

(Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Leipzig  
[Direktor: Obermedizinalrat Professor Dr. Kockel].)

## Histochemische Metallnachweise.

Von  
Heinz Kockel.

(Eingegangen am 15. Februar 1930.)

Lange Zeit beschäftigte sich die Histologie ausschließlich mit der Erforschung der *morphologischen* Struktur der Gewebe. Weitgehende Möglichkeiten in dieser Richtung eröffneten sich, als um die Mitte des vorigen Jahrhunderts die Färbemethoden eingeführt wurden. Daß diese Verfahren auch heute noch entwicklungsfähig sind, zeigen z. B. die systematischen Untersuchungen von *Becher*. Außerdem hat man aber aus der Affinität der Farbstoffe zu bestimmten Gewebsbestandteilen schon sehr bald *chemische* Rückschlüsse gezogen. Es sei hingewiesen auf das verschiedene Verhalten einzelner Zellbestandteile gegenüber sauren und basischen Anilinfarbstoffen, auf die Jod-Stärke-Reaktion, den Kalknachweis mit Hämatoxylin, die Fett- und Lipoidfärbung u. v. a.

Diese Methoden, durch welche die chemischen Eigenschaften der Zellbestandteile und Zelleinschlüsse in bezug auf den Gewebsverband klar gelegt werden können, rückten im Laufe der Zeit mehr und mehr in den Vordergrund. Besonders bemächtigte sich ihrer die Pflanzenmikrophysiologie; denn die Pflanzenzelle dient in ausgedehnterem Maße zum Speichern als die tierische, so daß größere Mengen der nachzuweisenden Substanz zur Verfügung stehen. So ist auch von einem Pflanzenphysiologen, *Molisch*, 1892 für dieses Gebiet der Histologie der Name „*Histochemie*“ geprägt worden. Schon zahlreiche histochemische Untersuchungen und Nachweise sind in pflanzlichen Geweben ausgeführt worden (*Klein, Molisch, Tunmann, Zimmermann* u. a.).

Aber auch in tierischen Geweben ist es schon weitgehend gelungen, Stoffwechselprodukte durch histochemische Reaktionen im mikroskopischen Schnitt kenntlich zu machen. Es sei hier erwähnt der Glykogenachweis, der Nachweis der Kochsalzausscheidung in den Harnkanälchen (*Leschke*), die Darstellung der Salzsäure in den Belegzellen (*Fitz-Gerald, Monti*) und der Nachweis der Oxydations- und Reduktionsorte (*Unna*). Meistens werden die histochemischen Reaktionen am gewöhnlichen histologischen Schnitt ausgeführt, aber auch in verwickelteren Ver-

fahren: so zur Beobachtung der Ausscheidung von Metallsalzen in den Nieren durch nachfolgende Einspritzung eines farblackbildenden Stoffs (*Kohsaku* und *Yokoyama*). Über die histochemische Unterscheidung der im menschlichen Organismus vorkommenden Pigmente liegen außer zahlreichen Mitteilungen (*Lubarsch*, *Kutschera-Anberge*, *ich* u. a.) zwei umfassende Arbeiten von *Hueck* vor.

Man hat auch versucht, im Gewebe vorhandene Stoffe, besonders Metalle, durch Veraschung eines Schnittes auf dem Objektträger (*Liesegang*, *Policard*, *Schoeller*) oder durch Mikrosublimation (*Eder*, *Kempf*, *Molisch*, *Nestler*, *Tunmann*) nachzuweisen. Derartige Verfahren haben aber wegen der ausgedehnten Zerstörungen, die die Gewebe dabei erleiden, nur unvollständige und besonders in bezug auf die Lokalisation der Stoffe schwer deutbare Ergebnisse. In den letzten Jahren, wo die Behandlung mit Metallkolloiden einen großen Aufschwung genommen hat, hat man begonnen, die Histochemie besonders auf den Nachweis der Schwermetalle anzuwenden, um ihr Verhalten zu gesundem und erkranktem Gewebe feststellen zu können (*Christeller* und *Schüler*, *Borchardt*). Dazu kommt noch, daß die Schwermetalle sehr charakteristische und dabei eindeutige Reaktionen geben, so daß sie für derartige Untersuchungen verhältnismäßig gut geeignet sind.

Im folgenden soll eine Anzahl Untersuchungen über histochemische Schwermetallnachweise und einige neue Reaktionen beschrieben werden.

Die hauptsächlichste Schwierigkeit bei der Ausführung histochemischer Reaktionen besteht in der äußerst geringen Menge der nachzuweisenden Substanz. Die Grundbedingung ist, wie in der anregenden kleinen Arbeit von *Brunswik* ausgeführt wird, eine genügende Empfindlichkeit. Am besten eignen sich also Fällungsreaktionen zum histochemischen Nachweis, da bei ihnen die Empfindlichkeit allein abhängig ist von der Löslichkeit des entstandenen Niederschlages. Bei Farbreaktionen ist die Empfindlichkeit abhängig von der Stärke des gebildeten Farbstoffes bzw. vom Extinktionskoeffizienten, d. h. die Intensität des Farbstoffes muß so groß sein, daß bei der geringen Schichtdicke des mikroskopischen Schnittes noch ein deutlicher Farbeindruck vorhanden ist.

Je empfindlicher eine Reaktion ist, um so größer ist auch die Erfassungsgrenze. Dabei ist zu unterscheiden zwischen einer theoretischen und der praktischen, die allein für die Beurteilung der Befunde maßgebend ist. Die theoretische Erfassungsgrenze ist abhängig vom Auflösungsvermögen des Mikroskops. Die praktische Erfassungsgrenze weicht davon um etwa 2—3 Zehnerpotenzen ab, da das bei einer Reaktion entstehende Produkt nie an einem einzigen Punkt auskrystallisiert, und auch die vielen entstandenen Einzelkrystalle mikroskopisch noch erkennbar sein müssen. *Brunswik* fordert für jede histochemische Reaktion eine Erfassungsgrenze von 0,01—0,000 001  $\mu\text{g}$ .

Bei Farbreaktionen hängt die praktische Erfassungsgrenze außer von der Stärke von der Art der entstandenen Farbe ab. Denn eine noch so starke Färbung wird, wenn sie von der Gewebseigenfarbe nicht genügend absticht, für histochemische Zwecke ungeeignet. Es sind also Reaktionen, bei denen braune und gelbliche Farbtöne entstehen, zu vermeiden. Die besten Ergebnisse werden mit leuchtend blauen oder roten Reaktionsprodukten erzielt.

Eine weitere wichtige Forderung wird von *Christeller* und *Hueck* aufgestellt. Es wird verlangt, daß bei jedem histochemischen Nachweis eine Identitätsreaktion der entstandenen Verbindung ausgeführt wird. Es ist dies gerade beim histochemischen Arbeiten sehr wesentlich, da infolge der mannigfachen Verfahren, denen der histologische Schnitt vor Ausführung der Reaktion unterworfen wird, leicht Niederschläge aus Konservierungsflüssigkeiten oder ähnlichem zu Täuschungen Veranlassung geben können. Besonders muß aber eine Bedingung für jedes histochemische Verfahren immer wieder nachdrücklich hervorgehoben werden: Es darf durch die Reaktion keine Änderung in der Lagerung des nachzuweisenden Metalles eintreten (*Liesegang*, *Patzelt*). Der Erfüllung dieser Bedingung stehen aber gewisse Schwierigkeiten, hauptsächlich kolloidchemischer Natur, entgegen. Es treten sehr leicht Änderungen im Aggregatzustand des nachzuweisenden Metalles oder des entstandenen Reaktionsproduktes auf, wodurch Verschiebungen infolge der verschiedenen Diffusion hervorgerufen werden. Nach *Liesegang* sind viele Fehlschlüsse dadurch zu erklären, daß man allzu großen Wert legt auf scharfe und „schöne“ Bilder und dabei die Frage der ungestörten Lagerung vernachlässigt.

Da die Konzentration der Schwermetalle, die unter normalen Verhältnissen im Organismus vorkommen, für eine histochemische Darstellung sehr gering ist — es ist von ihnen ja bis jetzt nur Eisen nachweisbar — hat man sich zunächst den pharmakologisch wichtigen Schwermetallen zugewendet. Aus dem Institut von *Christeller* sind mehrere Arbeiten hervorgegangen, die sich mit dem Nachweis von Gold, Wismut und Quecksilber und ihrer Lagerung im Gewebe beschäftigen.

Der Goldnachweis (*Kurosú*) wird geführt durch Behandlung der Gefrier- oder Paraffinschnitte mit zinnchloridhaltigem Zinnchlorür. Das untersuchte Präparat ist das Sanocrysin, das Natriumsalz der Aurothioschwefelsäure. In vitro ist die Empfindlichkeit der Probe 1 : 100 000—1 : 1 000 000. *Kurosú* erwartete die Bildung eines dem *Cassius*schen Goldpurpur ähnlichen Gels. Es bildeten sich aber schwarze Niederschläge, die nach der Ansicht des Verfassers vermutlich von metallischem Gold herrühren. Diese Niederschläge fanden sich im Bindegewebe der Einspritzungsstelle und außerdem in Milz, Leber, Niere und Lunge.

*Borchardt* im Institut von *Lubarsch* untersuchte ein anderes Präparat, das das Gold in organischer, komplexer Bindung enthält (Präparat 2949 der I. G.-Farbenindustrie). Eine Reduktion durch Zinnchlorür ist hier unmöglich, jedoch gelang es dem Verfasser durch Silbernitrat metallisches Gold auszufällen.

Zum Nachweis des *Wismut* verwenden *Christeller*, *Komaja*, *Califano* und *Vonkennel* eine der *Légerschen* (Cinchinon + Jodkali + Salpetersäure) ähnliche Reaktion, die eine Empfindlichkeit von 1 : 500 000 zeigt. Als Wismutpräparat nehmen sie das Bismogenol. Die zur Vermeidung von Wismutformolverbindungen in neutraler Formollösung gehärteten Gefrierschnitte werden in eine Mischung von Chininsulfat + acid. nitric. und Jodkali gelegt. Das Wismut bildet dann mit dem Reagens eine leuchtend orangegelbe Verbindung. Die Bilder sind von außerordentlicher Deutlichkeit und Schönheit. *Komaja* weist das Wismut auch als Wismutsulfid nach, nur ist die braunschwarze Farbe des Niederschlags nicht günstig. Die Empfindlichkeit ist die gleiche wie die der anderen Reaktion. Nach den Untersuchungen von *Califano* wird das Wismut vorwiegend in den Zellen des retikulo-endothelialen Systems, besonders der Lunge, nicht hingegen im Parenchym, gespeichert.

Über einen histochemischen *Quecksilbernachweis* hat schon im Jahre 1903 *Almkvist* eine Arbeit veröffentlicht. Er verwendet mit Schwefelwasserstoff gesättigte Pikrinsalpetersäure und erhält angeblich Quecksilbersulfid als feine gelbe Körnchen in Epithelien und Interzellularräumen. *Christeller* und *Sammartino* haben in neuerer Zeit ausgedehnte Untersuchungen mit den verschiedensten Reagenzien, hauptsächlich Reduktionsmitteln, u. a. auch mit dem von *Hesse* angegebenen Antidot bei Quecksilbervergiftung, Formalinnatriumthiosulfat, angestellt. Mit keiner dieser Methoden jedoch ist es den Verfassern gelungen, brauchbare Resultate zu erzielen. Sie sind dann auf das Verfahren *Almkvists* zurückgekommen, nur daß sie durch eine länger dauernde Einwirkung des Reagens eine Erhöhung der Empfindlichkeit erzielt haben. Es sind mit dieser modifizierten Methode sehr bemerkenswerte Quecksilbernachweise bei einer Vergiftung und nach kleinen Kalomelgaben gelungen.

*Justus*, der es für unmöglich hält, das organisch gebundene Quecksilber ohne weiteres durch Schwefelwasserstoff auszufällen, behandelt vorher mit Zinkchlorid. Diese Methode, an der schon *Siebert* Kritik geübt hat, ist neuerdings von *Christeller* und *Sammartino* nachgeprüft worden, hat aber nur unvollkommene Ergebnisse erzielt.

Über die histochemische Darstellung von *Blei* findet sich im Schrifttum nur eine kurze Bemerkung bei *Christeller* und *Sammartino*, daß die Japaner *Iwashi* und *Tada* mit Schwefelwasserstoff positive Ergebnisse erzielt hätten. Näheres ist aber darüber nicht bekannt.

Um zu ermitteln, ob und wieweit es möglich ist, auf diese Weise Blei im Gewebe nachzuweisen, sind von mir eine Anzahl Versuche durchgeführt worden. Untersucht wurden die Leber eines an chronischer Bleivergiftung verstorbenen Mannes, ferner einige Tiere, die teils einer akuten, teils einer chronischen Bleivergiftung erlegen waren.

Zwei Meerschweinchen, die 20 mg und 10 mg Bleiacetat in Lösung nach dem üblichen Verfahren in eine Mesenterialvene eingespritzt bekommen hatten, starben nach 10 bzw. 12 Stunden. Da Bleiacetat 66% Pb enthält, bekam das eine Tier 24,4 mg pro Kilogramm Körpergewicht, das andere 13,3 mg Pb pro Kilogramm. Außerdem standen zwei Kaninchen zur Verfügung, die infolge einer 2 Monate lang durchgeführten Fütterung mit Bleiacetat (täglich 7 bzw. 5 mg Pb pro Kilogramm) einer chronischen Bleivergiftung erlegen waren.

Gefrier- und Paraffinschnitte der Leber wurden mehrere Stunden lang teils in Schwefelwasserstoffwasser, teils in feuchtem Zustand in einer Schwefelwasserstoffatmosphäre gehalten. Es zeigte sich bei den

gepitzten Tieren in der Umgebung der Zentralvenen hauptsächlich in den Capillaren, aber auch manchmal in den Leberzellen ein deutlicher Niederschlag von rundlichen, schmutzig braungelben Körnchen, der nach seinem chemischen Verhalten — Auflösung in Salpetersäure — als Bleisulfid anzusprechen ist. Die Farbe des Niederschlags ist nicht günstig, kleinere Teilchen sind schwer von der Eigenfarbe des Gewebes zu unterscheiden. Bei den per os vergifteten Tieren wie bei dem einer chronischen Vergiftung erlegenen Manne versagte jedoch der Nachweis bis jetzt vollständig; auch durch Verlängerung der Einwirkungsdauer von Schwefelwasserstoff war kein positives Ergebnis zu erzielen. Weiterhin wurden Schnitte mit Kupferacetat und Essigsäure und anschließend mit Kaliumnitrit behandelt. Das entstehende Kaliumkupferbleinitrit zeigte eine noch weniger abstechende Farbe als das Bleisulfid, ist also zum Bleinachweis nicht sehr geeignet. Außerdem scheint die Empfindlichkeit wenigstens histochemisch geringer als die der Schwefelwasserstoffprobe.

Im Gegensatz zu den bis jetzt behandelten Schwermetallen bilden *Eisen*, *Kupfer* und *Zinn* normale Bestandteile des Organismus. Vor einer eingehenden Behandlung des Eisens als wichtigsten Vertreters dieser Gruppe soll kurz auf die Möglichkeiten eines histochemischen Nachweises für Kupfer und Zinn eingegangen werden.

*Kupfer* wurde zuerst im Blutfarbstoff von Cephalopoden, dem Hämocyanin, analytisch nachgewiesen (*Fredericq, Harless und Bibra, Henze*). Später fand man es auch bei Wirbeltieren (*Church* in Federn, *Halliburton* und *Slowtsoff* in der Säugetierleber, *Warburg* im Blutserum des Menschen). Die ersten und bisher einzigen histochemischen Untersuchungen stellten *Boyce* und *Herdman* an, die es in Austernleukocyten nachwiesen. *Laidlaw* meint, daß das Kupfer ähnlich dem Eisen in okkultur Form (vgl. unten) auftritt, ja es sogar ersetzen könne. Zusammengestellt wurden die bisherigen Ergebnisse in der umfassenden Arbeit von *Macallum*.

*Boyce* und *Herdman* verwenden als Nachweis die Ferrocyanidreaktion in saurer Lösung. Außerdem sollen Kupferverbindungen mit wässriger Hämatoxylinlösung einen violetten Farblack bilden.

Um nachzuprüfen, ob die angegebenen Reaktionen auch in anderen Fällen verwertbar sind, wurde einem Meerschweinchen 20 mg Kupferacetat (21,3 mg Cu pro Kilogramm Körpergewicht) in eine Mesenterialvene gespritzt. Der Tod trat nach 24 Stunden ein. Die quantitative mikrochemische Analyse [Zerstörung der organischen Substanz und elektrolytische Bestimmung (*Breitenstein*)] ergab — bezogen auf 10 g Leber-Trockensubstanz — 10 mg und 6 mg Kupfer. Es sind also etwa  $\frac{2}{3}$  des eingespritzten Kupfers in der Leber zurückgehalten worden. Bei der histochemischen Untersuchung war ein Einfluß des Kupfers auf verdünnte wässrige Hämatoxylinlösung in der Richtung auf eine Violettfärbung niemals wahrzunehmen. Ebenso erwies sich die von *Boyce* und *Herdman* verwendete saure Ferrocyanidreaktion (auch von *Patzelt* in *Klein* und *Strebing* angegeben) als unbrauchbar.

Abgesehen davon finden sich in der chemischen Literatur eine große Anzahl von zum Teil sehr empfindlichen Reaktionen auf Kupfer, die auf ihre Anwendungsmöglichkeit in histochemischer Hinsicht zu prüfen waren. *Parri* gibt an, daß mit Metallsalzen das *Braunsche* Reagens (Kaliumtrithiocarbonat), ebenso Derivate der Dithiocarbaminsäure, besonders ihr Ammoniumsalz, und das Thiophenylcarbacid, charakteristische Farbreaktionen geben, mit Kupfer grün, blaugrün oder violett. Nach einer Arbeit von *Kolthoff* verhält sich ähnlich das Diphenylcarbacid. Das dithiocarbaminsäure Ammonium wurde nach der Vorschrift von *Freund* und *Bachrach* (*Beilstein*), die anderen Reagenzien nach der Vorschrift der Verfasser hergestellt. Die Schnitte wurden verschieden lange Zeit sowohl in der Kälte als auch bei Brutschranktemperatur den verschiedenen Reagenzien ausgesetzt. Es ließen sich jedoch auf keine Weise Färbungen erzielen.

Ferner wurde versucht, nach der Angabe von *Fleming* und *Spaku* mittels Alkalirhodanid bzw. Kaliumjodid unter Zugabe einiger Tropfen alkoholischer Benzidin-, Tolidin- oder Guajakharztlösung die Bildung eines blauen Komplexsalzes zu erzielen, die noch in einer Verdünnung von 1:1 000 000—1:10 000 000 vor sich gehen soll. Aber auch hier war der Erfolg ein negativer. Eine Methode von *Montequi*, der beobachtet, daß Merkurisulfocyanate mit  $\text{Cu}^{++} + \text{Zn}^{++}$  einen tiefvioletten krystallinen Niederschlag bilden, lieferte nicht einmal in vitro ein sichtbares Ergebnis.

Nach diesen Mißerfolgen wurde entsprechend zum Blei versucht, das Kupfer als Kaliumkupferbleinitrit nachzuweisen. Ebenso wie dort ist ein Niederschlag zwar vorhanden, aber wegen des zu geringen Farbgegensatzes gegenüber dem Gewebe nicht geeignet. Hingegen erweist sich eine Behandlung der Schnitte mit Schwefelwasserstoffwasser als günstig zur histochemischen Darstellung des Kupfers. Das Kupfersulfid zeigt eine mehr rostbraune Farbe als das Bleisulfid, wodurch es besser vom Gewebe absticht. Das eingespritzte Kupfersalz ist ebenso wie das Bleisalz in der Umgebung der Zentralvenen hauptsächlich in den Capillaren anzutreffen. Berücksichtigt man, daß, wie die quantitative Analyse ergeben hat, in 1 g Leber-Trockensubstanz durchschnittlich 0,8 mg Kupfer enthalten sind, so ergibt sich für die in einem Schnitt vorhandene Kupfermenge etwa 0,5—1  $\mu\text{g}$ . Es ist das immerhin eine recht günstige Empfindlichkeit, die allerdings die von *Brunswick* geforderte nicht erreicht. Eingehende Versuche, die Empfindlichkeit zu steigern, um auch peroral eingeführtes oder sogar das normalerweise vorhandene Kupfer dem histochemischen Nachweis zugänglich zu machen, sind zur Zeit am Institut für gerichtliche Medizin im Gange.

Das Zinn gehört ebenfalls zu der Gruppe von Schwermetallen, die normalerweise im Organismus in geringen Mengen vorkommen (*Hammersten*, *Oppenheimer*). Nach der Mitteilung von *Misk* findet es sich ziemlich in allen Organen, besonders aber in der Leber, etwa 3—4 cg pro

100 g „Eingeweide“. Es ist das also ungefähr ebenso viel wie die normale Zinkmenge des Organismus. Außerdem wird man, wenn auch in seltenen Fällen, in Organen von einer Vergiftung herrührendes Zinn vorfinden. Denn die früher geleugnete Möglichkeit einer Zinnvergiftung, besonders bei Genuß von Nahrungsmitteln, die in verzinnnten Weißblechdosen konserviert waren, ist jetzt allgemein anerkannt (*Eckardt, Gadamer, Järwinen, Ungar und Bodländer, Vaubel* u. a.). *Hanzlik* und *Presho* erklären sogar das Zinn für das giftigste der Schwermetalle, und *Jolles* berichtet über eine Zinnvergiftung angeblich nach Tragen von mit Zinn beschwerten Seidenstrümpfen.

Eine größere Anzahl von Versuchstieren wurde mit Zinnverbindungen, teils intravenös gespritzt, teils gefüttert. Zur Verwendung gelangte einmal Stannotartrat (hergestellt nach *Schiff*). Die Analyse des verwendeten Tartrats ergab 46,9% Zinn (Theor. 44,4%). Als vierwertige Zinnverbindung wurde Zinnsäure benutzt (hergestellt nach *Graham*), die auf 1 Kubikzentimeter des Sols 20 mg Zinn enthielt. Verwendet wurde entweder das Sol oder das aus diesem durch einen Tropfen verdünnte Salzsäure ausgefällte Gel. Beide Zinnverbindungen in Blutadern eingespritzt waren an den ungefärbten und an den mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Gefrier- oder Paraffinschnitten noch deutlich zu erkennen, das Tartrat als feine, in Thromben eingebettete Krystalle; die Zinnsäure, besonders das Gel, als homogene, die Gefäße zum Teil vollständig ausfüllende Masse.

Im Anschluß an die Einspritzung hatten sich in der Leber stets mehr oder weniger umfangreiche anämische bis nekrotische Gebiete ausgebildet.

Von 5 gespritzten Tieren starben 3 (140,45 und 39,4 mg auf 1 kg Körpergewicht) an solchen ausgedehnten Nekrosen nach längstens 48 Stunden. Die beiden anderen Tiere (je 10 mg Zinn auf 1 kg Körpergewicht) wurden nach 14 Tagen durch Nackenschlag getötet. Nur 2 Tiere gingen an Zinnvergiftung (Unruhe, atypische, meist grobe klonische Krämpfe) zugrunde, das eine nach subkutaner Einspritzung von  $\frac{1}{2}$  g Stannotartrat (400 mg Zinn auf 1 kg), das andere nach einer 10 Tage dauernden Fütterung mit insgesamt 72 ccm Zinnsäure = 2880 mg Zinn auf 1 kg. Nach subkutaner Einspritzung von 120 bzw. 150 mg Zinn in 2- bzw. 4-wertiger Form auf 1 kg Körpergewicht zeigten die Tiere keine Krankheitserscheinungen.

Für die histochemische Untersuchung kommen in der Hauptsache zwei Wege in Betracht: Einmal unter Ausnützung der Eigenschaft der Zinnsalze, *Farblacke* zu bilden und andererseits mittels der *Additionsfähigkeit* der Zinnverbindungen. Die zur *Farblackbildung* am meisten geeigneten Farbstoffe ergeben sich aus *Becher, Bottler* und *Ullmann*. Es handelt sich vorwiegend um Anthrachinonderivate. Geprüft wurden Alizarin-gelb, -grün, -rot, -blau, -blauschwarz, ferner Oxyanthrarufin, Mono- und Dichloralizarin, Phenosafranin<sup>1</sup> und Purpurin, sowie das

<sup>1</sup> Es sei hier nebenbei mit *Christeller* wieder auf das Phenosafranin als Kernfarbstoff hingewiesen. Es liefert Färbungen von großer Klarheit und Durchsichtigkeit.

von *Kohsaku* und *Jokoyama* angegebene alizarinsulfosaure Natrium. Weiterhin wurden 2 Azofarbstoffe, das Azogallein und das Azochromin, die als Sulfosäuren stark beizenziehend sind, untersucht. Es ergibt sich, daß in vitro sämtliche Farbstoffe mit den in Frage stehenden Zinnverbindungen aus wässriger oder alkoholischer Lösung leuchtende Lacke bilden. Hingegen färben sich im Präparat die in den Gefäßen noch unverändert erhaltenen Stannotartratkristalle und Zinnsäurepräfröpfe nur zuweilen. Aus unbekannten Gründen ist trotz stundenlanger Einwirkungsdauer, Erhöhung der Temperatur usw. ein sicheres Auftreten der Färbung der noch nicht ins Gewebe eingedrungenen Verbindungen nicht zu erreichen. Die besten Ergebnisse liefert eine alkoholische Purpurinlösung. Auch das vom Gewebe aufgenommene Zinn hat sich mittels Farblackbildung nicht eindeutig nachweisen lassen, da immer eine diffuse Plasmafärbung auftritt, die auf eine Lackbildung mit den ja in großen Mengen vorhandenen Eisen- und Calciumsalzen zurückzuführen ist. Einzig wieder das Pupurin in konzentrierter alkoholischer Lösung zeigt bei einer Einwirkungsdauer von etwa 30 Minuten einigermaßen klare Ergebnisse. Es erscheinen hierbei die mutmaßlich mit Zinn durchdrungenen Gewebsteile um die Zentralvene herum stärker und dunkler gefärbt. Die Ergebnisse sind aber so unsicher, die Färbungen so verschiedenartig in bezug auf Stärke und Verteilung, daß sichere Schlüsse aus diesem Verfahren nicht gezogen werden können. Nach Entfernung des Eisens durch 1%ige Oxalsäure und des Calciums durch ganz verdünnte Salzsäure gelingt es zwar, die diffuse Färbung des Gewebes zu vermeiden, es gehen aber die Zinnverbindungen mit der Salzsäure in Lösung und werden dadurch einem Nachweis entzogen. Es läßt sich also das Zinn mittels beizenziehender Farbstoffe bis jetzt nicht nachweisen.

Auch die andere wichtige Eigenschaft der Zinnverbindungen, ihre *Additionsfähigkeit*, wurde zur histochemischen Darstellung herangezogen. Das Zinn liegt, wenn es vom Organismus aufgenommen worden ist, höchst wahrscheinlich in 4-wertiger Form vor. Es ergibt sich das 1. aus den stark oxydierenden Eigenschaften der Gewebe und 2. aus der Tatsache, daß reduzierende Bestandteile im Schnitt nach Einspritzung von Zinnverbindungen fehlen (keine Reduktion von Sublimat zu metallischem Quecksilber oder von *Fehlingscher* Lösung). Es wurde nun versucht, durch Anlagerung von Zinnchlorür eine Stanni-Stannoverbindung zu erzielen, die ihrerseits nun reduzierend auf eine Goldsalzlösung einwirken sollte. Es stellt sich aber heraus, daß nach Behandlung mit 10%iger Zinnchlorürlösung trotz nachfolgendem ausgiebigen Auswaschen in destilliertem Wasser aus einer schwachen Auronatriumchloridlösung überall im Gewebe metallisches Gold in Form anfangs rötlicher, später schwarzvioletter Niederschläge ausgefällt wird. Ein Auswaschen des etwa vorhandenen überschüssigen Zinnchlorürs mit ganz verdünnter



Salzsäure (3 Tropfen konzentrierter HCl auf 1 Reagensglas Wasser) entfernt gleichzeitig auch das Zinnchlorür, das an die vorhandene Zinnverbindung angelagert war, so daß überhaupt keine Reduktion mehr stattfindet. Andererseits führt eine Verdünnung der Goldsalzlösung auf 1:1000—1:10 000 zu dem gleichen negativen Ergebnis wie mit der konzentrierten Lösung.

Nachdem die Anlagerung von Zinnchlorür zu keinem brauchbaren Ergebnis geführt hat, wurde eine weitere Addition, die der Phosphorsäure, zum Nachweis herangezogen. Durch die Anlagerung von Molybdänsäure an die Phosphorsäure und nachfolgende Reduktion hätte Molybdänblau entstehen sollen. Es gelang dies nicht, da anscheinend verwickeltere Methoden als einfaches Einlegen der Schnitte in die Flüssigkeit nötig sind, um die Phosphorsäure zur Anlagerung an das Zinn zu veranlassen. Außer den beschriebenen wurde noch ein von *Behrens, Cohen* (in *Abeggs* Handbuch) und bei *Gmelin-Kraut* angegebenes Verfahren, die Bildung von Cäsiumchlorostannat mit nachfolgender Gelbfärbung mit Jodkali, untersucht, auch dies ohne Erfolg.

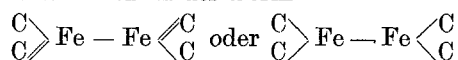
Es ist also bisher nicht gelungen, einen brauchbaren histochemischen Nachweis für Zinn zu finden. Untersuchungen in dieser Richtung, besonders auf dem Wege der Farblackbildung, der am aussichtsreichsten erscheint, unter Umständen nach Behandlung mit Halogenen (vgl. unten), sind am Institut für gerichtliche Medizin im Gange.

Das erste und bis jetzt einzige unter den im Organismus normalerweise vorkommenden Schwermetallen, dessen histochemischer Nachweis einwandfrei geglückt ist, ist das *Eisen*. Als erster wies es *Perls* im Jahre 1866 als Berlinerblau nach, bald nachher, 1868, *Quincke* mittels Schwefelammon. Seitdem sind über dieses Gebiet außerordentlich viel Arbeiten erschienen (*Abderhalden, Bunge, Gibson, Hueck, Jakobi, Kunkel, Lubavin, Macallum, Minkowski* und *Naunyn, C. Müller, Stender, M. B. Schmidt, Neumann, Schneider, Zaleski* und viele andere). Die erste große Zusammenfassung wurde im Jahre 1908 von *Macallum* als Hauptteil seiner Arbeit „Mikrochemie in der biologischen Forschung“ gegeben. Als zweiter hat *Hueck* in seinen „Pigmentstudien“ (1912) sowie im Handbuch der Allgemeinen Pathologie von *Krehl* und *Marchand* (1921) die Probleme des Eisennachweises eingehend erörtert. 1923 hat dann *R. Schneider* noch einmal einen Bericht über die in Frage stehenden Verfahren gegeben. Sonst sind seit den *Hueckschen* Arbeiten nur kleinere Berichte veröffentlicht worden (*Boecker, Lauda* und *Haam, Stoeltzner, Wiener* u. e. a.).

Bemerkenswert ist, daß seit *Perls* und *Quincke* kein grundsätzlich neues Verfahren des Eisennachweises zur Anwendung gelangte. Mit geringen Abänderungen wurden immer wieder das Schwefelammon bzw. die Berlinerblaureaktion herangezogen. Die Ansichten darüber, welche von beiden Proben die vorteilhaftere ist, sind sehr verschieden.

Da es zu weit führen würde, die Stellungnahme der einzelnen Autoren hier ausführlich zu erörtern, sei auf die Zusammenfassung bei *Hueck* und die Originale verwiesen.

Für diese Arbeit wichtig ist Folgendes: Schon sehr bald hat man gefunden, daß es im Organismus Verbindungen gibt, die zwar einwandfrei auf Grund der mikrochemischen Bestimmung Eisen enthalten, es aber histochemisch nicht oder nicht sofort nachweisen lassen. Der Hauptvertreter dieser Verbindungen ist das Hämoglobin, ferner das Hämatogen (*Bunge*), das Hepatin (*Zaleski*) und das Ferratin (*Schmiedeberg*). *Lubavin* fand in der Milch Eisen, das nur durch Veraschen nachweisbar war, und *M. B. Schmidt* und andere glauben, daß es eisenhaltige Pigmente gibt, die histochemisch keine Eisenreaktion erkennen lassen. Auch *Hueck* kommt zu dem Ergebnis, daß ein Eisengehalt von weniger als 50 mg auf 100 g Leber-Trockensubstanz eine positive Eisenreaktion ausschließt, obwohl er eine eigentliche „Phanerose“ des Eisens ablehnt. Über den Grund, warum ein Teil des Eisens histochemisch nicht greifbar ist, herrschen in der Hauptsache drei Ansichten (*E. Meyer*). Einmal wird angenommen, das Eisen sei *fest organisch* gebunden, z. B. an Eiweiß — Typus Hämoglobin — (*Neumeister-Zaleski*). *Macallum* meint, das Eisen fände sich in der Form



vor. Andere glauben, daß es sich nur um eine *lockere komplexartige organische* Bindung handle, in der das Eisenatom infolge seiner Stellung nicht reaktionsfähig sei, etwa nach Art des Ferri- oder Ferrocyankali (*Bunge*, *Schmiedeberg*, *Wiener*). Drittens gilt die Ansicht (*Abderhalden*, *Hueck*), daß das Eisen in *anorganischer* Bindung vorliege, aber wegen seines besonderen kolloidalen Zustandes nicht nachweisbar sei.

Für dieses nicht oder wenigstens nicht sofort greifbare Eisen wurde von *Molisch* der Ausdruck „maskiert“ eingeführt und von *Hueck*, *Macallum*, *C. Müller*, *Wiener* u. a. übernommen. *Boecker* schlägt die Bezeichnung „blockiert“ vor. Da es aber vorläufig noch nicht möglich scheint, ein sicheres Urteil abzugeben, ob eine organische oder anorganische Bindung des Eisens vorliegt, ob das Nichtreagieren auf der Art der Bindung oder dem Aggregatzustand beruht, empfiehlt es sich wohl, eine möglichst indifferente Benennung zu verwenden. Es sei daher der Ausdruck „okkultes Eisen“ vorgeschlagen, weil damit, auch für den Chemiker, nicht im geringsten der Eindruck einer bestimmten Konstitution verbunden ist.

Es hat an Versuchen, dieses okkulte Eisen dem Nachweis zugänglich zu machen, keineswegs gefehlt. *Molisch* versucht durch Behandlung mit Kaliumhydrat das okkulte Eisen frei zu machen, findet aber ebenso wie *C. Müller* Eisen in seinen Reagenzien. *R. Schneider* kann okkultes Eisen nach Härten mit Chromacetatmischungen feststellen. *Gibson* nach

Behandlung mit Schwefelsäure- und Schwefeligsäureanhydrid, *Brown* nach Einwirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . *Macallum* findet, daß die verschiedensten Reagenzien, Einfach-Schwefelammon (*Hall*), Ferrocyankali und Salzsäure, überhaupt Säuren, falls sie nicht das Eisen extrahieren, ja sogar zufällige „Unreinheiten“ der Konservierungsflüssigkeiten; besonders des Alkohols, das Eisen zugänglich machen können. Ebenso wirke auch das *Bungesche* Reagens (96% Alkohol — 25%  $\text{HCl}$  im Verhältnis 9:1), obwohl das nach *Bunges* Absicht gerade das okkulte Eisen nicht angreifen sollte. *Macallum* selbst legt seine Schnitte tage- bis wochenlang in eine Mischung von Einfach-Schwefelammon und Glycerin bei 60°.

Auch *Hueck*, der sich offenbar gegenüber okkultem Eisen ablehnend verhält, glaubt, daß durch einen Überschuß an Salzsäure bei der Berlinerblau-Reaktion eine Art „Ionisierung“ eintritt. Er zieht das Schwefelammon als Reagens vor, verwandelt aber nachträglich das Eisensulfid mit Ferricyanali und Salzsäure in Turnbullsblau. *Nishimura*, dessen Arbeit zu gleicher Zeit erschien, führt das Eisensulfid in Berlinerblau über. Eine Besprechung der Kritiken, die das besonders nach *Macallums* Methode gefundene Eisen als Verunreinigungs-eisen hinstellen (z. B. *Wiener* glaubt bewiesen zu haben, es stamme aus dem Glase) kann unterbleiben. Denn die Mengen Eisen, die in den verwendeten wenigen Kubikzentimetern der Reagentien enthalten sind, sind so gering, daß sie zu Fehlergebnissen niemals führen können.

Es ist sehr schwer nachzuprüfen, inwieweit mit einem dieser Verfahren wirklich okkultes Eisen frei gemacht werden kann. Sicher ist aber, daß ihnen immer noch große Mängel anhaften, denn z. B. aus dem Hämoglobin hat man bis vor kurzem das Eisen dem histochemischen Nachweis nicht zugänglich machen können. Das ist erst in neuester Zeit gelungen. Im „Praktikum der Histochemie“ von *Klein*, Auflage 1929, S. 65, findet sich eine kurze Bemerkung, die ihrer Wichtigkeit wegen wörtlich angeführt werden soll: „Der Nachweis des organisch gebundenen, also des gesamten  $\text{Fe}$  gelingt eindeutig nur nach Veraschung . . .

Nur im Blut ist es uns gelungen, das im Hämoglobin organisch gebundene Eisen ohne Veraschung nachzuweisen. Salzsaurer Hämatin, Hämoglobin und intaktes Blut geben bei vorsichtigem Hantieren direkt keine Berlinerblaureaktion. Legt man aber eine Spur dieser Stoffe oder einen Blutausschlag auf dem Objektträger über den Hals einer Bromflasche (etwa 1 Stunde) und macht dann die Reaktion, so tritt die Berlinerblaufärbung annähernd so stark auf wie nach dem Veraschen der gleichen Stoffmengen (noch nicht veröffentlicht)“. Auf diese kurze Mitteilung gründen sich die folgenden Untersuchungen.

Als Testobjekte wurden zunächst einmal Blutausschläge nach dem üblichen Verfahren hergestellt. Sie sind für diesen Zweck sehr geeignet, da sie Eisen nur in okkulten Form enthalten, und da die sehr empfindlichen roten Blutkörperchen durch Formveränderung oder vollkommene

Auflösung anzeigen, ob Reagenzien zu stark zerstörend auf Gewebsteile einwirken.

Weiterhin wurden die Versuche an in Formalin oder Alkohol gehärteten Leberpräparaten — meist Gefrier-, aber auch Paraffinschnitte — fortgesetzt. Es stand zur Verfügung die Leber eines an Kranzschlagaderverengung verstorbenen 60jährigen Mannes, die keine Stauungserscheinungen zeigte, und die völlig normale Leber eines an Kohlenoxydvergiftung zugrunde gegangenen 35jährigen. Die von Hueck für derartige Untersuchungen für unbedingt nötig gehaltene Entblutung konnte leider an dem gegebenen Material nicht ausgeführt werden, denn infolge der sommerlichen Hitze zeigten die Leichen alle mehr oder weniger starke Fäulniserscheinungen, so daß eine Ausschwemmung von Eisen zu befürchten war. Es wurden daher die an den menschlichen Lebern gewonnenen Ergebnisse an einer mit 3 Liter eisenfreiem Aqua redestillata durchgespülten frischen Meerschweinchenleber nachgeprüft. Da die Ergebnisse vollkommen übereinstimmten, sind dieser Arbeit die Ergebnisse an nicht entbluteten Menschenlebern zugrunde gelegt worden.

Die Lebern wurden zunächst unverändert untersucht. Außerdem wurde die eine etwa 20 Minuten mit verdünnter Salzsäure gekocht bzw. 24 Stunden lang bei einer Temperatur von 60° damit behandelt, so daß histochemisch mit der Schwefelammon- und der Berlinerblauprobe kein Eisen mehr nachzuweisen war.

Die quantitative Untersuchung wurde nach dem Verfahren von Röhmann und Steinitz ausgeführt. (Veraschung der organischen Substanz, Fällern mit Schwefelammon, Kaliumbisulfatschmelze zum Aufschließen etwa entstandenen Eisenoxys, Reduktion mit Zinkstäbchen, Titration mit Kaliumpermanganatlösung).

Nach angestellten Leerbestimmungen enthielten die Reagentien in den gebrauchten Mengen einschließlich des Spülwassers 0,0013 mg Fe. Dieser Wert, der etwa  $\frac{1}{300}$  der bei der Analyse gefundenen Eisenmenge beträgt, wurde vom Ergebnis abgezogen.

Die quantitative Untersuchung, die nur an der Leber des an Coronarstenose verstorbenen Mannes ausgeführt wurde, ergab in verschiedenen Teilen 47,5 mg Eisen auf 100 g Leber Trockensubstanz (0,4431 mg Fe auf 0,932987 g Leber) bzw. 87,4 mg Eisen auf 100 g Leber (0,3619 mg Fe auf 0,414488 g Leber). Es sind dies Werte, die, verglichen mit denen von Bielefeld, v. Lingen und Hueck, durchaus normal sind. Die Mengenbestimmung an einem in Salzsäure gekochten Stück Leber, die histochemisch keine Eisenreaktion mehr zeigte, ergab 30 mg Eisen auf 100 g Leber (0,0753 mg Fe auf 0,243713 g Leber). Der Eisengehalt dieser Leber liegt unter dem von Hueck noch als histochemisch greifbar angegebenen Wert. Es handelt sich hier also um okkultes Eisen.

Zum histochemischen Nachweise des okkulten Eisens wurde im Anschluß an die Ergebnisse von Klein mit Blutaussstrichen versucht, dieses oder ein ähnliches Verfahren auf Organpräparate zu übertragen.

Um eine Einschleppung von Eisen zu vermeiden, bestanden die Instrumente, mit denen die Schnitte aus den Flüssigkeiten übertragen werden, nach Möglichkeit aus Glas. War ein Anfassen mit einer Pinzette nicht zu umgehen, so diente dazu eine Platinspitzenpinzette. Aus den Reagentien war ein Eindringen von Eisen in die Schnitte nicht zu befürchten. Denn die Mengen der verwendeten Flüssigkeiten wurden so gering bemessen, daß ein nennenswerter Eisengehalt nicht mehr in Frage kam. Als Spülwasser wurde trotzdem vorsichtshalber frisch bereitetes redestilliertes Wasser benutzt.

Zunächst ließ sich feststellen, daß tatsächlich nach Behandlung mit Bromdämpfen in Blutausrichen eine Eisenreaktion, besonders schön mit Berlinerblau, zu erzielen ist. Morphologische Einzelheiten sind aber dann nicht mehr zu erkennen, die Struktur der Blutkörperchen wird durch die eingreifende Wirkung des Broms vollkommen zerstört. Es wurden nun Lebergefriserschnitte auf einen Objektträger aufgezogen und noch feucht in ein Glas mit eingeschliffenem Deckel gestellt, auf dessen Boden etwas flüssiges Brom sich befand. In dieser Bromatmosphäre wurden die Präparate bis zu 30 Minuten belassen, dann mit Wasser vorsichtig abgespült und gewartet, bis das Brom vollkommen verdampft war, was sich an der nunmehr schneeweißen Farbe des Schnittes zu erkennen gibt. Anschließend wurde die Schwefelammon-, die Berlinerblau- und die kombinierte Turnbells-Blau-Reaktion ausgeführt. Konserviert wurden die Schnitte nach Abtupfen mit Fließpapier in Glycerin, da sich herausgestellt hat, daß das Berlinerblau von Canadabalsam aufgenommen wird.

Die Ergebnisse sind folgende: Normale Leber gibt deutliche und schöne Eisenreaktion. Ein Vergleich mit nicht bromierter Leber zeigt einwandfrei eine verstärkte und stärker ausgebreitete Reaktion, die auch im Farbton merkbar dichter ist. Leber, die eines großen Teils ihres Eisens durch Kochen mit Salzsäure beraubt ist, und die ohne Vorbehandlung mit Brom nicht eine Spur Eisen erkennen läßt, auch nicht bei stundenlanger Einwirkung des Schwefelammons, weist nach Bromierung eine deutliche, wenn auch etwas schwächere Eisenfärbung auf. Es ist damit also der Beweis geliefert, daß eine Bromierung okkultes Eisen auch in Organpräparaten dem histochemischen Nachweis zugänglich macht. Der Ausfall der Eisenreaktion wird durch diese Vorbehandlung zweifellos gesteigert, bzw. überhaupt erst ermöglicht, es hat aber die Brombehandlung einen wesentlichen Nachteil: Die Gewebe werden nämlich verhältnismäßig stark angegriffen. Das Parenchym erscheint eigentümlich aufgequollen, etwa vergleichbar dem Bilde, das eine schon ziemlich angefaulte Leber gibt. Der Zellinhalt ist körnig oder schlierig getrübt und die Zellgrenzen sind verwaschen. Am besten widersteht den schädigenden Einflüssen das Bindegewebe.

Aus der Annahme heraus, daß die anderen Halogene nicht so stark

zerstörend auf die Gewebe wirken, wie das Brom, wurde anschließend zunächst ein Versuch mit Jod gemacht, teils in Dampfform, teils in methylalkoholischer Lösung. Es ergibt sich dabei aber, daß durch Joddämpfe sowohl Blutpräparate als Organpräparate eine stark braungelbe Färbung annehmen, die zähe festgehalten wird und weder durch Liegen an der Luft noch durch Lösungsmittel, wie Alkohol, ausgezogen werden kann. Eine positive Eisenreaktion wird durch diese Färbung vollkommen überdeckt. Neben diesem Übelstand trat bei Präparaten, die etwa 20 Minuten in methylalkoholische Jodlösung eingelegt wurden, der Verdacht auf, daß ein Teil des gebildeten Eisenjodids im Methylalkohol in Lösung ginge. Das bestätigte sich durch einen positiven Eisennachweis in dem jodhaltigen Alkohol.

Es galt also nun, ein Halogen zu verwenden, das die Gewebe nicht angreift, ihnen keine starke Färbung verleiht und in einer Form an die Präparate herangebracht werden kann, daß keine Lösung des entstandenen Halogenid eintritt. Es wurde daher eine Behandlung mit zunächst gasförmigem *Chlor* vorgenommen. Sie hatte das überraschende Ergebnis, daß sogar die doch so empfindlichen roten Blutkörperchen vollkommen unverändert erhalten blieben. Lebergewebe wird ebenfalls nicht angegriffen, die Bilder gleichen nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung vollkommen denen, die man bei gewöhnlicher histologischer Untersuchung erhält. Das Arbeiten mit gasförmigem Chlor ist aber umständlich, zeitraubend und unter Umständen nicht ganz ungefährlich. Verwendet man Tetrachlorkohlenstoff, der mit Chlor gesättigt ist, so vermeidet man die Nachteile des Chlorgases. Eisenchlorid ist in dieser Flüssigkeit unlöslich, so daß eine Lokalisationsveränderung nicht zu befürchten ist. Außerdem verdampft der Tetrachlorkohlenstoff in kurzer Zeit aus dem Präparat vollständig, so daß sich ein Auswaschen mit Wasser erübrigt, und daher eine damit verknüpfte Verschiebung des entstandenen Eisenchlorids nicht in Frage kommt.

Die Behandlung der Schnitte gestaltet sich nun folgendermaßen:

Von den in Formalin oder Alkohol gehärteten Organen werden auf die übliche Weise Gefrier- oder Paraffinschnitte angefertigt. Paraffinschnitte werden dann mit Xylol und Alkohol behandelt, Gefrierschnitte sofort in Alkohol entwässert. Die Schnitte werden auf der Oberfläche des mit gasförmigem Chlor gesättigten Tetrachlorkohlenstoff schwimmen gelassen. Die Übertragung geschieht mit Glas- oder Platinspatel und Glasnadel bzw. bei aufgezogenen Schnitten mit Platinspitzenpinzette. Nachdem das Chlor etwa 20 Minuten eingewirkt hat, werden die Schnitte herausgefischt und so lange gewartet, bis der Tetrachlorkohlenstoff und das Chlor völlig verdampft sind. Auf diese Weise kommt das gebildete Eisenchlorid mit Flüssigkeiten nicht mehr in Berührung. Anschließend wird dann sofort eine Eisenreaktion ausgeführt. Als Gegenfärbung kann man z. B. Bismarckbraun, Phenosafranin oder ähnliches anwenden.

Die nach dieser Methode erhaltenen Eisenfärbungen entsprechen in ihrem Verhalten zu okkultem Eisen vollkommen denen, die nach vorangegangener Bromierung erhalten werden. Eine regelmäßig wieder-

kehrende histochemische Eisenreaktion in der mit Salzsäure bis zum Verschwinden des üblichen Eisennachweises gekochten Leber beweist, daß auch mit Chlor okkultes Eisen zugänglich gemacht wird. Die entstehenden mikroskopischen Bilder zeichnen sich — was eigens hervorgehoben werden soll — durch überraschende Klarheit und Schönheit aus<sup>1</sup>. Ganz besonders aber ist das Chlorierungsverfahren außerordentlich günstig, da durch das Chlor die Gewebe nicht im geringsten angegriffen oder geschädigt werden, es wird nicht einmal der Bau der zarten roten Blutkörperchen gestört. Ein dritter und sehr wesentlicher Vorteil des geschilderten Verfahrens beruht darin, daß nach der Überführung des Eisens in das Chlorid keine Waschflüssigkeit mehr auf das Präparat einzuwirken braucht, durch die unter Umständen ein Teil des Halogenids gelöst werden könnte. Dadurch wird eine Lokalisationsänderung des Eisens, falls sie nicht durch die eigentliche Eisenreaktion stattfindet, unbedingt vermieden. Welch großer Wert darin liegt, daß keine Verschiebung des nachzuweisenden Metalles eintritt, darauf ist schon in der Einleitung hingewiesen worden.

Eine Lokalisationsveränderung des Eisens kann also nach vorangegangener Behandlung mit chlorhaltigem Tetrachlorkohlenstoff nur noch durch die Einwirkung der Eisenreagenzien stattfinden. Zunächst wurden angewandt die gewöhnliche Schwefelammonprobe und deren Erweiterung nach *Hueck* (Überführung des Schwefeleisens durch Behandlung mit Ferricyankali und Salzsäure in Turnbulls-Blau). Außerdem wurde die gewöhnliche Berlinerblaureaktion mit Ferrocyankali und Salzsäure ausgeführt. Von der *Stoelznerschen* Abänderung, der Ferro- und Ferricyankali verwendet, war aus naheliegenden Gründen kein besserer Erfolg zu erwarten. Ebenso wenig von dem Verfahren von *Nishimura*, der mit Schwefelammon gefälltes Schwefeleisen in Berlinerblau überführt und das für besser hält als die Turnbulls-Blau-Reaktion.

Der Vergleich von mit Schwefelammon und Ferrocyankali behandelten Präparaten hat ein bemerkenswertes Ergebnis: Es stellt sich heraus, daß das als Berlinerblau nachgewiesene Eisen diffus in den Zellen vorhanden ist. Der Grad der Blaufärbung ist verschieden, je nachdem wo die Zelle liegt. Im Gebiet um die Zentralvene herum ist die Reaktion stärker als an den Rändern, wo sogar eisenfreie Zellen anzutreffen sind. Aber in der einzelnen Zelle liegt eine gleichmäßige Färbung vor. Im Gegensatz dazu tritt nach Behandlung mit Schwefelammon ein körniger Niederschlag auf. Gibt man dann noch Ferricyankali und Salzsäure zu, so färbt sich der Niederschlag blau, und außerdem tritt auch hier eine diffuse Blaufärbung von verschiedener Stärke in den einzelnen Zellen auf.

<sup>1</sup> Für die Untersuchungen kam ein von der Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft zur Verfügung gestelltes modernes Zeiss-Mikroskop zur Verwendung.

Es ist nun wichtig, festzustellen, welche Reaktion die natürlichen Verhältnisse besser wiedergibt. *Hueck* hält zwar die Berlinerblau-Reaktion für ungenau in bezug auf die Menge des erfaßten Eisens, es sei das Verhältnis von Ferrocyankali und Salzsäure wichtig. Dieser Einwand wird aber hinfällig bei mit Chlor behandelten Präparaten; denn als Halogenid ist das Eisen unter allen Umständen vollständig als Berlinerblau nachweisbar. Es ist also die Berlinerblau-Reaktion bei chlorierten Präparaten der Schwefelammon-Reaktion zunächst einmal durchaus gleichwertig. Versetzt man nun eine Eisensalzlösung, in der das Eisen in einer Verdünnung von 1:10 000 000 oder 1:100 000 000 enthalten ist, im Reagensglas einerseits mit Schwefelammon, andererseits mit Ferrocyankali und Salzsäure, so wird man finden, daß selbst in dieser großen Verdünnung Schwefeleisen als Niederschlag ausfällt, während die Bildung von Berlinerblau sich nur durch eine Blaufärbung der Flüssigkeit kundgibt. Demnach scheint die Schwefelammonprobe, die das nachzuweisende Metall ausfällt, ungeeigneter zu sein, als eine, die nur auf einem Farbumschlag beruht. Es soll natürlich damit nicht geleugnet sein, daß Eisen auch primär in Pigmentkörnchen vorhanden ist, wo es dann auch histochemisch in Körnchenform nachgewiesen wird. Aber zum Nachweis des im Plasma kolloid oder anders gelösten Eisens ist die Berlinerblauprobe sicher geeigneter, da sie nicht wie das Schwefelammon zum mindesten einen Teil des Eisens zu Körnchen, also zu Artefakten, zusammenzieht.

Aber auch gegen die Berlinerblau-Probe ist, trotzdem sie sich zweifellos als recht brauchbar erweist, der Einwand zu erheben, daß durch die Behandlung mit Salzsäure sicher ein Teil des Eisens bzw. des Eisenchlorids in Lösung gebracht wird. Wenn es sich auch nur um sehr geringe Mengen handeln kann, so wird doch dabei eine Verschiebung in der Lagerung des Eisens unvermeidlich sein. Nur bei Verwendung gasförmiger Reagentien ist, wie oben ausgeführt, eine wirklich naturgetreue Wiedergabe der Lagerung möglich (*Liese gang*). Tatsächlich ist ein solches gasförmiges Reagens auf Eisen bekannt, nämlich der *Rhoda n-Wasserstoff*. Es ist aber, was auch *Hueck* bedauert, bis jetzt noch nicht gelungen, die Rhodanprobe in die Histochemie einzuführen.

Die Gründe für das Versagen der Rhodanprobe an histologischen Schnitten sind darin zu suchen, daß das Eisen in zu verwickelter Form vorliegt, während Rhodaneisen sich nur aus einfachen dreiwertigen Eisenverbindungen bildet. Es muß daher gelingen, die Vorteile des Rhodanwasserstoffes gegenüber den anderen Eisenreagentien auch histochemisch auszuwerten, sobald es möglich ist, eine einfache dreiwertige Eisenverbindung als Grundlage der Reaktion herzustellen. Diese Überführung des verwickelt gebundenen Gewebseisens in die reaktionsfähige Form gelingt durch die Vorbehandlung der Schnitte mit Chlor. Derartig chlorierte Präparate geben mit Rhodanwasser-



stoffgas eine kräftige Eisenreaktion. Das Rhodaneisen, das in Form einer leuchtend roten und gut durchscheinenden Farbe entsteht, liefert schöne mikroskopische Bilder und läßt die Lokalisation des Eisens zweifelsfrei erkennen.

Das histochemische Verfahren ist sehr einfach:

Die Schnitte werden auf die angegebene Weise mit chlorhaltigem Tetrachlorkohlenstoff behandelt. Sowie der Tetrachlorkohlenstoff verdampft ist, werden sie sofort dem Rhodanwasserstoff ausgesetzt. Am besten legt man den Objektträger oder das Deckglas, auf dem sie aufgezogen sind, umgekehrt über ein Blockschälchen, in dem aus Rhodankali und Salzsäure der Rhodanwasserstoff entwickelt wird. In ganz kurzer Zeit tritt die stark rote Farbe des Rhodaneisens in Erscheinung. Die mikroskopische Untersuchung erfolgt nach Einschluß der Präparate in Glycerin. Leider beginnt die rote Färbung nach einigen Minuten abzublassen und verschwindet nach etwa 10 Minuten vollständig. Durch erneute Einwirkung von Rhodanwasserstoff kann sie wieder, wenn auch nicht in derselben Stärke, hervorgerufen werden. Ein drittes Mal läßt sich im allgemeinen die Reaktion nicht mehr erzielen. Da es bis jetzt noch nicht gelungen ist, die Färbung der Schnitte bleibend zu erhalten, sind die mit Rhodanwasserstoff gewonnenen Präparate zur Konservierung nicht geeignet.

Die großen Vorteile der Rhodanprobe auf histochemischem Gebiet liegen in Folgendem: Zunächst wird unbedingt jegliche Lokalisationsveränderung des Eisens im Verlaufe der Behandlung vermieden. Keine Flüssigkeit, in der das gebildete Eisenchlorid löslich ist, kommt mit dem Präparat in Berührung. Der zweite wesentliche Vorzug liegt darin, daß die Erfassungsgrenze bei der Rhodanprobe noch bedeutend niedriger liegt als beim Berlinerblau. Nach *Rüdigsüle* ist die Erfassungsgrenze für die Berlinerblaureaktion  $0,07 \mu\text{g}$  Eisen, während *Emich* und *Donau* für die Rhodanprobe den Wert von  $0,0025 \mu\text{g}$  Eisen festgestellt haben.

Auf die ungeheure Wichtigkeit, die darin liegt, die Erfassungsgrenze für ein Metall zu erhöhen, ist schon in der Einleitung eingehend hingewiesen worden. Es soll hier nur soviel gesagt werden, daß durch die Einführung der Rhodanprobe mit vorhergehender Chlorierung wegen ihrer hohen Empfindlichkeit, wegen ihrer genauen Wiedergabe der Lokalisation und wegen der Darstellung des okkulten Eisens neue Möglichkeiten auf dem Gebiete der histochemischen Eisenforschung eröffnet sind.

### Zusammenfassung.

Die Untersuchungen über histochemische Nachweise der Metalle Blei, Kupfer, Zinn und Eisen zeigen folgende Ergebnisse:

1. Zum Nachweis von Blei ist das geeignete Reagens der Schwefelwasserstoff. Es gelingt aber nur der Nachweis von intravenös eingespritztem Blei.

2. Kupfer wird ebenfalls am besten mit Schwefelwasserstoff nachgewiesen. Auch hier glückt der Nachweis nur an dem intravenös eingespritzten Metall.

3. Ein befriedigender histochemischer Zinnnachweis ist bis jetzt, auch auf dem Wege der Farblackbildung, nicht gelungen.

4. Die seit langem gebräuchlichen histochemischen Eisenreaktionen sind mangelhaft, weil sie die Lokalisation des Metalles verändern und das okkulte Eisen nicht zur Darstellung bringen.

Durch Vorbehandlung mit chlorhaltigem Tetrachlorkohlenstoff gelingt es einmal, die Lagerungsverhältnisse des Eisens unverändert zu erhalten, andererseits wird dadurch das okkulte Eisen dem Nachweis zugänglich gemacht.

Außerdem kann, was bis jetzt nicht möglich war, nach Chlorierung die Rhodanprobe angewandt werden, die infolge ihrer besonderen Empfindlichkeit eine weitere Steigerung des histochemisch nachweisbaren Eisens bedeutet.

#### Schrifttum.

- Abderhalden*: Z. Biol. **39**, 113 (1900). — *Abegg*: Handbuch der anorganischen Chemie. Bd. 3, Abt. 2, S. 594 ff. u. 890 ff. Leipzig 1909. — *Almkvist*: Zit. nach *Christeller* und *Sammartino*. Nord. med. Ark. (schwed.) **2** (1903). — *Becher*: Untersuchungen über Echtfärbung der Zellkerne. Berlin 1921. — *Behrens*: Anleitung zur mikrochemischen Analyse. Hamburg und Leipzig 1899. — *Beilstein*: Handbuch der organischen Chemie. Bd. 3, S. 216. Berlin 1921. — *Bielefeld*: Zit. nach *Hueck*: S. 198. Beitr. chem. Physiol. u. Path. **2** (1902). — *Boecker*: Zbl. Path. **41**, H. 5, 193 (1928). — *Borchard*: Virchows Arch. **267**, 272 (1928). — *Botiller*: Die Beizen. Wien und Leipzig 1920. — *Boyce* u. *Herdman*: Zit. nach *Macallum*: S. 617 ff. Proc. roy. Soc. **62** (1898). — *Breitenstein*: Repetitorium der quantitativen Analyse. Teil: Elektrolyse. — *Brown*: J. of exper. Med. **13**, 5 (1911). Zit. nach *Hueck* in *Krehl-Marchand* S. 335. — *Brunsvik*: Naturwiss. **11**, 881 (1923). — *Bunge*: Z. physiol. Chem. **9**, 49 (1885). — *Califano*: Z. Krebsforschg **26**, H. 3 (1928). — Krankheitsforschung 1928. — *Christeller*: Verh. dtsch. path. Ges. **22**. Danzig 1927. — *Christeller* u. *Komaja*: Med. Klin. **16** (1926). — *Christeller* u. *Kaiser*: Med. Klin. **16** (1926). — *Christeller* u. *Sammartino*: Z. exper. Med. **1928**. — *Chursch*: Zit. nach *Macallum*: S. 618. Trans. roy. Soc. **159** (1869) u. **51** (1892). — *Cohen*: In *Abeggs* Handbuch. Bd. 3 II, S. 594 ff. — *Eder*: Zit. nach *Klein*: in *Klein-Strebinger* S. 63. — *Eckardt*: Z. Unters. Nahrungsmitt. usw. **18** (1909). — *Emich*: Lehrbuch der Mikrochemie. München 1926. — *Emich* u. *Donau*: Mh. Chem. **28**, 825 (1907). — *Fitz-Gerald*: Zit. nach *Patzelt* in *Klein-Strebinger* S. 73. — *Fleming*: Ref. Chem. Zbl. **2**, 1613 (1924). — *Fredericq*: Zit. nach *Macallum* S. 617. C. r. Soc. Biol. Paris **115** (1893). — *Freund* u. *Bachrach*: In *Beilsteins* Handbuch. Bd. 3, S. 216. — *Liebigs* Ann. **285**. — *Gadamer*: Lehrbuch der chemischen Toxikologie. S. 196 ff. Göttingen 1924. — *Gibson*: Rep. Brit. Assen. Adv. Sci. **1892**. Zit. nach *Macallum* S. 585 ff. *Gmelin-Kraut*: Handbuch der anorganischen Chemie. Bd. 4 I, S. 276 ff. u. 341 ff. Heidelberg 1911. — *Graham*: In *Abeggs* Handbuch. Bd. 3 II, S. 896 und in *Gmelin-Kraut*. Bd. 4 I, S. 278. — *Günther*: Z. Unters. Nahrungsmitt. usw. **2**, 915 (1899). — Z. off. Chem. **16**, 443 (1910). — *Hall*: Arch. f. Physiol. **1896**. — *Halliburton*: Zit. nach *Macallum*. S. 618. — J of Physiol. **13** (1892). — *Hammarsten*: Lehrbuch der physiologischen Chemie 1926. — *Hanslik* u. *Presho*: J. of Pharmacol. **21**, 2 (1923). Ref. Physiol. **20**, 226 (1923). — Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **19**, 4 (1922). Ref. Ber. Physiol. **13**, 191 (1922). — *Harless* u. *Bibra*: Zit. nach *Macallum*. S. 617. — *Müllers* Arch. 1847. — *Henze*: Z. physiol. Chem. **33**, 370 u. 417 (1901). — *Hesse*:

Arch. f. exper. Path. **1925**, 1907; **1926**, 117. — *Hueck*: Beitr. path. Anat. **54**, 68 (1912). — In *Krehl-Marchand*. Bd. 3, Abt. 2, S. 272 ff. — *Iwashi*: Zit. nach *Christeller* und *Samartino*: Verh. jap. path. Ges. **1927**. — *Jakobi*: Diss. Straßburg 1887. — *Järvinen*: Z. Unters. Nahrungsmitt. usw. **45**, 191 (1923). — *Jolles*: Münch. med. Wschr. **1091**, 372. — *Justus*: Arch. f. Dermat. **57**, (1901); **60** (1901); **75** (1905). — *Kempj*: Naturwiss. **9**, 308 (1921). — Z. anal. Chem. **62**, 284 (1922). — *Klein*: Praktikum der Histochemie. Berlin 1929, S. 65 f. — In *Klein-Strebinger*. S. 58 ff. — *Klein-Strebinger*: Fortschritte der Mikrochemie. Leipzig und Wien 1928. *Kohsaku* u. *Yokoyama*: Trans. jap. path. Soc. **14** (1924). Ref. Ber. Physiol. **37** (1926). — *Kolthoff*: Chem. weeklb. **21**, 2 (1924). Ref. Ber. Physiol. **27** (1924). — *Komaja*: Arch. Dermat. f. **149** (1925). — *Krehl-Marchand*: Handbuch der allgemeinen Pathol. Bd. 3, Abt. 2, S. 272 ff. Leipzig 1921. — *Kunkel*: Z. physiol. Chem. **5**, 40 (1881). — *Kurosu*: Z. exper. Med. **57**, H. 1/2 (1927). — *Laitlaw*: J. of Physiol. Zit. nach *Macallum*. S. 581. — *Lauda* u. *Haam*: Beitr. path. Anat. **74**, 85 (1925). — *Leschke*: Z. klin. Med. **81** (1914). — *Liesegang*: Biochem. Z. **28**, 413 (1910). — Z. wiss. Mikrosk. **31** (1914); **40** (1923). — *v. Lingen*: Diss. Dorpat 1891. Zit. nach *Hueck*. S. 198. — *Lottermoser*: In *Abeggs* Handbuch. Bd. 3 II, S. 800 ff. — *Lubavin*: Ber. dtsh. chem. Ges. **10** (1877). Zit. nach *Macallum*. S. 583. — *Macallum*: Erg. Physiol. **7**, 567 (1908). — *Meyer, E.*: Zit. nach *Hueck*. S. 206. — *Minkowski* u. *Naunyn*: Arch. f. exper. Path. **21**, 1 (1886). — *Misk*: C. r. Acad. Sci. Paris **176**, 2 (1923). Ref. Ber. Physiol. **18** (1923). — *Molisch*: Die Pflanze in ihrer Beziehung zum Eisen. Jena 1892. — Ber. dtsh. bot. Ges. **11**, 73 (1901). — Mikrochemie der Pflanze. Jena 1923. — *Montequi*: An. Soc. Espanola Fis. Chim. **25** Santiago. Ref. Chem. Zbl. **1**, 2453 (1927). — *Monti*: Arch. di Fisiol. **11** (1913). Zit. nach *Patzelt* in *Klein-Strebinger*. S. 73. — *Müller, C.*: Ber. dtsh. bot. Ges. **11** (1893). — *Nestler*: Zit. nach *Klein-Strebinger*. S. 63. — *Neumann*: Zit. nach *Hueck*. S. 103 ff. — *Neumeister*: Lehrbuch der physiologischen Chemie. Zit. nach *Boecker*. S. 196. — *Nishimura*: Zbl. Path. **21**, 1 (1910). — *Oppenheimer*: Lehrbuch der Chemie (Abschnitt Zinn). Leipzig 1923. — *Parri*: Giorn. farm. Chim. **73**. Ref. Chem. Zbl. **2**, 2190, 2683 (1924). — *Patzelt*: In *Klein-Strebinger*. S. 69 ff. — *Perls*: Virchows Arch. **39**, 42 (1867). — *Policard*: Zit. nach *Patzelt* in *Klein-Strebinger*. S. 108 f. — *Quinke*: Arch. f. Anat. **1868**, 757. — *Röhmman* u. *Steinitz*: In *Rüdisüle*. S. 271 ff. — *Rüdisüle*: Nachweis, Bestimmung und Trennung der Elemente. Bd. 4, S. 125 ff. Bern 1913. *Schiff*: Liebigs Ann. **125**, 146 (1863). — In *Gmelin-Kraut*. Bd. 4 II, S. 342. — *Schmidt, M. B.*: Zit. nach *Hueck*. S. 85 ff. — *Schneider, R.*: Sitzgsber. Ges. naturforsch. Freunde Berl. 1923. — Arch. f. Naturgesch. **1924**, Abt. A 4. — *Schoeller*: Ber. dtsh. chem. Ges. **55** (1922). — *Siebert*: Arch. f. Dermat. **75**, 82 (1905). — *Slowtsoff*: Beitr. chem. Physiol. u. Path. **2**, 307 (1902). — *Spacu*: Bull. Soc. da Stiinte din Cluj. **3** (1926). Ref. Chem. Zbl. **1**, 775 (1927). — *Stender*: Diss. Dorpat 1891. — *Stoeltzner*: Zbl. Path. **30**, 10 (1919). — *Tada*: Verh. japan. path. Ges. **1927**. Zit. nach *Christeller* und *Sammartino*. — *Tunmann*: Pflanzenmikrochemie. Berlin 1913. — *Ungar* u. *Bodländer*: Chem.-Ztg. **8**, 218 (1884). — *Unna*: Zit. nach *Patzelt* in *Klein-Strebinger*. S. 78. — *Vaubel*: Chem. Ztg. **48**, 351 (1924). — *Vonkennel*: Verh. dtsh. dermatol. Ges. Bonn 1927. — *Warburg* Biochem. Z. **187** (1927). — *Wiener*: Biochem. Z. **77**, 25 (1916). — *Zacharias*: Progr. rei bot. **3** (1903). Zit. nach *Boecker* und *Wiener*. — *Zaleski*: Z. physiol. Chem. **10**, 453. — *Zimmermann*: Die botanische Mikrotechnik. Tübingen 1892.