

stoffliche Einstellung zur Melaninproduktion gewinnen. Durch diese zellart-fremde Leistung entarten sie in ihrem spezifischen Chemismus. Damit wird aber auch ein der Zelle von der Organogenese her inhärentes Gesetz ausgelöst, wonach durch eine molekulare Änderung der spezifischen Zellkonstitution die selbständige Wucherungsfähigkeit der Zelle ausgelöst wird: die Zelle wird durch die primäre Entartung ihres spezifischen Funktionschemismus sekundär zur Tumorzelle.

Erklärung der Abbildungen auf Taf. VI.

- Fig. 1. Melanose der Kälberlunge. Man erkennt den scharf gezeichneten Läppchenaufbau, zwischen-durch allenthalben tiefschwarze, scharf abgekantete melanotische Lungenläppchen.
- Fig. 2. Lungenläppchen, zum Teil in intensiver Melaninproduktion begriffen. Das interlobuläre Bindegewebe ist frei von Melanin.
- Fig. 3. Melaninführende Gefäß- und Nervenstraße im Querschnitt aus der Tiefe des Coriums. *a* die breiten kollagenen Gewebsbündel, die sich nach allen Richtungen aufs engste durchflechten und so die Lederhaut aufbauen. Dieses Eigengewebe des Coriums ist stets frei von Melanin. *b* Arterien. *c* Venen. *d* Lymphgefäße und Nerven, deren Wandelemente das Melanin aufweisen.
- Fig. 4. Drei zusammenliegende Hautnervenäste im Schräg- bzw. Querschnitt aus dem lockeren Stratum subcutaneum. Die perineuralen Lymphscheiden sind stark pigmentiert.
- Fig. 5. Lymphsinus aus dem obersten Streifen des Coriums mit zu- und abführendem Lymphgefäß. Die Wandendothelien sind zum großen Teil melaninhaltig.
- Fig. 6. Melaninproduzierende Endothelien der Lymphsinus, die den Trachealknorpeln unmittelbar anliegen. Das gleiche instruktive Bild gewähren die Wandendothelien des subduralen Lymphraumes im Rückenmark.

XXVII.

Über die vitale metachromatische Färbung mit Sulforhodamin.

(Aus dem Königl. Institut für experimentelle Therapie und aus dem Georg Speyer-Hause, Frankfurt a. M.)

Von

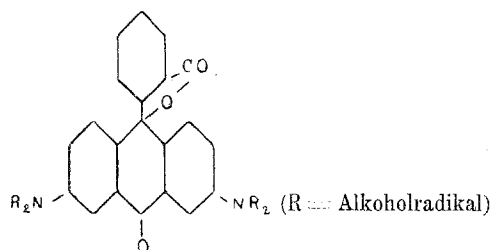
N. Andreev,

Vorstand des bakteriologischen Laboratoriums in Kiew.

(Hierzu Taf. VII.)

Als ich auf Veranlassung von Geheimrat Ehrlich über die vitale Färbung der Niere mit Sulforhodamin arbeitete, beobachtete ich bei der histologischen Untersuchung, daß die nach Zenger behandelten Nieren sich manchmal nicht nur rosarot, sondern auch violett und blau färbten. Diese Erscheinung veranlaßte mich, die vitale Färbung mit Sulforhodamin genau zu studieren.

Sulforhodamin ist ein rosaroter Farbstoff, dessen genaue chemische Zusammensetzung Fabrikgeheimnis ist. Die Formel von Rhodamin ist folgende:



Wahrscheinlich tritt hier noch die Gruppe SO^3 hinzu.

Bei den Tierversuchen wurde der Farbstoff subkutan in wässriger Lösung und einer Verdünnung von 1 : 150, 1 : 110, 1 : 75 und 1 : 50 injiziert (1 cem auf 20 g Körpergewicht). Zu den Experimenten dienten fast ausschließlich Mäuse; andere Tiere nur in äußerst beschränkter Anzahl. Nach der Injektion färbten sich die Tiere fast augenblicklich. Schon nach 5 Minuten machte sich die Färbung an der Haut des Schwanzes, der Ohren und der Schnauze bemerkbar, nach wenigen weiteren Minuten wird auch eine Färbung des Urins wahrnehmbar. In den meisten Fällen ist die Färbung der Haut schon nach einer Stunde so ausgeprägt, daß später keine weitere Steigerung der Färbung mehr beobachtet werden kann. Die Intensität der Färbung ist verschieden, in den meisten Fällen bleiben die intensiv gefärbten Mäuse länger tingiert und entfärben sich seltener als die andern. Bleibt die Entfärbung aus, so sterben die Mäuse 24 Stunden nach der Farbstoffinjektion. Über die Zeitdauer der Färbung gibt die nebenstehende Tabelle ein Bild.

Die Vergiftung tritt bei den Mäusen als allgemeine Depression zutage. Manchmal kann man nach 10 bis 12 Stunden Krämpfe beobachten, die anfangs nur bei Erschütterung des Glases eintreten. Später stellen sich die Krämpfe von selbst ein, es tritt allgemeines Zittern auf, und meist erfolgt der Tod während der tetanischen Krämpfe. Die folgenden Ziffern zeigen die Anzahl der injizierten und die der gestorbenen Mäuse nach der Einspritzung von verschiedenen Dosen (alle 5 bis 6 Tage).

Verdünnung	gespritzt	tot	%
1/150	162	8	5 %
bis 1/110	238	26	11 %
bis 1/75	206	33	16 %
bis 1/50	114	19	17

Zum Zweck einer größeren Übersichtlichkeit ist noch Tabelle 2 angeführt, in der die Zahl der mit Sulforhodamin injizierten Tiere mit 100 angenommen und die Zahl der gestorbenen in Prozenten der ursprünglichen Anzahl ausgedrückt ist.

Verdünnung	geimpft	% gestorben
1/150	100	5 %
bis 1/110	95	15 %
bis 1/75	85	28 %
bis 1/50	72	40 %
bleibt	60	

	5 Minuten	15 Minuten	30 Minuten	45 Minuten	1 Stunde	2 Stunden und mehr
Haut	leichte Färbung	deutliche Färbung	fast vollständige Färbung		Färbung je nach dem Individuum.	Manchmal Anfang der Entfärbung.
Nieren	schwache rötliche Färbung der ganzen Niere; im Sammelharnkanal rote und violette Färbung	allgemeine rote Färbung, Auftauchen in der ganzen Niere von einzelnen Streifen roter und violetter Färbung	dasselbe in gestiegem Maße		Färbung je nach dem Individuum.	Bei der Entfärbung entfärben sich die Sammelharnkanäle als letzte.
Leber	leicht rot, violette Färbung der Zellenkerne	dasselbe intensiver, die violette Farbe streifenförmig	vollständige Färbung		Färbung je nach dem Individuum.	Manchmal Anfang der Entfärbung.
Gallenblase	gefüllt mit roter Flüssigkeit	Beginn der Bildung kleiner Knäuel von violetter Farbe	die Zahl der dunkelvioletten Knäuel wächst	dasselbe	Manchmal ganz gefüllt mit Knäuel violetter Farbe.	Manchmal nach 3 bis 4 Std. eine Verringerung der violetten Farbe.
Dünndarm	leicht rot gefärbt, Inhalt ungefärbt	intensiver gefärbt, Inhalt d. Zwölffingerdarms gefärbt	Inhalt des Dünndarms zur Hälfte manchmal violett gefärbt	Inhalt der ganzen Länge nach gefärbt	dasselbe	Inhalt gefärbt, noch viel später Beginn der Entfärbung.
Dickdarm	leicht rot gefärbt, Inhalt ungefärbt	intensiver gefärbt, Inhalt ungefärbt	Inhalt ungefärbt	Inhalt ungefärbt	Inhalt des Blinddarms zum Teil gefärbt	Inhalt zum Teil gefärbt. Gefärbte Absonderungen nach 3 bis 4 Stunden.

Die Entfärbung vollzieht sich verhältnismäßig langsam und ist fast vollkommen an der Haut erst nach einigen Stunden. Das Tempo steht scheinbar in Zusammenhang mit der jeweiligen Dosis. So ist die Entfärbungszeit für 1 : 150 im Mittel 8 Stunden; vor 4 Stunden wurde nie eine Entfärbung beobachtet. Bei der Dosis 1 : 110 war die mittlere Entfärbungszeit 11 Stunden; vor 5 Stunden trat keine Entfärbung ein. Bei 1 : 75 und 1 : 50 betrug die mittlere Dauer 12 Stunden, die schnellste Entfärbung ist 6 Stunden.

Die inneren Organe entfärben sich später als die äußeren, und noch später wird der Inhalt des Darmkanals entfärbt. Die Entfärbung der Haut tritt selten später als nach 20 Stunden ein. Von den 719 beobachteten Tieren wurden nur 10 später als nach 20 Stunden entfärbt; die späteste Entfärbung wurde nach 48 Stunden wahrgenommen. In einem einzigen Falle war das Tier erst nach $4\frac{1}{4}$ Tagen tot, nachdem es sich deutlich entfärbt hatte. Die andern Tiere, 2 weiße Ratten, 2 Meerschweinchen und 2 Kaninchen, wurden in denselben Proportionen gefärbt, wie die Mäuse, bei einer Verdünnung von 1 : 110. Da bei der Einspritzung der betreffenden Dosis ein zu großes Flüssigkeitsquantum genommen werden mußte, so wurden in Wirklichkeit diese Tiere mit einer Verdünnung von 1 : 50 injiziert. Die Färbung war ziemlich beträchtlich; die Entfärbung erfolgte nach 10 bis 24 Stunden; längere Zeit brauchte nur die Ratte.

Färbung der Organe. Die einzelnen Organe zeigten an Quetschpräparaten sowohl makroskopisch wie mikroskopisch ein verschiedenes Verhalten gegenüber dem Farbstoff: die einen lassen sich gar nicht färben, die andern färben sich schwach rot oder intensiv rot; die Nieren und die Leber rot und blauviolett; ungefärbt bleiben Speicheldrüsen, Milz, Pankreas, Nebennieren, Hoden, Eierstock, Großhirn, Kleinhirn, Rückenmark, Nerven, Knochen, Linsen, Embryonen. Rot gefärbt werden Verdauungskanal, seröse Häute, Harnröhre, Harnblase, Lunge, Uterus, Plazenta, Augenflüssigkeit, rote Blutkörperchen, Haut, Gallenblase, Knorpel, Lymphdrüsen (intensiv rot) und Gefäße (intensiv rot); rot und blauviolett werden Nieren und Leber gefärbt.

Um genauer festzustellen, wie sich während des Lebens die Färbung der Nieren und Leber gestaltet, wurden die untersuchten Tiere mit Chloroform getötet und sofort untersucht. Die Organe wurden im Gefriermikrotom geschnitten. Es ist in diesem Falle mit ziemlichen Schwierigkeiten verbunden, brauchbare Schnitte zu erhalten, denn bei dem Ausbreiten derselben dürfen keine wässrigen Flüssigkeiten gebraucht werden, weil der Farbstoff in Wasser leicht löslich ist. Man mußte nicht zusammengerollte Schnitte herstellen und sie direkt vom Messer aufs Glas legen, wobei sich Luftblasen schwer vermeiden lassen; außerdem verlieren die Schnitte beim Abnehmen vom Messer leicht ihre ursprüngliche Form.

Beim Schneiden der Nieren tritt noch die Schwierigkeit hinzu, daß am wünschenswertesten ganze Schnitte aus der Mitte des Organs sind. Die Schnitte wurden in Lävulose eingebettet, die Deckgläser mit Paraffin umrandet.

Man bemerkt an den frischen Nierenschnitten, daß die rote, violette und blaue Farbe sich hauptsächlich in den *Henle* sehen Schleifen findet sowie in dem Ende der Sammelharnröhrchen. Fig. 2. Schnitt einer Mäuseniere einige Stunden nach der Einspritzung des Farbstoffes.

Die Absonderung des Farbstoffes in den Nieren beginnt am Ende der Sammelharnröhrchen, wie an Fig. 3 ersichtlich. Diese Figur stellt den Schnitt der Niere einer Maus dar, die 15 Minuten nach der Einspritzung des Farbstoffes getötet war. Während die ganze Niere orangegelb gefärbt ist, sieht man am Ende der Sammelharnröhrchen deutlich die Ausscheidung der violetten Farbe. Bei der Entfärbung der Niere ist dasselbe Bild zu beobachten, die violette Farbe verschwindet am spätesten aus den Sammelröhrchen.

Fig. 5, Taf. VII zeigt den Schnitt einer Mäuseniere einige Stunden nach der Injektion des Farbstoffes. Die Tiere waren mit Chloroform getötet. Am Präparat sind die intensiv rot gefärbten Gefäße und die violett bzw. blauviolett gefärbten Zellkerne zu sehen.

Die Nieren- und Leberschnitte der Mäuse, die nicht vital gefärbt waren, wurden bei Färbung mit wässriger 1 prozentiger Lösung von Sulforhodamin nur rosarot. An den frischen Leberschnitten vital gefärbter Mäuse bemerkt man, daß sie rot gefärbt sind, die Zellkerne aber violett und blauviolett.

Fig. 6, Taf. VII stellt den Schnitt der Leber einer Maus dar 45 Minuten nach Beginn der Färbung. Die letztere Abbildung zeigt ziemlich große Anhäufung des violetten Farbstoffs, gleichsam in einer Linie und wahrscheinlich entsprechend einem Gallengang. Derartige Anhäufungen von dunkelvioletter Farbe trifft man fast stets in großer Anzahl in der Gallenblase, wie es Fig. 4, Taf. VII zeigt, die die Gallenblase einer Maus einige Stunden nach Beginn der Färbung darstellt. Aus der Gallenblase geht der Farbstoff in den Zwölffingerdarm über und färbt dort den Inhalt zuerst des Dünndarms, dann des Dickdarms rot und violett.

Meist kann man nach 3 bis 4 Stunden die Färbung des Darminhalts wahrnehmen; dieselbe ist lediglich durch den Einfluß der Galle zu erklären, da die Obduktion der durch Chloroform getöteten Tiere zeigte, daß der Mageninhalt ungefärbt bleibt, während sich der des Darms entsprechend den ersten Portionen der gefärbten Galle tingiert, so daß man in der ersten Zeit nach der Einspritzung bei der Obduktion die Grenze des gefärbten und ungefärbten Inhalts deutlich erkennen kann, während der ganze Darmkanal bereits rot gefärbt ist.

Wie schon erwähnt, lassen die Nierenpräparate nach *Zenker* nicht immer die Doppelfärbung genügend deutlich erkennen. Selbst die am besten gelungenen Präparate sind gewöhnlich an der Peripherie fast entfärbt infolge der Lösung des Farbstoffes bei der vorhergehenden Bearbeitung. Es zeigt sich, daß die größte Löslichkeit der blauen und violetten Farbe zukommt, denn an der ganzen Peripherie des Präparats ist gewöhnlich eine blaßrote Farbe zu sehen. In den Harnkanälen, manchmal in der Nähe der Peripherie tritt eine hellblaue und blaue Farbe auf. Hier kann man auch eine Färbung der Zellkerne wahrnehmen. Weiter ab von der Peripherie erscheint die Farbe schon violett, und in der Gegend der *Henle* sehen Schleifen dunkelviolet. Die blaue und violette Farbe wird in den Harnsammelkanälen nicht immer beibehalten.

Aus dem oben erwähnten Grunde galt es, eine bessere Fixationsmethode des Farbstoffes zu finden. Bei einer früheren Arbeit über vitale Färbung erwies sich als solches Mittel 10 prozentiges Formalin¹⁾. Im gegebenen Falle war Formalin unbrauchbar, da der Farbstoff sich darin löst. Eine Fixierung wurde versucht mit *Müller* scher Flüssigkeit, Sublimat, Sublimatessig, Pikrinsublimat, Pikrinsäure, absolutem Alkohol, Azeton und Pyridin. Es zeigte sich, daß Fixation in Sublimat die besten Resultate gibt. Da nun bei der Behandlung nach *Zenker* ohnehin das Sublimat in Anwendung kommt, so wird es verständlich, daß alle ausprobierten Methoden keine besseren Resultate lieferten als die *Zenker* sche.

¹⁾ *Goldmann*, Die äußere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der vitalen Färbung. Beiträge zur klinischen Chir. Bd. 64, H. 1, 1909, S. 207.

An den besten nach Zenker erhaltenen Präparaten (s. Fig. 10, Taf. VII) ist eine blaue und violette Färbung in den Harnröhren wahrzunehmen, ebenfalls eine solche der Zellkerne des Epithels der Harnröhre, der Blutgefäße, der Glomeruli, der Zellkerne der glatten Muskeln der Arterienwände und der Zellkerne des Bindegewebes. Die hyalinen Zylinder werden besonders hellrot gefärbt (s. Fig. 10, Taf. VII).

Nach Zenker fixierte Nieren- und Leberschnitte von Mäusen, die nicht vital gefärbt sind, werden bei Färbung mit wässriger 1 prozentiger Lösung von Sulforhodamin gleichmäßig rosarot.

Eine Tinktion der Zellkerne in der Leber vital gefärbter Mäuse gelingt an fixierten Präparaten viel seltener als in den Nieren. Gewöhnlich erscheint die Leber nur schwach rosa gefärbt. An einem besonders gelungenen Leberpräparat (s. Fig. 11, Taf. VII) lassen sich die violett gefärbten Zellkerne beobachten, doch sind auch hier Partien, in denen die Zellkerne ungefärbt bleiben. Es handelt sich in diesem Falle um einen pathologischen Prozeß: fettige Degeneration, die ziemlich oft an der Leber der sich nicht entfärbenden Massen auftritt.

Die von mir beobachteten und geschilderten Erscheinungen einer metachromatischen vitalen Färbung lassen auf chemische Prozesse im Organismus schließen. Leider ist die genaue chemische Zusammensetzung des Sulforhodamins Fabrikgeheimnis; die Unkenntnis der genauen Formel erschwert aber in hohem Grade die Aufklärung der chemischen Reaktion¹⁾. Aus diesem Grunde konnte die Deutung der Befunde zurzeit noch nicht erklärt werden; jedenfalls bestätigt diese Erscheinung wieder einmal den Wert der vitalen Färbung für die Aufdeckung chemischer Prozesse im lebenden Organismus.

Erklärung der Abbildungen auf Taf. VII.

- Fig. 1. Stellt den frischen (ohne Behandlung) Schnitt der Niere einer Maus dar, die 15 Minuten nach der Einspritzung des Farbstoffes getötet war. Vergrößerung: 15 mal.
- Fig. 2. Frischer Schnitt einer Mäuseniere (Markssubstanz) einige Stunden nach der Injektion des Farbstoffes. Vergrößerung: Zeiss Apochrom. Brennweite des Objektivs — 16, Okul. komp. — 4.
- Fig. 3. Frischer Schnitt der Leber einer Maus, 15 Minuten nach Beginn der Färbung. Vergrößerung: Zeiss Apochrom. Brennweite des Objektivs — 8, Okul. komp. — 6.
- Fig. 4. Frische Gallenblase einer Maus einige Stunden nach der Einspritzung. Vergrößerung: 15 mal.
- Fig. 5. Schnitt einer Mäuseniere (Rindenssubstanz) einige Stunden nach der Injektion. (Nach Zenker behandelt). Vergrößerung: Leitz. Objektiv — 6. Zeichenokular.
- Fig. 6. Schnitt der Leber einer Maus einige Stunden nach der Injektion des Farbstoffes. (Nach Zenker behandelt). Vergrößerung: Leitz. Objektiv — 6. Zeichenokular.

¹⁾ Bekannt ist lediglich, daß aus dem Rhodamin blaue und violette Farbstoffe erhalten werden, z. B. bei der Einführung von Phosphortrichlorid oder Pentachlorid, auch von aromatischen Aminen. Beilstein Bd. III, S. 573.

Fig. 2.

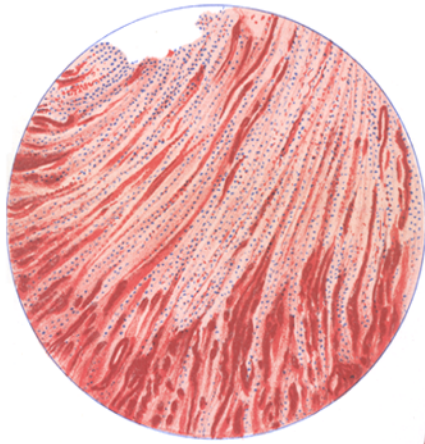


Fig. 1.



Fig. 6.

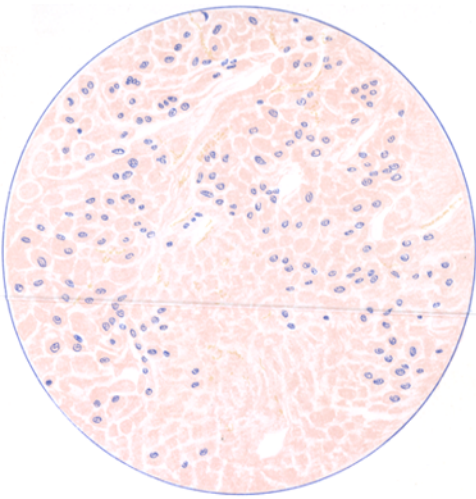


Fig. 4.



Fig. 5.

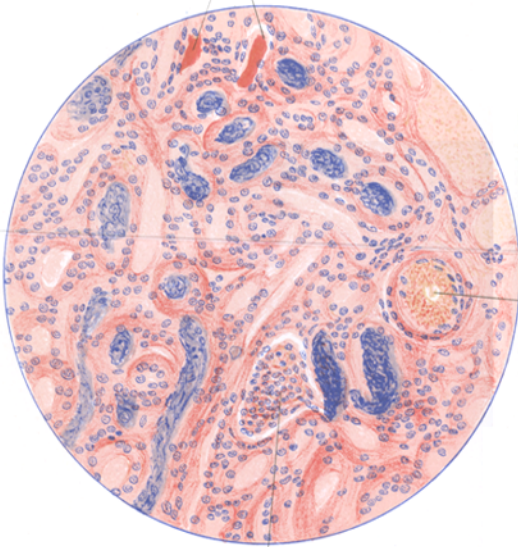


Fig. 3.

