

(Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Leipzig
[Direktor: Prof. Dr. med. G. Raestrup].)

Der histochemische Nachweis des „normalen“ Bleis in menschlichen Hartgeweben.

Von

Privatdozent Dr. med., Dr. phil. Friedrich Timm.

Mit 3 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 16. Mai 1936.)

In der Erforschung der Bleivergiftung sind in den letzten Jahren so erhebliche Fortschritte erzielt worden, daß die Frage nach Aufnahme, Ausscheidung und Verteilung des Bleis im Körper auch in quantitativer Beziehung als geklärt angesehen werden kann. Es hat sich herausgestellt, daß Blei eine große Affinität zu allen kalkhaltigen Geweben des Körpers besitzt und vorwiegend im Skelet abgelagert wird (*Flury*¹). Dies haben *Behrens* und *Baumann*² mittels der Autohistoradiographie, bei der ein radioaktives Isotopes für Blei als Indicator verwendet wird, überzeugend veranschaulichen können. Besonders funkenspektrophotographisch ist Blei leicht nachweisbar und von *Gerlach*³ auch in Verkalkungen und Steinbildungen des menschlichen Körpers gefunden worden. Durch umfassende quantitative Untersuchungen von Knochenaschen sog. „bleifremder“ Menschen, die nicht beruflich Blei haben aufnehmen können, ist von *Barth*⁴, *Weyrauch*⁵ u. a. gezeigt worden, daß Blei in kleinen Mengen stets in menschlichen Knochen vorhanden ist, daß dieser Bleigehalt mit dem Lebensalter ansteigt und in 3 g Knochenasche durchschnittlich 0,1 bzw. 0,2 mg betragen kann.

Höhere Bleimengen sind bei Menschen nachgewiesen worden, die in bleiverarbeitenden Betrieben beschäftigt gewesen sind oder die sonst beruflich mit Bleiverbindungen zu tun gehabt haben. Besonders hohe Bleiwerte sind in Knochenaschen Bleikranker gefunden worden. Es kann somit nicht zweifelhaft sein, daß der Bleigehalt in den Knochen all dieser Menschen aus dem normalen und dem gewerblich aufgenommenen Blei sich zusammensetzt. Bei dieser Voraussetzung würde der Unterscheidbarkeit dieser ätiologisch verschieden entstandenen Bleiaufnahmen nicht nur für die Beurteilung der chronischen Bleivergiftung, sondern auch für wichtige histophysiologische Untersuchungsmöglichkeiten eine hohe Bedeutung zukommen.

Bisher ist der Nachweis einer chronischen Bleivergiftung letztlich durch den über die Norm erhöhten Bleigehalt geführt worden, da bei den zahlreichen Untersuchungen sich herausgestellt hat, daß beruflich

oder sonstwie entstandene außergewöhnliche Bleizufuhr zu einer Erhöhung des Bleispiegels führt, die besonders in Knochen lange nachweisbar bleibt. Die Frage, wo und wie Blei im Knochen vorhanden ist, ist jedoch noch völlig offen, insbesondere auch die, ob der Verbleib des „normalen“ Bleis ein anderer ist, als der des gewerblich zugeführten.

Es bedarf keiner näheren Begründung, daß der Verbleib des Bleis mit Hilfe analytischer Verfahren, selbst wenn sie sich auf bestimmte Abschnitte des Knochens erstrecken würden und noch beträchtlich verfeinert werden könnten, nicht eindeutig festzustellen ist. Die funken-spektrographische und die mikrochemische Erfassungsgrenze liegt für Blei bei etwa $0,1 \gamma$ ($0,1 \cdot 10^{-6}$ g), die quantitative Bestimmungsgrenze bei etwa 10γ . Die so erfaßbaren Mengen genügen keineswegs den Anforderungen, die die Lösung des Problems, *Feststellung des Ortes der Bleiablagerung gegenüber dem Feinbau des Knochens*, verlangt.

Es ist daher versucht worden, auf *histochemischem Wege* einer Lösung der Fragen näherzukommen. Überblickt man die Vorbedingungen hierfür, so kann davon ausgegangen werden, daß im 10μ dicken Querschnitt eines größeren ($0,3$ mm) *Haversschen* Systems bei dem voranstehend genannten normalen Bleigehalt schätzungsweise $30-40 \mathcal{F}$ (1 Digamma = 10^{-12} g) Blei vorhanden sein können. Diese Menge ist für histochemische Begriffe verhältnismäßig hoch. Ein Bleisulfidteilchen von der Größe eines kleinen Coccus (1μ) wiegt etwa $4 \mathcal{F}$ und ein $0,5 \mu$ großes, gerade noch sichtbares $0,4 \mathcal{F}$, so daß im Querschnitt eines *Haversschen* Systems immerhin eine größere Anzahl Teilchen dieser Größe sichtbar sein könnte.

Da Calciumphosphat in äußerst feinen Körnchen in Knochen liegen soll, darf für Blei, das offenbar als ähnliche Verbindung im Knochen vorhanden ist, wohl die gleiche feine Einlagerung vorausgesetzt werden. Es wird somit zu vermuten sein, daß Bleiteilchen, selbst in dunkelfarbige Verbindungen, in Bleisulfid, umgewandelt, im Mikroskop nicht erkannt werden können.

Vor einigen Jahren ist von uns gezeigt worden, daß feinste Schwermetallteilchen in sog. optisch leeren Gewebsschnitten im Dunkelfeld nachgewiesen werden können (*Timm*⁶). Mit Hilfe des hierbei verwendeten Verfahrens ist es gelungen, die Bleieinlagerungen im Knochen bei experimenteller Bleivergiftung histochemisch zu erkennen — die Befunde hat *Sieber*⁷ kürzlich mitgeteilt — und nunmehr auch die Verteilung und Ablagerung des „normalen“ Bleis in menschlichen Knochen in den Einzelheiten festzustellen.

Die ursprüngliche Lagerung der annehmbar als tertiäres Phosphat im Knochengewebe vorhandenen Ablagerungen des „normalen“ Bleis läßt sich durch Behandlung der frischen Knochenstücke mit Schwefelwasserstoff festhalten. Bei geeignetem Vorgehen sind hierbei Umlagerungen nicht zu befürchten. Denn es handelt sich um die Umwandlung der im Knochengewebe eingelagerten hier in Betracht kommenden Teile

in solche von äußerst niedriger Löslichkeit. Die Entkalkung der so behandelten Knochenstücke muß bei Gegenwart von Schwefelwasserstoff vorsichtig und schonend erfolgen, um Lösung und Verlagerung der als Sulfid fixierten Bleiteilchen zu vermeiden. Als Entkalkungsmittel ist bei den Untersuchungen 30%ige Ameisensäure verwendet worden.

Es gelingt zwar auch, Knochenschliffe optisch leer zu machen, in ihnen wird aber durch die Behandlung mit Schwefelwasserstoff außer Blei auch Eisen in Sulfid umgewandelt sichtbar, das die Erkennung der Bleiablagerung stört. Für den Nachweis des Bleis sind demnach Schliffe weniger geeignet. Durch die entkalkende Säure wird jedoch gleichzeitig Eisensulfid im Gegensatz zum Bleisulfid herausgelöst. Von den anderen Schwermetallen, die wie Blei mit Schwefelwasserstoff in Säuren schwerlösliche Sulfide bilden, seien vornehmlich genannt: Silber, Kupfer, Wismut, Arsen und Zinn. Von diesen sind normalerweise wohl immer Kupfer und Zinn in kleinen Mengen im Knochen vorhanden. Kupfersulfid ist in Kaliumcyanidlösung, Zinnsulfid in gelbem Schwefelammon löslich, sie sind so aus den Schnitten entfernbar und auch entfernt worden.

Die Vorbereitung des Untersuchungsmaterials ist in der eben geschilderten Weise unter Fixierung der Bleiablagerungen folgendermaßen vorgenommen worden:

Knochenscheiben aus Diaphyse und Epiphyse sind in Schwefelwasserstoff gesättigtem Alkohol fixiert, in Schwefelwasserstoff gesättigter 30%iger Ameisensäure entkalkt, nach der Entkalkung in mehrmals gewechselter 5%iger Natriumsulfatlösung und endlich in schwefelwasserstoffhaltigem destillierten Wasser säurefrei gewaschen worden. Von den Knochenstücken sind Gefrierschnitte hergestellt, die zum Teil nach Färbung oder nach Behandlung mit Kaliumcyanid- und gelber Schwefelammonlösung in üblicher Weise über aufsteigenden Alkohol und Brombenzol in Brombenzolkannadabalsam eingedeckt worden sind.

Die Diaphysenteile nehmen während der Entkalkung häufig einen leicht braunen Farbton an, während Epiphysenstücke unter dem Gelenkknorpel nahezu immer einen schmalen, schwarzbraunen Saum zeigen. Die Spongiosa erscheint blaßbraun. In der Gegend der früheren sog. Epiphysenlinie werden vielfach streifige, braungraue Flecken sichtbar.

Bleiablagerungen sind bei bleivergifteten Kindern häufig röntgenologisch in der Epiphyse erkannt worden⁸. Im Hinblick auf die nach Schwefelwasserstoffeinwirkung in den Epiphysenteilen bereits makroskopisch deutlich erkennbaren Verfärbungen durch Bleisulfid liegt es nahe anzunehmen, daß auch die im Röntgenogramm auffallend deutliche Knochenstruktur, insbesondere die der Spongiosa, vornehmlich durch die in den Bälkchen vorhandenen Bleiablagerungen hervorgerufen wird.

Bei Hellfeldbeobachtungen sind im Bereich des braunschwarz verfärbten Saumes unter dem Knorpelüberzug der Epiphyse zahlreiche, gegen den Knorpel scharf abgesetzte, in die Spongiosabälkchen hinein

verstreute braune und schwarze Körnchen erkennbar. Im Dunkelfeld leuchten diese Körnchen gelbbraun auf. Überdies erstrahlen nunmehr noch zahllose feinste, dicht gelagerte, im Hellfeld nur andeutungsweise sichtbare oder nicht mehr erkennbare weiß- bis blaugraue Pünktchen. Solche sind auch in großer Zahl in den anschließenden Spongiosabälkchen vorhanden. Sie sind zum Teil regellos gelagert, zeigen sich vielfach dichter in den Knochenhöhlen, finden sich in feinen perlchnurartigen Zügen in den Knochenkanälchen und veranschaulichen so indirekt den Feinbau des Knochens (Abbildung 1). Überraschend schön bieten sich die Bleiablagerungen auch in Diaphysenquerschnitten bei Betrachtung im Dunkelfeld dar. Wiederum entsprechen hier gelbbraun aufleuchtende Teilchen größeren, im Hellfeld sichtbaren Körnchen von Bleisulfid.

Während bei akuter experimenteller Vergiftung Blei vorwiegend in den subperiostalen Zonen und in der Umgebung der *Haversschen* Kanäle grob abgelagert angetroffen wird, ist die Lokalisation des normalen Bleis beim Menschen auffallend anders. Hier kommen die verschiedensten Zustandsbilder nebeneinander vor. Doch sind ausgesprochen subperiostale Ablagerungen so gut wie nie vorhanden, wenn auch vereinzelt in der äußeren Grundlamellenzone kurze, schmale Säume nachweisbar sein können.

Die Bleiteilchen sind in den *Haversschen* Systemen abwechselnd und dazu verschieden dicht gelagert zu sehen (Abb. 2). Vielfach liegen größere und feinere Körnchen nahe der sog. Kittlamelle eines Systems,

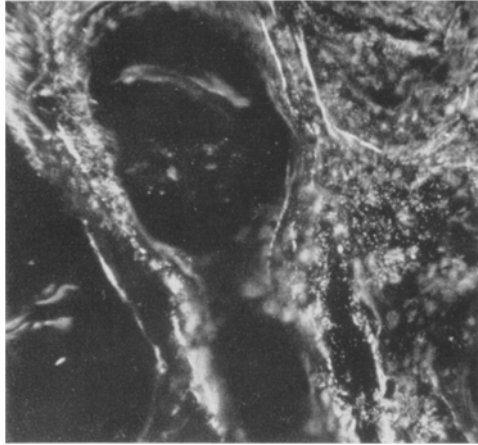


Abb. 1. Spongiosa. 47jährige Frau.
Dunkelfeldaufnahme 80:1.

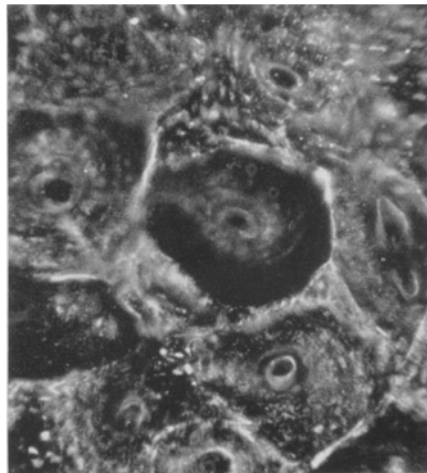


Abb. 2. Diaphyse, quer. 47jährige Frau.
Dunkelfeldaufnahme 10:1.

das zentral gelegentlich völlig frei von Ablagerungen ist. Die Schaltlamellen sind häufig besonders stark befallen. In die Knochenhöhlen sind zahlreiche Bleiteilchen eingelagert, andere liegen regellos in der Grundsubstanz. Es finden sich aber auch stets *Haverssche* Systeme, in denen von der Lichtung des Kanals aus feinste blauweiß aufleuchtende Teilchen dicht hintereinander in den Knochenkanälchen erstrahlen, also radiär zu Knochenhöhlen ziehen und diese miteinander verbinden (Abb.3). Die Knochenhöhlen selbst lassen oft zahlreiche Teilchen besonders an ihrer Peripherie erkennen. Weiterhin gibt es Systeme, die völlig oder nahezu frei von Ablagerungen sind. Unmittelbar nebeneinander liegen

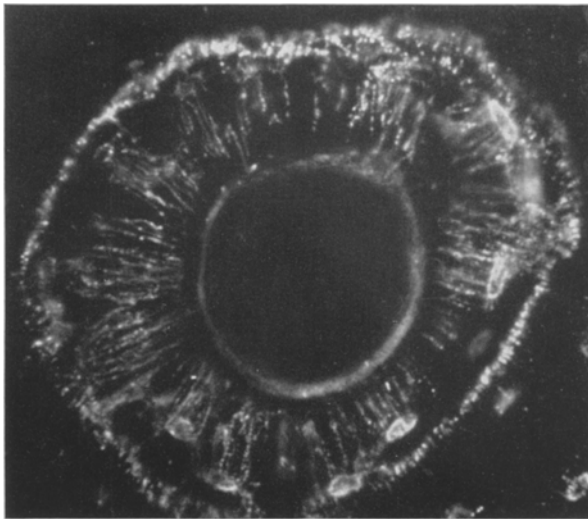


Abb. 3. *Haverssches* System aus Diaphyse. 45jähriger Mann. Dunkelfeldaufnahme 360:1.

im Schnitt mit Bleikörnchen vollgepfropfte und leere oder mehr oder weniger stark befallene *Haverssche* Systeme und Schaltlamellen.

Diese Erscheinungsbilder sind so eindrucksvoll, daß ohne weiteres die Frage nach ihrer Bedeutung sich aufdrängt. Es liegt dabei nahe, die verschiedenartigen Zustandsbilder der Bleiablagerung mit dem vielfachen Umbau des Knochens in Verbindung zu bringen. Bei der Erforschung dieser Fragen würden sich wichtige Einblicke in den Stoffwechsel ergeben können, der bisher nur wenig erfaßbar gewesen ist.

Wie die Knochen, so speichern auch die menschlichen Zähne Blei. *Pfrieme*⁹ hat in Zähnen „Bleifremder“ auf chemischem Wege einen Bleigehalt gefunden, der durchaus dem von *Barth* und *Weyrauch* angegebenen entspricht. In gleicher Weise wie bei Knochen lassen sich die „normalen“ Bleieinlagerungen in Zähnen nachweisen. Ferner sei hier eingefügt, daß bei experimenteller Bleivergiftung von *Rössler*¹⁰ und *Sonntag*¹¹ die

Lokalisation des Bleis in Zähnen und Kieferknochen im hiesigen Institut im Anschluß an die Untersuchungen von *Sieber* festgestellt worden ist.

Werden Zähne „bleifremder“ Personen bei Gegenwart von Schwefelwasserstoff durch Ameisensäure in der voranstehend geschilderten Weise behandelt, so treten in ihnen gleichfalls braungraue Säume im Dentin, vorwiegend in der Umgebung der Pulpenhöhle auf. Sie bestehen zum Teil aus kleinen schwärzlichen, bereits im Hellfeld sichtbaren Körnchen. Die Betrachtung im Dunkelfeld zeigt, daß die Zahl der Körnchen wesentlich größer ist als im Hellfeld. Denn nahezu alle Dentinkanälchen sind von der Pulpa aus eine Strecke weit mit feinen und feinsten überwiegend der Wandung anliegenden, im blauweißen Licht aufstrahlenden, allmählich an Zahl abnehmenden Körnchen besetzt. Nur hin und wieder läßt sich aus einer mehr zentralen Anordnung von Körnchenreihen im Kanälchen vermuten, daß auch die sog. *Tomesche Faser*, der Odontoblastenfortsatz, Bleieinlagerungen enthält. Streckenweise treten auch in näher dem Schmelz gelegenen Kanälchenabschnitten wiederum Ablagerungen auf und es sind auch nach der Wurzel zu gröbere Körnchen im äußeren Dentin unter dem Zement und im Zement selbst zu erkennen. Weiterhin sind nicht selten im Pulpdach, in sekundären Dentinschichten, gröbere Körnchen vorhanden. Die gröberen Körnchen liegen regellos in der Grundsubstanz und lassen keine Beziehungen zu den Dentinkanälchen erkennen.

Überblickt man dieses Untersuchungsverfahren und seine Ergebnisse, so zeigt sich, daß die Spurenforschung, die besonders in der gerichtlichen Medizin unter der Führung von *Kockel* und *Zannger* grundlegend ausgebaut worden ist, nicht nur für das kriminalistische Gebiet in der gerichtlichen Medizin, sondern auch für die Nachbargebiete der gerichtlichen Medizin wichtige, erfolgversprechende Anregungen vermittelt und neue Einblicke in das normale und pathologische Geschehen des Körpers geben kann.

Schrifttum.

- ¹ *Flury*: Blei. Handbuch für experimentelle Pharmakologie von *Heffter-Heubner*, Bd. III, T. 3. Zusammenstellung des gesamten Schrifttums bis 1933. — ² *Behrens* u. *Baumann*: Z. exper. Med. 1933. — ³ *Gerlach*: Verh. dtsch. path. Ges. 17, 277 (1934). — ⁴ *Barth*: Virchows Arch. 281, 146 (1931). — ⁵ *Weyrauch* u. *Müller*: Z. Hyg. 115, 216 (1933). — ⁶ *Timm*: Zellmikrochemie der Schwermetallgifte. Habil.-Schrift, Leipzig 1932. — Z. gerichtl. Med. 20, 582 (1933). — ⁷ *Sieber*: Z. exper. Med. 181, 273 (1936). — ⁸ *Childe*: Internat. Clin. 1. S. 44, 192 (1934). — ⁹ *Pfrieme*: Arch. f. Hyg. 111, 232 (1934). — ¹⁰ *Rössler*: Inaug.-Diss. Leipzig 1936. — ¹¹ *Sonntag*: Inaug.-Diss. Leipzig 1936.