

(Aus der Physiologisch-Chemischen Anstalt — Direktor: Prof. Dr. *Spiro* — und der Pathologischen Anstalt — Direktor: Prof. Dr. *Rössle* — der Universität Basel.)

Histo-topochemische Untersuchungen an krankhaft veränderten Organen unter Anwendung der Schnittveraschung.

Von

O. Schultz-Brauns,

Assistent am Pathologischen Institut Bonn.

Mit 34 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. Dezember 1928.)

Inhaltsübersicht.

Wesen und Ziel der chemischen Histologie, Schrifttum (S. 1).

Methodik der anorganischen Histo-Topochemie (S. 8).

Beobachtungen beim Verlauf der Veraschung (S. 14).

Beobachtungen an Gesamtaschenpräparaten (S. 19).

Besprechung der Befunde und Versuche zur Feststellung der Aschenbestandteile (S. 39).

Die Bedeutung chemischer Untersuchungen an pathologisch veränderten Organen für die Erforschung des Krankheitsgeschehens war schon in der Mitte des vorigen Jahrhunderts erkannt worden, und es wurden bereits in dieser Zeit verhältnismäßig zahlreiche chemische Analysen ausgeführt. Eine ganze Reihe von Umständen hemmte jedoch den Ausbau dieser Forschungsrichtung. Es standen damals nur Methoden zur Verfügung, die so viel Ausgangsmaterial erforderten, daß bei dem hohen Wassergehalt der Gewebe nur größere Organe untersucht werden konnten. Ein so gewonnenes Ergebnis stellt zudem die Summe aus unendlich vielen Einzelveränderungen dar, und weil diese kaum gleichsinnig sein werden, und weil in großen Organen nicht alle Teile verändert sein können, ist die Möglichkeit sehr groß, daß die Einzelveränderungen das chemische Endergebnis nur unwesentlich oder gar nicht beeinflussen. So nimmt es nicht wunder, daß trotz einer ganzen Reihe von mühevollen Untersuchungen nur wenige fruchtbare Ergebnisse und Gesichtspunkte gewonnen wurden. Ein Fortschritt auf diesem Wege war im wesentlichen von einer Verfeinerung der Methodik abhängig. Für eine solche im Sinne einer Verringerung des Ausgangsmaterials bestand aber in der Chemie kein Interesse, dort stand ja stets genügend Material zur Verfügung. Für den Ausbau einer *chemisch-morpho-*

logischen Richtung in der Biologie hätte schon damals, wie es erst sehr viel später durch *Pregl*, *Emich* u. v. a. wirklich geschah, zuerst die Methodik geschaffen werden müssen. Gegenüber solchen Schwierigkeiten ließ aber das Interesse an einer chemischen Forschungsrichtung nach und das besonders, weil auf anderen Wegen die großartigsten Aussichten sich eröffneten. Die Vervollkommnung der *optischen* Hilfsmittel gab ganz neue Einblicke in das feinere Gefüge der organisierten Welt, und die Hand in Hand gehende Entwicklung der Fixierungs-, Schneide-, Einbettungs- und namentlich der Färbemethoden stellte eine so große Menge von Problemen, daß viele Jahrzehnte alle Kräfte von diesem Zweig der Forschung angezogen und beansprucht wurden. Für ein Zurückgreifen auf die noch um die Wende des Jahrhunderts in unserem Sinne nicht weiter entwickelten chemisch-analytischen Methoden bestand um so weniger ein Bedürfnis, als auf Grund der herrschenden Vorstellungen allgemein angenommen wurde, daß den histologischen Färbungen chemische Vorgänge zugrunde lägen, mit anderen Worten: man glaubte auf diesem Wege Histochemie zu betreiben.

Aber bereits 1897 zeigte *Spiro*, daß Färbungen von Kolloiden, wie z. B. Leim und Agar, mit Methylenblau, Methylviolett und Bismarckbraun unter wechselnden Versuchsbedingungen nicht das Verhalten chemischer Reaktionen zeigen, sondern daß es sich nur um eine verschiedene Verteilung des Farbstoffes zwischen Farblösung und den Kolloiden, also um einen *physikalischen* Vorgang, eine Adsorption, handelt. Mit der Ausbildung der physikalischen Chemie sind in den beiden letzten Jahrzehnten auch von anderen Seiten ähnliche Beobachtungen mitgeteilt worden, die zeigen, daß nicht nur die kolloidalen Eigenschaften des Substrats, sondern auch die chemisch-physikalischen Eigenschaften der Farblösung für den Färbungsvorgang von ausschlaggebender Bedeutung sind. Hier sind besonders die Arbeiten von *v. Moellendorff*, *Michaelis*, *Schulemann*, *Bethe* und *Pischinger* und ganz besonders die von *Keller*, *Gicklhorn* und *Fürth* zu nennen. Wenn auch heute eine völlige Klärung über die ursächlichen Vorgänge bei den verschiedenen Färbungen noch nicht erfolgt ist, so muß dem Histologen doch bewußt sein, daß zum mindesten bei der Mehrzahl der Methoden keine chemischen Reaktionen vorliegen, sondern daß ein ineinander greifen chemischer und chemisch-physikalischer Vorgänge den im Einzelfall sehr schwer durchschaubaren Färbungserfolg hervorruft.

Diese Erkenntnis läßt die durch das Fehlen einer rein chemisch-histologischen Forschung verursachte Lücke wieder stärker empfinden; um diese Lücke auszufüllen, stehen uns nun heute ganz andere Möglichkeiten als vor einem halben Jahrhundert zur Verfügung. In den letzten Jahrzehnten war in der experimentellen Biologie und in der klinischen Medizin das Bedürfnis immer größer geworden, mit kleinsten Mengen,

besonders von Körperflüssigkeiten, fortlaufende Untersuchungen auszuführen, und es wurde eine Mikrochemie so weit ausgebildet, daß heute bei geringstem Ausgangsmaterial für die meisten Ionen gute Methoden zur Verfügung stehen. Diese geben jetzt die Möglichkeit, nicht nur kleinere Organe, sondern auch kleine Herde aus krankhaft veränderten Organen zu untersuchen, und wir können nun viel eher erwarten, deutliche Ausschläge bei den Ergebnissen zu erhalten. Aber obwohl es nun möglich ist, mit etwa einem Gramm Körpersubstanz oder noch weniger zahlreiche verschiedene Bestimmungen auszuführen, erlaubt die Mikrochemie — und das wird auch nie erreicht werden — doch nicht, den unmittelbaren Anschluß an die mikroskopischen Größenordnungen herzustellen. Immer noch setzen sich die Ergebnisse mikrochemischer Untersuchungen aus den Veränderungen unendlicher Mengen von einzelnen Zellen zusammen, so daß z. B. Verschiebungen zwischen benachbarten Gewebsabschnitten, wie sie *Gans und Packheiser* nach Bestrahlungen an der Haut beobachteten, nicht erfaßt werden können. Bei der Untersuchung von menschlichem Material ist die Schwierigkeit dadurch noch besonders groß, daß keine Möglichkeit vorhanden ist, einwandfreie Vergleichsdaten zu erhalten. Einmal stehen fast nur Organe von an anderen Krankheiten verstorbenen Menschen zur Verfügung, so daß eine Beteiligung anscheinend unveränderter Organe im Einzelfall nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, und außerdem wird die gerade vorliegende Stoffwechselphase des Organs die Befunde in verschiedener Weise beeinflussen. Wie wichtig gerade dieser letzte Punkt ist, zeigen viele Mißerfolge und andererseits die Ergebnisse von *Bürger und Schlomka*, die sie bei ihren Untersuchungen über das Altern von Geweben durch Beschränkung auf Gewebe mit geringstem Stoffwechsel erzielen konnten. Und wie allein die Schwierigkeiten der Materialbeschaffung die Erforschung eines Gebietes behindern, zeigt sich z. B. bei der Galle: da Lebergalle vom gesunden Menschen nicht in genügender Menge zu erhalten ist, sind wir auf diesem Gebiet noch nicht einmal über die grundlegenden physiologischen Tatsachen unterrichtet.

Wenn also heute durch die inzwischen erfolgte Ausbildung einer Mikrochemie sich ganz neue Möglichkeiten für eine *chemische Morphologie* eröffnen, so fehlt doch immer noch die Verbindung mit den mikroskopischen Größenordnungen. Bei den Körperflüssigkeiten, die stets gleichmäßig durchmischt werden, genügt die quantitative Bestimmung der einzelnen Ionen z. B. in einer Menge von 1 ccm; wir können ohne weiteres schließen, daß in kleineren Mengen der Flüssigkeit die entsprechenden Bruchteile der Einzelbestandteile vorhanden sein müssen. Anders bei den quantitativ-chemischen Untersuchungen von Geweben; wie bereits erwähnt wurde, ist in diesen die Verteilung besonders unter pathologischen Bedingungen ganz und gar nicht abzuschätzen, denn

ein Gewebe besteht nicht nur aus Zellen und nicht nur aus einer Zellart. *Die Gewebschemie bedarf deshalb neben der Mengenbestimmung noch der Ergänzung durch Feststellung der Lokalisation in den verschiedenen Geweben und Zellen.*

Diese Ergänzung kann nur durch eine chemische Notwendigkeiten voll berücksichtigende Histologie vermittelt werden; die gewöhnliche Histologie ist hierzu nicht befähigt, weil, wie erwähnt, die Vorgänge bei den histologischen Färbungen in beträchtlichen Ausmaßen physikalischer Natur sind, weil ein großer Teil der Zell- und Gewebsbestandteile bereits durch die Fixierungsmittel ausgezogen wird und weil endlich die Gewebe bei der Fixierung in noch nicht genügend bekannter Weise chemisch verändert werden. Im Gegensatz zu einer chemischen Histologie, die das gesamte, die Gewebe erfüllende Material zur Darstellung bringen muß, zeigt uns die gewöhnliche Histologie im wesentlichen nur das Gerüst der Zellen und Gewebe. Diesen Teil der Gewebschemie werde ich in folgendem, um Mißverständnisse zu vermeiden, und weil die Bezeichnung Histochemie bereits vielfach in einem umfassenderen Sinne unter Einbeziehung der nicht lokalisierenden quantitativen Analyse gebraucht wird, als mikroskopische Topochemie oder *Histo-Topochemie* bezeichnen.

Die histo-topochemische Forschungsrichtung kann verschiedene Ziele verfolgen, und sie kann zum Teil diese auch auf verschiedenen Wegen zu erreichen versuchen. Einmal kann sie in Verbindung mit der quantitativen präparativ-organischen Chemie der Körperbestandteile die Lokalisierung der organischen Verbindungen, aus denen sich die Gewebe aufbauen, betreiben; oder sie kann versuchen, die Verteilung der noch kleineren Bausteine, der einzelnen Elemente, in den Geweben zu bestimmen.

Über die Bedeutung der zuerst erwähnten Richtung ist kein besonderer Hinweis nötig; soweit solche organischen Verbindungen gefärbt sind, soweit es sich also um Pigmente handelt, waren sie ja seit jeher eines der Hauptziele der allgemeinen Histologie. Außerdem sind eine große Reihe von Ergebnissen über den Nachweis der Fette und einer ganzen Reihe von Einzelverbindungen, wie z. B. Harnstoff und Cholesterin, und von Pigmentvorstufen in weitgehendem Maße als gesichert anzusehen. Große Lücken klaffen jedoch noch auf dem Gebiet des Nachweises der Eiweißkörper, der Lipoide und der Kohlehydrate.

Der Nachweis der Elementarbestandteile der Gewebe, der Ionen, ist, wie bei den direkten Bestimmungsmethoden im Blut oder im Serum, auch in den Geweben direkt am nativen Material ausgeführt worden; bei einem solchen Vorgehen erschweren aber eine Reihe von störenden Vorgängen die Bildung eines sicheren Urteils; ich werde auf diese Frage noch zurückkommen. Diese Unsicherheiten liegen vor allem in der An-

wesenheit von Kolloiden und in den zum Teil sehr festen Bindungen der einzelnen Ionen in den organischen Verbindungen begründet, und man hat sie von jeher in der quantitativen Elementaranalyse der Gewebe dadurch zu vermeiden gesucht, daß man alle organischen Verbindungen zerstörte. Am sichersten ist diese Zerstörung durch die Veraschung zu erreichen, und auch am Gewebsschnitt ist aus diesen Gründen die trockene Veraschung bereits von einigen Forschern versucht worden. Obwohl bei diesem Verfahren eine biologische Auswertung der Ergebnisse unter großer Zurückhaltung erfolgen muß, sind die chemischen Bedingungen hierbei doch so leicht zu durchschauen, daß die Methode der Schnittveraschung bei weiterem Ausbau wertvolle Ergebnisse zu liefern verspricht; es sollen deshalb die folgenden Untersuchungen der Ausbildung dieses Zweiges der Histo-Topochemie dienen.

Bevor ich auf das Schrifttum über die wenigen bisher mit der Schnittveraschung angestellten Versuche eingehe, muß ich die an nativen Schnitten angestellten topochemischen Untersuchungen kurz besprechen, soweit sie das gleiche Ziel des Nachweises der Elemente verfolgen. Solche Untersuchungen wurden zuerst in der Botanik von *Molisch* seit den 90er Jahren des vorigen Jahrhunderts ausgeführt. Die Bedingungen sind in der Botanik besonders günstig, weil die Zellen sehr groß und infolge ihrer festen Hüllen sehr widerstandsfähig sind, so daß die Verarbeitung von nativem Zellmaterial keine Schwierigkeiten verursacht. Aus der qualitativen Mikrochemie, wie sie von *Behrens* u. a. in der Mineralogie ausgearbeitet wurde, konnte eine große Zahl von Methoden übernommen und erfolgreich angewandt werden; auf diese Weise konnte *Molisch* mit zahlreichen Schülern eine Topochemie des Pflanzenkörpers aufbauen. Auf tierische Gewebe und Zellen wurden derartige Methoden zuerst und vor allem in ausgedehntem Maße von *A. B. Macallum* angewandt, und wir verdanken ihm eine große Anzahl von neuen Methoden und wertvollen Ergebnissen. Im übrigen liegen nur vereinzelte Arbeiten auf diesem Gebiete vor, die meist zur Klärung spezieller Fragen ausgeführt waren. So untersuchten *Leschke* und später *Defrise* die Chlorverteilung in der Niere zur Feststellung der Funktion verschiedener Harnkanälchenabschnitte, *Fitz-Gerald*, *Monti* die Cl-Sekretion des Magens zur Feststellung des Ortes der Salzsäurebildung, *Groebbels* die Verteilung des Chlors im Gehirn zur Feststellung der Blutgefäßversorgung, *Rabl*, *Böhmig*, *Stoye*, *Schulze* die Vorgänge bei der Knochenbildung durch Untersuchung der Calcium-, Kalium- und Phosphorverteilung, *Watermann* die Veränderungen im Kalium- und Calciumgehalt der Gewebe von experimentell erzeugten Carcinomen und *Gans* und *Packheiser* sowie *Dähn* die Verteilung des Kaliums und Calciums in der normalen, bestrahlten und ekzematösen Haut. Soweit die Ergebnisse dieser Untersuchungen in engerer Beziehung zu den eigenen Versuchen stehen, werde ich später noch auf sie zurückkommen. Eine gute Übersicht über dieses Gebiet in bezug auf Methodik und Kritik der Ergebnisse findet sich außer bei *Weil* im Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden von *Abderhalden*, besonders in dem Abschnitt „Animale Histochemie“, von *Patzelt* in den „Fortschritten der Mikrochemie“. In allen diesen Untersuchungen wurden die Schnitte von unfixiertem Material gewonnen und statt in Wasser unmittelbar in dem Fällungsreagens der nachzuweisenden Substanz aufgefangen. Dadurch werden alle Verlustmöglichkeiten und Veränderungen, wie sie die verschiedenen Fixierungsmittel bedingen, vermieden; trotzdem sind gegen alle diese Untersuchungen von vielen Seiten zahlreiche Bedenken geäußert worden, die sich

vor allem auf die Beeinträchtigung des Reaktionsablaufes durch die Kolloide des nativen Gewebsmaterials beziehen. Einmal können sie eine Schutzwirkung ausüben und die chemischen Umsetzungen und Fällungen mehr oder minder verhindern, so daß vorhandene Elementarbestandteile nur in geringerer Menge oder gar nicht dargestellt werden. Weiter können sie das Reagens adsorbieren und auf Grund von solchen physikalischen Bindungen eine chemische Reaktion vortäuschen, so daß mehr von einem Bestandteil dargestellt zu sein scheint als wirklich vorhanden ist. Bei den mehrwertigen Elementen, die vielfach maskiert, d. h. in komplexer Bindung vorkommen, bleibt weiter unsicher, in welchem Grade diese Bindungen bei den ablaufenden Reaktionen gelöst werden. Es zeigt sich also, daß der Einfluß der Kolloide ganz und gar nicht abzuschätzen ist und, was besonders ins Gewicht fällt, daß sowohl Verminderungen wie auch Vermehrungen der nachzuweisenden Substanzen vortäuscht werden können.

Diese Schwierigkeiten sind zuverlässig nur auf dem zweiten, bereits angedeuteten Wege topochemischer Gewebsforschung durch völlige Zerstörung aller organischen Substanz zu beseitigen, und für unsere Zwecke kommt hier allein die trockene Veraschung in Frage. Den Vorteilen dieser Methode stehen, abgesehen von einer wesentlichen Vergrößerung technischer Schwierigkeiten, aber auch Nachteile gegenüber. Durch die Zerstörung aller organischen Verbindungen und die Überführung aller Elemente in ihre Oxyde oder hitzebeständige Neutralsalze wird jedes Urteil unmöglich, wie diese Elemente im Körper miteinander verbunden waren. Es geht somit jede Möglichkeit, Bau- und Betriebsstoffe voneinander zu trennen, und z. B. über derart wichtige Vorgänge, wie den Phosphat-Milchsäurestoffwechsel im Muskel weitere Forschungen anzustellen, verloren. Der Kreis der Probleme wird dadurch von vornherein wesentlich eingeengt, und nur die genaue Kenntnis der Begrenzung der Möglichkeiten kann vor Fehlschlüssen schützen.

Diesen Nachteilen stehen aber große Vorteile gegenüber, die vor allem darin bestehen, daß wir viel einfachere und viel leichter zu durchschauende Bedingungen vor uns haben und daß sich die Ergebnisse dieser Methode ohne weiteres mit den quantitativen Aschenbestimmungen von Gewebsstücken vergleichen lassen. Außerdem werden eine ganze Reihe von Stoffen zerstört oder ausgetrieben, die, wie z. B. Kreatinin und Ammoniak bei der Kaliumreaktion, sich mit dem Reagens umsetzen und zu Täuschungen Veranlassung geben.

Die erste Veröffentlichung über die Schnittveraschung stammt aus dem Jahre 1910 und röhrt von *R. E. Liesegang* her, der mit Eiweißglycerin aufgeklebte Schnitte über einem Bunsenbrenner veraschte. In dieser Arbeit finden sich zahlreiche bemerkenswerte und besonders methodische Beobachtungen; doch betont *R. E. Liesegang* selbst, daß keines der gestellten Ziele erreicht wurde, im besonderen gelang es ihm nicht, das Eisen des Hämoglobins nach der Zerstörung des Blutfarbstoffs durch die Veraschung nachzuweisen, und *R. E. Liesegang* nimmt an, daß das Eisen eine neue maskierte Verbindung gebildet hat. Im

gleichen Jahr benutzte *Herrera* die Schnittveraschung zum Nachweis des Siliciums. Auch *Molisch* wendete in der Pflanzenmikrochemie diese Methode an, und er erhielt sehr charakteristische Aschenbilder bei den verschiedensten Pflanzen, besonders durch die sich auch in der Asche sehr schön darstellenden krystallinischen Zelleinschlüsse. Er wendete die Veraschung deshalb auch auf die Pharmakognosie an, und *Lanzoni*, der diese Anwendungsmöglichkeit nachprüfte, bestätigte, daß oft sehr charakteristische Aschenbilder von Drogen erhalten werden können. Seit 1923 führte *Policard* eine große Zahl von Untersuchungen an veraschten menschlichen Geweben aus. Er gibt zahlreiche technische Anweisungen; eine der Hauptschwierigkeiten aber: die Befestigung der Asche auf dem Objektträger, kann er nur dadurch überwinden, daß er die Asche durch weitere Erhöhung der Temperatur in den gläsernen Objektträgern einschmilzt. Er selbst betont, daß dies Verfahren für chemische Reaktionen nützlich sein könnte; aber sicher ist das Gegen teil der Fall. Denn an die von der Glasschmelze umgebenen Aschenbestandteile können keine Reagenzien mehr gelangen, und daß überhaupt chemische Reaktionen, wie z. B. die Oxydation der Gewebsteile, nicht mehr erfolgen können, wenn sie vom Glasfluß umschmolzen sind, zeigt die eigene Beobachtung *Policards*, daß im Glas eingeschlossene Kohleteilchen auf keine Weise mehr vollständig verbrannt werden können. Er untersuchte Ovarien und Tumoren und konnte dabei die quantitativ- chemischen Untersuchungen von *Beebe* und von *Clowes* und *Frisbie* über die Verteilung des Kaliums und Calciums mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auch histologisch bestätigen, obwohl die Verteilung dieser Stoffe nicht durch spezifische Darstellung nachgewiesen werden konnte. Aus den allerletzten Jahren sind endlich noch die Versuche von *Ostertag* sowie *Jacobi* und *Keuscher* zu erwähnen; sie konnten aber keine Ergebnisse erzielen, zum Teil weil eine Lokalisierung der nachzuweisenden Stoffe nicht gelang, zum Teil wegen der großen technischen Schwierigkeiten, die *Jacobi* und *Keuscher* sogar veranlaßten, auf die völlige Veraschung zu verzichten und sich mit der Verkohlung zu begnügen.

Zu den aufgeführten Arbeiten, in denen die Schnittveraschung angewendet worden ist, ist zu bemerken, daß in ihnen — mit Ausnahme der an Pflanzengeweben ausgeführten Untersuchungen von *Molisch* und seinen Schülern — fixiertes Material, das außerdem meist auch mit Wasser und anderen Lösungsmitteln, wie z. B. Methylalkohol in Berührung gekommen war, verwendet wurde. Das trifft besonders für die Arbeiten von *Policard* zu, dessen Ergebnisse deshalb nur mit Vorsicht verwertbar sind. *Policard* selbst bezeichnet die Herstellung von Schnitten aus unfixiertem Material menschlicher oder tierischer Gewebe ausdrücklich als unmöglich, und er begnügt sich damit, formol- oder

alkoholfixiertes Material zu verwenden, und obwohl er selbst angibt, daß er keine sicheren Unterlagen dafür hat, nimmt er an, daß höchstens die frei in den Gewebsflüssigkeiten gelösten Bestandteile durch Herauslösung verloren gehen, und daß die adsorptiv oder chemisch an die großen Eiweißmoleküle gebundenen Ionen und damit die wesentlichen Aschenbestandteile erhalten bleiben. Für die adsorptiv gebundenen Ionen kann dies aus ganz allgemeinen chemisch-physikalischen Gesetzen heraus als unwahrscheinlich bezeichnet werden, und über das Verhalten der chemisch an die Eiweißmoleküle gebundenen Ionen bei der Fixierung läßt sich wegen des Fehlens chemischer Unterlagen über die bei der Fixierung sich abspielenden Vorgänge nichts aussagen. *Policard* gibt in seinen Arbeiten auch keine Abbildungen, so daß auch ein Vergleich mit den eigenen Ergebnissen nicht möglich ist.

Spiro erkannte, daß bei der Methode der Schnittveraschung durch Verwendung von Fixierungsflüssigkeiten und überhaupt irgendwelchen Lösungsmittels gänzlich unübersehbare Verlustmöglichkeiten entstehen, und er veranlaßte, diese Forschungsrichtung unter rein chemischen Gesichtspunkten aufzunehmen. In dieser Weise benutzte *Seifert* die Schnittveraschung bei experimentellen Untersuchungen über die Verteilung des Bleis, und *Tschopp* gelang es trotz der von *Policard* betonten Unmöglichkeit, Schnitte von unfixierten menschlichen Geweben von dem gekühlten Messer unmittelbar auf den Objektträger unter Zuhilfenahme einer eisgekühlten Pinzette und eines Pinsel zu übertragen und somit Verluste durch Herauslösung sicher auszuschließen. Es leuchtet aber ein, daß mit diesem Verfahren auch an günstigen Objekten nur ausnahmsweise genügend dünne Schnitte erhalten werden können, und das Verfahren führte auch nur unter Mithilfe einer zweiten Person zum Ziel.

Da nun einerseits die Verwendung unfixierter Schnitte eine unabsehbare Forderung bildet, um die Methode wirklich fruchtbringend anwenden zu können, und da andererseits eine zuverlässige und einfache Methode nicht zur Verfügung stand, erschien mir die wichtigste Aufgabe zunächst einmal darin zu liegen, die Ausarbeitung einer solchen Methode in Angriff zu nehmen. Nachdem dies gelungen war, zeigte sich, daß bereits die Gesamtaschenbilder bemerkenswerte Befunde ergaben, und es soll deshalb im folgenden nach Beschreibung der Methode der Herstellung der Schnitte und nach Mitteilung der beim Verlauf der Veraschung gemachten Beobachtungen über solche Gesamtaschenbefunde und zuletzt über die ersten Versuche einer chemischen Bestimmung der einzelnen Elementarbestandteile berichtet werden.

Methodik.

Den Ausgangspunkt für die Bemühungen um eine Verbesserung der Methodik bildete die auch von *Tschopp* benutzte Angabe von

A. B. Macallum, daß das Messer beim Schneiden gut zu kühlen sei, und die Richtigkeit dieser Angabe zeigte sich auch sofort in orientierenden Versuchen. Während aber bei *Macallum* eine einfache Kühlung genügt, weil er die Schnitte vom Messer in noch gefrorenem Zustand direkt in das Reagens hineinspringen lassen konnte, genügt sie nicht für die sichere Übertragung auf eine andere Unterlage, wie z. B. auf einen Objektträger. Wenn das Messer wärmer als 0° ist, so tauen die Schnitte sofort auf und die unfixierten Eiweißkörper derselben kleben am Messer an, bevor der Schnitt nur richtig ausgebreitet, geschweige auf eine zur Veraschung geeignete Unterlage übertragen ist. Die ersten Versuche zeigten, daß das Kleben der unfixierten Eiweißkörper nur dadurch beseitigt werden kann, daß Messer und manchmal auch Objektträger zuverlässig unter 0° gehalten werden können, bis der Schnitt völlig ausgebreitet und auf den Objektträger überführt ist. Dies gelang unter Zuhilfenahme eines zweiten Gefrierapparates, und es zeigte sich, daß nur $15\ \mu$ dicke Schnitte in gefrorenem Zustand nicht nur nicht kleben, sondern auch so fest und widerstandsfähig sind, daß sie die nötige Behandlung ohne Beschädigungen zu erleiden ertragen.

An einem Leitzschen Gefriermikrotom wurde ein zweiter Gefrierapparat so mittels Stativ und Stativklemmen befestigt, daß der aus der Düse austretende Kohlensäurestrahl den Gefriertisch des Mikrotoms von oben an der Stelle trifft, an der der Gewebsblock aufgesetzt werden soll (Abb. I); eine derartige Vorrichtung wird jetzt von E. Leitz-Wetzlar als Zusatzapparat zu dem Leitzschen Gefriermikrotom hergestellt.

Da die großen Klemmschrauben, die zur Befestigung des Messers im Messerhalter dienen, bei der Ausbreitung der Schnitte störten, wurden sie später durch kleine kopfflose Messingschrauben ersetzt. In den Gefrierteller wurden einige die verschiedenen Stellungen der Messerschneide anzeigen den Linien eingeschnitten, um den Block stets so aufsetzen zu können, daß aus einem später zu erwähnenden Grunde eine Kante des Gewebsblockes parallel zur Messerschneide gerichtet werden kann. Im übrigen ist die Anordnung am besten aus der Abbildung zu er-

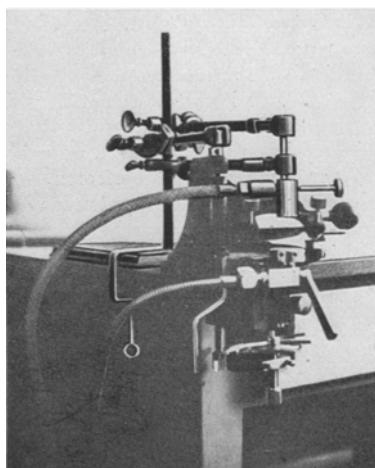


Abb. 1. Gefriermikrotom von *Leitz* mit einem zweiten zur Kühlung des Messers und der Schnitte aufgesetzten Gefrierapparat. (In dieser Abbildung sind die Klemmschrauben des Messerhalters noch nicht ausgewechselt.)

kennen. Der zweite Gefrierapparat wurde aus einer zweiten Kohlensäurebombe gespeist. Da die Herstellung guter Schnitte auch unter Anwendung dieser Verbesserungen noch ziemlich schwer ist und von einer ganzen Reihe von Kleinigkeiten abhängt, muß das Schneiden und die weitere Behandlung der Schnitte etwas ausführlicher beschrieben werden.

Der zu schneidende Gewebsblock wird möglichst nahe an der vorderen Kante des Gefriertisches aufgesetzt und so gerichtet, daß das Messer im Augenblick des Austretens aus dem Block mit seiner Schneide parallel zu einer Kante zu stehen kommt. Der Gefriertisch wird nun so weit gesenkt, daß das Messer frei über dem Block so weit nach vorne geführt werden kann, daß es von dem aus dem oberen Gefrierapparat austretenden Kohlensäurestrahl etwa in der Mitte getroffen wird. Messer und Gewebsblock werden dann unter Bedienung beider Gefrierapparate weit unter 0° abgekühlt. An dem durchgefrorenen Gewebsblock wird zur Schonung des Mikrotommessers zunächst mit einem Skalpell eine ungefähr ebene Schnittfläche angelegt, und erst diese wird mit dem Mikrotommesser selbst verbessert. Der Block wird am besten zunächst überfroren, damit nicht von dem noch zu weichen Gewebsmaterial von vornherein an der Messerschneide Bestandteile ankleben und anfrieren und sie dadurch zum Schneiden untauglich machen. Ist der Gewebsblock überfroren, so werden bei dem durch die zunehmende Erwärmung allmählich eintretenden Weicherwerden von Zeit zu Zeit Probeschnitte hergestellt; zwischendurch muß aber das Messer durch Bedienung des oberen Gefrierapparates häufig nachgekühlt werden. Wenn der Block noch zu hart ist, dringt die Schneide des Messers gar nicht in ihn ein, wird er etwas weicher, so können wohl Schnitte hergestellt werden, diese zeigen aber besonders an den Rändern parallel zur Messerschneide verlaufende und durch diese erzeugte feine Brüche. Erst bei noch weiterer Erwärmung folgt eine Periode, in der gleichmäßig dicke, glasig aussehende Schnitte abgenommen werden können. Wird der Block dann allmählich zu weich, so werden die Schnitte mehr gequetscht als geschnitten, die Schnitte sehen rauh und trübe aus und die Blockoberfläche erscheint nicht mehr wie poliert, sondern sie sieht samtartig oder sogar unregelmäßig rauh aus. Eine bestimmte Härte läßt sich genau wie beim gewöhnlichen Gefrierschneiden von fixiertem Material nicht angeben, weil der Eigenhärte des Gewebes auch die Härte des vereisten Gewebsblockes und damit die Temperatur entsprechen muß; je härter das Gewebe selbst ist, je härter muß es gefroren werden und desto tiefer liegt die beste Temperatur für das Schneiden. Temperaturmessungen haben ergeben, daß dieses Optimum bei weichen Geweben (Gehirn, Leber) zwischen -15 und -20° , bei härteren Geweben, besonders auch wenn diese stark von Fettgewebe durchsetzt sind, zwischen -25 und -30° liegt. Befindet man sich beim Schneiden in dem für das betreffende Gewebe günstigen Temperatur- bzw. Härtebereich, was am Schnitt und am Block in der besprochenen Weise erkannt werden kann, so wird der zu verwendende Schnitt nicht bis zum Ende abgeschnitten, sondern das Messer wird etwa 1—2 mm vor der Blockkante angehalten. Der nunmehr meist ziemlich eng an der Messerkante eingerollt liegende Schnitt wird mit einem weichen, völlig trockenen Pinsel auf das kalte Messer hinauf abgerollt. Dieses Abrollen muß sehr schnell geschehen, damit sich der noch gefrorene Schnitt nicht über 0° erwärmt und in sich zusammenklebt; liegt er dagegen erst einmal dem Messer ausgebrettet an, so wird er vom kalten Messer weiter gekühlt und man kann in Ruhe einzelne Falten und noch eingeschlagene Ecken ausbreiten. Dann erst wird der Schnitt unter leichter Fixation mit dem Pinsel völlig abgeschnitten.

Für die Überführung des Schnittes vom Messer auf einen Objektträger gibt es eine ganze Reihe von verschiedenen Möglichkeiten, die sich bei den wechselnden Bedingungen von seiten des Materials oder äußerer Einflüsse, wie z. B. Temperatur und Luftfeuchtigkeit im Arbeitsraum, verschieden gut anwenden lassen. Zum Einarbeiten in die Methodik dürfte es sich am meisten empfehlen, so vorzugehen, wie es auch bei der Ausbildung des Verfahrens geschah, den Schnitt nach dem Ausbreiten vorsichtig durch Bedienung des oberen Kohlensäureapparates nachzufrieren. Dann kann ein Objektträger zwischen Schnitt und Düse des oberen Gefrierapparates eingeschoben und durch kurzes, aber ausgiebiges Ausströmenlassen von Kohlensäure an einem Ende unter 0° abgekühlt werden und der evtl. auch jetzt noch einmal kurz nachgefrorene Schnitt kann ohne weiteres mit dem Pinsel auf den an die Messerschneide herangeführten Objektträger herübergeschoben werden. Auf diesem taut er erst an, wenn er bis an die Grenze des gefrorenen Teiles des Objektträgers geschoben wird, und es kann ein ganz gleichmäßiges Ankleben des Schnittes an das Glas besonders gut dadurch erreicht werden, daß der senkrecht nach unten gehaltene Objektträger, nachdem der Schnitt an einer Kante angeklebt ist, möglichst schnell von dieser Kante her aufgetaut wird.

Auf diese Weise gelang es, von allen Organen und mindestens 1 qcm großen Blöcken 15 μ dicke Schnitte herzustellen; viele Organe, wie z. B. Leber, Niere, lassen sich leicht auch noch dünner schneiden. Wie gut die Gewebe bei Anwendung dieser Methode dargestellt werden, zeigen die verschiedenen im folgenden gezeigten Vergleichspräparate (s. die Abb. 7, 11, 18, 20, 25 und 30), und sie beweisen, daß die Methode ein so günstiges Ausgangsmaterial herzustellen erlaubt, daß auch feinere Untersuchungen ausführbar erscheinen. Die Möglichkeit, auch mit diesem Verfahren gewöhnliche histologische Präparate herstellen zu können, ist ein außerordentlicher Vorteil, weil es so möglich ist, unmittelbar aufeinanderfolgende Schnitte einerseits chemisch, andererseits unter Anwendung üblicher Färbungsverfahren untersuchen und dadurch auf das genaueste vergleichen zu können. Hierauf muß ganz besonderer Wert gelegt werden, weil bei dem zunächst noch gänzlich ungewohnten Anblick der mikroskopischen Aschenbilder nur dauernde Vergleiche mit *unmittelbar* benachbarten und färberisch verarbeiteten Schnitten zeigen können, welchen Strukturen im gewöhnlichen histologischen Bild die Aschenformationen entsprechen. Diese Methode ist deshalb auch für allgemein histologische Untersuchungen anwendbar und unter Umständen vorzuziehen; hierüber sowie auch über weitere Anwendungsmöglichkeiten dieses Verfahrens soll an anderer Stelle berichtet werden.

Die erfolgreiche Anwendung dieser Art der Schnittherstellung wird manchmal durch gelegentlich auftretende Schwierigkeiten erschwert, daher müssen noch einige Besonderheiten und die Beseitigung gelegentlich auftretender Störungen besprochen werden. Da das Gewebe für die vorliegenden Untersuchungen nicht mit Wasser in Berührung kommen durfte, sprang der trocken auf den Gefriertisch aufgesetzte Gewebsblock sehr leicht ab; deshalb wurde der Gefriertisch vor dem Aufsetzen des Blockes mit etwas abgesonderter Gewebsflüssigkeit be-

tupft oder es wurde mit einem Spatel etwas von dem gleichen Gewebe verrieben. Bei faserigen Geweben, besonders bei der Muskulatur, die in einer Richtung sehr wenig Zusammenhang besitzen, muß der Block so aufgesetzt werden, daß die Schneide des Messers quer zum Faserverlauf steht; sonst reißt der Schnitt beim Abrollen zu leicht auseinander. Freie Oberflächen, auf deren Betrachtung im Schnitt besonderer Wert gelegt wird, stellt man ebenfalls quer zur Messerschneide, weil beim Abrollen und Abschneiden der Schnitte die beiden der Messerkante parallel laufenden Seiten leichter beschädigt und oft auch in der Dicke etwa ungleich werden. Sehr empfindliches und schlecht zusammenhängendes Gewebe kann nach Ausbreitung auf dem Messer durch zunächst vorsichtiges, dann aber energisches Nachkühlen mit Kohlensäure mit einem Kohlensäureschneehaufen bedeckt werden; durch diesen werden solche Schnitte so verstärkt und kühl gehalten, daß sie ohne weiteres sogar auf einen warmen Objektträger herübergeschoben werden können. Die Objektträger müssen äußerst sorgfältig gereinigt werden, weil die Asche an nicht völlig reinen Flächen sehr leicht abplatzt. Die feinere Struktur der Gewebe bleibt nicht nur um so besser erhalten, je dünner die Schnitte sind (*R. E. Liesegang*), sondern auch je schneller die Schnitte getrocknet werden. Diese wurden deshalb, soweit sie für die Veraschung bestimmt waren, sofort nach dem Auftauen über einem mäßig stark brennenden Bunsenbrenner getrocknet, was etwa 5 Sekunden dauerte. Um in den verschiedenen Aschenpräparaten die Aschenmengen durch Schätzung vergleichen zu können, wurden alle Gewebe gleichmäßig $15\text{ }\mu$ dick geschnitten; um diese Dicke mit Sicherheit zu erhalten, wurde bei entsprechender Einstellung des Mikrotoms nicht jeder gut erscheinende Schnitt verwendet, sondern erst wenn vorher 2—3 gleich dicke und gut erscheinende Schnitte hergestellt waren, wurde der nächste verwendet. Die Kontrolle, ob die Temperatur des Messers stets unter 0° liegt, erfolgt im Winter, wenn keine aus der Luft sich niederschlagenden und gefrierenden Wassertropfchen den Kältegrad von selbst anzeigen, durch einen weit außerhalb des Schneidebereichs aufgesetzten Wassertropfen, der stets gefroren gehalten werden muß. Im Sommer ist das Arbeiten mit dieser Methode außerordentlich viel mühsamer als im Winter. Daran ist neben der höheren Temperatur besonders die höhere Luftfeuchtigkeit die Ursache: sie schlägt sich, besonders bei schwüllem Wetter, in solchen Mengen an den kalten Teilen nieder, daß die Schneide des Messers durch das sich an ihr bildende Eis immer wieder schnell eingehüllt und dadurch stumpf wird. Auch auf der Oberfläche des Messers bilden sich lockere Schneeeüberzüge, an denen die Schnitte sehr leicht anfrieren, und sogar auf den Schnitten selbst schlägt sich Wasser nieder, besonders wenn Schnitt oder Objektträger mehrfach nachgekühlt wurden. In diesem sich niederschlagen-

den Wasser werden anorganische Bestandteile gelöst und so stark verschoben, daß dies nach der Veraschung manchmal schon makroskopisch zu erkennen ist. Unter solchen Umständen ist besondere Übung und allerschnellstes Arbeiten erforderlich, und es muß auf alle Erleichterungen, wie z. B. Nachfrieren der Schnitte, verzichtet werden. Dann bewährte sich oft am meisten, die schnell ausgebreiteten Schnitte dadurch auf den Objektträger zu überführen, daß derselbe von oben an den auf dem Messer liegenden Schnitt herangeführt wurde. Wenn der Schnitt den warmen Objektträger an einer Stelle berührt, klebt er sofort an und zieht sich völlig glatt an das Glas heran. Ganz besonders störend wirkt auch der leiseste Luftzug, weil er das Auftauen der Schnitte außerdentlich beschleunigt.

Die zu histologischen Vergleichspräparaten bestimmten Schnitte wurden nicht über der Flamme getrocknet, sondern in noch feuchtem Zustand in Formalindämpfen fixiert; dies ist schon in einigen Minuten der Fall, und damit die Schnitte nicht austrocknen, werden sie entweder gewässert und in der gewünschten Weise weiter verarbeitet oder aber zur Aufbewahrung in etwa 2 proz. Formalin überführt. Ein Aufkleben der Schnitte ist weder bei den zu färbenden noch bei den zu veraschenen Schnitten nötig, da die Eiweißkörper des Gewebes ja in unfixiertem Zustand auf das Glas kommen und erst auf diesem gefällt werden.

Die Veraschung der Schnitte erfolgte in einem vom Institutsmechaniker gebauten und schon von *Tschopp* benutzten elektrisch geheizten Quarzröhrenofen, dessen Temperatur durch einen vorgeschalteten Widerstand geregelt werden konnte, unter Durchleitung von angefeuchtetem Sauerstoff. (Über die Höhe der Temperatur s. S. 18.)

Die Betrachtung der Aschenbilder erfolgte im auffallenden Licht bei etwa 25—100facher Vergrößerung. Der Kondensor wurde durch ein unter den Objektträger gelegtes Stückchen schwarzen Glanzpapiers ausgeschaltet; durch einfaches Fortziehen und Wiedereinschieben des Papierstreifens konnten die Aschen ohne Wechsel des Gesichtsfeldes auch im durchfallenden Lichte betrachtet werden. Die Betrachtung im durchfallenden Lichte erfolgte bei allen Schnitten, um festzustellen, ob die Veraschung vollständig war; Kohlereste waren so leicht zu erkennen. Da die Aschen nur ohne jede Bedeckung in allen Feinheiten zu erkennen sind, wurde auf ein Bedecken oder Übergießen mit Äthercelloidinlösung, wie es von *Liesegang* und auch von *Tschopp* angewandt wurde, verzichtet. Dieses konnte um so eher geschehen, weil die aus nach dem geschilderten Verfahren hergestellten Schnitten gebildeten Aschen wesentlich besser am Glas haften als es bei eigenen Vergleichen und nach den Angaben des Schrifttums bei vorhergehender Formolfixierung der Schnitte der Fall ist. Eine bloße Erschütterung, wie sie nach *Policard* und *Tschopp* genügt, um die Aschen zu verlagern, ist nunmehr ohne

jeden Einfluß. Die Aschen sitzen im Gegenteil so fest, daß ein leichtes Herüberwischen wohl Schrammen und kleine Beschädigungen, niemals aber eine völlige Verlagerung der Asche verursacht. Waren die Schnitte dagegen vor der Veraschung nur gewässert, so hielten die Aschen auch von dünnsten Schnitten außerordentlich viel schlechter. Die Aufbewahrung der Aschenpräparate muß in einem Exsiccator erfolgen, weil einzelne Aschenbestandteile Wasser aufnehmen, dabei umkristallisieren und sich verlagern oder auch zerfließen.

Die photographischen Aufnahmen wurden mit einer Reichertschen Aufsatzcamera hergestellt; zur Scharfeinstellung auf der Mattscheibe wurde die Asche möglichst stark mit einer Bogenlampe beleuchtet. Da jedoch hierbei eine starke Überstrahlung die Aschenstruktur viel größer erscheinen ließ, wurde bei der Aufnahme selbst mit einer 300-Wattlampe belichtet; diese war vor dem Objekttisch so aufgestellt, daß die etwa 15 qcm große Leuchtfläche 10 cm vom Präparat entfernt war und daß das Licht unter einem Winkel von 10—15° auf das Präparat fiel. Alle Aufnahmen wurden mit der gleichen bzw. bei verschiedenen Vergrößerungen mit der der Lichtstärke des anderen Systems entsprechenden Belichtungszeit hergestellt, um den durch die gleiche Schnittdicke aller Präparate ermöglichten Überblick über die Aschenmenge auch in der Photographie zum Ausdruck zu bringen. Hierbei mußte bei geringem Aschengehalte darauf verzichtet werden, durch längere Belichtung die feineren Aschenveränderungen in einer den Feinheiten der Präparate entsprechenden Weise darzustellen. Andererseits zeigte sich aber, daß die quantitativen Unterschiede in der Aschenmenge in den Aufnahmen viel deutlicher erschienen als nach der Betrachtung mit dem Auge geschätzt wurde. Für die Aufnahmen wurden Agfa-Kontrastplatten verwendet; doch stellte sich heraus, daß für eine völlig einwandfreie Darstellung der Aschenmengen orthochromatische Platten verwendet werden müssen, weil die Aschen oft leicht bläulich (s. a. S. 27 und Abb. 16) oder bräunlich gefärbt sind.

Beobachtungen über den Verlauf der Veraschung.

Da die Frage, wie sich die Gewebsschnitte bei der Veraschung verändern und unter welchen Bedingungen evtl. Verschiebungen im Gefüge der Gewebe auftreten, von ganz besonderem Interesse und ausschlaggebender Bedeutung für den Wert der Methode der Schnittveraschung ist, wurde dieser Frage besondere Aufmerksamkeit zugewendet. Um den Einfluß der Erwärmung und der dann folgenden Verkohlung der Schnitte festzustellen, wurden die Schnitte zwischendurch öfter aus dem Ofen genommen und unter dem Mikroskop betrachtet oder es wurde die zur vollständigen Veraschung im Ofen nötige Aufenthaltszeit bei mehreren gleichen Schnitten fortschreitend verkürzt, so daß verschiedene

Vorstadien der Veraschung erhalten wurden und unmittelbar miteinander verglichen werden konnten. Ein solcher Vergleich ist ohne weiteres möglich, weil die Verkohlung in den verschiedenen Geweben und verschiedenen Bestandteilen der Zellen nicht gleichzeitig eintritt und auch verschieden schnell wieder verschwindet, so daß im durchfallenden Licht der wechselnde Kohlegehalt viele strukturelle Einheiten erkennen läßt.

Bei vorsichtigem Erwärmen auf ungefähr 100—150° zeigt zuerst das Bindegewebe eine Veränderung. Es wird besonders in seinen hyalin

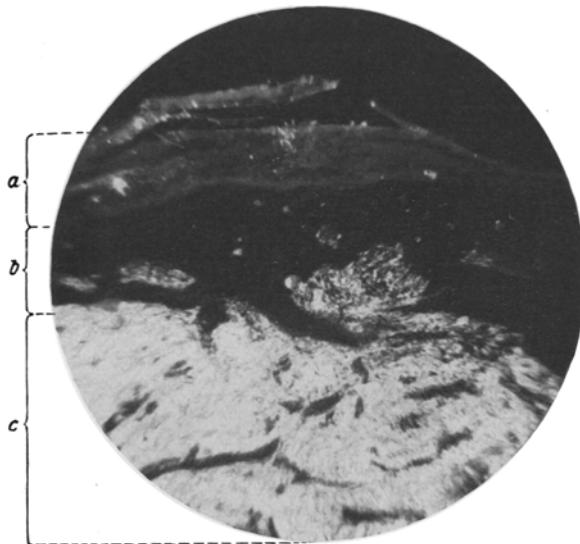


Abb. 2. Haut. Hochgradig hyalinisiertes Bindegewebe der Unterhaut aus der Umgebung eines Geschwürs. Aufnahme im polarisierten Licht, Doppelbrechung der hyalinen Fasern (c) infolge Luftaufnahme beim Erwärmen auf etwa 150°. Das Epithel (b) zeigt keine, das Horn (a) geringe Doppelbrechung.

veränderten Abschnitten trübe und undurchsichtig, so daß es sich schon makroskopisch aus dem Gewebe heraushebt. Im Polarisationsmikroskop (Abb. 2) zeigte sich dann, daß die vor dem Erwärmen bereits andeutungsweise vorhanden gewesene Doppelbrechung des Bindegewebes wesentlich stärker geworden war, während die Doppelbrechung des Horns z. B. im Gegenteil geringer wurde. Dieser Gegensatz erweckte den Verdacht, daß es sich bei der Zunahme der Doppelbrechung gar nicht um eine echte Doppelbrechung handeln möchte, und eine genauere Untersuchung zeigte, daß jene durch eine beim Erwärmen eintretende Luftaufnahme der hyalinen Substanz vorgetäuscht wird. Beim Einschließen der Präparate in Balsam sah man nämlich viele kleinste Luftbläschen aus dem Bindegewebe herauskommen, zusammenfließen und sich im

Balsam lösen; danach war die Doppelbrechung verschwunden. Bei stärkerer Erwärmung verkohlen zuerst die bindegewebigen Teile des Schnittes, die Gefäßwände und nekrotische Massen. Aus dem Bindegewebe und besonders aus den Gefäßwänden quellen dabei teerartige Stoffe heraus, die sich zu kleineren und größeren Tropfen zusammenziehen. Erst bei noch stärkerem Erhitzen verkohlen die epithelialen und muskulären Anteile der Schnitte. Während die Bilder bei der zunehmenden Verkohlung dadurch nicht so klar erscheinen, daß der Eintritt der Verkohlung nicht nur von der Art des Gewebes, sondern auch von der vorhandenen Menge abhängt, sind bei der zurückgehenden Ver-

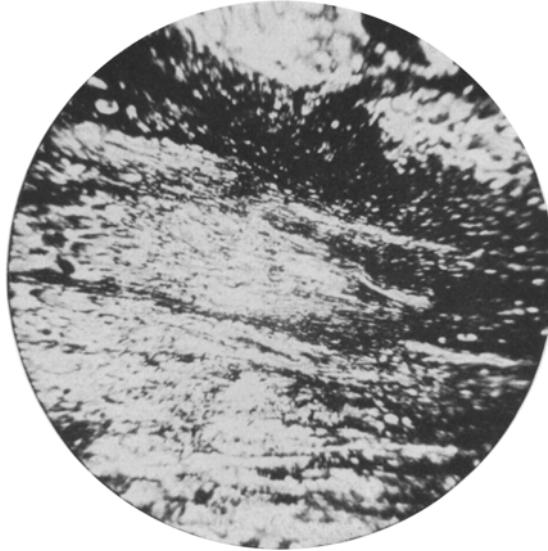


Abb. 3. Herzmuskel. Starke Schwielenbildung. Durchsichtsaufnahme eines verkohlten Schnittes bei zurückgehender Verkohlung. Muskulatur bereits fast kohlefrei, Bindegewebe bis in die feineren Fasern hinein noch sehr stark kohlehaltig (im Bilde schwarz).

kohlung Bilder zu beobachten, die an elektive Färbungen erinnern. Bei weiterem Aufenthalt der allmählich vollständig gleichmäßig verkohlten Schnitte im Ofen hellen sich nunmehr zuerst die muskulären und epithelialen Gewebsbestandteile durch Oxydation des Kohlenstoffes zu Kohlensäure auf. In der Muskulatur ist im Anfang dieses Stadiums die Querstreifung oft deshalb außerordentlich deutlich, weil die isotrope und anisotrope Substanz die Kohle nicht gleichzeitig abgibt, und es sind abwechselnd schwarze, noch stark kohlehaltige und gelbliche, fast kohlefreie Querbänder zu sehen. Das Bindegewebe und die Gefäße sind in diesem Stadium noch sehr stark kohlehaltig, so daß Bilder entstehen, wie sie bei den Versilberungsmethoden des Bindegewebes auftreten (Abb. 3). In den Epithelien bleiben die Kerne besonders lange kohle-

haltig, was schon von *Liesegang* und *Policard* beobachtet und auf die Phosphorverbindungen bzw. auf die Pyrrole der Kernsubstanz zurückgeführt wurde; das zeigt die Abb. 4 an einem Nierenpräparat. Diese Abbildungen zeigen also, daß bei der Verkohlung und kurz vor der vollständigen Veraschung, wie in Abb. 4, die Struktur der Gewebe und der Zellen bis in die feinsten Einzelheiten hinein erhalten geblieben ist, und wir dürfen feststellen, daß auch am veraschten Material feinere Untersuchungen über die Elementarbestandteile der Zellen möglich wären. Die Hauptgefahr für die Erhaltung der Gewebe liegt in der bei der Verkohlung entstehenden Bildung von teerartigen Tropfen, die,

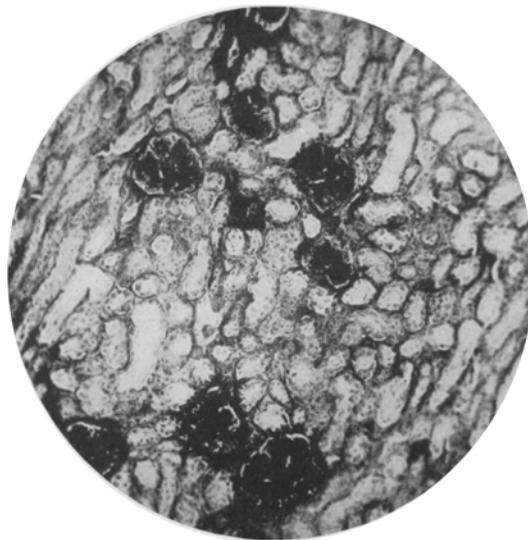


Abb. 4. Niere, Durchsichtsaufnahme eines verkohlten Schnittes kurz vor der vollständigen Veraschung; Gefäßwände, besonders in den Glomeruli, und Kerne noch stark kohlhaltig. Gewebsaufbau vorzüglich erhalten.

wie erwähnt, aus dem Bindegewebe herausquellen und zu größeren Tropfen zusammenlaufen. Diese Teerbildung hat auch schon *Policard* besondere Schwierigkeiten bereitet. Der Vergleich verschieden schnell verkohlter Schnitte zeigte nun, daß diese Teertröpfchen um so stärker aus dem Gewebe herausquellen und um so stärker zu größeren Tropfen zusammenflossen, je höher die Temperatur bei der Verkohlung war, je plötzlicher sie erfolgte. Sie konnte dadurch weitgehend zurückgehalten werden, daß die Verkohlung im Anfangsteil des Ofens bei einer Temperatur von nur 100—150° langsam vorgenommen wurde. Die Zerstörungen durch die Teerbildung sind im Aschenbilde sehr groß; in dem Teer sind Aschenbestandteile gelöst, die bei dem Zusammenlaufen und bei der dann folgenden Kontraktion der hochviscösen Massen verlagert

und in kleineren Bezirken angehäuft werden. Im Aschenbild stellen diese sich dann als aschereiche, runde Scheibchen dar, in denen die Asche zudem besonders leicht abplatzt.

Die Präparate wurden im durchfallenden Licht auf die vollständige Veraschung hin geprüft, ob noch Kohlereste in den Schnitten enthalten waren, und unter Umständen nochmals in den Ofen gebracht. Um die Veraschungstemperatur feststellen und gleichmäßig erhalten zu können, wurde an der Stelle des Ofens, an der bei der Veraschung der Objektträger, bzw. der auf diesem liegende Schnitt sich befand, ein Thermoelement eingebaut. Dieses war mit einem Galvanometer verbunden, das gestattete, die Temperatur direkt in Graden abzulesen. Es zeigte sich nun, daß bei einer Temperatur von 450 bis höchstens 500° die vollständige Veraschung nach etwa 20 Min. eingetreten war. Eine stärkere Erhitzung bis zu leichter Rotglut der Quarzröhre (600—700°), wie sie von *Policard* und *Tschopp* angewandt wurde, war unnötig, und sie wurde besonders vermieden, weil viele Beobachtungen zeigten, daß bereits über 500° eine deutliche Verminderung der Aschenmenge eintritt. Die besseren Ergebnisse bei einer gegenüber den Erfahrungen der erwähnten Forscher wesentlich geringeren Verwaschungstemperatur scheinen auf zwei Ursachen zurückzuführen zu sein; es wurde nämlich beobachtet, daß einerseits nur wenig dicke Schnitte wesentlich schwerer zu veraschen waren und daß andererseits bei fixierten Geweben die vollständige Veraschung bei der in diesen Untersuchungen angewandten tieferen Temperatur überhaupt nicht zu erzielen war.

Wenn wir die erzielten *methodischen Ergebnisse* überblicken, so ergibt sich, daß das ausgearbeitete neue Verfahren des Gefrierschneidens von unfixiertem Material die bisher nicht vorhandene Möglichkeit gibt, von tierischen und menschlichen Geweben für chemische Untersuchungen geeignete und vor allem genügend dünne Schnitte herzustellen. Die direkte Übertragung der Schnitte von dem Mikrotommesser auf Objektträger gelang durch Erhaltung des Gefrierzustandes der Schnitte bis zum Antauen auf der Unterlage mit Hilfe eines für diesen Zweck angebrachten zweiten Gefrierapparates. Eine forlaufende Überwachung der Verbrennung ergab, daß der Gewebsaufbau in der Schnitttasche bis in feinere Einzelheiten der Zellen hinein erhalten bleibt, wenn die Schnitte nach dem Antauen auf dem Objektträger in einer Flamme schnell getrocknet werden und wenn die Verkohlung nicht bei der Veraschungstemperatur, sondern bei etwa 150° langsam und schonend vorgenommen wird. Es ergab sich weiter, daß bei Verwendung derartig dünner und erst auf dem Objektträger durch Erhitzen fixierter Schnitte eine ganze Reihe von Schwierigkeiten, die frühere Untersucher gehindert hatten, verschwinden; so haftet die Asche dieser Schnitte ohne Klebemittel so fest, daß die unbedeckte Asche bei einigermaßen vorsichtiger Behand-

lung nicht nur nicht abfällt, sondern sogar — wie im folgenden gezeigt wird — beim Eintauchen in Wasser in ihren unlöslichen Bestandteilen nicht abgespült wird. Außerdem konnte aus dem gleichen Grunde die Veraschungstemperatur wesentlich herabgesetzt werden, und da sich diese Herabsetzung wegen eines Verlustes leichter flüchtiger Substanzen bei einer Verbrennungstemperatur von über 500° sogar als notwendig herausstellte, wurde zwecks Überwachung der Temperatur ein Thermoelement eingebaut.

So gelang es Aschenbilder herzustellen, die auch die Ausführung viel feinerer Untersuchungen, als sie heute möglich sind, gestatten würden.

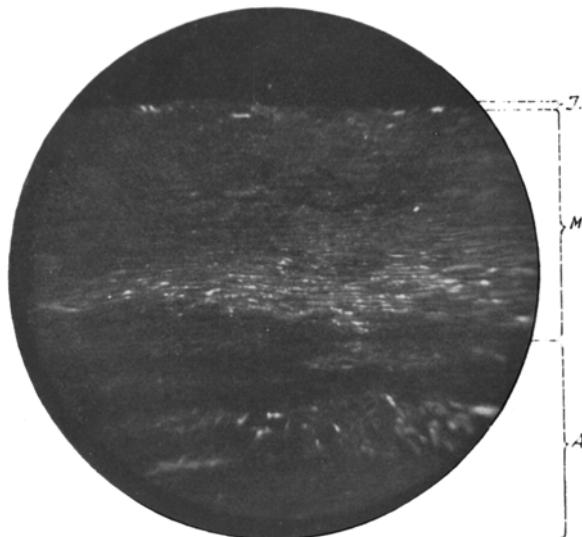


Abb. 5. Brustaorta, ♀ 27 Jahre. Aschenbild. Leichte Vermehrung der Gesamtasche in den tieferen Schichten der Media. In dieser wie auch in den folgenden Abbildungen bedeutet *J* = Intima, *M* = Media und *A* = Adventitia.

Untersuchungen an Aschenbildern über die Veränderungen im Gesamtaschengehalt.

Wie es bei der ersten Anwendung neuer Methoden stets der Fall sein wird, mußte ein großes Material aus den verschiedensten Organen und unter den verschiedensten pathologischen Bedingungen gewissermaßen abtastend untersucht werden, da bei Beginn der Untersuchungen jeder Anhalt fehlte, in welcher Richtung Befunde zu erwarten waren. Dabei fielen starke Veränderungen in der Verteilung und Menge der Gesamtaschen vor allem am Gefäßsystem auf, und es soll deshalb zuerst über diese Beobachtungen berichtet werden.

Bei Neugeborenen findet sich in der Aorta und in den großen Beckenarterien sehr wenig Asche, es sind nur feine, in leichten Wellen verlau-

fende rein weiße Aschenstreifen zu erkennen, die sich von einem ganz zart bläulichen Grunde abheben. Die Menge dieser Aschen ist in allen Abschnitten der Aorta und auch in den Beckenarterien die gleiche. Beim Säugling ist der Aschengehalt ähnlich, doch eher etwas geringer als beim Neugeborenen, besonders erscheint der Grund der Präparate zwischen den rein weißen Aschenstreifen, die den elastischen Fasern entsprechen, oft rein schwarz und somit fast aschefrei. Auch bei einem 2 Jahre alten Kinde (S. 382/28, Tod an Pneumonie nach Masern) fand sich noch der gleich geringe Aschengehalt wie beim Säugling. Aus den folgenden beiden Jahrzehnten konnte bisher noch kein Material

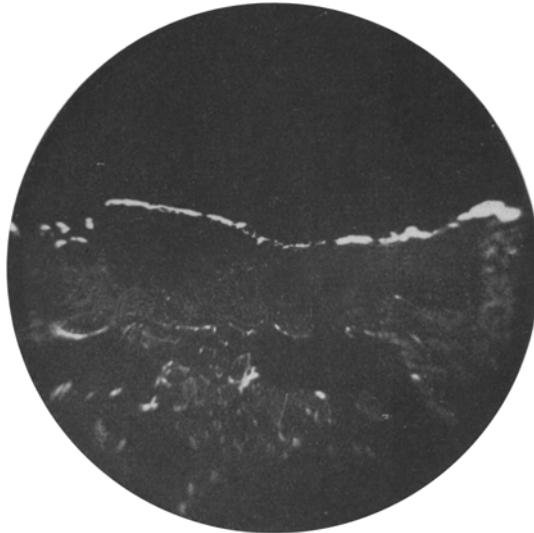


Abb. 6. Arteria femoralis, ♀ 27 Jahre. Aschenbild. In der Intima eine hochgradige Ablagerung von reinweißen Aschen.

untersucht werden. Bei einer 27jährigen Frau (S. 401/28), die an einer chronischen Lungentuberkulose starb und deren Gefäßsystem makroskopisch ausgesprochen unterentwickelt erschien, war aber der Aschengehalt in der Aorta im ganzen noch nicht größer als bei den untersuchten Kindern. Nur stellenweise fanden sich in den tieferen Mediaschichten zwischen den regelmäßig verlaufenden zarten Aschen der elastischen Fasern kleine, ebenfalls rein weiße, zum Teil zwischen, zum Teil an den Fasern liegende Ablagerungen (Abb. 5).

Ein sehr auffälliges Bild zeigte im Gegensatz zu der Aorta die ausnahmsweise untersuchte Arteria femoralis, in der die Intima im Aschenbild durch eine breite, rein weiße, wechselnd dicke Aschenlinie sowohl auf Längs- wie auf Querschnitten dargestellt wurde (Abb. 6). Ein mit Hämatoxylin gefärbtes Vergleichspräparat zeigte nur vereinzelt kleinste

blau dargestellte Kalkablagerungen zwischen den vielfach aufgesplitterten elastischen Lamellen der Elastica interna; die Größe des Unterschiedes in der Darstellung der Veränderungen zeigt am besten der Vergleich mit der Abb. 7, bei der es sich um eine Durchsichtsaufnahme von einem, dem veraschten benachbarten, mit Hämatoxylin gefärbten Gewebsschnitt handelt. In diesem finden sich keine dem Aschenhilde entsprechenden Ablagerungen, sondern zwischen den teilweise aufgesplitterten elastischen Lamellen finden sich nur ganz vereinzelt kleine, durch ihre starke Blaufärbung als Kalk gekennzeichnete Einlagerungen. Im übrigen war die Intima und besonders auch die Elastica frei von



Abb. 7. Arteria femoralis, Hämatoxylin-Vergleichspräparat zu der Abb. 6. In diesem sind in der Intima nur kleine vereinzelte Kalkherde zu erkennen.

allen Einlagerungen, doch erschien diese verdickt und sie verlief nicht wie gewöhnlich in weichen Wellen, sondern sie war vielfach scharf eingeknickt und aufgesplittert, als ob sie sehr brüchig gewesen wäre.

Mit zunehmendem Alter fand sich in den untersuchten Aorten eine mäßige, wenn auch deutlich erkennbare Zunahme des Aschengehaltes; diese Vermehrung betrifft aber nicht alle Abschnitte der Aorta gleichmäßig, sondern sie ist — wie schon mit bloßem Auge an gleichzeitig geschnittenen und auf dem Objektträger nebeneinanderliegenden Schnitten zu erkennen ist — in der Brustaorta am stärksten und nimmt zur Bauchaorta hin immer mehr ab, so daß sie dort wesentlich geringer oder überhaupt nicht mehr zu erkennen ist. Bei mikroskopischer Beobachtung ergibt sich, daß die Vermehrung hauptsächlich durch eine Aschenzunahme der elastischen Fasern hervorgerufen wird; im Gegen-

satz zu diesen rein weißen Aschenablagerungen findet sich zwischen den elastischen Lamellen eine, wenn auch geringere Vermehrung der leicht bläulichen Asche, die den Muskelfasern zu entsprechen scheint.

Während die eben beschriebenen Veränderungen in weit voneinander entfernten Teilen der Aorta verschieden stark, in einem Schnitt aber völlig gleichmäßig ausgeprägt sind, fanden sich in dem gleichen Altersbereich manchmal auch mehr herdförmige und schwerere Veränderungen. Das Aschenbild 9 zeigt neben den erwähnten Verdickungen der elastischen Fasern eine unregelmäßig herdförmige Ablagerung rein weißer Asche in die zwischen den elastischen Fasern liegenden Zwischen-

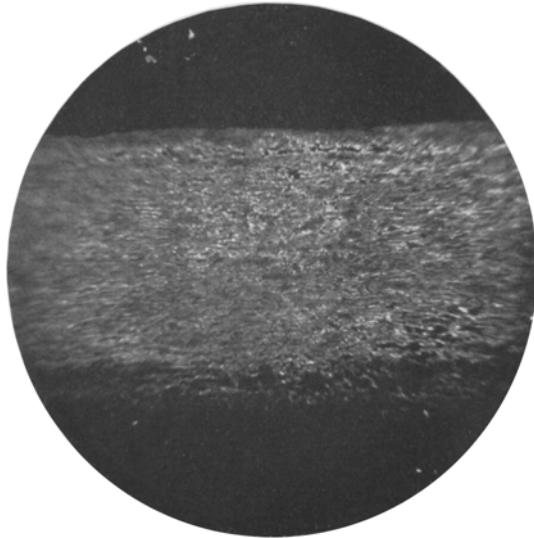


Abb. 8. Brustaorta, ♂ 47 Jahre. Aschenbild. Vermehrung der Asche in den elastischen Fasern.

räume, und diese ist vielfach so hochgradig, daß die Lücken völlig ausgefüllt werden. Das Präparat stammt von einem 41jährigen Manne, der bei einem verengendem Speiseröhrenkrebs infolge Inanition zugrunde ging (S. 332/28). Auch die Bauchaorta zeigte in diesem Falle eine Aschenvermehrung, doch war sie etwas geringer, so daß die erwähnte Abnahme der Aschenmenge nach unten noch deutlich war; die Arteria iliaca communis zeigte keine Aschenvermehrung mehr.

Eine nach Menge und Form ähnliche Aschenvermehrung fand sich auch bei einem 49 Jahre alten Manne, der an den Folgen eines komplizierten Oberarmbruchs bei Lebercirrhose starb (S. 400/28). In der Media der Brustaorta sind aber außerdem, besonders in dem an die Adventitia grenzenden Abschnitt, eigenartige Lücken im Aschenbild zu sehen, in denen sich keine Asche fand (Abb. 10). Diese Lücken sind

unscharf begrenzt, weil die den elastischen Fasern entsprechenden verstärkten Aschenstreifen allmählich zarter und schmäler werden. Während sie zum Teil völlig unterbrochen erscheinen, sind sie stellenweise jedoch auch in den Lücken, diese in ganzer Ausdehnung durchziehend, zu erkennen; sie haben nur einen derart geringen Aschengehalt, wie er sich in den Aorten von Kindern fand. Die Entstehung der Lücken konnte durch die Betrachtung eines Hämatoxylin-Vergleichspräparats erklärt werden (Abb. 11); an den entsprechenden Stellen finden sich feine Blutgefäße, die von den größeren Adventitiagefäßen aus in die Media eingewachsen sind.

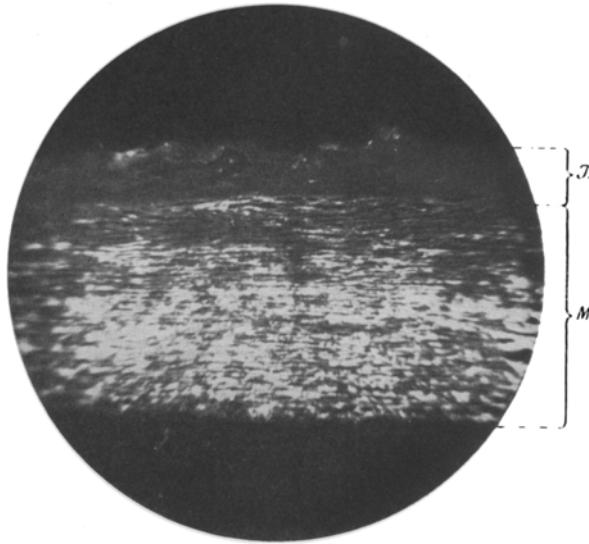


Abb. 9. Brustaorta, ♂ 41 Jahre. Aschenbild. Neben einer Vermehrung der Aschenmenge in den elastischen Fasern, sind herdförmige Einlagerungen auch in den den glatten Muskelfasern entsprechenden Zwischenräumen zu erkennen. (Intima leicht verdickt.)

Auch bei einigen Fällen mit schwersten Arteriosklerosen fanden sich in Schnitten aus verschiedenen der Umgebung schwerster Zerfallsherde entnommenen Wandstücken hochgradige Aschenansammlungen, ohne daß in gefärbten histologischen Präparaten diesen entsprechende Veränderungen zu beobachten gewesen wären. Es wurden absichtlich die dem Anschein nach wenig veränderten Teile untersucht, weil besonders daran lag, festzustellen, wie hochgradig die Aschenmengen zunehmen müssen, um auch mit Hämatoxylin darstellbar zu werden. Die Abb. 12 zeigt das Aschenbild eines Schnittes durch die Bauchaorta eines 87 Jahre alten Mannes (S. 358/28); hier liegen ganz außerordentlich große Mengen von Asche in der Media und auch in der Intima, so daß von der Zeichnung des Gewebes auf weite Strecken gar nichts zu erkennen ist.

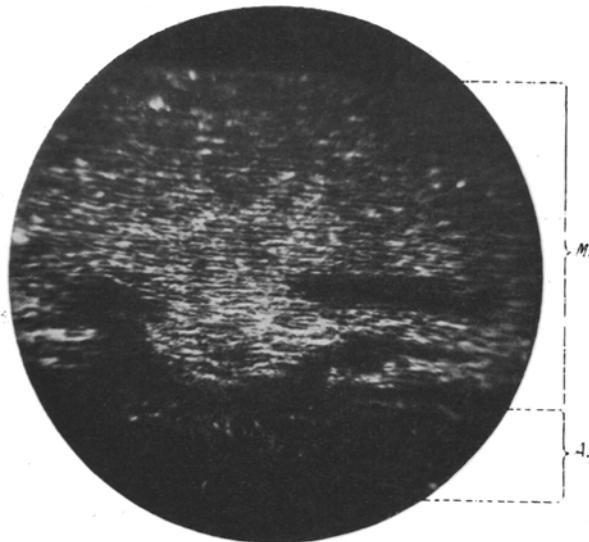


Abb. 10. Brustaorta, ♂ 49 Jahre. Aschenbild. Neben ähnlichen Aschenveränderungen wie in Abb. 9 finden sich Aussparungen, in denen die elastischen Fasern zum Teil fehlen, zum Teil aber weniger aschehaltig sind.

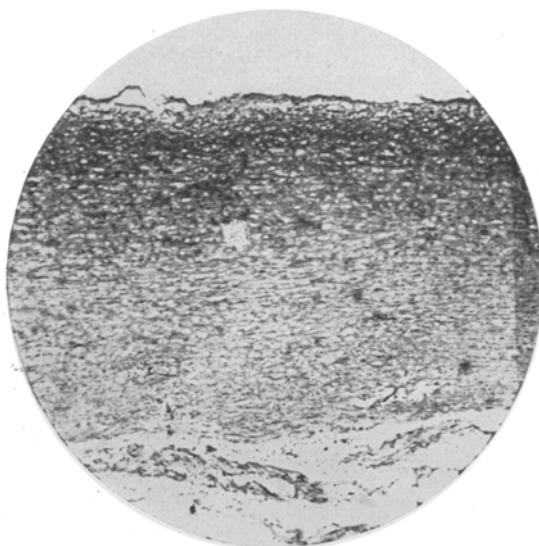


Abb. 11. Brustaorta, ♂ 49 Jahre.¹ Durchsichtsaufnahme eines Vergleichspräparates (Hämatoxylinfärbung) zu Abb. 10. An den den Lücken im Aschenbild 10 entsprechenden Stellen finden sich die auch im Präparat selbst kaum sichtbaren Vasa vasorum.

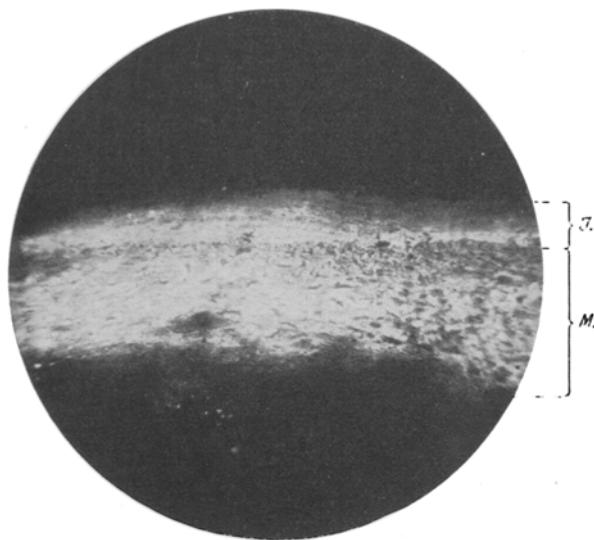


Abb. 12. Bauchaorta, ♂ 87 Jahre. Aschenbild. Sehr hochgradige Aschenanhäufung in der Media und in der verdickten Intima in der Umgebung arteriosklerotischer Herde.

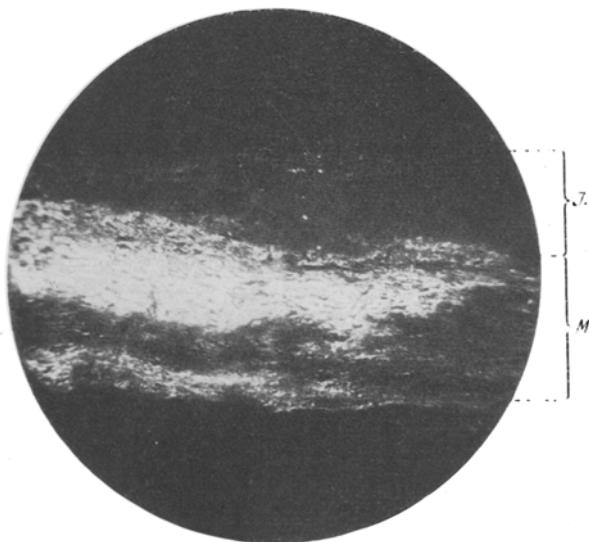


Abb. 13. Bauchaorta, ♂ 87 Jahre. Aschenbild. Aschenverteilung sehr unregelmäßig; Intima im Gegensatz zu Abb. 12 trotz stärkerer Verdickung sehr ascheinarm.

Im Hämatoxylinpräparat findet sich nichts von den Aschen dargestellt, soweit sie, wie in diesem Gesichtsfeld, rein weiß gefärbt sind. In diesem Falle war die Aschenverteilung in den verschiedenen untersuchten Schnitten außerordentlich verschieden; in der Abb. 13 ist z. B. die Intima sehr ascheinarm, obwohl sie viel stärker als in der Abb. 12 verdickt ist und unter diesen stärksten Verdickungen ist die Ablagerung sogar auch in der Media besonders gering. Auch in der Färbung der Asche bestanden auffällige Unterschiede. In größeren Aschenhaufen der Intima fanden sich scharf begrenzte Bezirke, in denen die Asche lebhaft rostbraun gefärbt war; bezüglich der Aschenmenge unterschieden sich

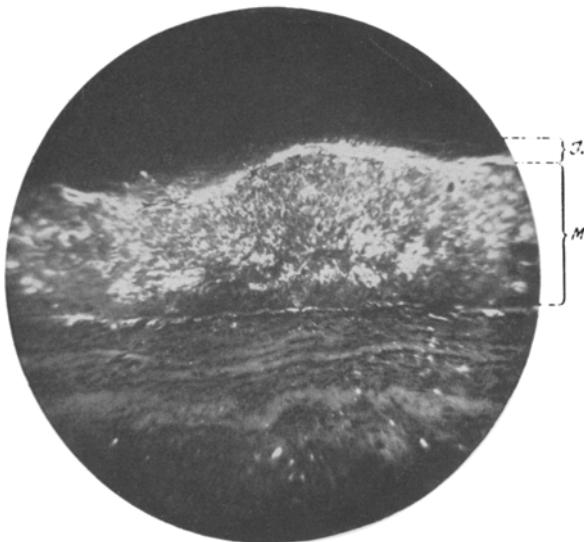


Abb. 14. Arteria iliaca interna, ♂ 77 Jahre. Längsschnitt durch die Wand.
Hochgradige Aschenablagerung.

diese Herde jedoch nicht von ihrer Umgebung. In den Vergleichspräparaten fanden sich an den entsprechenden Stellen mit Hämatoxylin blauschwarz gefärbte Einlagerungen, die in ihren Umrissen genau den rostbraun verfärbten Herden des Aschenbildes entsprachen.

In einem bezüglich der Veränderungen an der Aorta und in der Darstellbarkeit der Asche an den rostbraun verfärbten Bezirken dem vorhergehenden völlig entsprechenden Fall (S. 394/28, ♂ 77 J.) wurde auch eine Arteria iliaca untersucht. Der Vergleich der beiden Abb. 14 und 15 zeigt, daß die großen Mengen von Asche in der Intima plattenförmig und in der Media röhrenförmig um die Muskulatur herum abgelagert sind, so daß diese wie ummauert erscheint. Die Farbe dieser Asche war rein weiß, im Hämatoxylinschnitt fanden sich keinerlei erkennbare Veränderungen.

Auch in den Gefäßen der verschiedensten Organe finden sich Aschenablagerungen. Abb. 16 zeigt einen Teil der Wandung einer chronisch entzündeten Gallenblase (S. 379/28) mit einer sehr stark aschenhaltigen Arterie; der Kontrast ist in diesem Bilde nicht so groß, weil die Muskulatur der Gallenblasenwand ebenfalls mehr Asche enthält, und außerdem ist die Muskelasche infolge Verwendung nichttorthochromatischer Platten zu stark dargestellt, weil sie ungewöhnlich lebhaft blau-llich gefärbt war.

Besonders deutliche Veränderungen fanden sich weiter an den Nierengefäß. In einer hypertrophischen, von tuberkulösen Herden durch-

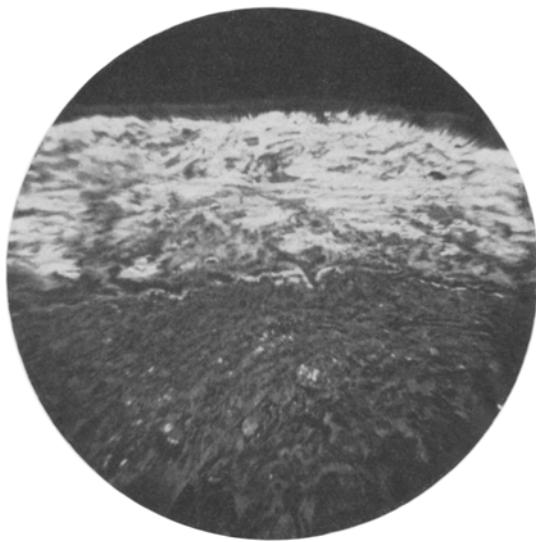


Abb. 15. Querschnitt von dem gleichen Gefäß wie Abb. 14.

setzten Niere (S. 396/28, Tod an Urämie bei tuberkulöser Sackniere der anderen Seite) sind in den verdickten Wänden mittelgroßer, auf der Grenze von Mark und Rinde verlaufender Arterien in der Intima reichliche, in der Media mäßige Mengen von weißer Asche abgelagert (Abb. 17). Neben diesen Gefäßen sind im Aschenbild noch kleine weiße Scheibchen zu erkennen; hier handelt es sich nicht um Kunstprodukte — wie sie etwa bei zu schneller Verkohlung entstehen —, sondern um bindegewebig umgewandelte Glomeruli, in denen sich Asche ablagert. Das zeigt der Vergleich des Aschenbildes mit dem histologischen Präparat, das die Abb. 18 wiedergibt; auf diesem sind an der entsprechenden Stelle mehrere, teilweise oder völlig hyalin umgewandelte Glomeruli zu erkennen. Zu diesem Bild ist noch besonders zu bemerken, daß sich im ganzen Präparat keine erkennbaren Konkrementablage-

rungen fanden; besonders sind die im Lichtbild zum Teil schwarz erscheinenden elastischen Fasern im Präparat glasklar, und sie erscheinen in der Aufnahme zum Teil nur deshalb dunkel, weil die starke Lichtbrechung an den beiden Rändern zu wenig Licht durchtreten lässt. Bei den im Aschenbild der Abb. 17 im Gefäßlumen erkennbaren Aschen handelt es sich ebenfalls nicht um Kunstprodukte, denn sie fanden sich in einem großen Teil der größeren Gefäße in allen Präparaten aus dieser Niere; sonst wurden im Gefäßlumen niemals Aschen beobachtet. Da der Tod in diesem Fall unter den Erscheinungen der Urämie erfolgte, liegt es nahe, einen Zusammenhang mit dieser anzunehmen. Die fol-

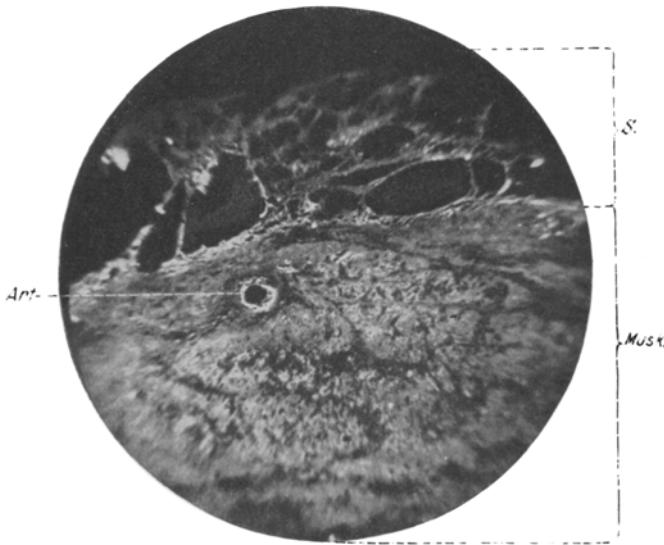


Abb. 16. Gallenblasenwand bei chronischer Cholecystitis. Aschenbild. In der Wand einer kleinen Arterie starke, in der Muskulatur mittelstarke Aschenvermehrung.

gende Abb. 19 zeigt die Veränderungen in der gleichen Niere an kleineren Gefäßen der Rinde und wiederum an den Glomeruli; hier verdient der Befund an dem Glomerulus, der noch gar nicht geschrumpft ist und nur eine doppelt konturierte, den Kapselblättern entsprechende Aschenablagerung zeigt, besondere Beachtung.

Am eindrucksvollsten sind die Gefäßveränderungen neben denen der Aorta aber am Uterus, wo sie bei der Rückbildung der Gefäße nach früheren Schwangerschaften zu beobachten sind. Die Präparate der Abb. 20—22 stammen aus einem Uterus, in dem die histologische Betrachtung der Media keinerlei Veränderungen erkennen ließ. Im Hämatoxylinpräparat (Abb. 20) findet sich nur in den elastischen Lamellen, die etwas verbreitert und zum Teil etwas aufgesplittet erscheinen, eine diffuse

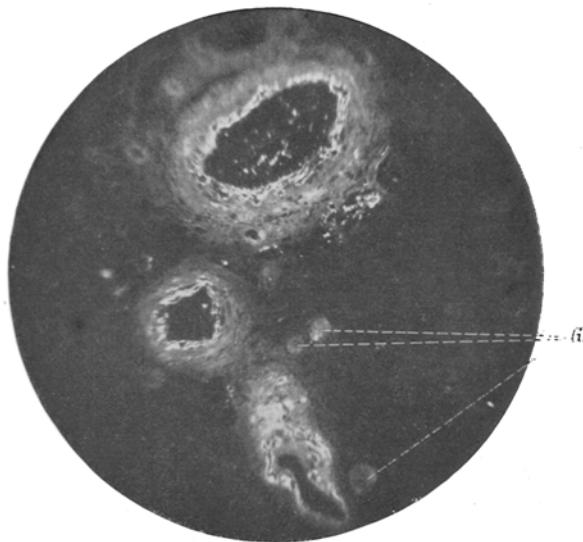


Abb. 17. Niere, ♂ 44 Jahre. Aschenbild. Starke Aschenanhäufung in der Intima, mittelstarke in der Media von Arterien; in verödeten Glomeruli (G) leichte Vermehrung der Asche.

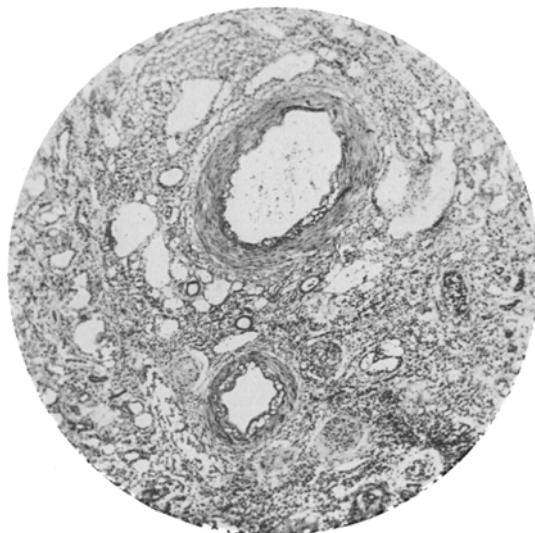


Abb. 18. Niere, Durchsichtsaufnahme eines dem vorhergehenden benachbarten Schnittes bei Hämatoxylinfärbung. Keine erkennbaren Einlagerungen in die Wandungen der Gefäße.

Blaufärbung, die auf eine mäßig hochgradige Ablagerung von Kalk bezogen werden muß. Im Aschenbild dagegen ist die ganze Media einschließlich der Elastica interna von zusammenhängenden, strukturlosen Aschenmassen erfüllt; außerdem ist die Intima und auch die Uterusmuskulatur durch eine leichte Vermehrung im Aschengehalt ausgezeichnet. Die gleichen Veränderungen finden sich (Abb. 22) an den mittelgroßen und sogar auch an den kleinen Arterien des Uterus, wie ein Ausschnitt aus demselben von einem dicht unter der Schleimhaut gelegenen Wandstück zeigt.

Aber nicht nur im Gefäßsystem, sondern auch in anderen Geweben finden sich ähnliche Anhäufungen von Aschenbestandteilen. Das zeigt

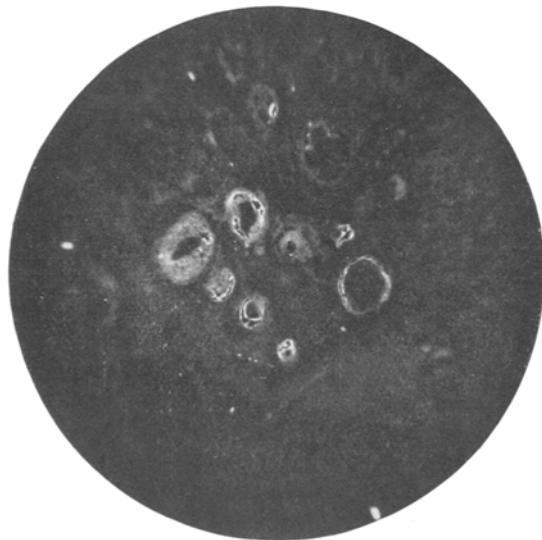


Abb. 19. Niere, ♂ 44 Jahre. Aschenbild. Starke Aschenanhäufung in der Wandung kleinerer Gefäße und in der Kapsel eines noch nicht geschrumpften Glomerulus (der doppelte Aschenring ganz rechts in der Abbildung).

z. B. besonders der Knorpel, und dieser zeigt auch bezüglich der Stärke der Veränderung in den verschiedenen Altersstufen ähnliche Schwankungen, wie wir sie an den Gefäßwänden gesehen haben. Beim Kinde enthält der Knorpel zwar schon reichlich Asche — er ist ja ein sehr aschereiches und z. B. das am stärksten natriumhaltige Gewebe des Körpers —, diese Asche ist aber völlig gleichmäßig auf die ganze Zwischensubstanz verteilt und rein bläulichweiß gefärbt. Beim Erwachsenen findet sich dagegen, auch wenn mit bloßem Auge keine Veränderungen am Knorpel zu erkennen sind, eine mehr oder minder hochgradige Anhäufung von rein weißer Asche neben den erwähnten bläulichen Aschen. Diese Ablagerungen fanden sich meistens in der Knorpelgrund-



Abb. 20. Uterus. Durchsichtsaufnahme eines Hämatoxylinpräparates. In den Arterien ist die Elastica interna infolge Kalkeinlagerung mäßig stark bläulich verfärbt.

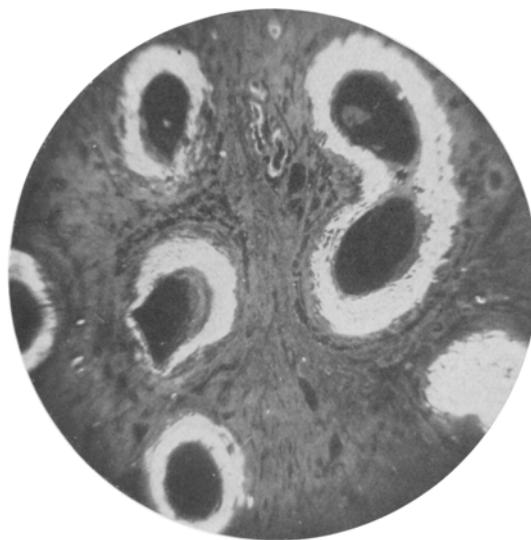


Abb. 21. Uterus, ♂ 47 Jahre. Aschenbild. Stärkste Aschenablagerungen in der Media der Arterien, leichtere in der zum Teil verdickten Intima und in der Muskulatur des Uterus.

substanz, manchmal aber auch, wie es die Abb. 23 zeigt, in den Knorpelzellen selbst. Es handelt sich hier um einen Bronchialknorpel bei chronischer Bronchitis, der außerdem von chronisch-pneumonischen Herden umgeben war (S. 316/28, Asthma bronchiale). Auch in diesem Falle liegen die meisten herdförmig abgelagerten Aschen in der Randzone des Knorpels, die Asche des Zwischengewebes ist gleichmäßig bläulichweiß gefärbt und nur ganz vereinzelt von weißen Aschen durchsetzt. Die Ascheeinlagerung in die Knorpelzellen war vielfach, und das zeigt auch das Lichtbild noch gut, nebeneinander in den verschiedenen Stadien dieses Prozesses zu sehen. Bei den am wenigsten veränder-

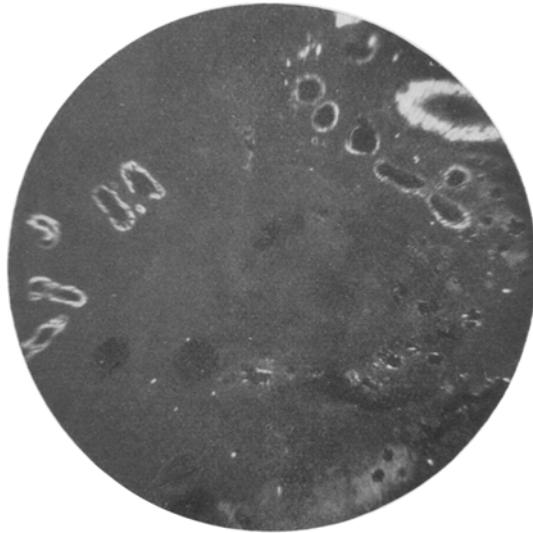


Abb. 22. Uterus, ♀ 47 Jahre. Aschenbild. Aschenanhäufungen auch in kleineren und mittelgroßen Arterien dicht unter der Uterusschleimhaut.

ten Knorpelzellen findet sich Asche nur in der äußersten, vom Kern am weitesten entfernten Zone des Plasmas, so daß oft sickelartige Aschenhaufen entstehen, wenn der Kern exzentrisch in der Zelle liegt. Lagert sich mehr Asche ab, wird der ganze Leib der Knorpelzelle ausgefüllt; der Kern bleibt aber am längsten ausgespart, und nur in ganz wenigen Zellen war auch er von Asche erfüllt. Stellenweise fiel bei Betrachtung der Kerne auf, daß in der Gegend, wo man die Kernkörperchen erwarten könnte, ein oder auch zwei rein weiß aufleuchtende Pünktchen zu erkennen sind. Gegenüber diesen Veränderungen der Knorpelzellen im Aschenbild fanden sich im histologischen Vergleichspräparat keinerlei Besonderheiten an den Knorpelzellen und im besonderen kein Anhalt dafür, daß hier eine Schädigung der Knorpelzellen die Ursache der Aschenablagerung sein könnte.

Die schwersten und ausgedehntesten Aschenablagerungen fanden sich bei der tuberkulösen Nekrose, bei der Verkäsung. Die geradezu ungeheuren Aschenmengen, die hierbei abgelagert werden, zeigt die Abb. 24. In diesem Bilde entsprechen die zusammenhängenden rein weißen, strukturlosen Aschen den das ganze Innere der Niere ausfüllenden käsigen Massen, und die schmale weiße, zum Teil unterbrochene Linie der schwielig verdickten und zum Teil ebenfalls verkästen Kapsel; das erhaltengebliebene Nierengewebe dagegen zeigt nur eine ganz leichte Vermehrung im Aschengehalt.

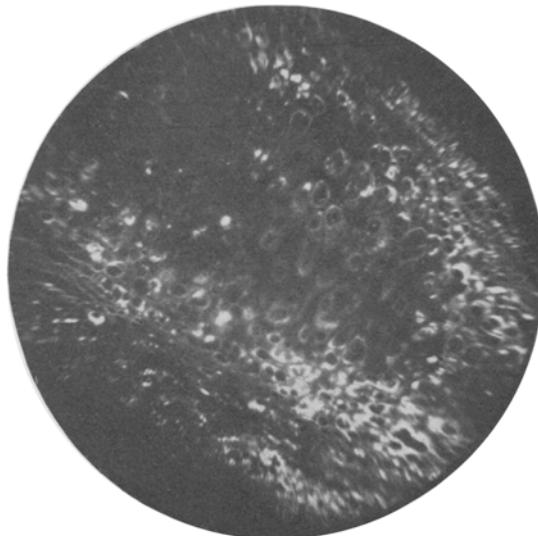


Abb. 23. Bronchialknorpel, ♂ 56 Jahre. Aschenbild. Im peripheren Abschnitt des Knorpels hochgradige, im zentralen mäßige Aschenablagerungen, hauptsächlich in das Protoplasma der Knorpelzellen.

Im Gegensatz zu derartigen alten käsigen Massen sind frische Verkäsungen sehr aschenarm; das zeigen die zarten, ringförmigen Aschenablagerungen in der frischen tuberkulösen Nekrose eines Lymphknotens im linken Teil der Abb. 26, die auf der Durchsichtsaufnahme eines Hämatoxylin-Vergleichspräparates (Abb. 25) von einem unmittelbar folgenden Schnitt infolge der fehlenden Färbbarkeit des Gewebes als helle weiße Scheibe zu erkennen ist. Diese beiden Aufnahmen sollen aber noch mehr zeigen. Im Hämatoxylinpräparat ist die tuberkulöse Nekrose von mäßig hochgradigen Kohleablagerungen umgeben; da die Kohle nun bei der Veraschung zu Kohlensäure oxydiert wird und entweicht, wäre zu erwarten, daß die kohlehaltigen Stellen im Aschenbild frei erscheinen würden. Statt dessen zeigt das Aschenbild an den vorher kohlehaltigen Stellen die gleiche Struktur als Asche, die vorher die Kohle

gezeigt hatte. Die Übereinstimmung zwischen beiden Präparaten geht bis in feinere Einzelheiten, so daß die Bilder sich fast wie das Positiv zum Negativ verhalten; doch fällt auf, daß die Aschenmenge etwas größer erscheint als die abgelagerte Kohlemenge.

Diese enge Beziehung zwischen Kohle und Aschenablagerungen fand sich in allen untersuchten Fällen und stets war die Aschenablagerung noch stärker, als man nach dem Kohlegehalt erwartet hätte, so daß bei Beginn der Kohleablagerung die Veränderung im Aschenbild viel auffälliger sich darstellt als im gewöhnlichen histologischen Präparat. Das zeigt z. B. ein Aschenbild aus einer im ganzen sehr kohle-

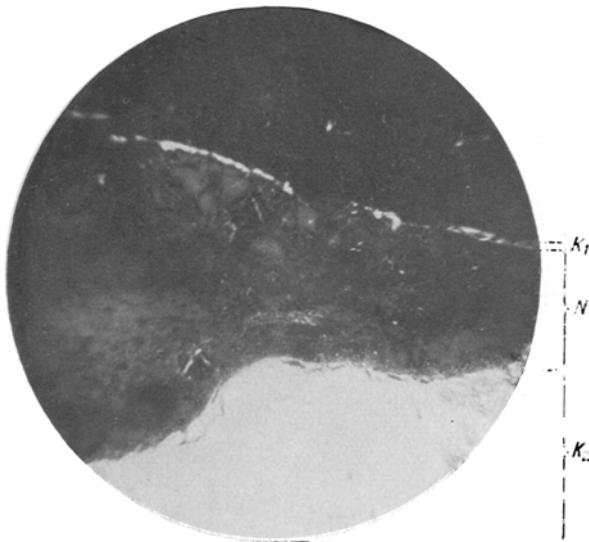


Abb. 24. Niere, ♂ 44 Jahre. Aschenbild. Hochgradigste Aschenablagerung im verkästen Inhalt (K_1) einer Sackniere; im Nierengewebe (N) selbst nur eine geringe Zunahme der Aschenbestandteile. Unter der Kapsel (K_2) ebenfalls sehr aschereiche Käsemassen.

armen Lunge, in der sich nur ganz kleine, weiche, subpleural gelegene sog. „physiologische“ Kohleherde fanden. Im histologischen Präparat war hier nur sehr wenig Kohle und gar keine Veränderung des Gewebes zu erkennen; im Aschebild (Abb. 27) findet sich dagegen schon reichlich rein weiße Asche, die in der gleichen zwickelförmigen Art abgelagert ist und an der Stelle der Vene die entsprechende Aussparung zeigt. Dieses Bild soll weiter zeigen, daß der Aschegehalt des normalen Lungengewebes so gering ist, daß er unter den angewandten Bedingungen im Lichtbild noch gar nicht dargestellt wird.

Während die Asche, die nach Verbrennen der Kohle an deren Stelle in Erscheinung tritt, im allgemeinen rein weiß gefärbt aussieht, war sie in einigen Fällen gelblich oder sogar rötlich-bräunlich verfärbt. Solche

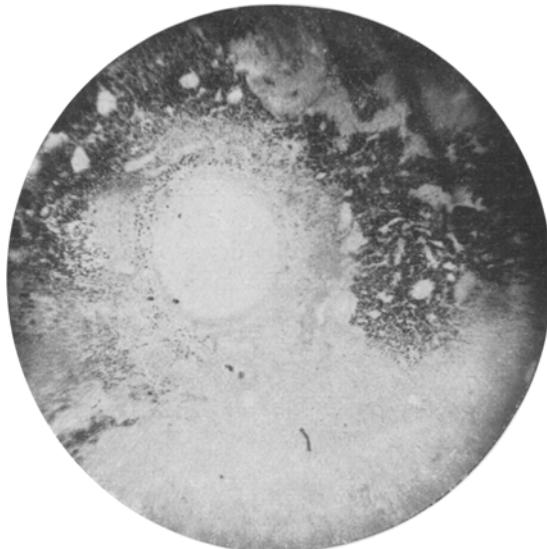


Abb. 25.

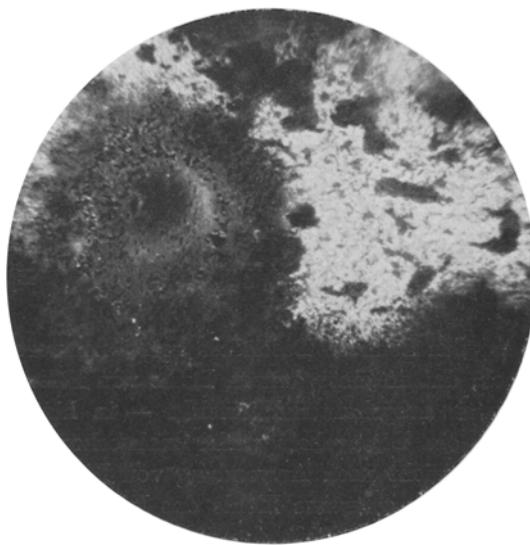


Abb. 26.

Abb. 25 und 26. Lymphknoten, ♀ 61 Jahre. Abb. 25 (oben) stellt eine Durchsichtsaufnahme von einem Hämatoxylinpräparat, Abb. 26 ein Aschenbild von einem unmittelbar benachbarten Schnitt dar. In der frischen tuberkulösen Nekrose sehr wenig Asche; im übrigen zeigen Kohle und Asche die gleiche Verteilung.

Verfärbungen der Asche fanden sich vereinzelt in allen untersuchten Lymphknoten und Lungen; sie waren am wenigsten ausgesprochen bei einer Reihe von Tuberkulosen, am stärksten, wenn eine Stauung vorhanden war oder ihr früheres Bestehen angenommen werden konnte. Besonders stark zeigten sie sich daher, abgesehen von einem Falle von Lebercirrhose, bei dem schon makroskopisch eine Braunfärbung vieler Gewebe auffiel, bei chronischen, mit Hochdruck verbunden gewesenen Nierenerkrankungen, bei Asthma bronchiale und bei einem ausgeheilten Herzfehler. Eine solche Aschenfarbe deutete ohne weiteres auf einen Gehalt an Eisen, der auch mit der Berliner-Blau- und Ammoniumreak-

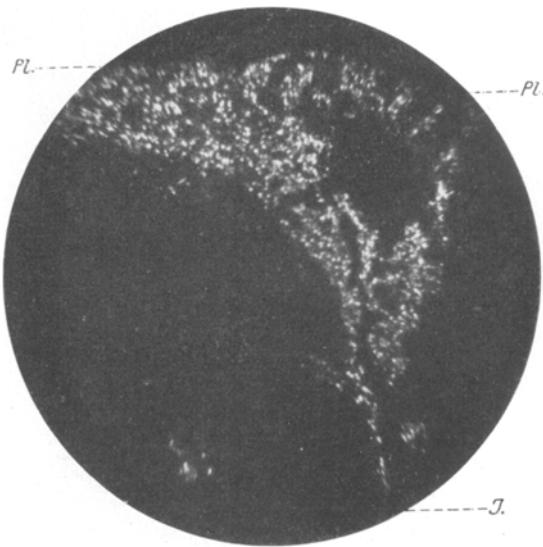


Abb. 27. Lunge, ♀ etwa 50 Jahre. Aschenbild. In einem subpleuralen kleinen Kohleherd nach der Verbrennung reichlich Aschenbestandteile; der Aschegehalt des normalen Lungengewebes ist bei der angewandten Dicke der Schnitte und der Belichtung bei der Aufnahme noch nicht dargestellt.
(*Pl* . . . *Pl* = Pleura; *I* = Interlobulärseptum.)

tion bestätigt werden konnte. Besonders bemerkenswert wurden diese Befunde dadurch, daß in einer ganzen Reihe von Fällen — besonders bei dem erwähnten ausgeheilten Herzfehler — in histologischen Vergleichspräparaten ein Eisengehalt weder makroskopisch noch mikroskopisch und auch nicht nach Anwendung von Eisenreaktionen nachzuweisen war, weil die schwarze Kohle das Eisen völlig verdeckte.

Gegenüber dem Aschengehalt der normalen Lunge, der, wie die vorhergehende Abbildung zeigte, so gering ist, daß er unter den angewandten Bedingungen noch nicht in der Lichtbildaufnahme dargestellt wird, fanden sich aber in einer ganzen Reihe von Lungen sowohl allgemeine wie auch herdförmige Veränderungen im Aschen-

bilde. In der Jugend, im mittleren Alter ist der Aschengehalt gering, bei schweren Tuberkulosen sogar deutlich vermindert; im hohen Alter kommt es dagegen zu hochgradigen Zunahmen. In der Abb. 28, die ein Aschenbild aus der Lunge eines 80jährigen Mannes zeigt, sind die Alveolarwände so aschereich und sie erscheinen so scharf konturiert, daß sie gar nicht einem zarten Lungengewebe, sondern eher einem Kalkskelett zu entsprechen scheinen. Aber diese in der ganzen Lunge gleichschwernen Veränderungen werden in der gleichen Lunge noch übertroffen durch die Aschenzunahme in einer kleinen atelektatischen Spitzennarbe (Abb. 29). In dieser ist das Lungengewebe nicht etwa zugrunde gegangen, sondern es ist, wie das histologische Vergleichspräparat be-

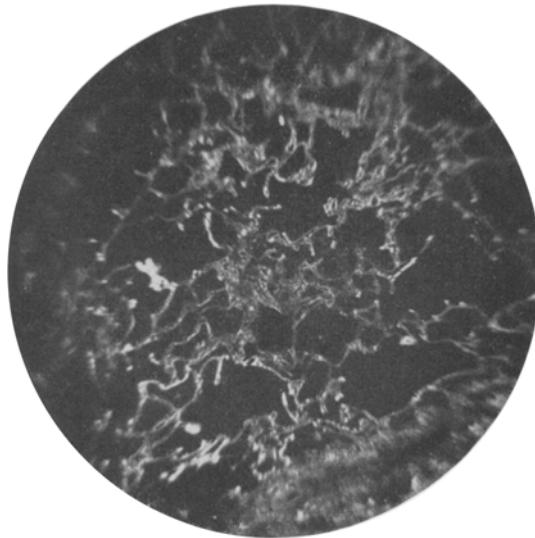


Abb. 28. Lunge; ♂ 80 Jahre. Aschenbild. In den nicht verbreiterten Alveolarwänden hochgradige Vermehrung der Aschenbestandteile.

sonders bei Färbung der elastischen Fasern zeigte, in allen Teilen erhalten und nur infolge des fehlenden Luftgehaltes zusammengedrängt worden. Die Vermehrung des Aschegehaltes ist also zum Teil durch die Zusammendrängung der Alveolarwände, außerdem aber auch ganz wesentlich dadurch bedingt, daß sie auch mehr Asche enthalten.

Aber nicht nur im Alter fanden sich Ascheablagerungen in der Lunge, sondern auch unter pathologischen Bedingungen bereits im mittleren Alter. So zeigt Abb. 30 den Rand eines chronisch-pneumonischen Infiltrats und diese Durchsichtsaufnahme eines Hämatoxylinpräparats zeigt, daß die Zeichnung des Lungengewebes infolge einer Verbreiterung der Alveolarwände und einer teilweisen Anfüllung der Alveolen mit in Organisation befindlichen Exsudatmassen sehr verwaschen ist. Das

zugehörige Aschenbild aber läßt den Aufbau viel deutlicher erkennen: infolge einer beträchtlichen Vermehrung der in den verbreiterten Septen abgelagerten Aschen ist der Verlauf der Alveolarwände hier gut zu verfolgen.

Bereits bei Beschreibung der Aschenveränderungen in den Gefäßwänden war bei der Gallenblase erwähnt worden, daß in dieser eine Aschenvermehrung auch in der Muskulatur vorgelegen hatte (Abb. 16); eine ähnliche Veränderung fand sich auch einmal in der quergestreiften Muskulatur, in einem von großen Schwielen durchsetzten Herzmuskel, dessen Aschenbild die Abb. 32 zeigt. In dieser zieht eine zwickelförmige

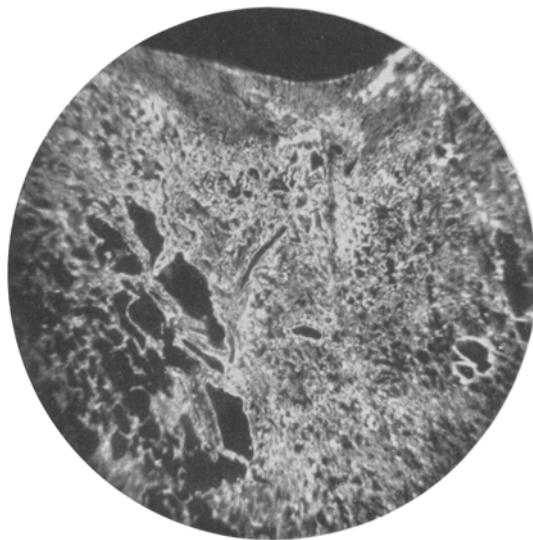


Abb. 29. Lunge, atelektatische Spitzennarbe aus der gleichen Lunge wie Abb. 28. Hochgradigste Vermehrung der Asche in den Wänden der kollabierten Alveolen.

Narbe in der Mitte links beginnend und nach rechts und rechts unten sich verbreiternd durch das Gesichtsfeld; die in ihr sichtbaren hellen Aschenflecken entsprechen stark gelb gefärbten eisenoxydhaltigen Aschenablagerungen. Am oberen Rande dieser Schwiele findet sich nun ein stärker aschehaltiger Streifen, der, wie das histologische Vergleichspräparat zeigte, einer Gruppe von großen, plumpe und chromatinreiche vergrößerte Kerne enthaltenden Muskelfasern entspricht.

Zuletzt muß noch erwähnt werden, daß auch am Epithel, wie z. B. in der Leber, Zunahmen des Aschengehalts beobachtet werden konnten; doch waren diese Veränderungen gegenüber den bisher gezeigten Aschenmengen zu gering, um bei der angewandten Schnittdicke und Belichtungszeit bei der Herstellung der Lichtbilder dargestellt zu werden.

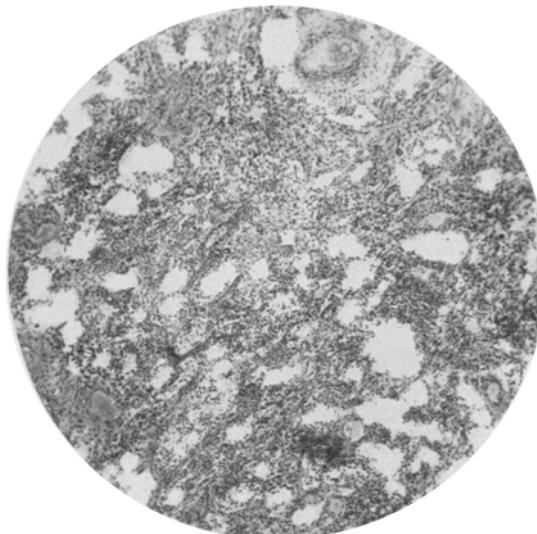


Abb. 30. Lunge; ♂ 56 Jahre. Durchsichtsaufnahme eines Hämatoxylinpräparates aus dem Randgebiet eines chronisch-pneumonischen Herdes.

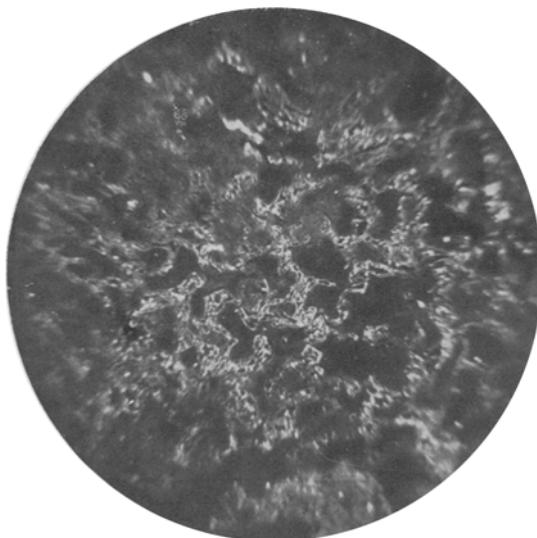


Abb. 31. Lunge, chronisch-pneumonischer Herd der Abb. 30. Aschenbild. Ablagerung von reichlichen Aschenmengen in den verbreiterten Alveolarsepten.

Besprechung der Befunde und Versuche zur Feststellung der einzelnen Aschenbestandteile.

Bei der Beschreibung der einzelnen Aschenbefunde wurden oft sehr naheliegende Deutungen absichtlich vermieden, weil die Erfahrungen

auf diesem neuen Gebiet noch zu geringe sind, um auch im Einzelfall eine sichere Deutung zu gewährleisten. Eine große Zahl von sich aufdrängenden Fragen muß aus diesem Grunde weiteren in mancher Richtung bereits begonnenen Untersuchungen vorbehalten bleiben. Trotz aller gebotenen Zurückhaltung ergeben sich aber in vielen Fällen eine ganze Reihe von Gesichtspunkten.

Überblicken wir die Befunde, über die im vorhergehenden berichtet wurde, so lassen sich viele von ihnen danach gruppieren, ob die Aschenablagerungen in lebendes Protoplasma oder in gewissermaßen unbelebte Zwischensubstanz und abgestorbene Gewebsbestandteile hinein erfolgt

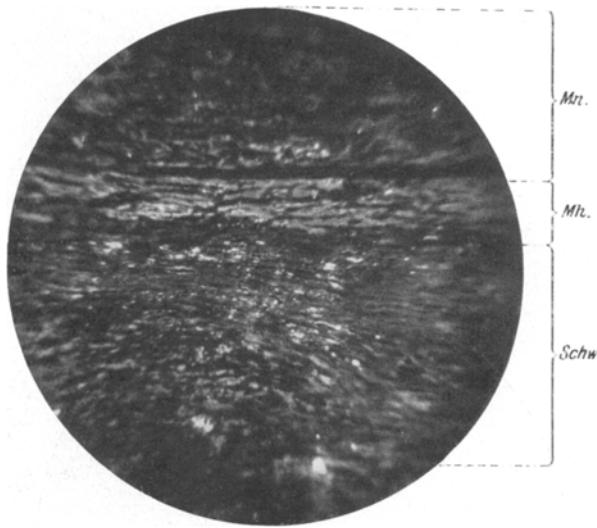


Abb. 32. Herzmuskelschwiele. Aschenbild. Vermehrung der Asche in einem schmalen, an eine Schwiele angrenzenden Muskelfaserstreifen (*Mh.*); Schwiele (*Schw.*) selbst aschearm, von hellgelben eisenhaltigen Ablagerungen durchsetzt. (*Mn.* normale Herzmuskulatur.)

ist. In der zweiten Gruppe finden wir die schwersten Veränderungen in alten tuberkulösen Nekrosen und in großen Zerfallsherden in der Intima der größten Arterien. Aber auch in noch mit dem Körper in engem funktionellen Zusammenhang stehenden Gewebsbestandteilen können Aschenvermehrungen erfolgen, so z. B. in vernarbendem Bindegewebe (hyalin umgewandelte Glomeruli), in die Knorpelgrundsubstanz und in das elastische Gewebe. In den beiden letzten Gewebsarten fällt eine besondere Beziehung zum Lebensalter auf: gegenüber einem sehr geringen Aschengehalt im jugendlichen Alter — bezüglich einem beträchtlichen Gehalt an rein bläulicher Asche im Knorpel — kommt es mit zunehmendem Alter zu einer immer stärkeren Ansammlung von rein weißer Asche. Derartige Zunahmen von Aschenbestandteilen sind

erst ganz kürzlich von *Bürger und Schlamka* mittels quantitativer Analysen z. B. für das Calcium beobachtet worden. Sie gingen von der Überlegung aus, daß Schlacken besonders in Geweben abgelagert werden müßten, die eine schlechte Gefäßversorgung besitzen; nach dieser gemeinsamen Eigenschaft fassen *Bürger und Schlamka* diese als bradytrophe Gewebe zusammen, und sie fanden an solchen Geweben, u. a. auch an der Aorta und am Knorpel, eine sehr hochgradige Zunahme des Calciumgehalts im Alter. Wie maßgeblich die Gefäßlosigkeit dieser Gewebe für das Zustandekommen der Ablagerungen ist, zeigt sehr schön die Abb. 11: in der Umgebung der Vasa vasorum wird die Aschenmenge geringer und fehlt sogar unmittelbar an den Gefäßen fast ganz. Auch in den Lungen kommt es im Alter, soweit bisher beobachtet, allerdings nur im höchsten Alter, zu starken Aschenvermehrungen, die zum Teil ebenfalls die elastischen Fasern betreffen. Ähnliche Veränderungen finden sich auch schon im mittleren Alter, dann aber nur, wenn schwere krankhafte Veränderungen in der Lunge vorhanden sind.

Während diese Aschenbefunde in gewissermaßen unbelebtem Material als Vorstufen der Verkalkung angesprochen werden können — wie weit es sich bei den Aschenmengen in unseren Befunden um Calcium handelt, wird noch besprochen werden — und sich damit in die Vorstellungen einfügen, die auf Grund der unzähligen histologischen Beobachtungen gebildet worden sind, finden sich in der anderen Gruppe Aschenablagerungen auch in lebenden Zellen. Das zeigen z. B. die Aufnahmen 33 an der Herzmusculatur, 17 an der Gallenblasenmusculatur und ganz besonders schön die Abb. 24 an Knorpelzellen. In diesem Falle bestehen die intracellulär abgelagerten Aschenbestandteile — wie im folgenden gezeigt werden wird — fast ausschließlich aus Calcium und da im histologischen Vergleichspräparat die Knorpelzellen gut färbar waren und keinerlei auf eine Schädigung deutende Veränderungen zeigten, muß angenommen werden, daß die Einlagerungen in die lebenden Knorpelzellen erfolgten. Auch in der Gallenblase und in dem Herzen waren die Muskelfasern gut erhalten, die Herzmuskelfasern erschienen sogar hypertrophisch. Zur Erklärung dieser Befunde können nur die Beobachtungen und Vorstellungen herangezogen werden, die *Freudenberg und György* über die Verkalkung in tierischen Geweben veröffentlicht haben. Diese glauben, daß es in den Geweben keine besonderen „Kalkfänger“ gibt, sondern daß alle Zellen gleichmäßig Kalk aufnehmen, von diesem sich aber nur durch ihre sauren kalklösenden Stoffwechselprodukte wieder befreien können. Wenn also der Stoffwechsel der Zelle darniederliegt, bleibt der Kalk in der Zelle liegen, sie verkalkt. In unseren Fällen sind wir nun ohne weiteres berechtigt, eine Schädigung der Zelle und damit ihres Stoffwechsels anzunehmen; in der Gallenblase bestand eine ausgedehnte chronische Entzündung,

auch der Knorpel war von chronisch entzündlichen Herden umgeben. Bei den aschereichen Herzmuskelfasern ist die Deutung jedoch nicht so einfach; es war aber aufgefallen, daß nur einige unmittelbar an die Schwiele grenzende Schichten von Muskelfasern mehr Asche enthielten. Wenn man nun berücksichtigt, daß der Zellstoffwechsel auch durch Verängerung der Funktion herabgesetzt wird, und da eine Funktion — in diesem Falle die Zusammenziehung der Faser — an der großen starren Schwiele unmöglich oder mindestens erschwert ist, so wäre auch hier möglich, den gleichen Mechanismus anzunehmen.

Nach diesen Ausführungen erscheinen die Gegensätze zwischen den beiden Gruppen von Aschenablagerungen — entweder in unbelebtes Gewebe oder in Zellen mit herabgesetztem Stoffwechsel — gar nicht mehr so groß und sie sind ja auch durch alle Übergänge und Kombinationen miteinander verbunden. Auch die unbelebten Teile des Gewebes, die kollagenen und die elastischen Fasern, sind von Zellen umgeben, deren Stoffwechselprodukte das ganze Gewebe durchdringen und somit auch die Zwischensubstanzen von Schlacken befreien können. In diesem Zusammenhang liegt die Bedeutung der Gefäßversorgung vor allem darin, daß bei ihrem Fehlen die zugehörigen Gewebsbezirke schlecht ernährt werden und somit von allen Geweben des Körpers an erster Stelle in ihrer Funktion zurückgehen und am frühesten Schlackenbestandteile einlagern werden.

Die bisher besprochenen Veränderungen an Gesamtaschenbildern ergaben eine ganze Reihe von lehrreichen Befunden, sie bedürfen aber dringend der Ergänzung durch Bestimmung der einzelnen Elementarbestandteile und ganz besonders beschäftigte uns die Frage, woraus die rein weißen Aschen bestehen, die den Hauptteil der beobachteten Aschenansammlungen ausmachen.

Nur bei einem einzigen Element liegen außerordentlich günstige Umstände vor, beim Eisen. Soweit bisher beobachtet wurde, werden alle Eisenverbindungen des Körpers bei der im Sauerstoffstrom vorgenommenen Veraschung oxydiert und in die höhere rotgefärbte Oxydationsstufe des Eisens, in Fe_2O_3 , überführt. Damit ist das Eisen je nach den vorhandenen Mengen gelb, gelbrot oder rot dargestellt und schon *Policard* versuchte diese verschiedenen Färbungen zu benutzen, um die vorhandene Menge abzuschätzen.

Auch im übrigen sind die Aschen, wie mehrfach erwähnt wurde, nicht rein weiß; im Knorpel findet sich z. B. besonders in der Jugend eine ausgesprochen bläulich gefärbte Asche, und da der Knorpel das natriumreichste Gewebe des Körpers ist, liegt die Annahme sehr nahe, daß die Natriumsalze der Asche blau gefärbt sind. Auch *Policard* hoffte aus der Aschenfarbe eine Schätzung bezüglich der Elementverteilung ermöglichen zu können. Spricht gegen diese Möglichkeit bereits die Tatsache, daß keins der in Frage kommenden Salze blau gefärbt ist, so zeigten in verschiedenen kleinsten Konzentrationen eingedampfte

Natrium-, Kalium-, Calcium- und Magnesiumumsalze, daß bei allen diesen Salzen übereinstimmend die Färbung nur von der Konzentration abhängt. Doch wird auf diesen Punkt noch zurückzukommen sein.

Die Einzeldarstellung der Elementarbestandteile der Asche muß deshalb auf mikrochemischem Wege erfolgen; auf diesem sind aber außerordentliche Schwierigkeiten noch zu überwinden. Wenn wir überlegen, daß in einem 1 qcm großen und $15\ \mu$ dicken Schnitt durchschnittlich $1/2\ mg = 500\ \gamma$ Aschenbestandteile zu erwarten sind und daß diese schon an und für sich geringfügige Menge gewissermaßen nicht als Ganzes zur Verfügung steht, sondern nur mit dem auf das betreffende Element entfallenden Bruchteil und vor allem bei einer bis hinab zu Zellen erstrebten Lokalisierung nur mit dem dieser Fläche entsprechenden Anteil. Es leuchtet ein, daß nur ganz wenige Reaktionen eine derartige Empfindlichkeit besitzen werden, und wenn zudem die Auswahl der Reaktionen weiter beschränkt wird, weil nur solche angewendet werden dürfen, bei denen die Umsetzung augenblicklich und möglichst ohne Bildung kristallinischer Reaktionsprodukte erfolgt, weil bei dieser Verschiebungen auftreten, und da endlich das Reaktionsprodukt auch gefärbt sein muß, um unter dem Mikroskop erkennbar zu werden, so wird die ungewöhnliche Schwierigkeit klar.

Gegenüber derartig großen Hindernissen liegen die Verhältnisse aber in Schnitten von pathologisch veränderten Organen wesentlich günstiger; das zeigt schon der Vergleich zwischen Aschenbildern von normalen und veränderten Gewebsschnitten. Das Aschenbild des normalen Gewebes ist — selbstverständlich mit Ausnahme des Knochens — sehr zart und bezüglich der Aschenmenge fast völlig kontrastlos, die Aschen der verschiedenen Gewebsbestandteile liegen nebeneinander, wie die völlig gleichgefärbten Steine eines Mosaiks. Das Aussehen von Aschenbildern veränderter Organe zeigen die zahlreichen Abbildungen und es ist ohne weiteres zu sehen, daß es unter pathologischen Bedingungen zu geradezu ungeheuren Vermehrungen des Aschengehalts kommen kann. Für die vermehrt abgelagerten Aschen liegen die Möglichkeiten des Nachweises entsprechend ihrer Zunahme günstiger. An solchen Aschenbildern wurde deshalb die Verteilung von Natrium, Kalium und Calcium nachzuweisen versucht.

Für den Nachweis des Kaliums steht eine in der quantitativen Mikrochemie und in der Histotopochemie an nativem Schnittmaterial besonders von *Macallum* ausgebildete und angewandte Methode zur Verfügung. Die etwas schwierige Darstellung des Reagens wurde auf eine Anregung von *Tschopp* hin durch Lösung des Natrium-Kobaltihexanitrits in Essigsäure vereinfacht; beim Zusatz des absoluten Alkohols fällt das Reagens aber meist wieder aus, durch langsames Zusetzen des Alkohols unter stetem Umrühren konnte das Ausfallen jedoch verhindert werden.

Das Fehlen einer brauchbaren Methode zur *Darstellung des Natriums* wird in der Histo-Topochemie sehr lebhaft empfunden, doch scheint die in der quantitativen Mikroanalyse gebräuchliche Caesium-Wismut-methode, wie eine Reihe von Versuchen zeigte, gut anwendbar zu sein. Die Überführung des Kobalts bezüglich des Wismuts in das Sulfid erfolgte bei beiden Methoden mit Schwefelammonium.

Die beiden, hauptsächlich an Schnitten von dem Uterus mit den beschriebenen Gefäßveränderungen angewandten Reaktionen ergaben nun fast genau das gleiche Bild; nur bei genaueren Vergleichen fanden sich ganz kleine Besonderheiten bei der einen oder anderen Reaktion. Daß hier Störungen vorliegen, etwa durch Adsorption des Reagens an die großen Oberflächen der Aschen, konnte mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden; es bleibt nur die Annahme, die ja auch aus ganz allgemeinen chemisch-physikalischen Überlegungen am wahrscheinlichsten erscheint, daß die Natrium- und Kaliumverbindungen sehr gleichartig verteilt sind.

Zum *Nachweis des Calciums* wurde zunächst ebenfalls die Methode von *Macallum* verwandt, doch versagte sie an der Asche völlig; wohl bildeten sich die Gipskrystalle, aber sie bildeten sich sehr langsam und wuchsen allmählich zu großen langen Nadeln aus, so daß die in der Asche vorhanden gewesene Lokalisation völlig zerstört war, der Erfolg der Reaktion bestand in einem wirren Durcheinander von Krystallnadeln. Es wurde darauf die Hämatoxylinreaktion angewandt; über den Mechanismus dieser Reaktion, die als zuverlässig gilt, war merkwürdigerweise in den einschlägigen Werken nichts zu finden, *Romeis* erwähnt sie gar nicht, und *Weil* z. B. bemerkt nur, daß eine Täuschung möglich ist, weil auch Eisen die Reaktion gibt. Es zeigte sich nun, daß bei Anwendung einer alkoholischen Hämatoxylinlösung in der Asche nur die Teile blau dargestellt wurden, die in der Asche mehr oder minder gelbrot gefärbt, also eisenhaltig waren.

Diese Beobachtung erweckte die Vermutung, daß das Eisen bei der Kalkreaktion eine wesentliche Rolle spielt. Deshalb wurde im Reagensglas eine Reihe von Versuchen angestellt. Zunächst zeigten diese, daß Calciumlösungen mit Hämatoxylin keinen Niederschlag bilden, es tritt nur bei Zusatz der gelben alkoholischen Hämatoxylinlösung eine Rotfärbung auf; auch aus gesättigten Calciumlösungen erfolgt keine Fällung, es färbt sich der ungelöste Bodenkörper nur ebenfalls rot. Auf der anderen Seite bildete die gleiche Hämatoxylinlösung mit Eisen, wie bekannt, im Laufe von einigen Stunden einen kleinen schwarzen Niederschlag. Wurde nun aber die Hämatoxylin-Calcium- und die frisch gemischte Hämatoxylin-Eisenlösung zusammengegeben, so entstand, am besten bei etwa gleichen Mengen von Hämatoxylin und Eisen, zunächst eine stahlblaue Verfärbung und nach 15—20 Min. ein voluminöser blau-

schwarzer Niederschlag, der um ein vielfaches mächtiger war als der Hämatoxylin-Eisenniederschlag. Es mußte angenommen werden, daß die Fällung des Calciums nicht durch Hämatoxylin selbst erfolgt, sondern durch den entstandenen Hämatoxylin-Eisenlack. Da nun bekannt ist, daß Hämatoxylin auch mit anderen Metallen Lacke bildet, mußte, falls die Lackbildung der wesentliche Faktor ist, die Fällung auch durch andere Metalllacke erfolgen; das war in der Tat sowohl mit den beiden Oxydationsstufen des Eisens als mit Kupfer und Aluminium der Fall. Es mußten nur die Mengenverhältnisse so gewählt werden, daß Hämatoxylin und das betreffende Metall im gleichen Verhältnis zugegen waren; der Farbenumschlag erfolgte beim Aluminium dann vom karmoisinrot der Aluminium-Hämatoxylinlösung in das gleiche leuchtende stahlblau. Diese Reaktion erfolgt nun weiter nicht mit Calcium allein, sondern genau so mit den übrigen Erdalkalien und sogar auch mit den Alkalien.

Aus diesen Versuchen ergibt sich für den Nachweis des Calciums mit Hämatoxylin folgendes: Hämatoxylin allein ändert die Löslichkeitsbedingungen des Calciums in keiner Weise, sind so große Calciummengen in den Geweben, daß sie von den verschiedenen Flüssigkeiten nicht gelöst worden sind, mit denen die Schnitte in Berührung gekommen sind, so werden solche Kalkkonkremente violett gefärbt; das ist ja auch manchmal zu beobachten. Ist das in den Geweben vorhandene Calcium jedoch eisenhaltig, so entsteht bei der Einwirkung von Hämatoxylin die blauschwarze Hämatoxylin-Eisen-Kalkfällung und es kann von dem bisher ungelösten Calcium nichts mehr in Lösung gehen. Daß die übrigen Erdalkalien und Alkalien diese Reaktion ebenfalls geben, ist bei den Bedingungen histologischer Färbungen bedeutungslos, weil alle Salze dieser Metalle so leicht löslich sind, daß sie längst ausgezogen sind, bevor die Schnitte ins Hämatoxylin kommen.

Der Nachweis, daß die *großen Mengen der abgelagerten rein weißen Aschen aber wirklich im wesentlichen aus Calcium bestehen*, konnte dann auf einem ganz anderen Wege geführt werden. Die Tatsache überhaupt, daß derartig große Mengen von Salzen in den Geweben angehäuft werden, spricht dafür, daß es sich um sehr schwer lösliche Salze handelt; derartig schwer lösliche Salze finden sich aber nur unter den Calciumsalzen. Es wurde nun der Versuch gemacht, die gleiche Eigenschaft, die zur Ablagerung geführt hatte, auch für die *Darstellung* des Calciums zu benutzen: die Aschen wurden mit 10 ccm destilliertem Wasser ausgezogen, ein dann evtl. noch vorhandener Rückstand konnte nur aus Calciumsalzen bestehen. Den Erfolg einer solchen Extraktion mit Wasser zeigt die Abb. 34; es handelt sich um das gleiche Aschenpräparat wie in der Abb. 22, das nach Herstellung dieser Aufnahme angehaucht, kurz über einer Flamme getrocknet und 10 Min. mit Wasser (Aqua dest.) ausgezogen wurde. Der Vergleich der beiden Präparate zeigt, daß die

zarten bläulichen Aschen völlig verschwunden sind; dagegen sind die massigen weißen Aschen in den Gefäßwänden völlig erhalten geblieben, und deshalb muß es sich bei diesen Aschen um Calciumsalze handeln. Denn 10 ccm destilliertes Wasser lösen etwa 600 mg Natriumcarbonat, 500 mg Kaliumcarbonat, 700 mg Kaliumsulfat und 3000 mg Natriumsulfat; dagegen lösen sich in der gleichen Menge Wasser etwa 19 mg Calciumsulfat, 13 mg Calciumoxyd (als Hydroxyd), 0,1 mg Calciumcarbonat und Calciumphosphat ist ebenfalls fast unlöslich. Diese Zahlen zeigen, daß beim Ausziehen auch etwas Calcium gelöst wird; da nun eine zufällig gemachte Beobachtung gezeigt hatte, daß angehauchte Aschen-

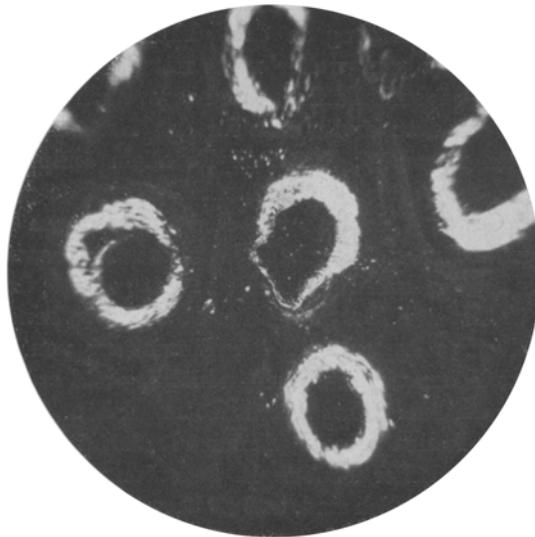


Abb. 33. Uterus. Calciumbild. Das Präparat der Abb. 21 nach Extraktion mit Wasser: nur Calciumsalze bleiben ungelöst.

präparate nicht so leicht zerflossen, sondern der Luftfeuchtigkeit gegenüber viel widerstandsfähiger waren, wurden die Aschenpräparate vor dem Extrahieren kurz angehaucht. Es muß angenommen werden, daß in der Schnitttasche viel Calciumoxyd vorhanden ist, das durch das Anhauchen zunächst in Calciumhydroxyd und durch die relativ hohe Kohlensäurespannung der Ausatmungsluft weiter in Calciumcarbonat überführt wird. Es leuchtet ein, daß infolge der erwähnten viel geringeren Löslichkeit des Carbonats nach dem Anhauchen der Aschen weniger Calcium in Lösung gehen kann.

Auch die Abb. 34 zeigt den Erfolg einer derartigen Extraktion; der Vergleich der Präparate selbst ergab, daß die für den Knorpel so besonders charakteristische bläuliche Asche völlig verschwunden war, während die weiße Asche der Knorpelzellen völlig erhalten geblieben war.

Solche Lösungsversuche wurden in großer Zahl ausgeführt, und immer blieben die massigen rein weißen Aschen ungelöst, während alle bläulich gefärbten Aschenbestandteile verschwanden. Trotz der Bedenken, die die Modellversuche durch die Feststellung verursacht hatten, daß die Aschenfarbe nur durch die Konzentration bedingt ist, ergibt sich nun doch, daß ein gewisser Schluß berechtigt ist. Es war beobachtet worden, daß geringe Aschenmengen bei allen Salzen bläulich, größere dagegen weiß erschienen; offenbar können nun nur die schwerer löslichen Calciumsalze in den Geweben eine so hohe Konzentration erreichen, daß sie im Aschenpräparat weiß erscheinen. Die bläulichen Aschen

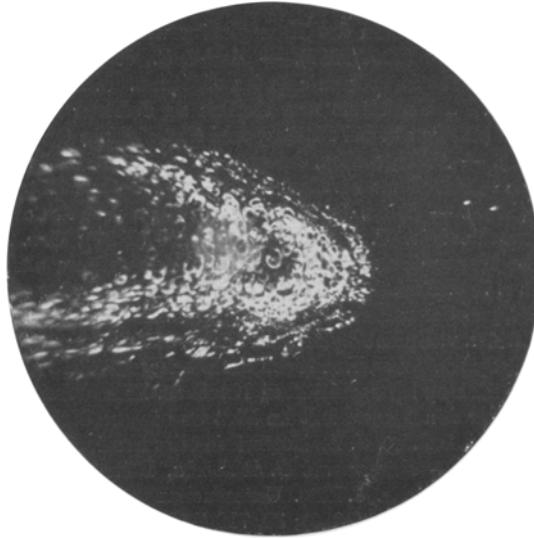


Abb. 34. Bronchialknorpel. Calciumbild. Das Präparat der Abb. 23 nach Extraktion mit Wasser (schwache Vergrößerung).

können also aus den allerverschiedensten Salzen, darunter auch Calcium, bestehen, die großen Mengen von weißer Asche dagegen bestehen mit größter Wahrscheinlichkeit nur aus Calcium.

Diese Ergebnisse der Aschenextraktion und der dadurch ermöglichten isolierten Darstellung des Calciums erlauben nun, die vorliegenden Untersuchungen in noch engerer Weise mit den Untersuchungen von *Bürger* und *Schlomka* einerseits und denen von *Freudenberg* und *György* andererseits zu verknüpfen. Die Aschenbilder geben in vielfacher Hinsicht gewissermaßen die Illustration zu den Versuchen dieser Forscher und die Möglichkeit, alle Befunde einem umfassenden Begriff unterzuordnen, dem Begriff der Funktion.

In diesen Rahmen fügen sich alle unsere Beobachtungen ein. Auf der einen Seite zeigen sie, wie das geringfügige Nachlassen der Lebens-

tätigkeit beim Altern an den benachteiligten Stellen des Organismus Veränderungen im chemischen Aufbau hervorruft und damit dienen diese Untersuchungen der objektiven Erforschung der Alternsvorgänge, wie sie *Rössle* zur Erweiterung unserer Kenntnisse forderte. Auf der anderen Seite zeigen sie, wie die allerverschiedensten Schädigungen der Zellen bereits in frühesten Stadien an den Veränderungen ihrer chemischen Zusammensetzung abgelesen werden können und damit eröffnen diese Untersuchungen ganz neue Möglichkeiten zur Erforschung des Krankheitsgeschehens.

Literaturverzeichnis.

- Abderhalden*, Das Verhalten des Hämoglobins während der Säuglingsperiode. *Hoppe-Seylers Z.* **34**, 500 (1901/1902). — *André, G.*, et *E. Demoussy*, Sur la répartition du potassium et du sodium chez les végétaux. *C. r. Acad. Sci.* **184**, 1501 (1927). — *Beebe, S. P.*, Verhältnis von Kalium zu Calcium in Tumoren. *Amer. J. Physiol.* **12**, 767 (1904); zit. bei *Neuberg* und *Gottschalk* in Oppenheimers Handbuch **4**, 441 (1925). — *Behrens-Kley*, Lehrbuch der Mikrochemie. — *Bertrand, J.*, et *R. Altschul*, Le metabolisme cérébral du calcium. Etude histologique. *Revue neur.* **34/2**, 241 (1927). — *Blum, L.*, et *D. Broun*, La teneur des organes en chlore et en sodium dans l'urénie. *C. r. Soc. Biol.* **96**, 640 (1927); *C. r. Acad. Sci.* **184**, 484 (1927) — La teneur des organes en chlore et en sodium chez les sujet non néphrétiques. *C. r. Soc. Biol.* **96**, 638 (1927). — *Blum, L.*, *Grabar* et *Thiers*, Teneur des organes en chlore et en sodium dans le coma diabétique. *C. r. Soc. Biol.* **96**, 643 (1927). — *Bethe*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. **6**, 399 (1905); zit. nach *Pischinger*. — *Bibra*, zit. nach *Oppenheimer*, Handbuch der Biochemie **4**, 258 (1925). — *Böhmg*, Die Rablsche Kalkfällung bei rachitischen Knochen. *Klin. Wschr.* **4**, 2010 (1925). — *Boussignault*, Über den Eisengehalt im Blut und in den Nahrungsmitteln. *C. r. Soc. Biol.* **74**, 1353. — *Bulkley, J. L.*, Potassium salts in relation to cancer. *Cancer (N. Y.)* **4**, 143 (1927). — *Bürger* und *G. Schlamka*, Beiträge zur physiologischen Chemie des Alterns der Gewebe. I. Mitt. Untersuchungen am menschlichen Rippenknorpel. *Z. exper. Med.* **55**, 287 (1927); **58**, 710 (1928); **61**, 465 (1928); ferner *Klin. Wschr.* **7**, 1944 (1928). — *Cahane, M.*, Teneur du tissue musculaire et du sang en calcium, magnésium et potassium au point de vue ilikibiotique. *C. r. Soc. Biol.* **96**, 1168 (1927). — *Camerer, W.*, Mitteilungen über den Eisengehalt der Frauenmilch. *Z. Biol.* **46**, 371 (1904). — *Chittenden and Gies*, Das Mucin des weißen fibrösen Bindegewebes. *J. of exper. Med.* **1**, 186. — *Clowes and Frisbie*, Amer. J. Physiol. **14**, 175 (1905); zit. nach *Oppenheimer*, Handbuch. — *Dähn, W.*, Über die Calcium- und Kaliumverteilung in der Haut. *Dermat. Wschr.* **82**, 425 (1926). — *Defrise, A.*, Reperti istochimici nella ghiandola renale con particolare riconcavo al NaCl. *Boll. Soc. Biol. sper.* **2**, 521 (1927). — *Dowding, E. S.*, The regional and seasonal distribution of potassium of plant tissues. *Ann. of Bot.* **39**, 459 (1925). — *Eilers, H.*, Die Verwendung der Kolthoffschen Magnesiumreaktion in der Pflanzenmikrochemie. *Chem. Weckbl.* **24**, 448 (1927). — *Fitz-Gerald*, Nachweis der Salzsäure in den Belegzellen. *Proc. roy. Soc. Lond.* **83** (1910); zit. nach *Patzelt*. — *Freudenberg, E.*, Bemerkungen zur Rablschen Methode des histologischen Kalknachweises. *Klin. Wschr.* **5**, 64 (1926). — *Freudenberg, E.*, und *P. György*, Kalkbindung durch tierische Gewebe. *Biochem. Z.* **110**, **115**, **118**, **121**, **124**, **129**, **142** (1920—1922). — *Gans* und *Packheiser*, Über den Calciumgehalt der gesunden und kranken Haut. *Dermat. Wschr.* **78**, 249 (1924). — *Gazert*, Über den Fett- und Kalkgehalt der Arterienwand bei Atheromatose und Arteriosklerose. *Dtsch. Arch. klin. Med.* **62**,

390 (1899). — *Groebels, F.*, Funktionelle Anatomie und Histophysiologie der Verdauungsdrüsen. Handbuch d. Physiologie 3/2, 547, (1928). — *Groebels*, Der Aufbau des Ernährungssystems der nervösen Zentralorgane. Münch. med. Wschr. **67**, 923 (1920). — *György, P.*, Über Quellungsvorgänge am Knorpel. Zit. nach *Oppenheimer*, Handbuch der Biochemie **4**, 250 (1925). — *Hamburger*, Kaliumbestimmung mit dem Kobaltreagens nach Hamburger. Biochem. Z. **71**, 415 (1915). — *Herrera, L.*, Sur la présence de la silice dans les coupes histologiques incinérées. C. r. Acad. Sci. **180**, 538 (1925). Dort Hinweis auf die im Original nicht zugängliche Arbeit aus dem Jahre 1910. — *Jacobi, W.*, und *W. Keuscher*, Über den mikrochemischen Kalium- und Calciumnachweis im histologischen Schnitt. Arch. f. Psychiatr. **79**, 323 (1927). — *Jono, Y.*, Über den Kaligehalt der Leber und des Skelettmuskels bei Avitaminose. J. orient. Med. **3**, 47 (1925). — *Kahn, H.*, Die Chemie der malignen Tumoren und die chemischen Veränderungen im krebskranken Organismus. Mit besonderer Berücksichtigung der serodiagnostischen Methoden und ihrer chemischen Grundlagen. Erg. inn. Med. **27**, 365 (1925). — *Keller, R.*, *J. Gickhorn*, sowie *O. Fürth*, siehe bei *K. Umrath*, Über Elektrostatik in der Biologie. Klin. Wschr. **8**, 241 (1929). — *Kisser, J.*, Pflanzliche Aschenbilder, Mikr. f. Naturf. **6**, 293 (1928). — *Klein, G.*, Der mikrochemische Nachweis von organisch gebundenem Schwefel und Magnesium in der Pflanze. Österr. bot. Z. **76**, 15 (1927). — *Lauda, E.*, und *E. Haam*, Histochemisch nachweisbares Eisen im Zellkern. Beitr. path. Anat. **74**, 316 (1925). — *Lanzoni, F.*, Gli spodogrammi di Molisch nell' analisi farmaco-botanica. Arch. Farmacol. sper. **42**, 79 (1926). — *Leschke*, Untersuchungen über den Mechanismus der Harnabsonderung in der Niere. Z. klin. Med. **81**, 14 (1914). — *Liesegang, R. E.*, Die Veraschung von Mikrotomschnitten. Biochem. Z. **28**, 412 (1910). — *Macallum, A. B.*, Mikrochemie in der biologischen Forschung. Asher-Spiro **7**, 522 (1908) — Die Methoden der biologischen Mikrochemie. Abderhalden, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden **5**, 1099 (1912). — *Meyer, H. H.*, Über die Wirkung des Kalkes. Münch. med. Wschr. **57**, 2277 (1910). — *Michaelis, L.*, Zur Theorie der histologischen Färbung. Arch. mikrosk. Anat. **94**, 580 (1920); zit. nach *Pischinger*. — *Molisch, H.*, Mikrochemie der Pflanze. Jena 1923. — *v. Moellendorff*, Zusammenfassende Darstellung über Färbung u. ä. In *Oppenheimer*, Handbuch der Biochemie **2**, 273 (1925). — *Monti*, Nachweis der Salzsäure in den Belegzellen. Arch. di Fisiol. **11**, 155 (1913); zit. nach *Patzelt*. — *Ostertag, B.*, Über die Veraschung des histologischen Schnittes zur Anstellung histochemischer Reaktionen am Zentralnervensystem. Arch. f. Psychiatr. **80**, 622 (1927) — Zur Histopathologie der Myoklonusepilepsie. Arch. f. Psychiatr. **73**, 633 (1925). — *Patzelt, V.*, Animale Histochemie. In *Klein-Strebinger*, Fortschritte der Mikrochemie. 1928. — *Pischinger*, Diffusibilität und Dispersität von Farbstoffen und ihre Beziehungen zur Färbung bei verschiedenen H⁺-Ionenkonzentrationen. Z. Zellforschg **5**, 347 (1927). — *Policard, M. A.*, La minéralisation des coupes histologiques par calcination et son intérêt comme méthode histochimique générale. C. r. Acad. Sci. **176**, 1012 (1923) — Détection histochimique du fer total dans les tissus par la méthode de l'incinération. C. r. Acad. Sci. **176**, 1187 (1923) — Sur une méthode de micro-incinération applicable aux recherches histochimiques. Bull. Soc. de Chim. biol. **33**, 1551 (1923) — Recherches histochimiques sur la teneur en centres de l'ovaire humain. C. r. Soc. Biol. **89**, 535 (1923) — Recherche histochimique sur la rapidité de minéralisation et la teneur en cendres des diverses parties des cellules. C. r. Soc. Biol. **89**, 533 (1923) — Part prise par les canaux excreteurs dans la formation des composés calcaire de la salive. Bull. Histol. appl. **3**, 22 (1926) — La microincinération et son intérêt dans les recherches histochimiques. I. Technique. Bull. Histol. appl. **1**, 26 (1924) — Recherches histochimiques sur la teneur en cendres

des diverses parties de la cellule. Teneur du noyau en calcium. Bull. Histol. appl. **5**, 260 (1928). — *Policard, M. A.*, et *S. Doubrow*, Recherches histochimiques sur la teneur en cendres des cancers. Ann. d'anat. path. **1**, 163 (1924). — *Policard, M. A.*, et *A. Leulier*, Etudes critiques sur les méthodes de caractérisation histochimique du phosphore. Bull. Histol. appl. **2**, 22 (1925). — *Policard, M. A.*, *R. Noel* et *D. Pillet*, Etude histochimique des variations de la teneur en cendres du tissus hépatique suivant divers régimes. C. r. Soc. Biol. **91**, 1219 (1924). — *Policard, M. A.*, et *N. Pehn*, Recherches histochimiques sur la répartition du calcaire dans les cartilages d'ossifications des os longs chez les rachitiques. Bull. Histol. appl. **5**, 277 (1928). — *Policard, M. A.*, et *D. Pillet*, Recherches histochimiques sur la teneur en matière minérales fixes des cancers experimentaux. C. r. Soc. Biol. **92**, 273 (1925). — *Pratje, A.*, Die Chemie des Zellkernes. Biol. Zbl. **40**, 88 (1928). — *Rabl, O. R. H.*, Über die Kalkablagerung bei der Knochenentwicklung. Klin. Wschr. **2**, 1644 (1923). — Histologischer Nachweis löslicher Calciumverbindungen. Zu den Bemerkungen Freudenberg's in Jg. **5**, S. 64 (1926). Klin. Wschr. **5**, 365 (1926). — *Ravault, P. P.*, Recherches histochimiques le sur l'imprégnation calcaire normale de la paroi aortique. Bull. Histol. appl. **5**, 40 (1928). — *Reichel, H.*, und *K. Spiro*, Ionenwirkung und Antagonismus der Ionen. Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie **1**, 486 (1927). — *Remesow, J.*, Über den Einfluß erhöhter Calciumzufuhr auf die dystrophische Nierenverkalkung beim Kaninchen. Biochem. Z. **187**, 51 (1927). — *Rössle, R.*, Wachstum und Altern. Lubarsch-Ostertag, Erg.-Bd. **20**, 369 (1923). — *Schneider*, zit. nach Handbuch der Biochemie **1**, 18 (1924). — *Schoeller, A.*, Mikroveraschung. Chem. Ber. **55**, 2191 (1922). — *Schulze, W.*, Die Anwendung neuer mikrochemischer Elektrolytreaktionen auf das Verkalkungsproblem bei der Osteogenese. Roux' Arch. **106**, 62 (1925). — *Schterbatschow, D.*, Über den Eisengehalt der Gewebe, die keine Gefäße führen. Zit. nach Handbuch der Biochemie **1**, 18 (1924). — *Seifert, Nelly*, Adrenalin und Synergismus. Schweiz. med. Wschr. **1924** — Synergistische Versuche an überlebenden Gefäßstreifen. Inaug.-Diss. Basel 1925. — *Sherman, H. C. A.*, und *F. L. MacLeod*, The calcium content of the body in relation to age, growth and food. J. of biol. Chem. **64**, 429 (1925). — *Shipley, P. G.*, *B. Kramer* und *J. Howland*, Calcification of rachitic bones in vitro. Amer. J. Dis. Childr. **30**, 37 (1927). — *Spiro, K.*, Über physikalische und physiologische Selektion. Straßburg 1897. — *Stöye, J.*, Der Calciumgehalt des wachsenden Knochens. Klin. Wschr. **5**, 791 (1926). — *Stübel, H.*, Histophysiologie. Jber. Physiol. **1**, 1 (1923). — *Toyonaga, M.*, Über die Verteilung des Kalkes im tierischen Organismus. Zit. nach Handbuch der Biochemie **1**, 29 (1924). — *Tschopp, E.*, Mikrochemie der Gewebe. Hdb. d. mikr. Anatomie **1**, 559 (1929). — *Watermann, N.*, Der heutige Stand der chemotherapeutischen Carcinomforschung. Erg. inn. Med. **30**, 304 (1926) — Über den Calcium- und Kaliumgehalt des Carcinoms. Biochem. Z. **133**, 535 (1922). — *Wehefritz, E.*, Kalkuntersuchungen an Placenten verschiedenen Alters. Arch. Gynäk. **127**, 106 (1925). — *Weil, A.*, Mikroskopischer Nachweis einzelner Zellbestandteile. Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden **5/2**, 437 (1923). — *Wichert, M.*, *Jakowleva* und *S. Pospeloff*, Die chemischen Veränderungen der Organe bei mit Nierengiften vergiftetem Kaninchen. Z. klin. Med. **101**, 173 (1924). — *Wiener, Adele*, Beitrag zum mikrochemischen Nachweis des Eisens in der Pflanze, besonders des „maskierten“. Biochem. Z. **77**, 27 (1916). — *Wildt, E.*, Zusammensetzung der Knochen der Kaninchen in verschiedenen Altersstufen. Zit. nach Handbuch der Biochemie **2/2**, 185 (1909). — *Winter, L. B.*, and *W. Smith*, Der Nachweis der Phosphate in Muskeln. J. of Physiol. **56**, 227 (1922); zit. nach Handbuch der Biochemie.