

# A r c h i v

für

## pathologische Anatomie und Physiologie

und für

## klinische Medicin.

---

Bd. CXIII. (Elfte Folge Bd. III.) Hft. 3.

---

### XX.

#### Anwendung des Methylgrün zur Erkennung der chemischen Reaction und des Todes der Zellen<sup>1)</sup>.

Von Prof. A. Mosso in Turin.

---

Heidenhain war der erste, der auf den Gedanken kam, zum Studium der Zellfunctionen<sup>2)</sup> Farbstoffe anzuwenden; seine Experimente mit indigschwefelsaurem Natron nach dem Verfahren von Chrzonszczewski sind bekannt. Certes<sup>3)</sup> fand, dass die durch 24 Stunden in der feuchten Kammer belassenen weissen Blutkörperchen des Frosches durch Cyanin leicht gefärbt werden, wenngleich sie noch Amöboidbewegungen zeigen. Brandt<sup>4)</sup> bediente sich des Hämatoxylin zum Studium der Infusorien, und folgerte, nachdem er bemerkt hatte, dass in den Vacuolen der Amöben die violette Farbe des Hämatoxylin sich in Braun verwandelte, — dass die Vacuolen ein Secretionsorgan seien und eine sauer reagirende Substanz absondern. Schon Rollet bemerkte, dass eine mit ammoniakalischer Carminlösung gefärbte 1procentige Kochsalzlösung die Blutkörperchen erst dann färbt, wenn sie geronnen sind oder einem elektrischen Strome ausgesetzt werden.

<sup>1)</sup> Aus den Rendiconti dell' Accademia dei Lincei. 1888. Vol. IV. p. 419.

<sup>2)</sup> R. Heidenhain, Pflüger's Archiv. 1874. Bd. 9. S. 1.

<sup>3)</sup> A. Certes, Comptes rendus. 1881. Vol. 92. p. 424.

<sup>4)</sup> K. Brandt, Biolog. Centralblatt. 1881. S. 202.

Pfeffer<sup>1)</sup> veröffentlichte jüngst eine sehr schätzbare Arbeit über „Aufnahme der Anilinfarben durch lebende Zellen“. Es sind diese Experimente und Forschungen an Pflanzen von grossem Interesse für die Zellbiologie. Pfeffer sah, dass das Protoplasma, so lange es lebend ist, durch Methylenblau nicht gefärbt wird, was hingegen eintritt, sobald das Protoplasma sich verändert und stirbt. Die Färbung der lebenden Zellen erfolgt viel leichter durch Methylviolett, doch bemerkte Pfeffer, dass dies ein sehr giftiger Stoff sei und man daher mit Bedacht folgern müsse. Die Färbung des Nucleus, welche eine Lösung von 0,0003 pCt. und sogar eine solche von nur 0,0001 pCt. nach wenigen Minuten hervorruft, ist nach Pfeffer bereits einer Alteration zuzuschreiben. Niemals fand er mittelst Methylviolett eine Färbung des Protoplasmas oder des Nucleus in lebendigem Zustande; in denjenigen Theilen der Pflanzen, welche die Färbung schwerer annahmen, überwogen junge Zellen.

Ehrlich machte in dieser Beziehung einige sehr interessante Versuche<sup>2)</sup>. In seiner Abhandlung über die Reaction der lebenden Nervensubstanz auf Methylenblau bemerkt er, dass alkalische Reaction und Sättigung mit Sauerstoff unerlässliche Vorbedingungen seien, damit die blaue Färbung der Nerven eintrete.

Die chemische Reaction der Zellen lässt sich durch verschiedene Anilinfarben erzielen: ich selbst erhielt die besten Resultate mittelst des Methylgrün<sup>3)</sup>.

Das Methylgrün ( $C_{25}H_3Cl_4N_3Zn$ ) wurde in die mikroskopische Technik durch E. Calberla<sup>4)</sup> eingeführt. Er fand, dass die Nuclei der Zellen des subcutanen Bindegewebes, die Gefässe, das Neurilemma dadurch rosa, die Zellen des Corium und insbesondere deren Nucleus roth-violett, die Elemente der Epidermis blaugrün gefärbt werden. Er forschte nicht nach den Ursachen dieser Farbdifferenz. — Erlicki führte den Ge-

<sup>1)</sup> W. Pfeffer, Untersuchungen aus dem botan. Institute zu Tübingen. Bd. II. S. 179.

<sup>2)</sup> Ehrlich, Deutsche med. Wochenschr. 1886. No. 4.

<sup>3)</sup> Das Methylgrün, dessen ich mich bei diesen Untersuchungen bediente, wurde mir von Trommsdorff in Erlangen und von Dr. Grübler in Leipzig geliefert.

<sup>4)</sup> E. Calberla, Morphologisches Jahrbuch. III. 1877. S. 625.

brauch des Methylgrün bei den histologischen Forschungen der Nervencentren ein.

Ehrlich<sup>1)</sup> bediente sich des Methylgrün beim Studium der Leukocyten, jedoch in Verbindung mit Säurefuchsin (Fuchsin-, Rubinsäure), wodurch er aber verhindert war, die spezifische Reaction jenes Farbstoffes zu erkennen. In Folge von Studien mittelst zahlreicher Anilinfarben, bestätigte er, dass die Leukocyten fünf verschiedene Arten von specifischen Granulationen aufweisen, welche sich verschiedenartig färben. Ehrlich brachte zu diesem Behufe ein Tröpfchen Blut zwischen zwei Deckgläschen, trennte dieselben wieder, nachdem er den Blutstropfen durch leichtes Aneinanderdrücken der Deckgläschen in eine dünne Schicht zertheilt hatte, und liess sie nun bei einer Temperatur von 120°—130° durch 2—3 Stunden trocknen, worauf er sie mit verschiedenen Substanzen färbte. Er behauptet, dass die verschiedenen specifischen Granulationen Folgen einer Secretions-thätigkeit der Zellen seien, giebt aber für diese Lehre keine weitere Erklärung ab, vielmehr beschränkte er sich darauf zu sagen, dass über die Natur dieser Granulationen noch positive Daten fehlen.

Heschel<sup>2)</sup> verwendete das Methylgrün als Reagens zur Erkennung der Amyloidsubstanz. Nach ihm bestätigte Curschmann<sup>3)</sup>, dass die in amyloider Entartung befindlichen Gewebe violett werden, während die normalen Theile sich blau oder grün färben.

Strassburger<sup>4)</sup> bediente sich des Methylgrün, um die karyokinetischen Figuren zu färben; nach ihm benützten es mehrere Andere zum nämlichen Zwecke, aber Niemand suchte — so weit ich davon Kenntniss hätte — die Ursachen der verschiedenartigen Färbungen zu ergründen, welche sich darbieten, wenn die Zellen in eine und dieselbe Lösung dieses Farbstoffes getaucht werden.

Gewöhnlich bediene ich mich des Methylgrün in einer

<sup>1)</sup> P. Ehrlich, Zeitschrift für klinische Medicin. I. 1880. S. 553.

<sup>2)</sup> Heschel, Wiener med. Wochenschrift. 1879. No. 2.

<sup>3)</sup> Curschmann, dieses Archiv Bd. LXXIX. S. 556.

<sup>4)</sup> Strassburger, Arch. f. mikrosk. Anatomie. Bd. XXI. S. 476. — Zellbildung und Zelltheilung. 3. Aufl. S. 141.

wässerigen Lösung von 0,2 pCt auf eine 1procentige Kochsalzlösung. Was die Dosis des NaCl betrifft, so muss der Titre der Lösung der Resistenz jener Zellen entsprechen, welche man zu untersuchen hat, da eine zu verdünnte Lösung sie alterirt. Um die Wirkung des Methylgrün auf die weissen und rothen Blutkörperchen des Menschenblutes zu beobachten, genügt es, wenn wir einen Finger anstechen und den herausquellenden Blutstropfen mit einem, auf einem gläsernen Objectträger befindlichen Tropfen der erwähnten Lösung leicht in Berührung bringen.

Im ersten Augenblicke scheinen die Leukocyten zu widerstehen, dann nehmen sie eine gleichmässig blass-violette Farbe an, die sich allmählich verstärkt<sup>1)</sup>.

Die rothen Blutkörperchen verändern sich: einige vertiefen sich und nehmen Becherform an; bei anderen erscheinen im Innern unregelmässige Höhlungen und diese Verdünnung der gelben Substanz im Centrum des Blutkörperchens ruft Figuren hervor, welche denen ähneln, die Marchiafava und Celli als Kennzeichen der Malariainfektion beschrieben haben<sup>2)</sup>.

Um die Transformation zu verfolgen, welche die Blutkörperchen im Methylgrün erleiden, genügt es, das Präparat in die feuchte Kammer zu bringen oder es mit einem Vaselineering zu umgeben. Alsdann kann man das Präparat unter dem Mikroskop lassen und Stundenlang die Veränderungen des Blutes verfolgen.

Nach 6 Stunden nehmen einige Leukocyten eine bläuliche Farbe an, andere werden grün, aber die grössere Anzahl hat eine intensiv violette Farbe. Die plasmodischen Figuren im Innern der rothen Blutkörperchen sind fast verschwunden, viele

<sup>1)</sup> Die in dieser Abhandlung und in der folgenden enthaltenen Beobachtungen wurden mit einem apochromatischen 2,0 mm Objectiv Zeiss mit homogener Immersion und 1,30 Apertur gemacht. Ich bediente mich fast immer des Ocular No. 4; bei stärkerer Vergrösserung des Oculars No. 12.

<sup>2)</sup> Ich werde in einer der nächsten Abhandlungen auf dieses Argument zurückkommen, um durch neue Beobachtungen den bereits ausgedrückten Zweifel zu bekräftigen, dass nemlich jene plasmodischen Figuren wahrscheinlich centrale Vertiefungen seien, welche durch die nekrobiotischen Veränderungen der rothen Blutkörperchen hervorgerufen werden.

Blutkörperchen haben ihre gelbe Farbe verloren und sind transparent geworden.

Nach 24 Stunden haben zahlreiche Leukocyten die sogenannten Nuclei intensiv grün gefärbt; der übrige Theil des Blutkörperchens besteht aus einer granulösen, leicht bläulichen Substanz; einige Leukocyten haben sich aufgelöst und einen granulösen, violettfarbigen Detritus hinterlassen.

Die violett gebliebenen Leukocyten behalten, im Gegensatze zu den grün gefärbten, undeutliche Nuclei. Man bemerkt auch violette Leukocyten mit grünen Nuclei, an denen Auswüchse und hyaline Tröpfchen zum Vorschein kommen.

Unter dem Einflusse des Methylgrün verlieren einige rothe Blutkörperchen ihr Hämoglobin, entfärben sich und bilden die sogenannten Schatten. Später zeigt sich ein weiterer Unterschied zwischen den resistirenden rothen Blutkörperchen. Einige sind stark granulös geworden und färben sich blau-violett, ohne dass ihre Form sich verändert hätte. Andere färben sich in violett-farbiges Blau, ohne granulös zu werden; bei anderen wieder bleibt der centrale Theil homogen, färbt sich grünlich-blau, und ringsherum bildet sich eine feine granulöse Schicht.

Das Methylgrün ruft noch andere Veränderungen der rothen Blutkörperchen hervor, welche zur Erkennung der Structur dieser Zellen interessante Behelfe liefern. Darüber in einer anderen Note.

---

Frischer, mit Methylgrün behandelter Eiter giebt von der verschiedenartigen Färbung der Leukocyten ein besseres Bild, als Blut. Ich berichte hier ausführlich über eine diesbezügliche Beobachtung, um das Verfahren mit dieser Substanz concreter zur Anschauung zu bringen.

15. Januar 1888. Ich öffne mittelst einer Lanzette eine kleine Pustel, die mir an einer Hand zum Vorschein gekommen war, und berühre sodann mit ersterer einen Tropfen der erwähnten Lösung (0,2 pCt. Methylgrün, 1 pCt. NaCl), welcher sich auf einem gläsernen Objectträger befindet, wodurch Eiter sich dem Tropfen beimischt. Grösstentheils erscheinen die Eiterkörperchen als weisse Sphären in einer grünen Flüssigkeit: viele sind violett gefärbt, wenige bereits grün.

Die grünen Körperchen zeigen keine Spur von Bewegung mehr. Diejenigen, welche sich bewegen, sind ungefärbt; einige zeigen blauviolette Färbung.

Der rothen Blutkörperchen sind nur wenige; einige von ihnen sind rund

und normal; andere sind becherförmig gehöhlt, andere wieder haben centrale unregelmässige Höhlungen.

Die rothen Blutkörperchen widerstehen der Einwirkung der Farbfüssigkeit ziemlich gut; doch sieht man an einigen an einer Seite einen granulirten Halbmond sich bilden, der violett gefärbt ist, während die Masse des Blutkörperchens zu zwei Drittel aus einer gelben homogenen Substanz besteht.

Die hyaline Substanz der Eiterkörperchen bildet Tröpfchen und Beulen, welche an der Oberfläche haften und sich nicht färben, während im Innern der Eiterkörperchen grüne oder violette Fragmente sichtbar sind, wie ich es schon in meiner Mittheilung über die Nekrobiose der rothen Blutkörperchen beschrieb<sup>1)</sup>.

Nach 10 Minuten sind fast alle weissen Blutkörperchen verschwunden, dagegen erscheinen nunmehr zahlreicher die violetten und grünen.

Ich bringe das Präparat in die feuchte Kammer und belasse es dort durch 2 Stunden. Die hierauf vorgenommene Untersuchung zeigt, dass die gelben Blutkörperchen gut widerstanden haben; die grössere Anzahl hat die normale Farbe behalten, nur einige wenige sind grün gefärbt und besitzen einen dicken, intensiver gefärbten Kern von  $5\mu$  Durchmesser und sind ausserdem mit einer lichtgrün gefärbten granulirten Substanz umgeben, wodurch der Durchmesser des Blutkörperchens auf  $7\mu$  steigt. Andere ähnliche Formen zeigen den Uebergang der rothen Blutkörperchen durch weniger intensive Färbung, in welcher noch die gelbe Farbe vorwiegt.

Die Eiterkörperchen enthalten eine fein granulirte Substanz, welche sich nur schwer, und eine andere, welche sich leichter färbt. Diese letztere Substanz bildet mehr oder weniger regelmässige Kügelchen, die ich Cytofragmente nannte<sup>2)</sup>, weil sie keine wahren Nuclei sind. Diese Kügelchen oder Fragmente erscheinen erst weiss, dann violett, hierauf bläulich und schliesslich smaragdgrün. Sie sind das Product eines nekrobiotischen Processes und entstehen durch eine Art von Coagulation, durch eine Zersetzung oder Anschwellung der Substanzen, welche die Blutkörperchen bilden. Eine dritte Substanz, welche wir in den Eiterkörperchen wahrnehmen, ist die sogenannte hyaline Substanz, die sich nie färbt. Nach 24 Stunden sind, anstatt der violetten, die grün gefärbten Körperchen vorwiegend. Noch bemerkt man einzelne weisse.

Ich bringe das Präparat wieder in die feuchte Kammer und untersuche es nach 3 Tagen. Sämmtliche Eiterkörperchen sind grün und gut erhalten. Die violettfarbigten sind nur selten und auch in ihnen zeigt sich eine stärkere Tendenz zum Grünen, als zum Blauen. In einigen finden sich 2—3 kuglige, grün gefärbte Fragmente neben 1—2 ähnlichen violetten Kügelchen. In diesen sämmtlichen Zellen ist der granulirte Theil, welcher den Zellkörper bildet, in welchem die sogenannten Nuclei oder Cytofragmente eingeschlossen sind, weniger gefärbt.

<sup>1)</sup> Dieses Archiv. 1887. Bd. 109. S. 252, 260.

<sup>2)</sup> Ibidem S. 254.

Die Granulationen sind lichtbrechend und die farblose hyaline Masse ist stärker entwickelt als am ersten Tage, weshalb viele Zellen mehr rund oder ellipsoid sind, mit hyalinen, transparenten Auswüchsen an der einen Seite. Nach 4 Tagen existirt kein einziges violett gefärbtes Eiterkörperchen mehr, alle sind smaragdgrün. Nur sehr wenige sind farblos und diese zeigen das Aussehen einer transparenten, wenig granulirten, hyalinen Masse ohne Cytofragmente. Einige Eiterkörperchen sind stark granulirt und bilden gleichsam eine Sphäre, welche 2—3 smaragdgrüne Kügelchen enthält.

Die Eiterkörperchen bestehen aus einer fein granulirten, schwammartigen Substanz, die sich nicht färbt; innerhalb dieser Sphäre befinden sich Kügelchen, die sich intensiv grün färben. In der ersten Periode, solange nemlich die ganze Zelle violett gefärbt ist, war dieser Unterschied zwischen den zwei Substanzen weniger evident.

Wir haben bereits früher<sup>1)</sup> ersehen, dass junger Eiter von altem sich durch eine tiefgehende Differenz in der Structur der Eiterkörperchen unterscheidet, welche letzteren sich in verschiedenen Graden einer mehr oder weniger vorgeschrittenen Degeneration befinden. Dieser Unterschied wird nun durch die Reaction des Methylgrün bestätigt, indem sich dadurch die jungen Eiterkörperchen violett, dagegen diejenigen grün färben, welche sich in der letzten Phase des nekrobiotischen Prozesses befinden. Bei jungem frischem Eiter bemerken wir, dass die grössere Anzahl der Eiterkörperchen violett wird und nur wenige sich grün färben. Wenn wir denselben Eiter auf einem Uhrglase 4—5 Tage in der feuchten Kammer belassen und sodann untersuchen, finden wir, dass fast alle Zellen sich sofort smaragdgrün färben. Sobald wir die Zersetzung des Eiters beschleunigen, indem wir ihn in eine Temperatur von 38°—42° bringen, so verlieren die Zellen die Fähigkeit, sich violett zu färben, und erscheinen sogleich grün. Der Eiter ist sauer geworden<sup>2)</sup>.

Die Beobachtung, dass eine und dieselbe Zelle sich erst violett, dann blau und schliesslich grün färbt, lässt darauf schliessen, dass die Färbung von chemischen Vorgängen abhängt, welche sich mit dem nekrobiotischen Prozesse verändern.

Zellen, welche sich in normalen Lebensbedingungen befinden,

<sup>1)</sup> Dieses Archiv. 1887. Bd. 109. S. 254.

<sup>2)</sup> In einer nächsten Mittheilung werde ich meine Versuche über die saure Reaction des Eiters veröffentlichen. Daraus wird man sich leicht überzeugen, wie durch die Nekrobiose eine saure Beschaffenheit der Zellen entsteht.

lassen sich nicht intensiv färben; auch wenn sie schon in die erste Phase des nekrobiotischen Prozesses eingetreten sind, widerstehen sie noch der Imbibition der Farbstoffe. Ich habe mich von dieser Thatsache nicht nur bei Verwendung des Methylgrün, sondern auch bei Experimenten mit Magdalaroth, Eosin, Methylviolett, Jodgrün, Methylenblau u. s. w. überzeugt. Von diesen Beobachtungen will ich nur eine erwähnen, wo der Eiter einem kleinen Abscesse unter der Zunge entnommen wurde.

Magdalaroth (= Naphthalinroth, salzsaures Rosanaphthylamin, Naphthalinrosa,  $C_{30}H_{21}N_3 \cdot H_2O \cdot HCl$ ) 0,4 pCt. NaCl 0,75 pCt.

Beiläufig die Hälfte der Eiterkörperchen färbt sich sofort roth, die andere nimmt keine Farbe an. Näher untersucht findet man, dass jene Eiterkörperchen, welche sich nicht färben lassen, lebhaftere Bewegungen der Granula zeigen, während dieselben bei den roth gefärbten Eiterkörperchen ganz unbeweglich sind. Wenn man eine Zelle mit in Bewegung befindlichen Kernen lange fixirt, so sieht man, wie sich dieselbe langsam färbt, ferner, dass die Bewegung der Kerne aufhört.

Fassen wir das Gesagte zusammen, so resultirt aus den angeführten Versuchen, dass die Zellen sich nicht färben lassen, so lange sie in voller Lebensthätigkeit sind; dass sie sich violett färben, sowie es gelingt, die Lebensthätigkeit zu vermindern, und dass diese Farbe sich bei derselben Zelle nach einander verändert und zwar zuerst dem Blaugrün zuneigt, um schliesslich lichtsmaragdgrün zu werden.

Bei der Untersuchung von frischem und altem Eiter mit Methylgrün habe ich meine Lehre der Nekrobiose der rothen Blutkörperchen bestätigt gefunden. Durch diese Methode kann man sich leicht überzeugen, dass die Leukocyten und die Eiterkörperchen sterbende und gestorbene Zellen sind.

Bei Anwendung einer Lösung von 0,2 pCt. Methylgrün, 1 pCt. NaCl bemerkt man eine rapide und tiefgehende Veränderung der Leukocyten. Im Fischblute bemerkt man, wenn man die homogenen, weissen Blutkörperchen, welche in lebhafter Bewegung sind, mit voller Aufmerksamkeit verfolgt, — nach Zusatz eines Tropfens der genannten Lösung an den Rand des Deckgläschens — wie die Leukocyten sofort ihre Fortsätze einziehen, kuglig werden und im Innern zahlreiche Kügelchen oder Hohlräume auf-



weisen. Die weissen Blutkörperchen nehmen eine blassviolette Färbung an. Die Vacuolen bleiben farblos, der sogenannte Nucleus hingegen wird intensiv violett gefärbt, ist rund oder nierenförmig, oder es zeigen sich zwei Nuclei neben einander.

Einige Blutkörperchen verwandeln sich in wenigen Minuten in eine hyaline Kugel mit dicken Granulationen und kernartigen Fragmenten auf der einen Seite, während man auf der anderen Seite die hyaline Substanz und in deren Innern in lebhafter Bewegung befindliche Körner bemerkt, wie ich es schon bei den Eiterkörperchen beschrieben habe. Manchmal verändern sich die in Bewegung befindlichen weissen Blutkörperchen, — überrascht von der deletären Wirkung der genannten Flüssigkeit, — bevor sie noch Zeit hatten zu conglobiren, und es erscheinen sodann im Innern der Blutkörperchen kleine Kügelchen in der Zahl von 10, 15 oder auch mehr um den Nucleus herum gelagert; bald nachdem die Blutkörperchen violett werden, ziehen sie die Fortsätze ein und werden sphärisch.

Methylgrün, 0,2 pCt. in einer 1procentigen Kochsalzlösung, bewirkt in diesem Falle einen so rapiden Tod der Leukocyten, dass wir in demselben Blutkörperchen die Transformationen auf einander folgen sehen, welche im Eiter — innerhalb des Organismus der Säugethiere — eine bedeutend längere Zeit beanspruchen. Wir sehen Leukocyten, die früher homogen waren, in der Bewegung einhalten, ihre Fortsätze einziehen und kugelförmig werden; in ihrem Innern (vielleicht durch einen Gerinnungsprozess) erscheint eine gewisse Anzahl von Kügelchen, 15, 20 bis 30, welche die ganze Zelle erfüllen; einige grössere Fragmente färben sich intensiver; in der letzten Periode der Nekrobiosis sondert sich eine hyaline Substanz ab, in welcher man Körnchen bemerkt, welche sich bewegen, wie diejenigen des Eiters, während der Rest der Zelle intensiv gefärbt ist.

Epithelialzellen mit flimmernden Wimperhaaren und Spermatozoen sind die am meisten geeigneten Elemente, um die Beziehungen zu studiren, welche zwischen Färbung der Zellen und ihrer Vitalität bestehen. Wenn man ein Stück der Pharynxschleimhaut des Frosches nimmt und es in der Lösung (0,2 pCt. auf 0,75 pCt. NaCl) zerreisst, so nehmen die Zellen, deren Cilien sich bewegen, eine violette Farbe an, diejenigen, deren Cilien

unbeweglich sind, hingegen eine grüne. Wenn man nun die Aufmerksamkeit jenen Zellen zuwendet, deren Cilien sich bewegen, so bemerkt man, dass sie keine Spur eines Nucleus zeigen; nach beiläufig einer halben Stunde werden die Cilien unbeweglich und es kommen 1—2 blaue Nuclei zum Vorschein, doch sind deren Umrisse noch verschwommen. Erst nach 2 oder 3 Stunden wird der Nucleus deutlicher und nimmt eine grüne Farbe an; die Cilien bleiben farblos. Nach 4 bis 5 Stunden sind alle Nuclei smaragdgrün gefärbt und nur sehr wenige Zellen erscheinen violettfarbig.

Ich habe dieselben Beobachtungen auch an den Flimmerzellen von *Unio* und *Anodonta* gemacht, welche die Kiemen dieser Thiere bedecken oder auf deren Mantel stehen. Die letzteren sind zum Studium mehr geeignet, da sie sich spontan loslösen und sehr lange Cilien besitzen, so dass man jede kleinste Bewegung sieht, da ferner ihre beträchtliche Grösse das Studium der nekrobiotischen Veränderungen erleichtert.

So lange die Zellen von *Anodonta* und *Unio* sich lebhaft bewegen, lassen sie sich weder durch Methylgrün, noch durch Magdalaroth oder eine andere Substanz färben. Dies ist die Periode der vollen Vitalität, während der die Zellen so lebhaft Bewegungen ausführen, dass man häufig sieht, wie sie das mikroskopische Gesichtsfeld durchheilen, indem sie mit ihren langen Cilien die ihnen nahestehenden Blutkörperchen und Zellen peitschen.

Hierauf folgt die Periode der Agonie, in welcher sie sich nicht mehr oder doch nur sehr langsam bewegen; in dieser Periode sind sie entweder farblos oder nur sehr leicht violett gefärbt, doch kann man den Nucleus noch nicht wahrnehmen.

Sobald der Nucleus sich färbt und deutlich begrenzt im Zellkörper erscheint, sind die Cilien bereits bewegungslos, oder ihre Bewegungen sind sehr verlangsamt und von Pausen unterbrochen, oder endlich sie sind unregelmässig, so dass der Cilien-schopf sich in zwei Theile theilt, welche sich in entgegengesetzten Richtungen bewegen.

In den Flimmerzellen, welche sich violett färbten, wird der Kern immer deutlicher; er kann auch in verschiedene Kerne oder Fragmente getheilt erscheinen, deren Farbe aber mehr in's Blaue neigt und schliesslich grün wird.

Manchmal hat der nekrobiotische Prozess bereits begonnen, wenn die Cilien sich noch bewegen. Von dem Tode und der Degeneration der Flimmerzellen werde ich in einer besonderen Note sprechen und nachweisen, dass der an den Blutkörperchen beobachtete nekrobiotische Prozess sich in allen seinen Einzelheiten an Epithelialzellen und Flimmerzellen getreulich wiederholt.

Das Methylgrün wirkt auch auf die Spermatozoen giftig ein. Ich machte Versuche mit denen von Meerschweinchen und Zitterrochen und sah, wie ihre Bewegungen sofort aufhörten. Aus Furcht, dass die Lösung von 0,2 pCt. auf 1,0 pCt. NaCl nicht genügend Natriumchlorid enthielte, nahm ich für Zitterrochen Seewasser, jedoch mit 0,2 pCt. Methylgrün, und sah, wie die Spermatozoen sich rapid färbten und starben. Nur selten beobachtet man, dass schon gefärbte Spermatozoen sich noch bewegen, aber man erkennt in diesem Falle doch, dass sie sterbend sind; ihre Oscillationen sind langsam, sie schnellen nicht mehr hin und her, vollziehen ihre Bewegungen nur in Intervallen und stehen schliesslich still. Mit Rücksicht auf den kleinen Kopf der Spermatozoen konnte ich nicht mit Sicherheit feststellen, ob alle die violette Farbe annehmen, bevor sie grün werden.

Die Wirkung des Methylgrün und anderer Farbstoffe auf das contractile Protoplasma der vegetabilischen Zellen studirte ich an den Blumenhaaren der *Tradescantia virginica* und an den Sporen einer Seealge, der *Ulva lactuca*. Die Wirkung des Methylgrün ist mörderisch. Die Zoosporen der *Ulva lactuca* sind ovale Körperchen, 3—5  $\mu$  gross, und tragen an dem einen Ende fadenförmige Fortsätze, die in sehr lebhafter Bewegung sind. Wenn man zu dem Seewasser, in welchem sich diese Sporen befinden, ein wenig einer 0,2procentigen Methylgrünlösung zusetzt, so färben sich die Sporen und halten sofort still. Der Inhalt der Zoosporen wird granulös und es erscheinen auf ihrer Oberfläche hyaline Tropfen. Der Todesprozess ähnelt jenem der Leukocyten, indem man in der hyalinen Substanz der Sporen Körnchen bemerkt, welche sich gerade so bewegen, wie ich es bereits von den Eiterkörperchen beschrieben habe. Ich werde in einer nächsten Note darauf zurückkommen, wo ich die Erscheinungen der Nekrobiosis an Pflanzenzellen untersuchen will.

Ich suchte nach den chemischen Ursachen dieser Veränderungen der Färbung und fand, dass, wenn die Alkalinität der Zellen sehr gross ist, das Methylgrün, das in den Zellkörper einzudringen sucht, zerstört wird. Die Färbung der Zellen in Violett wäre also das Anzeichen einer verminderten Alkalinität; die Färbung in Grün das Anzeichen einer sauren Eigenschaft der Zellen.

Wenn man 0,002 g Kali causticum in 2 ccm Wasser löst und 0,002 g Methylgrün, gelöst in 1 ccm Wasser, hinzufügt, so verändert sich die grüne Farbe und wird in 5 Minuten roth-violett, wie die Farbe der Zellen. Wenn man diese roth-violette Lösung mit einigen Tropfen einer 11procentigen Essigsäurelösung versetzt, so kehrt die ursprüngliche grüne Farbe langsam zurück.

Wenn wir, anstatt die erwähnten Substanzen zu gleichen Theilen zu nehmen, Methylgrün in Ueberschuss zusetzen, so erfolgt nicht mehr die Färbung in Violett; d. h. wenn man 2 ccm einer Lösung von 0,003 g Methylgrün in 3 ccm Wasser mit 0,002 g Kali causticum versetzt, so bleibt die Flüssigkeit grün. Mit anderen Worten: die oben genannte Reaction bleibt aus, wenn man eine zu grosse Menge Methylgrün nimmt. In verdünnteren Lösungen, wenn die Alkalimenge nicht der des Methylgrün gleich ist, entfärbt sich die Flüssigkeit vollständig in wenigen Minuten. So z. B. entfärbten 0,0004 g, in 4 ccm Wasser gelösten Kali causticum 0,00016 g, in 0,08 ccm Wasser gelöstes Methylgrün. Doch wird hierdurch das Methylgrün nicht zersetzt, denn, wenn wir zu der transparent gewordenen Lösung 2 Tropfen einer 10procentigen Essigsäurelösung hinzufügen, so kehrt die ursprüngliche grüne Farbe wieder langsam zurück.

Allein man kann nicht sagen, dass bei Anwendung eines Ueberschusses von Kali causticum das in der Lösung befindliche Methylgrün sich vollständig entfärbt. Die Farbe fehlt nur, weil die Lösungen zu stark verdünnt sind; denn, nehmen wir 0,008 g Kali causticum, gelöst in 0,8 ccm Wasser, und fügen wir 0,002 g Methylgrün, gelöst in 1 ccm Wasser, hinzu, so wird, wenngleich das Verhältniss zwischen Kali causticum und Methylgrün noch immer wie 4 : 1 ist, keine völlige Entfärbung erzielt, vielmehr nimmt die in diesem Falle weniger mit Wasser verdünnte Flüssigkeit eine gelbbraune Farbe an.

Ich fand, dass das Methylgrün die Gerinnung des Blutes hemmt.

Eine Lösung von 0,5 pCt. Methylgrün in einer 0,75procentigen Kochsalzlösung verzögert die Gerinnung des Blutes beträchtlich, auch wenn davon nur 2 ccm auf 40 ccm Blut in Anwendung kamen. Nimmt man 3 oder 4 ccm der genannten Lösung

auf 40 ccm Blut, so coagulirt dieses nicht mehr. Davon werde ich in einer nächsten Note ausführlicher sprechen.

Die Leukocyten des mittelst Methylgrün ungerinnbar gemachten Blutes sind in ihrer Substanz ungefärbt und zeigen im Innern die sogenannten Nuclei smaragdgrün gefärbt. In einigen ist die grüne Substanz überall verbreitet und erfüllt das ganze Blutkörperchen; andere Leukocyten hingegen sind vollständig entfärbt, aber der grösste Theil der Blutkörperchen ist violett, ohne eine Spur der sogenannten Nuclei.

Wenn man 5 oder 6 ccm einer 0,5procentigen Methylgrünlösung mit 40 ccm Blut mischt, welches direct den Arterien entnommen wurde, so kann man sich leicht überzeugen, dass das Methylgrün zersetzt wird. Schon die mikroskopische Untersuchung weist nach, dass die Intensität der Färbung der Blutkörperchen und des Serum nicht der dem Blute beigemengten Quantität Methylgrün entspricht und dass viele Leukocyten weiss bleiben.

Fügt man nun diesem Blute Essigsäure, in welchem Verhältniss immer, zu und verdünnt hierauf mit Wasser, so erhält man nicht mehr die charakteristische grüne Farbe; dies beweist, dass das Verschwinden der grünen Farbe nicht der Alkalinität des Blutes zugeschrieben werden kann.

Ich nahm an, dass Methylgrün im Contacte mit Blut sich auf Grund eines Oxydationsprozesses entfärbe, und versuchte, ob sich dasselbe Phänomen nicht etwa mittelst Wasserstoffsuperoxyd erzielen liesse. Die erhaltenen Resultate bestätigten vollkommen diese Voraussetzung; ich unterlasse es hier der Kürze halber, über diese Versuche zu berichten, da ich auf dieselben in einer nächsten Note, wo ich von der physiologischen Wirkung des Methylviolett sprechen werde, noch zurückkommen muss.

---