XI.

Ueber directe Fe-Reaction in thierischen Geweben.

Von

H. Quincke

in Kiel.

(Hierzu Taf. III, IV, Fig. 21.)

Das Fe in thierischen Geweben durch directe Reaction mittelst NH_4S nachzuweisen, wurde zuerst von A. Mayer¹⁾ 1850 versucht; er legte den frischen Darm in verdünnte NH_4S -Lösung und zog aus den für das blosse Auge sichtbaren Farbenveränderungen Schlüsse auf den Fe-Gehalt der Darmschleimhaut. 1867 verwendete dann Perls²⁾ Ferrocyankalium und Salzsäure zum directen Nachweis des Eisens in mikroskopischen Präparaten. Ich selbst³⁾ habe seit Beginn meiner Beschäftigung mit der Eisenfrage das eine wie das andere Reagens für makroskopische wie mikroskopische Untersuchungen verwendet und habe sehr bald die Vorzüge des NH_4S gegenüber dem Ferrocyankalium kennen gelernt und vertreten. Erst neuerdings sind diese directen Eisenreactionen etwas mehr in Aufnahme gekommen, aber nicht immer ganz richtig angewendet worden, so dass ich es für angezeigt halte, das dabei zu beobachtende Verfahren noch einmal ausführlicher zu besprechen.

Während Fe aus wässriger Lösung durch NH_4S als feinkörniges FeS gefällt wird, hindert, resp. verlangsamt die Gegenwart eines Eiweisskörpers in der Lösung diese Ausfällung bis zu einem gewissen Grade; auch das im Zellprotoplasma gleichmässig vertheilte Fe wird durch NH_4S nicht feinkörnig gefällt, sondern verleiht dem Zellkörper

1) De ratione que ferrum mutitas in corpore. Dorpat 1850.

2) Virchow's Archiv. Bd. XXXIX. S. 42. 1867.

3) H. Quincke, Ueber das Verhalten der Fe-Salze im Thierkörper. Reichert und du Bois-Reymond's Archiv f. Anat. u. hysiol. 1868. S. 757. — Ueber Siderosis. Festschrift. Bern 1878. S. 57. — Zur Physiol. u. Pathol. des Blutes. Deutsches Archiv f. klin. Med. Bd. XXVII. S. 214. 1880. — Ueber Eisen Therapie. Volkmann's Sammlung klin. Vorträge. Neue Folge. Nr. 129. S. 2. 1895.

im mikroskopischen Bilde eine gleichmässige mehr oder weniger intensive Grünfärbung, während einzelne Fe-reichere Theile des Zellinhalts sich als dunkler grüne bis schwärzliche Punkte, Körner oder Klumpen, meist in ziemlich scharfer Umgrenzung, abheben, bei mässiger Färbung auch noch deutlich durchscheinend. Die Verbindung des Fe mit den vermuthlich eiweissartigen Bestandtheilen des Zellkörpers wirkt auch verlangsamen auf die Bildung des Schwefeleisens, so dass an manchen dieser Körner die Grünfärbung erst nach einigen Minuten, an anderen nach 30 Minuten oder mehr hervortritt. Grössere Concentration des NH_4S oder Zusatz von Ammonium causticum beschleunigt den Eintritt der Reaction und ist zuweilen Bedingung für ihr Eintreten überhaupt; es scheint einer gewissen Zeit und Massenwirkung zu bedürfen, um das Fe aus seiner organischen Verbindung herauszulösen; zuweilen ist die Fe-Reaction an dem frischen Organ gar nicht oder unvollkommen zu erzielen, während sie an dem mit Alkohol gehärteten schneller und deutlicher hervortritt; nur ganz ausnahmsweise wurde an der Leber das umgekehrte Verhalten beobachtet.

Zur Ausführung der Reaction lässt man die Organstücke oder die mikroskopischen Schnitte in dem reinen oder bis auf $\frac{1}{10}$ verdünnten NH_4S liegen, je nach dem Eintritt der vollen Färbung einige Minuten, bis eine Stunde. Der in Wasser schnell abgespülte Schnitt wird in Glycerin übertragen; längeres Auswaschen ist fehlerhaft, da bei Entfernung sämtlichen NH_4S das gebildete Schwefeleisen durch Luftzutritt oxydirt und entfärbt wird. Das Glycerin eignet sich als Menstruum für die Schnitte, nicht nur weil es dieselben durchsichtiger macht, sondern namentlich auch wegen seines geringen Lösungsvermögens für Sauerstoff. Erst nach vollständiger Durchtränkung (etwa $\frac{1}{2}$ Stunde) treten die feinsten Körnchen von FeS mit genügender Deutlichkeit hervor, und durch passende Abstufung der Beleuchtung lässt sich von der Gewebestructur noch recht viel erkennen; nach 24 Stunden pflegen die Feinheiten empfindlicher Präparate (z. B. resorbirender Duodenalepithelien) schon eingebüsst zu haben, indem die Grünfärbung durch Oxydation abblasst und durch Diffusion an Schärfe verliert; gröbere und stärkere Fe-haltige Körner können ihre Färbung im Glycerin wochenlang bewahren.

Bei zu grossem Ueberschuss von NH_4S tritt milchige Trübung durch feinkörnig ausfallenden Schwefel ein; Färbemittel neben NH_4S anzuwenden, habe ich nicht als zweckmässig gefunden. Die Anwendung von Säuren ist selbstverständlich ausgeschlossen, ist aber nicht von allen Autoren vermieden worden (z. B. Berry.¹⁾)

1) Zur Frage der Fe-Resorption. Diss. Zürich. 1892.

Weniger zweckmässig als bei alkoholgehärteten ist das NH_4S für frische Präparate, weil besonders das Bindegewebe zu sehr quillt. An epithelialen Zellen (Duodenum, Leber) ist aber auch im frischen Zustande das mikroskopische Bild der Fe-Körnchen ein ganz gutes. Voraufgegangene Härtung in chromsaurem Kali verlangsamt und erschwert die NH_4S -Reaction in hohem Grade, ich habe sie daher selten angewendet. Vossius¹⁾ empfiehlt unter solchen Umständen das NH_4S 2—4 Tage lang einwirken zu lassen.

Wichtig für das Gelingen der Fe-Reaction ist die Beschaffenheit der NH_4S -Lösung; frischbereitetes, noch farbloses NH_4S ist nicht so brauchbar, wie das ältere gelbgewordene NH_4S der Laboratorien; man kann statt dessen in der frischen, farblosen Flüssigkeit etwas Schwefel lösen; ein zu altes Reagens ist andererseits wegen der leicht eintretenden milchigen Trübung durch ausfallenden Schwefel unzuweckmässig.

Kürzlich hat W. S. Hall²⁾ ein „neues Verfahren, das in der Zelle enthaltene Fe nachzuweisen“, angegeben; dasselbe besteht darin, in den ersten 24 Stunden der Alkoholhärtung der Lösung 5—30 Proc. NH_4S zuzusetzen; es sollen dadurch gewisse Fe-Verbindungen, die bei gewöhnlicher Alkoholhärtung in Lösung gingen, unlöslich fixirt und dadurch für die spätere mikrochemische Reaction zugänglich gemacht werden. Ich habe dies Verfahren vor Jahren gelegentlich auch angewendet, da es mir keine Vorzüge zu bieten schien, aber wieder verlassen. Den von Hall hervorgehobenen Punkt habe ich damals nicht speciell beachtet und kann deshalb ein Urtheil darüber nicht abgeben.

Bei der mikroskopischen Betrachtung zeigen in den mit NH_4S behandelten Präparaten gewöhnlich nur einzelne histologische Elemente die Fe-Reaction; manchmal zeigen diese Zellen auch ohne NH_4S eine etwas abweichende mehr oder weniger bräunliche Färbung; dieselbe betrifft gewöhnlich nur einzelne Körner des Zellinhaltes, sehr selten in diffuser Weise den ganzen Zellkörper; ein grosser (oft der grösste) Theil der auf Fe reagirenden Massen entbehrt aber dieser bräunlichen Färbung. Die körnigen, auf Fe reagirenden Partikel sind zum grössten Theil in den frischen Zellen schon als solche vorhanden; ein anderer Theil dieser Körnchen mag in den Alkoholpräparaten erst durch das Reagens ausgefällt sein.

Sind die Fe-haltigen Elemente sehr zahlreich, wie dies z. B.

1) Graefe's Archiv. Bd. XXXI. S. 172.

2) Ueber das Verhalten des Fe im thierischen Organismus. Archiv f. Anat. und Physiol. Physiol. Abth. 1896. S. 55.

häufig in der Leber der Fall ist, so zeigt der Schnitt, schon bei schwacher Vergrößerung oder für das blosse Auge Grünfärbung. Liegen die Fe-haltigen Elemente in einer gewissen anatomischen Anordnung, so kann diese durch die Grünfärbung hervorgehoben und schon für das blosse Auge sichtbar werden (Läppchenstructur der Leber, Rindensubstanz der Niere, Milz, Lymphdrüsen).

Bei sehr geringem diffusen Fe-Gehalt (z. B. der normalen Leber) kann die Grünfärbung so schwach sein, dass sie für das blosse Auge und vielleicht auch für schwache Vergrößerung zwar hervortritt, bei stärkerer Vergrößerung aber verschwindet.

Wie an Schnitten, so kann auch an Organstücken oder am ganzen Organ die Fe-Reaction durch NH_4S für das blosse Auge sichtbar werden. Diese makroskopische Reaction ist oft wertvoll zur vorläufigen Orientirung über die einzelnen Organe und Organtheile, dem sie am Darm z. B. die Fe-haltigen Regionen schnell herauszufinden erlaubt, man kann zu dem Zweck die frischen Organe in NH_4S legen, doch wirken hier Quellung und Grünfärbung durch Hämoglobin (s. u.) leicht störend; zweckmässiger legt man die alkoholgehärteten Präparate für kurze Zeit in NH_4S und untersucht in Salzwasser oder Alkohol; solche Präparate bewahren die Grünfärbung im Alkohol längere Zeit, besonders, wenn man noch etwas NH_4S hinzufügt, und bleiben trotzdem für mikroskopische Untersuchung noch leidlich brauchbar.

Oft vollzieht sich die makroskopische Schwefeleisenreaction von selbst in der Leiche an den Organen der Bauchhöhle durch den H_2S der Darmfäulniss, sodass die dem Darm anliegenden Organteile, namentlich von Leber, Milz, auch Niere eine mehr oder weniger schwärzliche Färbung annehmen und man dadurch auf grösseren Fe-Gehalt aufmerksam wird; freilich kann auch bei hohem Fe-Gehalt die Färbung fehlen, wenn zufällig die Fäulniss keine Schwefelverbindungen entwickelt.

Ueberhaupt darf auf die makroskopische Fe-Reaction allein kein zu grosser Werth gelegt werden und muss dieselbe mikroskopisch und an Schnitten controllirt werden; auch kann an frischen Organen dadurch eine Täuschung entstehen, dass das Blut in den Capillaren oder der imbibirte Farbstoff in den Geweben durch NH_4S grünlich gefärbt werden; diese Färbung ist am Rande und an dünnen Schnitten aber immer nur graugrün und schwindet unter dem Mikroskop; sie wird bei einiger Uebung von wirklicher Eisenreaction leicht unterschieden.

Auch zu andern Täuschungen giebt die NH_4S Reaction wenig

Anlass; Behandlung der Präparate mit blanken Stahlinstrumenten (Messer, Nadeln) vor der Anwendung des Reagens ist unverfänglich; Verunreinigungen des Präparats durch Rost oder Eisenniederschläge aus Luft und Wasser sind zwar störend, können aber als solche stets erkannt werden und zu Täuschungen kaum führen. Zur Manipulation in NH_4S -haltiger Flüssigkeit sind nur Glasnadeln oder Platininstrumente zu verwenden.

Dass durch Fäulniss aus dem Blut direct reagirendes Eisen frei werde, ist wohl möglich, aber jedenfalls äusserst selten und mir selbst niemals vorgekommen. Nur am Rand von Leber- und Nierenschnitten habe ich zuweilen mikroskopisch eine Grünfärbung der nächstgelegenen Gewebsschicht beobachtet, die im Innern des Organs nicht vorhanden war. Ob dieselbe durch den kurzen Einfluss der Luft vor dem Einlegen in Alkohol, ob sie durch directen Einfluss des letzteren auf das noch in den Capillaren enthaltene Blut herbeigeführt wurde, vermag ich nicht zu sagen. Die Färbung ist meist diffus, auf die Randschicht beschränkt und kann, wenn man die Thatsache kennt, zu Täuschung keinen Anlass geben.

Dass der Grad der Grünfärbung nur von der Menge des locker gebundenen Eisens abhängt, und daher einen Schluss auf den absoluten Eisengehalt des Organs nicht ohne weiteres zulässt, liegt auf der Hand und ist auch stets von mir betont worden. Gerade Hämoglobin, Methämoglobin, Hämatin und eine Anzahl nicht näher bekannten Fe-Verbindungen reagiren nicht auf NH_4S . Dagegen gehören zu den direct reagirenden Fe-Verbindungen das Ferratin und andere in der Leber vorkommende Eisenalbuminate, das Hämatogen im Eidotter und die unter dem Namen Hämosiderin zusammengefassten Abkömmlinge rother Blutkörper. Also nur auf die Gegenwart, resp. Vermehrung dieser letzteren oder verwandter Körper weist die Fe-Reaction hin.

Ein Beispiel, wie sehr in dieser Hinsicht Vorsicht des Urtheils geboten ist, giebt der Eidotter, welcher bei kaum so grossem Fe-Gehalt wie die normale Leber intensiver als diese auf NH_4S reagirt. Die Reaction tritt auch bei ganz frischem Dotter sofort ein, während sie in dem von Bunge daraus dargestellten Hämatogen erst nach mehreren Stunden eintreten soll.

Kann die NH_4S -Reaction demnach die quantitative chemische Analyse durchaus nicht ersetzen, so ergänzt sie dieselbe doch und giebt nach einer Richtung hin mehr Aufklärung, indem sie die Vertheilung des Eisens auf die einzelnen Gewebeelemente nachweist.

Die zweite auf thierische Gewebe direct anwendbare Fe-Reaction ist die mit Ferrocyankalium und Salzsäure.

Während aus wässriger Lösung das Eisen als Berliner Blau ausfällt, verleiht das im Zellprotoplasma enthaltene Fe diesem oder den betreffenden Protoplastmakörnern eine durchscheinende, diffus blaue Färbung. Wenn auch ein Theil des direct reagirenden Fe der Organe wahrscheinlich als Oxydulverbindung vorhanden ist und auf diese Ferrocyankalium nicht reagirt, so kommt dies praktisch bei mikroskopischen Schnitten wegen der leichten Diffusion des O doch gar nicht oder höchstens durch langsamere Entwicklung der Färbung zur Geltung.

Zur Ausführung der Reaction werden die mikroskopischen Schnitte in eine Lösung von Ferrocyankalium und Salzsäure (je $\frac{1}{2}$ —1 Proc.) auf einige Minuten bis höchstens eine Viertelstunde gebracht; dann folgt Auswaschen in angesäuertem Wasser, Einschluss in Glycerin oder Canadabalsam. Da nur bei saurer Reaction die Ferrocyan-Verbindung unlöslich ist, empfiehlt es sich nicht, die Salzsäure nach dem Ferrocyankalium anzuwenden, weil die Blaufärbung dann leicht diffus wird; letzteres kann auch bei allzulänglichem Verweilen der Schnitte in der angesäuerten Ferrocyankalium-Lösung, sowie bei grösserer Concentration der letzteren, namentlich an den Rändern, geschehen; augenscheinlich kann unter dem Einfluss der organischen Substanzen aus dem Ferrocyankalium eine geringe Menge Fe so weit frei werden, dass es mit dem Rest des unzersetzten Salzes eine schwache und verwaschene Berliner Blau-Reaction giebt. Um Zersetzungen zu vermeiden, ist es nöthig, die Ferrocyankaliumlösung erst unmittelbar vor dem Gebrauch mit der Salzsäure zu mischen. Für bedenklich halte ich auch Vorbehandlung der Objecte mit differenten Härtingsflüssigkeiten, wie Sublimat, Salpetersäure (Macallum), wenn mir auch eigne bestimmte Erfahrungen darüber nicht zu Gebote stehen. Ein Vorzug der Ferrocyankalium-Reaction ist die Möglichkeit, die Schnitte vorher in Alauncarmin oder Lithioncarmin zu färben; ist ferner die Haltbarkeit der Präparate, welche sich entwässern, und Monate, selbst Jahre lang, in Canadabalsam conserviren lassen. In Glycerinpräparaten wird die Berliner Blaufärbung leichter und schneller diffus, als die Grünfärbung durch Schwefeleisen.

Größere Eisenkörner, z. B. der Milz, werden durch die Berliner-Blaureaction recht gut sichtbar, ein Unterschied, gegen NH_4S scheint nicht zu bestehen, dagegen ist die Farbe für die meisten Augen gefälliger und das mikroskopische Bild, besonders bei gleichzeitiger Carminfärbung, hübscher; dies hat wohl die meisten Untersucher bestochen. An Feinheit steht die Ferrocyankalium-Reaction aber der mit NH_4S unzweifelhaft nach; diffuser Eisengehalt des Protoplasma

und sehr feine Eisenkörnchen, z. B. in resorbirenden Duodenalepithelien sind lange nicht so deutlich oder können sogar ganz übersehen werden. Die unvollkommenen Untersuchungsergebnisse mancher Beobachter, z. B. der Kobert'schen Schüler sind wohl theilweise auf die Bevorzugung dieser geringwerthigeren Methode zurückzuführen.

Für makroskopischen Fe-Nachweis eignet sich Ferrocyankalium und Salzsäure garnicht; da Eiweiss durch die Mischung coagulirt wird, dringt die Flüssigkeit nur sehr langsam in die Tiefe. Wie wenig die Reaction leistet, sieht man sehr deutlich am Eidotter, der durch sie nur eben blassblau, durch NH_4S aber dunkelgrün wird. Die Eiweiss coagulirende Wirkung bedingt auch wohl die Inferiorität der Methode für mikroskopische Zwecke.

Aber nicht nur weniger empfindlich ist die Ferrocyankalium-Reaction für den mikrochemischen Nachweis des Fe, sie kann auch direct irre leiten. Dass Abweichungen von der oben gegebenen Ausführungsvorschrift zu Irrthümern führen können, wurde schon erwähnt. Das Ergebniss mancher Untersuchungen in der Fe-Frage aus den letzten Jahren scheint mir von Irrthümern solchen Ursprungs nicht ganz frei zu sein. Aber auch bei durchaus vorsichtiger Ausführung der Reaction können grobe Täuschungen vorkommen. Fig. 21, Taf. IV, zeigt einen nach der oben gegebenen Vorschrift behandelten Schnitt von der Magenschleimhaut des Frosches. Gruppenweise im Präparat vertheilt, sieht man hier theils die Kernkörperchen blau gefärbt, theils die Kerne der Epithelzellen mit feinsten blauen Körnchen erfüllt, während mit NH_4S behandelte Schnitte keine Spur von Fe-Reaction zeigen. Auch die Kernkörperchen in Bindegewebszellen und glatten Muskeln zeigten in dem gleichen Präparat Blaufärbung, ebenso die von manchen Epithelien des Duodenums, des Dünn- und Dickdarms. In letzterem war diese Pseudo-Fe-Reaction der Kernkörperchen besonders da am deutlichsten, wo in der Umgebung wirklich Fe-haltige Zellen sich fanden.

Dr. B. Salomon machte den Versuch, Schnitte der gehärteten Magenschleimhaut vom Hund zuerst für kurze Zeit in Eisenchloridlösung, dann nach Abspülen, in NH_4S zu legen. Es trat dann schöne Kernfärbung durch Schwefeleisen ein. Das Eisen war also aus der Lösung von den Kernen besonders angezogen worden; verfuhr er so mit frischer Schleimhaut, so blieben gerade die Kerne ungefärbt.

In ähnlicher Weise wie hier, dürfte auch in meinen oben beschriebenen Präparaten seitens der Zellkerne eine Attraction auf dasjenige Eisen stattgefunden haben, welches in den Zellen ungebunden enthalten oder durch Zersetzung aus Ferrocyankalium frei geworden

war; dies Eisen hat dann mit dem überschüssigen Ferrocyankalium Berliner-Blaureaction gegeben; allerdings müssen unbekannte und uncontrolirbare Bedingungen gerade in den vorliegenden Präparaten mitgespielt haben.

Wenn ich in so schlagender Weise nicht öfter solche falsche Eisenreactionen der Zellkerne beobachtet habe, so liegt dies eben daran, dass ich mich der Ferrocyankaliumreaction nur mit grosser Vorsicht, viel seltener und aushülfsweise bediente; jedenfalls kann dieselbe zu ganz groben Täuschungen Veranlassung geben und ich muss befürchten, dass solchen Täuschungen auch R. Schneider¹⁾ nicht ganz entgangen ist, denn es ist doch auffällig, dass er bei seinen Untersuchungen in der Thierreihe mit der Berliner Blaureaction so häufig Fe-Reaction der Zellkerne fand, während mir dieselbe in meinem allerdings beschränkten Untersuchungsgebiet mit NH_4S niemals vorgekommen ist.

Um es noch einmal kurz zusammenzufassen, so ist die Berliner-Blaureaction mit Ferrocyankalium und Salzsäure für mikroskopische Zwecke mit einer gewissen Beschränkung und Vorsicht wohl brauchbar, namentlich für Demonstrationen mit gleichzeitiger Carminfärbung und für Dauerpräparate.

Ein viel vorzüglicheres Reagens aber ist Schwefelammonium, sowohl für makroskopische wie für mikroskopische Zwecke. Die Schwefeleisenfärbung ist freilich weniger haltbar, die Reaction aber nicht nur viel empfindlicher, sondern auch zuverlässiger und unzweideutiger als jene.

Erklärung der Abbildung.

(Taf. III, IV.)

Fig. 21. Normaler Frosch (März). Magenschleimhaut ⁴⁶⁰/₁. Pseudo-Fe-Reaction. Die Kerne der Epithelzellen an der Oberfläche der Leisten gruppenweise von feinen blauen Körnchen durchsetzt, dadurch blau erscheinend.

1) Die Fe-Resorption in thierischen Geweben und Organen. Abhandlungen der Akad. d. Wiss. zu Berlin 1888. Bd. II. — du Bois Archiv f. Physiol. 1890. S. 173.