

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Heidelberg. [Direktor:
Geheimrat *Ernst*.])

Über ein eigenümliches färberisches Verhalten der roten Blutkörperchen.

Von

Dr. Erich Eckstein,
Assistent am Institut.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 27. August 1923.)

Durch die von *Alzheimer* als Gliamethode angegebene Methylblau-Eosinfärbung werden Erythrocyten in auffallend eleganter Weise prachtvoll leuchtend rot dargestellt. Es lag nahe, diese Methode allgemein bei Hyperämien und Hämorrhagien anzuwenden. Der Erfolg entsprach jedoch nicht den Erwartungen. Wohl gelang die Rotfärbung in einem Teil der Präparate; häufig wurden die Erythrocyten jedoch ausnahmslos blau, und recht oft fanden sich im gleichen Schnitt rote und blaue neben- und durcheinander. Damit brachte die allgemeine Anwendung der *Alzheimer*-färbung neben einem partiellen Mißerfolg einen eigenartigen Befund: rote Blutkörperchen nehmen von 2 ihnen angebotenen Farbstoffen, dem Methylblau und dem Eosin, bald den einen, bald den andern an. Herr Geheimrat *Ernst* hat mich immer wieder auf diese eigenümliche Erscheinung aufmerksam gemacht und ihr nachzugehen angeregt; die im folgenden angeführten Untersuchungen sind aus diesen Anregungen heraus entstanden.

Die Betrachtung zahlreicher mit Methylblau-Eosin gefärbter Organschnitte ergab im ganzen mehr negative als positive Gesichtspunkte. Erythrocyten waren z. B. in der einen Leber rot, in der andern Leber blau. Sie waren innerhalb der Gefäße rot oder blau und waren es außerhalb der Gefäße. In einem *Zahnschen* Infarkt der Leber waren alle Erythrocyten rot. Bei einer embolischen Herdnephritis waren nicht nur die Erythrocyten in Gefäßen, sondern auch die in Kapselräumen und Harnkanälchen prachtvoll rot. Bei einer subakuten Glomerulonephritis waren die Erythrocyten in den prall gefüllten die Harnkanälchen umspinnenden Capillaren fast alle blau. In einem Ponsgliom fanden sich in den stark erweiterten Blutgefäßen nur blaue Erythrocyten, in den Capillaren des normalen Pongewebes unmittelbar daneben nur rote. Wohl als einziges positives Ergebnis konnte man feststellen, daß im Nervensystem (Gehirn und Rückenmark) die Neigung der Erythrocyten zur Blaufärbung eine recht geringe, in den übrigen Organen eine recht große ist.

Mit Notwendigkeit ergab sich aber ein Schluß: jene Umstimmung der Erythrocyten, die zur Veränderung der Färbbarkeit führt, findet erst nach dem Aufhören des Kreislaufes statt; „blaue“ und „rote“ Erythrocyten können nicht beim Lebenden präformiert sein, wenn wir bei der gleichen Leiche etwa in der Hirnrinde nur rote, in der Leber nur blaue Erythrocyten finden. Die Umstimmung der Färbbarkeit ist vielmehr eine Folge des nach Stillstand des Kreislaufs zur Dauerwirkung werdenden Organmilieus.

Aus diesen Erwägungen ergaben sich von selbst 2 Fragen:

1. Wie färben sich frisch dem Blutkreislauf entnommene Erythrocyten?
2. Wodurch läßt sich die Färbbarkeit solcher Erythrocyten experimentell umstimmen?

Für nicht vorbehandelte Erythrocyten wurde mit größter Wahrscheinlichkeit Rotfärbung angenommen; der weitere Plan war nun der, den Einfluß verschiedener chemischer Substanzen, von Toxinen, Tumorseßäften zu untersuchen.

Um die Gewebsverhältnisse einigermaßen nachzuahmen und die geplante Beeinflussung bequem zu ermöglichen, wurden die Erythrocyten in Agar eingebettet.

Der erste nach *Alzheimer* gefärbte Agargefrierschnitt bot nun einen sehr überraschenden, für die weiteren Untersuchungen schlagartig richtungangebenden Befund: ein halber Kubikzentimeter eben der Vene entnommenen Blutes wird in ein kleines angewärmtes Färbeschälchen (sogenanntes Salzfäßchen) gebracht, das Schälchen mit verflüssigtem auf etwa 48 Grad abgekühltem Agar aufgefüllt, und umgerührt. In wenigen Minuten ist der Blutagar erstarrt. Er wird nun sofort in Formol gebracht. Vom Moment der Venenpunktion bis zum Einbringen in Formol ist höchstens eine Viertelstunde verflossen; und doch färben sich die Erythrocyten nicht einheitlich. Rote und blaue Erythrocyten sind aber nicht regellos durcheinandergelegen, sondern ihr Vorkommen ist topographisch orientiert. Von außen nach innen folgen sich

1. eine schmale Zone roter Erythrocyten
2. eine breitere Zone blauer Erythrocyten
3. die zentral gelegene, rot gefärbte Hauptmasse der Erythrocyten.

Diese topographische Orientierung der verschieden gefärbten, völlig unvorbehandelten Erythrocyten drängte den Gedanken auf, die Ursache der verschiedenen Färbbarkeit in den verschiedenen Gasbindungszuständen des Hämoglobins zu sehen. Es wären also Unterschiede des Baues, die den Unterschied der Färbung bedingen. Die Frage wäre: wie färben sich reduziertes Hämoglobin, Oxyhämoglobin, Methämoglobin, Stickoxydulhämoglobin, Stickoxydhämoglobin, Cyanhämoglobin, endlich, welche Wirkung hat die Anlagerung der Kohlensäure an den Globinteil des Hämoglobins?

In diesen vorläufigen Mitteilungen sei nur über die Wirkung des Sauerstoffs, der Kohlensäure und eines indifferenten Gases berichtet, die Wirkung des Kohlenoxyds nur gestreift. Wir fragen uns also: wie wirkt Sauerstoffaufnahme oder -abgabe, Kohlensäureaufnahme oder -abgabe auf die Färbbarkeit der Erythrocyten?

Üben aber überhaupt die in Agar eingebetteten Erythrocyten die Funktion der Gasaufnahme und -abgabe aus? Um Aufschluß über diese Frage zu erhalten, betrachten wir die bei der Agareinbettung zu beobachtenden Vorgänge. Der durch Kochen verflüssigte Agar ist zunächst luftleer; die Erythrocyten dürfen an ihn einen großen Teil ihrer Gase abgeben. Dadurch und durch das Umrühren erhält der Agar wieder einen gewissen Luftgehalt. An dem Blut dokumentieren sich diese Vorgänge dadurch, daß es beim Zugießen des Agars zunächst ganz dunkel wird, diese Farbe aber schon in wenigen Sekunden während des Umrührens wieder in ein helleres Rot übergeht. Entnimmt man nun nach dem Erstarren den Blutagarkuchen dem Färbeschälchen, so erkennt man, daß die plane, an die Luft angrenzende Grenzfläche deutlich heller rot ist als die konvexe Grenzfläche, die an das Glas des Schälchens angrenzte. Der Block wird nun halbiert; es zeigt sich ein Farbunterschied der Schnittfläche: im Anschluß an die plane Grenzfläche findet sich ein etwa 1 mm breiter hellroter Streifen, während die übrige Schnittfläche dunkler rot ist. Halbierung des Halbblocks ergibt Viertelblöcke, deren beide Seitenflächen den erwähnten Farbunterschied zeigen. Bereits in wenigen Minuten ändert sich das Bild: auch an der konvexen und der neugeschaffenen künstlichen Grenzfläche treten schmale hellrote Randstreifen auf. Alle Randstreifen werden von 5 zu 5 Minuten breiter, und nach etwa $\frac{3}{4}$ Stunden sind die Seitenflächen gleichmäßig hellrot. Durchschneidet man nun den Block, so zeigt sich auf der Schnittfläche noch der Querschnitt eines kleinen dunkelrot gebliebenen Kernes.

Es findet also durch das Stehen an der Luft eine Beeinflussung des eingebetteten Blutes statt, und zwar nicht nur von den beiden natürlichen (plane und konvexe), sondern auch von der neugeschaffenen künstlichen Grenzfläche aus.

Bringt man den Agarblock in eine Kohlensäureatmosphäre oder in eine von Kohlensäure durchperlte Ringerlösung, so wird er tief dunkelblaurot. Diese Änderung kann durch Einbringung in Sauerstoffatmosphäre oder in sauerstoffdurchperlte Ringerlösung weitgehend, wenn auch nicht vollständig rückgängig gemacht werden.

Weitere Probleme bietet die Fixierung des Blutes. Versetzt man Blut im Reagenzglas mit dem gebräuchlichen, mit Leitungswasser oder mit destilliertem Wasser hergestellten Formol, so erfolgt Hämoglobinaustritt, und der völlige Verlust der Färbbarkeit ist die Folge. Diesen

Hämoglobinaustritt kann man dadurch verhindern, daß man das Formol isotonisch macht, am besten, indem man es mit Ringerlösung ansetzt (ein Teil Formalin auf 4 Teile Ringer) und entsprechend der angewandten Formalinmenge Kochsalz zugibt. Dieses *isotonische* Formol verhindert den Wassereintritt und damit den Hämoglobinaustritt. Ist es aber wirklich ein Fixationsmittel in dem Sinn, daß es auch den gegebenen Gasbindungsstand des Erythrocyten fixiert? Formol enthält Sauerstoff und Kohlensäure entsprechend dem herrschenden Partialdruck dieser Gase und der gegebenen Temperatur. Muß aber nicht mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß etwa ein kohlensäurerreicher Erythrocyt an ein kohlensäurearmes Formol einen großen Teil seiner Kohlensäure abgibt, wie er an ein nicht isotonisches Formol sein Hämoglobin abgibt? Ist dies aber der Fall, dann ist der Erythrocyt nicht in dem Sinn fixiert, daß der beim Einbringen in das Fixationsmittel gegebene Zustand festgehalten wurde. Das Formol muß also nicht nur *isotonisch* sein zur Verhinderung des Hämoglobinaustritts, es muß auch *isopneumatisch* sein zur Verhinderung des Gasaustritts.

Aus den angestellten Erwägungen ergeben sich eine Reihe von Fragestellungen und Vermutungen: wird die Färbbarkeit der Erythrocyten durch Aufnahme oder Abgabe von Sauerstoff oder Kohlensäure beeinflußt? Färben sich unvorbehandelte Erythrocyten verschieden, wenn man sie in einem nur Sauerstoff, nur Kohlensäure oder nur ein indifferentes Gas enthaltenden Formol fixiert? Ergeben sich weitere Unterschiede, wenn man mit Sauerstoff vorbehandelte Erythrocyten in einem nur Sauerstoff enthaltenden, mit Kohlensäure vorbehandelte in einem nur Kohlensäure enthaltenden Formol fixiert (*isopneumatische Fixation*)? Wenn der Gasbindungsstand des Erythrocyten für seine Färbung maßgebend ist, so darf die Färbbarkeit bereits fixierter Erythrocyten durch Gasbehandlung nicht mehr beeinflußt werden. Endlich werden wir erwarten, daß andere Gewebszellen, Zellkerne, Interzellulärsubstanzen ihre Färbbarkeit durch Gasbehandlung nicht ändern.

Ich möchte nun über das Ergebnis der Untersuchung einer großen Zahl von Blutagarblöcken berichten. Die Befunde an der Peripherie und im Zentrum des Blockes seien gesondert betrachtet.

Der Befund der Blockperipherie läßt bereits makroskopisch 2 Haupttypen unterscheiden: der eine zeigt sich am unvorbehandelten und an dem mit Sauerstoff, Wasserstoff oder Kohlenoxyd vorbehandelten Block, der andere an dem mit Kohlensäure vorbehandelten Block. Im 1. Fall zerfällt die Peripherie in 2 Zonen: eine schmälere rote Außenzone und eine breitere blaue Innenzone; dabei unterbleibt an der Aufliegefläche des Blocks in Formol die Ausbildung der peripheren Differenzierung. Im 2. Fall ist die Peripherie in ganzer Breite rot; auch sie ist an der Aufliegefläche im Fixationsmittel deutlich weniger ausgebildet.

Mikroskopisch erkennt man an den Erythrocyten der Peripherie mehrere Arten von Veränderung, die sich einteilen lassen in Änderungen der Färbbarkeit und in gröbere morphologische Veränderungen. Beide sind vielfach miteinander kombiniert. Die Unterschiede in der Färbbarkeit bestehen darin, daß der Erythrocyt sich rot oder blau färbt oder die angebotenen Farben ablehnt, also seine gelbliche Eigenfarbe erkennen läßt. Die morphologischen Veränderungen sind: Vergrößerung der Erythrocyten, Auftreten intraglobulärer Granula und der völlige Hämoglobinverlust (Hämolyse). Peripherie Erythrocyten sind (trotz des Einschlusses in Agar!) vielfach deutlich größer als zentrale. Die Maße betragen, mit dem Okularmikrometer gemessen, über 4—5 Teilstriche für die vergrößerten peripheren, $3\frac{1}{2}$ —4 Teilstriche für die zentralen (Zeiß Immersion 2 mm, Okular 7×). Recht mannigfach ist das Bild der granulierten Erythrocyten: es gibt fein- und grobgranuläre, spärlich- und dichtgranuläre; die Farbe der Granula im gefärbten Präparat ist rot, braun, rotgelb bis gelb bis gelbweiß. Die Granula finden sich auf rotem, farblosem, auch auf blauem Grunde. Im Dunkelfeld ist der granulierte Erythrocyt nicht mehr optisch leer, schwarz, mit grünlichem (rote) oder rötlichem (blaue) Rand, sondern er zeigt auf schwarzem Grunde entsprechend der Größe, Dichte und Farbe seiner Granula rot, gelbweiß oder blau aufleuchtende Bildungen. Ein granulierter Erythrocyt ist eher größer, auf keinen Fall kleiner als ein nichtgranulierter; Faltungs- und Schrumpfungserscheinungen können also keine Rolle spielen. Der völlige Hämoglobinaustritt führt als schwerste Veränderung zum völligen Verlust der Färbbarkeit; es bleibt ein im Dunkelfeld optisch leerer oder ganz fein granulärer Erythrocytenschatten.

Wir untersuchen nun zunächst das mikroskopische Verhalten der Peripherie eines unvorbehandelten Agarblocks. Die rote Außenzone kommt dadurch zustande, daß in ihrem Bereich die Erythrocyten rot gefärbt sind. Im Gegensatz zu den zentralen ebenfalls roten Erythrocyten zeigen die peripheren nicht die Bikonkavform mit ungefärbter Delle, sondern sie sind in ihrer ganzen Fläche gleichmäßig rote Scheiben. Im Vergleich zu den zentralen sind sie etwas vergrößert oder gleichgroß. Im Dunkelfeld sind sie optisch leer, einige wenige granulär. Auf die etwa 4 Teilstriche des Okularmikrometers (Zeiß Objektiv 16 mm, Okular 7×) breite rote Außenzone der Peripherie folgt eine 25—30 Teilstriche breite blaue Innenzone. Die Bikonkavform ist hier mehr oder weniger angedeutet; im Dunkelfeld sind die Erythrocyten optisch leer. Die Grenze der blauen Innenzone gegen das rote Zentrum ist eine fast lineare; nur wenige der anderen Farbe finden sich in schmaler Zone über diese Grenze hinaus. Bemerkenswert ist, daß die beschriebene periphere Differenzierung an der Aufliegefläche des Blockes im Formol ausbleibt.

Behandelt man den Agarblock mit Sauerstoff, Wasserstoff oder Kohlenoxyd, so ergeben sich gewisse Änderungen. Der periphere rote Saum kann etwas breiter werden; es treten hier mehr bis zahlreiche granulierte Formen auf. Nicht selten findet sich eine mehr oder weniger intensive Hämolyse, nicht nur in der roten Peripherieaußenzone, sondern auch in der äußeren Hälfte der blauen Peripherieinnenzone. Die Breite der Peripherie schwankt etwas, jedoch nur wenig; *niemals, auch nicht bei mehrere Stunden langer Vorbehandlung, dringt die blaue Peripherieinnenzone wesentlich gegen das Zentrum vor.*

Die beobachteten Unterschiede der Peripherie verschieden vorbehandelter Agarblöcke sind quantitativer, nicht qualitativer Natur; sie verlieren weiter dadurch an Bedeutung, daß Blut verschiedener Personen auch bei gleicher Vorbehandlung sich durchaus nicht immer ganz gleich verhält. Beispielsweise kann die Menge granulierter Formen oder die Intensität der Hämolyse recht beträchtlich wechseln. Offenbar ist die Resistenz der Erythrocyten gegen die genannten Beeinflussungen eine verschiedene.

Fixierung eines mit einem Gas vorbehandelten Blocks in isopneumatischem Formol hat allseitige Ausbildung der Peripherie und eine etwas größere Breite der blauen Zone zur Folge. Stets ist jedoch die Grenze gegen das rote Zentrum eine lineare.

Sicher ist auf Grund der erwähnten Tatsachen, daß die Ausbildung der Peripherie erst im Formol erfolgt; kann man sie doch z. B. an der planen Grenzfläche willkürlich entstehen lassen oder verhindern, je nachdem man diese Grenzfläche in Formol nach oben sehen oder als Aufliegefäche dienen läßt. Welche Bewandtnis hat es aber mit der Rotfärbung der Erythrocyten in der Außenzone und der Blaufärbung in der Innenzone? Ich glaubte zunächst die Rotfärbung durch den Sauerstoff, die Blaufärbung durch die Kohlensäure der Luft bedingt. Bereits die schweren morphologischen Veränderungen mußten diese Vermutung zweifelhaft erscheinen lassen. Wäre sie richtig, so müßte bei einem mit Sauerstoff vorbehandelten Block, der in einem nur Sauerstoff enthaltenden Formol fixiert wird, die blaue Innenzone, bei einem mit Wasserstoff vorbehandelten Block, der in einem nur Wasserstoff enthaltenden Formol fixiert wird, die rote Außenzone nicht gebildet werden. Beides ist nicht der Fall; eine rote Außenzone findet sich auch bei völliger Abwesenheit von Sauerstoff, eine blaue Innenzone auch bei völliger Abwesenheit von Kohlensäure.

Wesentlich anders verhält sich die Peripherie eines mit Kohlensäure vorbehandelten Blocks. Die Erythrocyten sind hier durchweg intensiv rot, grobgranuliert und bieten im Dunkelfeld ein prachtvolles Bild (rote Granula auf schwarzem Grunde). Bikonkavformen finden sich nur vereinzelt. Die Breite dieser roten Zone beträgt 35—40 Teil-

striche des Okularmikrometers (Zeiß Objektiv 16 mm, Okular 7×), gegen beispielsweise 4 Teilstriche der roten Außenzone und 26 Teilstriche der blauen Innenzone eines mit Sauerstoff vorbehandelten Blocks. Fixiert man einen vorher der Kohlensäurewirkung ausgesetzten Block in isopneumatischem Formol, so verbreitert sich die rote Randzone auf etwa 60 Teilstriche (Querdurchmesser des ganzen Schnitts nicht ganz 400 Teilstriche). Dabei ist die Granulierung in den äußeren Teilen der Randzone weitgehend verschwunden, die Erythrocyten sind zum großen Teil wieder homogen rot, im Dunkelfeld optisch leer. Der brüskie Wechsel des Gasmilieus führt also zu weitergehenden morphologischen Veränderungen als die Belassung unter Kohlensäurewirkung auch während des Vorgangs der Fixierung.

Die granulierte Erythrocyten der Kohlensäureperipherie sind weiterhin beeinflußbar. Sauerstoffbehandlung bringt keine wesentliche Änderung, wohl aber Wasserstoff- und Kohlenoxydbehandlung. Wasserstoff läßt das Rot der Peripherie, von einem ganz schmalen Randsaum abgesehen, völlig verschwinden. Die Erythrocyten sind nun klecksig blau oder schattenhaft blau, im Dunkelfeld fast alle optisch leer. Der Agar enthält kleinste blaue Körnchen und ist zu einem plumpen Maschenwerk mit kleineren und größeren Maschenräumen zerrissen, offenbar eine mechanische Wirkung des nach Entfernung aus der Kohlensäureumgebung plötzlich freiwerdenden Gases.

Weniger intensiv ist die Kohlenoxydwirkung. Auch hier ist die Granulierung weitgehend geschwunden. Die Erythrocyten sind nun zunächst in einer etwa 20 Teilstriche breiten Zone (Objektiv 16 mm Okular 7×) blau, schattenhaft oder mehr oder weniger klecksig, weiterhin ganz hellrot, wenig oder überhaupt nicht granuliert.

Wir erkennen also bei der Beeinflussung der Blockperipherie eine Sonderstellung der Kohlensäure; Blöcke, die mit den übrigen Gasen behandelt sind, und nicht behandelte Blöcke zeigen keine wesentlichen Unterschiede. Wasserstoff und Kohlenoxyd zeigen aber eine recht deutliche Wirkung, wenn sie Erythrocyten antreffen, die durch Kohlensäure bereits stark verändert sind. Die Veränderungen der Blockperipherie scheiden für unsere Fragestellung aus; die Erythrocyten in Organschnitten sind rot oder blau, aber nicht so weitgehend morphologisch verändert.

Das durch andere Färbbarkeit der Blutkörperchen schon makroskopisch hervorgehobene Zentrum wiederholt die Form des ganzen Blocks; d. h. wie auf dem Blockquerschnitt die 3 Grenzlinien sich in 2 rechten und 1 spitzen Winkel treffen, so treffen sich auch die Grenzlinien des Zentrumquerschnitts gegen die Peripherie in 2 rechten und 1 spitzen Winkel. Wie verhalten sich nun mikroskopisch die zentral gelegenen Erythrocyten?

In einem sofort nach dem Erstarren in Formol gebrachten Agarblock färben sich die Erythrocyten im Zentrum rot. Sie zeigen Bikonkav-

form, mit großer ungefärbter zentraler Delle und schmalem rotem Randwulst (scheinbar Rettungsringform). Der Rand ist rund oder häufiger leicht eingekerbt (beginnende Schrumpfung). Im Dunkelfeld sind die Erythrocyten optisch leer. Behandelt man den Agarblock vor der Fixierung mit Sauerstoff, Wasserstoff oder Kohlenoxyd, so zeigt sich keine Änderung der Färbbarkeit, Form und des Dunkelfeldbefunds der zentralen Erythrocyten. Anders bei Behandlung mit Kohlensäure. Bei genügend langer Einwirkung ist schon makroskopisch das Zentrum des Schnittes blau. Alle Erythrocyten zeigen sich bei mikroskopischer Betrachtung blau gefärbt. Aber auch ihre Gestalt hat sich verändert. Sie sind unter Wahrung ihres Durchmessers und der Bikonkavform gequollen, was sich in einer Verbreiterung des Randwulstes und einer entsprechenden Verkleinerung der zentralen Delle äußert; die scheinbare Rettungsringform ist plumper geworden. Die periphere Begrenzung ist meist eine kreisrunde, was im Gegensatz zu der sehr häufig leicht eingekerbten Peripherie nicht oder anders vorbehandelter Blutkörperchen hervorgehoben zu werden verdient. Nicht ganz selten finden sich etwas kleinere, homogen blaue Scheiben. Mit Kohlensäure vorbehandelte Erythrocyten sind homogen blau, im Dunkelfeld optisch leer.

Hat die Kohlensäure nicht lange genug eingewirkt, so wird nicht das ganze Zentrum blau, sondern es bleibt je nach der Dauer der Einwirkung ein größerer oder kleinerer roter Kern bestehen. Dieser Kern wiederholt nicht in Gestalt seines Querschnittes die Gestalt des ganzen Blocks, sondern zeigt eine ovaläre Begrenzungslinie gegen die bereits blau gewordenen peripheren Teile des Zentrums. Mikroskopisch ist die Grenze zwischen dem roten Innenbezirk und dem blauen Außenbezirk eine recht breite, indem sich in breiter Zone rote und blaue Erythrocyten gemischt finden; auch in den zentralen Teilen sind blaue Erythrocyten nicht ganz selten.

Wir haben nun gesehen, daß durch Kohlensäureeinwirkung eine Umstimmung der Erythrocyten im Sinne der Blaufärbung erreicht wird. Wenn aber Kohlensäurebindung Blaufärbung bedingt, dann muß sich der Erythrocyt nach Entfernung der Kohlensäure, also nach Wiederherstellung des Status ante wieder rot färben. Das ist in der Tat der Fall. Wird ein Blutagarblock nach Kohlensäurevorbehandlung Sauerstoff ausgesetzt, so färben sich die Erythrocyten seines Zentrums wieder rot, und das Zentrum erreicht wieder seine ursprüngliche Ausdehnung und Form. Die letztere Tatsache fällt besonders bei Agarblöcken auf, bei denen infolge kürzerer Vorbehandlung die Kohlensäurewirkung nicht ins Innerste des Zentrums vorgedrungen ist. Behandelt man solche Blöcke mit Sauerstoff, Wasserstoff oder Kohlenoxyd, so ist die Folge im wesentlichen die gleiche, wenn auch das Ausmaß der Veränderung ein etwas verschiedenes: der kleine rote, ovalär sich abgrenzende Innenkern wird viel größer, der blaue, nach außen folgende

Saum wird entsprechend kleiner; dabei ist der größer gewordene rote Kern nicht ovalär geblieben, sondern seine Grenzlinien bilden wieder zwei rechte und einen spitzen Winkel.

Unvorbehandelt in ein nur Sauerstoff oder nur Wasserstoff enthaltendes Formal gebrauchte Agarblöcke zeigen Rotfärbung der zentralen Erythrocyten. Enthält dagegen das Formal nur Kohlensäure, so wird der blaue äußere Streifen bedeutend breiter und dringt somit in das äußere Gebiet des Zentrums vor. Viel intensiver wird diese Wirkung, wenn man nicht Nativblut, sondern in Ringerlösung gewaschene Erythrocyten in Agar einbettet. Der blaue Streifen ist nun noch viel mehr verbreitert, und auch in dem kleinen roten zentralen Kern finden sich neben den roten sehr zahlreiche blaue Erythrocyten.

Die durch Kohlensäurezufuhr erreichte färberische Umstimmung der Erythrocyten wird also durch Kohlensäureentziehung wieder rückgängig gemacht. Wie verhalten sich nun fixierte unvorbehandelte Erythrocyten gegen Kohlensäurebehandlung und fixierte, mit Kohlensäure vorbehandelte Erythrocyten gegen Sauerstoffbehandlung? Beide bleiben unverändert: der fixierte Erythrocyt ist durch Kohlensäure nicht mehr beeinflußbar; wurde er nach Kohlensäurezufuhr fixiert, so bleibt der Versuch des Kohlensäureentzugs wirkungslos, d. h. der Erythrocyt bleibt rot bzw. blau.

Wenn wirklich die Bindung der Kohlensäure an die Globinkomponente des Blutfarbstoffs der Blaufärbung der Erythrocyten zu Grunde liegt, so können wir eine Umstimmung der Färbbarkeit bei anderen Zellen, bei Zellkernen und bei Interzellulärsubstanzien durch einfache Gasbehandlung nicht erwarten. In der Tat werden Kerne oder Protoplasma der Leberzellen, der Nierenepithelien, der Schlingenelemente der Nierenglomeruli, kollagene Fasern durch Sauerstoff- oder Kohlensäureeinwirkung in keiner Weise beeinflußt; alle genannten Gebilde färben sich bei den erwähnten Vorbehandlungen nach *Alzheimer* stets blau.

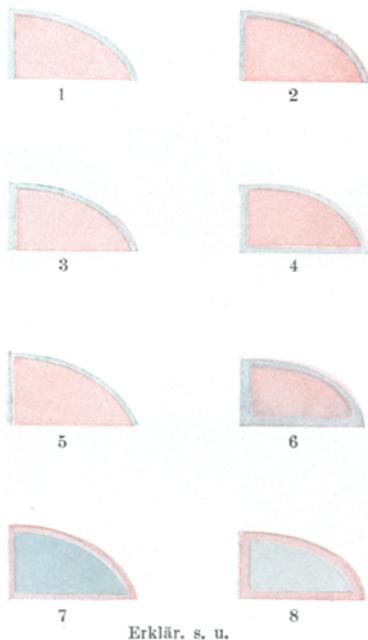
Fassen wir die beobachteten Tatsachen unter Ausschuß der Befunde an der Blockperipherie zusammen: frisch eingebettete unvorbehandelte und mit Sauerstoff, Wasserstoff und Kohlenoxyd vorbehandelte Erythrocyten färben sich nach *Alzheimer* rot. Bei Behandlung mit Kohlensäure färben sie sich blau. Läßt man der Kohlensäureeinwirkung eine Prozedur folgen, die den Wiederaustritt der Kohlensäure zur Folge hat (Sauerstoff, Wasserstoff, Kohlenoxydeinwirkung), so tritt wieder Rotfärbung ein. Der Gasgehalt des zur Fixierung dienenden Formols ist für die Färbbarkeit unvorbehandelter Erythrocyten nicht gleichgültig. Kohlensäurebehandlung fixierter Erythrocyten hat keine Blaufärbung zur Folge. Bei nach Kohlensäureeinwirkung fixierten Erythrocyten kann die Blaufärbung durch Sauerstoff, Wasserstoff oder Kohlenoxydbehandlung nicht mehr verhindert werden. Andere Zell- und

Gewebelemente zeigen keine Beeinflussung ihrer Färbbarkeit durch Zuführung oder Entziehung der respiratorischen Gase.

Unter Berücksichtigung aller genannten Tatsachen dürfte die Schlußfolgerung berechtigt sein: *Ein kohlensäurefreier bzw. sehr wenig Kohlensäure enthaltender Erythrocyt färbt sich nach Alzheimer rot; ein kohlensäurereicher färbt sich blau. Gleichgültig ist es, ob das Hämoglobin reduziert ist oder Sauerstoff oder Kohlenoxyd gebunden hat; der Erythrocyt färbt sich in diesen Fällen stets rot.*

Damit dürfte aber auch die Möglichkeit gegeben sein, die in der Natur, d. h. am Sektionsmaterial zu beobachtende Zwiespältigkeit der Erythro-

Fall 1.



Erklär. s. u.

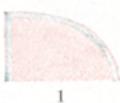
cytenfärbung zu erklären: Blaufärbung deutet auf postmortale Kohlensäurereproduktion hin. Damit wird ohne weiteres die Tatsache verständlich, daß gerade im Zentralnervensystem eine Blaufärbung so selten vorkommt; denn hier hört sofort nach dem Tode die Funktion und sehr bald auch der Stoffwechsel auf, während andere Organe viel länger, unter günstigen Bedingungen zum Teil viele Stunden lang leben und Stoffwechsel zeigen.

Anhang: Zur Technik.

Das Blut wird in einem Reagensglas mit etwas Citratringlerlösung aufgefangen. Man kann dieses *Nativblut* benützen oder durch mehrfaches Waschen in Ringerlösung eine Blutkörperchenaufschwemmung

herstellen. Einbettung in $5\frac{1}{2}$ proz. Ringeragar, der nicht mit Überdruck hergestellt sein darf. Der kalottenförmige Blutagarblock wird durch zwei zu einander rechtwinklig stehende Halbierungsschnitte gevierteilt. Ein solcher Viertelblock hat 2 natürliche (plane und konvexe) und 2 künstliche (durch die Vierteilung entstandene) Grenzflächen.

Fall 2.



1



2



3

Erklärt. s. u.

Fall 3.



1



2



3



4



5

Erklärt. s. u.

Grenzflächen sind solche Oberflächen des Blockes, von denen aus die Erythrocyten beeinflußt werden, und zwar in Oberflächennähe anders als in Oberflächenferne. Daraus ergeben sich die Begriffe *Peripherie* und *Zentrum*. Die Gasbehandlung erfolgt in großen Gaswaschflaschen, deren zuführendes Glasrohr eine Korkscheibe durchbohrt. Die Blöcke werden auf die Korkscheibe gestellt oder in die von dem Gas durchperlte Ringerlösung

gelegt. Durch Nachschaltung einer oder mehrerer weiterer Waschflaschen kann der Gasdruck gesteigert und das Rückströmen atmosphärischer Luft verhindert werden. Nach dem gleichen Prinzip erfolgt die Fixierung in Sauerstoff-, Wasserstoff-, Kohlensäureformol (unipneumatische Fixation). Die Formollösung wird etwa 2 Stunden von dem gewünschten Gas durchperlt, hierauf der zuführende Gummischlauch der Formolflasche und der abführende einer nachgeschalteten Flasche abgeklemmt. Das Ganze bleibt bis zur vollendeten Fixierung (mindestens 24 Stunden) stehen.

Die Einhaltung der oben angegebenen Konzentration des Fixierungsmittels ist unbedingt erforderlich; bei schwächerer Konzentration sind die Resultate andere.

Durchschneidet man einen unfixierten Block, so entsteht an jedem Teilstück eine neue Grenzfläche; durchschneidet man einen fixierten Block, so entsteht eine Schnittfläche, denn fixierte Erythrocyten werden nicht mehr beeinflußt.

Wird ein fixierter Blutagarblock parallel zu einer künstlichen Grenzfläche durchschnitten, so bestehen zwei Möglichkeiten: führt man den Schnitt sehr nahe an der Grenzfläche, so entsteht ein Flachschnitt der Peripherie; führt man ihn in mehr als Peripheriebreite von ihr entfernt, so ergibt sich ein Querschnitt durch Peripherie und Zentrum. Hieraus folgt, daß auf das Mikrotom nicht eine Grenzfläche, sondern eine neu gesetzte Schnittfläche zu legen ist.

Die Schnitte werden mit dem Gefriermikrotom hergestellt, etwa 40μ dick. Die Färbung erfolgt in der üblichen Weise: ein Tag Glabeize, 2 Stunden Phosphormolybdänsäure, 1 Stunde *Mannsche* Lösung. Differenzieren in 96 proz. Alkohol, Aufziehen auf Deckglas, Abtrocknen, Xylol, Canadabalsam.

Legt man Wert auf die Darstellung der Erythrocytenform, so empfiehlt sich Fixierung des Nativbluts im Reagensglas mit dünnerem Formol (1 Teil Formalin auf 9 Teile Ringer, dazu die entsprechende Menge Kochsalz); Färbung der Schnitte mit Hämalaun-Eosin. Eine Mitfärbung des Agars wird durch kurze Differenzierung in Salzsäure-Alkohol verhindert. Die Methode ergibt auch brauchbare Leukocytenbilder.

Erklärung der Abbildungen.

Fall 1.

Nativblut, in Agar eingebettet. Gasbehandlung in durchperlter Ringerlösung $1\frac{1}{2}$ mal vergrößert.

1. unvorbehandelt.
2. 2 Stunden Sauerstoffeinwirkung.
3. 2 Stunden Kohlenoxydeinwirkung.
5. 2 Stunden Wasserstoffeinwirkung.
7. 2 Stunden Kohlensäureeinwirkung.
- 4., 6., 8. Gleiche Vorbehandlung wie 3., 5. u. 7. Fixation in isopneumatischem Formol.

Man beachte das Ausbleiben der peripheren Differenzierung an der Aufliegefläche bei Block 1, 2, 3 u. 5, ihre allseitige Ausbildung bei der isopneumatischen Fixation, da der Block hierbei von dem durchströmenden Gas ständig bewegt wird.

Fall 2.

Ringeraufschwemmung gewaschener Erythrocyten, in Agar eingebettet. Gasbehandlung auf der Korkscheibe der Gaswaschflasche. $1\frac{1}{2}$ mal vergrößert.

1. unvorbehandelter Block.

Die rote Peripherieaußenzone ist hier breiter, daher bereits makroskopisch sichtbar.

2. 2 Stunden Kohlensäure.

Die rote Peripherie ist so schmal, daß sie makroskopisch nicht erkennbar ist.

3. 2 Stunden Kohlensäure, hierauf

1 Stunde Sauerstoff.

Man beachte den bläulich schimmernden Kern in dem wieder rot gewordenen Zentrum.

Fall 3.

Nativblut in Agar eingebettet. Gasbehandlung in durchperlter Ringerlösung. 2 mal vergrößert.

1. 1 Stunde Kohlensäure.

Die Kohlensäurewirkung ist noch nicht bis zur Blockmitte vorgedrungen. Ovale Abgrenzung des rot gebliebenen Kerns.

2. Kohlensäure 1 Stunde, hierauf

Sauerstoff 1 Stunde.

3. Kohlensäure 1 Stunde, hierauf

Wasserstoff 1 Stunde.

4. Kohlensäure 1 Stunde, hierauf

Kohlenoxyd 1 Stunde.

Bei 2, 3 und 4 ist das rote Innengebiet viel größer geworden und ahmt die Form des ganzen Blockes nach. Der rote Rand bei 2 gut erhalten, bei 3 kaum sichtbar, bei 4 sehr blaß.

5. Kohlensäure 1 Stunde;

Fixation;

Sauerstoff 1 Stunde.

Ein Einfluß der Sauerstoffbehandlung ist nicht erkennbar.
