

**XXIV.****Das Verhalten der Leukocyten bei der vitalen Blutfärbung.**

(Aus der Kgl. Universitätspoliklinik und III. Medizinischen Klinik der Charité zu Berlin.)

Von

Prof. Dr. Rosin, ehemaligem Assistenten

und

Dr. Eugen Bibergeil, Volontärassistenten der Klinik.

(Hierzu Tafel XVI.)

In einer vorläufigen Mitteilung hatten wir vor einiger Zeit (Deutsche Medizin. Wochenschrift Nr. 3 und 4, 1902) auf eine Methode hingewiesen, die es ermöglicht, die Färbung des Blutes im frischen Zustande von Anbeginn an und auf Tage hinaus zu beobachten. Wir hatten diese Methode kurz beschrieben; eine ausführlichere Mitteilung darüber findet sich in der Zeitschrift f. klin. Medizin Bd. 54 Heft 3 u. 4. Die Methode beruht im Prinzip auf der Anwendung trocken gefärbter Deckgläschen und der Benutzung hohlgeschliffener Objektträger.

Wir haben mit ihr die einzelnen Elemente des Blutes nach den verschiedensten Seiten hin geprüft, haben saure und basische Farben sowie Farbgemische angewandt und sind zu teils bestätigenden, teils neuen Ergebnissen gelangt.

Im nächstfolgenden wollen wir ausführlicher auf die Erscheinungen an den Leukocyten eingehen, soweit wir sie in normalen und pathologischen Fällen geprüft haben, da wir in unserer oben angeführten Arbeit nur einige Momente berücksichtigen und auch nur kurz beschreiben konnten. Wir hoffen zugleich, Anderen die Anregung zu geben, mit diesem leicht auszuführenden Verfahren dem Studium des Blutes und anderer Gewebe näher zu treten, da histologische Einzelheiten aufgedeckt werden, die am abgestorbenen und vor allem am gehärteten Präparate nicht mehr nachweisbar sind.

Im Verlaufe dieser Untersuchungen zeigten sich auch am ungefärbten, in der feuchten Kammer nach unserer Methode

beobachteten und längere Zeit konservierten Blute eine Reihe beachtenswerter Einzelheiten, die wir nicht übergehen zu dürfen glaubten und daher ebenfalls im nachstehenden beschreiben wollen.

## I. Ungefärbtes Präparat.

### 1. Amöboide Bewegung.

Die amöboide Bewegung der Leukocyten, die bald auf die bekannte anfängliche Starre und Rundung folgt, läßt sich auch ohne erwärmten Objektisch stundenlang, selbst noch bisweilen nach zweimal 24 Stunden beobachten. Besonders hervorzuheben ist nun aber, daß nicht nur die multinucleären, sondern auch die einkernigen Zellen, die Lymphocyten, amöboide Bewegung zeigen, die allerdings sehr viel träger ist und auch nur kürzere Zeit andauert. Wir stimmen in dieser Beobachtung mit Deetjen<sup>1</sup>, H. Hirschfeld<sup>2</sup>, A. Wolff<sup>3</sup> u. A. überein. Im allgemeinen ist im normalen ungefärbten Präparate die amöboide Bewegung auch der multinucleären Zellen eine langsame und ruhige, die schließlich nach langer Zeit erlischt. Tagelang kann man dann die Gebilde noch wohl erhalten, nur völlig still liegend beobachten; ihre Granulationen sind zunächst noch deutlich sichtbar, die eosinophilen an Größe und Rundung kenntlich. Allmählich treten die Konturen der Kerne schärfer hervor. Die Körnchen fangen an, an Zahl abzunehmen und vor allem weniger stark lichtbrechend zu werden; schließlich schwinden sie. In der zweiten Woche sind viele Exemplare ganz verschwunden, bei einigen nur die Kerne erhalten, bei anderen wohl auch noch der Leib, meist ganz blaß und nur von einzelnen Körnchen durchsetzt.

### 2. Die Körnchenbewegung.

Ein anderes, sehr interessantes Phänomen tritt nun am ungefärbten Präparat auf, wenn man ein kleines Wassertröpfchen an den Boden der feuchten Kammer bringt, bevor man das Deckgläschen mit dem Blut darüber deckt, und dafür sorgt, daß das Wassertröpfchen sich nicht etwa mit dem Blute mischt.

Eine so mit Wasserdampf gesättigte feuchte Kammer übt offenbar einen schädigenden Einfluß auf die Leukocyten aus;

denn eine große Zahl derselben beginnt nach einiger Zeit sich folgendermaßen zu verhalten: Der Leib quillt erheblich auf und wird zuweilen einhalbmal so groß als zuvor, und bald beginnen die Granula, und zwar stets nur in dem multinucleären (neutrophilen, nicht eosinophilen) Zellen, niemals in den Lymphocyten, in Bewegung zu geraten, die zuweilen jenem wilden Tanze gleicht, den man sich am besten darstellen kann, wenn man eine Spur von chinesischer Tusche auf einem Deckgläschen mittels Wasser verreibt und ebenfalls über einem hohlgeschliffenen Objektträger besichtigt. Denn auch diese Bewegung kann stundenlang beobachtet werden. Wenn sie aufgehört hat — und dieses Aufhören geschieht, wie wir oft beobachtet haben, überraschend plötzlich —, ist der Zelleib gewöhnlich noch mehr gequollen, als am Anfange, so daß die Granula in ihm weit zerstreut liegen; ein Teil derselben ist der Auflösung anheimgefallen.

Es scheint uns von Wichtigkeit, daß dieser Erscheinung, die so leicht erzeugt werden kann, genügende Aufmerksamkeit zuteil wird, schon um Irrtümer zu vermeiden. Denn an den Leukocyten im Harn bei Cystitis und Gonorrhoe ist sie schon mehrfach beschrieben, daselbst aber schon falsch gedeutet worden: man hielt die sich bewegenden Körnchen für Bakterien, für Gonokokken, die sich tummelten. Allerdings ist hier das Phänomen auch von anderer Seite richtig gedeutet worden (Moore<sup>4</sup>, Kiefer<sup>5</sup>). Man kann übrigens, wie wir wiederholentlich demonstrieren konnten, im cystitischen Harn, besonders wenn er einige Zeit gestanden hat und die Leukocyten angefangen haben aufzuquellen, bei Anwendung guter Immersionen gewöhnlich in jeder Eiterzelle die Körnchenbewegung sehen. Heinz<sup>6</sup> hat im Leibe der Pleuraepithelien des pleuritischen Exsudates dieselbe tanzende Bewegung beobachtet. Wir halten es nach unserer Erfahrung auch für möglich, daß die wildtanzende Bewegung der Pigmentkörnchen im Malariaplasmodium, die in vielen Gebilden nicht sofort nach Entnahme des Blutes, sondern erst nach einiger Zeit auftritt, und anfänglich in bedeutender Zunahme begriffen ist, nicht etwa eine Lebenserscheinung der Gebilde, sondern ein Zeichen des Absterbens ist.

## II. Gefärbte Präparate.

### 1. Verhältnisse an den Kernen.

#### A. Die Basophilie.

Wir können uns über die Kernfärbungen der Leukocyten im allgemeinen kurz fassen. Das Gesetz der Basophilie derselben zeigt sich auch bei unserer Färbung auf das deutlichste. Während die sauren Farben (Eosin, Rubin, Lichtgrün, Methylorange, Nigrosin, Indulin u. a.) der Kern blaß und strukturlos anfärben und nicht differenzieren, lassen ihn die basischen Farben kräftig gefärbt aus der Umgebung hervortreten und geben zugleich ein schönes Strukturbild seiner Chromatinsubstanz. Methylgrün, das Kernfärbemittel  $\kappa\alpha\tau' \acute{\epsilon}\xi\sigma\chi\acute{\iota}\nu$  (Pappenheim<sup>7</sup>), ist unter den basischen Farben das am schwächsten tingierende; auch das Neutralrot färbt nicht sehr intensiv, und, was farbenanalytisch wichtig und vorläufig nicht ganz erklärlich ist, in gelbbraunem, nicht rotem Farbentone, im Gegensatz zum gehärteten Präparate, in welchem es die Kerne hochrot färbt. Außerordentlich distinkt aber färben Toluidinblau, Dahlia, Safranin, Magentarot, Cresylblau, etwas zarter Methylenblau, Methylenazur, Thionin.

#### B. Das amphibole Stadium.

Wenn nun aber auch Methylgrün bei der vitalen Methode die chromophile Substanz der Kerne nicht sehr intensiv färbt, so hat es doch die Oberhand, wenn man es in Gemischen den Kernen zuführt, deren andere Komponente an sich dieselben viel intensiver färben würde. Dies gilt z. B. für die Mischung von Magentarot- oder Pyronin-Methylgrün (selbstverständlich verhält sich so auch das schwächer färbende Neutralrot mit Methylgrün).

Färbt man mit solchen Gemischen, in denen allerdings das Methylgrün stärker vertreten sein muß, besonders in seiner Verbindung mit Magentarot, so tingiert sich der Kern schließlich stets grün; aber, und dies ist ebenfalls eine interessante Erscheinung bei unserer Färbung, dieses Endstadium wird erst nach einem Zwischenstadium erreicht, in welchem die rote Farbe den Kern mit Beschlag belegt, allerdings in nicht sehr intensiver Nuance und ohne Kernstruktur. So-

lange die Leukocyten leben, färben sich die Kerne gar nicht; dann nehmen sie die rote Base an, schließlich stoßen sie dieselbe wieder aus und färben sich endgültig grün. Zwischen beiden Färbungen ist ein allmählicher Übergang über Violett hin deutlich zu konstatieren. Ein z. B. mit Pyronin-Methylgrün vital gefärbtes Blutpräparat sieht in einem gewissen Stadium der Färbung, das man natürlich mit Osmiumsäure jederzeit festlegen kann, sehr buntfarbig und für einen Uneingeweihten nahezu unerklärbar aus: Rote, violette, grüne Kerne in Leukocyten, Lymphocyten, Myelocyten, auch Mastzellen und kernhaltigen Erythrocyten finden sich durcheinander und womöglich noch untermischt mit ungefärbten Kernen, ein Bild, das namentlich im Knochenmark, auch in den Lymphdrüsen und vor allem bei Leukämie zunächst verwirrend wirkt, wenn man es nicht kennt oder nicht die endgültige Färbung erwartet. Wir haben das Stadium der Rotfärbung bei den oben genannten Methylgrüngenischen als amphiboles Stadium bezeichnet.

### C. Kernstrukturen und Nucleoli.

Die Feinheit der vitalen Färbung läßt sich bereits am Kerne auf das deutlichste demonstrieren. Wendet man nämlich an Stelle einer basischen Farbe jene Methylgrüngenische an, so erhält man ein Strukturbild, das man niemals an gehärteten Präparaten beobachten kann. Schon beim Pyronin-Methylgrün- und beim Neutralrot-Methylgrüngenisch, besonders aber bei der Verwendung von Magentarot-Methylgrün zeigen sämtliche Kerne aller leukocytären Gebilde regelmäßig eine Doppelfärbung: In eine grüne Grundsubstanz ist ein überaus zartes, in den Lymphocyten oft radartig angeordnetes Netzwerk roter Bälken eingelagert (Fig. 6 Taf. XVI), das bei den großen Myelocyten und im Knochenmark (Fig. 7) zuweilen durch den Kern sich derart ausbreitet, daß eine wabenartige Struktur entsteht<sup>1)</sup> (Arnold<sup>8</sup>, Pappenheim). Wir möchten übrigens hervorheben, daß auch die Kerne der Erythrocyten

<sup>1)</sup> Die Zellkerne aller Gewebe zeigen das nämliche Verhalten, wenn man sie aus Abstrichpräparaten gewonnen hat und ebenso nach unserer Methode, wie das Blut färbt. Man wird niemals die Doppelfärbung der Kerne vermissen.

ein äußerst zartes und spärliches Netzwerk bei Magentarot-Methylgrünfärbung aufweisen. Bei den anderen Farbkombinationen vermißten wir es meist hier.

Wir haben also im Leukocytenkerne eine zweifache Substanz nach unserer Methode färberisch differenzieren können, eine grün gefärbte, die nach Überwindung des amphibolen Stadiums, nach völligem Absterben eine Affinität zum Methylgrün besitzt, eine andere, spärlichere und in ihr fädchenförmig eingelagerte, die sich mit den minder basischen roten Farben verbindet. Die letztere verhält sich also färberisch, wie die an anderem Orte beschriebenen basophilen Granula der Erythrocyten oder wie der Leib der Lymphocyten (s. u.) oder wie das Granoplasma der Plasmazellen (Pappenheim). Auch die Bakterien färben sich, wie wir beiläufig erwähnen wollen, ohne Ausnahme in solchen Farbgemischen stets rot, ebenso auch die Nisslischen Granula der Nervenzellen (Luzzatto<sup>9</sup>). Wir haben es also hier durchgängig mit einer zwar basophilen Substanz zu tun, die aber innerhalb der basischen Farben eine andere Auswahl trifft als die eigentliche Kerngrundsubstanz: sie ist erythrophil (basophil geringeren Grades nach Mosse<sup>10</sup>), während die eigentliche Kerngrundsubstanz cyanophil (basophil höheren Grades) — cyanophil auf das blaugrüne Methylgrün bezogen — ist und sich ebenso verhält wie reines Nuclein. Bei den Härtungsmethoden geht diese Differenzierbarkeit vollständig verloren.

Auch die Kernkörperchen, welche von verschiedenen Autoren (Bizzozero<sup>11</sup>, Ehrlich-Lazarus<sup>12</sup>, Löwit-Türk<sup>13</sup>, Strauß<sup>14</sup>, Nakanishi<sup>15</sup> u. a.) auch an gehärteten Präparaten schon gesehen worden sind, besitzen Erythrophilie (Fig. 5 und 8, Taf. XVI), d. h. sie treten als leuchtend rote Gebilde aus der blaugrünen Grundsubstanz der Kerne nicht selten excentrisch gelagert heraus und sind besonders bei Magentarot-Methylgrünfärbung umgeben von den ebenfalls rotgefärbten erythrophilen Fädchen des Kerns. Am Blute ist eine solche färberische Differenzierung des Kernkörperchens von der Grundsubstanz noch nicht beschrieben worden.<sup>1)</sup> Was nun das Vor-

<sup>1)</sup> Pappenheim<sup>16</sup>, der zuerst die basischen Doppelfarben in die Technik eingeführt hat, hat allerdings bereits sowohl in den Plasma-

kommen dieser rotgefärbten Kernkörperchen anbelangt, so ist es als ein allgemein gültiges Gesetz festzustellen, daß dieselben stets den Kernen der Erythroblasten und der multinucleären Leukocyten fehlen; in deren Kernen findet sich also nur das rote Gerüst, das in den Erythroblasten, wie erwähnt, außerordentlich zart ausgebildet ist. Hingegen fehlen die Nucleoli nie in allen übrigen Leukocyten, also vor allem in den Lymphocyten, in denen man nicht selten zwei Kernkörperchen wahrnimmt. In den Myelocyten des Knochenmarks und der Leukämie ist die Vielheit an Kernkörperchen sogar die Regel (Levaditi<sup>19</sup>); man begegnet hier nicht selten vier bis fünf Nucleolis (Fig. 4, Taf. XVI), die dann oftmals nicht rund, sondern stäbchenförmig und zugleich gewunden sind, durch ihre intensive Farbe aber und ihre scharfe Abgrenzung von dem umgebenden erythrophilen Kernfasengerüst differenziert werden können. Auch im gehärteten Präparat sind sie im Gegensatz zu diesem Gerüst stets sichtbar und sind bereits beschrieben worden (Bizzozero<sup>11</sup>, Arnold<sup>8</sup>).

Wir können es nach unserer Methode ebenfalls als ein feststehendes Gesetz bezeichnen, daß die Kernkörperchen bei basischen Doppelfärbungen stets erythrophil sind. Nicht nur im Blut, nicht nur im Knochenmark, sondern auch in Milz und Lymphdrüsen konnten wir dies feststellen, und vor allem in Abstrichpräparaten sämtlicher Organe, ja selbst in den Zellen der malignen Tumoren. Also Erythroblasten und multinucleäre Zellen ausgenommen, besitzen alle weißen Blutelemente bei unserer Methode leuchtend rote Nucleoli; einkernige Gebilde ohne Kernkörperchen sind stets Erythroblasten.

## 2. Färbungserscheinungen am Protoplasma.

Unsere Beobachtungen erstrecken sich auf die Resultate mit einfachen sauren und basischen Farben und mit basischen und neutralen Farbgemischen (saure Farbgemische haben besondere Differenzierungen nicht ergeben). Unter den vielen Farben und Farbkombinationen, die wir versucht haben, wollen wir nur gewisse, besondere geeignete berücksichtigen und daran

zellen<sup>17</sup> als fixen Bindegewebszellen<sup>18</sup> rote Kernkörperchen in grüner Grundsubstanz beschrieben.

einige allgemeine Gesichtspunkte erörtern; Eigentümlichkeiten der einzelnen Farben sollen im speziellen Teile aufgeführt werden.

### A. Allgemeines.

Alle Färbungen haben wie auf die Erythrocyten, so auch auf die Leukocyten einen schädigenden Einfluß, der aus den bereits oben angeführten Gründen teils auf Änderungen des osmotischen Druckes, teils auf toxische Wirkung zurückzuführen ist.

Innerhalb der verschiedenen Farben aber ist ein Unterschied zu machen hinsichtlich des Grades der schädigenden Wirkung zwischen den Farbsäuren und Farbbasen; zu den Letzteren sind dann noch die durch Vereinigung von Säuren und Basen von dem Einen<sup>20</sup> von uns dargestellten Neutralfarben zu rechnen.

#### a) Saure Farben.

Die sauren Farben wirken schädlicher auf die Leukocyten ein als die basischen, ähnlich wie wir es bei den Erythrocyten (a. a. O.) nachgewiesen haben.

Beschickt man ein Deckgläschen z. B. mit Eosin, dann mit Blut, so zeigt sich folgendes: Der saure Farbstoff löst sich leichter und intensiver im Blutserum auf, als der basische. Deshalb sieht man bald nach der Anfertigung des Präparates die Leukocyten in einer rosa gefärbten Flüssigkeit schwimmen. Nach kurzer Zeit zeigen die weißen Blutkörperchen Phänomene, die als eine schwere Schädigung derselben gedeutet werden müssen. Es sind dann zweierlei Arten von abnormen Bewegungserscheinungen zu beobachten: Entweder es tritt, gewöhnlich schon nach wenigen Stunden, Körnchenbewegung ein, bei dem einen Leukocyten früher, bei dem anderen später, welche die stärksten Grade annehmen kann, die wir überhaupt haben feststellen können; die Körnchenbewegung tritt meist nach vorheriger Aufquellung und Rundung des Leukocyten, also unter Verlust der vorhergegangenen amöboiden Bewegung auf. In vielen Zellen zeigt sich aber vor der Körnchenbewegung als vorausgehendes Stadium oder aber auch gleichzeitig mit ihr, ein Zustand der Bewegung, die wir als krampfhaft amöboid bezeichnen möchten. In diesem



Zustände werden abnorm heftige Reizerscheinungen sichtbar, und zwar so, daß erst ein völlig homogener, strukturloser Fortsatz ausgestreckt wird und daß dann nach einiger Zeit, oft plötzlich, die Granula in den Fortsatz hineinfließen und ihn mehr oder weniger ausfüllen. Zuweilen kommt es sogar zur Abschnürung ganzer Fortsätze, die dann als kleine, rundliche, etwas granulierte Kugeln in der Nachbarschaft liegen. Zu diesem Stadium der krampfhaften amöboiden Bewegung tritt, wie schon erwähnt, die Körnchenbewegung hinzu; letztere dauert auch dann noch an, wenn der Leukocyt wieder eine rundliche Ruheform, freilich unter starker Aufquellung, angenommen hat und dann denjenigen Gebilden gleicht, die von vornherein nur Körnchenbewegung zeigten. Auch hier sei betont, daß die Lymphocyten niemals Bewegung ihrer Granula zeigen; dies ist wahrscheinlich auf den Umstand zurückzuführen, daß ihr Protoplasma, wie Ehrlich annimmt, nicht zu den echt granulierten zu rechnen ist, sondern ebenso wie das Granoplasma der Plasmazellen, nur eine verschieden dichte und aufgefranzte protoplasmatische Substanz darstellt.

Amöboider Reizzustand und Körnchenbewegung sind zwar in vielen, aber nicht in allen Leukocyten zu beobachten. Bei den letzteren tritt die Färbung direkt auf, während die anderen sich erst später, nachdem sie durch Quellung und teilweise Auflösung der Körnchen starke Veränderungen erlitten haben, nicht selten auffällig rasch, fast plötzlich, tingieren. Die Färbung erstreckt sich im allgemeinen gleichzeitig auf Zelleib und Kern. Der Leib färbt sich mit der sauren Farbe blaß an. Die Mehrzahl der Granula in ihm nimmt die Farbe nicht stärker auf, als die Grundsubstanz, in der sie liegen, und welche in den gequollenen Zellen ziemlich leicht von ihnen unterschieden werden kann; auch die Kerne nehmen, wie bereits oben erwähnt, den sauren Farbstoff in blassem Farbenton ohne jegliche Struktur auf. Nur die eosinophilen Granula färben sich selbstverständlich intensiv, und dies gilt für alle sauren Farben. Das Ehrlichsche Gesetz der Oxyphilie dieser Granula wird auch durch unsere Methode vollauf bestätigt. Erwähnen möchten wir schließlich noch, daß die Myelocyten und Lymphocyten in unseren Knochenmarks- und Lymphdrüsenpräparaten

ebensowenig Körnchenbewegung zeigten, wie die oben besprochenen Lymphocyten des Blutes.

### β) Basische und neutrale Farben.

Viel weniger deletär auf den Leukocytenleib wirken die basischen und neutralen Farben, letztere, wie erwähnt, durch eine Kombination einer Farbbase und Farbsäure in bekannter Weise dargestellt. Für die einfachen basischen Farben gilt folgendes: Eine Zeitlang tritt in den Blutpräparaten gar keine Färbung ein; dieser Zeitraum ist jedoch verhältnismäßig kurz, nie länger als eine halbe Stunde. Nur äußerst selten begegnet man den Erscheinungen der Quellung und Körnchenbewegung. Krampfhaft amöboide Bewegungen fehlen; normale ist meist so lange vorhanden, als keine Färbung aufgetreten ist. Diejenigen wenigen Zellen, welche die Körnchenbewegung zeigen, nehmen die Farbe viel später als die anderen an. Die Tinktion selbst geht dann in folgender Weise vor sich: Es kann als gesetzmäßig festgestellt werden, daß in jeder Zelle sich anfangs nur der Leib färbt, der Kern aber farblos bleibt. Später nimmt der Kern ebenfalls Farbe an, tingiert sich immer intensiver, und schließlich entfärbt sich das Protoplasma bei den einfach basischen Farben, soweit nicht Mastzellen, Lymphocyten oder gewisse Formen von Myelocyten (s. u.) vorliegen. Die neutrophilen und eosinophilen Granula sind also bei der vitalen Färbungsmethode für basische Farben nicht auf die Dauer färbbar; ihre anfängliche Tinktion kann vielleicht als Diffusionsvorgang bezeichnet werden.

Die Neutralfarben werden in ihre Komponenten zerlegt, sobald der Kern sich zu färben beginnt. Vorher wird der Leib in der Mischfarbe angefärbt, nachher nimmt aber der Kern nur die Base an, während die Granulationen des Leibes sich verschieden verhalten, getreu den Gesetzen, die Ehrlich festgestellt hat: Die oxyphilen  $\alpha$ -Granulationen färben sich in der Farbe der Säure, die basischen  $\gamma$ -Mastzellengranulationen in der der Base und meist metachromatisch, die neutralen  $\varepsilon$ -Granulationen in der Mischfarbe; letztere halten aber bei unserer Methode die Farbe nicht fest, sondern entfernen sie später wieder, so daß die neutrophilen

Zellen dann nicht anders aussehen, als wenn die entsprechend basische Farbe allein angewandt wäre.

Zu diesem Grundgesetz sind aber noch verschiedene Einzelheiten hinzuzufügen. Daß bei Methylenblau und verwandten Farben anfangs chromophore Zonen der Erythrocyten auftreten, haben wir anderwärts erwähnt (Berliner klin. Wochenschr. 1904 Nr. 49). Auch möchten wir bemerken, daß im Anfang der Färbung die Zellen auch dann noch amöboide Bewegung zeigen können, wenn schon der Leib, aber nicht der Kern sich zu färben beginnt. Eine andere Gruppe basischer Farben zeigt ein eigenartiges Verhalten, welches bei Neutralrot im gonorrhoeischen Eiter von Plato<sup>21</sup>, Uhma<sup>22</sup>, Bibergeil<sup>23</sup>, im Blute von Arnold beobachtet worden ist. Wir fanden die Erscheinung bei Neutralrot, Toluidinblau, Cresylblau, Methylenazur. Es dringt nämlich anfänglich der Farbstoff in Form grober runder Kugeln in den Zelleib ein.<sup>1)</sup> Diese sitzen zwischen den Granulis und bleiben sichtbar, auch wenn diese selbst sich schon zu färben beginnen (Figuren 1c und 2a, Taf. XVI), zuweilen auch noch, wenn der Kern bereits die Farbe anzunehmen anfängt (Fig. 2b, Taf. XVI). Der Eintritt des Farbstoffes in Form solcher Kugeln unterbleibt aber in Kombinationen mit Methylgrün, speziell bei Neutralrot-Methylgrün (s. u.). Diese Kugelbildung kann am besten wohl dadurch erklärt werden, daß im Zelleib kleine granulafreie Hohlräume sich finden, in die der Farbstoff mit Leichtigkeit eindringt. Allerdings bleibt es dabei unerklärt, weshalb nur gerade die erwähnten basischen Farben diese Erscheinungen hervorrufen, aber nicht die anderen, wozu alle übrigen bekannteren basischen Farbstoffe gehören dürften.

Der Frage nach dem Vorhandensein von farbenanalytisch verschiedenen Granulis in ein und demselben Zelleib konnten wir ebenfalls mit unserer Methode näher treten.

1) Wir möchten bemerken, daß wir auch an den Erythroblasten und Erythrocyten mit basophilen Granulationen bei diesen Farben ähnliches beobachten konnten. Überall, wo die genannten Farbstoffe in diese Zellen einzutreten pflegen, tun sie es nur in dieser eigentümlichen Weise, freilich nur bei vitaler Färbung. Ferner ist noch zu bemerken, daß diese Kugeln bei Methylenazur metachromatisch (rot) gefärbt sind (Fig. 3, Taf. XVI).

Im allgemeinen gelten die von Ehrlich aufgestellten Regeln. Man hat also die Zellen in oxyphile, neutrophile und basophile (zu letzteren sind außer den basophilen uninucleären Zellen die Lymphocyten und Mastzellen zu zählen) unterschieden. Allein wenn auch die Mehrzahl der Granula in den einzelnen Zellgattungen jener Grundeinteilung entsprach und so der einzelnen Zelle das charakteristische Gepräge gab, so fanden wir doch nicht selten vereinzelt unter ihnen Körnelungen von anderem Charakter. So konnten wir in den neutrophilen Zellen und sogar in eosinophilen Zellen in einem Falle von lymphatischer Leukämie (Fig. 8c, Taf. XVI) bei Färbung mit einfachen Basen nach der Überwindung des ersten Stadiums der diffusen Färbung, wenn im allgemeinen nur Kernfärbung zu beobachten war, nicht selten einzelne basophile Granula, zuweilen in einem kleinen Häufchen vereinigt, auffinden (vgl. Schwarz<sup>24</sup>, Weiss<sup>25</sup>, H. F. Müller<sup>26</sup>, F. Müller<sup>27</sup>, Schaffer<sup>28</sup>, Fischl<sup>29</sup>, Hirschfeld<sup>30</sup>, Bettmann<sup>31</sup>, Arnold<sup>32</sup>, Ehrlich<sup>33</sup>, Engel<sup>34</sup> u. a.). Ein ähnliches Verhalten haben Ehrlich und Levaditi selbst schon am gehärteten Präparat beobachtet (vgl. Levaditis Arbeit, Fig. 3); hier fanden sich in den eosinophilen Myelocyten einige basische Granulationen und umgekehrt in den Mastzellen einige oxyphile. Ferner hat H. Hirschfeld<sup>35</sup>, wie wir, in neutrophilen Zellen basophile Granulationen<sup>1)</sup> gefunden, und zwar am gehärteten Präparat. Auf oxyphile Granula sind wir freilich bei der Färbung mit Eosin-Methylenblau niemals gestoßen, wie Levaditi und Mosse<sup>36</sup> am gehärteten Präparate. Was den Befund von Mosse anbelangt, so weicht dieser von demjenigen Levaditis noch insofern ab, als er die polymorphkernigen Leukocyten für schwach acidophil oder neutroacidophil hält.

Trotzdem sehen wir nicht die geringste Veranlassung ein, aus solchen Gründen die Grundbezeichnungen der Zellen zu ändern, deren Nomenklatur ja von der Beschaffenheit der in den einzelnen Zellen überwiegenden Zahl der Granula

<sup>1)</sup> In einem Fall von lymphoider Leukämie konnten wir zahlreiche multinucleäre Leukocyten mit basophilen Granulationen (basische Doppelfärbung) feststellen (Fig. 8b, Taf. XVI.)

hergeleitet ist. Auch Ehrlich selbst weist darauf hin, daß man ein gleichzeitiges Vorhandensein von verschiedenartig gearteten Granulis in einem Zelleibe annehmen muß. Wir erinnern nur an die von ihm beobachteten indulinophilen Granula. Inwieweit es sich bei solchen heterochromatischen Granulis um Jugendformen handelt oder aber um Absterbungsvorgänge, endlich um Einflüsse von Härtungen, wollen wir nicht weiter untersuchen. Jedenfalls können wir Hesse<sup>37</sup> nicht zustimmen, wenn er bei seinen Beobachtungen am Kaninchenknochenmark die Unterscheidungen wieder zu verwischen sucht. Wir können um so weniger seine Ergebnisse anerkennen, als er mit Anilinöl entfärbt hat, einer bekanntlich für Farben differentiellen Flüssigkeit von basischem Charakter, die bei der Anwendung von Farbgemischen, wie Eosin-Methylenblau, die Farben ganz ungleichmäßig extrahiert und Schlußfolgerungen überhaupt nicht zulassen darf. Unsere so schonende Methode hat denn auch bei der Anwendung von Eosin-Methylenblau nie derartige Bilder ergeben, wie sie Hesse demonstriert (s. dort Literatur darüber).

### γ) Basische Farbgemische.

Das Unnasche polychromatische Methylenblau, welches für die mikroskopische Farbenanalyse bekanntlich sich als sehr wertvoll erwiesen hat, ist, wie wir jetzt wissen, ein Gemisch mehrerer basischer Farbstoffe, nämlich des Methylenblau und seiner stark basischen Zersetzungsprodukte, unter denen das Methylenazur (August Bernthsen<sup>38</sup>) eine besondere Beachtung verdient. Die Ergebnisse mit diesem Farbgemisch haben bereits seit längerer Zeit zur Differenzierung basophiler Gewebe untereinander geführt und beanspruchen ein erhebliches theoretisches Interesse, da es so ermöglicht wird, basophile Gewebsteile voneinander färberisch zu trennen. Es ist nun Pappenheim gelungen, ein Gemisch von basischen Farben herzustellen, welches die Differenzierung noch deutlicher gestattet. Diese Farbmischung enthält die rote Komponente Pyronin, die grüne Methylgrün. Die letztere ist, wie wir wiederholentlich schon zu erwähnen hatten, zwar die stärkere Base, jedoch ein nahezu reines Kernfärbemittel. Das Pyronin,

minderstark basisch, färbt auch andere basophile Elemente. Dieses Gemisch war uns das Paradigma für eine Anzahl weiterer Gemische, die wir versuchten, unter denen die Verbindung des Methylgrün mit dem Neutralrot (übrigens schon von Pappenheim empfohlen) oder Magentarot uns besonders gute Dienste leistete, erstere in bezug auf die Zartheit und Nuancierung der Farben, letztere zur Veranschaulichung der oben beschriebenen Kernstrukturen.<sup>1)</sup> Bei diesen Farbgemischen gelingt es, auch am Blute und in den Blut bereitenden Organen schöne und interessante Differenzierungen zu erhalten. Auf unsere Ergebnisse an den Erythrocyten und an den Kernen der Leukocyten haben wir anderwärts (a. a. O.) hingewiesen. Für das Protoplasma der Leukocyten gilt folgendes: Die oxyphilen Granula bleiben ungefärbt. Die neutrophilen färben sich mit der roten Base vorübergehend, offenbar lediglich durch Diffusion nach den bereits angegebenen Prinzipien, und geben die Farbe wieder ab. Die Lymphocyten aber tingieren sich intensiv rot in ihrem schmalen Protoplasmasaum (Fig. 8a, Taf. XVI), die kleinen sowohl wie die im leukämischen Blut befindlichen großen. Sowohl bei Pyronin-Methylgrün als besonders beim Neutralrot-Methylgrün erhält man so nach unserer Methode nicht nur sehr schön gefärbte Bilder, sondern es zeigt sich auch, daß der Protoplasmasaum nicht ganz homogen, mit ausgefranstem Rande (Ehrlich) sich färbt, sondern eine netzartig granulierte Struktur aufweist. Ehrlich hat sich dahin entschieden, die Struktur der Lymphocyten nicht auf eine Stufe mit den anderen Granulationen zu stellen, weil es sich mehr um eine netzartige Struktur des Protoplasmas mit knotigen Verdickungen, als um distinkte in das Protoplasma eingelagerte Körnchen handelt. Michaelis und Wolff<sup>39</sup> gelang es, mit Hilfe der Romanowskischen Methylenblau-Eosinfärbung im Protoplasmaleib der Lymphocyten violette Körnchen aufzufinden, die man mit anderen Methoden nicht zur Darstellung hatte bringen können. Man kann nicht sagen, daß

1) Weniger gute Dienste leisteten uns Methylgrün-Safranin oder Methylgrün-Magdalarot. Der Ersatz des Methylgrün durch Jodgrün bot keinen Vorteil, ebensowenig die Kombination des Methylenblau mit roten Basen, ferner Safranin-Dahlia und andere Gemische.

die Granula distinkt voneinander trennbar sind wie etwa bei den Mastzellen und in den sonstigen granulierten Zellen des Blutes, sie scheinen vielmehr auf einer geringeren oder größeren Dichte des Protoplasmas zu beruhen, in Verbindung mit Rauigkeit seiner Oberfläche, die etwa derjenigen gewisser Wollstoffe ähnelt, ein Verhalten, wie es Pappenheim<sup>40)</sup> für die Plasmazellen gut charakterisiert hat. Sind daher die Lymphocyten, wie Ehrlich schon betont hat, auch nicht eigentlich granulierten Zellen, so ergibt doch die vitale Färbung besonders mit Neutralrot-Methylgrün eine Pseudogranulation.

Die einkernigen basophilen Leukocyten färben sich entsprechend mit der roten basischen Komponente.

Die Mastzellen zeigen stets Metachromasie, wenigstens bei Pyronin und Neutralrot; die Färbung ist daher orange (Fig. 5, Taf. XVI), nicht fuchsinrot wie bei den Lymphocyten und basophilen Leukocyten. Die metachromatische Farbenüance erkennt man am schönsten bei Anwendung von Lampenlicht; am geeignetsten ist Petroleumlicht und elektrisches Glühlicht, doch wird auch bei Gasglühlicht die Färbung noch deutlich.<sup>1)</sup> In unseren Abbildungen haben wir daher die Art der Beleuchtung stets angegeben. Auch aus den Figuren anderer Autoren ist ersichtlich, daß die Zeichnungen bei Lampenlicht aufgenommen sind. Dies gilt z. B. auch für die Figuren von Levaditi (vitale Färbung mit Cresylblau).

Ein besonderes Interesse beansprucht die Wirkungsweise der basophilen Farbgemische auf Knochenmark, Lymphdrüsen und Blut von Leukämie. Die Untersuchungen normaler und pathologischer Milzen, die wir vorgenommen haben, haben uns eindeutige Resultate bisher nicht ergeben. Was die Lymphdrüsen anbelangt, so haben wir in ihnen neben den

<sup>1)</sup> Dies gilt natürlich auch für den Gebrauch von einfach basischen Farben, die Metachromasie zeigen, namentlich den blauen. Denn das Tageslicht, das reichlich blaue Strahlen enthält, läßt die Metachromasie nur als Violett-färbung erkennen, das Lampenlicht als fast rote Farbe. Aber auch bei den roten Farben tritt der Unterschied zwischen Rot und Orange schärfer hervor. Gewisse blaue Farben sind bei Lampenlicht von vornherein ganz anders nuanciert. Bei Toluidinblau sind die Kerne bei Tageslicht rein blau, bei Lampenlicht rotviolett (vgl. Fig. 1, Taf. XVI).

im gewöhnlichen normalen Blute vorkommenden kleinen Lymphocyten mit einem oder mehreren Kernkörperchen und den großen Lymphocyten noch eine dritte Zellgattung (Fig. 9, Taf. XVI) gefunden, der wir im Knochenmark sehr oft begegnet sind, und die wir auch im leukämischen Blute reichlich angetroffen haben. Wahrscheinlich ist diese Zellgattung im leukämischen Blute bisher zu den Myelocyten gerechnet worden. Diese Zellen zeichnen sich zunächst durch ihre Größe aus: breiter Kern, breites Protoplasma. Hier stellt sich eine Übereinstimmung heraus zwischen unsern Befunden, denen von Pappenheim<sup>40</sup> und denen von Michaelis und Wolff<sup>39</sup>, welche angeben, neben zahlreichen, scheinbar ganz protoplasmareinen, großen, runden Kernen Zellen gefunden zu haben, die außer derselben Kernform einen blaugefärbten Protoplasmaleib und zwar vom schmalsten Saum bis zum denkbar breitesten Leib besaßen. Der Kern zeigt nach unserer Methode namentlich bei Magentarot-Methylgrün ein schönes Chromatingerüst und hat mehrere große, oft fädchenförmige Nucleoli. Der Zellleib ist sehr grob granuliert, die einzelnen Granula haben nahezu die Größe der eosinophilen, sind aber minder scharf voneinander abzugrenzen und stehen in bezug auf dieses Verhalten zwischen diesen und dem Granoplasma der Plasmazellen. Wir begegneten dieser Zellgattung, wie erwähnt, noch häufiger im Knochenmark und im leukämischen Blute. Wir möchten sie vorläufig als Makro-Lymphocyten bezeichnen. Übrigens sei nochmals bemerkt, daß die anderen beiden Zellformen, die kleinen und großen Lymphocyten aus den Lymphdrüsen nach unserer Methode dieselbe netzartige Protoplasmastruktur zeigten, wie die im Blute kreisenden. Wenn Michaelis und Wolff sie in ihren Lymphdrüsenpräparaten nicht darstellen konnten, so lag dies wohl an den die Struktur schädigenden Maßnahmen vor der Färbung des Gewebes, Schädigungen, von denen unsere Methode frei ist.

Im Knochenmark (vgl. die Arbeiten von Bizzozero<sup>11</sup>, Rindfleisch<sup>41</sup>, Arnold<sup>8</sup> u. <sup>42</sup>, Neumann<sup>43</sup>, Hoyer und Stravinsky<sup>44</sup>, Hoffmann<sup>45</sup>, St. Klein<sup>46</sup>, Limbeck<sup>47</sup>, Löwit<sup>48</sup>, F. H. Müller<sup>49</sup>, Neusser<sup>50</sup>, Rieder<sup>51</sup>, Werner<sup>52</sup>, Pappenheim<sup>53</sup>, Hirschlaff<sup>54</sup>, Heidenhain<sup>55</sup>, Grünberg<sup>56</sup>, Hirsch-



feld<sup>30</sup>, Ehrlich-Lazarus<sup>12</sup>, Levaditi<sup>19</sup>, Michaelis und Wolff<sup>39</sup> u. a.) entsteht bei der Anwendung basischer Doppelfarben ein sehr mannigfaltiges Bild. An Stellen, wo die einzelnen Elemente noch nicht deutlich voneinander geschieden sind, wo die einzelnen Zellen, die später selbständige Individuen bilden, in ihrem Protoplasma noch zusammenhängen, wird der Untergrund meist gleichmäßig rot und noch nicht scharf granuliert. Inmitten der roten Grundsubstanz liegen die Kerne der zukünftigen multinucleären Zellen, durch das Fehlen der Nucleoli charakterisiert, und die ebendorthin gehörigen hufeisenförmigen und gelappten Kerne. Man sieht ferner die meist großen Kerne der Myelocyten mit der bereits oben beschriebenen Struktur; man nimmt kleinere Kerne mit einem runden Kernkörperchen wahr, die wahrscheinlich späteren Lymphocyten angehören.<sup>1)</sup> Da, wo wir im Knochenmark bereits ausgebildete, voneinander getrennte Zellindividuen antrafen, konnten wir mit unseren basischen Farbgemischen folgende Zellgattungen unterscheiden<sup>2)</sup>:

I. Zellen mit einem großen Kern und breitem, basophilen Protoplasma (meist mehreren Nucleolis), gekörnt, von derselben Gestalt, wie wir sie kurz zuvor für die Lymphdrüsen beschrieben haben.

II. Riesenzellen (selten) mit außerordentlich großen Kernen, die durch netzförmige (rotgefärbte) Chromatingerüste wabenförmig geteilt sind, vielen Kernkörperchen und breitem basophilen Protoplasma.<sup>3)</sup>

III. Zellen von dem Typus der kleinen (Mikro-Lymphocyten, Riedersche Zellen) und großen Lymphocyten. Diese waren im normalen Knochenmark in nur mäßiger Menge aufzufinden (Arnold<sup>8</sup>, Pappenheim<sup>40</sup>, Michaelis und Wolff<sup>57</sup>, u. a.).

1) Im Knochenmark der Kaninchen finden sich im Gegensatz zum Menschen niemals Kernkörperchen, eine Tatsache, die vor uns bereits Levaditi festgestellt hat (Fig. 7, Taf. XVI).

2) Wir untersuchten stets nur rotes Knochenmark aus den Rippen.

3) Beim Kaninchen sind die Riesenzellen sehr häufig; sie haben dort mehrere Kerne in einer Zelle, die durch ganz feine Fäden verbunden oder vollständig voneinander getrennt sind (siehe Arnold, dieses Archiv, Bd. 140).

In einem Fall von lymphatischer Leukämie waren sie so enorm vermehrt, daß sie das ganze Bild nahezu beherrschten.

IV. Ziemlich große Zellen mit großen, etwas eingebuchteten Kernen, meist mehreren Kernkörperchen, und basophilem, granuliertem, ziemlich breitem Protoplasma (basophile Myelocyten).

Außer diesen basophilen Zellen fanden sich noch folgende nicht basophile Zellgattungen, die durch den Vergleich mit den Ergebnissen bei neutralen und sauren Farbgemischen, die bereits andere Forscher erhalten haben, zur Aufstellung weiterer folgender Zellformen Veranlassung gaben:

V. Dieselbe Zellformation wie bei Gruppe IV, aber mit neutrophilen Granulationen (gewöhnliche neutrophile Myelocyten).

VI. Dieselbe Gattung mit eosinophilen Granulationen, sehr spärlich (eosinophile Myelocyten).<sup>1)</sup>

VII. Polymorphkernige und einkernige Zellen, stets ohne Kernkörperchen, mit neutrophilem Protoplasma (multinucleäre und uninucleäre Leukocyten).

VIII. Multinucleäre und uninucleäre Zellen ohne Kernkörperchen, mit eosinophilen Granulationen, sehr spärlich (eosinophile Leukocyten).

Im normalen Knochenmark fanden wir häufig basophiles Protoplasma. Vor der vollkommenen Differenzierung der Zellen erweist sich die Grundsubstanz bei Anwendung basischer Gemische der einen, roten Komponente als zugänglich (erythrophil). Aber auch bei der Differenzierung der Zellen ist die Basophilie reichlich. Man kann sie wohl, wie auch Ehrlich annimmt, als Jugendzustand bezeichnen. Vielfach verdient diese Basophilie eher den Namen Amphophilie, weil ein Vergleich mit den Färbungsergebnissen neutraler Mischungen zeigt, daß ein Teil der mit basischen Farbgemischen sich tingierenden Granulationen auch Neutralfarben annimmt. Sie sind also ein Vorstadium der neutrophilen. Verschiedene Forscher haben ja auch im Leibe der Myelocyten basophile und neutrophile Granula gemischt gesehen, was wir selbst mit unserer vitalen Methode aber nicht wahrnehmen konnten.

<sup>1)</sup> Dieselben sind im Kaninchenknochenmark sehr reichlich.

Vorausgesetzt, daß keine Artefakte bei solchen Beobachtungen vorliegen, würde man also den Übergang von basophilen in neutrophile Granulationen direkt beobachten können. Bemerkenswert ist ferner die lymphoide Umwandlung des Knochenmarks bei lymphatischer Leukämie.

Im leukämischen Blute (Figuren 4 und 5, Tafel XVI) — leukämisches Knochenmark stand uns nicht zur Verfügung — fanden wir nun selbstverständlich in bekannter Weise die Knochenmarkselemente zu einem großen Teil wieder vor. Mit den basischen Farbgemischen konnten wir gleichzeitig nicht nur das Vorhandensein basophiler Myelocyten (Gruppe IV) sowie kleiner und großer Lymphocyten (Gruppe III) konstatieren, sondern auch jene ebenfalls schon erwähnte Zellgattung auffinden, die wir schon in den Lymphdrüsen sahen und im Knochenmark unter Gruppe I beschrieben haben. Ferner möchten wir das Vorhandensein einer reichlichen Zahl von Mastzellen im leukämischen Blute bestätigen (siehe Ehrlich, Canon<sup>58</sup>, Zollikofer<sup>59</sup>, Milchner<sup>60</sup>, Schmauch<sup>61</sup>, Bauer<sup>62</sup>, Hirschlaß<sup>63</sup>, A. Wolff<sup>64</sup> u. a.). Wir glauben, daß unsere Methode, die ein Auswaschen der Mastzellengranula, wie sie durch die Anwendung wässriger Lösungen erfolgt, vermeidet, ihren Nachweis außerordentlich erleichtern wird (siehe Türck<sup>65</sup>, Hirschfeld und Tobias<sup>66</sup>, Litten und Michaelis<sup>67</sup>, Michaelis<sup>68</sup>, Wolff<sup>64</sup>). Die Zahl der Zellen, die sich mit basischen Doppelfärbungen als basophil erweisen, ist sehr bedeutend. Auch hier möchten wir unter Vergleich mit den Ergebnissen bei Neutralgemischen annehmen, daß ein Teil der Zellgranula amphophil ist. Schließlich möchten wir nochmals darauf hinweisen, daß wir — in einem unserer Fälle von lymphatischer Leukämie — bei Anwendung von Pyronin-Methylgrün in eosinophilen Leukocyten zwischen den farblosen eosinophilen Granulis Häufchen hochrot gefärbter basophiler Granulationen wahrnehmen konnten (Figur 8 c, Tafel XVI).

## B. Einzelne wichtigere basische Farbstoffe und Farbgemische.

1. Methylenblau: Reines Methylenblau, welches frei ist von den Zersetzungsprodukten, die gewisse Präparate schon in

Pulverform, Lösungen nach längerem Stehen aber stets enthalten, ist das Paradigma des oben beschriebenen Färbungsvorganges, wie ihn bei unserer Methode einfache basische Farben geben. Zuvörderst färbt sich der Leib der Leukocyten, gleichviel, ob er basophile, neutrophile oder oxyphile Granulationen besitzt, auf kurze Zeit blaßblau. Dann tritt die Bildung der chromophoren Zonen der Erythrocyten auf, und zwar um jeden Leukocyten (auch um Mastzellen und Lymphocyten). Im Verlauf dieses Stadiums beginnen sich die Leukocytenkerne zu tingieren und ihr Leib zu entfärben, vorausgesetzt, daß es sich um eosinophile und neutrophile Zellen handelt. Bei den Lymphocyten färbt sich der Leib intensiv blau, anfangs bedeutend dunkler als der Kern, etwa in der Nuance des Nucleolus; später tritt ein erheblicher Ausgleich durch Dunklerfärbung des Kerns ein. Die Mastzellengranula sind dunkelviolet, mit Metachromasie; ihre Kerne sind blaßblau. Die Granula der uninucleären Leukocyten und basophilen Myelocyten sind blau, zarter als die der Mastzellen. Die gesamte Färbung der Präparate tritt bei dem Methylenblau verhältnismäßig langsam ein; dafür bleiben die Leukocyten sehr lange erhalten, nahezu eine Woche, nachdem die Erythrocyten längst verschwunden sind. Wir haben zuweilen vor der Färbung Körnchenbewegung beobachten können, wenn auch sehr selten. Dabei waren stets die chromophoren Zonen schon ausgebildet. Hin und wieder waren die sich bewegenden Körnchen oder das Protoplasma während der Bewegung schon blaßblau (etwas metachromatisch) gefärbt. Ja wir konnten bisweilen auch normale amöboide Bewegung wahrnehmen bei gleichzeitig beginnender Färbung. Es handelte sich hier natürlich nur um jene blasse Blaufärbung durch Diffusion, die, wie erwähnt, nicht von Dauer ist.

2. Toluidinblau: Dieser Farbstoff entwickelt eine stärkere Wirkung, färbt rascher, aber die gefärbten Zellen konservieren sich schlechter als bei Methylenblau. Die Färbung sieht bei Tageslicht rein blau aus, nur die Mastzellen sind violett; bei Lampenlicht ist die Färbung durchweg rotviolett, bei den Mastzellen noch um eine Nuance heller. Der Farbstoff tritt fast überall in Form von Kugeln (s. o.) in die Zellen ein (Figur 1,

Tafel XVI), auch im Knochenmark, in den Lymphdrüsen und bei Leukämie. Er eignet sich besonders zur Färbung basophiler Körnelungen in den Erythrocyten.

3. Methylenazur: Bei Tageslicht sind die Kerne blau, ebenso die basophilen Substanzen, die Mastzellengranula dunkelviolett, bei Lampenlicht die ersteren violett, die letzteren rot. Chromophore Zonen deutlich, Kugelbildung bei Aufnahme des Farbstoffes in beträchtlich geringerem Grade als beim Toluidinblau. Die Kugelbildung wurde bei diesem Farbstoff auch in den Erythrocyten beobachtet, falls basophile Granulationen vorhanden waren (Fig. 3, Taf. XVI). Bei Lampenlicht sehen die Kugeln rot, bei Tageslicht dunkelviolett aus.

4. Brillant-Cresylblau: (Fig. 4, Taf. XVI): Dieses neue Präparat, dessen sich bereits Levaditi bedient hat, verdanken wir der freundlichen Zusendung des Herrn Geheimrat Prof. Dr. Ehrlich aus dem Frankfurter Institut. Der Körper färbt am schnellsten und intensivsten von allen Farbstoffen. Schon in der ersten Stunde ist die Färbung der Kerne und der sonstigen basophilen Substanzen beendet. Bei Tageslicht sind die Kerne rein blau, ebenso die basophilen Gewebe, bis auf die Mastzellengranula, diese violett; bei Lampenlicht sind die ersteren blauviolett, die letzteren rotviolett. Chromophore Zonen sind selten, und dann nur angedeutet, Kugelbildung ist auffallenderweise nur in denjenigen Erythrocyten, die basophile Granula haben (und dort nur spärlich), angedeutet, niemals in den Leukocyten (bei Tageslicht violett, bei Lampenlicht rot; Figur 9 h). Der raschen Färbung entspricht eine rasche Schädigung der Zellen. Bereits nach einigen Stunden tritt hier ein Phänomen auf, das wir bei anderen basischen Farben nicht beobachten konnten, und das den Vorgängen bei den sauren Farbstoffen etwas ähnlich, aber in anderer Beziehung davon verschieden ist. Zunächst bemerken wir hier die Tatsache, daß die Leiber der Zellen eine Neigung zum Aufquellen besitzen, wie wir dies bei den sauren Farbstoffen beobachten konnten. Dies gilt aber nur für die Grundsubstanz; die Granula, ob gefärbt oder ungefärbt, ziehen sich um die Kernsubstanz zusammen. Nach einiger Zeit löst sich die Grundsubstanz vollständig auf und die Zellen erscheinen dann

erheblich verkleinert. In diesem Zustande konnten wir sie noch nach zweimal 24 Stunden beobachten. An den Lymphocyten fehlte diese Erscheinung, wohl aber war sie an den Myelocyten und Mastzellen vorhanden. Bei Lampenlicht ist die Metachromasie der Mastzellen außerordentlich deutlich, ihre Granula sind dunkel scharlachrot. Aber auch bei den basophilen Myelocyten ist zum Teil Metachromasie zu beobachten; die Färbung schwankt zwischen violettrot und fuchsinrot. Einige basophile Myelocyten zeigen gemischtfarbige Granulationen, violettrote und fuchsinrote untermischt. Die Lymphocyten haben bei Lampenlicht ein blauvioletttes Protoplasma. So ergibt sich bei künstlicher Beleuchtung mit diesen Farbstoffen ein sehr buntes Bild im Blute bei myelogener Leukämie und im Knochenmark. Auch scheint es, daß die Granula der neutrophilen Myelocyten sich stets mit dem basischen Farbstoff färben, also ihm gegenüber amphichromatisch sind.

5. Neutralrot: Die Färbung tritt sehr allmählich ein; der Farbstoff färbt ebenso wie Methylenblau zuerst alle Granulationen diffus, bleibt aber später nur in den basophilen und Mastzellengranulishaften. Keine chromophoren Zonen, aber starke Kugelbildung (Figur 2, Tafel XVI). Vital färbt Neutralrot niemals fuchsinrot, sondern rotbraun, sowohl Kerne wie basophile Substanzen, die Granula der Mastzellen metachromatisch, d. h. bei Lampenlicht orange, bei Tageslicht gelb. Die Leukocyten halten sich viele Tage hindurch, auch nachdem die Erythrocyten aufgelöst sind.

6. Pyronin-Methylgrün und Neutralrot-Methylgrün: Das Gemisch färbt ziemlich rasch die Lymphocyten, etwas später die übrigen Leukocyten, zunächst in dem obenbeschriebenen amphibolen Stadium, so daß die Kerne und Nucleoli rot sind. Das Protoplasma der Lymphocyten färbt sich leuchtend rot, ebenso das der anderen basophilen Zellgattungen, die Mastzellen metachromatisch orange (namentlich bei Lampenlicht gut sichtbar). Der Zelleib der übrigen leukocyitären Elemente bleibt farblos. Nach einiger Zeit werden sämtliche Kerne, auch die der Erythrocyten, blaugrün, nur die Nucleoli bleiben rot. Es sondert sich die erythrophile Kernstruktur von der Kerngrundsubstanz ab. Chromophore Zonen und Kugelbildung fehlen.

7. Magentarot-Methylgrün: Die Färbung ist genau so wie die vorige. Nur ist die erythrophile Kernstruktur, wie oben erwähnt, viel schöner; sie tritt so stark hervor, daß sie zuweilen die Nucleoli verdeckt. Keine Metachromasie.

8. Eosin-Mythelenblau: Dieser neutrale, kristallisierte Farbstoff wird von den Geweben in seine Komponenten zerlegt. Es färben sich alle Kerne und Kernkörperchen blau, ebenso, und zwar besonders intensiv der Leib der Mastzellen und Lymphocyten, ersterer schwach metachromatisch. Die eosinophilen Granula sind rot, die neutrophilen Granula färben sich rotviolett, aber blaß, und halten den Farbstoff nicht lange. Das Stadium der chromophoren Zonen ist stets vorhanden, Kugelbildung fehlt. Bei der Anfertigung der Präparate ist folgendes zu beachten: Um die Kristallisation des Farbstoffes beim Verdunsten der alkoholischen Lösung möglichst zu verhüten, darf erstens keine zu konzentrierte Lösung genommen und muß zweitens die Flüssigkeit rasch, am besten über der Flamme, abgedunstet werden.

Fassen wir die Ergebnisse unserer Untersuchung zusammen, so zeigt sich bei der vitalen Färbung der Leukocyten folgendes:

I. Lebende Leukocyten nehmen keinen Farbstoff an, es sei denn in Gestalt eines farblosen Reduktionsproduktes.

II. Die Farbstoffe beschleunigen das Absterben der Leukocyten.

III. Basische Farben sind weniger rasch wirkend als saure.

IV. Beim Absterben, also noch im Zustande amöboider Beweglichkeit, beginnt die Färbung. Zunächst durchströmt der Farbstoff diffus die Zelle mit Ausnahme des Kerns.

V. In diesem Stadium und kurz vorher zeigt sich im Protoplasma eine intensive Körnchenbewegung, welche bald nur wenige Minuten, bald viele Stunden andauert und im allgemeinen bei sauren Farbstoffen intensiv ist, aber rascher abläuft als bei basischen.

VI. Nach der diffusen Protoplasmadurchtränkung nimmt erst der Kern die Farbe an, während sich das Protoplasma entfärbt, wenn es sich um basische Farben handelt: bei sauren

Farbstoffen bleibt die Farbe auch im Protoplasma und der Kern nimmt relativ wenig davon auf. Die eosinophilen Granula nehmen die saure Farbe selbstverständlich intensiv auf.

VII. Diese Vorgänge sind nur bei multinucleären und eosinophilen Zellen zu beobachten.

VIII. Bei Doppelfärbungen mit zwei basischen Farben findet sich der merkwürdige Vorgang der amphibolen Färbung vor der endgültigen Tinktion.

IX. Die Lymphocyten zeigen stets bei der vitalen Färbung auf das deutlichste ihre Kernkörperchen, während die Kerne der mehrkernigen Zellen niemals Kernkörperchen besitzen.

X. Die Zellen des Knochenmarks, der Milz und der Lymphdrüsen erweisen sich der vitalen Färbungsmethode gegenüber äußerst empfänglich und zeigen viele (oben dargelegte) Eigentümlichkeiten.

XI. Bei Leukämie treten die Markzellen als solche schon durch ihre Kernkörperchen hervor; basophile, neutrophile und eosinophile Myelocyten lassen sich deutlich unterscheiden. Auch finden sich Mischungen von basophilen und neutrophilen, sowie von eosinophilen und basophilen Granulationen in leukämischen Leukocyten (im Gegensatze zu normalen).

XII. Besondere Zellen haben wir in den Lymphdrüsen, dem Knochenmark und dem leukämischen Blute angetroffen; wahrscheinlich sind sie im leukämischen Blute bisher zu den Myelocyten gerechnet worden. Da sie sich durch ihre Größe auszeichnen und mit den Lymphocyten viel Gemeinsames haben, paßt für sie die Bezeichnung Makro-Lymphocyten.

### Erklärung der Abbildungen auf Tafel XVI.

- Fig. 1. Neutrophiler Leukocyt, bei welchem der Farbstoff in Kugelform den Zelleib erfüllt. Färbung: Toluidinblau, bei Tageslicht gezeichnet.
- Fig. 2. a) Neutrophiler Leukocyt, bei welchem der Farbstoff in Kugelform den Zelleib erfüllt, ohne daß schon die Kerne deutlich erkennbar wären; b) Fortgeschrittene Färbung. Die Kerne sind bereits deutlich gefärbt. Die Farbstoffkugeln sind bis auf eine verschwunden. Färbung: Neutralrot.
- Fig. 3. Basophile Granulationen bei Anaemia gravis. Man sieht neben mannigfach angeordneten Granulis rötlich gefärbte kleine Kugeln



in den Erythrocyten. Färbung: Methylenazur, bei Lampenlicht gezeichnet.

- Fig. 4. Myelogene Leukämie: a) Mastzellen, b) Lymphocyt mit mehreren Nucleolis, c) Myelocyt mit basophilen Granulis, d) Myelocyt mit metachromatisch gefärbten Granulis, e) Myelocyt mit Granulis von verschiedener Stärke, f) Neutrophiler multinucleärer Leukocyt. Färbung: Brillant-Cresylblau, bei künstlicher Beleuchtung gezeichnet.
- Fig. 5. Myelogene Leukämie: a) Mastzelle, b) Lymphocyt, c) Basophiler Myelocyt, d) Basophiler Myelocyt mit größeren Granulis, e) Multinucleärer neutrophiler Leukocyt mit vereinzelt basophilen Granulis. f) Eosinophile Zelle. Färbung: Pyronin-Methylgrün.
- Fig. 6. Darstellung der Kernstrukturen: a) Lymphocyt, b) Neutrophile Zelle, c) Eosinophile Zelle. Färbung: Magentarot-Methylgrün.
- Fig. 7. Normales Kaninchenknochenmark ohne Kernkörperchen.
- Fig. 8. Lymphatische Leukämie: a) Lymphocyt, b) Multinucleärer Leukocyt mit basophilen Granulis, c) Eosinophiler Leukocyt mit basophilen Granulis. Färbung: Pyronin-Methylgrün.
- Fig. 9. Makro-Lymphocyt aus einer normalen menschlichen Lymphdrüse. Färbung: Pyronin-Methylgrün.

Die Präparate sind mit der Zeiss'schen  $\frac{1}{12}$  Apochromat-Immersionlinse gezeichnet.

### Literatur.

1. Deetjen: a) Physiolog. Verein zu Kiel, 4. Dezember 1899, b) Dieses Archiv, Bd. 164, Heft II.
2. H. Hirschfeld: Berliner Klin. Wochenschr. 1901, Nr. 40.
3. A. Wolff: Berliner Klin. Wochenschr. 1901, Nr. 52.
4. Moore: Berliner Medizin. Gesellschaft, Dezember 1895.
5. Kiefer: Berliner Klin. Wochenschr. 1896, S. 83.
6. Heinz: Münchener Medizin. Wochenschr. 1901, Nr. 15.
7. Pappenheim: Grundriß der Farbchemie, 1901.
8. Arnold: Dieses Archiv 1883, Bd. 93.
9. Luzzatto: Berliner Klin. Wochenschr. 1902, Nr. 52.
10. Mosse: Berliner Klin. Wochenschr. 1902, Nr. 49.
11. Bizzozero: Dieses Archiv, Bd. 52, S. 156.
12. Ehrlich-Lazarus: Die Anämie. Normale und pathologische Histologie des Blutes. Wien 1900.
13. Löwit-Türk: Berliner Klin. Wochenschr. 1901. Nr. 37 und 38.
14. Strauss: Charité-Annalen 1898, Jahrgang 23, S. 20.
15. Nakanishi: Münchener Medizin. Wochenschr. 1900, Nr. 6.
16. Pappenheim: a) Zentrablatt f. Bakteriologie, Bd. 27, 1900, S. 403.  
b) Dieses Archiv 1901. c) Monatshefte f. praktische Dermatologie. Bd. 33, 1901.
17. Pappenheim: Dieses Archiv, Bd. 165, 1901, S. 395.

18. Pappenheim: a) Dieses Archiv, Bd. 151, S. 150. b) Dieses Archiv, Bd. 157, S. 45. c) Dieses Archiv, Bd. 166, S. 439—40.
19. Levaditi: Journal de Physiologie et de Pathologie générale, Nr. 3, 1901.
20. Rosin: a) Berliner Klin. Wochenschr. 1898, S. 825. b) Berliner Klin. Wochenschr. 1899, Nr. 12. c) Zentralblatt f. Physiologie, Bd. 13, Nr. 21, 1900.
21. Plato: a) Berliner Klin. Wochenschr. 1899, Nr. 49. b) Münchener Medizin. Wochenschr. 1900, Nr. 36. c) Archiv f. mikroskop. Anatomie 1900, Bd. 56, S. 868.
22. Uhma: Archiv f. Dermatologie und Syphilis 1899, Bd. I, Heft 2.
23. Bibergeil: Archiv f. Dermatologie und Syphilis 1902, Bd. 62, Heft 2 und 3.
24. Schwarz: Inaugural-Dissertation, Berlin 1880.
25. Weiss: Prochask. Wien 1896, S. 73.
26. H. F. Müller: Archiv f. experimentelle Pathol. und Pharm. Bd. 29.
27. F. Müller: Zieglers Beiträge 1900, Bd. 27.
28. Schaffer: Zentralblatt f. d. medicin. Wissenschaften 1891.
29. Fischl: Jahrbuch der Kinderheilkunde, Bd. 49, Heft 7.
30. Hirschfeld: Dieses Archiv, Bd. 153, 1898.
31. Bettmann: a) Münch. Medizin. Wochenschr. 1898, Nr. 39. b) Volkmanns Sammlung klinischer Vorträge, Nr. 266.
32. Arnold: a) Dieses Archiv, Bd. 140, Heft 3. b) Idem, Bd. 143.
33. Ehrlich: Charité-Annalen, Bd. 12.
34. Engel: Blutbefund bei einem Kind mit pseudo-perniciöser Anämie. (Dieses Archiv.)
35. Hirschfeld: Berliner Klin. Wochenschr. 1901, Nr. 29.
36. Mosse: Berliner Klin. Wochenschr. 1903, Nr. 32.
37. Hesse: Dieses Archiv 1902, Bd. 167.
38. Zernthsen: Annalen der Chemie, Bd. 230 und 251.
39. Michaelis u. Wolff: Dieses Archiv, Bd. 167.
40. Pappenheim: Dieses Archiv, Bd. 166.
41. Rindfleisch: Archiv f. mikroskop. Anatomie 1880, Bd. 17.
42. Arnold: Dieses Archiv, Bd. 140, 1895.
43. Neumann: Archiv der Heilkunde, Bd. 10, 1869.
44. Hoyer u. Stravinsky: Zeitschr. f. wissenschaftl. Zoologie, Bd. 22, 1873.
45. Hoffmann: Lehbuch der Konstitutionskrankheiten, Stuttgart, Enke, 1893.
46. St. Klein: Volkmanns Vorträge, Nr. 87, 1893.
47. Limbeck: Grundriß einer klinischen Pathologie des Blutes; Jena, Fischer, 1892.
48. Löwit: Studien zur Physiologie und Pathologie des Blutes und der Lymphe. Jena 1892.
49. F. H. Müller: Zentralblatt f. allgem. Pathologie 1894.

50. Neusser: Wiener Klin. Wochenschr. 1892.
51. Rieder: Beiträge zur Kenntnis der Leukocytose und verwandten Zustände, Leipzig 1892.
52. Werner: Dieses Archiv, Bd. 106, 1886.
53. Pappenheim: a) Dieses Archiv, Bd. 157, 1899. b) Idem, Bd. 159, 1900.
54. Hirschlaff: Deutsches Archiv f. klinische Medizin. Bd. 62, 1899.
55. Heidenhain: Archiv f. mikroskopische Anatomie, 1894, Bd. 43.
56. Grünberg: Dieses Archiv, Bd. 163, 1901.
57. Michaelis u. Wolff: Deutsche medicin. Wochenschr. 1901, Nr. 38.
58. Canon: Deutsche medicin. Wochenschr. 1892.
59. Zollikofer: Inaugural-Dissertation, Bonn 1899.
60. Milchner: Zeitschr. f. klinische Medizin, 1899, Bd. 37.
61. Schmauch: Dieses Archiv, Bd. 156.
62. Bauer: Inaugural-Dissertation, Bern 1899.
63. Hirschlaff: Deutsche medicin. Wochenschr. 1900. Vereinsbeilage S. 85.
64. A. Wolff: a) Münchener Medizin. Wochenschr. Nr. 6, 1902. b) Verein f. innere Medizin, Berlin, 21. Dezember 1903.
65. Türk: Klinische Untersuchungen über das Verhalten des Blutes bei akuten Infektionskrankheiten, Wien 1898.
66. Hirschfeld u. Tobias: Berliner Medizin. Gesellschaft, 9. Mai 1900.
67. Litten u. Michaelis: Medizinische Woche, August 1900.
68. Michaelis: Münchener Medizin. Wochenschr. Nr. 6, 1902.

---

## XXV.

### Kleinere Mitteilungen.

#### 1.

#### Ein Fall von kongenitalem Riesenwuchs des rechten Daumens.

Von

Professor Dr. med. A. Nolda in Montreux und St. Moritz.

(Mit einer Abbildung im Text.)

Fälle von wahren kongenitalen Riesenwuchs sind verhältnismäßig selten. Deshalb möchte ich kurz über einen Fall von einer solchen Mißbildung des rechten Daumens, den ich vor mehreren Jahren in meiner westfälischen Heimat sah und photographieren ließ, berichten.

Wir verstehen unter kongenitalem wahren Riesenwuchs das abnorme Wachstum ganzer Extremitäten mit allen ihren Bestandteilen oder einzelner Teile derselben: Füße, Zehen, Hände oder Finger auf Grund einer foetalen Anlage. Die abnorme Größe der betreffenden Teile ist jedoch zuweilen

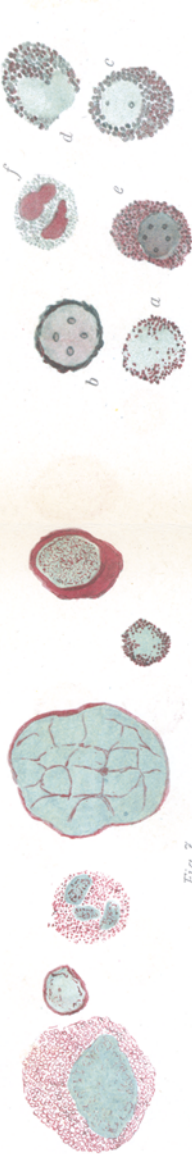


Fig. 1

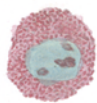


Fig. 2



Fig. 3

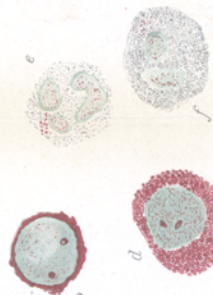


Fig. 4

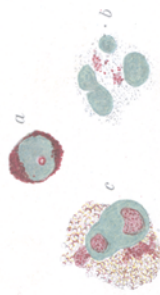


Fig. 5

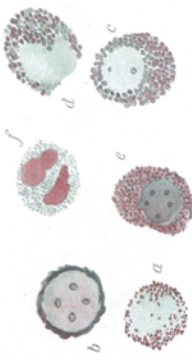


Fig. 6

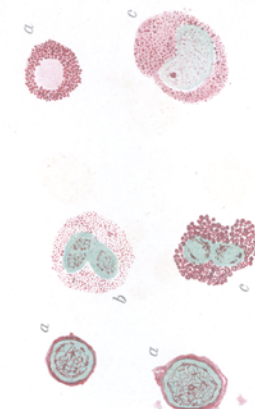


Fig. 7