

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Berlin.)

## Über die experimentelle Chrysosierung bei Kaninchen und Hunden und ihren histochemischen Nachweis.

Von

Dr. Harold Borchardt,

Assistent am Pathologischen Institut der Universität Berlin.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 30. September 1927.)

In neuerer Zeit werden in immer steigendem Umfange Goldpräparate in unseren Arzneischatz eingeführt. Die Goldbehandlung beschränkt sich nicht mehr auf die Tuberkulose allein, wie die Arbeiten von *Lewy*, *Freund* und *Hoffmann* gezeigt haben. Auf dem Kongreß der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin in Wiesbaden, im April 1927, wurde die Goldbehandlung von *Henius* in einer allgemein gehaltenen chemotherapeutischen Studie besprochen. Gerade diese Arbeiten *Henius*, auf die ich weiter unten noch zurückkommen muß, sind es, die den Anstoß zu dem vorliegenden Aufsatz gegeben haben.

Bei unseren Goldversuchen (*Henius*, *Brahn* und *Borchardt*) zeigte sich nun in Übereinstimmung mit ähnlichen, allerdings von anderen Gesichtspunkten aus unternommenen Versuchen *Christellers* und seiner Schüler *Gallinal* und *Kurosu* (Verhandl. d. D. Path. Ges. XXII. Tagung, 1927, Danzig), daß das Gold monatelang im tierischen Gewebe zurückgehalten wird. Diese langdauernden Goldspeicherungen zwingen zu einer kurzen, allgemeinverständlichen Bezeichnung, entsprechend den für die übrigen krankhaften Ablagerungen in den Geweben seit alters her bestehenden, wie z. B. Argyrosis, Anthrakosis, Hämosiderosis, Chalikosis usw. So ergab sich die Bezeichnung „Chrysosierung“ für Goldspeicherung aus dem griechischen *χρυσός* von selbst.

Anknüpfend an die Arbeiten von *Möllgaard*, *Bang*, *Neufeld* u. a., ging *Henius* daran, die Einwirkung von Arzneimitteln auf die Gewebe im Tierversuch ganz allgemein zu untersuchen. Den Reigen der Arzneimittel, die untersucht werden sollen, eröffnete das Gold, und zwar das 42 proz. komplexe Goldpräparat 2949 der I. G. Farbenindustrie. Die Untersuchungsmethoden waren quantitativ-chemische (*Brahn*), klinische und biologische (*Henius*) und vergleichend-histologische (*Borchardt*). Da unsere Arbeit in Kürze ausführlich an anderer Stelle

erscheinen wird, genügen wohl hier einige kurze Ausführungen. Zu prüfen war einmal, ob sich Gold in den Geweben wiederfinden ließ, und zweitens, ob überhaupt histologische Veränderungen nachweisbar waren.

Die ersten Versuchsreihen betrafen nur gesunde Tiere (Kaninchen und Hunde).

Die genaue Versuchsanordnung wird, soweit *Henius* sie noch nicht in Wiesbaden vorgetragen hat, in der gemeinsamen Veröffentlichung mitgeteilt werden. Das Präparat wurde in wechselnder Menge und wechselnder Anwendungszeit in die Ohrvene, unter die Haut, in die Gekrösevene und direkt in die Leber gespritzt. Ein großer Teil des eingespritzten Goldes blieb im Körper zurück und wurde quantitativ-chemisch in zahlreichen Organen wiedergefunden (Reihenfolge: Leber, Niere, Milz, dann wechselnd: Lungen, Darm, Muskulatur und Herz, Knochen, Magen, Fell, am wenigsten und nur in Spuren im Zentralnervensystem). In den ersten mikroskopischen Präparaten (Formalinfix., Gefrierschnitte) fanden sich in den blasig gequollenen Reticulumzellen der Leber und der Milz reichlich feinkörnige braungelbe Ablagerungen, die zum Teil mit Hämosiderin durchmisch waren, in sehr viel geringerem Maße bei Untersuchung mit Ölimmersion auch in den Reticulumzellen von Niere, Nebenniere, Dünndarm und Dickdarm. Ferner fanden sich hin und wieder in geringer Menge in den Leber- und Nierenepithelien feintropfige Lipoidablagerungen sowie auch geringe Hämosiderinablagerungen in den Kupfferschen Sternzellen der Leber und den Reticulumzellen der Milzpulpa. Irgendwelche anderen krankhaften Veränderungen, wie sie *Pagel* bei Sanocrysinsversuchen am Meerschweinchen (Krankheitsforschung 3, H. 4/5), besonders in den Nieren und der Milz, gefunden hat, konnte ich nicht feststellen. Die Frage, ob das an der Tierart lag, oder ob unser Präparat 2949 trotz seines hohen Goldgehaltes (42%) ungiftiger ist als Sanocrysin, kann vorläufig nicht mit Sicherheit beantwortet werden, doch ist es wahrscheinlich, daß eine geringere Giftigkeit die Ursache ist, denn die klinischen Untersuchungsmethoden während des Lebens ergaben keinerlei Vergiftungszeichen. Die Tiere gediehen trotz hoher Gaben ausgezeichnet und wiesen fast alle Gewichtszunahme auf<sup>1</sup>.

Waren die erwähnten braunen Zelleinlagerungen Gold? Diese Annahme war verlockend. Die *Christellersche* Methode wurde erst später mitgeteilt. So versuchte ich denn eine Identifizierung, was zunächst nicht gelang. Ferner beobachtete ich, daß die braunen Einlagerungen bei Behandlung mit Schwefelammonium (bei der Turnbull-Reaktion auf Zerfalleisen) verschwanden. So blieb nur der Schluß, daß es sich entweder gar nicht um Gold handelte oder um noch gebundenes Gold. Durch Ausschluß aller anderen bekannten gelbbraunen Ablagerungen stellte ich dann die Goldnatur fest. Es mußte demnach nur noch ein Mittel gefunden

<sup>1</sup> Von *Henius* in Wiesbaden mitgeteilt.

werden, das gebundene Gold in diesen Zellen aus seiner Bindung metallisch niederzuschlagen. Gold steht in der elektrolytischen Spannungsreihe der Metalle am weitesten links, es wird demnach durch jedes vorhergehende Metall aus seinen Salzen ausgefällt. Die Zinnchlorürmethode *Christellers* (Ausfällung von Stannosalzen: Cassiusscher Goldpurpur), auf die weiter unten noch zurückzukommen sein wird, beruht auf Reduktion.

Für meine Versuche wählte ich als goldausfällendes Metall Silber, und zwar Silbernitrat. Die Ergebnisse der Methode waren folgende: Die braunen Niederschläge in den Zellen wurden braunschwarz bis tiefschwarz, und in zahlreichen Zellen, in denen vorher nichts von Niederschlägen festgestellt worden war, lagen jetzt schwarze Körnchen, die, wie gleich gezeigt werden wird, ausgefällt Gold metallisches waren.

#### *Methode.*

Formalin- oder alkoholfixiertes Material, Gefrierschneiden oder Paraffineinbetten. Schnitte möglichst bei Sonnenlicht 12—14 Stunden (längeres Verweilen schadet nichts) in 5—10 proz.  $\text{AgNO}_3$ . Gut auswaschen, mehrmals Wasser wechseln. Einlegen in 5—10 proz.  $\text{HNO}_3$  zur Entfernung etwaiger Silberniederschläge. Falls erforderlich, auch Entfernung von Formalinniederschlägen nach Verocay. Nachfärben, am besten mit Alauncarmin oder Meyers Carmin, Alkoholreihe, Carbolxylol, Balsam.

Nach dieser Behandlung durften die schwarzen Körnchen, wenn sie aus metallischem Gold bestanden, nicht mehr in Schwefelammon verschwinden, was auch tatsächlich nicht mehr der Fall war.

Auf den positiven Nachweis, daß wir wirklich metallisches Gold vor uns hatten, sowie die zahlreichen makro- und mikroskopischen Kontrollen komme ich gleich noch zurück.

Wir unterwarfen nun die Schnitte aller Versuchstiere einer neuen histologischen Untersuchung unter Anwendung der angegebenen mikrochemischen Goldausfällungsmethode<sup>1</sup>.

Dabei fand sich in *allen* untersuchten Organen Gold, und zwar deckten sich bezüglich der Mengenverteilung die mikrochemisch-histologischen Befunde mit den von *Brahn* makrochemisch gemachten Analysen. Weiterhin ergaben sich in qualitativer Beziehung recht bemerkenswerte Befunde. Gleichviel, ob das Gold unter die Haut, in eine Blutader oder unmittelbar in die Leber gespritzt wurde, jedesmal wurde es im ganzen Körper in allen Organen aufgeteilt. Das Gold kreist mit dem strömenden Blut und kann in den weißen Blutzellen deutlich nachgewiesen werden, während es im Serum fehlt, sog. „Trans-

<sup>1</sup> Die ausführlichen Protokolle erscheinen in der gemeinsamen Arbeit mit *Henius* und *Brahn*.

portgold“. Sodann wird ein großer Teil des Goldes von den Uferzellen des Blutstromes, den Reticuloendothelzellen und von zahlreichen Histiocyten abgefangen und gespeichert. Die Organe mit reichlichstem Reticulum, wie Leber und Milz (Abb. 1), enthalten demgemäß am reichlichsten abgefangenes Gold, sog. „Speichergold“. Doch findet es sich auch in den Reticulumzellen von Niere, Nebenniere, Magen, Dünnd- und Dickdarm, Herz (Abb. 2), Skelettmuskulatur, Speiseröhre, Luftröhre, Lunge. Starke Speicherung findet auch in Organen mit trägtem Stoffwechsel statt, wie sich aus den Befunden am Knorpel (Trachealknorpel, Abb. 3) ergibt; wahrscheinlich infolge der sehr langsamem Wiederabgabe.

Eine besondere Rolle im Goldstoffwechsel spielt die Leber (Abb. 4). Sie ist, wie durch Einspritzung des Goldes in die Gekröseblutader<sup>1</sup> und unmittelbar in das Parenchym festgestellt wurde, nicht nur ein Goldspeicher, sondern das Verteilungs- und Regulierungszentralorgan. Das ergibt auch der mikroskopische Befund. In ihr liegt das Gold, außer in den Kupfferschen Sternzellen und den Histiocyten des interlobulären Bindegewebes, auch in feinstkörniger Form in den Epithelien der Leberzellbalken, diesen hochdifferenzierten Stoffwechselzellen. Von

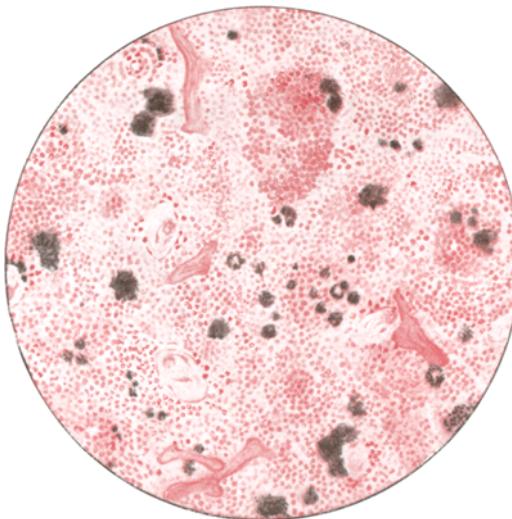


Abb. 1. Leitz, Okul. 1; Obj. 4. Chrysosierung der Milz.

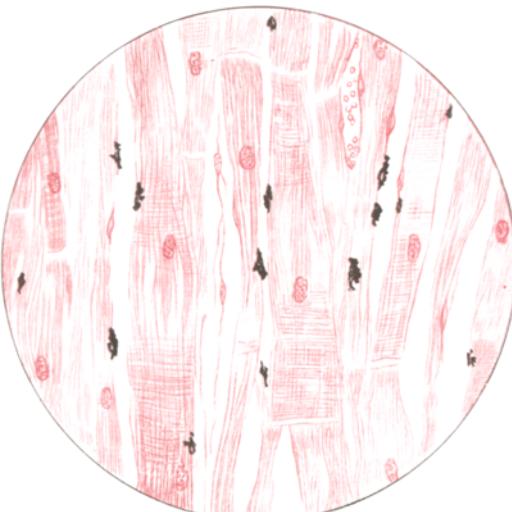


Abb. 2. Leitz, Okul. 3; Obj. 7. Chrysosierung des Herzens.

<sup>1</sup> Von Henius schon in Wiesbaden mitgeteilt.

diesen aus erfolgt die Abgabe des Goldes in das Blut und die Abfuhr in die anderen Organe, in denen es dann wiedergefunden wurde.



Abb. 3. Leitz, Okul. 1; Obj. 3. Chrysosis der Luftröhre.

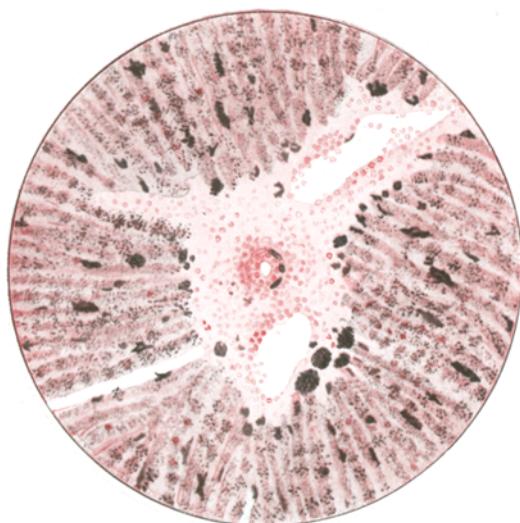


Abb. 4. Leitz, Okul. 1; Obj. 4. Chrysosis der Leber.

liche Ungiftigkeit des Präparats. Haben wir doch in keinem Falle derartige Vergiftungsfolgen gefunden wie *Page* und *Christeller* bei ihren Versuchen mit Sanocrysin. Sie fanden regelmäßig histologisch vor allem Nierenschädigungen, die bei unseren Versuchen stets fehlten.

Das Hauptausscheidungsorgan ist die Niere (Abb. 5). Auch sie speichert nebenbei in ihren Reticulumzellen, doch die Hauptmasse des in ihr wiedergefundenen Goldes liegt in feinstkörniger Form in den ausscheidenden Abschnitten der gewundenen Harnkanälchen der Rinde, sog. „Ausscheidungsgold“.

Aus diesen Befunden ergibt sich, daß unser 42% Gold enthaltendes Präparat in den Organen und Zellen festgehalten und längere Zeit gespeichert wird (in unseren Versuchen bis zu 4 Monaten), ohne *völlig* zersetzt zu werden, insbesondere wird aus ihm kein metallisches Gold während des Lebens der Zellen ausgefällt. Das geschieht erst an der toten Zelle durch den elektrolytischen Spannungsunterschied vermittels der oben angegebenen Methode neben vielleicht anderen unbekannten Einflüssen. Darauf beruht wahrscheinlich auch die ziem-

*Der positive Goldnachweis.*

Zum Zwecke des positiven Goldnachweises stellte ich nun zahlreiche Versuche an, bei denen ich von Herrn Prof. Dr. *Tiede* und Frl. Dr. *Goldschmidt* vom Chemischen Institut der Universität Berlin in entgegenkommendster Weise unterstützt wurde. Beiden spreche ich an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank aus.

Zunächst wurde das Verhalten des Präparates 2949 geprüft. Es wurde eine verdünnte Lösung hergestellt. Entsprechend der theoretischen Überlegung, daß Gold durch jedes andere Metall, das rechts von ihm in der elektrolytischen Spannungsreihe steht, ausgefällt werden muß, wurden der verdünnten Goldlösung (= Au) verschiedene Reagenzien zugesetzt:

1. Au +  $\text{AgNO}_3$  = brauner Niederschlag = ausgefällt Gold.
2. Au +  $\text{AgNO}_3 + \text{H}(\text{COH})$  = schwarzer Niederschlag = ausgefällt Gold, vermischt mit durch Formaldehyd reduziertem Silber. Beim Waschen des Niederschlages mit  $\text{HNO}_3$  geht das Silber wieder in Lösung, es bleibt ein brauner Niederschlag = reines ausgefällt Gold zurück.
3. Au +  $\text{HNO}_3$  = brauner Niederschlag = ausgefällt Gold.
4. Au +  $\text{HgNO}_3$  = brauner Niederschlag = ausgefällt Gold; bei Zusatz von  $\text{H}(\text{COH})$  wird auch Hg reduziert, und der Niederschlag wird dunkelbraun.

Nach dieser Prüfung war das Verhalten von metallischem Gold im Gewebe zu untersuchen. Es wurde eine feine Aufschwemmung metallischen Goldes durch Ausfällung aus Goldchloridlösung hergestellt und bei 2 Versuchstieren (Kaninchen) an 3 Stellen unter die Rückenhaut gebracht, auf der anderen Seite an 3 entsprechenden Stellen unser Goldpräparat.

Die Entnahme von je einem Hautstück mit metallischer und organischer Goldeinverleibung erfolgte in Abständen von 4, 12, 14 Tagen.

Das metallische Gold lag unverändert an der Einfuhrstelle in Form von akrystallinen Körnchen und Klumpen von schwarzer Farbe. Die Zellen der Umgebung enthielten keinerlei Farbstoff.

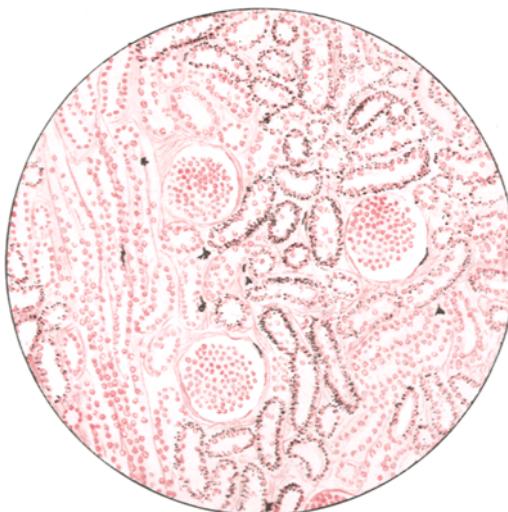


Abb. 5. Leitz, Okul. 1; Obj. 6. Chrysosis der Niere.

An den Einfuhrstellen des organischen Goldpräparates enthielten die Reticulumzellen und Histiozyten des subcutanen lockeren Bindegewebes und des Papillarkörpers reichlich feinkörnigen braungelben Farbstoff, der sich mit  $\text{AgNO}_3$  schwarz färbte und reichlicher wurde; er sah nun genau so aus wie das außerhalb von Zellen gelagerte metallische Gold. Bei diesen Tieren fand eine Aufsaugung des Präparates und Verteilung im ganzen Körper statt; es fand sich Gold als Speichergold am reichlichsten in Leber und Milz, geringer in den anderen angegebenen Organen, als Ausscheidungsgold in reichlicher Menge in der Niere. Dieser Versuch zeigt, daß in das Gewebe eingebrachtes metallisches Gold unverändert als Fremdkörper liegen bleibt, und daß solches Gold sich in Form schwarzer extracellulär gelagerter Körnchen und Klumpen darstellt.

Durch weitere Ausschlußversuche (keine Bleichung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ , negative Eisenreaktion usw.) ergab sich zwar mit Sicherheit die Goldnatur der Ablagerungen in den genannten Zellen, doch fehlte der Schlußstein des Beweises.

Zur Erreichung dieses letzten Ziels wurde ein weiteres Tier mit Goldlösung intravenös gespritzt. Von diesem und von einem nicht gespritzten Normaltier wurden nach der Tötung verschiedene Organe (Leber, Milz, Niere usw.) entnommen, zum Teil unfixiert gefriergeschnitten, zum Teil in Alkohol, zum Teil in Formalin (10%) fixiert und ebenfalls gefriergeschnitten, und alle Schnitte ungefärbt untersucht: Beim Goldtier traten deutlich die Reticulumzellen blasig gequollen, mit braungelbem Farbstoff hervor, beim Normaltier nichts dergleichen. Dann wurden die gleichen Schnitte der Behandlung mit  $\text{AgNO}_3$  ausgesetzt (24 Stunden); jetzt war beim Goldtier der braune Farbstoff in schwarz gewandelt und reichlicher geworden, beim Vergleichstier nichts.

Das Vorhandensein metallischen Goldes im ganzen Schnitt (nicht in den Zellen) wurde dadurch erwiesen, daß Schnitte des Goldtieres im Porzellantiegel bei  $1200^\circ$  verascht wurden und in der Asche metallisches Gold epimikroskopisch feststellbar war.

Nunmehr wurden unfixierte und formalinfixierte Gefrierschnitte 48 Stunden im Wasserdampfbad in Quecksilberdämpfe gebracht. Trotz der zahlreichen Verunreinigungen mit metallischem Quecksilber ließ sich einwandfrei feststellen, daß der braune Farbstoff in den Zellen ein metallisches Weiß angenommen hatte, also durch die Hg-Dämpfe amalgamiert war zu Goldamalgam.

*Damit war der Nachweis, daß wir metallisches Gold in den Zellen vor uns hatten, endgültig positiv erbracht.*

Wie schon oben ausgeführt, lagen unsere Beobachtungen lange zurück, doch hatte uns der positive Goldnachweis gefehlt. So hatten wir zwar seit langem die Goldablagerung histologisch festgestellt und im April 1927 in Wiesbaden (*Henius*) mitgeteilt, doch gebührt

fraglos *Christeller* die Ehre, als erster einen mikrochemischen Goldnachweis mitgeteilt zu haben (Juni 1927 in Danzig).

Es möchte demnach auf den ersten Blick überflüssig erscheinen, neben der Christellerschen Methode einer anderen das Wort zu reden. Doch sprechen wichtige Gründe dafür. Wir haben sofort nach Bekanntwerden der Christellerschen Methode mit ihr Vergleiche bei unseren Versuchen angestellt, genau nach den angegebenen Vorschriften, doch hat sie bei uns verasgt. Wohl traten in Schnitten mit sehr reichlicher Goldablagerung dunkle Körnchen auf, doch wechselnd, und meist versagte die Methode völlig. Woran lag das? Wahrscheinlich war bei unserem Präparat 2949 von den Zellen das Gold noch in so eigenartiger Bindung festgehalten, daß es vom Zinnchlorür nicht ausgefällt werden konnte, während das Silber wirksam werden konnte. Handelt es sich doch bei der Goldspeicherung in den Zellen nie um Speicherung von ausgefälltem metallischen Gold, sondern um kompliziert gebundenes Gold. Und zwar muß dies gebundene Gold in elektiver Weise während des Lebens von den Zellen aus dem strömenden Blute aufgenommen werden, denn zahlreiche Zellen nehmen gar kein gebundenes Gold auf, andere nur Transport-, andere Speicher-, andere wieder nur Ausscheidungsgold. Auch die Stärkegrade der Aufnahme sind sehr verschieden. Es ist mit Sicherheit anzunehmen, daß die Goldverbindungen in den verschiedenen Zellen sehr verschieden sind, nur das in all diesen verschiedenen Bindungen enthaltene Gold ist nach seiner Ausfällung sich stets gleich, metallisch.

Daß der Vorgang der Speicherung des gebundenen Goldes ein reiner Lebensvorgang ist, beweist der Versuch, daß Gefrierschnitte der Organe eines Normaltieres beliebig lange in verdünnter oder konzentrierter Lösung des Präparates 2949 liegen können, ohne auch nur eine Spur von Gold aufzunehmen. Derartige Schnitte lassen sich auch nicht veraschen wie die lebend-goldimprägnierter Organe, die stets eine Art Skelett erkennen lassen, sondern sie verbrennen völlig bei 1200° im Porzellantiegel bis auf einen winzigen strukturlosen Ascherest.

Es ist also wohl das Versagen der Christeller-Methode bei uns auf biologische Gründe zurückzuführen.

*Christeller hat mit Sanocrysin gearbeitet, das als anorganische Goldverbindung eben in den Zellen des Organismus anders aufgeteilt und zerlegt wird als das Präparat 2949, das im Gegensatz zum Sanocrysin organisch gebundenes Gold enthält.*

Für organische Goldverbindungen reicht die Zinnchlorürmethode zur Ausfällung anscheinend nicht aus. Daß unsere Versuche zunächst nur vorsichtig tastende Fühler in einem völligen Neuland sind, braucht wohl kaum betont zu werden. Der Goldstoffwechsel im normalen wie im kranken Organismus, die therapeutische Wirksamkeit von Goldpräparaten bei den verschiedensten Krankheitszuständen müssen ja erst auf das Allergenaueste erforscht werden.

Ich kann mich völlig den Schlußworten *Christellers* bei seinem Vortrag in Danzig anschließen, wenn er meint, daß durch den histologischen Nachweis des Goldes die Lösung der obigen Fragen wesentlich gefördert werden kann.

Auch bezüglich der anderen Metallverbindungen im Organismus sind *Christellers* Hoffnungen durchaus berechtigt. Ist doch durch unsere Versuche die theoretische und praktische Grundlage geschaffen, zu versuchen, jetzt alle Metalle auf Grund ihres elektrolytischen Spannungsunterschieds durch grundsätzlich gleichartige Methoden histologisch zu erfassen, was z. Zt. geschieht.

Haupterfordernis zu einer gedeihlichen derartigen Forschung ist aber unbedingt die Zusammenarbeit von Chemiker, Kliniker, Biologen mit dem Histologen. Jede Einseitigkeit bei chemotherapeutischen Arbeiten würde dem Fortschritt der Erkenntnis eher schaden als nutzen.

#### Literaturverzeichnis.

*Christeller*, Ein mikrochemischer Goldnachweis im Gewebe. Verhandl. d. dtsch. pathol. Ges., 22. Tag., Danzig 1927, S. 173. — *Gallinal*, Untersuchungen mit der mikrochemischen Goldreaktion an Organen sanocrysinbehandelter Tuberkulöser. Zeitschr. f. Tuberkul. **48**. 1927. — *Henius*, Chemotherapeutische Studie über die Grundlagen der Goldbehandlung der Lungentuberkulose. Verhandl. d. dtsch. Ges. f. inn. Med., Wiesbaden 1927. — *Hoffmann*, Die Goldbehandlung der Lepra. Münch. med. Wochenschr. 1927, Nr. 10, S. 405. — *Kurosu*, Ein histo-chemischer Goldnachweis, zugleich ein Beitrag zur Frage der Verteilung und Ausscheidung des Sanocrysin im gesunden und tuberkulösen Körper. Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. 1927. — *Lewy* und *Freund*, Die Behandlung des chronischen Infektes mit dem neuen Goldpräparat Solganal. I. Mitt. Dtsch. med. Wochenschr. 1926, Nr. 44, S. 1857. — *Lewy* und *Freund*, Die Behandlung usw. II. Mitt. Klin. Wochenschr. 1927, Nr. 19, S. 903. — *Pagei*, Meerschweinchentuberkulose und Metallvergiftung. Krankheitsforschung **3**, H. 4/5, S. 372. Weitere Literaturangaben über Sanocrysin siehe bei *Pagei*.

#### Berichtigung

zu der Arbeit von *A. Babes* und *Marinescu-Slatina*  
 „Über eine lymphoepitheliale Geschwulst der Schilddrüse“  
 Virchows Archiv **266**, H. 2, S. 321 von Professor Dr. *A. Dietrich*, Köln.

Die Verff. führen eine aus meinem Institut hervorgegangene Arbeit von *Paula Derigs*, Virchows Arch. **244**, 1923 an, verwechseln aber den Inhalt mehrmals mit der Arbeit von *Kneringer* und *Prisel* (Virchows Arch. **241**, 1923). *Derigs* beschrieb ein lymphoepitheliales Gewächs des Nasenrachenraumes (nicht des Mediastinums), der ausgedehnte Metastasen der Lymphknoten, vor allem aber der Lungen gesetzt hatte.