

oder andere Serum beschränkt sind, sondern diese Abgrenzung soll die charakteristische Wirkung der beiden Sera zum Ausdruck bringen, diejenige Wirkung, durch welche sie den Tod der Tiere herbeiführen.

Die Natur des Problems bringt es mit sich, daß die Beweisführung eine indirekte sein mußte. Aber durch Untersuchung des Blutserums anderer Tiere nach den hier benutzten Methoden wird eine Prüfung der hier gewonnenen Ergebnisse möglich sein.

Zum Schlusse möge noch darauf hingewiesen werden, daß die hier erhobenen Befunde auch bei der Erklärung des Todes nach Injektion artfremder Erythrozyten von Interesse sein mögen. Ob sie gewisse Widersprüche, die sich bei derartigen Untersuchungen bisher ergeben haben, werden aufklären können, kann erst durch besondere Versuche entschieden werden<sup>1)</sup>. Vielleicht müssen auch hier Kombinationen unterschieden werden, in denen die wesentliche Wirkung in Hämolyse der eingeführten Erythrozyten und in Koagulation besteht, und andererseits Kombinationen, in denen die Agglutination der fremden Erythrozyten vor allem in Betracht kommt.

### III.

## Versuche über vitale Färbung des Embryo.

(Aus dem Kgl. Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M.)

Von

Dr. med. S. Z a r e t z k y.

Den Inhalt des vorliegenden Aufsatzes, der ein Glied in der Kette gleichartiger, aus dem Laboratorium von Professor E h r l i c h hervorgegangener Arbeiten darstellt, bilden Beobachtungen über vitale Färbung der Gewebe des Tierorganismus.

Speziell prüfte ich die Fähigkeit verschiedener Farbstoffe, von der Mutter auf den Fötus überzugehen, oder anders ausgedrückt, die Durchgängigkeit des Plazentargewebes für die in den Bluträumen der Mutter zirkulierenden Farbstoffe. Diese Frage gewann ein besonderes Interesse durch die neuerdings veröffentlichten grundlegenden Beobachtungen von G o l d m a n n<sup>2)</sup>. Derselbe studierte die nach Subkutaninjektion von Lösungen typischer vitaler Farbstoffe, besonders von Pyrrolblau und Trypanblau, bei Mäusen und Ratten eintretenden Färbungen, und konstatierte hierbei, daß bei tragenden Tieren der Fötus stets ungefärbt blieb, obschon makroskopisch die Gebärmutter, Plazenta und Frucht-

<sup>1)</sup> Vgl. A r t h u r F. C o c a , Die Ursache des plötzlichen Todes bei intravenöser Injektion artfremder Blutkörper. Virch. Arch. Bd. 196 1909 S. 92. Diese Arbeit erschien zu einer Zeit, da ein großer Teil unserer Versuche schon ausgeführt war.

<sup>2)</sup> Beiträge zur klinischen Chirurgie 1909, Band 64, Heft 1.

hüllen eine intensiv blaue Färbung zeigten. Mikroskopisch wurde in der Plazenta eine vitale Färbung der Protoplasmagranula der embryonalen und Riesenzellen, besonders der von S o b o t t a „Dotterentoderm“ genannten Zellen der inneren Eihülle gefunden. In einigen Fällen hat der Autor auch eine bläuliche Färbung des Fruchtwassers beobachtet, der Fötus selbst aber erwies sich stets als vollkommen ungefärbt.

Die gleiche elektive vitale Färbung der Chorionzotten hatte schon früher Schlecht bei Injektion von Lithion-Karminlösungen an Mäusen beobachtet.

Ich begann meine Experimente mit zwei optimalen vitalen Farbstoffen, dem Trypanblau und Trypanrot. Später wurden noch andere Farben angewandt und jede derselben in speziellen Versuchsserien geprüft.

Als Hauptobjekte dienten weiße Mäuse. Die Versuche wurden verschiedentlich variiert und als Kontrollen vereinzelte Experimente auch an weißen Ratten und Meerschweinchen angestellt.

Ich bespreche zunächst die mit Trypanblau und Trypanrot erhaltenen Resultate. Von beiden Farben wurde 1 ccm einer sterilen, 0,4- bis 0,5 prozentigen wässrigen Lösung subkutan dem Tier einverleibt. Intravenöse Injektionen hatten auch bei minimalen Mengen sofortigen Tod durch Embolie zur Folge. Die subkutanen Einspritzungen werden von den Tieren ohne sichtbare Störung des Allgemeinbefindens gut vertragen, auch wenn sie in kleinen Zwischenräumen wiederholt werden. Erst nach einiger Zeit, nach Monaten, kann man nach wiederholten Injektionen eine Abmagerung des Tieres bemerken. Die Resorption der Farblösung erfolgt sehr schnell, so daß die allgemeine Färbung des Tieres oft schon nach einigen Minuten eintritt. Diese Verhältnisse sind von Goldmann eingehend beschrieben worden.

Die Autopsie erfolgte in verschiedenen Perioden der Schwangerschaft und nach einer von 2 Stunden bis 6 Tagen wechselnden Einwirkungszeit des Farbstoffes. In einigen Fällen dauerte die Schwangerschaft des Tieres nach der Farbstoffinjektion bis zu ihrem natürlichen Ende fort. Bei einem Teile dieser Weibchen wurde die Autopsie am Anfange des Geburtsaktes oder während desselben vorgenommen. Wieder andere Tiere erhielten die Farbstoffinjektion zu einer Zeit, zu der die Gravidität noch nicht diagnostiziert werden konnte. Diesen Tieren wurde bei Sicherung der Diagnose die gleiche Farbstoffdosis nochmals injiziert.

Die sezierten Tiere zeigten durchweg eine starke Färbung. Besonders intensiv ist dieselbe in den Zitzen, die manchmal bei Anwendung von Trypanblau eine dunkle, fast blauschwarze Färbung annehmen. Es gelang, aus ihnen ein Tröpfchen bläulicher Flüssigkeit auszudrücken. Mit Trypanrot färben sie sich intensiv rot. Auch die äußere Haut und die serösen Häute wiesen stets eine starke Färbung auf. Von den inneren Organen zeigten sich als besonders stark tingiert Herz, Leber und Nieren; die Färbung der Skelettmuskeln war stets bedeutend schwächer als die des Herzmuskels. Der ganze Magen-Darmtraktus zeigte eine blaue bzw. stark rote Färbung unter geringerer Tinktion des Magens und des Blinddarms;

dagegen zeigte der Dünndarm und Dickdarm keinen bemerkenswerten Unterschied in der Färbungsintensität. Auch der Darminhalt erschien je nach der angewandten Farbe dunkelblau oder rot. Die Blasenmuskulatur sowie der Urin waren auch mehr oder weniger gefärbt. Erheblich war die Tinktion der Lymph- und Speicheldrüsen; wechselnd, immer aber deutlich bemerkbar, die der Lungen, gering die der Knochen. In den Ovarien bemerkte man auf der Oberfläche eine bunte, punktierte Färbung, die den Follikeln und der Follikelflüssigkeit entsprach. Rückenmark und Gehirn blieben stets ungefärbt.

Besonders fiel bei Öffnung der Bauchhöhle die stark gefärbte schwangere Gebärmutter auf. Die Untersuchung zahlreicher Stadien zeigte mit Bestimmtheit, daß die Intensität der Färbung mit dem Fortschreiten der Schwangerschaft zunimmt, eine Erscheinung, die besonders bei Trypanblau zutage trat, da hier die Gebärmutter am Ende der Schwangerschaft vollständig dunkelblau, fast blau-schwarz aussieht, während die Nuancen in der Intensität der roten Färbung im allgemeinen schwerer zu erkennen sind. Das beruht darauf, daß die Gebärmutter im Laufe der Schwangerschaft außerordentlich an Vaskularisation, also an Blutgehalt zunimmt, so daß die Trypanrotfärbung in den späteren Stadien, eben wegen der Blutfülle des Organs, schwerer zu erkennen ist.

Ein Schnitt durch die Gebärmutterwand erschien dunkelblau oder hellrot. Ebenso gefärbt waren Eihüllen und Plasma. Das Fruchtwasser ist zuweilen ungefärbt, zuweilen zeigt es eine lichtblaue oder rote Färbung. Eine intensivere Tinktion desselben habe ich nie beobachtet. Wir können daher mit Bestimmtheit aussagen, daß die Farbstofflösungen zwar aus dem Gefäßsystem des schwangeren Tieres in den Liquor amnii übergehen, aber nur in geringen Quantitäten das „physiologische Filter“ passieren.

Da weder in der Nabelschnur noch in den Geweben des Embryo auch nur die geringste Spur einer Färbung zu erkennen war, so konnte die Tinktion des Fruchtwassers nicht von seiten des Fötus erfolgen. Es erheben sich daher die zwei Fragen: 1. wo sich das für die Farbe undurchdringliche Filter in der Plazenta befindet, und 2. weshalb das Fruchtwasser manchmal gefärbt erscheint.

Die erste Frage wird durch eine Untersuchung der Plazenta, die zweite durch die der Eihüllen beantwortet. Die Untersuchung der vitalen Verteilung der Farbstoffe in den Geweben der Plazenta habe ich auf zwei Arten ausgeführt. Zunächst frisch, unmittelbar nach der Sektion des Tieres an Gefriermikrotomschnitten. Man erhält auf diese Weise jedoch nur einige allgemeine Orientierungsresultate. Zur genaueren Ermittlung des Charakters und der Lage der vital gefärbten Zellen wurde die von Goldmann angegebene Härtungsmethode mit 10prozentiger Formollösung und folgender Durchtränkung mit Paraffin angewandt. Man kann auf diese Weise brauchbare Schnittserien erhalten, die zweckmäßig mit geeigneten Farbstoffen nachgefärbt werden können. Die bei diesem Verfahren entstehende Entfärbung des Objektes ist nie besonders störend.

Das Gefäßsystem des Embryo stellt sich als völlig geschlossen dar. In den Chorionzotten werden die Kapillaren von Epithelzellen bedeckt, die das Blutsystem des Embryo vollkommen abschließen. Diese Zellen sind ektodermaler Herkunft, werden vom Mutterblut bespült und bilden für den Embryo hinsichtlich des mütterlichen Blutes ein physiologisches Filter.

Sie sind angefüllt mit feinsten, vital gefärbten Granulis, der große Kern bleibt ungefärbt. Auch die fotalen Kapillaren werden nicht tingiert, nur das Protoplasma der angrenzenden Ektodermzellen reißt den Farbstoff aus der Mutterblutlymphie gierig an sich und gibt ihn nicht an das Blutplasma des Embryo ab. Für das Trypanblau und Trypanrot erweist sich also dieses Epithel als ein absolut undurchdringliches Filter. Aber nicht nur in diesen Ektodermzellen besteht eine besondere Verwandtschaft des Protoplasmas zu den Farbstoffen; in der Plazenta von Mäusen und Ratten findet man eine Zellart, mit der ausgeprägten Eigenschaft, sich vital mit den erwähnten Farbstoffen elektiv zu färben, und es ist bemerkenswert, daß auch diese Zellen ektodermaler Herkunft sind. Es handelt sich hier um große Zellen, die die äußere Schicht der Plazenta bilden, Riesenzenlen genannt werden, und diejenigen Elemente darstellen, mittels deren die Keimblase vom Beginn ihrer Entwicklung bis kurz vor Ende der Schwangerschaft sich zuerst mit dem Gebärmutterepithel und später mit der Dezidua verbindet. Nach S o b o t t a haben sie die charakteristische Fähigkeit, die mütterlichen Kapillaren zu arrodieren und so die Ernährung des sich entwickelnden Embryos bis zu Beginn der Plazentabildung zu ermöglichen. Ihre vitale Färbbarkeit ist dieselbe wie die der begrenzenden Ektodermzellen. Ein besonders scharfes Bild erhält man bei Anwendung von Trypanblau und Nachfärbung mit E h r l i c h schem Triazid. Man bemerkt also in dem rosa gefärbten Protoplasma unzählige kleine blau gefärbte Körnchen, die die Zelle dicht erfüllen. „Nichts kann fesselnder sein, als die zahllosen Farbnuancen des Kerns, der Nukleolen, der Granula des gewaltigen Protoplasmakörpers und die Verteilung des „vitalen Farbstoffes“ an diesen Gebilden zu studieren“<sup>1)</sup>. In der Tat sind die Bilder sehr reizvoll. Mit Trypanrot, das sich bei der Bearbeitung häufig mehr oder weniger verliert, erhält man bei weitem nicht so klare und nur bei schneller Manipulation entsprechende Bilder.

Die Deziduazellen bleiben gänzlich ungefärbt; beide Farbstoffe können also in das Blut und das Gewebe des Embryo nicht eindringen, weil sie im Protoplasma der Ektodermzellen, die in der Plazenta das Gefäßsystem des Embryo abschließen, festgehalten werden. Diese Zellen dienen eben als undurchdringliches physiologisches Filter der Plazenta.

Wir haben indessen gesehen, daß in den Geweben der Plazenta auch Zellen vorhanden sind, die kein Endfilter für solche Farblösungen bzw. für das Blutplasma der Mutter darstellen und die gleiche Fähigkeit besitzen, den Farbstoff in Körnchen des Protoplasmas aufzunehmen. Ich stimme G o l d m a n n bei,

<sup>1)</sup> Zitiert nach G o l d m a n n .

wenn er als charakteristische Eigenschaften beider Zellarten betont: ontogenetische Identität (ektodermale Herkunft) und gleiche chemische Beschaffenheit des Protoplasmas (gleiche elektive Verwandtschaft zu denselben Farbstoffen).

Wir wenden uns nunmehr zu der zweiten Frage, weshalb trotz der absoluten Abwesenheit von Farbe im Blut und in den Geweben des Embryo das Fruchtwasser dennoch, obschon in unbedeutendem Maße, gefärbt erscheint. Wir bemerkten schon, daß den Schlüssel für diese Frage die Untersuchung der Eihäute bildet, und zwar in erster Linie der inneren Eihülle, die bei Mäusen und Ratten eine besondere Entwicklungsgeschichte aufweist und Dotterentoderm (*S o - b o t a*) oder *l'entoderm proximal* (*D u v a l*) genannt wird. Diese proximale Hülle besteht im frühesten Entwicklungsstadium des Embryo aus zwei Schichten, einer viszeralen und einer parietalen. In der Folge resorbiert sich das Parietalblatt allmählich und bleibt am Ende der Schwangerschaft in Form von Fetzen an den lateralen Abschnitten der Plazenta übrig. Während das Dotterentoderm an der der Plazenta gegenüberliegenden Seite (antimesometraler Eipol) ganz glatt ist, bilden sich bei Annäherung an den Rand der Plazenta Zotten. Zwischen der Plazenta und dem zottigen Teile des Dotterentoderms befindet sich eine Falte, Sinus entodermaticus. Die Längsschnitte der Zotten sind von einer Lage zylindrischer Zellen bedeckt. Diese proximale Hülle ist stets intensiv gefärbt; mit Trypanblau erscheint sie dunkelblau, mit Trypanrot grellrot. Breitet man ein kleines Stück dieser Hülle auf dem Objektträger aus, entwässert in Alkohol und montiert in Kanadabalsam, so kann man in zwei Minuten ein ausgezeichnetes mikroskopisches Präparat erhalten, das dauernd aufbewahrt werden kann. Vergleichende Beobachtungen zeigen, daß die vitale Körnchenfärbung des Protoplasmas der Eihülle ein gleiches mikroskopisches Bild liefert bei Untersuchung in frischem Zustande und in Kanadabalsam. Die vitale Färbung der Protoplasmakörnchen erscheint also als feste chemische Verbindung, die nicht so leicht unter dem Einfluß farbstoffentziehender Medien sich ändert. Der Charakter der Färbung ist aber hier insofern ein anderer, als in den Zellen der Plazenta letztere nur sehr feine, zuweilen staubähnliche Körnchen aufweisen, während die Granula der Dotterentodermzellen viel größer erscheinen.

Die leichte Färbung des Fruchtwassers, die wir bisweilen bei Öffnung der Fruchtkammer beobachteten, wird zweifellos ausschließlich durch den Übergang des Farbstoffes aus dem vital gefärbten Dotterentoderm bedingt. Da die Zellen dieser Hüllen lebendig sind und die chemische Verbindung des Farbstoffes in den protoplasmatischen Körnchen sehr fest ist, so kann von Farbausspülung keine Rede sein. Es unterliegt ja keinem Zweifel, daß die Dotterentodermzellen eine sekretorische Fähigkeit besitzen, und daß diese „innere Sekretion“ im wesentlichen denjenigen protoplasmatischen Körnchen zufällt, welche eine chemische Verwandtschaft zu den Farbstoffen aufweisen. Die sekretorische Tätigkeit dieser Zellen ist wahrscheinlich von Bedeutung für die Entwicklung des Embryo in sehr frühen Stadien der Schwangerschaft, wenn diese Elemente sich differenzieren.

Auf dieser sekretorischen Tätigkeit beruht also der Übertritt des Farbstoffes ins Fruchtwasser.

Weitere vitale Färbungsversuche stellte ich an Hühnerembryonen an. Zu diesem Zweck wurden frische Hühnereier in eigens dazu hergerichteten Körbchen in einen gut ventilierten, auf 38 bis 38,5° C gehaltenen Thermostat gestellt. Durch ein auf den Boden gestelltes Gefäß mit Wasser blieb die Luft stets mit Wasserdampf gesättigt. Morgens und abends wurden die Eier gedreht. Die Farbstoffinjektion erfolgte gewöhnlich am 2. oder 3. Tage der Bebrütung, wenn das Gefäßsystem des Embryos schon vorhanden ist, gelegentlich auch am 4., 5. und 6. Tage, und zwar in die Luftkammer des Eies.

Die angewandte Methodik war folgende:

Das aus dem Thermostat herausgenommene Ei wurde in einen erwärmten Eierbecher gelegt, mit dem breiteren Ende, in dem sich die Luftkammer befindet, nach oben. Nach Abreiben der Schale mit Spiritus wurden in der Gegend der Luftkammer in einem Abstande von 1 cm zwei Trepanationsöffnungen gemacht, die eine zur Einführung der Spritzenkanüle, die andere zur Entfernung der Luft. Letzteres ist zur Vermeidung schädlicher Druckerhöhungen wünschenswert. Natürlich geschieht alles unter strenger Einhaltung der Aseptik. Von einer 0,2- bis 0,5prozentigen Lösung wurde  $\frac{1}{2}$  bis 1 cem in die Luftkammer eingespritzt. Sodann wurden beide Öffnungen versiegelt und das Ei wieder in den Thermostat gelegt. Wird durch schnelles Arbeiten eine längere Abkühlung vermieden, so geht die weitere Entwicklung des Embryos in normaler Weise bis zum Schluß vor sich. Die Untersuchung wurde in verschiedenen Perioden der Bebrütung vorgenommen; niemals entdeckte man einen Übergang des Farbstoffes ins Blut oder in andere Gewebe des Embryos.

Stark gefärbt erweisen sich die inneren Eihüllen; mehr oder minder diffus färbt sich das Eiweiß, der Dotter bleibt gänzlich ungefärbt. Auch die amniotische Flüssigkeit ist lange Zeit ungefärbt, und nur in den späteren Stadien der Bebrütung, wenn auch das Amnion leicht tingiert wird, zeigt sich eine geringe Färbung.

Die Gewebe des Embryo blieben stets farblos, auch dann, wenn die amniotische Flüssigkeit in späteren Stadien der Bebrütung etwas tingiert war. Die Färbung des Fruchtwassers geschieht also nicht von seiten des Embryos aus, sondern von außen durch das Amnion. In diesen Fällen kann man fast stets im Magen des Embryo einen gefärbten Inhalt finden, was selbstverständlich auf gefärbtem verschlucktem Fruchtwasser beruht. Trotzdem findet hier aber keine Resorption von Farbstoff in das Blut des Embryo statt, so daß die Nieren keine Spur einer Färbung aufweisen. Eine analoge Erscheinung beobachteten wir bei säugenden Mäusen und Ratten, die die Milch ihrer vital gefärbten Mutter trinken. Das Milchserum zeigt eine durch Transsudation des Farbstoffes aus dem Blutplasma bedingte Färbung. Bei den neugeborenen Mäusen und Ratten tritt am zweiten Tage auf der Bauchoberfläche ein blauer bzw. roter Fleck auf, der etwas später größer wird und den durchscheinenden gefärbten Mageninhalt darstellt. Die Jungen entwickeln sich weiter, indem sie sich von der Milch der Mutter nähren; ihre Exkremente nehmen auch eine entsprechende Färbung an, aber der Urin bleibt ungefärbt, und nirgends gelingt es, das Vorhandensein von Farbstoff zu konstatieren. Also

wird seitens des Darmkanals kein Farbstoff resorbiert. Das Darmepithel zeigt keine vitale Färbung.

Bei keinem Versuch gelang indessen eine vitale Färbung des Hühnerembryos, also in das Blut des Embryos dringt von dem in die Luftkammer des Eies eingespritzten Farbstoff nichts ein. Die Färbung der Areola vasculosa zeigt sich in Gestalt baumartig verzweigter Streifen von verschiedener Breite. Die Richtung derselben entspricht, wie die genauere Untersuchung ergibt, derjenigen der Blutgefäße der Areola. Mikroskopisch sieht man hier eine vitale Färbung der großen vaskularisierten grobkörnigen Zellen der Areola. Diese körnige Färbung des Zellprotoplasmas hat insofern einen wechselnden Charakter, als die Körnchen ein und derselben Zelle eine überaus differente Größe und Form aufweisen können, von kleinsten staubartigen bis zu großen kugeligen Gebilden. Im allgemeinen ist die Granulation grobkörnig, die Gefäße bleiben gänzlich ungefärbt, die Zellen der Areola fixieren also in ihrem Protoplasma den Farbstoff, dem somit die Möglichkeit eines Überganges in das Blutsystem des Embryo genommen ist. Sie spielen dabei eine ähnliche Schutzrolle wie die begrenzenden Ektodermzellen in der Plazenta der Nagetiere. Beide Male haben die protoplasmatischen Elemente eine chemische Verwandtschaft zu den betreffenden Farbstoffen und bilden daher für den Embryo ein physiologisches Schutzfilter gegen das Gefäßsystem des Embryo.

Ergibt sich daher aus diesen Resultaten, daß bei Nichtbeschädigung der innersten Hülle eine Färbung des Embryos nicht eintritt, so entsteht die Frage, wie sich Farbstoffinjektionen in das Hühnerei in späteren Perioden der Bebrütung, 5, 6, 7 Tage bei gleichzeitiger Zerstörung der Gefäßwände verhalten. Zu diesem Zweck wurden nach der oben erwähnten Methode zwei Öffnungen in die Schale des Eies gemacht, von denen sich die eine am stumpfen Ende in der Gegend der Luftkammer, die andere an der Seite des Eies, ungefähr in der Mitte zwischen beiden Polen befindet. Bei diesem Verfahren ist es unumgänglich, daß eines der äußeren Gefäße, welche unter der inneren Eihülle liegen, beschädigt werden. In der Tiefe der Öffnung sieht man Blut. Man spritzt nun in diese Öffnung mittels einer stumpfen Kanüle, also ohne jedwede Amnionbeschädigung, die betreffende Farbstofflösung ein. Darauf werden in gewöhnlicher Weise die beiden Öffnungen versiegelt, und die Bebrütung im Thermostat nimmt ihren Fortgang. Die Untersuchung der Eier wurde in verschiedenen Perioden vorgenommen. Es zeigte sich nun, daß unter diesen Umständen der Farbstoff in das Gefäßsystem des Embryos gelangt; das Quantum ist jedoch sehr unbedeutend und völlig ungenügend, um eine vitale Färbung der Gewebe des Embryos hervorzurufen. Dagegen fand man eine intensive Färbung des Fruchtwassers, der Embryo selbst erscheint dabei in seinem Äußern ungefärbt. Leicht abgetönt in der entsprechenden Farbe erweist sich dagegen das Gefieder; das beruht aber augenscheinlich auf einer Tinktion durch das gefärbte Fruchtwasser. Die Haut des Embryos selbst ist ungefärbt, die Gewebe haben ein normales Aussehen, nur der Magen-Darminhalt ist wieder stärker tingiert, durch Verschlucken des stärker gefärbten Fruchtwassers. Nur in den

Nieren ließ sich bei sorgfältiger Untersuchung eine schwache vitale Färbung der Epithelzellen der Harnkanälchen entdecken. Man fand in dem Protoplasma dieser Zellen ganz kleine, entsprechend gefärbte Körperchen.

Vermutlich gelangt die Farblösung bei der erwähnten Versuchsanordnung in geringer Menge durch einen Gefäßriß in das Gefäßsystem; sehr bald heilt jedoch die beschädigte Stelle, und durch die folgende Obliteration wird die Gefäßwand wieder für die Farblösung undurchdringlich. Das in der Zirkulation befindliche geringe Farbstoffquantum wird durch die Nieren schnell ausgeschieden, wodurch die Färbung des Nierenepithels bedingt wird.

Die Beschädigung eines größeren Gefäßes bei der Injektion ist jedoch für die Entwicklung des Embryos deletär. Letzterer geht zugrunde und erweist sich bei Öffnung des Eies oft schon bis zu einem gewissen Grade mazeriert.

Da also aus diesen Versuchen hervorgeht, daß der in den Körper des Embryos gelangte Farbstoff vollkommen durch die Nieren ausgeschieden wird, hier aber lange nachweisbar ist, so ergibt sich, daß in den Fällen, in denen das Fruchtwasser gefärbt war, ohne daß die Nieren eine Färbung zeigten, auch kein Farbstoff in den Körper des Embryos eingedrungen sein kann.

#### M e t h y l e n b l a u .

Methylenblau wurde als 0,1- bis 0,2prozentige wässrige Lösung subkutan ein- bis zweimal in der Menge von 1 ccm injiziert. Manchmal wurde am folgenden Tage noch eine dritte Injektion vorgenommen. Bei diesem Farbstoff tritt die äußerlich sichtbare Färbung des Tieres viel später ein und entwickelt sich langsamer als bei den zuerst besprochenen Trypanfarben. Die Färbung ist unvergleichlich schwächer und hat einen grünlichen Schimmer. Erst später wird sie, besonders an Schnauze und Ohren, intensiver. Zugleich tritt eine ebenso blaue Färbung des Schwanzes auf; zuweilen ist jedoch die sichtbare Färbung des Tieres sehr schwach. Die Ausscheidung des Farbstoffes aus dem Organismus beginnt sehr schnell. Der Urin erhält dabei eine smaragdgrüne Farbe.

Eine einmalige Injektion von 1 ccm einer 0,1- bis 0,2prozentigen Lösung wird ziemlich gut vertragen. Nach wiederholten Injektionen macht das Tier jedoch einen deutlich kranken Eindruck, auch treten hiernach bei graviden Tieren Aborte ein. Wird die Schwangerschaft nicht unterbrochen, so beobachtet man einen großen Prozentsatz totgeborener Jungen, so daß oft unter 6 Fötus nur einer lebendig ist. Die übrigen 5 findet man nicht selten schon mazeriert. Bei einigen dieser mazerierten Föten bemerkte man eine bläuliche Hautfärbung, von der jedoch die inneren Organe frei sind. Die lebenden Föten zeigen keine Färbung, sie gehen schnell zugrunde, in den meisten Fällen durch Bissee ihrer Mutter. Ich hatte wiederholt Gelegenheit, den Geburtsakt zu beobachten, und bemerkte dann eine klare, manchmal stark blaugrüne Färbung des Fruchtwassers. Einige Fötus wurden frisch untersucht, und es gelang mir in einigen Fällen, ein unbedeutendes Quantum

bläulich gefärbter Körnchen in der Leber und zwar extrazellulär gelagert, sowie eine schwache körnige Färbung des Nierenepithels zu ermitteln.

Die Autopsie gravidier Tiere wurde verschieden lange nach der Injektion ausgeführt. Der früheste Termin war 2 Stunden nach der Einspritzung, wenn die smaragdgrüne Farbe des Urins am intensivsten ist. In anderen Versuchen betrug das Intervall bis zu 6 Stunden. Zuweilen erfolgte die Autopsie am nächsten Tage, d. h. 24 bis 27 Stunden nach der Injektion, zu einer Zeit, als das Tier bei einmaliger Injektion äußerlich schon entfärbt erscheint. Einige Tiere wurden 24 bis 26 Stunden nach der ersten Injektion noch einmal gespritzt. Die Sektion wurde dabei in verschiedenen Zeiträumen bis zu Beginn der Urinentfärbung vorgenommen, gelegentlich erst, nachdem der Urin gänzlich entfärbt war. Bei schwangeren Tieren zeigen Leber und Herz eine intensive dunkelblaugrüne Färbung. Gänzlich grün ist der Darmtraktus. Die Färbung der Gebärmutter zeigt große Variationen von einer kaum merklichen bläulichen bis zu intensiv grünblauer Tinktion. Die Plazenta war stets, wenn auch in verschiedenem Grade, gefärbt, die Schnitte zeigten einen deutlich grünlichen Schimmer. Auch die Fruchthüllen variierten in der Stärke der Tinktion und in dem Farbenton von hellgrün bis gesättigt blau. Niemals sieht man jedoch bei Methylenblau eine so intensiv blaue Färbung des Dotterentoderms, wie bei Anwendung von Trypanblau. Zuweilen bleibt das Dotterentoderm bei starker Färbung der Gebärmutterwände völlig farblos.

Vergleichende Studien zeigten, daß die Färbung des Dotterentoderms viel später beginnt als die der Plazenta und der Gebärmutter. Natürlich muß diese Erscheinung durch die verschiedene Versorgung dieser Gewebe mit Mutterblutplasma erklärt werden. Ferner zeigt sich, daß die grüne Färbung zuerst in dem Teile des Dotterentoderms auftritt, der die Plazenta bedeckt. Sie erscheint hier in Form eines dünnen Ringes, welcher die Wurzel der Nabelschnur umfaßt und bald eine blaue, bald grünlichblaue Färbung aufweist. In späteren Stadien wächst dieser gefärbte Ring nach allen Seiten und verbreitet sich schließlich über das ganze Dotterentoderm. Das erste Auftreten der Färbung im plazentaren Teile der Keimblase ist eine ständige Erscheinung, wie aus zahlreichen Autopsien hervorgeht, und beruht nicht auf Zufall. Die Erklärung ist folgende: an der betreffenden Stelle befindet sich zwischen der Plazenta und dem villös gewucherten Teile des Dotterentoderms ein sogenannter Sinus entodermaticus, durch den die mütterliche gefärbte Lymphe in reichlicher Menge in das Dotterentoderm gelangt. Zunächst beginnt damit der angrenzende villöse Teil des Dotterentoderms sich zu färben, und allmählich breitet sich die Färbung peripherwärts aus.

Die Untersuchung muß möglichst frisch geschehen, weil sowohl bei der Fixation als auch besonders bei der Entwässerung fast die ganze Farbe ausgezogen wird. Eine so feste chemische Verbindung der Granula mit dem Farbstoff wie bei den Trypanfarben besteht hier also nicht.

In der frischen Hülle präsentiert sich die vitale Zellfärbung in Gestalt blauer Körnchen, die über das Zellprotoplasma dicht gesät sind, ein Bild, das abgesehen

von der geringeren Intensität der Farbe, die häufig einen grünlichen Schimmer zeigt, mit den Trypanblaubildern identisch ist.

Auch die Untersuchung der Plazenta wurde vorzugsweise in frischem Zustande ausgeführt. Ich versuchte auch die Fixation mit Ammoniummolybdat nach B e t h e , gab dieselbe jedoch infolge der starken Entfärbung bei der Entwässerung wieder auf.

In der Plazenta entfärbt sich das Methylenblau in hohem Grade durch Reduktion zu dem Leukoproduct, indessen gelingt es, eine vitale Färbung der begrenzenden Ektodermzellen zu erzielen. Die typische körnige Verteilung des Farbstoffes in dem Protoplasma der Zellen erinnert an ein Bild, welches wir bei Trypanblaufärbung beobachteten, aber auch hier haben die Körnchen eine blassere, mehr grünliche Färbung. Der Nachweis von Farbstoffkörnchen in den vitalen Gefäßen der Plazenta gelang mir nicht mit Sicherheit an Gefriermikrotomschnitten. Bei einem Paraffin- und Zelloidinpräparat konnte sogar in den mütterlichen Bluträumen und in den ektodermalen begrenzenden Zellen keine Färbung entdeckt werden.

Auch die durch Autopsie erhaltenen Gewebe lebender Embryonen sind fast ausschließlich frisch, ohne Fixation untersucht worden, wobei selten ein Übergang des Farbstoffes in den Organismus des lebenden Embryo konstatiert wurde, und wenn überhaupt, in einem so unbedeutenden Grade, daß der Gedanke an vitale Färbung gänzlich ausgeschlossen ist. Vor allem wurden die Nieren eingehend untersucht. In einigen Fällen konnte hier eine bässe, bläulichgrüne vitale Färbung des Epithels der Harnkanälchen konstatiert werden, im allgemeinen ist diese Färbung des Nierenepithels aber sehr schwach. War eine Färbung der Nieren zu konstatieren, so traf man auch im Gehirn, seltener im Rückenmark, eine Anzahl extrazellulär gelagerter Farbstoffkörnchen an. In Leber, Herz und anderen Organen des Embryo waren niemals auch nur Spuren zu finden. Die minimale Menge Farbstoffes, die in den Körper des Embryos gelangt, wird hier vollkommen reduziert. Das peripherische Nervensystem bleibt gänzlich ungefärbt.

Solche Resultate erzielt man bei der Untersuchung lebender Embryonen nur dann, wenn sich außerdem in der Fruchtkammer auch noch tote Embryonen befinden. Die große Sterblichkeit der Embryonen in dieser Versuchsserie legt den Gedanken an eine Störung der Ernährung durch die Plazenta nahe, die anscheinend durch pathologische Gewebsveränderungen bedingt ist und durch den Einfluß des im mütterlichen Blute zirkulierenden Methylenblaus hervorgerufen wird. Die Tatsache, daß Farbstoffe im Organismus des lebenden Embryos nur bei dem gleichzeitigen Vorhandensein toter Embryonen konstatiert werden kann, dient als Bestätigung dieser Ansicht und weist gleichzeitig darauf hin, daß auch der Farbstoffübergang durch die Plazenta zum Embryo nur unter der Bedingung pathologischer Veränderungen des Plazentargewebes möglich ist. Diese Veränderungen müssen in das physiologische Endfilter lokalisiert werden, das sich an der Grenze der plazentaren Blutsysteme von Mutter und Frucht findet und in dem

wir bereits ein den Embryo schützendes Gewebe konstatiert haben. Dieser Schutzapparat des Embryo bildet sich aus dessen eigenen Elementen ektodermaler Herkunft. Trotz des idealen Schutzes, den die Ektodermzellen gegen die Trypanfarben bilden, erweisen sie sich durchlässig für das Methylenblau. Denn die chemische Verwandtschaft ihrer protoplasmatischen Elemente zum Methylenblau ist verhältnismäßig gering und erreicht bald ihre Sättigung, so daß bei beständigem Zufluß neuen Farbstoffes das Protoplasma geschädigt wird. Infolgedessen fixieren die Körnchen nicht mehr den Farbstoff, so daß letzterem die Möglichkeit zu einem weiteren Eindringen in das Blutsystem des Embryo gegeben ist. Es dürfte erlaubt sein, hier von einer Störung des normalen Turnus in den protoplasmatischen Elementen zu sprechen. Die Störung dieses Turnus muß auch ungünstig auf den Stoffwechsel zwischen Mutter und Frucht wirken und die Entwicklung des Embryos stören, wodurch sich der hohe Prozentsatz der Mortalität letzterer erklärt. Es ist in diesem Zusammenhange nicht uninteressant, an die Versuche Duchassoys, lebende Blumen zu färben, zu erinnern<sup>1)</sup>. Bleiben die mit der Farblösung begossenen Blumenwurzeln intakt, so werden die Farben, mit denen sich die abgeschnittenen Blumen leicht färben, gar nicht resorbiert; in anderen Fällen zerstört der Farbstoff durch Eindringen in die zarte Struktur der Pflanzen ihre physiologische Funktion und bringt sie zum Welken. Es zeigen sich dann stets, wenn auch unbedeutende, Verletzungen der Wurzelzellen oder der Zellen des unteren Stammteiles.

Ich habe hier auch Versuche mit Hühnereiern zu erwähnen. Die Injektion der Methylenblaulösung geschah in gleicher Weise wie die der Trypanfarben. Die Konzentration wechselte von 0,025, 0,05, 0,1 bis 0,2 %. Die Untersuchung geschah in den verschiedenen Perioden der Bebrütung. Die Resultate dieser Versuche unterscheiden sich zunächst hinsichtlich des weiteren Schicksals der Embryonen, bei Anwendung verschiedener Farbstoffkonzentration. Bei den niedrigen Konzentrationen von 0,025 bis 0,1 % zeigten die Embryonen größtenteils normale Entwicklung und lebten bei Öffnung des Eies, doch gelang es nicht, eine Gewebsfärbung zu entdecken. Auch die amniotische Flüssigkeit blieb ungefärbt. Nur bei einer 0,1 prozentigen Lösung war das Fruchtwasser zuweilen etwas blau gefärbt, in welchen Fällen auch der Mageninhalt des Embryo blaugrün erschien. In den Geweben, speziell Nieren, war jedoch nichts von Färbung zu entdecken. In anderen Fällen war der Embryo tot. Aus der verflossenen Zeit und dem Entwicklungsgrade ließ sich schließen, daß der Embryo nach der Injektion sich noch 2 bis 3 Tage weiter entwickelt hatte und daher nicht infolge des mechanischen und thermischen Insults der Injektion abgestorben sein konnte. Die Färbung der Areola vasculosa fing bei einer Konzentration von 0,1 an stärker zu werden und erwies sich bei konzentrierteren Lösungen von 0,2 ziemlich intensiv, und zwar grün, mit einem bläulichen Schimmer.

<sup>1)</sup> Revue générale des matières colorantes 1909 XIII t.. no. 149.

Die beständige Koinzidenz der drei Momente: Konzentration der Farbstofflösungen, verstärkte Färbungsintensität der Areola-vasculosa-Zellen und erhöhte Sterblichkeit der Embryonen, weisen auf ein gegenseitiges Abhängigkeitsverhältnis hin. Auch hier bedingt die verstärkte Konzentration einen reichlicheren Farbzluß zu den Zellen der Areola. Letztere nehmen die Farbe in ihren protoplasmatischen Körnchen auf und verhindern so das Eindringen in den Embryo. Wahrscheinlich gehen auch hier bei weiterem Farbzluß in dem Protoplasma der Zellen chemische Veränderungen vor sich, die schädlich auf die Fortentwicklung des Embryo einwirken. Ich sehe gegenwärtig keine Möglichkeit, die Resultate meiner Beobachtungen genauer zu formulieren. Bei der energischen Reduktion des Methylenblaus in den Geweben des Organismus kann die Frage nach dem Eintritt des Farbstoffes in die Gewebe des Embryos nicht absolut negativ entschieden werden. Es ist möglich, daß ein geringes Quantum Farbstoff in den Organismus des Embryos eintritt, aber in der Form des Leukoproductes eben nicht zu entdecken ist. Ob der Tod des Embryo durch diesen hypothetischen Eintritt des Farbstoffes bedingt wird oder auf chemischen Veränderungen in den Zellen der Areola vasculosa beruht, ist sehr schwer zu entscheiden. Ich will mich mit einem Hinweis auf den oben erwähnten Zusammenhang der Erscheinungen begnügen, wozu mir meine Versuchsresultate mit Methylenblau wohl ein Recht geben.

Es bleibt nur noch hinzuzufügen, daß ich eine Färbung des Dotters in den verschiedenen Bebrütungsstadien nie beobachtete; dagegen war eine verschieden starke Eiweißfärbung zu konstatieren. Dieselbe war von blaßgrüner Farbe und lokalierte sich oft an einer Stelle in Gestalt einer kleinen Insel. In diesem Falle blieb die übrige Eiweißmasse gänzlich ungefärbt.

#### N e u t r a l r o t .

Vitale Färbungsversuche mit Neutralrot wurden nach zwei Methoden ausgeführt:

1. durch Fütterung des schwangeren Tieres mit Cakes nach Farbstoffzusatz und

2. durch subkutane Injektion von wässrigen, 0,1prozentigen Farbstofflösungen.

Bei beiden Methoden entwickelt sich allmählich eine äußere Rotfärbung des Tieres. Die mit Neutralrotcakes gefütterten Weibchen fühlen sich anfangs ziemlich wohl, aber nach 3 bis 4 Tagen verschlimmert sich das Allgemeinbefinden, es tritt Apathie und ein schläfriger Zustand ein, und das Tier geht bald zugrunde. Kurz vor dem Tode abortiert es seine toten Jungen. Es ist klar, daß die Krankheit des Tieres, die zum Abort toter Jungen führt, pathologische Veränderungen in den Geweben der Plazenta hervorruft. Es zeigte sich, daß Neutralrot aus der Mutterlymph in den Organismus des Embryo durch die Plazentargewebe eindringen kann, und zwar in einem Quantum, das es ermöglicht, das Vorhandensein von Farbstoff in den verschiedenen Geweben des lebenden Fötus zu konstatieren. Aber nicht in allen Fällen gelingt der Nachweis eines Farbstoffüberganges in den Fötus, so z. B. niemals in den frühen Stadien der Gravidität. In den späteren Stadien

werden bei verschiedenen Tieren trotz absolut gleicher Versuchsanordnung verschiedene Resultate erzielt. Bei den Embryonen der einen Weibchen entdeckt man Farbstoff, bei denen anderer nicht. Ja selbst die Embryonen desselben Tieres können sich in dieser Beziehung verschieden verhalten. Im allgemeinen ist das Quantum des auf die Embryonen übergegangenen Farbstoffes gering. Ich konnte Neutralrot in folgenden Organen nachweisen: Leber, Nieren, Gehirn, Herz und Skelettmuskeln. In der Leber färben sich die Zellen des Parenchyms. Man findet im Protoplasma der Leberzellen eine mehr oder minder große Anzahl rotgefärbter Körnchen. Die Größe der Körnchen ist verschieden, im allgemeinen aber ziemlich beträchtlich. Neben den gefärbten Zellen findet man auch ungefärbte. Zuweilen fehlt die Färbung in einem ziemlich großen Bezirk, in anderen Fällen liegen die gefärbten Zellen gruppiert in Form kleiner Inselchen zwischen ungefärbten Zellen.

In den Nieren findet man bei späteren Entwicklungsstadien eine Färbung des Nierenepithels in Gestalt kleiner roter Körnchen, die im Protoplasma verteilt sind. Genaueres läßt sich bei den frischen Präparaten dieser Organe nicht ermitteln. Im Gehirn, das ich in frischem Zustand untersuchte, ist eine kleine Anzahl roter Körnchen aufzufinden. Dieselben liegen scheinbar intrazellulär, doch ist hierüber sehr schwer etwas Bestimmtes auszusagen. Im Herzen und in den Skelettmuskeln findet man inkonstant Körnchen, die zwischen die einzelnen Muskelemente verteilt sind. Es scheint hier eine vitale Färbung interfibrillärer Zellen zu existieren, doch habe ich nie ein Eindringen des Farbstoffes in die Muskelfibrillen beobachtet.

Das Neutralrot dringt also aus dem Mutterblut in den Organismus des Embryo nur in unbedeutenden Mengen ein. Bei stärkerem Übergang wurde die entsprechende Plazenta mikroskopisch auf pathologisch-anatomische Veränderungen untersucht, jedoch mit negativem Erfolg. Man kann daher nur von pathologisch-chemischen Veränderungen sprechen, die die Durchlässigkeit des Plazentafilters bedingen. Auch hier bin ich geneigt, den Übergang des Farbstoffes auf ein Sinken des Turnus des Biochemismus im Protoplasma der begrenzenden Ektodermzellen der Plazenta zurückzuführen.

Diese Ektodermzellen der Plazenta zeigen das gewöhnliche Bild rotgefärbter kleiner Körnchen, ähnlich wie beim Trypanrot, nur ist die Färbung nicht so grell und scharf. Klarer und den Trypanrotbildern ähnlicher ist die Färbung der Dotterentodermzellen.

Die Versuche mit Neutralrotinjektionen in Hühnereier wurden auf die gewöhnliche Weise ausgeführt. Die Konzentration der Farblösungen schwankte zwischen 0,025, 0,05, 0,1, 0,2 bis 0,4%. Auch hier geschah die Untersuchung in verschiedenen Stadien der Bebrütung. Das Eiweiß war stets diffus hellrot gefärbt, eine Färbung des Dotters war nie zu entdecken. Die Areola vasculosa zeigte sich in gewöhnlicher Weise tingiert. Die Embryonen waren durchweg tot, oft stark verändert und mazeriert. Viele wiesen eine rötliche Färbung auf, doch waren ihre Gewebe derart verändert, daß von einer mikroskopischen Untersuchung Abstand genommen werden mußte. Aus dem Entwicklungsstadium ergab sich, daß die Embryonen

noch etwa 2 bis 3 Tage nach der Injektion gelebt haben mußten. Wurde die Farbstoffinjektion vor Beginn der Bebrütung gemacht, so trat gar keine Entwicklung ein. In mehreren Versuchsserien erhielt ich mit Neutralrot stets das gleiche negative Resultat, während nach Injektion von Trypanfarben die Entwicklung regelmäßig vor sich ging. Bei dieser Giftigkeit des Neutralrot für jene Embryonen (2. bis 4. Tag) dehnte ich die Versuche mit verschiedenen Konzentrationen auch auf spätere Stadien der Bebrütung (6. bis 8. Tag) aus. Es zeigte sich, daß bei konzentrierteren Lösungen als 0,1% die Embryonen zugrunde gehen. Bei 0,1% setzten sie ihre Entwicklung fort. Das Entwicklungsstadium der zugrunde gegangenen Embryonen erwies sich stets als etwas älter, als es dem Injektionstermin entsprach, so daß sich also augenscheinlich die Embryonen noch einige Tage nach der Injektion weiter entwickelten. Viele waren schon in bedeutendem Grade mazeriert. Bei den besser erhaltenen wurde eine mikroskopische Untersuchung in frischem Zustande angestellt, die jedoch keinen Farbstoff erkennen ließ. Auch bei den im Moment der Öffnung des Eies lebend angetroffenen Embryonen war Farbstoff nicht zu entdecken. Die Eiweißfärbung war unbedeutend.

Die Versuche mit Hühnereiern bestätigen also die in geringerem Grade schon bei Ratten und Mäusen beobachtete Schädlichkeit des Neutralrotes für die Embryoentwicklung. Gewöhnlich entdeckte man bei den toten Hühnerembryonen analog wie bei Mäusen und Ratten keinen Farbstoff in den Geweben. Diese Übereinstimmung der Resultate beweist, daß die Embryonen nicht an dem Eindringen des Farbstoffes zugrunde gehen, sondern infolge von Ernährungsstörungen, die ihrerseits durch den Farbstoff bedingt werden. Anscheinend besteht in den Versuchen mit Hühnereiern das schädigende Moment in einer Färbung des Eiweißes, durch das die Resorption dieses so wichtigen und für den Embryo unentbehrlichen plastischen Materials beeinträchtigt wird. Natürlich ist es möglich, daß bei der Färbung im Eiweiß chemische Veränderungen auftreten, die es für die Assimilation seitens des Embryos untauglich machen. Die Hauptsache ist, daß der Embryo nicht an dem Farbstoff selbst, sondern an der Störung der Ernährung zugrunde geht.

Vergleicht man diese Resultate mit den an Mäusen und Ratten erhaltenen, so kann man eine Analogie konstatieren. Die Embryonen der letzteren werden vielfach abgetötet, ohne daß ihre Gewebe Farbstoff zeigen. Auch hier findet also keine unmittelbare Vergiftung durch Neutralrot statt, sondern der Tod erfolgt durch Störung in der Zufuhr des Nährmaterials, welche Störung wieder bedingt ist durch das Sinken der Lebenstätigkeit der vital gefärbten begrenzenden Ektodermzellen der Plazenta. Das Sinken des Turnus des Biochemismus in diesen Zellen wirkt deletär auf den Stoffwechsel zwischen Mutter und Fötus. Später erst lassen die Zellen den fixierten Farbstoff frei, der nunmehr zum Gefäßsystem des Embryos Eintritt erhält. Zeitweilige Schwankungen in dem Auftreten pathologisch-chemischer Veränderungen im Protoplasma dieser Zellen erklären die Möglichkeit eines partiellen Überganges unbedeutender Farbstoffmengen in den Embryo, ohne daß derselbe zugrunde geht. Vermutlich beruht dies darauf, daß

in diesen seltenen Fällen nur einige Ektodermzellen der Plazenta in ihrer Funktion geschädigt werden, während die allgemeine Verbreitung pathologisch-chemischer Veränderungen die Ausdehnung und den Grad noch nicht erreicht hatte, bei welchen die starken Veränderungen des Stoffwechsels eintreten, die zum Tode des Embryos führen.

So erklären sich die Resultate dieser Versuche aus den verschiedenen biochemischen Beziehungen des Protoplasmas der begrenzenden Ektodermzellen der Plazenta zu den verschiedenen Farbstoffen. Die primitiven Organe des Zellprotoplasmas, die sich in Form von Körnchen präsentieren, fixieren in sich verschiedene Farbstoffe, zeigen dabei aber verschiedenartige biochemische Eigenschaften und eine verschiedene biologische Resistenz. In manchen Fällen verschlingen diese Zellorgane gierig den Farbstoff (Trypanblau und -rot) ohne jede Störung der chemischen Prozesse des Protoplasmas, in andern Fällen nehmen sie den Farbstoff (Methylenblau und Neutralrot) mit wenig Energie an, erleiden aber pathologisch-chemische Veränderungen, die den Turnus des allgemeinen Biochemismus zum Sinken bringen. Die Zelle erweist sich mehr oder minder krank und unfähig ihre biologischen Funktionen zu verrichten.

Diese Differenz in der Beziehung der protoplasmatischen Elemente zu den verschiedenen Farbstoffen wird durch eine Reihe von Versuchen mit den drei folgenden Farbstoffen (Fluorescin, Eosin und Alkaliechtgrün) bestätigt. Fluorescin (Natriumuranin) wurde in Form einer wässrigen 0,25- bis 0,5prozentigen Lösung subkutan angewandt. Dabei entwickelte sich die äußerlich sichtbare Färbung des Tieres im Laufe einiger Minuten. Sie erreicht in 15 Minuten ihr Maximum, hält einige Zeit an und beginnt dann zu verblassen, so daß das Tier nach ungefähr 6 bis 7 Stunden anscheinend fast gänzlich entfärbt ist und nur die Fluoreszenz der Augen (*Humor aquaeus*) bemerkbar bleibt. Die Färbung, die von den Tieren anscheinend sehr gut vertragen wird, ist gelb. Besonders deutlich ist die von Ehrlich beschriebene Augenfluoreszenz<sup>1)</sup>.

Die Autopsie der in verschiedenen Stadien der Gravidität befindlichen Tiere wurde entweder auf der Höhe der äußerlichen Färbung oder während der fast völligen Entfärbung ausgeführt. Die mikroskopische Kontrolle des Farbstoffüberganges in die Gewebe des Embryo kann aus optischen Gründen nicht ausgeführt werden. Es wurden daher zur Kontrolle Alkoholextrakte aus den Embryonalgeweben hergestellt, mit denen ein minimales Quantum von Farbstoff durch Fluoreszenz der Alkohollösungen konstatiert werden kann.

Entsprechend dem guten Allgemeinbefinden der schwangeren Tiere erwiesen sich alle Embryonen bei der Autopsie als lebend. Äußerlich zeigten sie meist keine scharfe Färbung, obwohl mitunter das Vorhandensein einer gelben Tinktion zu konstatieren war. Durch die einfache Betrachtung war auch nach der Sektion keine Färbung zu erkennen. Dagegen gab die Methode der Alkoholextrakte aus

<sup>1)</sup> Ehrlich, Über provozierte Fluoreszenzerscheinungen am Auge. D. med. Wschr. 1882 Nr. 2 bis 4.

zerriebenen Geweben in allen Fällen klare Resultate. Nach 24 Stunden konstatierte man einen größeren oder kleineren Grad von Fluoreszenz in den Lösungen. Bezeichnet man den Grad der Fluoreszenz durch die Zahl der Pluszeichen und berücksichtigt man weiter das Quantum der eingespritzten Lösung, die Konzentration derselben und das Zeitintervall zwischen Injektion und Autopsie, so lassen sich die Resultate in folgender Tabelle zusammenfassen; wobei zu bemerken ist, daß die einzelnen Embryonen stets in demselben Quantum 95prozentigen Alkohols extrahiert wurden.

Nr.	Injektion cem	Konzentra- tion %	Autopsie nach Std.	Fluoreszenz- intensität
1	1	0,25	3	Spur
2	1	0,5	3	+
3	1	0,5	3	+
4	1	0,5	3	++
5	1	0,5	3	++
6	1	0,25	4	+
7	1	0,25	4	+
8	2	0,5	3	+++
9	2	0,5	3	+++
10	2	0,5	7	++
11	2	0,5	7	++
12	2	0,5	7	++

Aus dieser Tabelle ergibt sich, daß das Quantum der in den Embryo übergegangenen Farbe um so größer ist, je später die Autopsie vorgenommen wird, und je mehr Farbstoff dem schwangeren Tier injiziert wurde. Ich wiederhole, daß alle Embryonen lebendig waren.

Das Dotterentoderm zeigte sich bei der Autopsie in den meisten Fällen gelblichgrün fluoreszierend. Das gleiche war in diesen Fällen auch bei dem Fruchtwasser zu konstatieren.

Um über den quantitativen Farbstoffgehalt der einzelnen Organe des Embryo nach dem Grade der Fluoreszenz des Alkoholextraktes genaueres zu ermitteln, versuchte ich die aus den einzelnen Organen erhaltenen Alkoholextrakte mit einer Skala von Fluorescin-Alkohollösungen von steigender Konzentration zu vergleichen. Diese Versuche führten jedoch zu keinem brauchbaren Resultat, weil die anwendbaren Konzentrationen zu schwach waren, um Intensitätsdifferenzen der Fluoreszenz exakt zu bestimmen. Erschwert wird die Vergleichung noch dadurch, daß die Alkoholextrakte neben der Fluoreszenz noch eine auf der Auflösung des Blutfarbstoffes beruhende gelbliche Färbung aufweisen. Außerdem sind die einzelnen Organe der Mäuse- und Rattenembryonen so klein, daß man zur Erlangung fluoreszierender Extrakte nur ein verschwindend kleines Quantum Alkohol nehmen darf, wodurch weitere Fehlerquellen entstehen.

Die Tatsache, daß die Leberextrakte einen etwas höheren Grad von Fluoreszenz zeigen, erklärt sich vermutlich dadurch, daß dieses Organ besonders blutreich ist und schon deswegen den größten Gehalt an Fluorescin hat.

Fluorescin geht also leicht und schnell aus dem Blut der Mutter in das Gefäßsystem des Embryo über. Leider kann man aus optischen Gründen die Beziehungen der begrenzenden Ektodermzellen der Plazenta zu diesen Farbstoffen mikroskopisch nicht untersuchen. Jedenfalls kann von einem giftigen Einfluß des Fluorescins keine Rede sein, da sowohl die Mutter den Farbstoff gut verträgt als auch die Embryonen am Leben bleiben und selbst die Neugeborenen sich als lebensfähig erweisen. Einige der letzteren wurden eine halbe Stunde nach der Geburt untersucht und gaben fluoreszierende Alkoholextrakte. Es ist kein Grund vorhanden, hier irgendwelche pathologischen Veränderungen im Protoplasma der begrenzenden Ektodermzellen der Plazenta oder irgendeine Schädigung ihrer Funktionen anzunehmen. Vielmehr ergibt sich aus den Beobachtungen, daß die Zellen ganz gesund bleiben und in ihrem Protoplasma keine Elemente enthalten, die fähig sind, das Fluorescin zu fixieren. Diese Beziehungen des Zellprotoplasmas zum Fluorescin beobachtet man in großem Maßstabe im ganzen Tierorganismus, in den der Farbstoff eingeführt wird. Derselbe wird rasch resorbiert, färbt das Tier und schwindet ebenso schnell aus dem Organismus, wobei sich das Tier vollkommen entfärbt.

Parallelversuche mit Injektion einer 0,5prozentigen Fluoresceinlösung in Hühnereier erwiesen ebenso die Penetrationsfähigkeit dieses Farbstoffes in die Gewebe des sich entwickelnden Embryos, seine absolute Unschädlichkeit und schnelle Entfernung aus dem Organismus. Bei Eröffnung des Eies am 16. Tage der Bebrütung (die Injektion geschah am 5. Tage) erblickt man einen gut entwickelten, mit primitivem Gefieder bedeckten lebenden Embryo, der sich im Amnion befindet. Man bemerkt eine scharf ausgeprägte Fluoreszenz des Fruchtwassers, das Eiweißquantum ist zu dieser Zeit sehr unbedeutend, da es fast vollständig für den Aufbau der fötalen Gewebe verbraucht ist. Die Reste des Eiweißes zeigen eine merkbare Fluoreszenz.

Eine vergleichende Untersuchung verschiedener Bebrütungsstadien ergibt, daß die Eiweißfärbung verhältnismäßig schnell, der Übergang des Fluorescins zum Embryo aber viel später eintritt. Bis zum 12. bis 13. Tage der Bebrütung gelingt es nicht, in den Geweben des Embryo Fluoreszin zu entdecken, obgleich das ganze Eiweiß stark fluoresziert. Gießt man den Inhalt des Eies in eine Petrischale, so sieht man inmitten einer Eiweißmasse das scharf begrenzte Amnion. Das Fruchtwasser ist absolut wasserklar, ohne eine Spur von Fluoreszenz. Später gelingt es in den Embryogeweben Fluorescin nachzuweisen, und nun beginnt auch die amniotische Flüssigkeit zu fluoreszieren. Bei weiterer Resorption des gefärbten Eiweißes verstärkt sich die Fluoreszenz der amniotischen Flüssigkeit immer mehr. Diese Beobachtung zeigt ganz klar, daß das Eindringen von Fluorescin in die embryonalen Gewebe durch Resorption des gefärbten Eiweißes erfolgt. Zugleich

bestätigt sie die absolute Unschädlichkeit des Fluorescins für den Embryo und seine chemische Indifferenz für das Eiweiß, dessen Resorptionsfähigkeit nicht geändert wird. Schließlich geht die ganze eingespritzte Fluorescinnmenge aus dem Eiweiß in das Fruchtwasser über, ohne die Entwicklung des Organismus, den sie zuvor passiert hat, zu gefährden.

Der Fluorescingehalt der Gewebe des Embryos ist ziemlich bedeutend; der Humor aquaeus zeigt eine starke Fluoreszenz bei auffallendem Licht auch nach dem Ausschneiden des Auges; die Alkoholextrakte aus den Geweben fluoreszieren stark.

Die Sättigung des fötalen Organismus mit Fluorescin nimmt rasch ab und verschwindet fast ganz beim Auskriechen des Hühnchens aus dem Ei. Bei zwei ausgebrüteten Hühnern waren 3 bis 4 Stunden nach dem Auskriechen nur noch Spuren von Fluorescin in den Geweben zu entdecken und nur eine leichte Fluoreszenz der Augen des lebenden Tieres gab Zeugnis von dem Vorhandensein des Farbstoffes im Organismus.

Analoge Resultate nur nicht in so klarer Form gaben die Versuche mit Eosin. Sie wurden von mir nur an Mäusen und lediglich zum Vergleich angestellt. Zur Bestimmung des Eosinüberganges in die Gewebe des Embryos wurde ebenfalls die Methode der Alkoholextrakte angewandt. Schwangere Tiere erhielten 1 bis 2 ccm einer 0,5- bis 1prozentigen wässerigen Eosinlösung subkutan. Die sichtbare äußere Färbung des Tieres erfolgte nicht so schnell wie bei Fluorescin, war schwächer und hatte einen rötlichen Schimmer. Die zu verschiedenen Zeiten vorgenommenen Autopsien ergaben stets lebende Embryonen. Bei Öffnung der Fruchtkammer zeigte sich eine Rosa-Färbung des Dotterentoderms. Mikroskopisch erkannte man eine nicht sehr scharf ausgeprägte körnige Färbung des Zellprotoplasmas.

Die Resultate sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt:

Nr.	Injektion ccm	Konzentration %	Autopsie nach Std.	Fluoreszenz- intensität
1	1	0,5	2	—
2	1	0,5	2½	+
3	1	0,5	2½	+
4	1	0,5	5	+
5	1	0,5	5	+
6	1	1	4	++
7	1	1	4	+++
8	1	1	5	+++
9	2	1	5	++
10	2	1	6	++++

Bezüglich dieser Tabelle bemerke ich, daß sich die Intensitätsbezeichnung der Fluoreszenz ausschließlich auf Eosin bezieht und nicht mit der der Fluorescintabelle verglichen werden kann, denn die Fluoreszenz des letzteren Körpers ist unver-

gleichlich viel stärker als die des Eosins. Dies beruht ebenso wie die Differenz in der Giftigkeit darauf, daß das Molekül des Fluorescins sehr viel kleiner ist, als das des Eosins. Auf unserer letzten Tabelle bedeutet also ein + -Zeichen einen wesentlich geringeren Grad als auf der Fluorescintabelle. Wie ferner ersichtlich ist, wächst der Grad der Embryofärbung erstens mit der Zeit und zweitens mit der größeren Konzentration der Lösungen. Sonst ähneln die Versuche mit Eosin im großen ganzen denen mit Fluorescin.

Auch das Alkaliechtgrün (Sulfosäure des Triphenylmethans) besitzt die Eigenschaft, leicht und schnell resorbiert zu werden und auch rasch wieder aus dem Organismus zu verschwinden. 1 bis 2 ccm einer 1- bis 2prozentigen wässerigen Lösung, Mäusen und Ratten subkutan eingeführt, färbt die Tiere in wenigen Minuten grün. Die Färbung erreicht rasch ihren Höhepunkt und beginnt bald zu verblasen (Urin grün), so daß schon 3 Stunden nach der Injektion eine bedeutende Abblassung der Färbung bemerkt wird. Nach 1 ccm einer 2prozentigen Farblösung ist in 18 Stunden die Färbung kaum noch zu erkennen. In dieser Form vertragen die Tiere den Farbstoff gut und zeigen keine Störung des Allgemeinbefindens. Die Embryonen bleiben am Leben.

Bei diesem Farbstoff ist der Übergang auf die fötalen Gewebe weder durch mikroskopische Untersuchung der Gewebe noch durch Alkoholextrakte wie beim Eosin und Fluorescin zu bestimmen, da die Farbe hierbei verschwindet. Indessen erweist sich die bloße Besichtigung der Embryonen mit unbewaffnetem Auge als vollkommen ausreichend. Das Alkaliechtgrün geht in erheblichem Quantum auf die embryonalen Gewebe über und erzeugt eine deutlich wahrnehmbare grüne Färbung des Embryos. Eine ähnliche Färbung gelang einmal bei neugeborenen Mäusen, deren Mutter 4 Stunden vor dem Geburtsakt 2 ccm einer 1prozentigen Farbstofflösung erhalten hatte. 4 Stunden nach der Geburt nahm die Intensität der Färbung der Neugeborenen schon etwas ab. Am folgenden Morgen waren sie bis auf eines von der Mutter angefressen, hatten jedoch ihre grüne Farbe noch behalten. Ein noch lebendes neugeborenes Tier war entfärbt. In den Versuchen dieser Serie befanden sich einige, in denen die Schwangerschaft der Mutter nach der Injektion noch 3 bis 4 Tage fortduerte. Die zuweilen unter den Augen des Beobachters zur Welt kommenden Jungen erwiesen sich als ungefärbt, dagegen hatte das Fruchtwasser, das während des Geburtsaktes ausfloß, eine grüne Färbung. Eine gleiche Fruchtwasserfärbung bemerkte man auch bei der Autopsie schwangerer Tiere. Alkaliechtgrün dringt in die Gewebe des Embryo ein und geht dann aus dem Organismus in das Fruchtwasser über. Bei fortschreitender Schwangerschaft entfernt sich die Färbung schnell aus dem Organismus der Mutter, ein weiteres Eindringen des Farbstoffes in den Embryo hört daher auf; das schon eingedrungene Quantum wird aus dem Embryo in das Fruchtwasser geleitet, ein Vorgang, der zur völligen Entfärbung von Mutter und Embryo führen kann. Nur das Fruchtwasser legt noch Zeugnis ab von dem stattgehabten Experiment. Das Alkaliechtgrün, welches durch die Plazenta in das Gefäßsystem des Embryo leicht eindringt,

ruft in den begrenzenden Ektodermzellen der Plazenta keine Veränderungen hervor, die zu einer Störung des Stoffwechsels mit seinen gefährlichen Folgen für die Entwicklung des Embryo führen. In dieser Hinsicht gehört Alkaliechtgrün in eine Gruppe mit Eosin und Fluorescin.

Die sehr schwach zu unterscheidende vitale Färbung kann man mikroskopisch in den Zellen des Dotterentoderms in frischem Zustand sehen. Nach einiger Zeit jedoch verblaßt auch hier die Färbung und es entschwindet jede Möglichkeit den mattgrünen Schimmer der protoplasmatischen Körnchen durch das Mikroskop festzustellen.

Wenn ich zum Schluß eine kurze Zusammenfassung meiner Beobachtungen geben darf, so sind zunächst drei Beziehungen des Protoplasmas der Ektodermzellen der Plazenta zu verschiedenen Farbstoffen, welche in dem sie umspülenden mütterlichen Blute zirkulieren, zu erwähnen. Die biochemischen Eigenschaften der protoplasmatischen Elemente dieser Zellen sind gegenüber den verschiedenen Farbstoffen sehr verschieden. Ebenso ungleich reagiert der ganze Zellorganismus auf die mit ihm in Kontakt kommenden Farbstoffe. Er bewahrt den normalen Turnus biochemischer Prozesse, indem er gierig und in großen Quanten das Trypanblau und Trypanrot aufnimmt; er zeigt kein Sinken seiner vitalen Eigenschaften, erfüllt seine spezifischen Funktionen und bleibt gesund. Gegenüber anderen Farbstoffen wie Neutralrot und Methylenblau haben die Organe dieser Zellen eine geringere chemische Verwandtschaft, nehmen dieselben daher in geringerem Maße auf und erleiden bei der Färbung pathologisch-chemische Veränderungen, die sich in dem biologischen Verhalten der Zellen dokumentieren. Der Biochemismus der letzteren verliert seinen Turnus, die spezifischen Funktionen werden gestört, der Zellorganismus erkrankt in größerem oder geringerem Grade. Die Diagnose dieser Erkrankung kann nur auf Umwegen gestellt werden, durch Erscheinungen im System derjenigen physiologischen Prozesse, in denen diese chemischen Funktionen der Zelle eine wesentliche Rolle spielen. Der Charakter dieser Erkrankung liegt außerhalb der Grenze einer mikroskopischen Diagnose. Es handelt sich nicht um strukturelle, sondern um nicht sinnfällige chemische Veränderungen in einzelnen Protoplasmalelementen. Dem Studium der chemischen Veränderungen des Protoplasma muß ein solches seines normalen Chemismus vorausgeschickt werden, und in dieser Richtung eröffnet die Methode der vitalen Färbung eine große Perspektive. Nur mit dieser Methode können wir tiefer in die Biologie der lebenden Zelle eindringen.

Es war der Zweck der mitgeteilten Versuche, zu prüfen, ob ein Übergang von Farbstoff vom Organismus der Mutter in den des Embryos überhaupt möglich ist. Deswegen wurden auch ausschließlich vitale Farbstoffe angewandt. Die Resultate, welche mit Fluorescin, Eosin und Alkaliechtgrün erhalten wurden, zeigen die Unmöglichkeit, eine Beziehung der protoplasmatischen Elemente der Ektodermzellen der Plazenta zu den Farbstoffen unmittelbar zu beobachten. Hier aber stellt sich, wie oben erwähnt, die Möglichkeit ein, auf Umwegen in dieser Hinsicht

Schlüsse zu ziehen. Das Protoplasma dieser Zellen übernimmt den Farbstoff gleich demjenigen anderer Zellen des Tierorganismus leicht und schnell aus dem Blut des mütterlichen Sinus und entfernt ihn ebenso schnell aus dem Körper, wobei derselbe in das Blut des fotalen Gefäßsystems übergeführt wird. Die Summe der beobachteten Tatsachen zeigt, daß die physiologischen Prozesse, an denen die Lebensfähigkeit dieser Zellen beteiligt ist, ganz normal fortschreiten, daß also eine spezifische Funktionsstörung dieser Zellen nicht eintritt und der Biochemismus derselben sich nicht ändert.

Im allgemeinen kann ich erwähnen, daß einige Farbstoffe in den Embryo nicht übergehen, im Protoplasma der begrenzenden Ektodermzellen der Plazenta festgehalten werden und keine pathologisch-chemischen Veränderungen in den letzteren hervorrufen. Andere Farbstoffe gehen sehr leicht in den Organismus des Embryo über, fügen seiner Entwicklung keinen Schaden zu und rufen keine pathologisch-chemischen Veränderungen im Protoplasma der begrenzenden Ektodermzellen der Plazenta hervor. Die dritte Gruppe endlich bilden diejenigen Farbstoffe, welche teilweise in den Organismus des Embryo übergehen, aber nur nachdem sie pathologisch-chemische Veränderungen im Protoplasma der begrenzenden Ektodermzellen der Plazenta hervorgerufen haben. Sie erweisen sich als schädlich für die Entwicklung des Embryos, während die ersten beiden Farbstoffgruppen durch eine fast völlige oder absolute Unschädlichkeit für den Tierorganismus charakterisiert sind.

Es liegt nahe, daß wenn wir von einer schützenden Kraft des biologischen Filters, das von der Natur an der Grenze des Gefäßsystems zwischen Mutter und Embryo geschaffen ist, sprechen, wir dieselbe in den chemischen Eigenschaften derjenigen protoplasmatischen Elemente zu suchen haben, die sich unserem Auge in Form von gefärbten Körnchen bei Anwendung der Methode der vitalen Färbung darstellen.

#### IV.

### Systematische Lichtungs- und Dickenmessungen der großen Arterien und ihre Bedeutung für die Pathologie der Gefäße.

(Aus dem Pathologischen Institute der Universität München.)

Von

Iwakichi Kani aus Morioka (Japan).

(Mit 1 Textfigur.)

Seitdem von Virchow die Enge der Aorta in ätiologischen Zusammenhang mit Chlorose, Hämophilie und andern Blutkrankheiten gebracht worden ist, hat diese Anomalie in der Pathologie eine große Rolle gespielt. Während Vir-