

(Aus dem Med.-Chem. Institut der Prager deutschen Universität.)

Über die Differenzierung lebenden und toten Protoplasmas durch Methylgrün.

Von

Assistent Dr. Felix Haurowitz.

(Eingegangen am 30. Oktober 1922.)

In der neueren Literatur finden sich mehrfach Angaben über die merkwürdige Metachromasie lebenden Protoplasmas durch Methylgrün [vgl. *Georgievics*¹⁾, *O. Loew*^{2), 3)}]. Sie gehen auf die eingehenden Untersuchungen *Mossos*⁴⁾ zurück, der fand, daß lebende Leukocyten, Flimmerepithel der Froschrachenschleimhaut und andere lebende Zellen von Methylgrün violett gefärbt werden, allmählich jedoch — indem sie absterben — eine grüne Farbe annehmen. *Mosso* führte die Violettfärbung auf die alkalische Reaktion des lebenden, die folgende Grünfärbung auf die saure Reaktion des toten Protoplasmas zurück, wobei er sich wesentlich darauf stützte, daß Methylgrün mit Kalilauge versetzt eine violette Farbe annehme. *O. Loew* vermutet, daß der violette Farbton durch eine Abspaltung der Methylchloridgruppe des Methylgrün bewirkt werde, d. h. durch einen Übergang in Methylviolett.

Die im folgenden mitgeteilten Versuche sollten im wesentlichen zwei Fragen beantworten:

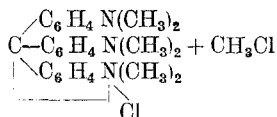
1. Welcher Prozeß liegt der Violettfärbung lebender Zellen durch Methylgrün zugrunde?

2. Weshalb tritt die Grünfärbung erst später — beim Absterben — auf?

1.

Die Wiederholung der Versuche *Mossos* an frischen Blutleukocyten, Eiterleukocyten und Flimmerzellen des Froschrachens ergab vollständige Übereinstimmung mit seinen Resultaten. Bloß scheint in seinen Versuchen die Violettfärbung intensiver gewesen zu sein als in den meinigen. Auch *Mossos* Beobachtung, daß Methylgrün mit Alkali Violettfärbung gibt, konnte ich vorerst bestätigen. Da die Carbinolbase des Methylgrün farblos ist, mußte aber in erster Linie an eine Verunreinigung des Farbstoffes gedacht werden. Es wurde hier wie bei allen folgenden Versuchen das käufliche Methylgrün des Handels (Präparate der Agfa Berlin und solche von Dr. Hollborn,

Leipzig) verwendet, und zwar wie von *Mosso* angegeben in 0,2proz. Lösung mit 1% NaCl. Bekanntlich wird Methylgrün.



aus Methylviolett (Hexamethylpararosanilin) durch Behandlung mit Methylchlorid gewonnen. Das in den Handel gebrachte Zinksalz ist meist mit Methylviolett verunreinigt. Ich entfernte letzteres durch 3 maliges Ausschütteln mit Chloroform [nach *Mayer*⁵⁾], das Chloroform durch Eindampfen am Wasserbad bis auf das halbe Volum der 0,2proz. Lösung, füllte wieder das ursprüngliche Volumen auf und fand nun weder beim Alkalisieren noch bei der Vitalfärbung von Flimmerzellen oder Leukocyten des Blutes oder Eiters Violettfärbung. Eine solche trat außerordentlich deutlich an den Leukocyten eines mir entnommenen frischen Blutstropfens auf, wenn demselben eine in gleicher Weise zubereitete Lösung von Methylviolett zugesetzt wurde. Damit glaube ich gezeigt zu haben, daß als *Ursache der Violettfärbung das Methylviolett* anzusehen ist, *das gelegentlich in größeren Mengen dem Methylgrün des Handels beigemengt* sein mag.

2.

In den mit reinem (von Methylviolett befreitem) Methylgrün gefärbten Präparaten blieben die Flimmerepithelien, ebenso die Leukocyten vorerst farblos, färbten sich dann allmählich grün. Im frisch entnommenen Eiter einer männlichen gonorrhoeischen Urethra zählte ich unter 100 Leukocyten:

15 Min. nach Entnahme:	88 farblos,	12 grün
3 Std. „ „	32 „	68 „

Im frisch punktierten Eiter eines Douglasabscesses einer Frau:

10 Min. nach Entnahme:	62 farblos,	38 grün
12 Std. „ „	30 „	70 „
24 „ „	24 „	76 „
36 „ „	4 „	96 „

Die Leukocyten wurden in der feuchten Kammer beobachtet, ein Tropfen Eiter wurde (nach *Mosso*) mit einem Tropfen Methylgrünlösung versetzt. Die Zahlen bringen auch vielleicht zum Ausdruck, daß in dem chronischen Douglas-Absceß — wie ja zu erwarten ist — weniger lebende Leukocyten vorhanden sind als in dem frisch sezernierten gonorrhoeischen Urethraleiter.

Es liegt nahe, von einer „Widerstandsfähigkeit des lebenden Protoplasmas“ zu sprechen, die man ja bei zahlreichen anderen Farbstoffen beobachten kann. Eine solche Erklärung des refraktären Verhaltens der lebenden Zellen kann gerade beim Methylgrün vorerst nicht befriedigen, da seine chemische Konstitution jener des leicht eindringenden Methylvioletts so ähnlich ist.

*Pappenheim*⁶⁾, der sich mit dem Studium des Methylgrün am eingehendsten befaßt hat, nimmt als Ursache der Widerstandsfähigkeit der meisten Gewebe gegen Methylgrün seine schwere Dissoziabilität an, d. h. die Schwierigkeit, das Farbsalz zu spalten, um so die Entstehung einer Verbindung zwischen Farbbase und „Gewebsäure“ zu ermöglichen. Derselbe Autor führt die elektive Färbung des basophilen Kerngerüsts mit seinen methylgrünhaltigen Farbstoffmischungen darauf zurück, daß bloß das stark nucleinsäure Kerngerüst instande sei, das schwer zersetzliche Salz des Methylgrün zu spalten und damit zu fixieren (a. a. O. S. 212). Tatsächlich hat bereits *Mosso* beschrieben, daß Methylgrün von frischem Blut entfärbt wird, wenn man letzteres in großem Überschuß zusetzt. In analoger Weise hat kürzlich *Rebello*⁹⁾ in Bromthymolblau einen Farbstoff gefunden, der durch die postmortale Säuerung einen Farbumschlag von Blau nach Gelb erleidet. Analog wäre die elektive Färbung des sauren Kerngerüsts zu erklären. Während alle anderen basischen Farbstoffe das Plasma überfärben (*Pappenheim*, a. a. O. S. 182), erreicht beim Methylgrün bloß das Chromatin die Acidität, um die Entstehung der farblosen Carbinolbase zu verhindern.

Um den Einfluß der Reaktion zu prüfen, habe ich Puffergemische verschiedener Wasserstoffionenkonzentration nach *Sørensen*⁷⁾ hergestellt und zu je 10 ccm derselben 6 Tropfen der 0,2 proz. Methylgrünlösung im 1,0 proz. NaCl zugefügt.

pH	Puffergemisch:				Resultat:
10,0	6,0 ccm	Borat	+	4 ccm Natron	farblos
9,0	8,6 „	„	+	1,4 ccm Salzsäure	farblos
8,0	9,4 „	sec. Phosph.	+	0,6 ccm prim. Ph.	farblos
7,0	6,4 „	„	+	3,6 „ „ „	nahezu ganz entfärbt
6,0	1,2 „	„	+	8,8 „ „ „	wenig entfärbt
5,0	0,1 „	„	+	9,9 „ „ „	unverändert grün
3,8	9,6 „	Glykokoll	+	0,4 „ Salzsäure	unverändert grün
3,0	8,2 „	„	+	1,8 „ „	etwas gelblichgrün
2,0	5,2 „	„	+	4,8 „ „	mehr gelblichgrün, entfärbt
1,0	0,0 „	„	+	10,0 „ „	stark entfärbt, gelblich

Die Entfärbung bei alkalischer Reaktion ist durch die Bildung der farblosen Carbinolbase bedingt, die Entfärbung bei saurer Reaktion durch Umwandlung in das gelbe 2-säurige Salz. Sie erfolgte bei den mittleren Werten der Wasserstoffionenkonzentration sehr langsam und erreichte erst nach etwa 12 Stunden Konstanz. Der Farbstoff selbst bleibt nur bei p_H 4 und 5 unverändert. Nun reagiert der frische Eiter [*Hammarsten*⁸⁾] stets alkalisch, wird aber allmählich durch Bildung von Milchsäure, Fettsäuren, Glycerophosphorsäure und anderen Säuren stark sauer (*Hammarsten*). Demnach erschien mir anfangs die Annahme gerechtfertigt, daß das Farbsalz des Methylgrüns zwar in die Zellen schnell eindringt, jedoch bei der Reaktion des lebenden Protoplasmas nicht beständig ist, indem es unter Abgabe einer HCl-Gruppe an die Puffer des Gewebes entfärbt wird. Gegen einen solchen Erklärungsversuch sprach aber die Tatsache, daß die *Entfärbung in vitro sehr langsam* vor sich geht, am Objektträger nach obigem aber augenblicklich erfolgen müßte, da überhaupt keine Grünfärbung ein-

tritt. Im weiteren Verlauf meiner Untersuchung gelangte ich zu einer Auffassung, die diesem Einwand Rechnung trägt. Im Gegensatz zu Methylviolett ist Methylgrün in Äther oder Chloroform nahezu unlöslich, vermag also die lipide Grenzmembran der Zellen erst nach ihrem postmortalen Zerfall zu durchdringen. Für diese Annahmen sprechen die beiden folgenden Versuche.

1. Frischer Blutstropfen mit Methylgrün versetzt; keine Färbung; auf Alkoholzusatz sofort Färbung aller Leukocyten wie auch der Erythrocyten.

2. Die gleiche intensive Färbung tritt bei Erhitzen des Objektträgers auf.

Änderung der Reaktion ist wohl weder durch den Alkohol, noch durch das Kochen zu erwarten, wohl aber Zerstörung der Membranlipide der Zellen.

Zusammenfassung.

1. Die *Violett*färbung lebender Zellen durch Methylgrün *beruht auf Verunreinigung durch beigemengtes Methylviolett*. Eine Entmethylierung des Methylgrüns findet nicht statt.

2. Das *refraktäre Verhalten* der lebenden Zellen *gegen Methylgrün* *beruht auf der Lipoidunlöslichkeit des Farbstoffs*, seinem Unvermögen, die lipoidhaltige unversehrte Zellmembran zu durchdringen (im *Gegensatz zu Methylviolett*).

3. Daneben begünstigt vielleicht die postmortal eintretende Säuerung die Umwandlung der farblosen Base des Methylgrüns in das färbende einsäurige Salz.

Den Herren Dr. *Benda* (Deutsche gynäkologische Klinik) und Dr. *Pick* (Deutsche dermatologische Klinik) sei für die Übermittlung des Untersuchungsmaterials auch an dieser Stelle bestens gedankt.

Nachschrift.

Einer Anregung des Herrn Prof. *v. Georgievics* folgend habe ich untersucht, ob die gleichen Verhältnisse für die Wollfärbung Geltung haben. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt die folgende Zusammenstellung:

Vers. 1.	Wolle in 1‰ wäßriger Methylgrünlösung . .	keine Färbung
„ 2.	„ „ 1‰ alkohol. Methylgrünlösung . .	keine Färbung
„ 3.	„ „ 1‰ wäßriger Methylgrünlösung . .	keine Färbung
„ 4.	„ „ 1‰ wäßriger Methylviolettlösung . .	intensive Violettfärbg.

Die Wolle wurde stets 1 Stunde lang bei 80° in der Farbstofflösung gelassen. In Versuch 3 wurde vorher durch Extraktion mit Äther, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Petroläther und Alkohol (und zwar stets bei der Siedetemperatur des angewandten Lösungsmittels) die Faser vollkommen entfettet. Das Resultat zeigte keine Differenz gegen Versuch 1.

Aus Versuch 2 geht hervor, daß die Wollfaser ein anderes Verhalten als die untersuchten Zellen zeigt, denn die letzteren waren mit alkoholischer Methylgrünlösung färbbar. Allerdings darf nicht übersehen werden, daß die Wolle bloß dann als „gefärbt“ bezeichnet wird, wenn die Färbung nicht durch Wasser ausgewaschen werden kann, daß hingegen die Eigenschaft der toten Zellen, Methylgrün eindringen zu lassen, nicht mit Wasserechtheit der Färbung verbunden ist. Die Lipide hätten demnach keine Bedeutung für die Echtheit der Färbung (die wohl auf adsorptive Eigenschaften zurückzuführen ist); hingegen vermögen sie das Eindringen des Farbstoffes in die Zelle zu verhindern.

Nach Abfassung der Korrektur werde ich freundlichst aufmerksam gemacht, daß die störende Beimengung des Methylviolett bereits von *Unna* gelegentlich seiner Untersuchungen an *fixierten* Präparaten festgestellt wurde (*Unna*, Biochemie der Haut, 1913, S. 5). In der Literatur der Vitalfärbemethoden findet sich kein Hinweis auf diese Stelle, so daß sie mir dadurch entgangen ist.

Literaturverzeichnis.

- ¹⁾ *Georgievics*, Handbuch der Farbenchemie S. 22. 1922. — ²⁾ *Loew, O.*, Chemiker-Zeit. **45**, 417. 1920. — ³⁾ *Loew, O.*, Biochem. Zeitschr. **71**, 316. 1915. — ⁴⁾ *Mosso*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **113**, 397. 1888. — ⁵⁾ *Mayer*, zit. nach Encyclop. d. mikrosk. Technik **2**, S. 113. 1910. — ⁶⁾ *Pappenheim*, Grundriß der Farbenchemie S. 301. 1901. — ⁷⁾ *Sörensen*, Biochem. Zeitschr. **21**, 131. 1909. — ⁸⁾ *Hammarsten*, Lehrbuch der physiologischen Chemie S. 186. 1922. — ⁹⁾ *Rebello*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **86**, 615. 1922; zit. nach Ber. üb. d. ges. Physiol. u. exp. Pharmakol. **13**, 372. 1922.