

IX.**Ueber Granula in Lymphocyten.**

(Aus dem städtischen Krankenhaus Gitschnerstrasse 104-5. Dirig. Arzt
Prof. M. Litten.)

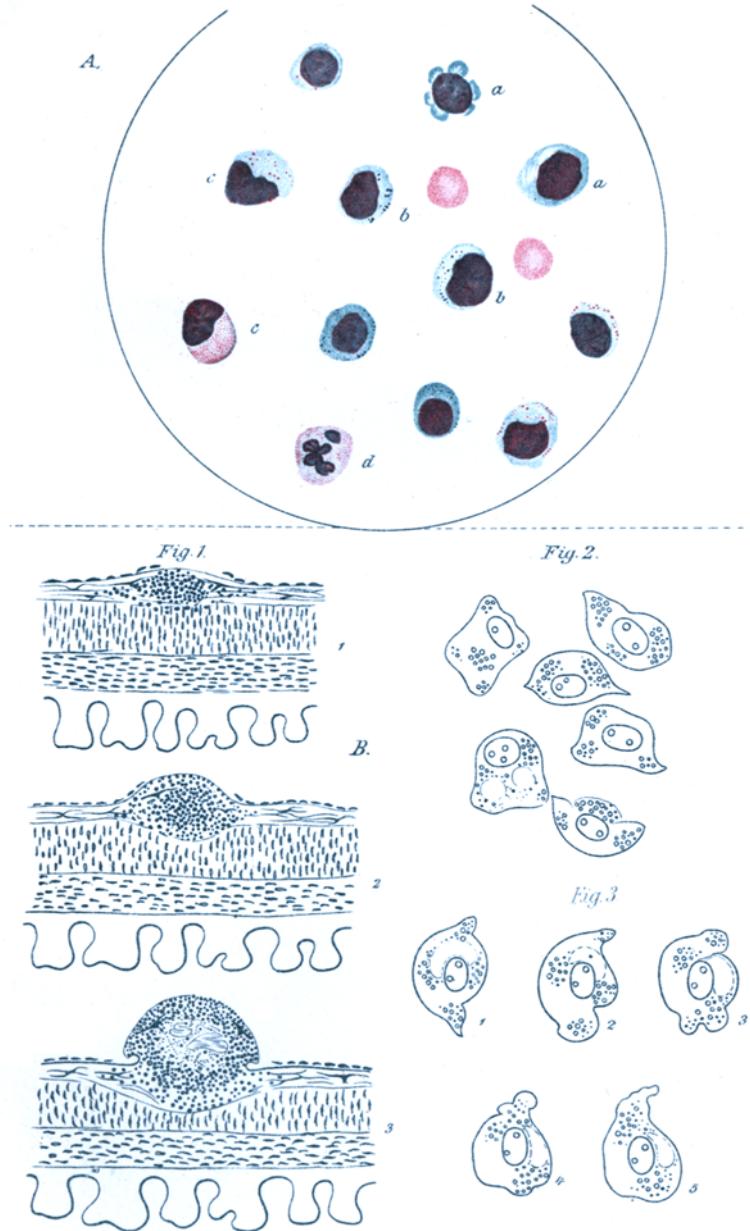
Von

Dr. Leonor Michaelis und Dr. Alfred Wolff.

(Hierzu Taf. IV A.)

Unter den Eintheilungs-Principien der Leukocyten erscheint uns heute als das höchst zu bewerthende dasjenige, welches die weissen Blutzellen nach ihren Granulationen unterscheidet. Die beiden Hauptgruppen der Leukocyten sind seit Ehrlich nach diesem Princip geordnet, granulirte und ungranulirte Leukocyten werden streng geschieden. Diese Eintheilung hat so festen Fuss gefasst, dass z. B. Pappenheim, der unter Anderem die Entwicklung von granulirten Zellen aus ungranulirten auch beim Erwachsenen als möglich hinstellt, doch die Bezeichnung „Granulocyten“ gewählt hat, um die neutrophil, eosinophil und basophil gekörnten myeloiden Zellen von den Granula-freien „Lymphocyten“ (deren Ursprungsstätte er übrigens zum Theil auch in das Knochenmark verlegt), zu unterscheiden.

Nicht immer hat Ehrlich die Ansicht vertreten, dass die Lymphocyten Granula-frei seien. In der ersten Zeit, als durch seine Untersuchungen die Lehre von den Granula sich entwickelte, schrieb er dem Protoplasma der Lymphocyten eine besondere Art von Granulation zu, die er als δ -Granula bezeichnete. Sie sollten basophil sein und sich von den Mastzellen-Körnchen hauptsächlich durch den Mangel an Metachromasie unterscheiden. Sie würden sich also z. B. mit Thionin blau färben, während sich Mastzellen-Granula roth färben. Später jedoch hat Ehrlich sich mit Recht dahin entschieden, diese Structur der Lymphocyten nicht auf eine Stufe zu stellen mit den anderen Granulationen, weil es sich mehr um eine Netz-artige Structur des Protoplasma mit knotigen Verdickungen, als um distincke, in das Protoplasma eingelagerte Körnchen



handelt¹⁾). Eine andere Art von Körnchen ist seitdem in Lymphocyten nicht beschrieben worden, weil die bis heute üblichen Methoden den Zellleib der Lymphocyten nicht weiter differenzieren. Das Protoplasma der Lymphocyten ist basophil, und alle Methoden haben das gemein, dass sie innerhalb der Basophilie feinere Unterschiede nicht mehr machen, es sei denn, dass eine Metachromasie auftritt. Eine Ausnahme hiervon machen nur die Combinationen eines hellen und eines dunklen basischen Farbstoffes, am besten die Pappenheim'sche Methylgrün-Pyronin-Mischung, welche Kern und Protoplasma verschieden färbt. Aber innerhalb des Protoplasma differenzirt auch diese Methode Nichts.

Ganz einzig steht aber in dieser Beziehung die Romanowski'sche Methylenblau-Eosin-Färbung²⁾ da.

Ursprünglich für das Studium der Malaria-Parasiten bestimmt, ist diese Methode zum Studium der Structur der Blutzellen bisher wenig angewandt worden, obwohl bereits Ziemann³⁾ auf ihre Verwerthbarkeit in dieser Beziehung hingewiesen hatte. Das lässt sich zum Theil daraus erklären, dass es mehr oder weniger vom Zufall abhängig war, dass die gewünschte Reaction gelang. Neuerdings sind nun die Mittel gefunden worden, die Sicherheit der Methode zu erhöhen.

Bei einer äusserst mühevollen Untersuchung kam Ziemann zu dem Resultat, dass das Alter, die Sorte der Methylenblaulösung, das Mengen-Verhältniss zum Eosin einige Factoren zum Zustandekommen der richtigen Reaction seien, aber durch Nocht⁴⁾

¹⁾ Aehnlich ist es mit den Körnchen der Unna'schen Plasmazellen gegangen. Auch hier bestehen die Körnelungen nicht aus Einlagerungen des Protoplasma, sondern sie sind der Ausdruck einer ungleichmässigen Structur des Protoplasma selbst (Marschalko). Vgl. dazu Pappenheim: „Wie verhalten sich die Unna'schen Plasmazellen zu Lymphocyten?“ I. Theil, dieses Archiv, 1901, S. 379ff.

²⁾ Romanowski, Zur Frage der Parasitologie und Therapie der Malaria. Deutsch von P. Werner. Petersburg 1891.

³⁾ H. Ziemann, Ueber Malaria- und andere Blut- Parasiten, nebst Anhang; Eine wirksame Methode der Chromatin- und Blutfärbung. 1898.

⁴⁾ Nocht, Zur Färbung der Malaria-Parasiten, Centralbl. f. Bakt. 1898 Bd. XXIV, S. 839; 1899 Bd. XXV, S. 17 und 764.

wurde die Methode erst wirklich brauchbar, indem er nachwies, dass der erwünschte Ausfall der Färbung an das Vorhandensein eines Zersetzung-Productes des Methylenblau gebunden sei, desselben, welches Unna als den wesentlichen Factor seines „polychromen Methylenblau“ erkannt hat. Nocht nennt es im Anschluss an die Unna'schen Untersuchungen „Roth aus Methylenblau“. Der eine von uns¹⁾ identificirte diesen Farbstoff mit dem von Bernthsen gefundenen Methylen-Azur. Dieser Farbstoff entsteht immer, wenn Methylenblau-Lösungen, besonders bei Gegenwart eines Alkali, längere Zeit aufbewahrt werden, neben anderen Veränderungs-Producten.

Zur Anwendung dieser Methode hält man sich am besten 2 Farblösungen vorrätig: 1. eine derartige, Methylen-Azur enthaltende 1 procentige Methylenblau-Lösung. Man stellt sie her, indem man 200 ccm einer 1 proc. Methylenblau-Lösung mit 10 ccm $\frac{1}{10}$ normal Natron-Lauge $\frac{1}{4}$ Stunde lang kocht und nach dem Erkalten mit genau 10 ccm $\frac{1}{10}$ normal Schwefel-Säure wieder neutralisiert²⁾; 2. eine wässrige Eosin-Lösung 1:1000.

Unmittelbar vor dem Gebrauche mische man 2 ccm Azurblau-Lösung mit 10 ccm Eosin-Lösung, giesse diese Farbflüssigkeit zur besseren Durchmischung mehrere Male zwischen zwei Gläsern um. Diese Lösung wird, ohne Rücksicht auf den entstehenden Niederschlag, zur Färbung benutzt. Um nach Möglichkeit zu vermeiden, dass Niederschläge auf das Deckglas fallen, färbe man in einem Schälchen mit concavem Boden, die bestrichene Seite des Deckgläschens nach unten. Die Färbedauer beträgt $\frac{1}{2}$ Stunde. Nach der Färbung spüle man das Präparat mit einem sehr kräftigen Wasserstrahl ab und trockne es. Am geeignetsten sind Präparate, die etwa 1 Stunde mit Alcohol absolut fixirt sind.

Reuter³⁾ hat neuerdings den aus rothstichigem Methylenblau und Eosin entstehenden Niederschlag, (der also nach unserer Auffassung im Wesentlichen eosinsaures Methylen-Azur ist), als

¹⁾ L. Michaelis, Das Methylenblau und seine Zersetzung-Producte. Centralbl. f. Bakt. 1901. Bd. XXIX, S. 763.

²⁾ Diese Lösung ist unter dem Namen „Azurblau“ bei Grübner in Leipzig und bei E. Leitz in Berlin zu beziehen.

³⁾ Centralbl. f. Bakt etc., Bd. XXX, No. 6.

solchen hergestellt und verwendet eine Lösung desselben direct zur Färbung. Ob man es nun so oder so macht, scheint am Resultat nichts zu ändern.

Diese Methode hat sich nun nicht nur zur Erforschung der Malaria-Parasiten, sondern auch in vielen anderen Beziehungen als äusserst werthvoll erwiesen. Ziemann war der erste, der auf die mannigfache Verwendbarkeit der Methode hinwies. Sie stellt z. B. in den Bakterien-Leibern eine feinere Structur dar¹⁾, deren Echtheit um so sicherer verbürgt ist, als dieselbe Structur zum Theil durch ganz unabhängige Methoden (vitale Färbung und M. Neisser'sche Methylenblau - Bismarckbraun - Färbung) zum Ausdruck kommt.

Auch für Blut-Präparate, abgesehen von Malaria-Parasiten ist die Methode schon angewandt worden, vor allem von Ziemann.

Ein normales Blut-Präparat bietet bei dieser Färbung folgendes Bild. Die rothen Blutkörperchen sind roth, ebenso die eosinophilen Granula. Die neutrophilen Granula sind rothviolett, in reifen multinucleären Zellen nicht immer vollständig gefärbt, mit grosser Sicherheit gelingt dagegen die Färbung immer an den unreifen, neutrophilen Körnchen der Myelocyten des Knochenmarks. Die Mastzellen-Granula färben sich, soweit sie nicht durch Wasser gelöst werden²⁾, intensiv rothviolett.

Auch die Kerne nehmen, wenn die Zellen gut ausgebreitet sind, eine leuchtend rothviolette Farbe an. Je weniger die Zellen ausgebreitet sind, um so mehr nähert sich der Farbenton dem Blau. Im Allgemeinen werden die Lymphocyt-Kerne mehr roth, als die Kerne der multinucleären Leukocyten, welche einen mehr blauen Farbenton annehmen. Ist aber einmal eine multinucleäre Zelle zerquetscht und ihr Kern plattgedrückt, so ist dieser ebenso roth, wie ein Lymphocytenkern. Ist dagegen umgekehrt an einer dickeren Stelle des Präparats ein Lymphocyt nicht ausgebreitet, sondern kugelig contrahirt, wie im frischen Präparat, so nähert sich die Farbe seines Kernes dem Blau.

¹⁾ Ziemann a. a. O. Zetnow, Zeitschr. f. Hyg. und Infectionskr. Bd. XXX, S. 1. Feinberg, Centralbl. f. Bakt. etc. 1900, Bd. XXVII S. 417.

²⁾ Vgl. L. Michaelis, Untersuchungen über Mastzellen. Münchener med. Wochenschrift, 1902 (im Druck).

Die Blutplättchen werden mit grosser Deutlichkeit ebenfalls roth gefärbt. Sie zeigen eine feinkörnige Structur, wie mit keiner anderen Methode¹⁾

Ein Fehler der Methode ist, dass man Farbniederschläge nicht immer mit Sicherheit ganz vermeiden kann. Doch ist es leicht, diese zu erkennen. Sie sind amorph und diffus über ganze Stellen des Präparates verbreitet, wenn sie sich auch mit Vorliebe in der Nähe der Zellen zu bilden pflegen. Prinzipiell dürfen zur Aufklärung von Structur-Verhältnissen nur Niederschlags-freie Präparate verwandt werden.

Jeder ausgebreitete Lymphocyt zeigt um den rothvioletten Kern einen zart himmelblau gefärbten Protoplasma-Leib. In diesem findet man nun violette Körnchen, welche man mit anderen Methoden nicht zur Darstellung bringen kann. Sie sind nicht in allen Lymphocyten zu sehen, sondern nur etwa in jedem dritten. Besonders findet man sie selten dann, wenn der Lymphocyt einen extrem schmalen, kaum sichtbaren Protoplasma-Saum hat. Die Grösse des Körnchens schwankt zwischen der Grösse der neutrophilen und der eosinophilen Körnchen; ihre Form ist bei grösseren Exemplaren nicht immer genau kugelig. Die Anzahl der Körnchen in einer Zelle schwankt zwischen ganz vereinzelten Exemplaren bis zu demjenigen Bilde, wie es z. B. die neutrophilen Granula in einer multinucleären Zelle bieten. Am häufigsten ist eine mässig zahlreiche, noch gutzählbare Menge.

Ausser in den typischen Lymphocyten finden sich die Körnchen in gleicher Weise in den „grossen uninucleären Leukocyten“ und in den „Übergangsformen“ Ehrlich's. In diesen werden sie jedoch bei anderen Exemplaren auch vermisst.

Es fragt sich nun, ob diese Körnchen prinzipiell von den neutrophilen Granulationen verschieden sind. Die neutrophilen Granula färben sich bei der Methode um so sicherer, je jünger sie sind. Es könnte sich also sehr wohl um noch spärlich entwickelte, neutrophile Granula handeln. Schon Ehrlich hat beobachtet, dass in seinen „Uebergangszellen“ spärliche neutro-

¹⁾ Argutinsky (Anatom. Anzeiger 1901) will sogar Kern und Protoplasma in Blutplättchen differenzirt haben.

phile Granulationen vorkommen. Jedoch scheint der Umstand, dass z. B. Triacid die Granula nicht darstellt, sehr dafür zu sprechen, dass sie doch nicht einfach den neutrophilen Körnchen gleich zu setzen sind.

Lassen sich nun diese Körnchen zur Differentialdiagnose von Unterarten der Leukocyten verwerten, deren Trennung bisher nicht möglich ist? Vor allem kommt da die sichere Unterscheidung von Lymphocyten und der grossen uniucleären Zellen in Betracht. Aber da die Granula in diesen beiden Zellarten sowohl vorkommen als auch fehlen können, so ergiebt sich schon, dass sie für diese Unterscheidung nicht verwerthbar sind. Ihr Werth liegt in etwas ganz Anderem.

Entweder sind die granulafreien und die granulahaltigen Lymphocyten verschiedenen Alters, also Umbildungsformen derselben Zellart, oder sie sind prinzipiell verschieden. Die letzte Ansicht ist deshalb unhaltbar, weil die Anzahl der Granula so stark variiert, und man ungezwungen alle Uebergänge von völlig homogenen bis zu stark granulirten Zellen constatiren kann. Wenn aber unzweifelhafte Lymphocyten Granula besitzen können, so verliert damit das Moment der Körnelung seinen Werth als Scheidungsmerkmal der beiden Hauptgruppen der farblosen Blutzellen. Wenn ausserdem Lymphocyten und grosse uninucleäre Zellen auch in dieser Beziehung sich gleich verhalten, so verwischt dies bei dem Werth, den man der specifischen Granulation zuschreibt, die Grenze dieser beiden Zellformen.

Zunächst könnte man geneigt sein, eine gerade entgegengesetzte Deutung zu geben. Ehrlich und Lazarus¹⁾ definiren die Lymphocyten als „kleine . . . Zellen, deren Leib von einem grossen, runden, homogen gefärbten, concentrisch gelagerten²⁾ Kern eingenommen ist, während das Protoplasma als ein schmaler Saum den Kern concentrisch umschliesst“.

. . . „ 2. „Streng von den Lymphocyten zu unterscheiden ist die zweite Gruppe: „die grossen uninucleären Leukocyten. Es sind dies voluminöse Zellen von der etwa 2—3 fachen Grösse der Erythrocyten, die einen grossen, ovalen, meist excentrisch

¹⁾ Ehrlich und Lazarus, Die Anämie.

²⁾ Die Sperrung findet sich nicht im Original. 1901.

gelagerten und schwach färbbaren Kern, dabei ein relativ mächtiges Protoplasma besitzen. Letzteres ist frei von Granulationen“.

Trotz dieser präzisen Definitionen wird niemand die Schwierigkeiten erkennen, die Lymphocyten in jedem einzelnen Fall von den grossen uninucleären Zellen zu unterscheiden. Da nun, wie wir von den grossen uninucleären Zellen angaben, die Körnchen in einem Theil der lymphocytären Zellen fehlen, so könnte man meinen, dass die Körnchen das lange gesuchte Unterscheidungsmittel dieser beiden Zellformen seien, dass also die ungekörnten als Lymphocyten, die gekörnten als grosse uninucleäre Zellen anzusehen seien. Da man aber dem morphologischen Bilde der Lymphocyten völlig entsprechende Zellen mit Körnelung findet und sichere grosse uninucleäre ohne Körnelung, würde man sich in einen Widerspruch zu der Ehrlichen'schen Definition setzen, wenn man einerseits nur die granulirten, andererseits nur die ungranulirten Zellen als zusammengehöriginstellen wollte. Auch die Körnelung ist nicht im Stande, den Gegensatz, den Ehrlich zwischen Lymphocyten und grossen uninucleären Zellen macht, zu bestätigen.

Wie häufig man in absolut zweifellosen Lymphocyten die Körnelung findet, zeigt z. B. folgende Zählung. Unter 50 gezählten lymphocytären Zellen (Lymphocyten, grosse uninucleäre) eines gesunden Mannes wählten wir 32 aus, welche in strengster Weise die morphologischen Merkmale der Lymphocyten darboten, also eine im Verhältniss zur Gesamtmenge von 50 gewiss niedrig bemessene Zahl. Von diesen 32 sicheren Lymphocyten zeigten 13 mit voller Bestimmtheit Granula, während in 19 keine Granula erkannt werden konnten.

Von ganz anderen Gesichtspunkten aus ist Pappenheim¹⁾ zu dem gleichen Schluss gekommen, dass Lymphocyten und grosse uninucleäre Zellen von einander nicht zu trennen seien.

Es musste von Interesse sein, die Lymphocyten in den Lymphdrüsen auf ihren Granula-Gehalt zu prüfen. Auf Abstrich-Präparaten von Lymphdrüsen machten wir dabei die Beob-

¹⁾ A. Pappenheim, Von den gegenseitigen Beziehungen der verschiedenen farblosen Blutzellen zu einander. Dieses Archiv Bd. 159, 160.

achtung, dass diese Granula in den Zellen der Lymphdrüsen nicht vorkommen. Man findet hier folgende Zellformen:

1. Zahlreiche scheinbar ganz protoplasmafreie, grosse, runde Kerne. Es ist mit keiner Methode, auch nicht mit Methylgrün-Pyronin, ein merklicher Protoplasma-Leib nachzuweisen.

2. Zellen mit derselben Kernform mit blaugefärbtem Protoplasma-Leib, und zwar vom schmalsten Saum bis zum denkbar breitesten Leib, vom centrischen bis zum völlig excentrischen Kern. In den protoplasmareichen Zellen finden sich manchmal offenbar durch Phagocytose aufgenommene Einschlüsse von rothen Blutkörperchen und Kernresten anderer Zellen¹⁾.

In allen diesen Zellen fehlen die Körnchen. Daraus können wir entweder den Schluss ziehen, dass die Lymphocyten des Blutes zwar aus den Lymphdrüsen stammen, ihre Körnchen aber erst im Blut erhalten als Alters- und Secretions-Erscheinungen; oder, dass die Lymphocyten des Blutes wenigstens zum Theil nicht aus den Lymphdrüsen stammen. Letztere Möglichkeit steht in guter Uebereinstimmung mit dem Befunde von Lymphocyten im normalen Knochenmark, den Waltz, Pappenheim und Naegeli zuerst richtig gewürdigt haben. Dagegen ist es nicht angängig, zwei nicht ineinander übergehende Sorten von Lymphocyten anzunehmen, granulirte und ungranulirte, weil alle Uebergänge zwischen beiden vorhanden sind.

Alle diese Darlegungen sind auf dem einen, nur mit der einen Methode erhaltenen Befunde basirt. Obgleich die Körnchen nun von vorne herein durchaus nicht den Eindruck von Farb-Niederschlägen machten, verliessen wir uns doch nicht allein auf diesen Eindruck, sondern haben uns erst nach langer, reiflicher Ueberlegung dazu entschlossen, die Körnchen mit Bestimmtheit als präformirt zu betrachten. Wir fassen die Gründe noch einmal zusammen:

1. Die Granula finden sich in völlig Niederschlags-freien Präparaten und finden sich dort nur innerhalb des Protoplasma der Lymphocyten.

¹⁾ Das ist ein unzweifelhafter Beweis für die Contractilität der Lymphdrüsenzellen, wenn auch die Locomobilität damit noch nicht bewiesen ist.

2. Die Granula wurden constant in Abstrich-Präparaten von Lymphdrüsen (Tonsillen und Submaxillar-Drüsen) bei ganz gleicher Methodik vermisst und in zahlreichen Präparaten zweier Fälle von lymphatischer Leukämie ausserordentlich spärlich ange troffen.

3. Einen sicheren Beweis stellt folgende Versuchs-Anordnung dar. Wenn man chemisch reines Methylenazur und Eosin, (letzteres zur völligen Ausnutzung des werthvollen chemisch reinen Methylenazur in geringem Ueberschuss), in wässriger Lösung zusammenbringt, erhält man nach 24 Stunden einen Niederschlag von eosinsaurem Methylenazur, der sich durch Decantieren oder auf dem Filter durch Waschen mit Wasser leicht reinigen lässt. Dieser Niederschlag lässt sich in warmem Wasser in geringer, doch zur Färbung genügender Menge lösen. Die Lösung färbt genau in derselben Weise, wie die angegebene modifizierte Romanowski'sche Methode, nur entstehen hier niemals Niederschläge. Auch bei dieser Färbung zeigen sich die Körnchen in der beschriebenen Weise, können also nicht als Niederschläge aufgefasst werden.

Zusammenfassung:

1. Bei Anwendung der Romanowski'schen Methode (Modification vergleiche Text) gelingt es, in sonst Körnchen-frei erscheinenden farblosen Blutzellen Körnchen nachzuweisen.

2. Die Körnchen finden sich in den Lymphocyten, Ehrlich's grossen uninucleären Leukocyten und Uebergangsformen.

3. Die Körnchen finden sich nur in einem Theil dieser Zellen.

4. Ebenso wie die morphologischen Merkmale nicht ausreichen, die von Ehrlich principiell geschiedenen Gruppen der Lymphocyten und grossen uninucleären Zellen immer streng auseinander zu halten, ebenso wenig erweist sich die Körnung als ein differential-diagnostisches Merkmal.

5. Durch diesen Befund wird die ohnehin schwankende Grenze zwischen diesen beiden Zellformen noch mehr verwischt. Es liegt kein Grund vor, die einander morphologisch ähnlichen und mit gleicher Granulation versehenen Zellen noch weiterhin principiell zu trennen.

Wir waren in der Lage, diese Arbeit im Manuscript Herrn Geheimrath Ehrlich nebst Präparaten zu übersenden. Es dürfte von allgemeinem Interesse sein, welche Stellung Herr Geheimrath Ehrlich zur Frage der Lymphocyten-Granula einnimmt:

„Ich bin nach längerer Ueberlegung zu der Anschauung gelangt, dass die Lymphocyten-Körnchen nicht mit den specifischen Granulationen der multinucleären Zellen ohne Weiteres analogisirt werden können. Schon Ihre eigenen Feststellungen und Beobachtungen sprechen meiner Ansicht nach dagegen. Das Fehlen in den Lymphdrüsen, das auf einen Theil der Lymphocyten beschränkte Vorkommen, das unregelmässige, oft nur sehr spärliche Vorkommen selbst in den positiven Fällen stehen mit dem, was wir von neutrophilen, eosinophilen, Mastzellen-Körnchen und ihren Analogen bei den verschiedenen Thierspecies wissen, in einem grossen Gegensatz, so dass ich mich doch sehr reservirt aussprechen würde. Ich vermuthe, dass Ihnen selbst wohl ähnliche Bedenken aufgestossen sind.“

Gegenüber der Regelmässigkeit der ächten Granula machen diese Lymphocyten-Granula — ich möchte sagen: einen zufälligen Eindruck. Wenn ich aus der Blut-Histologie ein Analogon suchen will, so möchte ich diese in den neuerdings von Levaditi eingehender untersuchten oxyphilen Körnchen der Mastzellen sehen, die ebenfalls einen solchen irregulären Charakter aufweisen, — bald ganz in den Zellen fehlen, bald mehr spärlich, bald auch wieder reichlicher vorhanden sein können. Mit der specifischen Mastzellen-Körnung hat diese Nebenkörnung nichts zu thun, wie ich glaube. Was re vera vorliegt, ist natürlich schwer zu sagen; ob Alter-Erscheinungen, Degenerations-Vorgänge (wie z. B. in den gekörnten Erythrocyten) oder Anhäufung mehr nebенäslicher Stoffwechsel-Producte, kann ich nicht entscheiden, und würde das auch noch mancher Arbeit bedürfen.“

Erklärung der Abbildungen auf Tafel IV A.

Färbung nach Romanowski. Normales Blut vom Menschen.

- a) Lymphocyten ohne Körnchen; b) Lymphocyten mit Körnchen;
 - c) „Uebergangszelle“ Ehrlichs; d) multinucleäre, neutrophile Zelle.
-