

Aus der Privatklinik von Dr. J. Voigt und dem Institut für anorganische Chemie in Göttingen. (Direktor: Prof. Zsigmondy.)

Biologische Untersuchungen über kolloidales Silber mittels einer neuen Methode zum Nachweis feinsten Metallablagerungen in den Organen.¹⁾

Von J. Voigt.

Seit P. Ehrlich auf Grund seiner theoretischen Ueberlegungen und experimentellen Arbeiten — vorzugsweise mit Farbstoffen — als Erster die Bedeutung des distributiven Moments erkannt und gelehrt hat, ist von therapeutisch wichtigen Substanzen nur die Verteilung der Salizylsäure (M. Jakoby) und des Jods (O. Loeb) genauer studiert worden. Es ist dies um so auffallender, als die Berechtigung des Ausspruchs P. Ehrlichs, „daß die Verteilung der Arzneistoffe im Organismus das Bindeglied zwischen der chemischen Konstitution und der pharmakologischen Wirkung bilde“, von Niemandem ernstlich angefochten werden kann. Das von ihm geforderte Studium der Verteilung bedeutet zugleich das Erfüllen der wichtigsten Vorbedingung für eine wirklich zielbewußte therapeutische Verwendung. Für das kolloidale Silber, das vielfach zu therapeutischen Zwecken empfohlen wird, ist dieser Forderung noch bei weitem nicht entsprochen; fehlt uns doch auch heute noch die genaue Kenntnis der Verteilung und des Schicksals der Silberhydrosole im tierischen Organismus. Bei der großen, über das kolloidale Silber vorliegenden Literatur muß es auffallen, daß es den verschiedenen Untersuchern noch nicht gelungen ist, experimentell feste Grundlagen für seine therapeutische Anwendung zu schaffen.

Französische Autoren z. B. haben ziemlich viel über die Frage der Verteilung und des Schicksals des Silberhydrosols im Organismus gearbeitet. Ihre Beobachtungen genügen jedoch nicht, um eine Therapie mit kolloidalem Silber wissenschaftlich zu begründen; ja es muß leider festgestellt werden, daß ihre Angaben vielfach so wenig genau sind, daß eine Nachprüfung ganz unmöglich ist. Die weniger zahlreichen deutschen Arbeiten, die sich mit dem Studium des Schicksals des Silberhydrosols im Körper befassen, lassen noch zahlreiche Fragen unbeantwortet.

Auch die sorgfältigste chemische Analyse vermag unterhalb eines gewissen Minimums nichts mehr zu leisten, ganz abgesehen davon, daß die vielen Chloride im Tierkörper einer solchen erhebliche Schwierigkeiten bereiten. Aus diesem Grunde scheint auch die sehr mühsame Mikroanalyse hier nicht anwendbar. Auch im besten Falle erhalten wir durch eine quantitative Analyse niemals einen Aufschluß über das Verhalten der Zellen, welcher auf deren Funktion resp. Partialfunktion zu schließen berechtigte. Die quantitativen Untersuchungen finden ihre Ergänzung durch die mikroskopischen Beobachtungen, deren Bedeutung gerade für das Studium der Verteilung P. Ehrlich nachgewiesen hat. Die gewöhnliche mikroskopische Untersuchung vermag zwar Metallniederschläge bis zu einer gewissen geringsten Größe als schwarze oder braune Ablagerungen in den Schnitten nachzuweisen, aber auch hier ist die Grenze bald erreicht. Wo derartige Niederschläge nicht zu erkennen waren, konnte bisher kein Metall nachgewiesen werden, ebensowenig ließ sich entscheiden, ob neben den wahrnehmbaren Ablagerungen nicht noch feinere beständen, die biologisch wie therapeutisch von besonderem Interesse sein dürften. Um also mit einiger Aussicht auf Erfolg an das Studium der Verteilung kolloidaler Metalle, wie z. B. des Silbers, im Organismus gehen zu können, bedurfte man offenbar einer neuen Methode, die uns instandsetzt, möglichst alle Metallniederschläge, insbesondere die bisher nicht sichtbar zu machenden allerfeinsten, im Gewebe nachzuweisen.

Ich bin nun in der Lage, über eine neue Methode zu berichten, die ich für diese Untersuchungen ausgearbeitet und deren Leistungsfähigkeit ich erprobt habe.

Es gelingt unter Anwendung gewisser Vorsichtsmaßregeln, in genügend feinen Schnitten mit Hilfe des Paraboloidkondensors dem Auge noch Metallteilchen erkennbar zu machen, die bei der Betrachtung im durchfallenden Lichte sich

entweder gegenüber der Körnelung des Protoplasmas nicht genügend markieren oder selbst mit stärkster Vergrößerung nicht mehr wahrnehmbar sind. Dies beruht auf der Tatsache, daß feine Partikelchen mit einem anderen Brechungsindex als dem des umgebenden Mediums seitlich auffallende Strahlen diffus reflektieren und dadurch den Eindruck selbstleuchtender Gebilde machen, die sich dann auf dunklem Grund ausgezeichnet abheben. Es ist ohne weiteres klar, daß schon an und für sich ein leuchtender Punkt mit dunkler Umgebung sehr viel leichter zu erkennen ist, als wenn die umgekehrten Verhältnisse bestehen. Ein weiterer Vorteil dieser Beobachtungsweise liegt noch darin, daß die diffuse Reflexion ein Diffraktionsbild, von Zsigmondy u. A. als Beugungsseibchen bezeichnet, liefert, welches das lichtbeugende Teilchen an Größe bedeutend übertrifft. Außer den Niederschlägen, die immer noch als Ablagerungen von Teilchen zu erkennen sind, kommen auch solche Bilder vor, die durch Adsorption allerfeinsten, ultramikroskopischer Metallteilchen zu erklären sind; es treten hier keine Beugungsseibchen mehr auf, sondern es geht ein feiner Lichtschein von der betreffenden Membran aus.

Während es bei der ultramikroskopischen Untersuchung von Metallhydrosolen nicht angängig ist, von der Farbe des Beugungsseibchens auf die Größe des lichtbeugenden Teilchens zu schließen, so scheint nach meinen Beobachtungen bei meiner Methode ein derartiges Vorgehen bedingt zulässig, wenn es sich um Schnitte handelt, in denen Silberablagerungen vorhanden sind. (Ob die gleich zu beschreibenden Verhältnisse auch für andere Metallhydrosole zutreffen, kann ich nach dem mir bis jetzt vorliegenden Material noch nicht entscheiden.) Die Farbe des durch Niederschläge eines Silberhydrosols abgebeugten Lichtes ist sehr verschieden; sie durchläuft alle Nuancen vom dunklen Goldrot, das sich z. B. an den Emboli aus Silberteilchen findet, über Goldgelb zum Silberweiß, um bei den erwähnten Fällen von Imprägnierung zu einem hellstrahlenden Himmelblau zu gelangen.

Nach meiner Erfahrung sind für die Technik der Dunkelfelduntersuchung von Schnitten zum Studium der Verteilung kolloidaler Metalle in den Organen besonders folgende Punkte von Bedeutung:

Das Protoplasma besitzt selber ein gewisses Lichtbeugungsvermögen, das sich bei Verwendung einer sehr starken Lichtquelle störend geltend macht, da die einzelnen leuchtenden Metallteilchen sich auf dem hell schimmernden Protoplasma nicht genügend deutlich abheben können. Die besten Bilder erhält man bei klarem Himmel ohne direktes Sonnenlicht, sonst genügt auch eine 50kerzige Osramlampe, wenn man die Vorsicht gebraucht, eine mattierte Blauscheibe davor zu stellen. Um bei diesem verhältnismäßig schwachen Licht untersuchen zu können, muß man nach Möglichkeit alles Nebenlicht vom Auge fernhalten.

Des Weiteren ist für diese Untersuchungen im Dunkelfeld die denkbar peinlichste Reinheit jeden Zubehörs von größter Bedeutung. Deckgläser und Objektträger müssen in konzentrierter Salpetersäure ausgekocht und in Alkohol aufbewahrt werden, alle Reagentien sind nur frisch filtriert zu verwenden. Der Kanadabalsam muß wenigstens von Zeit zu Zeit im Dunkelfeld daraufhin untersucht werden, ob er keine nennenswerten Verunreinigungen enthält. In den meisten Präparaten werden sich trotzdem einzelne lichtbeugende Punkte finden, die nicht den gesuchten Metallteilchen entsprechen. Um sich da vor Täuschungen zu bewahren, ist es ratsam, eine ganze Reihe von Schnitten zu untersuchen, die mit verschiedenen Reagentien behandelt worden sind. Einige Niederschläge verschwinden in verdünnter Salzsäure, andere in Kalilauge, in manchen Fällen ist ein intensives Behandeln mit Xylol zu empfehlen. Nur diejenigen lichtbeugenden Teilchen, welche allein auf Zusetzen des spezifischen Lösungsmittels — für meine Versuche mit Silber 1%ige Zyankalilösung — verschwinden, kann man mit Sicherheit als die gesuchten Ablagerungen ansprechen. Die sich hier und da in den Schnitten findenden Verunreinigungen durch Staubteilchen sind meist schon durch die Inkonzanz ihrer Lage im Gewebe charakterisiert. Es muß aber noch auf eine Fehlerquelle hingewiesen werden, die nicht gut auszuschalten ist. Zuweilen kommt es vor, daß durch die Klinge des Mikrotoms einzelne Metallteilchen im Gewebe weitergeschoben werden — es ist das am häufigsten bei größeren Ablagerungen der Fall — und dann falsche Bilder erzeugen. Es genügt aber wohl stets, an diese Möglichkeit zu denken, um derartigen Täuschungen zu entgehen.

Ungefärbte Schnitte sind im ganzen für die Dunkelfelduntersuchung vorzuziehen, doch möchte ich empfehlen, zum Vergleich auch mit Hämatoxylin diskret gefärbte Präparate heranzuziehen. Das Betrachten letzterer, abwechselnd im Hell- und Dunkelfeld, ermöglicht

¹⁾ Vortrag i. d. Med. Ges. in Göttingen am 20. XI. 1913.

ein genaues Lokalisieren der einzelnen Niederschläge im Gewebe. Als ein weiteres Hilfsmittel dafür hat sich mir folgendes Verfahren gut bewährt. Alle im durchfallenden Licht erkennbaren Niederschläge werden zunächst mit Hilfe des Abbé - Winkelschen Zeichenapparates gezeichnet. Nach Herstellen des Dunkelfeldes muß durch Einschalten eines passenden Rauchglases die Helligkeit der Zeichenfläche vermindert werden; man kann dann die eben beobachteten Niederschläge mit den im Dunkelfeld leuchtenden Punkten identifizieren und markieren, außerdem aber noch erkennbar werdende dazu zeichnen. Sehr viel eleganter ist natürlich der Ausweg, das mikroskopische Bild sowohl im Hellfeld wie im Dunkelfeld zu photographieren. Dazu muß ich jedoch bemerken, daß die Mikrophotographie im Dunkelfeld nicht immer ein so gutes Bild liefert, wie der beim Betrachten erhaltene Eindruck erwarten ließ. Abgesehen davon, daß eine Randschärfe selbst mit den besten Systemen nicht zu erzielen ist — es liegt das in der Konstruktion des Kondensors begründet —, schaltet der Beobachter störende Reflexe etc. mehr oder weniger unbewußt aus, die auf der photographischen Platte eine Unklarheit des Bildes bedingen. Um möglichst gute Aufnahmen zu erhalten, empfehle ich, das Präparat mit möglichst schwacher Vergrößerung einzustellen und durch Ausziehen des Kamerabalgens mit der Platte so weit zurückzugehen, daß nur der mittlere Teil des Gesichtsfeldes für die Aufnahme in Frage kommt. Die so erzielte Vergrößerung entspricht der eines bedeutend stärkeren Systems, und das Bild ist von Verzeichnungen fast vollständig frei. Für solche Aufnahmen ist eine sehr lange Expositionszeit nötig; sie schwankte bei Anwendung eines Auerbrenners als Lichtquelle bei meinen Versuchen zwischen 1 Stunde und 4½ Stunden.

Der Gebrauch einer Sternblende unter Verwendung des gewöhnlichen Kondensors genügt für Uebersichtsbilder; zum Studium feinsten Metallniederschläge bedarf man aber unbedingt eines guten Paraboloidkondensors, der auf eine bestimmte Dicke der Objektträger eingestellt ist, die dann selbstverständlich ausschließlich gebraucht werden sollten. Sodann ist zu überlegen, ob nicht ein Vermindern der Apertur durch das Aufkleben einer Papierscheibe auf die Unterseite des Kondensors oder etwas Ähnliches für den Nachweis stark lichtbeugender Teilchen im Gewebe von Vorteil wäre.

Die Leistungsfähigkeit meiner Methode durch Messung der lichtbeugenden Teilchen etwa zu bestimmen, gelingt nicht, doch mögen folgende Tatsachen eine Vorstellung davon geben:

Die Membrana propria gewisser Harnkanälchen in bestimmten Präparaten, die in der Durchsicht keinerlei Silberniederschläge erkennen ließen, strahlten im Dunkelfeld in hellblauem Lichte, das auf Zusetzen von Zyankalilösung, aber nur daraufhin, sofort verschwand. Bei einem mittelgroßen Kaninchen, das in Form einer intravenösen Injektion 0,00125 g kolloidales Gold erhalten hatte, konnte man in der Leber im Dunkelfeld die Goldniederschläge an den typischen Stellen mit aller Sicherheit nachweisen, — sie wurden ebenfalls nur von Zyankalilösung zum Verschwinden gebracht — die im Hellfeld selbst mit Hilfe der Immersion nicht sicher zu bestimmen waren.

Die Tatsache, daß es mit der neuen Methode gelingt, so feine Metallablagerungen im Gewebe zu erkennen, eröffnet neue Perspektiven, die zu verfolgen nicht nur vom rein pharmakologischen, sondern auch vom physiologischen, experimentell pathologischen und experimentell therapeutischen Gesichtspunkte aus lohnen dürfte.

Meine Versuche sind, wie ich bereits erwähnte, im wesentlichen mit kolloidalen Silber angestellt worden; ich habe jedoch Anhaltspunkte dafür, daß sich das Studium anderer Metallsole und wahrscheinlich auch anderer Kolloide, sowie möglicherweise auch anderer Metallverbindungen mittels des neuen Verfahrens als fruchtbar erweisen wird.

Vom pharmakologischen Standpunkte aus ist das Studium der einzelnen Metallhydrosole nicht nur mit Rücksicht auf ihre Verteilung im Organismus interessant, es gibt auch einen Hinweis auf gewisse therapeutische Möglichkeiten. Außerdem wird es aber auch mit Sicherheit mittels dieses Verfahrens gelingen, die verschiedenen Silberhydrosole z. B. untereinander auf ihren Wert zu vergleichen, was vielleicht auch für die Arzneimittelpfprüfung und -bewertung in Frage käme.

Aus dem normalen Verhalten der kolloidalen Metalle im Organismus dürften konstante Befunde vielleicht Rückschlüsse auf die Physiologie einzelner Organe und Zellgruppen erlauben. Gelingt es uns, eine Verwandtschaft des Silberhydrosols oder eines anderen kolloidalen Metalls z. B. zu den Endothelien nachzuweisen, so dürften wir beispielsweise Aufschlüsse über die normalen Lymphbahnen durch besondere Färbung der Lymphkapillaren erwarten. Die Neigung, in bestimmten Zellgebilden, wie in den Sternzellen der Leber oder in bestimmten

Nierenzellen, sich abzulagern, weist uns auf besondere physiologische Verhältnisse hin. Kennen wir aber diese, so können wir sie auch durch die verschiedenartigsten Eingriffe stören, sodaß die Verteilung der kolloidalen Metalle eine Veränderung erleidet. So können wir hoffen, sehr feine Störungen in der Funktion der Organe oder einzelner Zellgruppen zu erkennen, die auf andere Weise nicht festzustellen sind, denn die Störung einer Funktion braucht noch keineswegs grob histologisch erkennbare Veränderungen zu bedingen.

Vom praktischen Standpunkte aus dürften sich experimentell-therapeutische Versuche lohnen. Es wäre z. B. die Verteilung bei infizierten Tieren zu studieren. Man könnte einen Zusammenhang zwischen der Art der Verteilung eines Silberhydrosols oder anderer kolloidaler Metalle und der Wirksamkeit einerseits, und einer veränderten Verteilung im pathologischen Organismus andererseits, wie sie von Locb bereits für das Jod nachgewiesen wurde, aufsuchen. Es würde das nicht nur theoretisch Interessantes liefern, sondern auch für die therapeutische Technik unter Umständen von Bedeutung sein. Bei Trypanosomeninfektion wäre auch eine eventuelle Anhäufung der Metallteilchen im lebenden Infektionserreger zu studieren. Seit längerer Zeit beschäftigt mich die Frage des Verhaltens der kolloidalen Metalle dem Karzinom gegenüber. Insbesondere wird sich bei den experimentellen Mäuse- und Rattentumoren aus dem Studium der Verteilung mittels des beschriebenen Verfahrens die Frage diskutieren lassen, ob die Metalle lediglich als Kapillargifte wirken, oder ob auch eine Wirkung auf die Tumorzellen selbst anzunehmen ist. Der Nachweis ihrer Ablagerung im Tumorgewebe würde auch die bereits theoretisch empfohlene Kombination der Strahlentherapie von Karzinomen mit Injektionen von kolloidalem Metall berechtigt erscheinen lassen.

Ich darf vielleicht zum Schlusse noch darauf hinweisen, daß auch vom gerichtlich-medizinischen, insbesondere vom toxikologischen Standpunkt aus die neue Methode sich als fruchtbar erweisen dürfte.