von Knochen Neugeborener, wo die Eisenreaktion in frischem Zustande ganz schwach, nur an der Knorpelverkalkungszone nachweisbar war und die nach zweimonatiger Konservierung in Formollösung sehr stark geworden war, beschrieben. Bei diesem Falle von nachträglicher Imbibition kann man einen sehr auffallenden Unterschied der Eisenreaktionsverhältnisse gegenüber den frischen Eisenreaktionsbildern bemerken. Bei ersteren gehen Kalk- und Eisenbilder im ganzen fast parallel, derart, daß stärkste Eisenreaktion an kalkgehaltreicheren Knochenbalken, schwächere Reaktion an kalkgehaltminderreichen jüngeren Knochenpartien auftritt. Also sind in dieser Beziehung die Resultate meiner Untersuchungen fast gleich denen von G i e r k e und S c h m o r l und nichts anderes als eine Bestätigung der Erhebungen dieser Autoren.

Ferner ist das Kalkreaktionsbild an allen Präparaten, besonders an der Verkalkungszone, als feinkörnig vorhanden, während das Eisenbild an den betreffenden Stellen nicht aus Körnchen besteht, sondern überall diffus gefärbt ist, im Gegensatz zu O r t h s Befunden

beim Kallusgewebe. Das ist auch ein Beweis, daß das Eisen nicht nur durch Affinität imbibiert ist, sondern auf Grund gewisser biologischer Verhältnisse hier aufgespeichert worden ist.

Von meinen Untersuchungen an Embryonen und an Neugeborenen sind am wichtigsten: die fast konstante positive Eisenreaktion der Knochengewebe, besonders deutlich an jüngeren Knochenpartien wie Verkalkungszone und Osteoblastenschicht des Periosts, während sie an älteren Knochenbalken deutlich schwächer ist, und das Überschreiten des Eisenbildes knorpelwärts über das Kalkbild, die umgekehrten Verhältnisse des Eisen- und Kalkbildes.

Vom Eisengehalt der Knochen von Erwachsenen oder von größeren Kindern sind bisher sehr mangelhafte Untersuchungen gemacht. G i e r k e hat den Eindruck gewonnen, daß der Eisengehalt im extrauterinen Leben bedeutend vermindert, wenn nicht ganz aufgehoben ist. S c h m o r l schreibt in seinen Untersuchungen an pathologischen Materialien, daß am fertigen ausgebildeten Knochengewebe eine Eisenreaktion nicht zu erzielen ist. Außerdem schreibt B e s t, daß Knochen Erwachsener keine Reaktion zu geben scheinen. Ferner hat O r t h gefunden, daß der fertige Knochen die Berlinerblau-Reaktion nicht mehr gibt.

Die mangelhaften Ergebnisse des Eisengehalts beim Erwachsenen rühren von den Schwierigkeiten der Untersuchungsmethode ohne vorherige Entkalkung her. Bei meiner Untersuchung war die Eisenreaktion der erwachsenen Knochen vollständig negativ, während sie an embryonalen, neugeborenen und an vielen pathologischen Knochen positiv gewesen sind. Dieser negative Eisengehalt der Knochen von Erwachsenen ist nicht nur als solcher wertvoll, sondern zeigt auch einen auffallenden Widerspruch zu der Annahme von H ü c k und N o e s s k e, daß der bisherige Nachweis von Eisengehalt als Kunstprodukt oder postmortale Erscheinung aufgefaßt und alle Befunde durch die bekannte Affinität zwischen Eisen und Kalk erklärt werden könnten. Die negative Eisenreaktion der Knochen Erwachsener und die umgekehrten Verhältnisse zwischen Kalk- und Eisenbildern sind alle zur Bedeutungsbestimmung des vorhandenen Eisens sehr wichtige Tatsachen.

Betreffs des Eisengehalts pathologischer Knochen und Verkalkungen sind die bisherigen Untersuchungsergebnisse sehr wider-

sprechend. Von früheren Autoren, welche ohne besondere Rücksicht auf Materialauswahl untersucht haben, ist häufig negativer Eisenbefund angegeben, während von den neueren Autoren, welche nur frisches Material benutzten und an vielen physiologischen Knochen negative Resultate bekommen haben, er hier positiv befunden wurde.

Zum Beispiel erhielt Gierke¹⁾ an einem großen Teile der Sandkörper der Adergeflechte und der Zirbeldrüse, verkalkten Teilen der Milzinfarkte, verkalkten Strumen, Zylindermassen der Harnkanälchen von Sublimatvergiftungsniere, Verkalkungen in der Plazenta, verkalkten Ganglienzellen, Sandkörpern des Psammoms usw. positive Eisenbefunde, während er von verkalkten Arterienwänden, verkalkter Lymphdrüsentuberkulose und Lungenherden, Kalkinfarkt der Kaninchennieren und in zahlreichen verkalkten Partien von Geschwülsten niemals einen Eisengehalt nachgewiesen hat. Rona²⁾ hat an elastischen Fasern der Riesenzellen im lupösen Gewebe eine Eisenreaktion nachgewiesen, ferner Best³⁾ an den Augen bei intraokularer Knochenneubildung eine Eisenreaktion verkalkter Partien beobachtet.

Schmorl⁴⁾ hat bei seinen Untersuchungen der Eisenreaktion an Kallusgewebe, Schwangerschaftsosteophyten, Knochentumoren, Ostitis deformans, Osteomalazie, Rachitis usw. die Resultate angegeben: daß am fertigen ausgebildeten Knochengewebe eine Eisenreaktion nicht zu erzielen ist, daß aber überall da, wo eine Neubildung von kalkhaltigem Knochengewebe stattfindet, die jüngsten Knochenteile meist eine deutliche, wenn auch verschieden starke Eisenreaktion geben. Ferner wurde bei Osteomalazie die Eisenreaktion an den während der Dauer der Krankheit neugebildeten Partien, und zwar stets dann, wenn die Kalkablagerung stattgefunden hatte, nachgewiesen. An den Knochenbalken, die alten Knochenteile entsprechen und mehr oder minder breite Säume osteoiden kalklosen Knochengewebes aufweisen, fand sich sehr häufig an der Grenze zwischen kalkhaltigem und kalklosem Gewebe eine feine Linie, mitunter auch ein mehr oder minder

¹⁾ a. a. O.

²⁾ a. a. O.

³⁾ a. a. O.

⁴⁾ a. a. O.

breiter Streifen, der deutlich und häufig sehr intensive Eisenreaktion gab. Bei den Fällen von Rachitis konnte er keine Eisenreaktion an florider und beginnender Rachitis finden, während in andern Fällen, wo das Wiederauftreten der Knorpelverkalkung, also eine Tendenz zur Heilung, stattgefunden hatte, an vielen Knochenbälkchen an der Grenze zwischen kalkhaltigem und kalklosem Gewebe sowie im Zentrum von völlig kalklosen Bälkchen und an den Stellen des gewucherten Knorpels, an denen sich mittels Silberreaktion eine eben beginnende Ablagerung von Kalksalzen nachweisen ließ, eine deutliche, und zwar meist eine sehr starke Eisenreaktion erzielen.

Hoffmann¹⁾ hat an jedem Knochenbalken von Barlow'scher Krankheit einen intensiven Eisensaum dicht an der Kambiumschicht der Osteoblasten und an den der Spongiosa zugewendeten Seite der präparatorisch verkalkten Knorpelsäulen nachgewiesen. Ferner haben Ehrlich²⁾ an elastischen Fasern, käsigen Herden, verödeten Glomerulis, Membrana elastica interna der Arterien usw. Eisen mit Kalk, Orth³⁾ an 15 tägigem Kallusgewebe bei Einkeilungsbrüchen des Schenkelhalses Kalkbilder und Eisenbilder in völliger Übereinstimmung gefunden. Orth hat das Eisen nur an Kalkablagerungsstellen, nicht diffus, sondern in der gleichen körnigen Beschaffenheit, wie sie die Kalkmassen darboten, bemerkt und schreibt weiter: „In meinen Kalkbälkchen war keine diffuse Imbibition des Grundgewebes mit Eisensalzen eingetreten, sondern überall ließ sich die Blaufärbung auf blaue Körnchen zurückführen.“ An frischen Materialien hat Noesske⁴⁾ bei Osteomyelitis, Tuberkulose, osteoplastischer Karzinose, Beckensarkom usw. positiven Eisenbefund festgestellt und schreibt, daß im frischen Zustande keine Eisenreaktion an normalen fötalen Knochen zu sehen ist, während pathologisches Knochen- und Kalkgewebe häufiger, aber keineswegs regelmäßig mehr oder weniger deutlichen Eisengehalt zeigt.

Bei meinen Untersuchungen ist der Eisengehalt der pathologischen Materialien, ausgeschlossen drei Fälle von Knochenneubildungsprozessen, sehr unbestimmt.

¹⁾ a. a. O.

²⁾ a. a. O.

³⁾ a. a. O.

⁴⁾ a. a. O.

An solchen Verkalkungen kann man die nachgewiesene Eisenreaktion als ohne physiologische Bedeutung, wie R o n a¹⁾ bei der Verkalkung in elastischen Fasern gedacht hat, auffassen. Er schreibt bei seinem Falle: „Nicht bloß die Verkalkung, sondern auch die Eisenimprägnation der elastischen Fasern ist die Folge einer degenerativen Veränderung derselben“ und faßt sie als ohne besonderen physiologischen Zweck entstehend auf.

Am pathologischen Knochenprozeß, wo Knochenneubildung denkbar ist, sind die Eisenverhältnisse ganz anders: Drei von mir untersuchte Fälle waren positiv, und zwar stets in bestimmter Weise. Diese positiven Befunde bestätigen immer in gewissen Verhältnissen die andern positiven Resultate am normalen wachsenden Gewebe und zeigen nach meiner Auffassung immer bedeutungsvolle biologische Verhältnisse.

So sieht man an meinen Präparaten von periostalen Osteophyten bei Osteomyelitis femoris eine deutliche Eisenreaktion an einwandfreien Präparaten. Diese Eisenbilder überschreiten immer den Umfang der Kalkbilder, gerade im Gegenteil zu O r t h s Angabe bei seiner Untersuchung des Kallusgewebes.

Bei ihren Fällen von Rachitis konnten G i e r k e und H o f f m a n n fast gar keine positiven Resultate bekommen, S c h m o r l dagegen konnte an vielen Knochenbälkchen heilender Rachitis an der Grenze zwischen kalkhaltigem und kalklosem Gewebe sowie im Zentrum von völlig kalklosen Bälkchen (an Stellen von beginnender Kalkablagerung) deutliche Eisenreaktion erzielen. Bei meinen in frischem Zustande untersuchten zwei Rachitisfällen waren die Resultate im ganzen mit denen von S c h m o r l übereinstimmend. Es war nämlich an neugebildeten, eben vor der Kalkablagerung stehenden Partien deutlich positiver Eisengehalt nachweisbar. Besonders ausgeprägt kam er bei Schädelosteophyten, und zwar nur an neugebildeten, erst verkalkenden oder direkt vor der Verkalkung stehenden Bälkchen als positiv vor. Also wir sind auch wie S c h m o r l der Meinung, daß das Eisen sehr häufig dem Kalk vorangehen kann.

Betreffs der Brauchbarkeit der alten, in differenten Flüssigkeiten konservierten Präparate stimmen meine Untersuchungs-

¹⁾ a. a. O.

resultate mit denen von H ü c k und N o e s s k e überein. Das Eisen kann in die Konservierungsflüssigkeiten entweder von den Präparaten oder vom Glas aus hineingelangen. Und von Anfang an eisenfreie oder in Oxalsäure eisenfrei gemachte oder ganz wenig eisenhaltige Präparate zeigen nach meiner Untersuchung schon nach kurzem Stehenlassen in der eisenhaltigen Flüssigkeit immer positive und sogar häufig sehr starke Eisenreaktion. So sind überhaupt alte, schon lange konservierte Präparate zur Eisenreaktion fast ganz unbrauchbar. Dieser nachträglich von der Umgebung imbibierte Eisengehalt ist häufig nur von der Affinität zwischen Kalk und Eisen abhängig, und zuweilen ist derselbe sehr unregelmäßig und nicht so scharf lokalisiert. Bei Eisenimbibitionen wenig eisenhaltiger Präparate ist die spätere Eisenreaktion häufig ganz unabhängig von der präformierten Eisenmenge, und die mikroskopischen Bilder zeigen häufig, wenn das Eisen nur vom Kalkgehalt abhängig ist, ganz umgekehrte Verhältnisse entgegen der B e s t s e n ¹⁾ Behauptung, ein Substraktionsbild im Sinne A l b r e c h t s ²⁾. Viele bisherige richtige Resultate von G i e r k e und S c h m o r l und andern Autoren muß man also als glückliche Zufälle ansehen, und alle weitere Forschung auf diesem Gebiet muß immer an frischen, tadellosen Präparaten geführt werden.

Bedeutung des Eisens.

Dem Eisen im Organismus hat S c h n e i d e r schon im Jahre 1885 eine histomechanische Bedeutung, unabhängig von der Blutbildung und -zerstörung, zugeschrieben. Er erklärt, daß das Eisen ähnlich wie der Kalk als Schutz und Stütze für Bindegewebe, Skeletteile, Zähne und Schalen sich verhält. In diesem Zusammenhang weist er auf das manchmal beobachtete Zusammentreffen von Kalk und Eisen hin sowie auf einen gewissen Ersatz des Kalkes durch Eisen, wenn es sich für die Natur darum handelt, manchen Stützorganen die nötige Festigkeit bei erhaltener Elastizität zu verleihen.

Trotzdem haben viele Autoren, welche dieses Thema bearbeitet haben, das Vorhandensein des Eisens durch Blutbildung oder -zersetzung beweisen wollen. Betreffs dieses Punktes sind die Ansichten G i e r k e s und M ü h l m a n n s bemerkenswert.

¹⁾ a. a. O. 1904.

²⁾ A l b r e c h t, Verh. d. D. Path. Ges. 2, 1904.

Gierke¹⁾ hat in seiner Arbeit seine Meinung dadurch begründet, daß die Bedeutung des nachgewiesenen Eisengehaltes in verkalkten Geweben darin zu sehen sei, daß das Eisen die Vorstufe für den Aufbau des Hämoglobins bilde. Es paßt aber diese Erklärung nicht für den deutlichen Nachweis von Eisen an der beginnenden Verkalkung der Schädelknochen bei einem Frühgeburtskinde, wo keine Markräume in der Nähe sichtbar waren. Mühlmann²⁾ glaubt, daß bei der normalen enchondralen Ossifikation stets eine Neubildung von roten Blutkörperchen stattfindet, und deshalb an diesen Stellen Eisen zu finden sei. Nach ihm ist die Eisenreaktion nicht von Bedeutung für den Knochenaufbau, er hält dieselbe nun für eine Stütze seiner Theorie; doch kann dieselbe meines Erachtens keine Geltung haben in Fällen von Knochenneubildung aus Bindegewebe.

Als eine stattgefundene Blutzersetzung faßt Lipski³⁾ das nachweisbare Eisen im Organismus auf, ebenfalls glaubte Arnold⁴⁾, daß endogene Siderosis nach seiner Einteilung fast ausschließlich vom Blut herkomme, also sei sie als hämatogene Siderosis aufzufassen.

Orth⁵⁾ kommt zu der Ansicht, daß das Eisen aus dem Hämoglobin des in der Nachbarschaft zerstörten Blutes herstamme, weil erstens die Eisenreaktion da fehlte, wo kein Kalk war, zweitens keine diffuse Imbibition des Grundgewebes mit Eisensalzen vorhanden war, sondern überall die Blaufärbung in blauen Kügelchen auftritt, drittens in der Umgebung sehr häufig nachweisbare Pigmentmassen vorhanden sind. Im wesentlichen hat er die Meinung wie Best und Albrecht, daß das Auftreten von Eisen in nachweisbarer Form die koordinierten Resultate besonderer Stoffumsetzungen an den betreffenden Stellen seien.

In normaler Weise fest organisch gebundenes Eisen, glaubt Best⁶⁾, tritt vorübergehend aus seiner festen Bindung heraus

¹⁾ a. a. O.

²⁾ Mühlmann, Verh. d. D. Path. Ges. 2 (Diskussion), 1904.

³⁾ Lipski, Mikroskopische Untersuchungen über die physiologische und pathologische Eisenablagerung im menschlichen und tierischen Organismus. (Inaug.-Diss.) Dorpat 1896.

⁴⁾ a. a. O.

⁵⁾ a. a. O.

⁶⁾ a. a. O.

in chemisch reaktionsfähiger Form, Ionenform, wenn irgendeine Verkalkung im Gewebe vorhanden ist und so eine große Umwandlung der chemischen Beschaffenheit stattfindet. Albrecht¹⁾ glaubt, daß das reagierende Eisen durch Veränderung der chemischen Beschaffenheit der Gewebe aus andern Formen durch chemisch es bindende oder reduzierende Körper entstanden sein mag.

Kockel, Hück und Noeske fassen das nachweisbare Eisen als postmortale Imbibition auf. Es ist aber höchst unwahrscheinlich, daß das so regelmäßig an einer Gruppe von Knochen konstant positiv und an andern immer negativ nachweisbare Eisen als zufällig aufzufassen sei. Ebensowenig denkbar ist es, die Eisenreaktion als sekundäre Resultate immer in so bestimmter Weise und bestimmter Beschaffenheit konstatieren zu können. Daß das Eisenbild gegen das Kalkbild bei unserer Untersuchung niemals parallel, sondern fast regelmäßig ganz in umgekehrtem Verhältnis steht und sehr häufig, und zwar nach bestimmter Regel, das Eisenbild das Kalkbild überschreiten kann usw., sind alles beweiskräftige Ergebnisse gegen eine sekundäre Imbibition (intravitale oder postmortale) des Eisens.

Sehr wahrscheinlich dagegen ist die Ansicht Schmorl's²⁾ und Ehrlich's³⁾. Es scheint ihm, wie Schmorl geäußert hat, als ob die stärkste Eisenreaktion bei denjenigen Knochenbälkchen auftritt, welche eben vor der Verkalkung stehen, oder in denen, wie der positive Ausfall der Silberreaktion zeigt, eine Ablagerung von Kalksalzen eben beginnt. Also vermutungsweise kann angenommen werden, daß ebenso wie bei manchem technischen Färben das Haften des Farbstoffes auf gewissen Gespinnstfasern der Gewebsbestandteile an die vorherige Einwirkung von Beizen gebunden ist, die Imprägnation des zunächst kalklos gebildeten Knochengewebes mit Eisensalzen gleichsam die Beize für die nachherige Ablagerung von Kalksalzen im Knochengewebe darstellt. Er glaubt, je mehr die Verkalkung fortschreitet, je dichter sie wird, desto schwächer fällt die Eisenreaktion aus. Ähnlich schreibt Ehrlich: Mit dem Schwächerwerden der Eisenreaktion verstärkte sich der Kalkgehalt. Er behauptet weiter, daß die Verkalkung

¹⁾ a. a. O.

²⁾ a. a. O.

³⁾ a. a. O.

und Eisenablagerung in Geweben sehr oft Hand in Hand geht, wenigstens in einem gewissen Stadium des Prozesses, und die Eisenablagerung geht der Kalkablagerung voraus, z. B. im Sinne der Rolle des Eisens als Beize für die Kalkablagerung, wie *Schmorl* meint.

Bei meinen Untersuchungen waren die Hauptergebnisse im ganzen und großen ganz wie bei *Schmorl* und *Ehrlich*. Im wesentlichen ist der Eisengehalt, meiner Untersuchung nach, bei embryonalen und neugeborenen Knochen immer positiv, und zwar besonders deutlich ist er an den jüngsten Teilen der Verknöcherung. Diese Eisenbilder stehen bei vielen Präparaten immer in ganz umgekehrtem Verhältnisse zu den Kalkbildern; an der jüngsten Knochenpartie, wie der Knorpelverkalkungszone und der innersten Schicht des Periosts usw., sind sie am stärksten und an den ältesten Partien am schwächsten, und zuweilen ist das Eisen nur an der jüngsten Partie oder an den sehr häufig direkt vor der Verkalkung stehenden Teilen positiv nachzuweisen. Außerdem ist es eine Tatsache, daß bei der beginnenden Kalkablagerung, z. B. provisorisch verkalkende Knorpelgrenze der normalen Knochen, erst verkalkende osteoide Gewebe bei verschiedenen pathologischen Geweben usw., die Kalkablagerung immer feinkörnig vorhanden ist, die Eisenablagerung dagegen diffusen Charakter zeigte; das ist sehr bemerkenswert.

So kann man die Behauptung *Schmorls* und *Ehrlichs*, daß die Eisenablagerung der Kalkablagerung vorausgeht, am sichersten bestätigen. Aus gleichem Grunde kann man die Meinung *Schmorls*, daß das Eisen für die Kalkablagerung als Beizmittel wirkt, wie es bei allem technischen Färben der Fall ist, als die plausibelste halten.

Daß sich das in Neubildung begriffene Knochengewebe chemisch anders verhält als die fertige Knochensubstanz, scheint auch noch aus andern Beziehungen hervorzugehen. Bei Fütterungen mit Krapp, einem roten Farbstoffe, kann man (vgl. die Arbeit von *Lieberkühn*¹⁾ und *Kölliker*²⁾) feststellen, daß nur das

¹⁾ *Lieberkühn*, Versuche mit Krapp (Knochenwachstum). *Müllers Arch.* 1864. — Über Wachstum des Unterkiefers und der Wirbel. *Märburger Sitzungsber.* Nr. 10, Aug. 1867.

²⁾ *Kölliker*, Die normale Resorption des Knochengewebes. Leipzig 1873.

sich neubildende Knochengewebe eine rote Färbung annimmt, der fertige Knochen aber farblos bleibt. Wenn wir auch nicht genau wissen, welcher besonderen chemischen Zusammensetzung der junge Knochen diese Fähigkeit verdankt, so können wir doch daraus schließen, daß der junge Knochen zu dem im Blute zirkulierenden roten Farbstoff eine besondere Affinität besitzt. Ganz ähnlich könnte er auch gegenüber dem im Blute zirkulierenden Eisen elektive Eigenschaften und spezifische Affinität besitzen. Es wäre Krappfärbung der neugebildeten Knochensubstanz eine schöne Analogie zu ihrem von mir wiederum konstatierten Eisengehalt.

Z u s a m m e n f a s s u n g.

1. Bei vorsichtiger Anwendung ist die Eisenreaktions-Methode mit Ferrozyankalium und Salzsäure (Berlinerblau-Methode) am empfindlichsten, zuverlässigsten und am angenehmsten; genaue Kontrollpräparate von Kalkreaktionsbildern, gewöhnlich Hämatoxylin-Eosinpräparate und Oxalsäurepräparate, dürfen keineswegs vernachlässigt werden.

2. Durch einwandsfreie Methode an einwandsfreiem Material kann man an embryonalen, neugeborenen Knochen und an pathologischen Knochenneubildungen sicheren Eisengehalt nachweisen.

3. Eisenbefund der Knochengewebe von größeren Kindern, Erwachsenen und an älteren Knochenpartien des pathologischen Knochenneubildungsprozesses ist fast konstant negativ.

4. Das Eisenbild der embryonalen und neugeborenen Knochen ist am stärksten an den jüngsten Knochenpartien, am schwächsten an ältesten Knochenpartien, oder die Eisenreaktion ist häufig nur an der jüngsten Knochenpartie (z. B. Knorpelver kalkungszone) nachweisbar.

5. Genaue Übereinstimmung von Eisen- und Kalkbildern ist fast niemals zu sehen; sehr häufig zeigen sie ein ganz umgekehrtes Verhältnis: an der kalkärmsten, also an der jüngsten Knochenpartie, ist die Eisenreaktion am deutlichsten, an der kalkreichsten, also an der ältesten Knochenpartie, ist sie am schwächsten nachweisbar. Sehr häufig kann man sogar das Eisen an den direkt vor der Kalkablagerung stehenden Stellen nachweisen. Im allgemeinen geht das Eisen dem Kalk voraus.

6. Das Eisenbild am Knochen zeigt fast immer mehr diffusen (gleichmäßigen) Charakter, während die Kalkablagerung an beginnender Verkalkungsstelle immer feinkörnig nachzuweisen ist.

7. Das Eisenbild der wachsenden Knochen zeigt im Vergleich mit imbibiertem Eisengehalt der in eisenhaltigen Flüssigkeiten konservierten Knochen sehr häufig ganz umgekehrte Verhältnisse; denn bei letzteren ist der Eisengehalt nur von der innigen Affinität zwischen Kalk und Eisen abhängig (also mit ganz parallelem Bild, und doch ergibt sich bisweilen auch ein unregelmäßiges Bild).

8. Aus oben erwähnten verschiedenen Ergebnissen kann man eine Bedeutung des Eisens im Knochen unter normalen und pathologischen Bedingungen mit gutem Recht behaupten.

Ich trete der Meinung Schmors und Ehrlichs, also der Beizungstheorie, bei. Also das Beizen der Gewebe vor der Kalkablagerung durch das Eisen scheint mir von größter Bedeutung für im Wachsen begriffene oder neuzubildende Knochen zu sein.

9. Bei den in differenten Flüssigkeiten konservierten Materialien kann das Eisen vom Gewebe zur Flüssigkeit, vom Glas zur Flüssigkeit und endlich von Flüssigkeiten zum Knochen übergehen. So sind alte, schon lange konservierte Präparate zum Eisennachweis fast ganz unbrauchbar, und man muß immer an möglichst frischen Präparaten untersuchen.

10. Der Eisengehalt der pathologisch verkalkten Gewebe ist sehr inkonstant, und meine Untersuchung solcher Materialien ist noch sehr ungenügend; es bedarf noch weiterer Forschung.

Erklärung der Abbildungen auf Taf. IV.

- Fig. 1. Knochenknorpelgrenze der Rippe vom normalen Neugeborenen. Kochgefrierschnitt, Berlinerblau-Reaktion. (Zeiss' Obj. A, Okul. I.)
- Fig. 2. Knochenknorpelgrenze der Rippe vom normalen Neugeborenen. Kochgefrierschnitt, Berlinerblau-Reaktion. (Zeiss' Obj. A, Okul. I.) Zone der Knorpelwucherung nicht so deutlich wie in Fig. 1; Blaufärbung reicht nicht so weit in die Knorpelgrundsubstanz hinein; Abschwächung der blauen Färbung nach der Diaphyse ist sehr auffallend.
- Fig. 3. Knochenknorpelgrenze der Rippe vom normalen Neugeborenen. 1½ Monate lang konserviertes Präparat, Gefrierschnitt, Berlinerblau-Reaktion. (Zeiss' Obj. A, Okul. I.) Unregelmäßiges Bild imbibierten Eisens sehr deutlich; Blaufärbung der Knorpelverkalkungszone ganz schwach.

- Fig. 4. Osteophytengewebe bei Osteomyelitis femoris. Kochgefrierschnitt, Hämatoxylin - Eosinfärbung. (Leitz' Obj. 4, Okul. I.) Junge Knochenbalken mit noch nicht verkalkten Rändern.
- Fig. 5. Osteophytengewebe bei Osteomyelitis femoris. Kochgefrierschnitt von derselben Serie wie Fig. 4, Berlinerblau-Reaktion. (Leitz' Obj. 4, Okul. I.) Junge Knochenbalken samt den osteoiden Rändern zeigen deutliche blaue Färbung; Blaufärbung überschreitet die in Fig. 4 erkennbare Zone der Verkalkung.
- Fig. 6. Senkrechte Schnitte vom rachitischen Schädelknochen (8 monatiges Kind). Kochgefrierschnitt, Berlinerblau-Reaktion. (Leitz' Obj. 2, Okul. I.) Osteophytengewebe nur am unteren Teile verkalkt; Eisenreaktion nur an diesem verkalkenden Teile deutlich; alte Knochenbalken und peripherisches Osteoidgewebe zeigen keine Eisenreaktion.

XV.

Über das Verhalten des Knochenmarkes bei verschiedenen Erkrankungen des Kindesalters.

(Aus der Universitätskinderklinik in Heidelberg.)

Von

Dr. J. L o s s e n - Coblenz.

früherem Assistenten der Klinik.

Die erste Kenntnis von den Beziehungen des Knochenmarkes zur Blutbildung wurde uns durch den von Neumann¹⁾ erbrachten Nachweis kernhaltiger Erythrozyten in diesem Organ vermittelt. Die auf Grund dieser Entdeckung dem Knochenmark zugeschriebene Bedeutung für die Erythropoese fand ihre Bestätigung durch experimentelle Untersuchungen über sein Verhalten bei der Blutregeneration nach wiederholten Blutentziehungen (Litten u. Orth²⁾), wobei sich eine hochgradige Zu-

¹⁾ Neumann, Über die Bedeutung des Knochenmarkes für die Blutbildung. Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1868 S. 689 u. Arch. f. Heilk. Bd. X, 1869, S. 68.

²⁾ Litten und Orth, Über Veränderungen des Markes in Röhrenknochen unter verschiedenen pathologischen Verhältnissen. Berl. klin. Wschr. 1877, Nr. 51.