

## II.

# **Vergleichende Untersuchungen über die elementare Zusammensetzung des rothen Knochenmarkes einiger Säugethiere.**

(Nebst Bemerkungen zur Frage des gegenseitigen Verhältnisses  
der verschiedenen Leukocyten-Formen zu einander)

von

Dr. A. Pappenheim

z. Z. Königsberg i. Pr.

Bei der actuellen Bedeutung, die in der wissenschaftlichen Pathologie die lymphoiden Organe, Gewebe und Zellen erworben haben, kann wohl jede, auch noch so geringe Förderung unserer Kenntnisse auf diesem Gebiete willkommen erscheinen. Da ich nun im Entwicklungsgange meiner Untersuchungen, betreffend gewisse Fragen der morphologischen Haematologie, an einen Punkt gelangt bin, wo mir eine eingehende Untersuchung der Brutstätten rother Blutkörperchen nothwendig erschien, so wählte ich das rothe Knochenmark, als den wesentlichsten in Betracht kommenden erythropoetischen Heerd, zum Vertreter der lymphoiden Organgruppe und machte ihn zum Object der vorliegenden Arbeit. Ich war nemlich der Ansicht, dass man, um den genetischen Connex gewisser morphologischer Zustände zu verstehen, verpflichtet sei, die verschiedenen Etappen des betreffenden Entwicklungs-Processes an Ort und Stelle ihres Vollzuges zu studiren, also auch die Erythro- und Leukogenese am Orte der Erythro- und Leukoplastik innerhalb des lymphoiden Organs, nicht aber, wie dies bisher zumeist geschah, im Blut, in welches normalerweise ja gar nicht alle Formen übergehen und wo bei pathologischen Vorgängen das normale Geschehen vielleicht alterirt sein könnte. Aus jener Zeit stammt noch die Ableitung multinucleärer neutrophiler Leukocyten aus basophilen uninu-

cleären Lymphocyten oder Leukocyten und der Uebergang multinucleärer neutrophiler Leukocyten in multinucleäre eosinophile.

Ueberhaupt sind die verschiedenen Functionszustände des Knochenmarks noch viel zu wenig erforscht und seine Beziehungen, besonders zu constitutionellen Krankheiten, leider noch zu wenig festgestellt. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass die Zeit kommen wird, in der man schon klinisch das Knochenmark wird untersuchen können und müssen, und wo eine Section nicht für vollständig gilt, bei der nicht auch der mikroskopische Befund des Knochenmarks erhoben ist. Zum Theil ist der Anfang hierzu gemacht, insofern, als ja einige werthvolle Untersuchungen über physiologische Functionszustände des Marks im Hunger, in der Gravidität, im Greisenalter u. s. w. vorliegen. Für das Verständnis der immer noch räthselhaften Blutkrankheiten der Leukaemie und perniciosen Anaemie kann aber, wie ich glaube, nur das eingehendste Studium des normalen Knochenmarks im Stande sein, uns vorwärts zu bringen.

Zur Untersuchung gelangte das rothe Knochenmark:

1. in seiner gewöhnlichen erythroplastischen Thätigkeit, aber bei einem Thier, welches auf so niedriger phylogenetischer Stufe steht (Marsupialier), dass man erwarten durfte, möglichst primitive embryoiden Zustände vorzufinden.

2. im Zustande physiologisch vermehrter Function (Embryo, neugeborenes Thier, 12 Tage altes Thier).

3. im Zustande höchster künstlicher Reizung (nach Aderlass).

Wir betrachten demnach das Rippenmark einer ausgewachsenen Beutelratte (*Didelphys virginiana*), das Femur-Diaphysenmark bei 12 Tage alten, neu geborenen und embryonalen (Ende der dritten und Anfang der vierten Schwangerschaftswoche) Kaninchen, schliesslich das Rippenmark vor und nach Aderlass.

Zu letzterem Zweck wurde ein eben 4 Wochen alter, junger weiblicher Hund einer sehr grossen Doggenrasse gewählt, bei der man einen sehr starken Wachsthumstrieb und kräftige Regeneration voraussetzen konnte. Derselbe war 3400 gr. schwer und wurde dreimal in kurzer Zeit hintereinander je einem, pro Gewichtseinheit recht beträchtlichen Aderlass unterzogen. Vor

jedem Aderlass wurde ein Stückchen Rippe resecirt, nach jedem Aderlass das Blut untersucht. Im Folgenden gedenke ich nur den Knochenmarkbefund vor dem ersten und nach dem letzten Aderlass zu beschreiben.

Es wurden am 13. October 1897. 40 ccm Blut entnommen (rechte Vena iugularis), am 14. October 1897. 80 ccm (linke Jugularis) am 16. October 1887 60 ccm (rechte Femoralis). Zwischen den einzelnen Venaesectionen wurde reichliche Nahrung gewährt. Herrn Dr. Aldehoff, dem ehemaligen ersten Assistenten der Kgl. medicinischen Poliklinik zu Halle a. S., der die Liebenswürdigkeit hatte, mich bei den Operationen zu unterstützen, möchte ich auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank aussprechen.

#### Technik und Untersuchungsmethoden.

##### I. Schnittpräparate.

Solche wurden nur aus der Femur-Diaphyse des 12 Tage alten Kainchens hergestellt, derart, dass die Knochen mit einer scharfen Scheere oberflächlich gesprengt wurden und der isolirte Markcylinder in toto in Essigs. Sublimat, Chrom-Essigs. Sublimat, in Sublimat-Alkohol, Lenhossek, Formol, Zenker, Formol + Zenker, Flemming fixirt, und dann in Alkohol, bezw. in Jod-Alkohol in üblicher Weise gehärtet wurde.

An 2—4  $\mu$  dicken Paraffin-Schnitten konnte man vortrefflich die histologische Architectur des rothen Marks studiren; cytologisch schienen sie mir höchstens zum Studium der verschiedenen Arten von Riesenzellen geeignet, da gerade diejenigen morphologischen Details, auf die es mir zumeist ankam, wie Kernstructuren und Granulationen, in den Schnittpräparaten entschieden zum Theil verloren gehen, somit die isolirende Deckglas-Methode für diesen Zweck vorzuziehen war. Auch durch Färbungen gelang es nur, eine ziemlich grobe Differencirung ganz allgemein zwischen rothen und farblosen Zellen zu erzielen, nicht aber zwischen den einzelnen Arten der letzteren; schliesslich war je nach der fixirenden Vorbehandlung das Färbungsergebniss ein verschiedenes, da die verschiedenen Chemicalien einmal verschiedene albuminöse Structuren durch Coagulation zur Darstellung bringen, dann aber auch die natürliche Affinität der verschiedenen Eiweissstoffe zu den Farbstoffen erheblich beeinflussen. Granulationen wurden am besten bei Formol-Fixationen conservirt, jedoch weniger die Specialgranula, als die basophilen und eosinophilen. Für Conservirung feinerer Kernstructuren schien noch am meisten das Sublimat zu leisten. Eine tinctorielle Differencirung wurde versucht:

1. auf Grund der verschiedenen Kernverhältnisse. Hier kamen in Betracht die Russel-Färbung und das Flemmingsche Dreifachverfahren, beides physicalische Färbungen, die auf verschiedener Dichtigkeit und dem verschiedenen Nucleingehalt der Kerne basiren und durch successive Proce-

duren, wie Farbstoff-Summentation und Farbstoff-Entziehung wirken. In beiden Fällen erschienen im Grossen und Ganzen die Erythrocyten-Kerne roth, die der Leukocyten blau.

2. Nach dem Verhalten der Protoplasmen, zu welchem Zweck nur chemisch elective Färbungen, auf der verschiedenen Affinität der Gewebstheile basirend, verwendet wurden, indem stets ein Gemisch von 2 sauren Farben zur Anwendung kam. Die Kerne wurden dabei vorgefärbt mit Alauncarmin (auch wohl Alaunorcin), oder am besten mit Hämatoxylin. Letzteres ist nur in Form der bestens zu empfehlenden Hämatoxylin-Tinctur, wie sie von dem chemisch-technischen Laboratorium von Louis Müller, Leipzig, Turnerstrasse, in den Handel gebracht wird, verwendet worden. Schliesslich versuchte ich auch als Kernfarbe den natürlichen Farbstoff der gemeinen Heidelbeere (*Myrtillus vitis idaea*), welchen ich als Myrtillin in die Technik einführen möchte. Denselben stellte ich mir so her, dass die Schalen der Beeren in 10procentiger Eisen-Alaunlösung gekocht wurden, der Colatur etwas Eisessig und Alkohol zugesetzt und in der Sonne reifen gelassen wurde. Dieses Decoct ist ebenfalls, wie das des Blauholzes, gerbsäurehaltig, und hat, wie das von Fol<sup>1)</sup> empfohlene Ribesin welches ich mir aus Mangel an Material leider nicht herstellen konnte, die Eigenschaft, mit Alkalien metachromatisch grün zu werden. Es färbt sehr distinct und zart, aber langsamer und weniger intensiv, als das Hämatoxylin. Auf Deckglas-Präparaten sind die Kerne der Lymphocyten stets grau-grünlich, die der Leukocyten prachtvoll blau-violett.

Zu einer der Kernfärbung nachgeschickten Plasmafärbung wurden folgende Combinationen verwendet:

1. Aurantia + Eosin in alkoholisch-glyceriniger Lösung (Modification nach Ehrlich's Glyceringemisch).
2. Orange G + S Fuchsin in wässriger Lösung mit einem kleinen Zusatz von Essigsäure und Sulfanilsäure (Modification nach Biondi-Heidenhain's Gemisch).<sup>2)</sup>
3. Naphtolgelb S + S Rubin in alkoholisch-wässriger Lösung mit Zusatz von 5 pCt. Carbolsäure (Modification nach van Gieson).
4. Methylorange (Metanilgelb, Helianthin, Tropäolin D, Orange III) + Grüblers französisches Eosin + etwas Lithion<sup>3)</sup> carbonicum in wässrig-glyceriniger Lösung (Modification nach Spuler).
5. Eosinscharlach (Eosin B N) + S. Fuchsin (Modification nach Oppel).

Die Hbhaltigen Gebilde nahmen hierbei stets die erstere hellere, mehr gelbe Farbe an, und zwar waren die kernlosen Scheiben meistens ganz rein gelb in verschiedener Helligkeit, die kernhaltigen orangefarben in verschiedener Abstufung; das Protoplasma der Leukocyten war gelblich

<sup>1)</sup> Lehrbuch der vergl. mikroskop. Anatomie 1896 p. 183.

<sup>2)</sup> M. Heidenhain: Beitrag zur Kenntniss der Topographie und Histologie der Kloake etc. Inaugural-Dissert. Freiburg i. B.

<sup>3)</sup> Cf. Jacob: Lehmanns Handatanten XV Text zu Taf. II Fig. 3.

oder bläulich rosa, die Granulationen leuchtend roth. Eine ganz gute Differencirung erhält man auch, wenn man einen metachromatischen, aber sauren Farbstoff, wie Benzopurpurin oder Bordeaux, anwendet, wobei ebenfalls das Hb mehr oder weniger gelblich orange, die Granulationen etwas roth, die Protoplasmen durch Hämatoxylin lilafarben erscheinen.

## II. Deckglas-Präparate.

Die Abstriche von dem sehr zerfliesslichen, embryonalen oder neugeborenen Mark werden so hergestellt, dass das von Weichtheilen befreite Femur, nachdem der Gelenk-Knorpel flach abgeschnitten war, mitten in der Diaphyse mittels einer kleinen Kneifzange ergriffen wird, und gleichzeitig mit der anderen Hand ein auf dem Tisch liegendes Deckgläschen an einer Ecke mittels eines Stäbchens auf einer Unterlage fest angedrückt wird. Während nun durch Zangendruck auf die Diaphyse das Epiphysenmark aus dem Knochen hervorquillt, fährt man mit diesem, am Knochen haftenden, weichen, kleinen Tropfen schnell und möglichst leicht, ohne Druck, in mehreren parallelen Zügen über das betreffende Deckgläschen; in gleicher Weise verfährt man mit dem Rippenmark. Bei den 12 Tage alten Kaninchen wurde oberflächlich (siehe oben Schnittpräparate) die Compacta des Femur durch Scheerenschnitt gesprengt, dann ein Stückchen des Markeylinders mit einer Pincette gefasst, mit dem man nun in gleicher Weise, wie dies soeben beschrieben, in mehreren parallelen Zügen über das Deckgläschen hinfährt. Bei diesem Vorgehen haftet eine genügende Menge des Marks auf dem Glase, und zwar bewahren die Zellen ziemlich ihr natürliches Nebeneinander, werden nicht zerquetscht, wie dieses bei der Methode des Abziehens der Deckgläschen oft der Fall ist, und liegen an den breiten Rändern der „Züge“ in ganz dünner Schicht, zum Studium hinreichend isolirt angeordnet. Nach Herstellung des Abstrichs wird sofort möglichst schnell die Antrocknung in der heissen Luft über niedriger Bunsenflamme vorgenommen.

Zur Fixation der Deckglaspräparate verfuhr ich anfangs nach der combinirten Methode des 5 Minuten langen Erhitzens bei 120° C. und des darauf folgenden kurzen Eintauchens in concentrirte, wässrige Chlornatrium-Sublimatlösung.

Statt der Sublimatlösung versuchte ich ferner mit wechselndem Erfolg verschiedene andere Fixative. Sehr gut bewährte sich statt einfach wässriger Sublimatlösung ein Zusatz von wenigen Tropfen essigsaurer Thonerdelösung; ferner vorzüglich ein Phenolsublimat, welches man erhält, indem man concentrirte, wässrige Sublimatlösung mit acid. carbol. liquefact. nach Art der Anilinwasserbereitung schüttelt und filtrirt. Es scheint, dass diese beiden Fixative eine Art von Beize für gewisse Kernstrukturen vorstellen. Der Ersatz des Quecksilberchlorid-Chlornatriums durch Quecksilberjodid-Jodkalium, in Form von Nesslers Reagens, missglückte stets. Besser war Quecksilbernitrat bei Zufügung von wenigen Tropfen Kieselfluorwasserstoffsäure, oder als Millons Reagens. Gewisse Protoplasma-

structuren erschienen dabei sehr deutlich. Von Salzen anderer Schwermetalle bewährte sich gut das Platinchlorid, besonders in Verbindung mit acid. chromicum. (Merkel). Die dabei entstehenden Bilder der Erythrocyten ähneln hinsichtlich der Granulirung etwas den von Altmann abgebildeten. Keine Erfolge erzielte ich mit Goldchlorid und Silbernitrat.

Je nach den Mischungs-Verhältnissen, der Concentration u. s. w., der Fixative sind die Resultate natürlich überaus verschieden. Oft entsteht Ueberfixation; oft bewirken die angewendeten Metallbeizen Farbeninversionen, und erschweren die farbenanalytische Beurtheilung der Bilder. Auch gelang es fast nie, die Vorzüge eines Mittels für alle in dem Präparat vorhandenen Zellen gleichmässig nutzbar zu machen, so zwar, dass, wenn bei einer Zellart gewisse Verhältnisse vorzüglich zur Darstellung gelangten, andere Zellen gequollen oder unfärbbar geworden waren. Trotzdem waren im Einzelnen die Präparate recht instructiv, und dürften für besondere Zwecke gewiss mit grossem Vortheil verwendet werden.

Da es uns diesmal nicht darauf ankam, mittels subtiler Methoden irgend welche feinsten Structur-Einzelheiten einzelner Zellen aufzudecken, sondern vielmehr dem genetischen Zusammenhang zwischen den verschiedenen Zellarten nachzugehen, so war es nöthig, sich einer Fixations-Methode zu bedienen, die in ein und demselben Präparat alle Zellen gleichmässig gut zur Darstellung bringt, und dabei zugleich auf alle Zellen in identischer Weise einwirkt, mithin vergleichbare Resultate liefert, während die obigen Methoden vielmehr geeignet sind, zu beweisen, dass zwischen den verschiedenen, differencirten Zellarten bereits auch verschiedene, morphologische und chemische Unterschiede Platz gegriffen haben. Es scheint, dass dieses Postulat durch chemische Fixationen nicht gut zu erfüllen ist, da ja, je nach der chemischen Affinität und dem specifischen osmotischen Aequivalent, die verschiedenen Protoplasma-Arten verschieden beeinflusst werden. Nach meinen Erfahrungen muss man für diesen Zweck vor Nikiforoff, abs. Alkohol und [Formol] Benario entschieden der alleinigen Fixation durch Hitze nach Ehrlich den Vorzug geben, ein Verfahren, das auch zugleich das weitaus beste Mittel zur Erhaltung und Darstellung der verschiedenen Granulationsformen ist. Die neueste Ehrlich'sche Vorschrift empfiehlt<sup>1)</sup> für wässrige Farblösungen, z. B. Triacid, eine  $\frac{1}{2}$  bis 2 Minuten lange Erhitzung bei 107 bis 110° C., für differentere Farbgemische eine 2 Stunden lange Einwirkung höherer Temperaturen (120° C.). Nach meinen persönlichen Erfahrungen habe ich auf diese Weise, was Erhaltung des Hb oder der Kernstruktur betrifft, nie allen Anforderungen entsprechende Resultate bekommen. Ganz anders gestaltete sich die Sachlage indess, als ich die Bekanntschaft mit einer Modification der Ehrlich'schen Methode machte, welche Dr. H. Rubinstein jüngst angegeben hat<sup>2)</sup>, und welche thatsächlich in verschiedener Hinsicht eine entschiedene Verbesserung be-

<sup>1)</sup> Anämie p. 22, 29.

<sup>2)</sup> Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie Band XIV, p. 456.

deutet. R. kam ebenfalls, wie auch Rieder, zu der Ueberzeugung, dass die von Ehrlich angegebene Fixation nach Dauer und Hitzeegrad nicht ausreichend ist, und fand schliesslich, dass man weit über  $120^{\circ}$  hinausgehen muss, um „die prachtvollsten Resultate der Blutfärbung“ zu erzielen. Rubinstein fixirt nur 30—45 Sekunden lang auf der Kupferplatte bei einer Temperatur, bei der für Wasser das Leidenfrost'sche Phänomen des sphäroidalen Zustandes eben eintreten beginnt ( $140^{\circ}$ ). Ich hatte nie die Kühnheit gehabt, bis zu solcher Temperatur vorzugehen, kann aber nunmehr Rubinsteins Resultate meinerseits durchaus bestätigen. Die Fixation ist eine so vorzügliche, dass man selbst die Kernstructur der Mast- und eosinophilen Zellen studiren kann, die sonst stets verwaschen erscheinen; auch die Kerngerüste der Lymphocyten erschienen in einer bisher nicht erreichten Deutlichkeit. Das Verfahren ist äusserst schnell, bequem und stets zuverlässig<sup>1)</sup>.

Im Folgenden werde ich nur von Präparaten handeln, welche nach dieser Ehrlich-Rubinstein'schen Methode hergestellt sind.

Bei der jetzt zu beschreibenden Färbung unserer Knochenmark-Präparate trachteten wir vor Allem nach der Erfüllung folgender Indicationen:

1. prägnante Kernfärbung im Sinne von Chromatinfärbung.
2. Differencirung der Granulationen,
3. der Cytoplasmen nach ihren verschiedenen, chemischen Affinitäten, und zwar möglichst in panoptischer Weise, d. h., wir versuchten möglichst alle, bei dem betreffenden Thiere vorkommenden, verschiedenen Granulationen in ein und demselben Präparat, durch ein und dieselbe Färbungs-Procedur different zur Darstellung zu bringen;
4. möglichst demonstrative Hervorhebung der Hb-führenden Elemente.

Es zeigte sich leider, dass die verschiedenen Postulate in praxi nicht gut mit einander auf einmal erfüllt werden konnten.

1. Was zuerst die Kernfärbung anbetrifft, so finden sich in einem Knochenmarks-Präparate Kerne der verschiedensten Dichtigkeit und des verschiedensten Nucléin-Gehaltes. Hat man z. B. eine recht distincte Kerngerüstfärbung, etwa in Normoblasten, erhalten, so erscheinen die chromatinarmen Kerne der Markzellen, Lymphocyten und Megaloblasten kaum schwach angefärbt, matt und verschwommen, zeigen nichts von Kernstructur; ist es andererseits gelungen, hier Kerngerüste deutlich zu machen, so erscheinen wieder die Kerne der jungen Normoblasten, Lymphocyten etc. überfärbt, arteficiell pyknotisch. Dazu kommt, dass man mit den meisten Anilinfarben eine wirklich gute Kernfärbung überhaupt nicht erzielen kann. Die basischen „linksspectralen“ Farben, nämlich die gelben (Auramin, Vesuvin, Phosphin und Chrysoidin), die grünen (Methylgrün<sup>2)</sup>, Jodgrün, Malachit-

<sup>1)</sup> Ich lege indess die Deckgläschen nicht mit der chargirten Seite, sondern mit dem Rücken auf das heisse Kupfer.

<sup>2)</sup> Mit Methylgrün kann man eine ziemlich gute, mehr „deckende“ Färbung der Kerne erhalten, wenn man von der Thatsache Gebrauch

grün, Smaragdgrün, Chromgrün), ja auch die rothen (Fuchsin, Safranin, Magdalaroth, Neutralroth, Acridinroth, Pyronin), wirken viel zu transparent, gewissermaassen lasirend. Bei ihnen glaubt man ein Kernnegativ zu sehen, weil nämlich das zumeist in den Complementärfarben gefärbte Oxychromatin dunkler wie das Basichromatin erscheint, und so seinerseits scheinbar als das eigentliche Kerngerüst imponirt, während das Basichromatin matt, wie gequollen und kernsaftartig sich darstellt. Ist nun gar, wie in älteren Erythrocyten, Oxychromatin sehr spärlich vorhanden, so erscheint dasselbe in Gestalt von dunkelrothen Granulis oder gar Nucleolen, welche in einer diffusen, matt grünlichen (pyknotischen oder gequollenen) Kernmasse eingebettet sind<sup>1)</sup>. Die „rechtsspectralen“, violetten Farben (Methylviolett, Thionin, Oxonin, Amethyst) überfärben oft selbst in geringerer Concentration, färben also auch das Oxychromatin und die meisten Cytoplasmen mit, ja imprägniren sogar mechanisch das Hb, so dass künstliche Polychromatophilie zu Stande kommt. Die blauen basischen Farben (Viktoria-blau, Acetinblau, Chlorhydrinblau, Indoinblau, Neumethylenblau, Chinablau) geben zwar eine kräftigere Kernfärbung, wie die grünen Farben, überfärben auch nicht so stark, wie die violetten, trotzdem ist die Färbung selten ausreichend präzise, meist etwas verschwommen, da diese Farben nach ihrer Constitution (sie besitzen saure Gruppen) auch Verwandtschaft zum Oxychromatin haben. Einzig und allein Toluidinblau und Methylenblau ermöglichen eine ziemlich allen Anforderungen genügende Kernfärbung.

Trotzdem steht die Kernfärbung mittels Methylenblau, was prägnante Darstellung der Kernnetze und Schönheit der Präparate betrifft, bedeutend der Hämatoxylin-Färbung nach. Leider hat dieser natürliche Farbstoff den Nachtheil, dass er farbenanalytisch nicht zu verwerthen ist, da er zwar das Kernchromatin, aber sonst keine basophilen Elemente färbt, z. B. nicht die basophilen Mastzellen-Granulationen, auch nicht das basophile Lymphocytenplasma; andererseits färbt er auch gewisse, nicht basophile Elemente, wie z. B. Markzellen-Cytoplasmen; Hämatoxylin ist demnach kein basischer Farbstoff, sondern nur mit Hilfe der Alaunbeize ein Kern-Färbemittel. Gerade diese Zufügung der Alaunbeize ist wohl auch Schuld daran, dass bei der Hämatoxylin-Färbung die chemischen Affinitäten gewisser morphotischer Elemente alterirt zu sein scheinen, indem es z. B. in keiner Weise gelingt, eine Hämatoxylin-Kernfärbung mit der Darstellung neutrophiler Granulationen zu vereinigen. Hämatoxylin selbst bildet natürlich weder mit sauren, noch mit basischen Farben neutrale Farbstoffe im farben-

macht, dass Methylgrün in der Botanik als Reagens auf Chlorophyll verwendet wird. Man färbt also mit concentrirter wässriger, Chlorophylllösung vor, und dann mit Methylgrün nach. Dabei färben sich allerdings auch die basophilen Granula und das Hb mit.

<sup>1)</sup> (Vergl. Taf. Gruppe A.) Färbung Methylgrün-Pyronin.



analytischen Sinne; aber auch, wenn man einer Hämatoxylin-Färbung eine Färbung mit einem neutralen Farbgemisch folgen lässt, gelingt es niemals, die neutrophilen Granulationen zur Darstellung zu bringen; möglich, dass dieselben in der Alaunbeize aufgelöst sind, da es auch nicht gelingt, sie negativ, als ungefärbte Körnelungen sichtbar zu machen wie die Mastzellenkörner. Die neutrophilen Zellen erscheinen vielmehr bei Anwendung von Hämatoxylin völlig homogen<sup>1)</sup>. (Cf. Dominici, Soc. de Biol. 1897.)

Ebenso gelingt es nicht, das granulationslose Plasma der basophilen Lymphocyten bei Anwendung des Hämatoxylin auf irgend eine Weise hinreichend deutlich als solches kenntlich zu machen. So kommt es, dass man, bei dem Wegfall der neutrophilen Granulationen, bei einer Hämatoxylin-Färbung von gewissen grossen, einkernigen Zellen nie sicher sagen kann, ob es „grosse“ granulationslose Lymphocyten, neutrophil granulirte Markzellen, neutrophile Uebergangszellen, oder sogenannte grosse uninucleäre Leukocyten sind; ja sogar junge, grosskernige, Hb-arme Erythrocyten, besonders Megaloblasten, können leicht mit solchen granulationslosen, farblosen Zellen verwechselt werden, da wir erstens kein Reagens auf Hb besitzen, andererseits auch das oft polychromatophile Plasma der Erythrocyten eine ähnliche Verwandtschaft zu Hämatoxylin hat, wie das Plasma grosser Lymphocyten und Markzellen. Einer Mitose aber mit Sicherheit anzusehen, ob sie einer farblosen, ungekörnten Zelle, oder einem Hb-armen Erythrocyten angehört, ist, ohne Willkür anzuwenden, schlechterdings unmöglich, so dass auch von hier aus die Lehre Lövits von der principiellen Scheidung der Leukoblasten und Erythroblasten ebenso angreifbar erscheint, wie die Lehre Bizzozeros von der fundamentalen Trennung zwischen rothen Hämatoblasten und weissen Leukocyten. Man ist also auch hier einzig auf die Kernstruktur ruhender Zellen angewiesen. Die Unterschiede zwischen Lymphocyten und Erythrocyten hatte ich bereits früher<sup>2)</sup> klargestellt. Diesmal wird es sich auch ausserdem um etwaige Unterschiede der Kerne zwischen den verschiedenen, farblosen Zellen handeln.

Während Hämatoxylin als Kern-Färbemittel vorzüglich ist, aber neutrophile Granula und Lymphocyten-Plasmen weniger begünstigt, ermöglicht es stets Gegenfärbungen, welche eine prägnante Veranschaulichung der oxyphilen Granulationen, des oxyphilen Plasmas, sowie des Hb gestatten, soweit letzteres überhaupt durch Farben-Combinationen manifestirt werden kann; ja auch basophile (Mastzellen?)-Körnungen sind darstellbar.

Bei einer gut gelungenen Kernfärbung, wie sie die Müllersche Hämatoxylin-Tinctur ermöglicht, gelingt es auch dem nur etwas Geübten sehr bald, die Unterschiede zwischen „Proto- und Metakernen“, also z. B. Mega-

<sup>1)</sup> Dabei ist die Hitze das vorzüglichste Fixationsmittel für die neutrophilen Granula. Fixirt man nach Nikiforoff, so sind sie selbst mit dem eigens für sie angegebenen Triacid nur äusserst ungenügend zur Darstellung zu bringen.

<sup>2)</sup> Dieses Archiv. 151, 1898.

loblasten und Normoblasten herauszufinden, was bei anderen, einfachen Kernfärbungen mit Anilinfarben, selbst blauen und dunkel-violetten, also auch beim Glyceringemisch, fast unmöglich erscheint. Bei dieser letzteren Färbung färbt sich das basophile Chromatin mit einem sauren Farbstoff, dem in Wasser löslichen Indulin (indulin-sulfosaures Natrium), indem es, seiner Molecular-Structur entsprechend, von den drei gebotenen sauren Farben die, welche die geringste Acidität und zugleich das grösste Molecular-Volumen besitzt, an sich zieht, ein Beweis dafür, dass das Nucléin kein Stoff höchster Basophilie ist, wie die Mastzellengranula, die sich nur mit basischen Farben tingiren. Als Kernfärbung ist demnach das Hämatoxylin in mancher Hinsicht dem Methylenblau vorzuziehen. Es gestattet eine differente Kenntlichmachung fast aller übrigen, in Betracht kommenden Elemente, mit Ausnahme der Lymphocyten. Farbenanalytisch ist es allerdings nicht zu verwerthen.

2. Was die Erfüllung der zweiten Indication, die Differencirung der Granulationen, und zwar in möglichst panoptischer Weise, anbetrifft, so kommen von den üblichen Färbungen in Betracht: das Glycerin-Gemisch, das Triacid, die Methylenblau-Eosinfärbung, und das Hämatoxylin in Combination mit anderen Farben.

Mit dem Glyceringemisch erkennt man nur oxyophile Granula, diese allerdings differencirt je nach dem Grade der Oxyphilie, also als aurantiophile, indulinophile u. s. w. Die aurantiophilen Granula, die sich physiologisch nur bei wenigen Thierspecies finden, können oft artificiell zu Stande kommen durch Ueberfixation der Eosinophilen: sie kommen für uns nicht in Betracht. Die echten eosinophilen Granula sind charakterisirt durch die Eigenschaft höchster Oxyphilie, und unterscheiden sich dadurch von gewissen amphophilen und pseudo-eosinophilen Granulis. Es ist eben nicht alles eosinophil, was sich mit Eosin roth färbt, sondern es gehört dazu eine gewisse, specifische Affinität zu gewissen, bestimmt charakterisirten und zwar rein sauren Farben, verbunden mit grosser Avidität gegenüber Entfärbungsmitteln (Glycerin im Glyceringemisch). Daraus folgt, dass man zum Studium einer Granulations-Art und zur sicheren Recognoscirung derselben sich mit einem Färbeverfahren nicht begnügen darf<sup>1)</sup>. Zum Beispiel färben sich im Glyceringemisch bei Kaninchen, welches keine aurantiophile Granula besitzt, alle sonstigen oxyphilen Granula, soweit sie nicht eosinophile sind, gleichmässig mit dem einen Indulin, obwohl sie oxyphile Granula der verschiedensten Valenz umfassen, nemlich die wirklich echten Indulinophilen, ferner amphophile Granula, die doch auch facultativ basophil sind, ferner unreife eosinophile, sowie auch zur Gruppe der Pseudo-eosinophilen gehörige Granula. Die neutrophilen Granula sind, wie bei Hämatoxylin-Färbung, nicht dargestellt, die echten basophilen erscheinen ungefärbt,

<sup>1)</sup> Z. B. nennt Niegolewski (Inaug.-Dissert. München 1894) bei den verschiedensten Thieren alle sich in neutraler Farbe tingirenden Granula neutrophil, ohne festgestellt zu haben, ob sie auch nur neutrophil und nicht etwa amphophil sind.

negativ zur Darstellung gebracht. Ist das Präparat zu stark fixirt, so färben sich die eosinophilen Granula, ebenso wie das Hb, mit Aurantia, die indulinophilen mit Eosin. Auch mit diesem Factor ist bei der Deutung der Befunde zu rechnen. Da für unsere Zwecke eine specialisirte Differencirung zwischen den Granulationen geringerer Oxyphilie ohne Bedeutung war, so leistete uns das Glycingemisch eigentlich nur Dienste als Reagens auf das Vorhandensein echter eosinophiler Zellen. Da aber auch dieser Indication, obschon vielleicht in weniger demonstrativer Weise, durch andere Färbungen Genüge geleistet werden kann, ferner zum Studium der Kern-Morphologie dieser Zellen das Glycingemisch weniger geeignet ist, wie eine gute Hämatoxylinfärbung, so erschien diese Färbung im grossen und ganzen entbehrlich.

Wie das Glycingemisch eigentlich nur die isolirte Hervorhebung der eosinophilen Zellen bezweckt, so kann man als Reagens auf basophile Mastzellen die Ehrlich-Westphal'sche Färbung mit der Modification von Morgenroth anwenden, indem man mit Alauncarmin (und Orange G) vorfärbt, und das Präparat dann mit einer Lösung von Kresylviolett R, und in der bekannten Weise mit Essigsäure und Glycerin behandelt. Eine Differencirung zwischen Plasmazellen und Mastzellen gelingt am besten mit Unnas polychromem Methylenblau, welches durch Kal. carbon. alkalisch gemacht ist. Ferner gelingt recht gut die Darstellung der basophilen Granulationen mittels der Gram'schen Färbung oder mit der Ehrlich'schen Tuberkelbacillen-Färbung.

Das Triacid differencirt eosinophile und neutrophile Granula. Auch hier gilt das gleiche, wie beim Glycingemisch. Es ist nicht alles neutrophil, was violett ist. Unreife eosinophile Granula verhalten sich ähnlich dunkel wie neutrophile, ja sogar reife eosinophile erscheinen bei zu schwacher Erhitzung violett, wenn schon grobkörniger als neutrophile; bei Rubinstein'scher Erhitzung sind wieder pseudo-eosinophile und echt eosinophile ohne zu Hilfe genommene Controllpräparate, chemische Reagentien u. s. w. nicht auseinander zu halten; schliesslich färben sich auch die anderen Granulationen geringerer Basophilie und Oxyphilie, sowie die amphophilen je nach dem Grade ihrer Affinität mit dem neutralen, oder mit dem ihn in Lösung haltenden, im Ueberschuss vorhandenen sauren Farbstoff. Mit dem basischen Farbstoff, dem Methylgrün, färbten sich keine Granulationen, auch nicht die Granula höchster Basophilie (Mastzellen), es sei denn, dass das Methylgrün mit Methylviolett verunreinigt gewesen wäre. Dieses liegt nicht daran, dass etwa Methylgrün, um eine neutrale, gelöste Farbe zu bilden, in zu geringer Menge im Verhältniss zu dem Ueberschuss der die gebildete neutrale Farbe in Lösung haltenden sauren Farben vorhanden ist, dass also nicht genug Methylgrün quantitativ disponibel ist, sondern es liegt qualitativ an der Natur des nur Nuclëin färbenden Methylgrüns. Triacide Farblösungen, mit anderen basischen Farben bereitet, färben

auch Mastzellengranula<sup>1)</sup>. Zur bequemen und sicheren Unterscheidung echt neutrophiler Zellen empfiehlt sich beim Triacid-Präparat die Rubinstein'sche Fixation ganz besonders; bei derselben werden die eosinophilen Granula stärker verdichtet, als bei geringer Erhitzung, so dass dieselben nur die Farben mit kleinem Molecular-Volumen, also die sauren rothen, vielleicht auch eine Spur von sauren gelben (was dabei ein Vorzug ist), keinesfalls aber auch die dunklen grünen mit grossem Volumen, also die basischen aufnehmen, und somit hier nie violett, wie die neutrophilen Zellen, erscheinen. Die Differenz zwischen diesen gelbrothen Granulis und den dunkelvioletten Neutrophilen ist eine stärker in die Augen fallende, als zwischen den dunkelrothen und röthlich violetten der geringen Erhitzung. Dieser Unterschied wird noch prägnanter, wenn man statt des gewöhnlichen Ehrlich'schen Triacid, Philipp-Aronson'sches verwendet.

Die Methylenblau-Eosinfärbung verhält sich im Ganzen ebenso, wie das Triacid. Sie hat vor diesem den grossen Vorzug der besseren Kernfärbung, sowie das Moment voraus, dass sie auch basophiles Lymphocyten-Plasma und polychromatophiles Erythrocyten-Plasma und die basophilen Mastzellen-Körnungen zur Darstellung bringt. Sie theilt mit ihr den Uebelstand, dass in dem entstehenden Präparat die weniger basophilen, die nicht absolut oxyphylen, und die amphophilen Granula nicht mit Sicherheit zu identificiren sind, da, wie im Glycingemisch, sich Granula verschiedener chemischer Valenz faute de mieux mit ein und demselben Farbstoff tingiren, zu dem sie gerade die relativ grösste Affinität besitzen, z.B. unreife eosinophile und indulinophile Körner ebenso, wie die Mastzellen-Körner das basische Methylenblau aufnehmen, welcher Farbstoff nicht wie das Methylgrün reiner Nuclëinfarbstoff ist, sondern in Folge seiner Constitution auch schwach plasmophile Eigenschaften besitzt. Daher kommt es, dass bei Anwendung dieser Färbung Autoren basophile und oxyphile Granula in ein und derselben Zelle aufgefunden zu haben glaubten. Auch hier gilt dasselbe, was oben für die Eosinophilen auseinandergesetzt ist, es ist noch nicht alles basophil, was sich mit basischen Farben färben lässt. Man muss eben nicht nur mit neutralen Farbgemischen, dem allein seligmachenden Triacid, die Chromatophilie der Granula studiren, sondern auch mit den Gemischen mehrerer saurer (Glycingemisch), oder mehrerer basischer Farben, die natürlich beide verschiedene Basicität, bezw. Acidität aufzuweisen haben, natürlich aber, gemäss den von Ehrlich<sup>2)</sup> für eine differentielle Combinations-Färbung entwickelten Gesetzen, in entsprechenden Mischungs-Verhältnissen angewendet werden müssen. Gegenüber dem Triacid besteht bei

<sup>1)</sup> Vgl. Behrens, Tabellen z. Gebr. b. Mikr. Arb. II. 1892, S. 37, aus welcher Stelle hervorgeht, dass Methylgrün, im Gegensatz zu den anderen basischen Reoanilin-Farbstoffen, im Seifenbade, und da nur Seide, nicht Wolle, färbt, und für Tannin-Brechweinstein gebeizte Baumwolle überhaupt nicht anwendbar ist.

<sup>2)</sup> Ehrlich Farbenanalyt. Unters. S. 84.

Methylenblau-Eosin der geringe Nachtheil, dass das oxyphile Plasma und das Hb nur durch einen sauren Farbstoff dargestellt werden.

Durch Combination des Haematoxylin's mit sauren und passenden basischen Farbstoffen (Rhodamin) gelingt es, basophile (Mastzellen)-Granula und echt eosinophile Körnungen getrennt zur Darstellung gelangen zu lassen. Da bei den verschiedenen, von uns untersuchten Thieren verschiedene Special-Granulationen zu erwarten waren, wir uns aber nicht das Einzelstudium derselben zur Aufgabe gemacht hatten, sondern nur das Verhältniss der Zellen, welche Special-Granulationen führen, zu anderen Zellen, so gewährt uns die Haematoxylin-Färbung einen grossen Vortheil insofern, als bei ihr, wie wir gesehen haben, wahrscheinlich in Folge der Alaunbeize, alle Special-Granulationen insgesamt aufgelöst werden, somit die in den Anilin-Präparaten bestehende, verwirrende Mannigfaltigkeit als Gelegenheit zu Missdeutungen fortfällt; die Gesamtheit der Special-Granulationen nemlich, d. h. alle jene Granula geringerer Oxyphilie oder Basophilie werden als solche in gemeinschaftlicher Weise durch Elimination ihrer Körnelung morphologisch kenntlich gemacht. Wir werden also auch zur Recognoscirung der verschieden gekörnten Zellen der Haematoxylin-Färbung den Vorzug geben.

3. Wir kommen jetzt zur Färbung der Cytoplasmen. Wir verlangen von unserer Färbung eine deutliche Kenntlichmachung der polychromatophilen Erythrocyten, eine von den anderen absteichende Färbung der basophilen Lymphocyten-Leiber, und eine Darstellung der die Markzellen-Leiber von den Leukocyten-Leibern charakterisirenden Structur-Verhältnisse.

Im Triacidpräparat sind alle drei Forderungen nicht erfüllt. Hier, wo unzumuthbare Kernfärbung noch hinzukommt, ist es unmöglich, gekörnte Markzellen, z. B. neutrophile, von entsprechenden einkernigen, grossen Leukocyten zu unterscheiden. Solches wird aber im Methylenblau- und Haematoxylin-Präparat, sowohl durch Hervorhebung der verschiedenen Kerncharaktere, wie der für Markzellen charakteristischen Zelleib-Structur mit Sicherheit ermöglicht, und zwar sowohl bei Erhaltung, wie bei Fortfall der neutrophilen u. s. w. Granula. Ferner sind bei Anwendung des reinen Methylgrüns polychromatophile Erythrocyten als solche nicht kenntlich zu machen, was ebenfalls im Methylenblau- und Hämatoxylin-Präparat leicht gelingt (nur bei unreinem Methylgrün erscheint das polychromatophile Hb „weinrot“). Schliesslich erscheinen die Lymphocyten fast nur wie freie Kerne, da ihr basophiles Plasma in Folge der fehlenden Plasmophilie des basischen Methylgrüns nur von den sauren Farbstoffen, und da auch nur grade eben sichtbar, „angehaucht“ erscheint<sup>1)</sup>.

Die Haematoxylin-Färbung ermöglicht nun zwar eine Differencirung zwischen grossen und kleinen Lymphocyten, in Folge der Hervorhebung der Kerncharaktere und einer gewissen „haematoxylinophilen“ Plasmasubstanz

<sup>1)</sup> Es gelingt, mit Methylgrün auch das Lymphocytenplasma zu färben, wenn man das Präparat vorher mit concentrirter, wässriger Chlorophylllösung färbt. Dieser Farbstoff kann somit als Beize für Methylgrün gelten.

in grossen Lymphocyten, jedoch ist es leider in keiner Weise möglich, weder durch Combination mit sauren, noch mit basischen Farbstoffen, die Lymphocyten in ihrer Gesamtheit als solche an ihrem Hauptcharakteristicum, dem stark basophilen Plasma, von den nicht gekörnt erscheinenden Special-Granulationszellen distinct kenntlich zu machen.

Im Hämatoxylin-Präparat nehmen die bei übrigen Färbungen als basophil erkannten Leiber der Lymphocyten Haematoxylin plus eventuelle saure, nie aber basische Farben auf, und erscheinen somit ganz gleich den oxyphilen Leibern einkerniger neutrophiler Markzellen und den schwachbasophilen und sogenannten grossen uninucleären Leukocyten und Uebergangszellen, zumal da bei Lymphocyten eingebuchtete Kerne, und bei Markzellen, deren Granula im Haematoxylin-Präparat fortfallen, grosse runde Kerne vorkommen.

Sämmtlichen sonstigen morphologischen Anforderungen genügt die Haematoxylin-Färbung vollständig. Dieses ist ihr einziger Nachtheil. Wir bedürfen deshalb ausser einer Hämatoxylin-Färbung noch einer weiteren Färbung, welche speciell die Recognoscirung und Identificirung der Lymphocyten bezwecken soll.

Eine Färbung mit Methylenblau hebt den Leib der Lymphocyten kräftig dunkelblau von anderen Zelleibern und dem waschblauen Lymphocyten-Kern hervor, derselbe erweist sich demnach als noch stärker basophil, als der Kern. Auch das Plasma der polychromen Erythrocyten nimmt Methylenblau auf; dieselben heben sich, gemäss ihrem Gehalte an gelblichem, oxyphilem Hb von den rein basophilen, dunkelblauen Lymphocyten durch eine mehr blaugrünliche, bei Methylenblau-Eosin hellviolette Färbung ab. Während aber schon die Kernfärbung weniger scharf, wie beim Hämatoxylin erscheint, hat die Plasmafärbung in Hinsicht auf Markzellen-Structur und Polychromatophilie den Nachtheil der leicht stattfindenden Ueberfärbung (künstliche Polychromatophilie). Dazu kommen die verwirrenden Verhältnisse der mannigfaltigen Granulationen. Kann zwar darnach, was die Menge des Darstellbaren betrifft, die Methylenblau-Färbung mit dem Haematoxylin concurriren, so zeichnet sie sich vor diesem eigentlich bloss aus durch die Hervorhebung der Lymphocyten, ihrer Nachtheile sind aber gegenüber jenem so viele, dass wir zur Ergänzung der Haematoxylin-Färbung lieber eine andere Färbung bevorzugen, die weiter keiner Indication genügt, als bloss dem Nachweis und der Hervorhebung der Lymphocyten, dieser aber dafür in einer noch bei weitem demonstrativerer Weise, als es beim Methylenblau der Fall ist, gerecht wird. Zur Ergänzung unserer Haematoxylin-Färbung benutzen wir eine Combination zweier basischer Farbstoffe, eines grünen und eines rothen, und zwar des Methylgrüns, welches nur Kerne färbt, und des Fuchsin, welches auch zu Plasma und Granulationen eine gewisse Affinität zeigt<sup>1)</sup>. Statt des Methylgrüns kann man auch Jodgrün, nicht

<sup>1)</sup> Vergl. Spilling in Ehrlich's farben-analytische Untersuchungen. S. 66 u. 68, ferner die Fuchsin-Jodgrünmethode Zimmerman's.

Ferner Ehrlich-Lazarus Anaemie S. 29.

aber Malachitgrün oder Chromgrün anwenden, statt des Fuchsin's auch Para-(Rosanilin)-rubin, Saffranin, Acridinroth, Neutralroth oder am empfehlenswerthesten Pyronin (Ehrlich, Anaemie, S. 26 u. 27). Es wird aus Methylgrün eine concentrirte, wässrige Lösung hergestellt, und dazu soviel Pyronin hinzugefügt, dass die Lösung eben anfängt blau zu werden, also etwa 1 Theil Pyronin auf 3—4 Theile Methylgrün. Bei dieser Färbung erscheint das basophile Lymphocytenplasma prachtvoll dunkel carminroth, während die Plasmen der anderen Zellen mehr oder weniger matt-bräunlich, röthlich-gelb oder ungefärbt erscheinen. Während das Plasma der Lymphocyten bei dieser Färbung von allen anderen farblosen, granulationslosen Zellen stark absticht, ist es uns öfters sehr schwer, es von dem gewisser junger, noch Hb-armen, grosskerniger und schmalrandiger Erythrocyten zu unterscheiden. Hier müssen die Kerne die Unterscheidung ermöglichen, was jedoch nur durch die Farbennüance, nicht durch die Structur angängig ist, welche letztere, wie bei allen Anilinfärbungen, mangelhaft hervortritt. Einen Fingerzeig gewährt wohl auch der Umstand, dass das Lymphocyten-Plasma reticulär zackig zerfranst, das Erythrocyten-Plasma glattrandig homogen erscheint. Ferner scheint sich aus dieser Färbung zu ergeben, dass das Plasma der Lymphocyten, in Uebereinstimmung mit den Resultaten der Jod-Eosin-Methode, (Anämie S. 31 u. 48) basisch reagirt, wie ein geringer Zusatz von Alkali zur wässrigen Lösung des Farbstoffes im Reagensglase beweist. Schliesslich verzeichnen wir noch als interessantes Ergebniss, dass auch das Plasma der Riesenzellen sich stets ebenso, wie das der Lymphocyten verhält, und speciell bei der Methylgrün-Pyronin-Färbung prachtvoll carminroth gefärbt wird. Dass das Plasma der Lymphocyten aber nicht schlechtweg erythrophil im Gegensatz zu cynophilen Kernen ist, sondern den rothen Farbstoff bloss aufnimmt, weil Methylgrün zufällig eben nur Kerne, nicht Plasmen färbt, ergibt sich aus einer Färbung mit Methylenblau + Pyronin (resp. Saffranin u. s. w.), bei der es ausgesprochen cyanophil sich erweist. Nicht die blosse Rothfärbung, sondern die chemische Beeinflussung des rothen Farbstoffes durch ihr alkalisches Lymphocyten-Plasma ist charakteristisch für die Lymphocyten.

4. Wir wenden uns nunmehr schliesslich zur Besprechung der vierten Indication, der tinctoriellen Differencirung des Hb von oxyphilem Zellplasma und oxyphilen Granulationen.

Von den bekannten Färbungen wird dieselbe erfüllt mittels Combination eines helleren gelben und eines dunkleren rothen Farbstoffes, wie im Glyceringemisch und im Triacid. Am besten verbindet man die gelben Nitrofarbstoffe (Naphthylamingelb, Naphtholgelb S, Azosäuregelb u. s. w.) mit Fluorescein-Derivaten, mit bläulichem Eosin, Rose bengale oder dergl.; die gelben Azosulfosäuren (Methylorange, Orange G., Narcöin) mit rothen Sulfosäuren, S-Fuchsin, Azokarmin, u. s. w. Das Hb bevorzugt dann den helleren gelben Farbstoff von geringerem Molecularvolumen, da die schwerer diffundirenden dunkleren Farben nur in die weiteren Micellverbände der mehr protoplasmatischen Zelleiber eindringen können. Man kann jedoch für die verlangte

Differencirung mit nicht viel geringerem Erfolge auch nur eine, dann aber metachromatische saure Farbe anwenden, und empfiehlt es sich, hierfür Kongoroth (Benzopurpurin), französisches Eosin oder die Tetrazofarben (Biebricher Scharlach, Ponceau, Bordeaux) zu benutzen. Auch hier erscheint dann ebenfalls das Hb mehr gelb, die oxyphilen Granulationen und Protoplasmen mehr roth. Wie man schliesslich im Glycerin-Gemisch, bestehend aus drei sauren Farben, basophile Kerne und auch basophile Plasmen mit einer derselben gefärbt zur Darstellung bringen kann, so gelingt es auch, das oxyphile Hb in einem Gemisch aus drei basischen Farben mit einer derselben, und zwar stets mit der, welche das kleinste Molecularvolumen und die stärkste Diffusion zeigt, zur Darstellung zu bringen. Färbt man nämlich mit einer Combination von Chromgrün, Fuchsin und Vesuvin<sup>1)</sup>, so zieht das Hb hauptsächlich das gelbe und am wenigsten basische (?) Vesuvin an. Es zeigt sich aber nun sowohl bei sauren wie basischen Farben, dass die Micellen der Erythrocyten, im Gegensatz zu den rein gelb erscheinenden kernlosen Erythrocytoden, doch noch einen leicht röthlich orangefarbenen Ton (Fuchsin) angenommen haben, der bei den jüngsten Formen fast ebenso, wie bei den Lymphocyten rein roth erscheint. Erhitzt man das Präparat stärker, so werden stets auch die Micellen der „fuchsinophilen“ Erythrocyten soweit verdichtet, dass sie orangeophil werden. Es wird also künstlich der Process nachgeahmt, der bei natürlicher Reifung der Erythrocyten vor sich geht. Dort wird ein protoplasmatischer Bestandtheil verdichtet, für schwer diffundirende Farben mit grossem Molecularvolumen unfärbbar, hier geht er überhaupt verloren<sup>2)</sup>. Da diese dreifach basische Färbung vor solchen mit sauren Farbgemischen weiter keine besondere Vortheile bietet, werden wir dieselbe in folgendem zumeist vernachlässigen; erwähnt muss aber werden, dass es auch mit einer metachromatischen basischen Farbe ganz gut gelingt, eine Differencirung zu erhalten, wofür man ebenfalls am besten Fuchsin, Pyronin, Saffranin u. s. w. verwendet. Wie bei dem sauren Ponceau des Hb orange gelb, das oxyphile Plasma und die oxyphilen Granula rot erscheinen, so färbt sich mit basischem Saffranin das Hb ebenfalls gelblichroth, das basophile Lymphocyten-Plasma dunkelroth. Jedenfalls aber ergiebt sich aus allen Farbencombinationen, dass eine absolut

<sup>1)</sup> Ehrlich, Anaemie S. 25.

<sup>2)</sup> Bei Quellungen künstlicher, pathologischer oder cadaveröser Natur lässt sich sehr schön beobachten, dass sich in rothen Blutzellen ein mehr roth gefärbter Hb-haltiger Bestandtheil (Zooid) krausenförmig um den Kern herum zusammengezogen hat, während das Oikoid (Stroma, Discoplasma) rein gelb erscheint, wie die Blutscheiben. Bei schwächer erhitzten Präparaten nehmen auch die Blutscheiben etwas rothe Farbe auf, und bei Quellungen zieht sich der rothgefärbte Theil ebenfalls als hämoglobinämischer Binnenkörper in die Gegend der centralen Delle zurück.

Vgl. auch C. Reich, Inaug.-Diss. Halle 1898, S. 7.



sichere Kenntlichmachung des Hb durch Farbstoffe nicht gelingt, da keiner derselben als Reagens fein genug ist, um auch geringste Mengen von Hb sicher hervorzuheben, welches ja stets mit anderem, „fuchsinophilen“ Plasma (Globular-Plasma, Discoplasma) vermischt in die Erscheinung tritt, und welches letzteres seinerseits ebenfalls mit dem gebotenen Farbstoffe tingibel ist, so dass die Elemente also nie rein roth oder rein gelb, sondern stets in Mischfarbe erscheinen. Bei ganz jungen, sehr Hb-armen Erythrocyten ist das Hb so in Minderheit gegenüber dem fuchsinophilen Protoplasma, dass dieselben oft als basophile (fuchsinophile) Lymphocyten, also frei von oxyphilem Hb, imponiren können. Diese jüngsten rothen Blutkörperchen zeigen ihr wenig hyalines mehr protoplasmatisches Verhalten, d. h. ihre Fuchsinophilie, aber in reiner Form nur, falls zugleich die Kerne mit Methylgrün gefärbt werden, also etwa beim Triacid. Bei allen anderen Kernfärbungen färben sich die fuchsinophilen rothen Blutzellen auch etwas mit der Kernfarbe, erscheinen also mehr oder weniger zugleich basophil, wie die Lymphocyten, und zwar ebenfalls um so ausgesprochener, je weniger entwickelt in Art oder Alter (Megaloblasten, jugendliche Kerne, wenig Hb) sie sind. Sie sind dann also polychromatophil. Je unentwickelter eine Zelle ist, um so basophiler ist sie. In diesem Sinne sind die rein basophilen Lymphocyten die primitivsten Leukocyten. Die fuchsinophilen, bezw. polychromatischen Erythrocyten bilden sozusagen den Uebergang zu den orangeophilen orthochromatischen Erythrocyten mit alten pyknotischen Kernen. Wie man unreife indulinophile Granula durch Erhitzen und Verdichtung ihrer Micellen in eosinophile und aurantiophile verwandeln kann, so auch polychromatische Erythrocyten in orthochromatische. Aus dem Gesagten ist verständlich, dass die Abstufung der Erythrocyten, die in ihrer Gesamtheit cyanophil im Gegensatz zu erythrophilen Erythrocytoden, oder genauer, erythrophil im Gegensatz zu xantophilen Blutscheiben sind, derart vor sich geht, dass die Megaloblasten im Ganzen matter, Hb-ärmer, die Normoblasten kräftiger gefärbt erscheinen, bei beiden aber die grosskernigen jüngeren Formen röther, als die kleinkernigen alten hervortreten. Fuchsinophilie und Polychromatophilie sind dabei aber doch nicht schlechtweg identisch, gehen auch nicht unbedingt Hand in Hand, sondern Polychromatophilie ist der weitere Begriff. Alle fuchsinophilen Zellen sind polychromatophil, es giebt aber auch polychromatophile orangeophile Zellen. Polychromatophilie ist nicht schlechtweg ein Ausdruck der Jugendlichkeit und auch Fuchsinophilie ist dieses nur bedingt, da Megaloblasten zwar im Ganzen röther, wie Normoblasten sich färben, im Einzelnen aber alte Megaloblasten zwar matt, aber deutlicher gelb, wie junge Normoblasten erscheinen. Von Fuchsinophilie darf man eigentlich nur bei einseitiger Färbung mit Triacid reden; dieselbe ist dann vielleicht Ausdruck des Mangels oder der geringen Gegenwart von Hämatin im Hämoglobinemolecul. Polychromatophilie ist dagegen Ausdruck relativer Hb-Armut, bezw. richtiger des Vorhandenseins eines basophil-cyanophilen, wenig dichten Protoplasmas, welches Farben mit grösserem Molecularvolumen aufzunehmen im

Stande ist; dabei ist auch Polychromatophilie und Cyanophilie nicht identisch mit Basophilie, wie Färbungen mit einem gelben basischen und einem sauren Farbstoff (Vesuvium + S. Violett) beweisen, doch decken sich die Begriffe in praxi, wo ja meist dunkle Kernfarben angewandt werden. Das die polychromophile Färbung ermöglichende cyanophile (basophile) Protoplasma findet sich natürlich sowohl bei jugendlichen, als bei degenerierten Blutkörperchen; es ist das Substrat, in welches das Hb eingelagert ist. Bei ersteren ist die relative Hb-Armut primär, praeformirt, bei letzteren durch Auslaugung des Hb oder sonstwie acquirirt, so dass das zuvor verdeckte cyanophile Plasma wieder zum Vorschein kommt. Im ersteren Fall enthält das jugendliche Hb viel fuchsinophiles Globulin, im letzteren Falle besteht es zumeist aus dichter, orangeophiler Substanz.

Wenn schon demnach die Combinationen aus zwei sauren Farbstoffen, wie sie im Triacid und im Glycerin-Gemisch zur Verwendung kommen, der Indication der Hb-Färbung nicht in einer allen Anforderungen genügenden Weise gerecht werden können, so sind sie doch da nicht ganz zu entbehren, wo es sich um farbenanalytische Abstufungen und panoptische Uebersichtsbilder handelt, und es auf die tinctorielle Differencirung der oxyphilen Granula vom Hb ankommt. An Mannigfaltigkeit des färberisch Dargestellten, an differenter Färbung morphologisch und chemisch differenter Elemente, wird das Mögliche von einer Orange G + S Fuchsin-Combination geleistet, wenn sie mit Methylenblau<sup>1)</sup> zu einer triaciden Lösung gemischt ist. Hier ist das Hb gelb, die oxyphilen Granula leuchtend roth, das oxyphile Plasma röthlich orange oder gelblich rosa, die neutrophilen Granula bräunlich violett, die basophilen Granula und das basophile Leukocytenplasma dunkelblau gefärbt, und auch die Kerne ziemlich gut zur Darstellung gebracht. In gleicher Weise hebt die Aurantia-Eosin-Combination oxyphiles Plasma und oxyphile Granula vom Hb ab, ohne aber auch ihrerseits als absolut zuverlässiges Reagens auf das Vorhandensein von Hb dienen zu können. Färbt man mit dieser Lösung ein Präparat, dessen Kerne bereits vorher mit Haematoxylin gefärbt sind<sup>2)</sup>, so verhält sich das entstehende Bild im Ganzen, wie ein mit dem Glyceringemisch hergestelltes. Allerdings sind die Specialgranulationen geringerer Oxyphilie in Folge des Alauns nicht zur Darstellung gebracht, dafür ist aber die Kernfärbung eine weitaus bessere. Ist das Präparat stark erhitzt, dann ist das Hb mehr oder weniger gelb, desgleichen die oxyphilen Granula, das schwach oxyphile Plasma der Spezialzellen matt

<sup>1)</sup> Ehrlich-Lazarus, Anämie S. 26 u. 27. In panoptischer Hinsicht gleichwerthige Bilder, sogar mit besserer Kernfärbung, allerdings farben-analytisch nicht immer ohne weiteres zu verwerten, erhält man, wenn man einer Färbung mit gewöhnlichem Triacid eine solche mit concentrirter, wässriger Methylenblaulösung vorhergehen lässt.

<sup>2)</sup> Sehr bequem und zu empfehlen ist es, mit Haematoxylin vor- und mit dem Glycerin-Gemisch nachzufärben.

bräunlich violett (Markzellen), bzw. gelblich rosa (Leucocyten), die Mastzellenkörner ungefärbt, eingebettet in dem matt rothen Intergranularplasma.

In panoptischer Hinsicht dem Methylenblautriacid fast gleichwerthig, in morphologischer Hinsicht ihm noch überlegen, allerdings farbenanalytisch auch nicht zu verwerthen, ist eine Hämatoxylin-Färbung, bei der die Differencirung zwischen Hb und oxyphilen Granulationen zwar nur durch einen sauren metachromatischen Farbstoff besorgt wird, bei der man dann aber zur besonderen Färbung der basophilen Dinge Rhodamin<sup>1)</sup> verwendet, einen seiner Constitution nach sauren Farbstoff, der aber vorläufig noch unaufgeklärter Weise basische Eigenschaften hat. Hierbei wird das Hb gelb, die eosinophilen Granula mehr weniger gelblich roth gefärbt, die basophilen Granula dunkelblau-roth. Vom Methylenblau-Triacid unterscheidet sich dann eine solche Färbung nur dadurch, dass die verschiedenen amphophilen Specialgranulationen, sowie das basophile Lymphocyten-Plasma nicht zur Darstellung gelangt ist. Eine solche Hämatoxylinfärbung, in Combination mit Biebericher Scharlach und Rhodamin, erfüllt uns in einfachster Weise fast alle für uns wesentlichen Postulate. Während wir nun bei dieser der folgenden Untersuchung zu Grunde gelegten, universionellen Hämatoxylinfärbung zur Differencirung des Hb von Hb freiem Plasma uns nur eines sauren Farbstoffes bedienen, haben wir bei unserer, die Hämatoxylinfärbung ergänzenden Lymphocytenfärbung versucht, dieser Forderung nicht nur durch den einen basischen, und zwar rothen Farbstoff (s. o.) zu genügen, sondern ihr von einem anderen Gesichtspunkte aus gerecht zu werden. Da es nämlich bis jetzt weder durch saure, noch durch basische Farbstoffe gelungen ist, geringste Mengen von Hb von anderem, amphophilen, d. h. mit basischen und sauren Farben färbbaren Zellplasma isolirt, ohne dieses, darzustellen, so erschien es berechtigt, umgekehrt zu versuchen, nur das Zellplasma ohne das Hb zu färben. Letzteres kann erreicht werden, wenn man das Hb stark fixirt, seine Micellen also verdichtet, und dann mit Farbstoffen von grösserem Molecularvolumen färbt, für welche alsdann das Hb überfixirt und impermeabel erscheint, und sich daher nur in seiner eigenen, gelblichen Naturfarbe repräsentirt. Der Rubinstein'sche Grad der Erhitzung ermöglicht bei etwas längerer Einwirkung eine solche relative Ueberfixation, ohne Schädigung irgendwelcher Structurbilder. Von dieser Art der negativen Hb Färbung machten wir versuchsweise bei dem Methylgrün-Pyronin-Verfahren Gebrauch. Da aber in gleicher Weise dabei auch die oxyphilen Granula un-

<sup>1)</sup> Statt des Rhodamin kann man auch Chromgrün oder Wasserblau benutzen. Für praktisch hämatologische Zwecke sind jedoch diese drei Färbungen nicht zu empfehlen, da das Wichtigste, die Hervorhebung der basophilen Lymphocytenleiber bei gleichzeitiger Hämatoxylin-Anwendung doch nicht ausreichend genug gelingt, die positive Mastzellkörnerfärbung praktisch, aber weniger von Belang ist. Vorzuziehen ist die Hämatoxylin-Eosin-Aurantia-Färbung, welche dafür feine Abstufungen der Oxyphilie garantirt.

gefärbt, d. h. negativ dargestellt erscheinen, wird der geringe Vortheil durch einen grösseren Nachtheil wett gemacht. Ein Versuch mit dem von Ehrlich<sup>1)</sup> angegebenen, aus zwei basischen und einem sauren Farbstoff bestehenden Triacid (Methylgrün, Pyronin, Narcein) bringt basophiles Lymphocyten-Plasma, basophile Mastzellengranula, neutrophile Granula, in differenter Färbung zur Anschauung und ist daher panoptisch dem oben geschilderten Methylenblau-S-Fuchsin-Orange-Triacid vergleichbar, abgesehen davon, dass hier bei Anwendung nur eines sauren Farbstoffes sich die Farbe des Hb von der der oxyphilen Granula nicht abhebt. Jedoch ist diese Färbung, gegenüber der einfachen Methylgrün-Pyroninfärbung, entschieden minderwerthig, insofern, als der eigentliche Zweck, das Characteristicum der letzteren, die Kenntlichmachung und eclatante Rothfärbung des basophilen Lymphocyten-Plasmas, nicht so prägnant in die Erscheinung tritt; müssen doch, um gelöste neutrale Farben zu bilden, die basischen Farbstoffe an Menge viel geringer, als die angewendeten sauren Farbstoffe sein, wobei dann natürlich nicht genügend freier basischer Farbstoff für den gewünschten Erfolg disponibel bleibt, vielleicht auch der überschüssige saure Farbstoff seinerseits wieder entfärbend wirkt und wohl auch die alkalische Reaction des Lymphocytenleibes alterirt, oder seinerseits das Pyronin wie eine schwache Säure beeinflusst. Da wir auf die Darstellung der neutrophilen Granula gern verzichteten, und uns allein an einer guten Kenntlichmachung der Lymphocyten lag, so verwerteten wir lieber statt dieses neutralen Gemisches die einfache Methylgrün-Pyroninfärbung, der man zur Darstellung des Hb und der oxyphilen Granulationen am besten eine getrennte Färbung mit verdünntem Narcein oder Biebericher Scharlach vorausschickt<sup>2)</sup>.

Aus all den verschiedenen, zur Erfüllung der erwähnten Postulate angestellten Färbungsversuchen hat sich ergeben, dass in panoptischer Hinsicht die meisten Indicationen erfüllt werden von den triaciden Gemischen, die nicht mit Methylgrün, sondern mit Methylenblau hergestellt sind. Auf gleicher Stufe steht das Triacid, welches Amethyst als Kernfarbe enthält. Auch das gewöhnliche Methylgrün-Triacid gehört hierher, wenn es mit Spuren von Methylviolett verunreinigt ist. Wo es nicht nur auf den Nachweis von gewissen Granulationen, sondern auf ein eingehendes, farbenanalytisches Studium, besonders der amphophilen Elemente, ankommt, müssen die neutralen Gemische controllirt und ergänzt werden durch Gemische basischer, und solche saurer Farben verschiedener Basicität und Acidität.

<sup>1)</sup> Ehrlich, Anaemie p. 26. 27.

<sup>2)</sup> Für den klinischen Gebrauch, zum blossen Nachweis von Lymphocyten, genügt völlig die einfache Methylgrün-Pyroninfärbung.

Wir versuchten ausser dem Glyceringemisch und dem Chromgrün Fuchsin-Vesuviumgemisch folgende Combinationen:

1. Malachitgrün (Smaragdgrün) + Fuchsin (Pyronin, Neutralroth, Acridinroth, Safranin);
2. Chromgrün + Rhodamin;
- 2a. Malachitgrün + Rhodamin;
- 2b. Chromgrün + Fuchsin u. s. w.;
3. Malachitgrün + S. Fuchsin;
- 3a. Chromgrün + S. Fuchsin;
4. Fuchsin u. s. w. + Lichtgrün;
- 4a. Rhodamin + Lichtgrün;
- 5<sup>1)</sup>. Methylenblau (Victoriablau) + Fuchsin u. s. w.;
- 5a. Fuchsin u. s. w. + Wasserblau;
6. Chrysoïdin (Vesuvium) + Benzoazurin (S. Violet);
7. Methylviolett, (Thionin, Amethyst) Tropäolin;
- 7a. Chrysoïdin + Methylviolett;
8. Methylenblau + Rhodamin (Rhodamin S.);
- 8a. Rhodamin + Wasserblau;
9. Methylenblau + Cyclamin (S. Fuchsin, Bordeaux).

Die fünfte der erwähnten Färbungen giebt die Handhabe dafür, das basophile Lymphocyten-Plasma für cyanophil zu erklären. Aus der ersten Färbung ergibt sich, dass die Kerne der Mastzellen erythrophil sind. Besonders geben die Chromgrün-Färbungen interessante Aufschlüsse, und ermöglichen vielleicht die Aufstellung einer eigenen Art Zellen, worüber noch an anderer Stelle berichtet werden soll. Uns kam es jedoch in erster Hinsicht auf die möglichst beste Darstellung der natürlichen morphologischen Verhältnisse an, in zweiter Hinsicht erst auf möglichst panoptisch-tinctorielle Differenzirung derselben. Die farbenanalytische Betrachtung geschah diesmal nur mehr nebenhin; es kam uns weniger darauf an, mit welchen Farben verschiedene Dinge verschieden dargestellt waren, als vielmehr, dass dieses überhaupt geschah.

Wir hatten im Verlauf unserer Erörterungen gesehen,

<sup>1)</sup> Besonders interessant: Methylenblau + Pyronin S, Neumethylenblau + Pyronin, Neumethylenblau + Pyronin S, Methylenblau + Pyronin, wegen der Wirkung der Thiofarbstoffe.

dass es für unsere erstrebten Zwecke auf folgende Punkte ankam:

1. distincte Kerngerüsthärbung, die zugleich die Unterschiede zwischen Proto- und Metakernen hervortreten lässt.
2. distincte Darstellung der basophilen und ächt oxyphilen Granulationen.
3. Darstellung der feinen Cytoplasmen-Unterschiede zwischen Markzellen und Leukocyten.
4. Darstellung der Polychromatophilie.
5. Differenzirung des Hb von den ebenfalls mit sauren Farben färbbaren Cytoplasmen und Granulationen.
6. Darstellung der basophilen Lymphocyten-Plasmen.

Den allermeisten dieser Punkte kann gleichzeitig, unter Voranstellung des morphologischen Gesichtspunktes, am besten durch eine geeignete Haematoxylinfärbung entsprochen werden. Das Haematoxylin genügt schon für sich allein, bloss als Kernfarbe angewendet, den Indicationen 1, 3 und 4. Combinirt man dasselbe nun noch mit einer Aurantia-Eosin-Gegenfärbung (was man sehr bequem erreicht, wenn man der Haematoxylinfärbung eine Färbung mit dem Glycerin-Gemisch folgen lässt), so wird alsdann noch der Indication 5 genügt. Die auf diese Weise erzielten Bilder sind schön, vielfach differencirt und instructiv. Wenn man sich damit begnügt, der Indication 5 durch nur einen, aber metachromatischen, sauren Farbstoff, etwa den Biebericher Scharlach zu entsprechen, und diesem dann noch etwas Rhodamin hinzusetzt, so wird dann auch der Indication 2 genügt. Einzig und allein der Indication 6, deren Ausfall schon bei einfacher Haematoxylin-Färbung störend auffällt, gelang es im Deckglaspräparat, auch bei Combination mit den verschiedensten sauren oder basischen Farbstoffen, nie völlig gerecht zu werden. Das Plasma der Lymphocyten giebt sich nicht genügend scharf als solches zu erkennen. In erster Linie ähnelt es in Configuration und Färbung sehr dem der Erythrocyten; besonders bei grossen Lymphocyten und polychromatophilen Megaloblasten ist dieses der Fall. Während aber diese Aehnlichkeit zwischen Erythrocyten und Lymphocyten, da sie auch bei anderen Färbungen (Methylenblau, Methylgrün + Pyronin) in

die Erscheinung tritt, keine spezifische schlechte Eigenthümlichkeit der Haematoxylin-Färbung ist, sondern im Gegentheil nur gewisse erythrogenetische Schlüsse gerechtfertigt erscheinen lässt, ist es ein Fehler dieser Färbung, dass das Lymphocyten-Plasma zweitens ausserdem auch von dem der granulationslos scheinenden Spezialzellen nicht deutlich absticht. Die Entkörnung selbst der Spezialzellen durch Hämatoxylin war für uns, wie wir sahen, eher ein Vortheil als ein Nachtheil, da die verschiedenartig gekörnten, aber doch als Spezialzellen zusammengehörigen Zellen nur auf diese Weise in gleichmässiger Weise kenntlich gemacht werden können; das ihnen allen Gemeinsame ist nemlich ihre Löslichkeit in gewissen Reagentien, bezw. im Alaunhämatoxylin, und nur so konnte es gelingen, sie in ihrer Gesamtheit sicher von den ächten oxyphilen und basophilen Elementarzellen zu unterscheiden. Nunmehr aber stellt sich bei Haematoxylin-Färbung der missliche Umstand ein, dass diese Spezialzellen nach einer anderen Richtung hin, nemlich von den granulationslosen Lymphocyten nicht ohne weiteres abgrenzbar scheinen, dass sich also diese beiden Plasmenarten bei Haematoxylin-Färbung tinctoriell gleich verhalten. Hieraus resultirt einmal als leicht zu begehender und oft begangener Fehler, die Annahme eines Ueberganges von Lymphocyten zu multinucleären neutrophilen Zellen; andererseits aber scheint die Haematoxylin-Färbung auch zur Aufstellung der „mononucleären granulationslosen Leukocyten“, als einer besonderen Art, Veranlassung gegeben zu haben, von denen dann ihrerseits die Leukocyten mit Spezialkörnungen sich ableiten sollen. Von Natur aus ist das Lymphocyten-Plasma, wie Controllfärbungen zeigen, stark basophil, das der Spezialzellen schwach oxyphil oder schwach basophil. Durch die Alaunbeize werden aber diese natürlichen Affinitäten derart alterirt, dass sowohl bei blosser Haematoxylin-Färbung, wie bei Hinzufügung saurer oder basischer Farben, beide Zellarten stets in gleicher Nüance gefärbt erscheinen. Nur die Kerne können allenfalls Unterscheidungen ermöglichen, und wir werden im Folgenden diesen Punkt noch zu besprechen haben. Dass aber überhaupt im Knochenmark wirklich lymphoide Zellen vorkommen, und es sich nicht bei unseren Schlussfolgerungen um granulationslos scheinende Special-Myelocyten gehandelt hat, dafür musste die Indication 6 durch Controllfärbungen erfüllt

werden, zu deren Herstellung wir der Scharlach- + Methylgrün-Pyroninfärbung vor allen den Vorzug geben. Wie aber das Triacid, das Glyceringemisch, die Ehrlich-Westphal-Morgenrot-sche Färbung u. s. w. infolge der durch sie ermöglichten prägnanten und fast isolirenden Hervorhebung gewisser Elemente, immer nur blossе Reagentien für den Nachweis gewisser Granulationen sind, für ein eingehenderes, morphologisches Studium jedoch nicht ausreichend erscheinen, so betrachten wir auch die Methylgrün-Pyroninfärbung ebenfalls nur als Reagens auf das Vorhandensein von Lymphocyten; allenfalls noch zum Studium der feineren Cytoplasma-Verhältnisse dieser Zellen scheint dieselbe geeignet, jedoch für Structuren der feineren morphologischen Kernverhältnisse in keiner Weise ausreichend, was sie mit allen anderen Anilinfärbungen theilt. Hier muss dann wieder die Haematoxylin-Färbung herhalten, wo jedoch in manchen Einzelfällen eine gewisse Willkür, ob Lymphocyt oder Spezialzelle vorliegt, nicht ganz auszuschliessen ist.

In unseren folgenden Untersuchungen wenden wir nur diese beiden Färbungen an:

1. Färbung mit Haematoxylin, Scharlach und Rhodamin.
2. Färbung mit Scharlach, Methylgrün und Pyronin.

Wir wenden uns nun zur eingehenderen Besprechung der einzelnen, bei diesen zwei Färbungen in Betracht kommenden Verhältnisse, um zuvörderst zu sehen, wie sich die verschiedenen, morphologischen Elemente des Knochenmarks dabei verhalten.

#### I. Färbung mit a) Hämatoxylin, b) Rhodamin + Scharlach.

Da wir farbenanalytisch das Hämatoxylin nicht verwerthen können, verzichten wir auf eine simultane, chemisch-elective Färbung. Wir färben successiv in zwei Tempi. Zuerst wird etwa 5 Minuten mit unserer Hämatoxylin-Tinctur vorgefärbt, und alsdann kurze Zeit mit einer mässig concentrirten, wässrig-glycerinigen<sup>1)</sup> Lösung nachgefärbt, die 3—4 Theile Rhodamin auf 1—2 Theile Biebericher Scharlach enthält. Wir finden dann:

a) Kerne blaugrau bis schwarz-violett. Die Kerne der rothen Blutzellen im Ganzen dunkler, als die der farblosen, die

<sup>1)</sup> Damit nur echt eosinophile, nicht pseudo-eosinophile Granula den Scharlach aufnehmen.



der Normoblasten, Leukocyten und kleinen Lymphocyten, also die „Metakerne“, dunkler, als die der Megaloblasten, Markzellen und grösseren Lymphocyten (Protokerne), die der alten Zellen (pyknotische Kerne und polymorphe Kernformen) dunkler, als die jungen, runden und deutlich structurirten Kerne.

Demnach darf man, um eine genetische Reihe zu construiren, sich keineswegs bloss an das eine Symptom der Helligkeit, in der die Kerne erscheinen, halten, sondern wird auch die anderen Eigenschaften der Zellen, wie Kernstructur, relative Kerngrösse, Plasmaverhältnisse berücksichtigen müssen, ebenso wie wir früher es als fehlerhaft erkannt haben, nur allein auf die absolute Grösse bei Kern oder Zelle Gewicht zu legen.

Bei Berücksichtigung des Gesamtcharakters der Zelle ist es leicht zu vermeiden, relativ ältere, pyknotische Megaloblasten für identisch, oder für directe Vorstufen („Uebergangsbilder“) von relativ jungen Normoblasten zu halten. Ebenso liegen die Dinge bei farblosen Zellen, bei denen z. B. die polymorphen Kerne allerdings meist dunkel (Metakerne) erscheinen, sehr häufig aber auch ebenso matt, wie die runden der Markzellen (Protokerne). Die chromatinarmen, polymorphen Kerne sind aber keine „Uebergangs-Formen“ zu den chromatinreicheren, polynucleären, weil umgekehrt stets auch runde Kerne in Zellen gefunden werden, von gleichem Charakter, wie die der polymorphen dunkelgegefärbten.

Dazu kommt, dass das Zellplasma von den Zellen mit matten polymorphen Kernen sich ebenso verhält, wie dasjenige mit matten, runden Kernen, dass aber das bei dunkleren, polymorphen Kernen erheblich davon abweicht.

Wir halten uns auf Grund dieses Befundes für berechtigt, zwei Entwicklungsreihen anzunehmen, in denen parallele Verhältnisse obwalten. Die eine Reihe führt chromatinarme (Proto-), die andere chromatinreiche (Meta-) Kerne.

In beiden Reihen sind die äusseren Conturen der Kerne entweder rund, oder von polymorpher Figur. Dazwischen liegen die verschiedenen Abstufungen der Polymorphosen (Abflachung, Einbuchtung etc.), die wir als „Uebergangskerne“ bezeichnen wollen. Somit ist der Begriff der „Uebergangszellen“, die von den uninucleären Markzellen zu den gewöhnlichen multinucle-

ären Leukocyten überleiten sollten, fallen zu lassen. Die uninnucleären Markzellen werden zu multinucleären Markzellen, die multinucleären Leukocyten entstehen aus entsprechenden multinucleären Leukocyten.

Bei beiden Arten aber, sowohl den Markzellen wie den Leukocyten, giebt es Zellen mit „Uebergangskernen“. Diese Verhältnisse finden sich sowohl bei granulirten Zellen, wie bei nicht granulirten.

Zugegeben muss jedoch werden, dass die Ein- und Abschnürung bei Leukocyten sich etwas anders verhält, wie bei Markzellen. Bei Leukocyten überwiegt die Verbiegung, bei Markzellen die Streckung des Kernes. Eine so hochgradige und tiefgreifende Polymorphose des Kernes, wie bei Leukocyten, kommt bei Markzellen gewöhnlich nicht vor, sie scheint auf einem früheren Stadium stehen zu bleiben (cf. Megaloblasten). Trotzdem sind die polymorphen Kerne der Markzellen denen der Leukocyten durchaus äquivalent zu erachten. Während aber eine wirkliche Fragmentirung des Kernes in mehrere Bestandtheile bei den Leukocyten meist pathologischer Natur ist (Eiter), und es sich gewöhnlich nur um eine äusserst starke Ausziehung, mit dünnen, fädigen Verbindungsbrücken handelt, ist eine directe Theilung des Kerns in zwei Fragmente bei Markzellen, wenn sie vorkommt, wohl zumeist physiologisch. Bei den neutrophilen Leukocyten ist das Ergebniss der Polymorphose meist eine Dreitheilung des Kerns, bei eosinophilen Leukocyten (Asthma-Sputum) sehr oft eine Zweitheilung. Auch die grossen Lymphocyten zeigen oft zweigetheilte Kerne, die kleinen sogar bisweilen viertheilige. Bei Lymphocyten besteht der Vorgang der Polymorphose mehr in einer Einkerbung, als in Ein- und Abschnürungen.

Ferner waren in unseren Präparaten in Folge der Rubinstein'schen Methode auch die Structuren der chromatinarmen Markzellen und Lymphocyten, besonders auch die Kerne der eosinophilen Zellen, dem Studium besser zugänglich, als dieses früher der Fall sein konnte.

Die Kerne der basophilen Zellen, noch mehr aber die der eosinophilen, haben vieles Gemeinschaftliche mit denen der Lymphocyten. Bei diesen drei Arten finden sich im Kernnetz weitere Maschenräume mit sehr deutlich hervortretenden Kernfäden. Da-

gegen finden sich bei anderen, granulationslosen Zellen, die man wohl ihrem ganzen sonstigen Habitus nach für Specialzellen halten muss, äusserst enge, feine, im Einzelnen nicht so distincte Fäden.

Auffallend ist, dass sich die Kerne der Eosinophilen und Basophilen bei Anwendung der Hämatoxylin-Tinctur nicht nur durch grössere Helligkeit, sondern auch durch differenten, mehr grau-grünlichen Farbenton von den röthlich-violetten Kernen der Special-Granulationen abheben. Die structurirten Kerne der jungen Erythrocyten zeigen stets ein mehr weniger centrirtes Radiensystem<sup>1)</sup> mit sectorenförmigen, oxychromatischen „Kernlücken“, die der rundkernigen Lymphocyten, besonders schön die der „grossen“ Lymphocyten, um ein weitmaschiges Netzwerk, das im Gegensatz zu den geraden, plumpen Balken der Erythrocyten aus zarten, geschwungenen Fädchen zu bestehen scheint (cf. Tafel). Trotzdem kommen Zellen vor, bei denen es im Einzelfall ausserordentlich schwer ist, an den Kernen die sichere Diagnose auf Lymphocyten oder Erythrocyten zu stellen. Zwar werden zwischen kleinen Normoblasten mit grossem pyknotischen Kern und schmalem Zellleib einerseits, und kleinen Lymphocyten andererseits Schwierigkeiten wohl bloss bei schlechter Kernfärbung (Ueberfärbung) vorkommen<sup>2)</sup>, dagegen sind die Schwierigkeiten erheblich grösser bei den Zellen mit structurirten Kernen, zumal der Proto-Arten, i. e. grossen Lymphocyten und jungen Megaloblasten. In ausgesprochenen Fällen zeigen zwar letztere radiäre Kern-Structur, erstere das lockere Fädchenwerk, aber es finden sich Zellen, bei denen das Netzwerk im Einzelnen zwar noch aus geschwungenen Fädchen besteht, im Ganzen aber doch schon deutlich centripetale Tendenz zeigt, d. h. die im Inneren des Kerns gewellten Fädchen setzen an der Kernwand mit breiten Füsschen an (s. Taf.). Ich möchte nicht anstehen hier „Uebergänge“ zwischen Lymphocyten und Erythrocyten anzunehmen, zumal in Rücksicht auf die oben erwähnten entsprechenden Ergebnisse der Zelleibsver-

<sup>1)</sup> Nur deutlich bei Fixation durch Hitze (oder allenfalls Sublimat.) Bei Nikiforoff erscheinen die Kerne aus einem feinsten Körnerwerk zu bestehen.

<sup>2)</sup> Ueber die sogenannten Reizungsformen Türk's habe ich keine Erfahrung. Der Beschreibung nach (Anämie S. 53) möchte ich sie für pyknotische Hb-reiche oder polychromatophile Erythrocyten halten, bezw. für Uebergänge von Lymphocyten zu Erythrocyten.

hältnisse (so S.40). Ferner kommt hinzu, dass es auch oft bei karyolytisch-karyorrhektischen Megaloblasten-Kernen schwierig ist, sie von grossen, matten Lymphocytenkernen sicher zu unterscheiden.

Uebrigens erscheint, auffallender Weise, das Oxychromatin der Erythrocyten stets ebenso gefärbt, wie der Zellleib. Ist der Zellleib kräftig gelb, also doch Hb-reich, so erscheint das Oxychromatin ebenso; ist der Zellleib matt oder mehr röthlich, oder polychromatophil, so zeigt das Oxychromatin dieselbe Nuance. Das gleiche Verhalten zeigte sich auch bei Anilin-Doppelfärbungen (Methylgrün + S. Fuchsin, Methylenblau + Eosin u. s. w.), besonders auch bei solchen mit 2 basischen Farben, (Methylgrün + Pyronin, Chromgrün + Fuchsin, Methylenblau + Safranin), wo sich das Oxychromatin mit demselben basischen Farbstoff gefärbt zeigt, wie das Hb. Der Ansicht, dass hier nur „Kernlücken“, also ein leerer Raum zwischen dem basophilen Karyolinin vorliegt, durch welchen hindurch man das Cytoplasma der Gegenseite erblickt, wird entgegengetreten durch die Möglichkeit der Ueberfärbung, bei der auch dieser „leere“ Raum sicher ein Substrat für Farbstoff-Aufspeicherung abgibt (cf. den Kernsaft der Ganglienzelle). Dazu kommt, dass man auch in „abgerissenen“ Kernen die gefärbten Lücken sieht, welche aber nur bis zur abgerissenen Kerngrenze reichen und sich nicht über den Spalt zwischen Kernmembran und Nuclein einerseits, und Cytoplasma andererseits fortsetzen, ein Beweis, dass sie innerhalb der ersteren selbst gelegen sein müssen. Es scheint demnach nicht ganz von der Hand zu weisen, dass zwischen Oxychromatin und Cytoplasma der Erythrocyten irgend welche Beziehungen obwalten, so zwar, dass bei der Entkernung nur ein Basichromatin-Schwund stattfindet, das Oxychromatin aber als Arnold's Nucleoid und Substrat für Blutplättchenbildung restirt, und unter Umständen sogar noch später in der Blutscheibe different gefärbt zur Anschauung gebracht werden kann, obwohl doch im physiologischen Zustand die Dellengegend der Blutscheibe ebenso Hb-haltig erscheint, wie die Randpartie. Das Oxychromatin rother Blutzellen besteht zum Theil wohl aus Nucleohiston, bzw. Protaminbasen; der Eiweisskörper des Häoglobins, das Globin, ist aber nach Schulz<sup>1)</sup> ebenfalls ein Histon.

<sup>1)</sup> Fr. N. Schulz, Zeitschrift für physiolog. Chemie, XXIV, S. 473, 1898.

b) Von Granulationen erscheinen die eosinophilen röthlich orange oder bei stärkerer Fixation dunkelgelb gefärbt, während die basophilen (Mast)-Zellkörnungen sich prachtvoll scharlachroth (Rhodamin) repräsentiren. Die Special-Granulationen sind überhaupt nicht, auch nicht „durch Aussparung“ dargestellt. Bei den meisten multinucleären eosinophilen schienen die Granulationen gröber, bei den uninucleären feiner zu sein, jedoch kommen auch kleine uninucleäre mit groben Granulationen, und grössere multinucleäre mit feineren Granulationen vor.

Die Anordnung der Granula ist ebenfalls eine ganz verschiedene. Das Gewöhnliche ist eine diffuse Vertheilung durch den ganzen Zellleib rings um den Kern herum. Sehr oft aber nehmen sie bloss einen Theil des Zelleibes ein, etwa eine Calotte, die bei Zellen mit eingebuchteten Kernen meist an der concaven Kernseite gelegen ist, oft einen Zapfen in diese hinein sendet (s. u.).

c) Das Hämoglobin erscheint hellgelb bis dunkel gelblich-roth (Scharlach, oder Scharlach + Rhodamin), bei kernlosen Erythrocyten rein gelblich, theils heller, theils kräftiger, bei kernhaltigen Erythrocyten meist mit röthlichen Beimengungen, und zwar: bei Megaloblasten gelblich rosa und meist polychromatisch, d. i. schmutzig mit einen Stich ins Gelbbraunliche, bei Normoblasten röthlich-dunkelgelb. Bei ganz jungen, sehr grosskernigen Erythrocyten, sowohl bei Megaloblasten wie bei Normoblasten, erscheint der Hb führende schmale Protoplasma-Saum bei Hb-Armut fast rein röthlich, d. h. ohne gelbliche Beimischung dabei aber polychromatophil, weinroth, mattbräunlich mit einem leichten Stich in die violette Kernfarbe, von Lymphocyten oft nicht zu unterscheiden, besonders wenn auch der Kernbau im Stich lässt.

d) Das intergranulare Plasma der eosinophilen Zellen erscheint bei den gröber gekörnten Zellen mit den dunkleren Metakernen wohl stets völlig ungefärbt, bei den feiner gekörnten mit Protokernen in dem gleichen matt violetten, oder leicht röthlichen Schimmer, wie die Lymphocyten-Leiber. Das Plasma der basophil gekörnten Zellen erschien grösstentheils ungefärbt. Die ungranulirten Zellen haben ein homogenes zartes Plasma von einer lilafarbenen Nuance, die alle Abstufungen von bläulich-rosa bis matt röthlich-violett darbietet. Es ergab sich,

dass diejenigen Zellen, die wir wegen ihrer Kerne (s. o. S. 45) für Lymphocyten halten mussten, mehr bläuliche Nuancen des Zellleibes aufwiesen (Haematoxylin und Rhodamin), während die anderen, granulationslos erscheinenden Zellen mit abweichenden Kernen, welche als Specialzellen zu deuten sein dürften, mehr gelbröthlichen Farbenton darboten (Rhodamin und Scharlach). Doch sind auch hier die Unterschiede nicht stets absolut sicher zu erkennen. Bei den Zellen, die Protokerne hatten (Markzellen), und zwar sowohl bei rundförmigen wie bei polymorph gestalteten, erscheint der Zelleib von einer zarten, graublauen, haematoxylinophilen Substanz durchsetzt, welche an der Kernmembran in das basichromatische Karyomitom überzugehen schien. Bei den Zellen, deren Kerne Metacharakter aufwies, war der Zelleib dagegen ganz homogen, weniger zart, und hatte ziemlich kräftigen Farbenton angenommen. Diese Haematoxylinophilie der Plasmen bei Protozellen (granulationslos erscheinende Markzellen, grosse „Lymphocyten“ mit breitem Leibessaum) kann ebenfalls, wie schon erwähnt, eine Verwechselung mit Hb-armen polychromatophilen Megaloblasten zu Stande kommen lassen, sowohl bei breitem Zelleib, als auch besonders, wenn die Kerne relativ gross, der Zelleib aber schmal ist.

Es bedeuten demnach bei unserer Haematoxylin-Färbung:

1. hellgelbe und dunkelgelbe hyaline Scheiben: Erythrocytoden.

Zellen mit röthlichgelbem, orangefarbenem, homogenem Plasmasaum und typischen, radiären oder pyknotischen Kernen: Erythrocyten.

Im einzelnen bedeuten Formen mit chromatinarmen (amblychromatischen), matt graublau gefärbten Kernen: Megaloblasten.

Formen mit chromatinreichen (trachychromatischen) fast schwarz gefärbten Kernen: Normoblasten.

Bei jeder der beiden Arten bedeuten solche mit grossen, deutlich structurirten, ein centrirtes Balkenwerk aufweisenden Kernen: junge Formen.

Solche mit kleinen, völlig homogen oder diffus gefärbten (pyknotischen) Kernen: alte Zellen.

2. Ferner bedeuten Zellen mit Granulationen und z. T. matten, grünlich-grauen Kernen: Elementar-Leukocyten.

Solche mit carminrothen Granula: basophile [Mast-] Zellen.

Solche mit bräunlich-rothen bezw. orange farbenen Granula: indulinophile, bezw. eosinophile Zellen.

Im Einzelnen bedeuten meist grössere Formen mit feinen Granula, schwach lila angedeutetem, intergranulärem Plasma und Kernen mit Protocharakter (chromatinarmen Kernen) eosinophile Markzellen, andere, meist kleinere Formen mit gröberen Granula, ungefärbtem Protoplasma und chromatinreichem Kern: eosinophile Leukocyten.

Es finden sich rundkernige = junge, polymorphkernige = reifere, und fragmentirtkernige = katabiotische, alte Formen, wobei gewöhnlich die rundkernigen, spärlicher, aber dichter stehende Granula in dem schmalen Zelleib, die polymorphkernigen reichlicher, aber doch lockerer angeordnete Granula in dem breiteren Zelleib aufweisen.

3. Zellen ohne Granula und mit röthlich-violettem Kernbasophile Lymphocyten oder Specialzellen. Zumeist grössere Zellen mit matterem Kern und feinem mattgraublau gefärbtem Spongioplasma, welches eine etwas hellere, schmutzig grauröthliche, bezw. mattbräunlich-violette Grundsubstanz durchsetzt: Markzellen oder grosse Lymphocyten.

Meist kleinere Zellen mit dunkleren Kernen und etwas kräftiger röthlichem Plasma: Specialgranulirte Leukocyten oder kleine Lymphocyten.

Allenfalls als Unterschied zwischen Lymphocyten und Specialzellen im Haematoxylinpräparat könnte man anführen, dass die Kerne der ersteren mehr graublau, die der letzteren mehr röthlich-violett erscheinen, ferner erstere ein deutliches, aus Fädchen bestehendes lockeres Maschenwerk zeigen, während die braune Structur der letzteren dichter und enger ist (s. o. S. 45).

Sowohl bei diesen letzteren, als auch bei den ersteren mit den lockeren Kerngerüsten kann man, wie bei den Elementargranulationen, junge rundkernige, reifere polymorphkernige, und katabiotische, fragmentirtkernige Formen unterscheiden.

## II. Färbung mit Scharlach, Methylgrün + Pyronin.

Zuerst Vorfärbung mit dünner wässrig-glyceriniger Scharlachlösung, dann Nachfärbung mit dem Methylgrün-Pyronin-Gemisch (3—4 Theile Methylgrün, 1—2 Theile Pyronin).

### a) Kerne der Erythrocyten blaugrün.

Kerne der Leukocyten röthlich-violett; im übrigen die Abstufungen der Helligkeit wie oben bei Haematoxylin. Kern-structuren schlecht zu erkennen. Das Ergebniss dieser Kernfärbung darf nicht als im Gegensatz stehend angesehen werden zu den Ergebnissen der Schnittfärbung nach Flemming und Russel, wo die Leukocytenkerne cyanophil, die der Erythrocyten erythrophil sich ausweisen. Dort handelt es sich um eine physicalisch summative Färbung, welche nur beweist, dass nucleinreichere Formen noch nicht mit Farbstoff gesättigt sind, wenn die nucleinarmen dieses bereits sind, und dass sie noch im Stande sind, ausser dem ersten noch einen zweiten Farbstoff aufzunehmen. Färbt man erst mit dem rothen, dann mit dem blauen Farbstoff, so liegen die Dinge gerade umgekehrt.

### b) Hb der rein oxyphilen Erythrocytoden rein gelb (Scharlach).

Hb der Erythrocyten mit deutlichem Stich ins Rothe, also basophil (Mischfarbe von Scharlach mit Pyronin). Die Abstufungen der Farbe zwischen Megaloblasten und Normoblasten wie oben bei Haematoxylin Scharlach-Rhodaminfärbung. Auch hier können Megaloblasten mit schmalem, rothem Zelleib sehr ähnlich gewissen grossen Lymphocyten sein.

c) Granula: basophile = leuchtend roth, eosinophile = schön orange gefärbt (Scharlach). Die jungen indulinophilen mehr bräunlichroth (Pyronin-Quote); Special-Granulationen nicht gefärbt, theils unsichtbar, theils ausgespart.

d) Cytoplasma sämmtlicher erscheinenden Zellen, mit Ausnahme der Lymphocyten, matt bräunlich-gelb gefärbt, das intergranulare Plasma der eosinophilen Zellen leuchtend roth.

Aus der Masse dieser gelblichen Zelleiber hebt sich eine Gruppe ungekörnter Zellen durch leuchtend rothen, prächtig carminfarbenen Zelleib hervor. Wie Ehrlich und Spilling (l. c.) angegeben, hat man in diesen, alkalisch reagirenden Zellen Lymphocyten zu erblicken.



Unsere Färbung ergibt nun, dass Zellen, die diese Reaction der Lymphocyten geben, nicht nur mit runden, sondern auch mit polymorphen Kernen vorkommen.

Doch ist diese polymorphe Kernfigur eine etwas andere, als die der gekörnten Zellen; es handelt sich meist weniger um Abflachung, Einbuchtung und Einstülpung, als um tiefgehende Einschnitte und Einkerbungen (s. o.).

Ferner ergibt unsere Färbung, dass auch Zellen, die diese Reaction aufweisen, mit runden, nicht polymorphen Kernen vorkommen, deren morphologischer Habitus aber von dem klassischen der Lymphocyten abweicht, insofern als der Kern relativ kleiner, das Plasma relativ mächtiger ist. Wegen der specifischen Reaction des Cytoplasma rechnen wir jedoch auch diese Zellen zu den „Lymphocyten“, indem wir den Begriff der grossen mononuclearen, granulationslosen, basophilen Leukocyten als unnöthig fallen lassen. Die Breite des Cytoplasma ist hier weiter nichts, wie ein Ausdruck des Zellenwachstums, welches in genau der gleichen Weise bei den anderen granulirten Zellen und auch bei den Erythrocyten auftritt. Ein Megaloblast bleibt Megaloblast, auch wenn der Kern relativ klein (pyknotisch) wird, und dass wohl eosinophile Zellen im Mark grosse runde, den Zellkörper fast ausfüllende Kerne, wie relativ kleine runde, mehr im Centrum liegende besitzen können, ist bekannt. Gewöhnlich ist die Breitenzunahme des Zellleibes schon mit geringer Einbuchtung oder Abflachung des Kernes verbunden, jedoch kann auch erst der Kern sich einbuchten oder auch erst das Plasma wachsen. Da typische rothgefärbte Lymphocyten nicht nur in Lymphdrüsen und Milz, sondern besonders die grossen, „theilungsreifen“ auch in jedem Mark vorkommen, ist es auch nicht unbedingt nöthig, solche Zellen, falls sie etwas breiteren Zellleib zeigen, als basophile, lymphoide, granulationslose Markzellen (Troje) zu bezeichnen.

Ebenso, wie in mit Haematoxylin und Methylenblau hergestellten Präparaten, sind die granulationslosen, basophilen Lymphocyten häufig nicht von kernhaltigen rothen Blutkörperchen mit sehr grossem, rundem Kern und schmalem Protoplasmaleib zu unterscheiden, da bei jungen Erythrocyten das Hb stark basophil, d. h. polychromatophil ist, sich also fast ebenso roth, wie

das Lymphocytenplasma färbt. Im Haematoxylinpräparat sichert vor Verwechslungen noch am besten die Kernstructur; in Methylenblaupräparaten neben der Kernstructur oft ein leicht gelblich-grüner Schimmer des Erythrocyten-Leibes, im Gegensatz zum rein dunkelblauen Zelleib der Lymphocyten; bei der Methylgrün-Pyroninfärbung hält man sich am besten an die verschiedene Farbe der Kerne: matt röthlich-violett bei Lymphocyten, bläulich-grün bei Erythrocyten; ihre Structur ist, wie bei allen linkspectralen Anilinfarben, nur mangelhaft zu erkennen<sup>1)</sup>.

Wir haben demnach bei dieser Färbung:

1. hyaline, matt bräunliche Scheiben=Erythrocytoden.
2. hyaline Zellen mit scharlachrothem Protoplasmaleib und blaugrünem Kern=Erythrocyten. Auch hier grössere mattere, und kleinere, etwas dunklere Kerne. Da genaue Structur-einzelheiten der Kerne im einzelnen nicht zu erkennen sind, ist auch eine Unterscheidung zwischen amblychromatischen Megaloblasten und trachychromatischen Normoblasten hier nicht mit Sicherheit durchführbar. Gewisse Zellformen mit grossen runden Kernen und schmalem Protoplasmsleib sind den Lymphocyten sehr ähnlich.

3. Granulationslose Zellen mit leuchtend carminroth gefärbtem Plasmaleib und matt röthlich-lilafarbenem Kern = Lymphocyten. Dieselben haben theils schmales, theils breiteres Plasma, theils grössere, theils kleinere, theils runde, theils eingebuchtete Kerne. Manche, besonders mittelgrosse Formen, mit schmalem Plasma und grossem rundem Kern sind häufig von entsprechenden Erythrocyten nicht zu unterscheiden. Unterscheidungen zwischen grossen und kleinen Lymphocyten, oder eingehendere Studien über die Kernstructur der Lymphocyten wegen unzureichender Kernfärbung nicht möglich.

4. Zellen mit matt gelblich-bräunlichem, oft ungefärbtem Cytoplasma, frei von Granulationen und violettblauem Kern = Markzellen, oder Leukocyten mit Special-Granulationen.

<sup>1)</sup> Da in zu langsam eingetrockneten Präparaten nur die Kerne der Erythrocyten wegen ihrer grösseren Dichte eine Tendenz zum „Abreissen“ haben, nie aber die der Lymphocyten, so kann unter Umständen auch einmal dieser Umstand von Vortheil für die Zelldiagnose sein. Auch pflegt der Erythrocyten-Rand glatter und hyaliner, der der Lymphocyten etwas hökriger zu sein.

Eine Unterscheidung zwischen Markzellen und Leukocyten ist wegen nicht genügenden Hervortretens der Kernstructur nicht sicher durchführbar. Auch hier Zellen mit runden, sowie mit eingebuchteten Kernen.

5. Zellen mit leuchtend gelben oder röthlich-braunen Granulationen, oft eingebettet in basophilem, rothem Plasma, mit matt himmelblauen (oft odematös scheinenden) Kernen = eosinophile, resp. indulinophile Zellen.

Unterschiede zwischen Markzellen und Leukocyten nicht überall mit Sicherheit durchführbar, besonders wenn bei ersteren das Intergranular-Plasma nicht erhalten ist. Auch hier runde und polymorphe Kernformen.

Schliesslich 6. Zellen mit matt gelblich-bräunlichem (schwach sauer reagirendem, aber wahrscheinlich oxyphilem) Cytoplasma, in dem leuchtend rothe Granulationen hervortreten = basophile Mastzellen. Auch hier rundkernige und polymorphkernige Formen.

Aus unseren verschiedenen Färbungen ergaben sich folgende, für die Morphologie der einzelnen Zellformen des Markes wesentliche Punkte.

Wir haben von morphotischen Elementen kennen gelernt.

1. Riesenzellen. Ihr Cytoplasma zeigt stets dasselbe tinctorielle Verhalten, wie das der Lymphocyten.

2. Erythrocytoden. Bei Färbungen mit zwei sauren (Aurantia, Eosin), zwei basischen (Fuchsin + Vesuvin), einer sauren und einer basischen (Orange, Pyronin; Scharlach + Rhodamin) Farbe, nehmen dieselben nur, oder überwiegend den gelben, nicht den rothen Farbstoff auf, sind xanthophil.

3. Erythrocyten. Im Ganzen etwas röthlicher als die Vorigen. Der Hb-haltige Cytoplasmaleib ist mit allen Farben, mit Ausnahme von Methylgrün, färbbar, erweist sich aber, genügend erhitzt, gegenüber einem passenden Gemisch basischer und saurer Farben als oxyphil, und manche jüngere Formen nehmen, selbst genügend fixirt, ebenso wie ältere Formen bei zu geringer Fixation, auch von dem basischen Farbstoff auf (ausser Methylgrün), sind also polychromatophil. In einem gelbrothen Gemisch zweier basischer oder zweier saurer Farben (Fuchsin-Chrysoidin, Auramin oder Phosphin); S. Fuchsin-Orange, Primulin, Curcumin, Tartrazin), erweisen sich die jüngeren Formen als fuchsinophil, erythrophil; dieselben verhalten sich aber zu einem Gemisch blauer und rother, oder blauer und gelber Farben als cyanophil, was bei neutralen Gemischen, falls die basische Componente die dunklere ist, mit polychromatophil zusammenfällt (s. o.). Junge Erythrocyten verhalten sich also sehr ähnlich den Lymphocyten, die granulationslos, basophil und ebenfalls cyanophil sind. Dem Kern-

charakter entsprechend unterscheidet man: a) Megaloblasten und b) Normoblasten; bei beiden Arten kann man junge structurirtekernige mit schmalem, polychromatophilem Zelleib, und alte pyknotische Formen mit breitem, orangeophilem Zelleib unterscheiden.

Im Hämatoxylin-Präparat sind die Kerne der Erythrocyten stets dunkler, als die der farblosen Zellen.

Kernstructur ist im Grossen und Ganzen radiär. Im Methylgrün-Pyroninpräparat Kernfärbung chemisch different von der der farblosen Lymphocyten, nämlich rein blaugrün, während jene röthlichen Farbenton haben.

4. Lymphocyten. Das Plasma bevorzugt in Gemischen von zwei sauren Farben (Aurantia + S Fuchsin) den dunkleren rothen, nimmt ihn aber nur in allerdünnster Nuance auf. Bei einem geeigneten Gemisch zweier basischer Farben (Methylenblau + Fuchsin), erweist es sich als ausgesprochen cyanophil. Neutralen Farbgemischen gegenüber, die entsprechend den Principien der differentiellen Combinations-Färbung zusammengestellt sind, verhält es sich stark basophil; nur Methylgrün wird nicht aufgenommen.

Auf Grund der basischen Grün-Rothfärbungen erweist sich ihr Plasma, übereinstimmend mit den Resultaten der Jod-Eosin-Methode, als alkalisch reagirend. Auf Grund dieser Färbung ergibt sich ferner, dass auch Zellen mit eingebuchtetem Kern zu den Lymphocyten zu rechnen sind, ebenso wie Zellen mit breitem Plasmasaum. Auf Grund der Hämatoxylin- und Methylenblaufärbungen zeigen die Kerne der Lymphocyten unregelmässig-kleinmaschige, knäueiförmige Netzstructur. Auf Grund der Hämatoxylin-Färbung ergibt sich ferner, dass auch bei ihnen chromatinarme (amblychromatische) Proto-, und chromatinreiche (trachychromatische) Metakerne unterschieden werden müssen. a) Die Protolymphocyten entsprechen den sogenannten „grossen“ Lymphocyten (lymphoiden Troje'schen Markzellen), doch gehören auch kleinere Formen, falls sie Protokerne haben, hierher. b) Die Metolymphocyten entsprechen den gewöhnlichen kleinen Lymphocyten, doch kommen auch hier mittelgrosse Formen vor.

Ueber das gleiche tinctorielle Verhalten des Lymphocyten-Plasma mit dem der Riesenzellen, sowie über die Punkte der Aehnlichkeit zwischen Lymphocyten und Erythrocyten s. o.

Auf Grund der Myrtillin-Färbung reagirt der Kern der Lymphocyten alkalisch, der der gekörnten Leukocyten mehr sauer<sup>1)</sup>.

5. Die granulirten Zellen. Gegen Myrtillin reagiren ihre Kerne schwach sauer. Aus unserer Haematoxylinfärbung ergiebt sich weiter, dass die Kerne der a) Markzellen chromatinarm, amblychromatisch sind, d. h. dem

<sup>1)</sup> In frischen unfixirten (überlebenden) Zellen gelingt es, durch Thionin oder Neutralroth ein Nucleolus-ähnliches Gebilde im Kern sichtbar zu machen. Man bewerkstelligt den Zusatz von Farbstoff in Substanz am besten, indem man von einer concentrirt alkoholischen Lösung ein minimales Tröpfchen auf dem Objectträger antrocknen lässt, und den Marksaff dann dort hinaufbringt.

entsprechen, was wir Protokerne nennen, während die der b) Leukocyten trachychromatischen Metacharakter aufweisen. Es finden sich aber auch polymorphe, chromatinarme Kerne in grösseren Zellen (alten Markzellen) und runde chromatinreichere in kleineren Zellen (jungen Leukocyten). Es kommen rundkernige Zellen vor, deren Kern relativ so gross im Verhältniss zum schmalen Zelleib ist, dass die Zelle als gekörnter, grosser oder kleiner Lymphocyt imponirt (Pseudolymphocyt).

Eine besondere Art der „Pseudolymphocyten“ zu unterscheiden, ist demnach eigentlich überflüssig, ebenso wie die Aufstellung einer eigenen Art schwach basophiler, granulationsloser, grosser uninucleärer Leukocyten.

Das Plasma der chromatinarmen „Markzellen“ zeigt ein hämatoxylinophiles, spongiöses Netzwerk, in dem der Kern gewissermaassen suspendirt ist.

Im Einzelnen bestehen noch folgende Differenzen:

Bei Zellen mit Metakernen erscheinen die Granula, falls sie gefärbt sind, gröber, bei Protokernen feiner.

Ist der Kern rund und relativ gross, so enthält die (junge) Zelle weniger, aber dicht (oft nur an circumscripiter Stelle) stehende Granula, ist er relativ klein, dann mehr und weiter zerstreute Granula; ist er eingebuchtet, so befinden sich die Granula am zahlreichsten in der Calotte, die der Invagination des Kerns gegenüberliegt, und zwar halbmondförmig um das Centrosoma angeordnet.

Im Gemisch zweier basischer Kernfarben (Chromgrün + Fuchsin) nehmen die Kerne der Eosinophilen und Mastzellen nur rothen Farbstoff, die der Spezialzellen eine Mischung beider auf.

Im Hämatoxylin-Präparat sind die Kerne der Eosinophilen und Mastzellen mehr blaugrün, die der Specialgranulirten mehr violett.

Wenn bei Eosinophilen (bes. Markzellen) intergranuläres Plasma vorkommt, so färbt es sich in neutralen Anilinfarbgemischen mit der basischen Componente, falls diese nicht Methylgrün ist, und beeinflusst dieselbe, ebenso wie das Lymphocyten-Plasma, als schwaches Alkali. Bei Mastzellen habe ich über diesen Punkt nicht genügende Untersuchungen anstellen können; es färbt sich jedenfalls auch mit basischen Farben (Pyronin), und reagirt dann schwach sauer, scheint aber, nach einer Methylenblau-Eosinfärbung zu urtheilen, mehr oxyphil zu sein.

Das intergranuläre Plasma der Special-Granulationen nimmt in neutrophilen Mischungen (Methylenblau-Eosin) den sauren Farbstoff auf, aus dem Scharlach-Rhodamin-Gemisch hauptsächlich den sauren; gegenüber Tropäolin, Scharlach, Bordeaux u. s. w. reagirt es schwach sauer. Aus einem Gemisch zweier saurer Farben (Orange + S. Fuchsin) bevorzugt es die dunklere, rothe; aus einem Chromgrün-Fuchsin-Gemisch, das zwei basische, immerhin aber plasmafärbende Componenten enthält, färbt es sich in gelblich-grüner Nuance (reagirt schwach sauer); im Methylgrün-Pyronin-Gemisch nur eben

schwach gelblich angefärbt, beeinflusst es das Pyronin, wie eine schwache Säure.

Die Special-Granulationen sind bei der Hämatoxylinfärbung unsichtbar.

Sie erweisen sich theils als neutrophil<sup>1)</sup>, theils als amphophil. Letztere können sich färben:

- a) in basischen und neutralen,
- b) in basischen und sauren,
- c) in neutralen und sauren,
- d) in basischen und neutralen und sauren Farben.

Finden sich Granula verschiedenen Farbentons in einer Zelle, so sind diejenigen, die grösser und dunkler (cyanophiler) erscheinen, und die basische Componente rein, oder in neutraler Verbindung enthalten, als unreife anzusehen, im Verhältniss zu den anderen, welche die hellere Farbe kleineren Molecularvolumens bevorzugen.

Was speciell den Fall b angeht, so nehmen solche amphophilen Körnungen aus neutralen oder triaciden wässrigen Farbgemischen, selbst solchen, die kein Methylgrün enthalten, nur die sauren Farbstoffe auf, weil diese ja bekanntlich im Ueberschuss vorhanden sein müssen, falls die gebildete neutrale Farbe gelöst bleiben soll. Sie können daher leicht mit oxyphilen Granulis verwechselt werden (Pseudoeosinophile), falls Controlfärbungen ausstehen. Dagegen aus einem Gemisch saurer Farben nehmen sie stets die dunkleren, schwerer diffundirenden, am wenigsten sauren Componenten auf (Indulin), umgekehrt aus einem Gemisch basischer Farben (Methylenblau + Saffranin, Malachitgrün + Rhodamin, Chromgrün + Fuchsin) die leichter diffundirenden helleren, mehr plasmophilen (Fuchsin, Rhodamin, Saffranin).

Methylgrün färbt auch diese Granula niemals.

Im übrigen färben sich in neutralen Mischungen (Methylenblau-Triacid) Körnungen a mit neutraler Farbe, Körnungen c mit saurer.

In Gemischen saurer Farben bleiben Körnungen a ungefärbt, Körnungen c nehmen Indulin auf.

Im Gemisch basischer Farben nehmen Körnungen a die dunkleren auf, Körnungen c bleiben ungefärbt.

Die eosinophilen Granula. Die ächten, reifen lassen sich mit keinem basischen Farbstoff färben, selbst nicht mit solchem, welcher Zellplasma anfärben kann. (Malachitgrün, Fuchsin, Chromgrün, Rhodamin u. s. w.).

Aus einem Gemisch zweier saurer Farben (Orange + S. Fuchsin, Aurantia + Eosin) nehmen sie, im Gegensatz zum Hb, die dunkleren mit

<sup>1)</sup> Ausser dem Menschen scheinen nur Affe, Hund und Schwein noch  $\alpha$ -Zellen zu führen. Diese Thiere neigen leichter, als andere Versuchsthiere, zu Eiterungen. Gewisse Immunisirungs-Resultate mit Bac-  
terien-Proteinen sind also nicht ohne Weiteres vom Meerschweinchen  
mit amphophilen Zellen auf den Menschen übertragbar.

grösserem Molecularvolumen auf; werden sie durch stärkeres Erhitzen noch mehr verdichtet, so nehmen auch sie die helleren auf.

Aus einem Gemisch dreier saurer Farben nehmen die unreifen Indulin auf, oder sonst die dunkelsten Farben (Wasserblau, Azoblau); d. h. finden sich in oxyphil granulirten Zellen bei Färbung mit zwei sauren Farbstoffen Granula verschiedener Farbnuance in ein und derselben Zelle, so sind die dunkler gefärbten als die unreiferen anzusehen. So kommen indulingefärbte und eosingefärbte, oder eosingefärbte und aurantiagefärbte Granula bei Behandlung mit Glycerin-Gemisch zusammen in einer Zelle vor, ferner fuchsin- und orangegefärbte bei Behandlung mit Triacid. Bei letzterer Behandlung können sogar, falls zu wenig erhitzt war, die unreifen, eosinophilen Granula in der violetten, also neutralen Mischfarbe, tingirt erscheinen, also eine basische Quote enthalten, und bei derselben Bedingung aus einem Methylenblau-Eosingemisch sogar die reine blaue, basische Componente aufnehmen. Gegenüber Tropäolin und Ponceau u. s. w. scheinen sie sauer zu reagiren. Sehr schön färben sie sich, wenn der sauren Farbe etwas Alkali zugesetzt, bezw. das gefärbte Präparat mit 10 pCt. Kalilauge behandelt wird<sup>1)</sup>.

Die Mastzellgranula. Sie lassen sich mit keiner sauren Farbe färben, auch nicht mit solcher, die Kernchromatin zu färben im Stande ist (z. B. Indulin). Von basischen Farben wird nur Methylgrün nicht aufgenommen; aus Methylgrün + Fuchsin-Mischungen nehmen sie also die rothe Farbe auf, sind aber trotzdem nicht erythrophil, denn aus Mischungen anderer basischer Farben (Methylenblau + Saffranin, Amethyst + Pyronin, Chromgrün + Fuchsin, Fuchsin + Vesuvin) nehmen sie stets die dunklere vorangestellte auf.

Gegenüber Methylviolett, Kresylviolett, Oxonin, Thionin, Methylenblau, Toluidinblau, sowie Chromgrün reagiren sie anscheinend alkalisch, desgleichen gegenüber Neutralroth und Pyronin. Am besten färben sie sich nach Westphal, wenn der basischen Farbe Essigsäure zugesetzt wird.

Etwaiges Intergranularplasma scheint oxyphil und sauer zu sein.

Wir haben in allen von uns untersuchten Knochenmarken folgende Zellformen gefunden. 1. Blutscheiben, 2. Erythrocyten, a) Megaloblasten, b) Normoblasten, 3. basophile, granulationslose Lymphocyten, a) grosse, b) kleine, 4. Specialzellen, a) Markzellen, b) Leukocyten, 5. oxyphile Elementarzellen, a) Markzellen, b) Leukocyten, 6. basophile Elementarzellen, a) Markzellen, b) Leukocyten, 7. Riesenzellen.

Ausser den genannten und beschriebenen kommen keine anderen morphotischen Elemente physiologischer

<sup>1)</sup> Vgl. Jacob: Lehmann's Hand-Atlanten XV, Text zu Taf. II, Figur 3.

Weise in Knochenmark-Präparaten vor. Alle Zellen, die sich finden, lassen sich ohne Zwang unter eine dieser Hauptgruppen unterordnen. Zu bemerken ist höchstens, dass von grossen Lymphocyten, specialgranulirten und eosinophilen Markzellen im Knochenmark, neben denen von der gewöhnlichen Grösse, wie sie bei Leukämie sich im Blute finden, auch wahre Riesenexemplare vorkommen, wie man sie im Blute bislang noch nicht anzutreffen Gelegenheit gehabt hat. Nur einen Punkt wollen wir dann noch hervorheben, bevor wir zur näheren Beschreibung der bei den einzelnen unserer Untersuchungsfälle sich findenden quantitativen Differenzen schreiten, nämlich die Frage des Kernaustritts aus rothen Blutzellen. Ohne mich auf das weitere sonstige Beweismaterial, welches in dieser Frage im bejahenden oder negirenden Sinn herbeigeschafft worden ist, einzulassen, will ich nur die Thatsache betonen, dass bei den auf unsere Weise hergestellten Deckglas-Abstrichpräparaten vom Mark<sup>1)</sup> sich nirgends ein sicherer Anhalt für den physiologischen Kernaustritt finden lässt. Umgekehrt, wenn man Präparate von sehr labilem, z. B. embryonalem Knochenmark nach der Ehrlich'schen Abzugsmethode herstellt, findet man stets in grosser Anzahl freie Kerne, und zwar fast nur pyknotische Normoblastenkerne, und als Vorstufen zu solchen, freie, stark excentrische oder im Austritt begriffene, pyknotische Kerne, denen man aber in Bezug auf Configuration des Zelleibes und die Art der Lage des Kernes in demselben leicht das Artefact ansehen kann. Insofern decken sich meine Befunde durchaus mit denen von Bogdanoff<sup>2)</sup>, dessen sonstige Ansicht über das Wesen des eosinophilen Granula u. s. w. ich im übrigen keineswegs theile. Auch dieser Autor hat jüngst hervorgehoben, dass in den von ihm untersuchten Fällen sich niemals ein Bild für die Deutung des Kernaustritts verwerthen liess; ja selbst nicht einmal

<sup>1)</sup> Um aus Blutpräparaten Aufschluss über eventuellen Kernaustritt zu erhalten, kann man, abgesehen von der von mir angegebenen Absaugungs-Methode, um die Abzugsmethode zu umgehen, von der Centrifugalkraft Gebrauch machen. Man fasst entweder mit Neumann das soeben mit mässig grossen Tropfen beschickte Deckgläschen mittels Pincette und schleudert den Tropfen ab, oder man befestigt die Deckgläschen auf der Centrifuge.

<sup>2)</sup> Bogdanoff, Biolog. Centralblatt Bd. 18. 1898.



excentrisch gelagerte Kerne rother Blutzellen konnte er in seinen Präparaten beobachten. Während wir demnach daran festhalten müssen, dass alle Bilder von *Luxatio nucleï*, wenn schon nicht Kunstproducte, so doch, falls *præformirt*, sicher nicht physiologischer Natur sind (Plasmolyse durch eingedicktes, hyperisotonisches Serum bei Leukämie), so ist im Gegensatz hierzu hervorzuheben, dass sich fast an allen Erythrocyten-Kernen Zeichen der Karyorrhexis und der Karyolyse nachweisen liessen, derart, dass aus dem regulären Radienwerk eines normalen Radkernes einzelne Speichen schwächer färbbar waren, oder auch ganz unfärbbar erschienen. Die Enucleation der Erythrocyten zu Erythrocytoden geschieht daher durch physiologischen Kernschwund. Der Erwähnung werth erscheint mir aber der Umstand, dass sich in dem verschiedenen, von mir untersuchten Knochenmarke in seiner normalen oder höchstens doch quantitativ vermehrten, jedenfalls aber physiologischen erythroplastischen Thätigkeit niemals jene bizarren Bilder von überstürzter Karyorrhexis, wie Kernwandsprossungen, directe Kerntheilung und dgl. gefunden wurden, wie dieselben sich in der Blutcirculation von Embryonen vor Anlage des Knochenmarks<sup>1)</sup> finden, oder in jenen abnormen, d. h. pathologischen Zuständen bei perniciöser Anämie, lymphatischer Leukämie oder Arsenikvergiftung, wie sie Bettmann<sup>2)</sup> jüngst in eingehender Weise beschrieben hat. Während also in geeignet hergestellten Knochenmark-Präparaten freie Kerne rother Blutkörperchen nicht zur Beobachtung kamen, fanden sich jedoch in solchen, die besonders reich an Lymphocyten waren (embryonales Mark), gewisse grosse, mit Hämatoxylin grau gefärbte, unregelmässig conturirte Schollen, die man, wie Uebergangsbilder deutlich zeigen, als freie und gequollene Lymphocytenkerne deuten muss, deren Plasma durch Cytolysis verloren gegangen ist. Ob es sich in unseren Fällen um einen vital præformirten Vorgang handelt, oder ob hier bei dem zerfliesslichen embryonalen Mark ein Kunstproduct vorliegt, dem die labilsten Elemente am leichtesten zum Opfer gefallen sind, vermag ich nicht zu entscheiden. Jedenfalls aber erweisen sich diese Formen identisch mit den von Klein-Gumprecht bei lymphatischer

<sup>1)</sup> Pappenheim, Inaugural-Dissertation. Berlin 1895.

<sup>2)</sup> Bettmann, Habilitationsschrift. Bonn 1898. Ziegler's Beitr. XXIII

Leukämie beschriebenen „Schatten“, bei welcher Krankheit durch die veränderte Isotonie des Serums die vielleicht schon normaler Weise grosse Neigung der Lymphocyten zur Leukolyse und Zerquetschung erhöht zu sein scheint.

Aus den bisherigen Erörterungen möchte ich hier noch folgenden Sätze besonders hervorheben:

1. Eine der besten Fixationen für Blutzellen-Deckglaspräparate ist die Rubinstein'sche.

2. Neben Hämatoxylin hat auch das Myrtillin seine besonderen Vorzüge.

3. Ausser den bekannten gewöhnlichen Färbungen von Blutpräparaten (Hämatoxylin-Eosin, Methylenblau-Eosin, Triacid) ist besonders die Methylgrün-Pyroninfärbung als Reagens auf basophile, granulationslose Zellen anzuwenden.

#### I. Rippenmark von halbjährigen Kaninchen.

Qualitativ fanden sich: Megaloblasten, Normoblasten, grosse Lymphocyten, kleine Lymphocyten, granulirte Markzellen, granulirte Leukocyten. Die Megaloblasten waren allermeistens polychromatophil, die Normoblasten seltener. Die polychromatophilen Megaloblasten zeigten im Uebrigen normalen Zellhabitus, während die polychromatophilen Normoblasten sich z. Th. im Zustande der Plasmorrhaxis befanden. Erythrocyten mit vollständig pyknotischen Kernen waren in der Minderzahl gegenüber solchen mit karyorrhectisch-karyolytischen Kernen, denen man ansah, dass der beginnende Kernschwund bereits vor der vollendeten Pyknose eingesetzt hatte. Ebenso waren Kerne mit ganz symmetrischem Radiärwerk in der Minderzahl gegenüber den karyorrhectischen.

Quantitativ erschienen die Megaloblasten gegenüber den Normoblasten in der Minderheit. Der mikroskopische Gesamteindruck eines Gesichtsfeldes zeigte ausserdem die rothen Blutzellen in der Minderzahl gegenüber den übrigen Hb-freien Zellen.

Die Mengenverhältnisse der letzteren stellten sich nach ungefährer Schätzung etwa so, dass am meisten polymorphkernige Markzellen und Leukocyten vorhanden waren, dann erst die anderen Arten folgten.

Sichere Mitosen von Hb-reichen Erythrocyten kommen gar

nicht, von farblosen Zellen nur äusserst spärlich zur Beobachtung. Dieser Punkt erscheint von principieller Bedeutung, weil er zum mindesten sehr stark gegen Bizzozero's Lehre von der alleinigen homogenetischen Vermehrung der Erythrocyten von sich aus ins Gewicht fallen dürfte. Für erwachsene Thiere wenigstens dürfte sie keine Geltung haben.

## II. Knochenmark eines jungen, wachsenden Thieres.

a) Femur-Diaphyse von 12tägigen Kaninchen.

b) Rippe unseres 4 Wochen alten Versuchshundes vor der Operation.

Qualitativ fanden sich Megaloblasten, Normoblasten, grosse Lymphocyten, kleine Lymphocyten, granulirte Markzellen und Leukocyten.

Quantitativ erschienen die Megaloblasten gegenüber I entschieden vermehrt, etwa in gleicher Zahl wie Normoblasten. Es finden sich ziemlich häufig Erythrocyten mit vollständig pyknotischen Kernen. Auch Erythrocyten mit vollständig radiärer Kernfigur fanden sich nicht so selten. Die Megaloblasten waren zumeist polychromatophil, auch etwaige Hb-arme Normoblasten sehr häufig polychromatophil. Farblose und Hb-führende Zellen waren ungefähr in gleicher Zahl vorhanden. Am meisten finden sich von farblosen Zellen rundkernige Markzellen, einkernige, besonders eosinophile Leukocyten, sowie grosse, rundkernige Lymphocyten. Sehr selten waren Mitosen rother Blutzellen und farblose Zellen.

## III. Embryonale Kaninchen gegen Ende der dritten Trächtigkeitswoche sowie

Neugeborene Kaninchen direct nach dem Wurf.  
(Femur-Diaphyse)

Es fanden sich: Megaloblasten, Normoblasten, Markzellen und grosse Lymphocyten, Leukocyten und kleine Lymphocyten. Megaloblasten überwiegen entschieden an Zahl gegenüber den Normoblasten. Bei beiden finden sich Zellen mit vollständig pyknotischen Kernen, sowie Zellen mit radiärer, symmetrischer Kernfigur und zwar anscheinend häufiger, als Zellen mit karyorhektischen Kernen. Die Erythrocyten mit schmalen Zellleib und grossem Kern erschienen fast stets polychromatophil. Selten

polychromatophil erschienen die Zellen mit breitem Zellleib und relativ kleinen Kernen, am seltensten, wenn sie kleine, vollständig pyknotische Kerne führten. Im Grossen und Ganzen schienen mehr Erythrocyten, als farblose Zellen im Gesichtsfelde sich zu befinden. Reichliche Mitosen rother Hb-armer (bezw. basophil-lymphoider) und farbloser (eosinophiler) Zellen fanden sich ausserdem. Auch Mitosen Hb-reicher Erythrocyten wurden gefunden, doch seltener.

Die farblosen Zellen waren überwiegend, und von diesen eigentlich fast nur basophile, granulationslose Lymphocyten, sowie eosinophile Markzellen und eosinophile Leukocyten vorhanden. Sie waren überwiegend rundkernig, und es war daher besonders im einzelnen häufig die Unterscheidung, ob Lymphocyt oder Erythrocyt vorlag, sehr erschwert. Ferner überwiegen entschieden die grossen Formen über die kleinen. Man sieht im Gesichtsfeld ausser Erythrocyten fast nur grosse, rundkernige Lymphocyten. Zellen mit polymorphen Kernen sind relativ selten; sie finden sich eigentlich nur bei eosinophilen Markzellen und Leukocyten, bei den lymphoiden Zellen aber so gut wie gar nicht. Auf Grund der Ergebnisse des embryonalen Markes scheint es demnach nicht unberechtigt, da dasselbe fast ausschliesslich aus basophilen, granulationslosen Rundzellen besteht, welche ihrerseits, wie wir gleich sehen werden, theils zu Erythrocyten, theils zu Riesenzellen, theils zu Eosinophilen sich umwandeln, die rundkernigen Lymphocyten als die primitivste Urform der Leukocyten anzusehen. Jedoch sind die Lymphocyten eine Art für sich, und man darf nicht ohne Weiteres mit Uskoff schliessen, dass der rundkernige, granulationslose Lymphocyt die Vorstufe des gewöhnlich multinucleären Leukocyten ist.

#### IV. Junger, vierwöchentlicher Hund.

Rippenmark 4 Stunden nach dem letzten Aderlass. (Im Blut reichliche Normoblasten, neben Leukocytose; keine Megaloblasten.) Es fanden sich Megaloblasten, Normoblasten, Markzellen, Leukocyten, grosse Lymphocyten, kleine Lymphocyten. Ziemlich viel Megaloblasten sind polychromatophil, von Normoblasten zumeist solche mit pyknotischen Kernen und plasmorrhektischem Zellleib. Die Kerne der Erythrocyten waren meist karyorrektisch, oft

vollständig pyknotisch, am seltensten fanden sich solche mit symmetrischen Kernfiguren. Normoblasten fanden sich reichlicher, als Megaloblasten; rothe Blutkörperchen reichlicher, als farblose Zellen. Von letzteren waren hauptsächlich zu sehen: polymorphkernige Leukocyten und kleine, rundkernige und polymorphkernige Lymphocyten; polymorphkernige und rundkernige Markzellen, rundkernige grosse Lymphocyten und rundkernige, granulierte Leukocyten, besonders eosinophile u. s. w. schienen etwas geringer an Zahl. Mitosen fanden sich auffallenderweise keine.

Wir haben demnach approximativ

bei I und II mehr weisse, als rothe Zellen;

bei I und IV mehr Normoblasten, als Megaloblasten;

bei III und IV mehr rothe Zellen, als weisse Zellen;

bei II und III mehr Megaloblasten, als Normoblasten.

Bei III ging das Vorhandensein von Mitosen rother Blutkörperchen mit geringer Zahl von karyorrhektischen Kernen, dagegen mit reicher Zahl von symmetrischen und pyknotischen Kernen einher. Auch überwogen die Megaloblasten. Ferner gingen die Mitosen weisser Blutkörperchen mit dem Ueberwiegen rundkerniger Formen über polymorphkernige, mit dem Ueberwiegen grosser Formen über die kleinen, und vor Allem mit dem Ueberwiegen von Lymphocyten und eosinophilen Zellen über die Special-Granulationen einher. Da nun das intergranuläre Plasma eosinophiler Markzellen ebenfalls basophil, wie das der Lymphocyten, ist, so überwogen bei III basophile Zellen und Elementar-Granulationen über Specialzellen. Das Mark bei III ist sowohl ein megaloblastisches, wie ein lymphocytisches.

Bei IV fehlten Mitosen rother Blutkörperchen; auch Erythrocyten mit symmetrischen und pyknotischen Kernen waren relativ selten, hauptsächlich fanden sich solche mit karyorrhektischen Kernen. Ausserdem war das Mark bei IV ein vorwiegend kleinzellig lymphatisch-normoblastisches. Es scheint demnach, dass die Erythropoese sich derart gestaltet, dass bei III im grossen und ganzen der Modus der Homoplastik durch Theilung, bei IV der der Heteroplastik durch vermehrte Umbildung aus farblosen Zellen überwiegt, so zwar, dass die bei beiden vorkommenden Normoblasten bei III vorwiegend irgendwie aus Megaloblasten,

bei IV vielleicht aus kleinen Lymphocyten gebildet werden, dass aber doch, während bei IV die wenigen vorhandenen grossen Lymphocyten vorwiegend zu kleinen Lymphocyten werden, die grosse Menge der bei III vorhandenen zumeist direct in Megaloblasten übergeht. Das Ueberwiegen der Karyorrhesis bei IV zeigt ebenfalls, dass der Organismus bereits die Eigenschaft erworben hat, auf kürzestem Wege die zweckmässigsten Formen herzustellen, während bei III sich derselbe noch mit einer ihm von früheren Zeiten her überkommenen vorwiegenden Production von Megaloblasten, sowie einer vollständigen Reifung junger Zellen zu solchen mit pyknotischen Kernen, aufhält. Während das relativ spärliche, aber doch schon vorhandene Vorkommen von Normoblasten bei III bereits auf eine functionelle Anpassung an neue Lebensverhältnisse, also auf eine neu erworbene Eigenschaft schliessen lässt, ist in dem spärlichen Vorhandensein von Megaloblasten bei IV noch ein Rest jener früheren, primitiven Blutbildungsweise zu erblicken.

Im Gegensatz zu den Befunden III und IV überwiegen bei I und II Hb-freie (weisse) Zellen, und während bei III und IV polymorphkernige Formen dieser sehr selten sind, treten sie bei I und II in imponirender Weise hervor. Auch diese Thatsache spricht dafür, dass die Rundkernigkeit ein Ausdruck der Jugendlichkeit, im Gegensatz zur Kernpolymorphose, ist, weshalb die Annahme einer Umbildung polymorphkerniger Wanderzellen zu rundkernigen (einkernigen) fixen Gewebs-Zellen nicht recht wahrscheinlich sein dürfte. Es erklärt sich aber der Gegensatz in den Befunden zwischen I und II einerseits, und III und IV andererseits leicht so, wenn man annimmt, dass bei III und IV, d. h. der starken progressiven, plastischen Thätigkeit des Marks die primitiven, körnchenfreien, lymphoiden, basophilen Markzellen mit runden Kernen sich ausschliesslich heterotypisch weiter fortentwickeln, sich zu rothen Blutzellen differenciren, während später, wenn das Bedürfniss gedeckt und ein hinreichender Stamm von Hb-führenden Zellen erst einmal vorhanden ist, die homotypische Weiter-Entwicklung der rundkernigen Markzellen vorwiegend Platz greift, d. h. ihre cytogenetische Alterung zu polymorphkernigen Formen.

Wir haben schon oben, wo wir die Grenzen der Leistungsfähigkeit unserer Färbungsmethode kritisch besprochen haben, festgestellt, dass, ganz allgemein gesagt, zwischen Lymphocyten und gewissen grosskernigen und schmalleibigen Erythrocyten stellenweise äusserst zahlreiche Aehnlichkeiten zu finden sind, welche unter Umständen im Einzelfalle einer Unterscheidung Schwierigkeiten bereiten können. Ganz besonders nun bei embryonalem Knochenmark (III) zeigte sich, auf Grund unserer nach Rubinstein fixirten und mit Müller'schem Hämatoxylin gefärbten Präparate, dass thatsächlich Bilder vorkommen, welche einen Uebergang zwischen beiden Zellarten wahrscheinlich zu machen geeignet sein dürften. Dass weder auf die Basophilie der Lymphocyten, noch auf die Orangeophilie des Hb ein sicherer Verlass ist, haben wir ebenfalls bereits erörtert, indem gerade die jungen, gewissermaassen eben entstehenden Erythrocyten noch nicht nachweisbare Mengen von Hb haben, ihr Protoplasma also ebenfalls, wie das der Lymphocyten, gewissermaassen noch basophil ist. Auch die Structuren der Kerne liessen im Stich, denn da zeigte es sich, dass Bilder vorkommen, deren Kerne im Centrum denen der Lymphocyten äusserst ähnlich waren, aber durch den regulären, breitfüssigen Ansatz der Netzfäden an der Kernmembran schon theilweise einige Characteristica von Erythrocyten besaßen.

Während auf diese Weise, wie embryonale Verhältnisse lehren, durch diffuse Einlagerung einer oxyphilen (xanthophilen) Substanz in basophiles Cytoplasma eine Metamorphose von Lymphocyten zu Erythrocyten zu Stande zu kommen scheint, liefert uns die embryonale Epoche der Blutbildung im Knochenmark den sicheren Beweis dafür, dass durch circumscripte Einlagerung oxyphiler (erythrophiler) Substanz in basophiles Protoplasma die Entstehung eosinophiler Zellen aus basophilen lymphoiden Zellen gedacht werden muss. Einzig und allein im embryonalen Knochenmark, bis jetzt aber physiologischer Weise niemals später beim Erwachsenen, fand ich Zellen, die noch alle Reactionen der basophilen Lymphocyten geben (Methylgrün-Pyronin etc.), deren etwas aufgelockertes Cytoplasma aber schon an einer ganz circumscribten Stelle, wie es Hirschfeld<sup>1)</sup> jüngst

<sup>1)</sup> Dieses Archiv 153.

beschrieben hat, und zwar meist dort, wo der Kern sich einbuchtet, oxyphile Granulationen eingelagert, und oft halbkreisförmig um das Centrosoma herum, angeordnet enthält. Ähnliche Bilder, wie hier im embryonalen Mark, sieht man bisweilen pathologischer Weise im Blut bei schweren Anämien. Wenn dort dann infolge Einwirkung des dyskrasischen Serum die eosinophilen Granula stark gequollen sind, so glaubt man bei Methylenblau-Eosinfärbung bisweilen im Leibe von grossen Lymphocyten an einer bestimmten Stelle Hb-Tröpfchen zu sehen (vgl. Grawitz), da ja bei Eosin-Tinction Hb und eosinophile Granula in gleicher Farbe gefärbt erscheinen. Im weiteren Verlauf der Cytogenese erblickt man dann Bilder, wo bereits eine Calotte der Zellkugel mit Granulis angefüllt ist, oder die Körner scheinen in einer Kapsel oder kugelförmigen Vacuole des Zellleibes, wie von einer eignen, conturirten Wandung eingeschlossen. Später breiten sich die Granulationen durch die ganze Zelle hindurch über alle Seiten des Kerns hinweg aus, und schliesslich schwindet das basophile Plasma zwischen den Granulationen. Während auf diese Weise eosinophile Zellen aus Lymphocyten neu zu entstehen scheinen<sup>1)</sup> — vielleicht hat man sich den postembryonalen pathologischen Process der eosinophilen Degeneration beim malignen Lymphom (Goldmann, Kanter) ebenso zu denken — kommen umgekehrt keine Bilder vor, welche sich als eine Wiederrückbildung von Lymphocyten aus solchen eben entstandenen Eosinophilen deuten lassen, derart, dass etwa eine Eosinophile mit circumskripter Körnchenansammlung sich in einen granulirten und einen ungranulirten Schössling karyokinetisch

<sup>1)</sup> Ob die eosinophilen Zellen des Bindegewebes, vgl. Ehrlich Farbenanalyt. Unters. S. 17, ebenfalls aus den uninucleären lymphoiden granulationslosen basophilen Rundzellen des Gewebes (histiogenen Wanderzellen) hervorgehen, bleibt abzuwarten. Eine Umbildung multinucleärer Blut-Zellen zu sessilen uninucleären Gewebszellen scheint unwahrscheinlich. Es scheint also, dass ins Asthmasputum entsprechend der gewöhnlichen Eiterbildung sowohl multinucleäre Eosinophile des Blutes wie uninucleäre Eosinophile des Gewebes übergehen, denn im Blute bei Asthma und Pemphigus fehlen uninucleäre Formen. Vgl. die analog. Verhältnisse des Gonorrhoe-Eiters, Lohnstein und Hirschfeld, 1897, Monatsberichte über die Gesamtleistungen auf dem Gebiet der Harn- und Sexualkrankheiten II.



theilt; stets theilte die Teilungsebene auch die Körnchenansammlung in zwei Hälften (s. Taf.). Es scheint also, dass der Ort derersten Körnchenproduction im Lageverhältniss zum Kern kein beliebiger ist. Wie ich Hirschfeld bestätigen kann, spricht eine geringe Ausbreitung der Granulationen im Zellleib nicht für die Jugend der ganzen Zelle als solcher, sondern nur für die Frische der eosinophilen Secretion. Es kann nämlich ein alter Lymphocyt mit eingebuchtetem Kern eben erst angefangen haben, eosinophil zu werden: solchen Bildern stehen andere gegenüber von ausgesprochenen, fertigen eosinophilen Zellen mit jugendlich runden Kernen; denn einzig und allein der Kern bestimmt das Alter des Zellindividuums. Ehrlich<sup>1)</sup> hat angegeben, dass ein mehr cyanophiles Verhalten der eosinophilen Granulationen für einen unreifen Zustand spricht, indem die specifisch eosinophile Substanz mit einer paratinctoriellen Masse durchsetzt ist, wodurch das eosinophile Granulum, natürlich aber auch die Micellen der eosinophilen Substanz grösser, ihre Poren weiter geworden sein müssen, sodass dieselben nunmehr für dunklere Farben mit grösserem Molecularvolumen imbibitionsfähig sind, während die reifen, nur aus rein eosinophiler Substanz bestehenden Granula, in Folge ihres dichteren Gefüges, nur für hellere, links-spectrale Farben mit grossem Diffusionsvermögen permeabel sind. Abgesehen davon, dass dieses Verhalten, ebenso wie das entsprechende der Polychromatophilie rother Blutzellen, eben so wohl für einen jugendlich progressiven, wie für einen degenerativ regressiven Zustand (Quellung) sprechen kann, muss betont werden, dass hier unter „Jugendlichkeit“ jedenfalls nur die Jugendlichkeit des einzelnen Granulum, nicht der gesamten Zelle zu denken ist, indem die eben secernirten, bzw. gebildeten Granula einer alten Zelle mit eingebuchtetem Kerne cyanophil, die fertigen Granula einer jungen Zelle aber rein erythrophil sein können. Da sich nun die indulinophilen Granula zu den eosinophilen etwa so erhalten, wie das polychromatophile (basophile, fuchsinophile, erythrophile) Hb zu dem orthochromatischen, orangeophilen, xanthophilen, scheint es vielleicht nicht so ganz absurd, jede Beziehung zwischen der eosinophilen Substanz und dem Hb ganz von der Hand zu erweisen, zumal

<sup>1)</sup> Ehrlich, Farbennalyt. Unters. S. 15, S. 89—91.

die von Ehrlich<sup>1)</sup> angeführten Differenzen keineswegs principieller, sondern nur gradueller Natur zu sein scheinen. Es scheint sich die eosinophile Substanz im Ganzen zum Hb zu verhalten, wie das erythrophile Hb zum xanthophilen, oder die indulinophilen Granula zu den eosinophilen, d. h. eine Art unvollkommenen weniger hoch organisirten Blutfarbstoffs zu sein. Letzteres ist aber natürlich nicht identisch mit dem unreifen, fuchsinophilen Hb, welches immerhin schon Hb ist, während die reifste (xanthophile) eosinophile Substanz höchstens als eine Art „Hämoglobinoid“ zu denken ist. In den lymphoiden, basophilen, granulationslosen Rundzellen haben wir demnach das variabelste, tiefstehendste Element cytogenen Gewebes zu sehen, welches zu grossen monocucleären Leukocyten, zu Riesenzellen, zu eosinophilen Zellen und zu Erythrocyten sich umzuwandeln vermag. Betreffs der Bildung und Entstehung der eosinophilen Zellen würde also zu unterscheiden sein:

1. Heteroplastische Bildung: a) Die Neubildung durch Aufnahme irgend welcher hämoglobinartigen Substanz von aussen seitens granulationsloser Zellen; b) Die Umbildung granulationsloser Zellen durch Production eosinophiler Substanz von innen her, aus sich heraus.

2. Homoplastische Bildung: Die Vermehrung eosinophiler Zellen aus eosinophilen Zellen durch Theilung.

Zu wiederholen ist jedoch, dass alle diese, fast handgreiflichen Uebergänge von Lymphocyten zu Eosinophilen, von Lymphocyten zu Erythrocyten, ja auch von Protokernen zu Metakernen nur beim Embryo zu finden sind, in späteren postembryonalen Stadien aber, bei physiologischer Blutbildung wenigstens, nur scharf geschiedene Arten in die Erscheinung treten.

Für eine Bildung von neutrophilen, feinkörnigen, special-granulirten Megalocyten aus basophilen, lymphoiden Zellen (mononucleären Leukocyten), wie Hirschfeld<sup>2)</sup> mit Ehrlich dieses annimmt, die nicht nur in einer Production von neutrophilen Granula innerhalb des basophilen Plasma bestehen müsste, sondern auch in einer Reifung dieses basophilen Plasmas zu

<sup>1)</sup> Ehrlich, Farbenanalyt. Untersuch. S. 9 u. 10.

<sup>2)</sup> Hirschfeld, d. Arch. CLIII, S. 343, 344.

oxyphilem, wie es doch den neutrophilen Zellen, im Gegensatz zu den, basophiles Intergranularplasma führenden, eosinophilen Zellen, eigenthümlich ist, habe ich bei meinen Färbungen (Alaun-hämatoxylin, welches Special-Granula zerstört, Glycerin-Scharlach, welches nur echte  $\alpha$ -Granula färbt) und bei meinem embryonalen Versuchsthier (Kaninchen, welches keine  $\varepsilon$ -Granula, sondern pseudoeosinophile Specialzellen führt) keine Belege auftreiben können. Meine Befunde sprechen dagegen für die Entstehung der grobkernigen, bei allen Thieren vorhandenen echten  $\alpha$ -Markzellen aus den ebenfalls bei allen Thieren vorhandenen lymphoiden Zellen, ein Nachweis, der Hirschfeld nicht gelungen zu sein scheint. Ob sein Schluss berechtigt ist, dass auch die  $\varepsilon$ -Specialzellen in der oben angedeuteten complicirten Weise aus lymphoiden Zellen entstehen, weil dieses die pseudoeosinophilen feinkörnigen Special-Zellen thun, bleibt abzuwarten.

V. Wir wenden uns jetzt zur Besprechung des Knochenmarkes einer erwachsenen Beutelratte (*Didelphys Virginiana*): Rippe und os marsupiale.

In demselben finden sich Megaloblasten, Normoblasten, basophile Lymphocyten, basophil granulirte Mastzellen, eosinophil granulirte Zellen, und Special-Granulationen. Im Grossen und Ganzen sieht man auch hier, wie es beim alten Thier natürlich ist und in der Regel zu sein scheint, mehr weisse als rothe Zellen. Im einzelnen aber herrschen insofern embryonale Verhältnisse, als deutlich mehr Megaloblasten als Normoblasten, mehr Erythrocyten mit structurirten, als solche mit pyknotischen Kernen vorhanden zu sein scheinen; ferner findet man weit über das gewöhnliche Maass Lymphocyten, und nicht ganz so selten Mitosen, so dass dieses phylogenetisch auf niedriger Stufe stehende Säugethier auch in seiner Blutbildung dieser niedrigen Stufe entsprechende Verhältnisse darbietet.

Dazu kommt, dass auch die Milz, wie eine grosse Zahl kernhaltiger rother Blutkörperchen beweist, bei dem ausgewachsenen Beutelhier erythropoetische Functionen zu erfüllen scheint, da das Blut wenigstens stets frei von kernhaltigen rothen Blutkörperchen war. Insofern verhalten sich gewissermaassen die Beutelhier zu den höher stehenden Säugethieren, wie die

urodelen Amphibien zu den Anuren, nur mit dem Unterschiede, dass bei den Urodelen allein die Milz, bei den Beutelhieren jedoch Milz und Knochenmark erythropoetische Functionen ausüben. Irgend welche morphologischen Unterschiede zwischen den rothen Blutkörperchen der Milz und denen des Knochenmarks bestehen nicht. In der Milz findet man ferner eine recht beträchtliche Zahl eosinophiler Zellen, sowohl rundkerniger, wie polymorphkerniger, sowohl solcher, die den Markzellen, wie solcher, die den Leukocyten entsprechen. Immerhin finden sich hier weniger als im Knochenmark.

Ich fasse nunmehr die Hauptergebnisse unserer Arbeit in folgenden Sätzen zusammen.

I. In jedem Knochenmark finden sich Zellen, die sich morphologisch und tinctoriell völlig wie Lymphocyten verhalten, d. h., ein relativ schmales, besophiles alkalisches, granulationsloses Cytoplasma, und einen relativ grossen, runden Kern mit unregelmässigem Maschenwerk aufweisen. Diese Zellen kommen im Knochenmark als grosse und als kleine Lymphocyten vor; als kleine Lymphocyten in grösserer Menge, als dass sie als eingeschwemmt aus dem Blut gedacht werden können; als grosse Lymphocyten, welche im normalen Blut fehlen, können sie nur antochthon im Knochenmark entstanden sein.

Dass echte Lymphocyten, wie in jedem anderen reticulären Gewebe, auch im Knochenmark gebildet werden, kann nicht Wunder nehmen, falls es sich bestätigt, dass die aus Milz (und Lymphdrüsen) gebildeten Erythrocyten sich morphologisch den aus dem Knochenmark gebildeten völlig homolog verhalten. Dass aber in Milz und Lymphdrüsen, wo nachgewiesenermaassen eine embryonale Erythropoese stattfindet, in überwiegender Zahl basophile, granulationslose Lymphocyten gebildet werden, im Gegensatz zu den granulirten, die das Knochenmark producirt, muss anerkannt werden. Ob die allerersten rothen Blutkörperchen der Embryonen aus Endothelien (Bonnet) oder primären Wanderzellen (Saxer) gebildet werden, ist noch nicht mit Sicherheit entschieden. Jedoch giebt Saxer an, dass seine primären Wanderzellen grosse Aehnlichkeit mit grossen Markzellen aufweisen, und auch Ribbert und Baumgarten heben die grosse Aehnlichkeit der grossen, theilungsreifen Lymphdrüsenzellen der Keimcentren mit Endothelien hervor. Ob und welche Unterschiede zwischen grosskernigen, chromatinarmen, histiogenen und hämatogenen Wanderzellen bestehen, und wie diese fixen Elemente des Gewebes in das Lumen der Gefässe und in die Circulation gelangen, darüber sind die Acten noch nicht geschlossen.

II. In jedem Knochenmark finden sich Zellen, die sich ihrem Plasma nach tinctoriell wie Lymphocyten verhalten, deren Kern aber deutlich flachere oder tiefere Einkerbungen aufweist, oder deren Plasma im Verhältniss zur Kerngrösse relativ breit entwickelt erscheint (mononucleäre Leucocyten, Troje's Markzellen); diese Zellen sind als Entwicklungsstufen der Lymphocyten aufzufassen.

III. In jedem Knochenmark finden sich Zellen, die sich nach der Granulation, nach dem sonstigen tinctoriellen Verhalten, ihres Plasma, und nach der Chromatinarmut ihres Kerns als Markzellen ausweisen, deren Kern aber polymorph und eingebuchtet ist; ebenso lassen sich umgekehrt Zellen finden, die nach der Granulirung u. s. w. ihres Plasma und nach dem Chromatin-Reichtum ihres Kerns als Leukocyten gedeutet werden müssen, deren Kern aber rund und nicht eingebuchtet ist.

IV. In jedem normalen Knochenmark finden sich präformirt Megaloblasten.

V. Im embryonalen Mark kann man auf directe Uebergänge von basophilen Lymphocyten zu Erythrocyten, und zwar von grossen Lymphocyten zu Megaloblasten, von kleinen Lymphocyten zu Normoloblasten schliessen.

Hb-arme, junge Erythrocyten und Lymphocyten lassen sich oft weder an der Kernstructur noch tinctoriell sicher unterscheiden.

VI. Im embryonalen Mark ist ein Entstehen von eosinophilen Zellen aus Lymphocyten durch Uebergangsbilder, d. h. Entstehung von eosinophilen Granula in Lymphocyten, mit Sicherheit zu verfolgen.

VII. Die basophilen, granulationslosen Lymphocyten sind die primitivste Art farbloser Zellen. Dafür kann angeführt werden ihre Granulationslosigkeit, ihr hauptsächliches Vorkommen als rundkernige, schmalleibige Gebilde, ihre Basophilie, ihre Verwandtschaft mit den wandernden, histiogenen Amoebocyten, (Endothelien, Klastocyten Ranvier's), ihre Differencirungsfähigkeit zu Hb-führenden Erythrocyten, ihre Production von eosinophilen Granulis, schliesslich ihr vor anderen Zellarten überwiegendes Vorkommen gerade im embryonalen Mark und dem Mark niedrig im System stehender Thiere.

VIII. Die Cyanophilie der Granulationen ist ebenso, wie die

Polychromatophilie (Fuchsinophilie) der Erythrocyten, ein Ausdruck vom Vorhandensein relativ grosser Platin-Micellen und weiterer intermicellärer Räume, d. h. polychromatophile (fuchsinophile) Erythrocyten sind in ihrem Verhalten zu orangeophilen ebenso zu würdigen, wie z. B. indulinophile Granula zu eosinophilen, bzw. eosinophile Granula zu Hb. Polychromatophilie ist zwar zu meist Begleiterin der Jugendlichkeit der Zelle, aber kein Ausdruck derselben, da sie auch Begleiterin der Degeneration sein kann. Sie findet sich bei präformirter Hb-Armut jugendlicher Zellen und secundärer Hb-Armut ausgelaugter (gequollener) Zellen, und ist uns der färberische Ausdruck dafür, dass eine basophil-cyanophile Grundsubstanz, in die das Hb eingebettet ist, in grösserer Menge als das Hb innerhalb der Erythrocyten vorhanden ist, so dass letzteres wenig, hauptsächlich ersteres sich färbt.

Im Anschluss hieran kann ich nicht unterlassen, meinen Standpunkt zur Frage der Fuchsinophilie rother Blutkörperchen, wenschon vorläufig ohne detaillirte Begründung, an dieser Stelle bereits kurz zu präcisiren, wozu ich einiges aus meinen früheren Arbeiten nochmals hier wiederholen muss. Die Charakteristica junger Blutzellen sind: relativ grosser, structurirter Kern in relativ schmalem, hämoglobinarrem Plasma. Die Charakteristica einer älteren Blutzelle sind relativ kleiner, structurloser, pyknotischer Kern in relativ breitem, hämoglobinreichem Plasma.

Die Charakteristica der Megaloblasten im Gegensatz zu Normoblasten beruhen auf den Unterschieden chromatinarmer Protokerne und chromatinreicher Metakerne.

Die Megaloblasten sind eine weniger entwickelte, primitivere Erythrocytenart, als die Normoblasten. Wenn überhaupt ein Uebergang zwischen beiden stattfindet, so ist nur anzunehmen, dass die Megaloblasten-Art irgendwie allmählich sich zu Normoblasten umwandelt und differencirt, nicht aber, dass ein einzelner Megaloblast zu einem Normoblasten altert.

Ganz von der Hand zu weisen ist Rindfleisch's ältere Anschauung, wonach die Normoblasten zu Megaloblasten auswachsen. Die aus einem jungen Normoblasten entstehenden grösseren Zellen mit breitem, hämoglobinreichem Plasmaum und kleinem pyknotischem Kern sind eben alte Normoblasten,

aber trotz ihrer Grösse keine Megaloblasten. Um nun die Nomenclatur des Autors der Lehre von der Fuchsinophilie auf unsere Verhältnisse anzuwenden, so sind seine orangeophilen Metrocyten unsere alten Megaloblasten, die orangeophilen Entwicklungsformen Neumann's unsere alten Normoblasten, seine fuchsinophilen Megaloblasten unsere jungen Megaloblasten, seine fuchsinophilen Normoblasten unsere jungen Normoblasten. Wir erkennen nicht an, dass die polychromatischen Zellen als besondere Art den orthochromatischen gegenüberstehen. Die „pathologischen“ rothen Blutkörperchen sind keine anderen, als die embryonalen. Wir behaupten, dass es bei Megaloblasten, wie auch bei Normoblasten polychromatische (fuchsinophile) und orthochromatische (orangeophile) Zellen giebt, und sehen in der Polychromatophilie einen Ausdruck der Hb-Armut, des Mangels an oxyphiler Substanz, welche meist mit der Jugendlichkeit der Zelle, öfters allerdings auch mit secundärer Degeneration zusammenfällt, wie Erhitzungs- und Auslaugungsversuche (Latschenberger) beweisen, mittels der man fuchsinophile Zellen in orangeophile, und umgekehrt wieder orthochromatische in polychromatophile umwandeln kann. Nach unseren früheren, auf der allgemeinen Zellanatomie, d. h. den Kerncharakteren beruhenden Deductionen können wir demnach nicht zugeben, in der Fuchsinophilie des Plasma im Gegensatz zur Orangeophilie ein Art-Merkmal zu erblicken. Wir können nicht zugeben, dass die fuchsinophilen Normoblasten mit grossem Kern und schmalen Zelleib zu fuchsinophilen Megaloblasten ebenfalls mit grossem Kern und schmalen Zelleib auswachsen, auch nicht, dass die orangeophilen Entwicklungsformen Neumann's mit kleinem Kern und breitem Zelleib zu orangeophilen Metrocyten mit kleinem Kern und noch breiterem Zelleib auswachsen, sondern wir behaupten, dass sich die fuchsinophilen Normoblasten zu Neumann's orangeophilen Entwicklungsformen, d. h. alten Normoblasten, die fuchsinophilen Megaloblasten zu orangeophilen Metrocyten = alten Megaloblasten entwickeln<sup>1)</sup>. Ueber die sich hieraus ergebenden Consequenzen soll später noch berichtet werden.

<sup>1)</sup> Anmerkung: Dieser aus dem Nebeneinander innerhalb eines Knochenmark-Präparates construirte genetische Connex könnte als Missdeutung erscheinen, wenn man die von anderen Untersuchungen betonten That-

Zum Schlusse möchte ich noch kurz an dieser Stelle über einige Ergebnisse berichten, die zwar mit dem Gefüge der gesamten Arbeit in keinem engeren Zusammenhange stehen, die aber einiges Interesse erheischen dürften. Es handelt sich um einige Befunde, die ich im Knochenmark des Eichhörnchens, des Maulwurfs und der Fledermaus gewonnen habe.

1. Eichhörnchen (*Sciurus*). Es wurde nur deshalb untersucht, um festzustellen, ob sein Hämoglobin, welches im Gegensatz zu dem anderer Thiere hexagonal und nicht rhombisch krystallisirt, sich tinctoriell irgend-

sachen im Nacheinander der verschiedenen Blutbildungsperioden in Betracht zieht. Alle jene Forscher, soweit sie darin einig sind, dass zuerst beim Embryo vorwiegend Megaloblasten, später aber Normoblasten gebildet werden, beschreiben bei ihrer Untersuchung ihre Normoblasten und Megaloblasten nur als Zellen mit breitem, Hb-reichem Cytoplasma und relativ kleinem, bei Megaloblasten noch einigermaassen deutlich structurirtem, bei Normoblasten aber structurlosem pyknotischem Kern. Daraus wurde einmal fälschlich gefolgert, dass die Megaloblasten die directe Vorstufe der Normoblasten seien, zweitens, dass die ersten, jüngsten, embryonalen Blutzellen so aussähen, wie wir grade unsere älteren Zellen schildern. Die erste Folgerung ist entschuldbar, wenn wir auf unsere früheren Blutzellstudien zurückweisen, in welchen ausgeführt und gezeigt wurde, wie den rothen Blutzellen eine immanente, gewissermaassen prädestinirte Tendenz zur Reifung innewohnt, deren Culminationspunkt in der Blutscheibe erreicht ist, und in Verkleinerung, Verdichtung und Nucleinzunahme des Kernes, in Verkleinerung, Protoplasma-Abnahme und Hb-Zunahme des Zelleibs besteht; wie ferner die phylogenetisch höhere Art der Normoblasten als solche gemäss dem biogenetischen Grundgesetz die früheren Alterungsphasen der Megaloblasten wiederholt und überholt, umgekehrt aber die höchst mögliche Reifung in den alten Megaloblasten ihrer Anlage nach wohl erstrebt, aber nicht erreicht wird, sondern der Entwicklungsprozess noch eher als bei den Normoblasten Halt macht. Demnach haben zwar selbst die alten Megaloblasten stets etwas Unreifes, Jugendliches, sind aber doch schon alte Zellen, und junge Normoblasten haben trotz der Jugendmerkmale einen im Ganzen reiferen Charakter als Megaloblasten. Wie sich der alte Megaloblast zum jungen Megaloblast verhält, so verhält sich die Art der Normoblasten zur Art der Megaloblasten. Ähnlich verhalten sich Markzellen und Leukocyten. In Bezug auf die zweite Folgerung muss bemerkt werden, dass sich allerdings in den verschiedenen Epochen überwiegend nur die oben von den Untersuchern angegebenen Zellen in der Blutbahn finden, die wir als alte pyknotische bezeichnen; aber dies ist eine Thatsache, die eigentlich gar nichts Merkwürdiges hat und sich überall auch sonst später wiederholt. Wir



wie besonders verhält. Ein Unterschied konnte nicht gefunden werden<sup>1)</sup>. Die Elemente des Knochenmarks dieses Thieres sind besonders gross. Es fanden sich sehr viele, schön entwickelte Riesenzellen.

2. Maulwurf (Talpa). Sehr dunkelrothes, fast milzfarbened Knochenmark; dem entsprechend war die rothe Musculatur äusserst dunkelroth. Die specifischen Knochenmarkzellen erscheinen auch bei Triacid und Glycerin-Gemisch ungranulirt, bei anderen Färbungen schwach basophil. Im grossen und ganzen ähnlich wie Milzpulpa-Zellen. Jedoch ist nicht ausgeschlossen, dass sich auch bei ihnen, wie bei den Special-Granulationen der Maus durch besondere Methoden Granula nachweisen lassen (vgl. Dr. Franz Müller bei Ehrlich, Anämie S. 84). Am charakteristischsten beim Maulwurfs-Knochenmark erscheint es, dass dasselbe einen ganz hervorragenden Reichtum an eosinophilen Zellen besitzt, welche im Triacid stets S. Fuchsin + Orange aufnehmen. Sie weichen von den bisher bei Thieren bekannten eosinophilen Zellen des Knochenmarkes insofern ab, als sie zwar einkernig sind, aber einen sehr kleinen, central gelegenen, kreisrunden fast pyknotischen, sich sehr dunkel färbenden Kern besitzen. Sie sehen aus wie granulirte pyknotische Normoblasten.

3. Fledermaus (Vespertilio). Hier reicht<sup>2)</sup> an den langen Röhrenknochen das rothe Knochenmark nur so weit, wie der Ansatz der Musculatur. Auch hier habe ich über die specifischen Knochenmarkzellen noch keine abschliessenden Ergebnisse erhalten. Es finden sich sehr viele kleine und grosse Lymphocyten, und besonders finden sich bei diesem Thier äusserst demonstrative Uebergänge von gigantisch grossen Lymphocyten zu ächten Riesenzellen.

Herrn Geh.-Rath Eberth zu Halle a. S., in dessen Institut diese Arbeit im Herbst 1897 begonnen wurde, sowie Herrn Geh.-Rath E. Neumann hier, der die Güte hatte, meine Präparate

finden z. B. stets die alten Leukocyten im normalen Blut, während die Jugendformen im Knochenmark bleiben und bei einfachen Anämieen treten fast stets nur pyknotische rothe Zellen über. Wie die jungen Normoblasten späterer embryonaler Epochen in Milz und Knochenmark zu suchen sind, so sind entsprechend die allerersten, grosskernigen und schmalrandigen Megaloblasten, welche meist auch polychromatophil und fuchsinophil sind, als fixe, sessile Zellen in den Brutorganen der Lymphdrüsen, in den primären Wanderzellen der Gewebe, in den Gefäss-Endothelien der Blutinseln zu suchen. Ausserdem sind doch auch nur die Mehrzahl der circulirenden Blutzellen pyknotisch; es finden sich bei sorgfältigem Zusehen stets auch jugendliche Zellen im Blut. Wir müssen also diesen unsern Standpunkt in allen Einzelheiten aufrecht erhalten.

<sup>1)</sup> Auch bei CO-Hb ist solches nicht der Fall.

<sup>2)</sup> Ebenso wie bei der Wüstenspringmaus (Dipus).

zu besichtigen, möchte ich auch an dieser Stelle meinen ergebensten Dank aussprechen.

### Erklärung der Tafel-Bezeichnungen:

Die Figuren sind mit Zeiss's Zeichenapparat unter Achromat  $\frac{1}{12}$  homogen, Ocular II (Zeiss) entworfen.

Gruppe B sind Zellen der Beutelratte. Alle anderen entstammen dem embryonalen Kaninchen der IV. Trächtigkeitswoche.

#### Färbung:

a—e Hämatoxylin, Rhodamin + Scharlach,

A, B Scharlach, Methylgrün + Pyronin,

M Methyleneblau, Triacid.

Es bedeuten:

- |          |   |                             |   |                |
|----------|---|-----------------------------|---|----------------|
| a        | = | Grössere                    | } | Megaloblasten. |
| $\alpha$ | = | Kleinere                    |   |                |
| b        | = | Grössere                    | } | Normoblasten.  |
| $\beta$  | = | Kleinere                    |   |                |
| c        | = | Grosse Lymphocyten.         |   |                |
| c'       | = | Kleine Lymphocyten.         |   |                |
| d        | = | Eosinophile Myelocyten.     |   |                |
| $\delta$ | = | Eosinophile Leukocyten.     |   |                |
| l        | = | Junge Zellform.             |   |                |
| 2—4      | = | Aeltere Entwicklungsstufen. |   |                |
| a, c     | = | Mitosen von a oder c.       |   |                |
| b        | = | Mitosen von d.              |   |                |
-