

lich nicht an Gicht erkrankt wäre, wenn nicht infolge der Leukämie der Harnsäurespiegel des Blutes abnorm hohe Werte erreicht hätte. In diesem Sinne fällt also der Leukämie zum mindesten die Rolle einer *auslösenden Ursache* zu. Das Zusammentreffen mit der Gicht kann nicht als etwas rein Zufälliges betrachtet werden; ein gewisser innerer Zusammenhang ist zweifelsohne anzuerkennen.

Histologische Darstellungsmethoden der Harnsäure und der Urate.

Von

A. Schultz und W. Schmidt, technische Assistentin am Institut.

Vergeblich sucht man in den Lehrbüchern der histologischen Technik nach Methoden, die eine färberische Darstellung der Harnsäure und der Urate ermöglichen. *Aschoff*, ebenso *Eckert*, benutzten alkoholische Lösungen von Bismarkbraun, um Harnsäurekügelchen und Sphärolithe beim künstlich erzeugten Harnsäureinfarkt bräunlich anzufärben. *Ebstein* und *Nicolaier* erzielten (außer mit Bismarkbraun) mit Boraxcarmin und alkoholisch-alkalischer Methylenblaulösung eine Anfärbung von künstlich erzeugten Sphärolithen. Die von *Courmont* und *André* angegebene Methode der Harnsäuredarstellung mittels Silbernitrat hat sich *Schmorl* nicht bewährt; wird hingegen von *Bauer* empfohlen. Für unsere Untersuchungen erwies sie sich als unbrauchbar. Schon bei der Vorbehandlung mit 1%iger Ammoniaklösung lösten sich fast augenblicklich Harnsäure und Urate restlos auf. *Brogsitter* bediente sich der *Schmorl'schen* Knochenkörperchenfärbung, um an gichtischen Gelenknorpeln nach Lösung der Uratkrystalle deren zurückgelassene Spalten und Höhlen sichtbar zu machen. Neuerdings hat *Pommer* eine Methode mitgeteilt, mit deren Hilfe es ihm gelungen ist, am entkalkten Knochen die Urate selbst anzufärben. Sowohl zur Entkalkung wie zur Färbung fand er in der Pikrinsäure ein sehr geeignetes Mittel. Pikrinsaures Eisenoxyd stellte gleichzeitig eine geeignete Beize dar, um mit alkoholischer Hämateinlösung eine gute Anfärbung der Kerne und Gewebe zu erzielen. Unabhängig von *Pommer* fanden auch wir, daß Urate sich mit Pikrinsäure gelb färben lassen. Den ersten Anstoß zu eingehenden Versuchen über Färbemöglichkeiten der Harnsäure und ihrer Salze gab uns jedoch der überraschende Befund, daß in einem nach *Best* auf Glykogen gefärbten Präparat der Niere unseres Falles die Harnsäurekrystalle innerhalb der Harnkanälchen leuchtend rot erschienen. Später wiederholte Färbungen, bei denen wir genötigt waren, andere Carminsorten zu verwenden, mißlangen stets. Erst eine Abänderung der Glykogenfärbung, die sich an die *Fraenkelsche* Methode anlehnt, führte

zu gleichmäßigen und sehr befriedigenden Ergebnissen. Bei kurzer Färbedauer konnte dabei eine gleichzeitige Mitfärbung des Glykogens mit Sicherheit vermieden werden. Nachstehend geben wir die genauen Färbevorschriften wieder.

Methode I.

Färbung des Harnsäureinfarktes und der krystallinischen Harnsäure.
(Modifizierte Färbung nach *Best-Fraenkel*.)

Fixierung in absolutem Alkohol. (Das *Carnoysche* Gemisch bot uns keine besonderen Vorteile.) Übertragen dünner Scheiben auf 4–5 Stunden in 3mal gewechseltes Aceton.

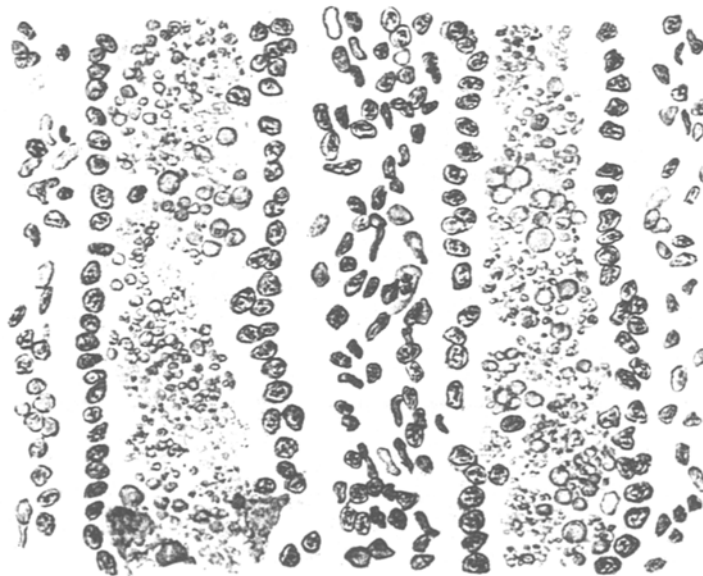


Abb. 6. Harnsäureinfarkt eines Neugeborenen. Carminfärbung nach Methode I.

Paraffineinbettung.

Nach Entparaffinieren zweimaliges Abspülen in absolutem Alkohol.

Färbung in folgendem (gut ausgereiften) *Alaunhämatoxylin*:

Hämatoxylin pur. crist.	10 g
Alkohol 96%	100 ccm
Ammoniakalaun	20 g
Aqu. dest.	900 ccm

Hämatoxylin zunächst im Alkohol lösen. 20 g Ammoniakalaun in 200 ccm Aqu. dest. unter leichtem Erwärmen lösen und der Hämatoxylinlösung hinzusetzen. Zuletzt auf 1000 ccm mit Aqu. dest. auffüllen. Vor Gebrauch filtrieren.

Farblösung auf den Schnitt gießen. Unter ständigem Bewegen $\frac{1}{2}$ bis 1 Minute färben.

Ganz kurzes Differenzieren (2maliges Eintauchen) in absolutem Alkohol mit $\frac{1}{2}\%$ igem Salzsäurezusatz. Übertragen in absoluten Alkohol, dem auf 50 ccm

5 Tropfen Ammoniak zugesetzt sind, bis der Schnitt blau erscheint. Abspülen in 3mal gewechseltem absolutem Alkohol. Anschließend folgende *Carminfärbung*:

Stammlösung (begrenzte Zeit haltbar):

Carmin (besonders geeignet Marke „Nakarate“)	1 g
Ammoniumchlorid	2 g
Lithiumcarbonat	0,5 g
Aqu. dest.	50 cem

Das Gemisch aufkochen. Nach Erkalten 20 cem Liqu. Ammon. caust. zusetzen.

Zur Färbung folgendes (kurze Zeit haltbares) Gemisch verwenden:

Stammlösung (filtriert)	3 cem
Ammoniak 0,960	1,5 cem
Methylalkohol	2,5 cem

Die Farblösung muß klar sein. Farblösung auf den Schnitt gießen. Zwischen zwei Petrischalen unter leichtem Bewegen 5 Minuten färben.

Mehrfach mit absolutem Alkohol abspülen.

Xylol. Balsam.

Ergebnis: Kerne blau. *Stark rot* färben sich *Harnsäurekrystalle* (vgl. Abb. 1), sowie die *kolloidalen Tropfen und Sphärolithe beim Harnsäureinfarkt* (vgl. Abb. 6), während Mononatriumurat ungefärbt bleibt. Protoplasma und Bindegewebe leicht rötlich. Sehr deutlich treten die Basalmembranen der Harnkanälchen hervor. Glykogen bleibt bei genauer Einhaltung der Färbedauer ungefärbt.

Methode II.

Färbung des Harnsäureinfarktes.

(Methylenblau-Pikrinsäurefärbung.)

Fixierung und Einbettung wie bei Methode I. Färbung der Kerne mit *Alaun-hämatoxylin* und anschließende Differenzierung wie unter I.

Nach gründlichem Abspülen in absolutem Alkohol einlegen auf 5 Minuten in folgendes Gemisch:

Methylalkohol	8 Teile
Ammoniak	2 Teile
Kurzes Abspülen in absolutem Alkohol.	

Färben in konzentrierter alkoholischer (96%iger) *Methylenblaulösung*, die zur Hälfte mit absolutem Alkohol verdünnt ist, etwa $\frac{1}{2}$ Minute (Farblösung auf den Schnitt gießen und bewegen).

Abspülen mit absolutem Alkohol, bis keine Farbwolken mehr abgehen.

Färben mit gesättigter *Pikrinsäurelösung* in absolutem Alkohol, der auf 30 cem 10 Tropfen einer konzentrierten Lösung von Säurefuchsin in 96%igem Alkohol zugesetzt sind (aufgießen und bewegen!) $\frac{1}{4}$ Minute.

Mehrfach mit absolutem Alkohol abspülen.

Xylol. Einschließen in *rektifiziertem Kanadabalsam*, da sonst Pikrinsäure-niederschläge entstehen.

Ergebnis: Kerne blauschwarz. Protoplasma teils gelblich, teils rötlich, mitunter leuchtend rot. An den Epithelien der Tubuli contorti tritt der rot gefärbte Bürstensaum sehr schön hervor. Deutlich gesteigert ist der „*van Gieson-Effekt*“, indem namentlich das kollagene Gewebe bis zu den feinsten Fasern sehr bestimmt rot angefärbt wird; selbst

Gitterfasern und Basalmembranen kommen vorzüglich zur Darstellung. *Kolloidale Harnsäure und Sphärolithe färben sich leuchtend grün* (vgl. Abb. 7).

Methode III.

Färbung des Mononatriumurats. (Methylenblau-Pikrinsäurefärbung.)

Fixierung und Einbettung wie oben angegeben. Kernfärbung mit Alaun-hämatoxylin ist hier nicht angebracht, da dieses in geringem Maße die Uratkristalle



Abb. 7. Harnsäureinfarkt eines Neugeborenen. Methylenblau-Pikrinsäurefärbung nach Methode II.

löst. Am zweckmäßigsten ist eine Verbindung der modifizierten *Fraenkel-Carminfärbung* mit einer etwas abgeänderten Methylenblau-Pikrinsäurefärbung.

Nach Entparaffinieren und Abspülen mit absolutem Alkohol, *Carminfärbung* wie unter I angegeben.

Abspülen in mehrfach gewechseltem absolutem Alkohol.

Färbung in *alkoholischer Methylenblaulösung* (wie unter II) etwa $\frac{1}{2}$ Minute.

Abspülen in absolutem Alkohol.

Färben in folgendem *Pikrinsäuregemisch*:

Konzentrierte *wäßrige* Pikrinsäurelösung 9 cem

Heiß gesättigte wäßrige Natriumsulfatlösung 1 cem

Das filtrierte Gemisch auf den Objektträger gießen und unter Bewegungen etwa 15 Sekunden färben.

Abspülen in mehrfach gewechseltem absolutem Alkohol.

Xylol. Einschließen in *rektifizierten* Kanadabalsam.

Ergebnis: Kerne graublau, manchmal graurötlich. Protoplasma gelblich. *Mononatriumurat leuchtend grün* (vgl. Abb. 3). *Krystallinische Harnsäure tief blaugrün*.

Für die Betrachtung aller nach vorstehenden Methoden gefärbten Präparate empfiehlt es sich, eine starke künstliche Lichtquelle und *Blaufilter* zu verwenden.

Bei Ausarbeitung der Färbemethoden wurde selbstverständlich genau darauf geachtet, daß eine Lösung oder Formänderung der Krystalle nicht eintrat. Hierzu dienten uns vor allem vergleichende Untersuchungen am ungefärbten Präparat mit Hilfe des Polarisationsmikroskopes. Von der Spezifität der Färbungen überzeugten wir uns durch Nachprüfung an reinen Substanzen. Es wurden Harnsäurekrystalle und Mononatriumurat, ferner uns freundlicherweise von Herrn Professor *Schade* zur Verfügung gestellte kolloidale Harnsäure in Celloidin eingebettet und am Schnittpräparat untersucht. Wie zu erwarten war, handelt es sich bei unseren Färbungen nicht um eine Spezifität im strengsten Sinne. So beobachteten wir bei der Methylenblau-Pikrinsäurefärbung gelegentlich eine Grünfärbung hyaliner Massen, besonders auch des Amyloids; in einem Falle kam es zu einer partiellen Anfärbung des tropfigen Hyalins in Nierenepithelien. Bei Anwendung mehrerer Methoden, besonders auch bei Zuhilfenahme des Polarisationsapparates, werden sich indessen Irrtümer leicht vermeiden lassen.

Der Nutzen der Färbung ist offensichtlich. Er besteht einmal in einer sehr eindrucksvollen farbigen Darstellung, der sonst schwer sichtbaren krystallinen und tropfigen Gebilde. Zweitens wird eine sichere Unterscheidung gegenüber anderen morphologisch ähnlichen Bildungen, wie etwa Verkalkungen, ermöglicht. Vor allem aber sind wir in die Lage versetzt, Harnsäure und Urate auf Grund ihres verschiedenen färberischen Verhaltens voneinander zu trennen. Wir glauben hiermit eine bisher vorhandene Lücke in der histologischen Untersuchungstechnik ausgefüllt zu haben.

Schrifttum.

- Aschoff, L.*: Verh. dtsch. path. Ges. 2. Tagg 1900, 422. — *Bauer, E.*: Virchows Arch. 225, 1 (1918). — *Brogsitter, A. M.*: Zbl. Path. 33, 429 (1922/23). — *Brugsch, Th.*: Z. exper. Path. u. Ther. 6, 278 (1909). — *Ebstein, W.*: Virchows Arch. 154, 349 (1898). — *Ebstein u. Nicolaier*: Virchows Arch. 123, 373 (1891). — *Eckert, A.*: Arch. f. exper. Path. 74, 244 (1913). — *Glückmann, S.*: Leukämie und Gicht. Inaug.-Diss. Berlin 1910. — *Hagedorn, K.*: Z. klin. Med. 104, 124. — *Marchand, F.*: Dtsch. med. Wschr. 1901, Ver.-Beil. Nr 23, 179. — *Pommer, G.*: Mikroskopische Untersuchungen über Gelenkgicht. Jena 1929. — *Schmidt, M. B.*: Ablagerung harnsaurer Salze. Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. 3, 2, S. 268. — *Schmorl, G.*: Untersuchungsmethoden, 4. Aufl. 1907.
-