

Aus dem Pathologischen Institut der Med. Akademie Erfurt
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. H. GÜTHEBT)

Das Sulfidsilberverfahren zum topochemischen Schwermetallnachweis

Von

H.-E. STEGNER und W. FISCHER

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. Juli 1957)

Das von TIMM angegebene Sulfidsilberverfahren hat sich für den histotopochemischen Nachweis zahlreicher Schwermetalle durch seine einfache technische Handhabung und ausgezeichnete Lokalisierbarkeit der nachzuweisenden Substanzen als besonders wertvoll erwiesen. Experimentell dem Organismus zugeführte Metalle, sowie zahlreiche im Gewebe vorhandene Spurenmetalle werden durch die Einwirkung des Schwefelwasserstoffes bei der Fixierung in die Sulfidform überführt, obwohl sie im lebenden Gewebe sicherlich nicht als freie Ionen vorliegen, sondern wohl immer in organischer Bindung.

Ohne Zweifel entziehen sich eine große Anzahl gerade der biogenen Metallverbindungen (s. GEDIGK und PROCH) durch besonders starke komplexe Bindung der Einwirkung des Schwefelwasserstoffes und lassen sich dadurch nicht mit der Sulfidsilbermethode darstellen.

Während TIMM und Schüler diese Methode zunächst vorwiegend zum topochemischen Nachweis verschiedener Metalle nach experimenteller Vergiftung mit Metallsalzen angewendet haben, sind später von VOIGT und Mitarb. bei Alkoholschwefelwasserstoff-Fixierung normaler tierischer Gewebe in verschiedenen Organen Substanzen gefunden worden, die eine Keimwirkung bei der physikalischen Entwicklung entfalten¹. Es war naheliegend, diese Substanzen, die nur nach Fixierung im Schwefelwasserstoffmedium und mit der zum Metallsulfidnachweis gebräuchlichen Sulfidsilbermethode darstellbar waren, für Metallsulfide

¹ Bei der physikalischen Entwicklung handelt es sich um eine durch LIESEGANG in die histologische Technik eingeführte Methode, die in ihrer Wirkungsweise zahlreiche Analogien zum photographischen Entwicklungsprozeß aufweist. In beiden Fällen wird der unter der Wirkung eines geeigneten Reduktionsmittels ablaufende Reduktionsprozeß von Silberionen zu metallischem Silber durch gewisse Substrate (Keime) lokal katalytisch beschleunigt. Die Wirkung der sog. Belichtungskeime der photographischen Platte gleicht den bei der physikalischen Entwicklung histologischer Schnitte wirksamen Keimen, die ihrer chemischen Zusammensetzung nach jedoch noch nicht in jedem Falle bekannt sind.

(Literatur siehe bei LIESEGANG, TIMM, VOIGT, STEGNER und FISCHER).

zu halten. In der Prostata, den Langerhansschen Inseln und den Panethschen Körnerzellen des Dünndarms entsprachen diese Substanzen in ihrer Lokalisation weitgehend den intravital oder am Schnitt mit Dithizon darstellbaren Zinkvorkommen (STAMPFL). Der Beweis der Zinksulfidnatur dieser bei der physikalischen Entwicklung keimwirksamen Stoffe ist durch Lösungsversuche geführt worden (VOIGT).

Alle leichter als Silbersulfid löslichen Metallsulfide setzen sich nach dem Zusammenbringen mit dem Silbernitrat des physikalischen Entwicklers in Silbersulfid um (STEGNER und FISCHER). Das an der Stelle der Metallsulfidablagerungen entstandene Silbersulfid wirkt bei der physikalischen Entwicklung der Gewebsschnitte beschleunigend auf die Reduktionsvorgänge, so daß in der unmittelbaren Umgebung der Sulfidteilchen die Silberablagerungen selektiv und der allgemeinen Schwärzung des Präparates vorausgehend auftreten. Es läßt sich also bei einem positiven Ausfall der Reaktion zunächst nicht sagen, um welches Schwermetallsulfid es sich handelt. Weitere Versuche zur Differenzierung der dem Versilberungseffekt zugrunde liegenden Schwermetallsulfide müssen unternommen werden.

Die für die Ortsrichtigkeit des Nachweises erwünschte Schwerlöslichkeit der Sulfide wird bei dem Versuch ihrer Differenzierung durch Lösungsversuche zum Nachteil. Selbst das verhältnismäßig leicht lösliche Zinksulfid läßt sich recht schwer vollständig aus dem hydrophilen Kolloid der Zellsubstanzen herauslösen, und solange Metallsulfide nur in Spuren noch vorhanden sind, dürfte eine Silberanlagerung an diese Keime bei der physikalischen Entwicklung nicht zu verhindern sein. Bei den übrigen Metallsulfiden sind allen Lösungsversuchen durch die Empfindlichkeit der histologischen Gewebsschnitte in bezug auf Konzentration des Lösungsmittels und Behandlungstemperatur von vornherein enge Grenzen gesetzt. Es erschien uns deshalb aussichtsreicher, die Bedingungen bereits bei der Fixierung der Gewebsstücke im Schwefelwasserstoffmedium so zu wählen, daß nur bestimmte Metalle oder Metallgruppen selektiv als Sulfide ausgefällt und damit versilberbar werden. Darauf gründet sich die Trennung der Metalle in der analytischen Chemie. Die Fällung der einzelnen Metallgruppen als Sulfide ist abhängig vom p_H -Wert der Lösung oder, auf die histologischen Verhältnisse übertragen, vom p_H des Fixierungsmittels. Ein ungefähres Bild vom obliegenden Milieu der Sulfidbildung verschiedener Metalle gibt Tabelle 1. Die Tabelle liefert nur einen Anhalt. Für die praktische Anwendung muß sie durch exakte Angaben der Säure- und Laugenkonzentration zur Differenzierung der einzelnen Metallsulfide ergänzt werden.

In den bis jetzt vorliegenden Mitteilungen über Untersuchungen mit dem Sulfidsilberverfahren sind besondere Einstellungen des p_H bei der Schwefelwasserstoff-Alkoholfixierung der Gewebsstücke nur vereinzelt angegeben worden. VOIGT

weist darauf hin, daß durch die Fixierung im ammoniakalischen Milieu die Anzahl der Keime bei der Sulfidsilbermethode vergrößert werden kann, da z. B. Eisensulfid im alkalischen Milieu fällt. VOIGT, BOG und WOLF benutzten bei der Darstellung von Nickel im Gewebe ammoniakalischen Schwefelwasserstoffalkohol zur Fixierung. NETTE hat bei seinen histochemischen Untersuchungen über die Lokalisation von Eisen in Leber und Niere mit der Sulfidsilbermethode lediglich von Fixierung in H_2S -Alkohol berichtet, ohne spezielle Angaben über den pH -Wert. Die auf diese Weise erzielten positiven Ergebnisse setzen eine leichte alkalische Reaktion des Gewebes voraus, was in den meisten Fällen, von acidotischen Veränderungen abgesehen, gewährleistet sein wird. Eine Säuerung des Gewebes während der Fixierung, die von ZEIGER und WERNER genauer untersucht worden ist, muß in Rechnung gestellt werden. Sie spielt jedoch mehr bei der Formol- als bei der Alkoholfixierung eine Rolle.

Tabelle 1. *Abhängigkeit der Sulfidfällung einiger Metalle vom pH der Lösung.*

	Salzsauer	Essigsauer	Ammoniakal.	NH_4 + Cyanid
1. Hg	+	+	+	+
2. Bi	+	+	+	+
3. As	+	+	0	0
4. Cu	+*	+	+	0
5. Pb	+*	+	+	+
6. Sb	+*	+	0	0
7. Sn	+*	+	0	0
8. Zn	0	+	+	0
9. Fe	0	0	+	0
10. Ni	0	0	+	0
11. Co	0	0	+	0
12. Mn	0	0	+	0

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die Metalle 1—7 in stärker mineralsaurer Lösung durch H_2S fällbar sind. Hg, Bi und As fallen bei einer HCl-Konzentration von 3% und darüber. Die mit einem * bezeichneten Metalle werden in einer Lösung, die bis zu etwa 1% HCl (etwa 0,2—0,3n) enthält, als Sulfide gefällt. Die gleichen Metalle und zusätzlich Zink fallen in essigsauerm Milieu. As, Sb und Sn gehen in ammoniakalischer Lösung als Thiosalze in Lösung, während die übrigen als Sulfide gefällt werden. In cyanidhaltigem Milieu werden diejenigen Metalle in Lösung gehalten, die mit Cyanid stärkere Komplexe bilden. Es fallen also nur Hg, Bi, Pb und außerdem noch Cd als Sulfide.

Bei der Umwandlung der Metalle in ihre Sulfidform im bisher meistens verwendeten annähernd neutralen H_2S -Alkoholmilieu reagieren die Metalle mit dem Schwefelwasserstoff, bevor stärkere Diffusionsströme im Gewebe wirksam werden können, bevor also eine völlige Durchtränkung des Gewebstückes mit dem Fixationsmittel erfolgt ist. Der Schwefelwasserstoff dringt als gelöste und teilweise in H^+ , HS' und S'' -Ionen dissoziierte Molekel in das Gewebe ein. Die Geschwindigkeit des Eindringens hängt von der Größe der Moleküle, von ihrer Form und von ihrer Affinität zu im Gewebe vorhandenen Hindernissen ab unter Betätigung lockerer van der Waalsscher Kräfte, wie sie in gleicher Weise z. B. bei der Adsorptionschromatographie eine Rolle spielen. Dasselbe trifft natürlich auch für die H^+ und OH' -Ionen bei der Anwendung

saurer oder basischer Fixierungsmittel zu. H^+ - und OH^- -Ionen dringen mit großer Wahrscheinlichkeit mit annähernd gleichem Tempo wie der gelöste Schwefelwasserstoff in die Gewebe ein und jedenfalls schneller als die größeren Moleküle des zur Fixierung benutzten Äthylalkohols. Bei Fixierung in saurem oder alkalischem Milieu wird also bei der außerordentlich schnellen Wanderung der H^+ - und OH^- -Ionen, die den übrigen Substanzen des Fixierungsgemisches vorausziehen, das im Gewebe herrschende p_H durch die H^+ - und OH^- -Ionen des Fixierungsmittels bestimmt und die Sulfidbildung damit in regulierbarer Weise beeinflusst. Ein unbekanntes im Gewebe vorliegendes Metall müßte also, vorausgesetzt, daß es in seiner Sulfidform und nur in dieser versilberbar ist, nur bei Fixierung in einem bestimmten p_H -Bereich, der für seine Umwandlung in die Sulfidform obligat ist, durch physikalische Entwicklung darstellbar sein. Wir haben diese Frage im Tierversuch überprüft.

Material und Methode

Experimentelle Vergiftungen mit Metallsalzen wurden durch subcutane Verabfolgung wäßriger Lösungen von Kupfersulfat, Zinkacetat und Bleiacetat an erwachsenen männlichen und weiblichen weißen Ratten von etwa 250 g Gewicht durchgeführt.

1. Kupfersulfatvergiftung. Die mit einer Weißbrot-Haferdiät ernährten und vorher nicht zu experimentellen Untersuchungen verwendeten Tiere erhielten an 5 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 30 mg $CuSO_4$ in wäßriger Lösung (10 mg/cm³) unter die Haut des Oberschenkels gespritzt. 5 Std nach der letzten auf 60 mg erhöhten Dosis wurden die Tiere durch Nackenschlag getötet und unmittelbar danach sehr kleine Gewebsstücke aus Leber, Niere, Pankreas, Dünndarm und Haut aus dem Bereich der Injektionsstelle jeweils fixiert in

1. H_2S -gesättigtem 70%igem Alkohol;
2. H_2S -gesättigtem 0,1 n salzsaurem 70%igem Alkohol;
3. H_2S -gesättigtem 2n essigsäurem 70%igem Alkohol;
4. H_2S -gesättigtem 1/2n ammoniakalischem 70%igem Alkohol;
5. Cyanid- und schwefelwasserstoffhaltigem Alkohol

folgender Zusammensetzung: 70 ml 96%igen Alkohol, 1,0 g NaCN p. a., 7,5 ml NH_3 25%ig mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen, mehrere Minuten H_2S unter dem Abzug einleiten, Lösung im Kühlschrank aufbewahren und bald verbrauchen.

Die auf der Bildung nicht durch H_2S angreifbarer Komplexe beruhende Wirkung der cyanidhaltigen Lösung erlaubt eine weitere Differenzierung der Metalle. Die Dauer der Fixierung betrug 1—2 Std. Vor der Weiterbehandlung der Organstücke in der aufsteigenden Alkoholreihe und üblichen Paraffineinbettung muß der Schwefelwasserstoff durch ausgiebiges Waschen mit mehrmals gewechseltem, in gleicher Weise zusammengesetztem, aber H_2S -freiem Fixierungsmittel entfernt werden, um eine nachträgliche Bildung von Sulfiden im annähernd neutral reagierenden Alkohol der aufsteigenden Reihe zu verhindern. Die Gewebsstücke werden dann in üblicher Weise über Alk. abs., Methylbenzoat-Celloidin und Benzol in Paraffin eingebettet und etwa 5 μ dicke Schnitte physikalisch entwickelt. Dabei verwendeten wir den gebräuchlichen, auf eine Vorschrift von LÜPPO-CRAMER zurückgehenden Entwickler, der von VOIGT modifiziert wurde und aus 5 cm³ Gummiarab., 1 cm³ 1,2%iger Borsäure, 1,2 cm³ 2%igen Hydrochinons und 0,3 cm³ 10%igen

Silbernitrat besteht. Die Dauer der Entwicklung betrug etwa 10 min. Die auf Deckgläschen relativ fest anhaftenden Schnitte werden nach der Entwicklung unter fließendem Wasser scharf abgespült, mit Kernechtrot gegengefärbt und in Kanadabalsam eingedeckt.

2. Zinkacetatvergiftung. Dosierung: je 30 mg einer wäßrigen Zinkacetatlösung unter die Haut des Oberschenkels an 5 aufeinanderfolgenden Tagen. Die letzte Applikation auf 60 mg erhöht. Weiterbehandlung wie bei der Kupfersulfatvergiftung.

3. Bleiacetatvergiftung. Dosierung: je 30 mg einer wäßrigen Bleiacetatlösung: unter die Haut des Oberschenkels an 5 aufeinanderfolgenden Tagen. Die letzte Applikation auf 60 mg erhöht. Weiterbehandlung wie bei der Kupfersulfatvergiftung.

Die Erörterung toxikologischer Befunde, sowie die Fragestellung, in welcher Weise anorganische Metallsalze im mesenchymalen Gewebe und in den Organen verarbeitet werden, liegt außerhalb unserer Untersuchungen. Wir beschränken uns auf den Hinweis, daß schwere Gleichgewichts- und Koordinationsstörungen sowie Lähmungserscheinungen der Extremitäten, besonders bei den mit Kupfersulfat vergifteten Ratten auftraten, während die zink- und bleivergifteten Tiere weniger grobe Symptome aufwiesen.

Histologische Befunde

1. Kupfersulfatvergiftungen. a) Fixierung in H_2S -gesättigtem 70%igem Alkohol:

Leber: Dichte feinkörnige Silberablagerungen im Bereich der Leberzellbalken vorwiegend in den zentralen Anteilen der Zellen. Die Sternzellen hochgradig vergrößert und mit schwarzen Körnchen vollgestopft, die Gefäß- und Capillarendothelien kräftig imprägniert. *Niere:* Die Glomeruli frei, die Basalmembranen der Tubuli schwarz imprägniert. Sehr feinkörnige Silberablagerungen im Bereich der Epithelien nahezu sämtlicher Tubuli contorti und recti. Die Sammelröhren frei von Silberablagerungen, im dünnen Teil der Henleschen Schleife nur spärliche Ablagerungen. In den Hauptstücken braunschwarzgefärbte, geschwollene, z. T. in die Lichtung abgestoßene Tubulusepithelien. Zahlreiche mit Silberkörnchen beladene Phagocyten im Zwischengewebe. *Pankreas:* Braune Verfärbung und sehr feine schwarze Körnelung der zentral gelegenen Inselzellen. Deutlich stärkere dichte Granulierung der Randzellen in etwa einschichtiger Lage. Das exokrine Parenchym bis auf einzelne Phagocyten im Zwischengewebe frei von Silberablagerungen. *Dünndarm:* Braun-schwarze Körnelung der Panethschen Körnerzellen. *Haut* (Aus dem Bereich der Injektionsstelle): Kräftige, aus dicht beieinanderstehenden Körnchen bestehende Imprägnierung des subcutanen Bindegewebes.

b) Fixierung in 1n salzsaurem H_2S -gesättigtem Alkohol. *Leber:* Dichte schwarze Körnelung der Leberzellbalken, besonders in den zentralen Anteilen der Leberzellen. Kupffersche Sternzellen bis auf einzelne feine Körnchen frei von Silberablagerungen. Keine Imprägnierung der Gefäßendothelien. Zellgrenzen verwaschen. Färbbarkeit mit Kernechtrot schlechter (Abb. 1a). *Niere:* Glomeruli frei von Silberablagerungen. Keine Imprägnierung der Basalmembranen. Feinkörnige Ablagerungen im Bereich der Tubuli contorti und -recti, zum Teil in abgestoßenen Tubulusepithelien. *Pankreas und Dünndarm:* Keinerlei Versilberung. *Haut:* Im Bereich der Injektionsstelle kräftige Imprägnierung der subcutanen Bindegewebsfasern.

c) Fixierung in essigsauerm H_2S -gesättigtem Alkohol. *Leber:* Körnige Ablagerungen in den zentralen Anteilen der Leberzellbalken, jedoch etwas schwächer als in a) und b). Kupffersche Sternzellen bis auf einzelne feine Körnchen frei von Silberablagerungen. Keine Imprägnierung der Gefäßendothelien. *Niere:* Wie bei b), jedoch etwas schwächer. *Pankreas:* Braune Verfärbung und sehr feine schwarze

Körnclung der zentral gelegenen Inselzellen. Deutlich stärkere dichte braun-schwarze Granulierung der Randzellen. Leichte bräunliche Tingierung des exokrinen Anteils, hier jedoch keine körnigen Silberablagerungen. *Dünndarm*: Relativ grobe braun-schwarze Körnelung der Panethschen Körnerzellen. *Haut*: Deutliche Imprägnierung des subcutanen Bindegewebes im Bereich der Injektionsstelle.

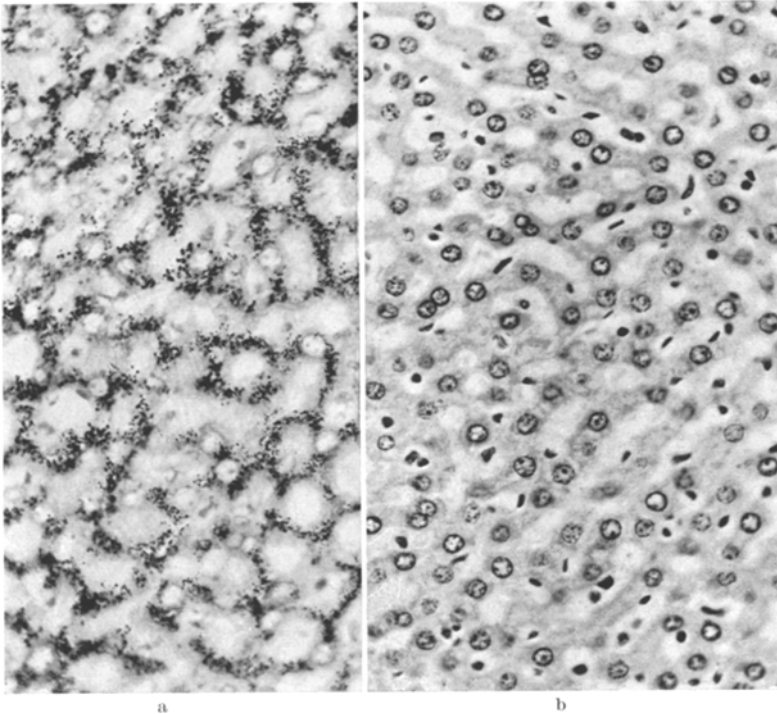


Abb. 1a u. b. Rattenleber, Kupfersulfatvergiftung nach Fixierung in 0,1 n salzsaurem H_2S -gesättigtem Alkohol. Physikalische Entwicklung. (Näheres siehe Fußnote S. 608.) Kernechtrot. Feinkörnige Versilberung der Leberzellen an den Stellen der Kupferablagerungen. Vergr. 300:1; b Rattenleber, Kupfersulfatvergiftung. Vergleichsschnitt nach Fixierung in cyanidhaltigem, ammoniakalischem, H_2S -gesättigtem Alkohol. Physikalische Entwicklung. (Näheres siehe Fußnote S. 608). Kernechtrot. Ausbleiben des Versilberungseffektes. Vergr. 300:1

d) *Fixierung in cyanid- und schwefelwasserstoffhaltigem Alkohol*. In sämtlichen untersuchten Organen keine Versilberung (Abb. 1b).

2. Zinkacetatvergiftungen. a) *Fixierung in H_2S -gesättigtem Alkohol*.

Leber: Spärliche schwarze Körnelung in den Leberzellen der zentralen Läppchenanteile in der Umgebung der Zentralvenen. *Niere*: Feine Körnelung in den lumenwärts gelegenen Anteilen der Epithelien der Haupt- und Schaltstücke mit saumartiger schwarzer Begrenzung der Kanälchenlichtung. Körnchen stellenweise frei im Lumen. Keine Versilberung im Bereich der Glomeruli. *Pankreas*: Bräunliche Tingierung des exokrinen Anteils. Bräunliche Verfärbung und feine Körnelung der zentral gelegenen Zellen der Langerhansschen Inseln. Dichte schwarzbraune Körnelung der Randzellen. *Dünndarm*: Dichte schwarzbraune Körnchen in den

Panethschen Körnerzellen. *Haut*: Schwarze Imprägnierung der Bindegewebsfasern im Bereich der Injektionsstelle.

b) *Fixierung in 0,1 n salzsaurem H_2S -gesättigtem Alkohol*: Sämtliche Organe frei von Versilberung (Abb. 2b u. 3b).

c) *Fixierung in 2 n essigsäurem H_2S -gesättigtem Alkohol*. *Leber*: Feine schwarze Körnelung in den zentralen Anteilen der Leberzellen, nur auf die den Zentral-

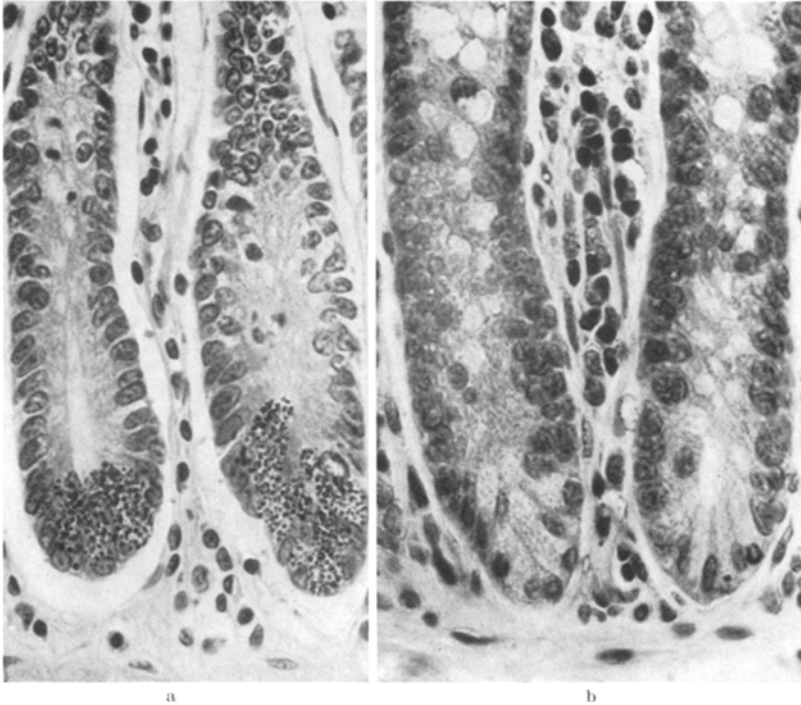


Abb. 2a u. b. a Rattendünndarm, Zinkacetatvergiftung nach Fixierung in 2 n essigsäurem H_2S -gesättigtem Alkohol. Physikalische Entwicklung. (Näheres siehe Fußnote S. 608.) Echttrot. Körnige Silberablagerungen in den Panethschen Zellen im Bereich der auch unter physiologischen Bedingungen nachweisbaren Zinkablagerungen. Vergr. 560:1; b Rattendünndarm, Zinkacetatvergiftung. Vergleichsschnitt nach Fixierung in 0,1 n salzsaurem H_2S -gesättigtem Alkohol. Physikalische Entwicklung. (Näheres siehe Fußnote S. 608.) Kernechttrot. Ausbleiben des Versilberungseffektes. Vergr. 560:1

venen benachbarten Zellen beschränkt. *Niere*: Feine Körnelung in den lumenwärts gelegenen Anteilen der Haupt- und Schaltstücke. Glomeruli frei von Versilberung. *Pankreas*: In den Langerhansschen Inseln Braunfärbung und feine Körnelung der zentral gelegenen Zellen. Dichtere schwärzliche Körnelung der Randzellen. Bräunliche Tingierung des exokrinen Parenchyms. *Dünndarm*: Körnige Versilberung der Panethschen Körnerzellen (Abb. 2a). *Haut*: Schwarze Imprägnierung der Bindegewebsfasern im Bereich der Subcutis (Abb. 3a).

d) *Fixierung in ammoniakalischem H_2S -gesättigtem Alkohol*. *Leber*: Vereinzelt körnige Ablagerungen in den Leberzellen der zentralen Läppchenanteile. *Niere*: spärliche feine Körnelung der Tubulusepithelien und einzelner im Zwischengewebe gelegenen Zellen. *Pankreas*: Braune Tingierung und einzelne körnige Ablagerungen

im exokrinen Gewebe. In den Langerhansschen Inseln Braunfärbung und feine schwarze Körnelung der zentral gelegenen Zellen, dichtere schwärzliche Körnelung der Randzellen. *Dünndarm*: Körnige Versilberung der Panethschen Zellen. *Haut*: Im Bereich der Injektionsstelle dichte Imprägnierung der subcutanen Bindegewebsfasern.

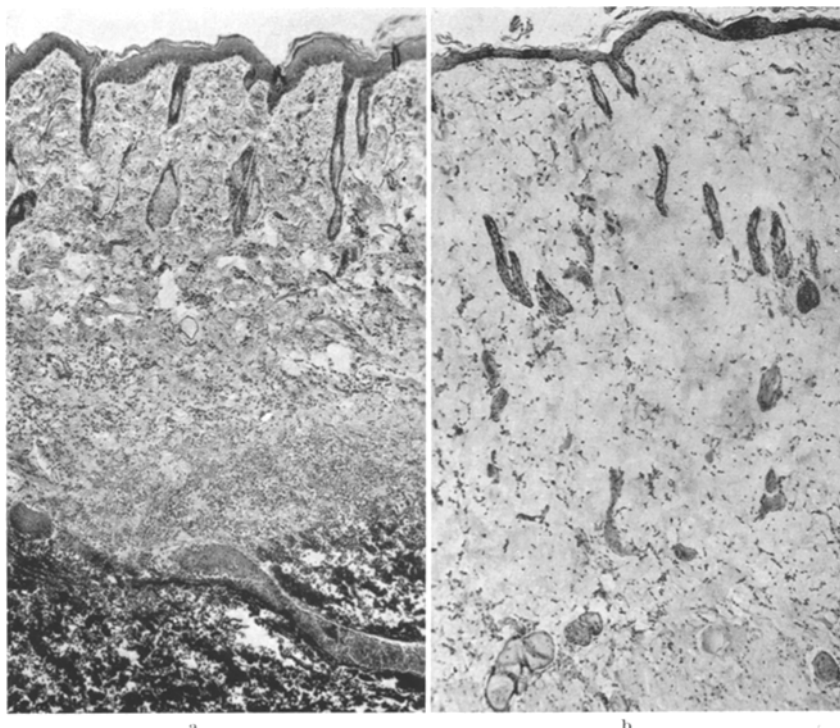


Abb. 3a u. b. a Ratte, Haut aus dem Bereich des Oberschenkels nach subcutaner Injektion einer wäßrigen Zinkacetatlösung. Fixierung in 2 n essigsauerm H_2S -gesättigtem Alkohol. Physikalische Entwicklung. (Näheres siehe Fußnote S. 608.) Kernechtrot. Dichte feinkörnige Versilberung in der Subcutis im Bereich der Zinkablagerungen. Vergr. 60:1; b Ratte, Haut aus dem Bereich des Oberschenkels nach subcutaner Injektion einer wäßrigen Zinkacetatlösung. Vergleichsschnitt nach Fixierung in 0,1 n salzsaurem H_2S -gesättigtem Alkohol. Physikalische Entwicklung. (Näheres siehe Fußnote S. 608.) Kernechtrot. Ausbleiben des Versilberungseffektes. Vergr. 60:1

e) *Fixierung in cyanid- und schwefelwasserstoffhaltigem Alkohol.* Leber Niere, Pankreas und Dünndarm zeigen keine Versilberungseffekte.

Haut: Schwarze Imprägnierung der subcutanen Bindegewebsfasern. Der Zinküberschuß im Injektionsgebiet war gegenüber der Cyanidkonzentration zu hoch, so daß die Sulfidbildung und damit ein positiver Versilberungseffekt nicht restlos unterdrückt werden konnte.

3. Bleiacetatvergiftung. Bei der Bleiacetatvergiftung waren die Organbefunde offenbar infolge ungenügender Resorption spärlich und nicht mit Sicherheit zu verwerten. Die physikalische Entwicklung der Hautstücke aus dem Bereich der Injektionsstelle ergab in allen Fällen ein positives Ergebnis.

Besprechung

Die Versuche mit Zink- Blei und Kupfer erlauben mit einigem Vorbehalt den Schluß, daß sich durch Variation der p_H -Werte der schwefelwasserstoffhaltigen Fixierungsmittel die Umwandlung verschiedener im Gewebe vorliegender Schwermetalle in ihre Sulfidform und damit ihre Darstellung durch physikalische Entwicklung in steuerbarer Weise beeinflussen läßt. In Anlehnung an die in der analytischen Chemie gebräuchlichen Trennungsmethoden der Metallsulfide ist auch bei histochemischen Untersuchungen derjenige für die einzelnen Metalle bekannte p_H -Bereich zu wählen, in welchem die Metalle annähernd quantitativ in ihre Sulfidform umgewandelt werden. Bleisulfid fällt z. B. in 0,1 bis 0,3n salzsaurem Milieu quantitativ, mit steigender Säurekonzentration zunehmend schwächer. In 1n salzsaurem H_2S -gesättigtem Alkohol war eine Umwandlung in die Sulfidform und damit Versilberbarkeit nicht mehr möglich.

Die Sulfidsilbermethode ist keine quantitative Nachweismethode. Darauf ist von verschiedenen Untersuchern mehrfach hingewiesen worden. Aus der Größe und Gestalt der entwickelten Silberkörnchen kann nicht auf die Menge der vorliegenden Metalle geschlossen werden. LIESEGANG hat wiederholt darauf hingewiesen, daß die Größe der erzeugten Silberkristalle unabhängig von den Dimensionen der Keime ist. Die p_H -Abhängigkeit der Sulfidfällung stellt einen weiteren Ungenauigkeitsfaktor dar. Bezüglich der Ortsrichtigkeit des Nachweises sind wir der Ansicht, daß grobe Änderungen in der Lagerung der Schwermetallniederschläge durch die sauren und alkalischen schwefelwasserstoffhaltigen Fixierungsgemische nicht eintreten. Die Schädigung der Gewebsstrukturen ist unseren Beobachtungen nach geringer als bei Lösungsversuchen an den schon ausgebildeten Sulfidkristallen. Vorausgesetzt, daß ein Metall nicht im Gemisch mit anderen physikalisch entwickelbaren Metallverbindungen vorliegt, kann bereits bei Benutzung der von uns verwendeten 4 in der aktuellen Reaktion verschiedenen Fixierungsmittel je nach dem positiven oder negativen Ausfall bei der physikalischen Entwicklung in begrenztem Umfange eine Zuordnung des Metalls zu einer bestimmten Metallgruppe durchgeführt werden.

Die Langerhansschen Inseln und die Panethschen Körnerzellen verschiedener Tierspecies waren in allen Versuchsreihen in ammoniakalischem und essigsäurem Milieu darstellbar, nicht jedoch im salzsauren und cyanidhaltigen. Darin kann man eine Bestätigung der Zinksulfidnatur der dabei wirksamen Keime sehen. Eisen- und Nickelsalze, welche naturgemäß gleiche p_H -Bedingungen zur Umwandlung in die Sulfidform benötigen, lassen sich durch andere histochemische Methoden ausschließen. Auch die Intensität der Schwärzung mit Bevorzugung der Randzellen der Langerhansschen Inseln des Rattenpankreas entspricht den

Ergebnissen des mit Dithizon durchgeführten Zinknachweises (STAMPFL, WOLFF). Bei der Ratte erwiesen sich im Gegensatz zu anderen Tier-species die Zinkkonzentrationen in den peripher gelegenen A-Zellen höher als in den B-Zellen (STAMPFL, WOLFF, RINGLEB). Da auch die Dithizonmethoden keinen exakten quantitativen wie unter Umständen auch qualitativen Nachweis erlauben — es handelt sich bekanntlich um Farbreaktionen, die bei der Winzigkeit der nachzuweisenden Mengen und durch mögliche Interferenzerscheinungen nicht immer sicher zu beurteilen sind — dürfte die Zinkdarstellung durch physikalische Entwicklung eine wertvolle Ergänzung dieser Methoden sein. MAGER und McNARY haben zwar durch komplexe Bindung der konkurrierenden Metalle den histochemischen Zinknachweis mit Dithizon spezifisch machen können, aber ungenügende Ortsrichtigkeit durch die Notwendigkeit der Untersuchung mindestens 10—15 μ dicker unfixierter Gewebsschnitte und recht erhebliche Diffusionserscheinungen mindern den Wert der Methode für exakte zelltopochemische Untersuchungen. Fehlermöglichkeiten, welche die mit dem Sulfidsilberverfahren gewonnenen Resultate beeinflussen, sind schließlich in einer primären Keimwirkung chemisch nicht in jedem Falle klassifizierter Stoffe begründet, die bereits ohne H_2S -Einwirkung ihre katalytische Wirkung auf den Reduktionsprozeß der Entwicklerlösung entfalten — sog. Primärkeime. VOIGT hat in umfassenden Untersuchungen normaler und pathologisch veränderter Organe bei reiner Alkoholfixierung nur in vereinzelten Fällen derartige Substanzen gefunden. Ihre Kenntnis bildet eine Voraussetzung bei allen mit dem Sulfidsilberverfahren angestellten Untersuchungen. Gleichlaufende vergleichende Untersuchungen alkoholfixierter Organe mit der physikalischen Entwicklung sind beim histotopochemischen Schwermetallnachweis mit der Sulfidsilbermethode unbedingt notwendig.

Zusammenfassung

Ratten wurden mit Zink-, Kupfer- und Bleisalzen vergiftet und Organstücke in schwefelwasserstoffgesättigtem Alkohol bei verschiedenem p_H fixiert. Die Abhängigkeit der Sulfidfällung der einzelnen Metalle vom p_H der Fixierungslösung und damit die Möglichkeit einer selektiven Versilberung der einzelnen Metallsulfide im histologischen Schnitt ließ sich demonstrieren. Beim histotopochemischen Schwermetallnachweis mit dem Sulfidsilberverfahren läßt sich durch Variation der p_H -Werte der Fixierungslösung in begrenztem Umfange eine Differenzierung der Metalle durchführen.

Literatur

BILTZ, H., u. W. BILTZ: Ausführung quantitativer Analysen. Zürich: S. Hirzel 1947. — BOG, R., u. H.-E. STEGNER: Versuche mit der physikalischen Entwicklung am tierischen Darm. *Acta histochemica* 1, 29 (1954). — GEDIGK, P., u. W.

PROCH: Über die Speicherung von Schwermetallverbindungen in mesenchymalen Geweben. Beitr. path. Anat. **116**, 124 (1956). — HELCK, J.: Über das Verhalten von Bleinatriumthiosulfat im Organismus. Inaug.-Diss. Jena 1944. — LIESEGGANG, R. E.: Histologische Versilberungen. Z. wiss. Mikrosk. **45**, 273 (1928). — LÜPPO-CRAMER, H.: Kolloidchemie und Photographie. Dresden: Th. Steinkopf 1921. — MAGER, M., W. F. McNARY and F. LIONETTI: The Histochemical Detection of Zinc. J. Histochem. a. Cytochem. **1**, 493 (1953). — McNARY, W. F.: Zinc Dithizone Reaction of Pancreatic Islets. J. Histochem. a. Cystochem. **2**, 185 (1954). — NETTE, H.: Histochem. Untersuchungen über die Lokalisation von Eisen in Leber und Niere. Inaug.-Diss. Jena 1944. — NIETZSCHE, S.: Untersuchungen über den histochemischen Nachweis von Gold im Gewebe. Inaug.-Diss. Jena 1944. — RENNERT, H.: Das zellmikrochemische Verhalten von Kupfer in Leber und Niere nach Zufuhr von Natriumcuprothiosulfat. Inaug.-Diss. Jena 1944. — STAMPFL, B.: Zinkhaltige Zellen in der Prostata. Symposium über Cytochemie im Max-Planck-Inst. für Hirnforschung, Köln, Oktober 1953. — STAMPFL, B., u. H. WOLFF: Zit. nach W. RUNGE, I. MÜLLER u. H. FERNER, Der Zinknachweis in den A-Zellen und B-Zellen des Inselorgans bei der Ente. Z. Zellforsch. **44**, 208 (1956). — STEGNER, H. E., u. W. FISCHER: Über die „Keimwirkung“ der Schwermetallsulfide bei der physikalischen Entwicklung. Acta histochemica (im Druck). — TIMM, F.: Zellmikrochemie der Schwermetallgifte. Habil.-Schr. Leipzig 1932. — Zur Histochemie der Schwermetalle. Das Sulfidsilberverfahren. Vortr. auf dem Kongr. der Ges. für gerichtl. und soziale Med. 1956. — TIMM, F.: Zit. nach J. HELCK, H. NETTE, S. NIETZSCHE, H. RENNERT u. G. ZAPPE. — VOIGT, G. E.: Histologische Versilberungen. Habil.-Schr. Jena 1951. — Gewebeeigene Keime (Primärkeime) bei histologischen Versilberungen. Z. wiss. Mikrosk. **61**, 1 (1952). — Kolloid und histologische Versilberung. Zbl. Path. **89**, 457 (1952). — Über den Nachweis von Schwermetallen mit Silbermethoden. Vortr. svenska patologförening Stockholm 1956. — Zit. nach R. BOG u. H.-E. STEGNER. — VOIGT, G. E., R. BOG u. I. WOLF: Untersuchungen zum histotopochemischen Nickel- und Kobaltnachweis. Zbl. Path. **92**, 1 (1954). — WERNER, F.: Der Säuregrad der Fixationslösung in Abhängigkeit vom fixierten Präparat. Z. wiss. Mikrosk. **52**, 406 (1935). — WOLFF, H., u. D. RINGLEB: Histochemische Untersuchungen über das Inselzink. Z. exper. Med. **124**, 236 (1954). — ZAPPE, G.: Ein Beitrag zum histochemischen Nachweis von Gold im Gewebe. Inaug.-Diss. Jena 1941. — ZEIGER, K.: Zur Frage nach der Wirkungsweise des Formaldehyds bei der histologischen Fixation. Z. wiss. Mikrosk. **46**, 273 (1930).

Dr. H.-E. STEGNER, Pathologisches Institut der Med. Akademie, Erfurt,
Nordhäuser Str. 74