

(Aus dem Pharmakologischen Laboratorium der Militär-medizinischen Akademie
in Petersburg [Vorstand: Prof. N. Krawkow].)

Versuch einer Anwendung der Vitalfärbungsmethode an isolierten Organen^{1).}

Von

Prof. Th. Ssyssojew,

Prosektor am Obuchowschen Prof. Netschajew-Krankenhaus in Petersburg.

(Eingegangen am 2. November 1923.)

Ich habe den Weg der Erforschung von isolierten Organen aus folgenden Gründen betreten. Wenn die Vitalfärbung, wie aus Literaturangaben ersichtlich ist, als ein morphologisches Kriterium gelten kann bei der Beurteilung, ob die Zelle lebend oder tot, ob sie normal oder pathologisch verändert ist — so wäre es ja äußerst erwünscht, mit diesem Kriterium an die Untersuchung von isolierten Organen heranzutreten. In letzteren haben wir ja Gebilde, die sich selbst vollkommen überlassen sind, da sie von den Einflüssen des zentralen Nervensystems und von den Einwirkungen der im Blut zirkulierenden Inkrete isoliert sind, und somit ihren spezifischen, wenn auch bis zu einem gewissen Grade veränderten, physiko-biologischen Status aufweisen. Die zahlreichen allbekannten Versuche von Prof. N. P. Krawkow und seinen Schülern an isolierten Organen (Herz, Uterus, Niere, Nebenniere, Milz und Ohr), durch welche bewiesen worden ist, daß diese ihre Funktionen bewahren, gaben mir vollen Anlaß, zu erwarten, daß die Vitalfärbungsmethode hier mit vollem Erfolge angewandt werden kann.

Indem auf Grund erwähnter Versuche festgestellt worden ist, daß die Funktion der überlebenden Organe dauernd ist, was zweifelsohne auf fortbestehende biochemische und biophysikalische Vorgänge in den Zellen und Geweben zurückzuführen ist — konnte ich hoffen, daß dieselben Vorgänge, die — wie es scheint — auch die Vitalfärbung bedingen, mir die Möglichkeit geben würden, mittels der letzteren manche Fragen der normalen und pathologischen Histologie, speziell der Hämatologie, zu klären.

Ich hatte dabei hauptsächlich Untersuchungen an Organen des Menschen im Sinne, denn die Vitalfärbungsmethode beim Menschen,

¹⁾ Vortrag gehalten auf dem Ersten Kongreß der Russischen Pathologischen Gesellschaft (16.—22. IX. 1923).

wie sie an Tieren angewandt wird, d. h. in Form intravenöser Einspritzungen, die an Sterbenden angewandt werden könnte, stieß ja auf wohl erklärliche Hindernisse.

Ein Versuch in dieser Richtung wurde schon im Jahre 1913 von *Cesaris-Demel*¹⁾ am isolierten Kaninchenherz unternommen; derselbe ließ durch das Herz Pyrrolblau- und Isaminblaulösungen in *Ringer-Lockescher* Flüssigkeit hindurch (1: 100 000). Bei der mikroskopischen Untersuchung konnte nur eine diffuse Durchfärbung des Gefäßendothels und eine „Penetration“ von feinsten Farbenteilchen in diesen Zellen festgestellt werden; *Goldmanns* „Pyrrolzellen“ konnten in den Geweben nicht festgestellt werden.

Ich habe zu diesem Zweck 40 Versuche im Laboratorium von Prof. *N. P. Krawkow* ausgeführt und habe noch nicht alle gestellten Fragen gelöst. Deshalb sehe ich diese Versuche als orientierende an — bloß als ein Feststellen jener Bedingungen, unter denen das zu erwartende Resultat positiv ausfallen könnte. Ich wollte nämlich die Bedingungen finden, unter denen eine Speicherung der Farbe in allen Zellen des retikuloendothelialen Apparates und in den Epithelien des oberen Abschnittes der Nierenharnkanälchen stattfinden kann.

Ich teile alle Versuche in 3 Gruppen:

1. 4 Versuche an isolierten Organen des Frosches,
2. 33 Versuche an Organen der Warmblüter (Meerschweinchen, Kaninchen, Hund) und Mensch,
3. 3 Versuche an Kaninchen in toto, d. h. ohne Isolierung von Organen, nach einer vorhergehenden vollständigen Entblutung und einer Durchspülung der Gefäße mit *Ringer-Lockescher* Flüssigkeit.

Die Methodik wurde ausführlich und öfters in den Arbeiten von Prof. *N. P. Krawkow* und seinen Schülern beschrieben, und so will ich sie hier nicht näher erörtern.

Erste Versuchsreihe.

Es wurden beim Frosch Herz und Leber untersucht, wobei bei der Untersuchung der letzteren die Kanüle in die Vena abdominalis eingeführt wurde. — Die Organe wurden in den Apparat nach 1½ Stunde bzw. nach 1 Stunde nach ihrer Isolierung gebracht. Eine Ausnahme bildete ein Herz, das mittels einer Pipette mit *Ringer-Lockescher* Flüssigkeit durchspült und im Laufe von 20 Stunden vor dem Versuch aufbewahrt wurde, indem es auf mit *Lockescher* Flüssigkeit durchtränkte Watte gelegt und mit einem Glase überdeckt wurde. Die Versuchsdauer betrug 4½—9 Stunden. Beim Frosch wurde ausschließlich

¹⁾ *Cesaris-Demel*, A., Sull'azione delle sostanze coloranti vitali e sopravitali sul cuore isolato di coniglio (Atti Soc. toscana di Scienze naturali, 28. Pisa 1912). Ref. Zentralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. 24, Nr. 16, 17, S. 787. 1913.

Carmin angewandt, in gesättigter Lithium-carbonicum-Lösung gelöst, und zwar in einer Konzentration 1 : 100 ccm *Ringer-Locke*scher Flüssigkeit.

In allen Fällen, wo das Herz untersucht wurde, wurde vorerst reine *Ringer-Locke*sche Flüssigkeit ohne Farbe durchgeleitet, bis die rhythmische Herztätigkeit hergestellt war, was im Laufe von einigen Minuten erreicht werden konnte. Diese Regelmäßigkeit der Herzkontraktionen wurde, wie es aus den Kymogrammen zu ersehen war, jedesmal gestört beim Beginn der Durchleitung von Farbe — es trat immer eine Arhythmie auf. Diese Störung war aber von kurzer Dauer, das Herz hörte auf zu reagieren, und seine Kontraktionen gewannen die frühere Regelmäßigkeit. Nur in einem Experimente, wo das isolierte Herz vorher 20 Stunden gelegen hatte, gelang es, Kontraktionen von Kammern zu bekommen, dieselben waren unregelmäßig und selten; zum Schluß des Experimentes, d. h. nach 3 Stunden, verschwand auch diese Unregelmäßigkeit.

Das Herz wurde vom Apparat heruntergenommen, indem es noch schlug, wenn auch seine Tätigkeit nun geschwächt war.

Das Froschherz, sowohl wie auch das Herz anderer Tiere, begann schon 10—15 Min. nach dem Beginn der Durchströmung seine Farbe merklich zu verändern, indem dieselbe einen rötlichen Ton annahm; letzterer wurde im weiteren allmählich stärker, bis die Farbe schließlich dunkelrot wurde.

Die mikroskopische Untersuchung ergab eine Ablagerung der Farbe in den Endothelien der Herzräume in Form kleiner Granula von blaßroter Farbe. Manche Endothelzellen sind vergrößert, auch trifft man diese Zellen in losgelöstem Zustande an. Das Muskelgewebe enthält keine Farbe. Im Epikard werden Fibroblasten angetroffen, deren Protoplasma und Kern diffus gefärbt sind.

Im Herz, das 20 Stunden gelegen hatte, war die Speicherung in den Endothelien von geringerem Maße, diese Zellen wurden mit Mühe aufgesucht. Die diffuse Färbung der Kerne von Fibroblasten und auch teilweise der Kerne von Muskelzellen ließ sich dagegen öfter feststellen als in den anderen Experimenten.

Der Versuch mit der Leber ergab eine deutlich ausgeprägte Ablagerung der Farbe in Form von rosa Kernen nur in den *Kupfferschen* Zellen, alle anderen Zellen reagierten nicht auf die Farbe — es ließ sich keine Ablagerung der Farbe im Protoplasma und keine Durchfärbung der Kerne feststellen. Es fehlte auch die Reaktion seitens der Gefäßwand.

Versuche an Organen der Säugetiere und des Menschen.

Herz.

Es wurden 6 Experimente ausgeführt, und zwar:

1 am Meerschweinchen,

4 am Kaninchenherz,

1 am Herzen eines neugeborenen Kindes.

Der Zeitraum zwischen dem Augenblick, wo das Herz losgelöst, und dem Augenblick, wo der Versuch angestellt wurde, betrug 30—40 Min. Das Herz des Neugeborenen wurde der Leiche entnommen und in den Apparat 5 Stunden 30 Min. nach dem Tode gebracht.

Die Konzentration der Carminlösung war 1:300 bis 1:1000; die Versuchsdauer betrug $2\frac{1}{2}$ — $3\frac{1}{2}$ Stunden.

Das Herz reagierte immer auf die Farbenlösung im Laufe der ersten Minute, wo diese durchgeleitet wurde, mit einer Änderung des Rhythmus, ebenso wie das Herz des Frosches; nach kurzer Zeit aber fand ein Ausgleich wieder statt. Das Herz wurde vom Apparat heruntergenommen in einer Periode, wo seine Tätigkeit geschwächt war. Manchmal aber dauerten die Zusammenziehungen noch weitere 3—4 Min. fort, wenn das Herz schon auf dem Tische lag. Am Herzen des Neugeborenen ließen sich nur Kontraktionen der Vorhöfe erzeugen und auch erst, nachdem vorher eine Adrenalinlösung kurze Zeit hindurchgeleitet wurde.

Als Folge von Durchleitung der Farbstofflösung bekommt das Herz zum Schluß des Versuches eine dunkelrote Farbe; dieselbe Farbe hat auch der Querschnitt durch seine Wand. Bei der mikroskopischen Untersuchung wurden in allen Fällen in geringer Anzahl Histiocyten vorgefunden, die einzeln zwischen dem Muskelgewebe liegen und deren Protoplasma kleine hell- oder dunkelrote Granula enthält. Solcherlei Granula und auch größere von tropfartiger Form wurden im Endothel der Valvula bicuspidalis und in der Zwischensubstanz der letzteren vorgefunden. Diese Zwischensubstanz offenbarte an den Stellen der Carminablagerung eine schwächere Färbbarkeit, wenn später eine Hämatoxylin-Nachfärbung angewandt wurde. An den Rändern der Klappe liegen die Farbengranula manchmal in Form kleiner Häufchen — „Plaques“. Die kontraktile Substanz der Muskelfibrille und die Kerne mancher von diesen, besonders im Herzen des Kindes, sind diffus gefärbt. Eine ebensolche diffuse Färbung wird bei den Endothelen der meisten Capillaren, Venen und der kleinen Arterien festgestellt. An manchen Stellen wird das Endothel losgelöst, häuft sich an, und es kommt zum Verschluß der Gefäßlichtung. An manchen Arterien konnte auch eine Ablagerung der Farbe in der Elastica interna festgestellt werden.

Somit führte die Methode der vitalen Färbung am Herzen des Meerschweinchens und des Kaninchens zu einem positiven Ergebnis: es fand eine Ablagerung der Farbe in Form von Granula statt im Protoplasma jener Zellen, bei denen diese Ablagerung auch bei intravenöser Injektion beim lebenden Tier stattfindet. Die Färbung bei diesen Tieren unterscheidet sich von der Färbungsart beim Frosch insofern, daß im Herzen der ersteren auch das Endothel der Gefäße und teilweise die Muskulatur oft diffus durchfärbt werden. Histiocyten, die im Protoplasma Farbstoffgranula enthielten, wurden auch im Herzen des Kindes

festgestellt, und es befanden sich dieselben nicht nur im Myokard, sondern auch im Lumen der Venen.

Die Leber.

Dieses Organ wurde bei Kaninchen untersucht. Die Flüssigkeit wurde durch eine Kanüle geleitet, die in die V. portae eingeführt war; die Konzentration der Farbstofflösung schwankte zwischen 1:300 bis 1:3000; die Versuchsdauer betrug 1 Std. 15 Min. bis 4 Stunden.

Die Leber färbte sich immer ungleichmäßig — manche Teile nahmen eine dunkelrote, andere eine gelblichrote Farbe an.

Bei der mikroskopischen Untersuchung wurde ein positives Ergebnis bloß an einer Leber festgestellt, wo der Versuch 2 Stunden dauerte, wobei die konzentrierte Carminlösung in der Verdünnung 1:1000 angewandt wurde. Die Farbe wurde nur in manchen *Kupfferschen* Zellen gefunden, in Form kleiner, schwach rosa gefärbter Granula. Die Leberzellen durchfärbten sich zuerst diffus an der Peripherie der Läppchen in der Nähe des interlobulären Bindegewebes. Eine gleiche diffuse Färbung, d. h. eine Färbung von Protoplasma und Kern, wurde auch an den Gefäßendothelen, an den Fibroblasten des interlobulären Bindegewebes und an den Fibroblasten der Kapsel beobachtet.

Nieren.

An der losgelösten Niere wurden 15 Versuche angestellt, davon 13 an Kaninchennieren, 1 an einer Hundenniere und 1 an einer Niere, die aus dem Leichnam eines 2jährigen Kindes entnommen wurde. Die Nieren, die von Tieren stammten, wurden vor der Isolierung vom Blut befreit, indem die gesamten Blutgefäße des Tieres mit *Ringer-Lockescher* Flüssigkeit durchspült wurden. Der Zeitraum, der zwischen der Isolierung und dem Beginn der Durchströmung der Farblösung verstrich, schwankte zwischen 30 Min. und 6 Stunden.

Die Versuche dauerten 3—6 Stunden; dabei wurde die Farbe in Konzentrationen von 1:500 bis 1:2000 (Carmin) und von 1:1000 bis 1:3000 (Trypanblau) angewandt.

In 2 Fällen (Kaninchen und Hund) wurden die Nieren in einen Kasten gebracht, der mit einem Glasdeckel versehen war und doppelte Wände besaß, zwischen die auf 37—38° erwärmtes Wasser gegossen wurde.

Bei der Durchleitung von Farbe nahm die Niere eine dunkelrote (Carmin), bzw. eine dunkelblaue (Trypanblau) Farbe an und wies eine Quellung auf, indem ihr Umfang merkbar zunahm. Auf dem Querschnitt hatte die Rindenschicht in manchen Fällen eine diffuse rote Farbe, in anderen Fällen wieder wechselten dunkelrote und hellgelbe Teile ab. Die Markschicht blieb entweder blaß oder hatte rosa oder dunkelrote Streifen, die von der Rinde zum Becken zogen. Das Bindegewebe

rund um das Nierenbecken wurde ödematos und durchfärbte sich. Durch eine Kanüle, die in den Harnleiter eingeführt wurde, floß tropfenweise eine Flüssigkeit ab, die je nach der durchgeleiteten Farbe bald rosa, bald hellblauer Farbe war.

Bei der mikroskopischen Untersuchung konnte in keinem Versuch eine Ablagerung der Farbe in Form von Granula festgestellt werden, was ja charakteristisch ist für das Epithel des oberen Abschnittes der Harnkanälchen, d. h. für die Kanälchen, die sich vom Glomerulus bis zur *Henleschen Schleife* erstrecken. Es konnten nur jene Erscheinungen festgestellt werden, die bei Einführung der Farbe in den Organismus an ausgesprochen pathologisch veränderten oder toten Zellen auftreten — d. h. eine Durchfärbung des Kernes und des Protoplasmas. Die diffuse Färbung des Kanälchenepithels lokalisiert sich hauptsächlich in der Gegend der Tubuli contorti, sehr selten wird eine Färbung der Kerne in den Kanälchen des untern Abschnittes festgestellt. Die Membrana propria der gewundenen Kanälchen bleibt entweder blaß oder färbt sich rosa, eine gleiche Farbe nimmt oft das Bindegewebe an, das zwischen den Kanälchen gelegen ist. In allen Versuchen färbten sich mehr oder weniger die Glomeruli — ganz oder auch nur teilweise. Das Gefäßendothel der meisten Gefäße hat in jedem Versuch eine diffuse dunkelrote Farbe, ist stellenweise abgestoßen und häuft sich in kleinen Gefäßen zu Häufchen an. In allen Fällen tritt deutlich die rot- oder blaugefärbte Elastica interna hervor. Die Kerne der glatten Muskelzellen nahmen ebenfalls, wenn auch sehr selten, eine diffuse Färbung an.

Die Milz

wurde nur in 2 Fällen untersucht: einmal beim Hund und einmal bei einem 4jährigen Kinde; beim Hund wurde der Versuch 1 Stunde nach der Isolierung angestellt, beim Kinde 10 Stunden nach dem Tode. Der erste Versuch dauerte 10 Stunden, der zweite 3 Stunden. Durch die Milz des Hundes wurde vor der Farblösung eine Lösung von Caseosan (1:2000) hindurchgeleitet, um dadurch die Funktion der retikulären Zellen möglichst zu steigern. Die Farben wurden in folgenden Konzentrationen angewandt: Trypanblau 1:2000, und im zweiten Falle Carmin 1:1000.

In beiden Fällen kam es nicht zu einer gleichmäßigen Färbung des Organs, sondern es entstanden mehr oder weniger gefärbte Partien, stellenweise von rosa, stellenweise von blaßroter Farbe.

Die mikroskopische Untersuchung der Milz des Kindes ergab, daß der Versuch ein negatives Resultat hatte: Farbstoff-Granula konnten weder im Protoplasma der Retikulumzellen der weißen und roten Pulpa noch im Endothel der venösen Sinussen nachgewiesen werden. Dagegen färbten sich stark die Gefäßwände, besonders die Elastica interna, wie in den Arterien der Malpighischen Follikel, so auch der Trabekel; dabei wurde die diffuse Färbung nicht nur in den Endothel-

zellen festgestellt, die hin und wieder abgestoßen waren, sondern auch in den Kernen der glatten Muskelfasern der Media. Ebenso dunkelrot gefärbt erschienen die Kerne der Lymphocyten in den Malpighischen Knötchen und die Kerne verschiedener Zellen der roten Pulpa.

Ein anderes Bild bot die Milz vom Hunde. Ihre Kapsel war von hellblauer, ihre elastischen Fasern von dunkelblauer Farbe. Wie in der roten, so auch in der weißen Pulpa trifft man bloß hin und wieder Zellen mit Trypanblau diffus gefärbten Kernen an. In der roten Pulpa sind granulahaltige Reticulumzellen zerstreut, deren Protoplasma wechselnde Mengen blauer Granula von verschiedener Größe enthält, die bald heller, bald dunkler gefärbt sind. In manchen Arterien ist eine schwach ausgeprägte diffuse Färbung der Endothelzellen und der Elastica interna vorhanden.

Das Ohr.

Kaninchenohren wurden in 4 Fällen untersucht. Die *Ringer-Locke*-sche Flüssigkeit wurde hindurchgelassen 40—60 Min. nach der Isolierung. In einem Falle wurde der Versuch derart modifiziert, daß nach einer Durchspülung von 35 Min. Dauer mit *Ringer-Lockescher* Flüssigkeit, zu derselben Antidiphtherieserum (1:500) hinzugesetzt wurde, welches nun im Laufe 1 Stunde hindurchgeleitet wurde; weiter wurde im Laufe von 10 Stunden dieselbe Flüssigkeit mit Zusatz von Serum und Trypanblau (1:2000) hindurchgeleitet. Die anderen Versuche dauerten $5\frac{1}{2}$, 6, 12 Stunden, die Konzentration der Farbe (Trypanblau) betrug dabei 1:1000, 1:1500, 1:2000.

Bei der makroskopischen Betrachtung wiesen alle Ohren eine bläuliche Färbung auf, dieselbe war schärfer ausgeprägt in den Experimenten, wo die Farbe länger eingewirkt hat.

Bei der mikroskopischen Untersuchung läßt sich ein ausgesprochenes Ödem des Bindegewebes feststellen, das zwischen dem Knorpel und dem äußeren Epithel gelegen ist. Nur in einem Falle (Versuchsdauer 6 Stunden) wurden einige Histiozyten gefunden, die im Protoplasma Granula von hellblauer Farbe enthielten. In den anderen Versuchen enthielten diese Zellen keine Ablagerung der Farbe im Protoplasma, und eine diffuse Färbung ihrer Kerne wurde selten beobachtet. Am kräftigsten färbte sich das Gefäßendothel, wenn seine Desquamation auftrat. Selten werden Fibroblasten angetroffen, deren Kerne diffus gefärbt sind. Elastica interna der Arterien ist von blauer Farbe.

Versuche an Kaninchen in toto.

Das Kaninchen wurde zuerst aus der Art. carot. sin. verblutet, das Gefäßsystem mit *Lockescher* Flüssigkeit durchspült, und daraufhin wurde die Farbe durch die V. jugularis dextra geleitet; dabei wurde während der ganzen Versuchsdauer eine künstliche Atmung durch ein Tracheotomie-Glasröhrchen unterhalten.

Es wurden insgesamt 3 Versuche ausgeführt:

1. mit Trypanblau 1:1000, von 2 Stunden Dauer;
2. mit Carmin 1:1000, von $2\frac{1}{2}$ Stunden Dauer;
3. mit Carmin 1:2000, von 4 Stunden Dauer.

Bei dieser Versuchsanordnung kam es bei der Durchleitung von Farbe in allen Fällen zu großen Anhäufungen von Flüssigkeit, nicht nur in der Bauchhöhle, sondern auch im Magen und im Darm. Dieser Umstand wirkte sehr störend auf die rechte gleichmäßige Verteilung der Farbe in den Organen, wie es z. B. im ersten Versuch geschah, wo die linke Niere rot, die rechte aber von hellgelber Farbe war. Um diese Unregelmäßigkeiten zu verhindern, wurden deshalb im dritten Versuch Incisionen in der Bauchwand und in einigen Schlingen des Dünnd- und Dickdarms gemacht; wenn dadurch auch der wachsende Druck nicht ganz ausgeglichen wurde, so kam es jedenfalls zu einer gewissen Veränderung desselben.

Die Schleimhaut und die Serosa nahmen im Versuch allmählich eine gleichmäßige hellblaue Farbe an. Die Leber war stellenweise dunkelrot bzw. dunkelblau, stellenweise gelblichblau. Die Milz war in allen Versuchen ungleichmäßig gefärbt und hatte ein fleckiges Aussehen. Die Rinde der Nebennieren war hellgelb, die Marksubstanz hellrot oder hellblau. Die Lungen wiesen eine rote bzw. eine hellblaue Farbe auf. Der rechte Vorhof war rot, die rechte Kammer hellrot, das linke Herz — hellgelb. Die Niere hatte im Bereich der Rinde eine fast dunkelrote Farbe, in der Marksubstanz stellenweise eine hellrote; stellenweise war sie fast ungefärbt, das Nierenbecken war hellrot.

Bei Anwendung von Trypanblau war die Stärke der Färbung die gleiche.

Bei der mikroskopischen Untersuchung war das histologische Bild in allen Fällen fast das gleiche. Ich will mich vorerst nur auf das Bild der Leber, der Milz, der Lungen, der Nebennieren und der Nieren beschränken.

Die Leber: Die Capillaren sind erweitert. Die Leberbalken sind etwas zusammengedrückt; an der Peripherie der Läppchen, besonders in den Partien, wo die Farbe eine dunkelrote ist, werden Zellen mit diffus gefärbten Kernen getroffen. Die *Kupffer* schen Sternzellen enthalten in ihrem Protoplasma Farbengranula von dunkelrosa oder blauer Farbe; die Zellen sind vergrößert und liegen frei. In den übrigen Zellen der Leber ist eine Ablagerung von Farbe nicht festzustellen.

Die Milz: In den Reticulumzellen findet eine Speicherung der Farbe in Form derselben Granula statt, wie in den *Kupffer* schen Zellen. Entsprechend der schon erwähnten unregelmäßigen Verteilung der Farbe in der Milz, sind auch die granulahaltigen Reticulumzellen in einzelnen Partien gelegen. Eine diffuse Färbung der Kerne in Lymphocyten und in anderen Zellen in der roten Pulpa wird selten angetroffen. Das Endothel der Arterien ist stellenweise auch diffus gefärbt, aber schwach.

Die Lungen: In den Capillaren lassen sich bald in größerer, bald in kleinerer Menge Zellen feststellen, deren Protoplasma mit Granula von rosa Farbe gefüllt ist. Da diese Zellen ausschließlich intracapillar liegen, so läßt sich vermuten, daß sie nicht lokalen Ursprungs sind, sondern mit dem Flüssigkeitsstrom hierher gelangten, hauptsächlich aus der Leber — daß es also *Kupffer* sche Zellen sind.

Die Nebennieren: Im Protoplasma des Capillarendothels der Rindenschicht fand keine Ablagerung der Farbe statt. Es konnte nur eine diffuse Färbung der Kerne in den Zellen der Marksicht und des Venenendothels festgestellt werden.

Die Nieren: Keine Ablagerung der Farbe in Form von Granula im Protoplasma der Epithelien in den oberen Abschnitten der Kanälchen; es ist nur eine diffuse Färbung der Kerne und des Protoplasmas festzustellen, die bald mehr, bald weniger ausgesprochen ist und hauptsächlich in den gewundenen Kanälchen zu beobachten. Eine gleiche diffuse Färbung ist auch an den Kernen der Zellen des Glomeruli zu beobachten. Sehr selten findet eine diffuse Färbung des Epithels in den Kanälchen, im unteren Abschnitte statt. Das Gefäßendothel und die Elastica interna mancher Arterien färben sich ebenfalls diffus.

Versuchsergebnisse und Schlußfolgerung.

Somit bietet die Vitalfärbungsmethode, wie es auf Grund der mikroskopischen Untersuchungen ersichtlich ist, bei ihrer Anwendung an isolierten Froschorganen keinen wesentlichen Unterschied von den Ergebnissen, die bei der Einführung der kolloiden Farbstofflösung in den lebenden Organismus gewonnen werden. Es kann also diese Methode an isolierten Organen angewandt werden beim Studium pathologischer Vorgänge, ohne daß man dabei Gefahr läuft, Abweichungen von der Norm dort zu finden, wo sie bei Lebzeiten nicht vorhanden waren. Es darf nur, wie mir scheint, kein zu großer Zwischenraum gelassen werden, zwischen dem Moment der Isolierung des Organs und dem Beginn des Versuchs, d. h. bis zum Durchströmen der Farbe. Auf diesen Umstand weist u. a. der schon erwähnte Versuch hin, in dem das Herz vor dem Versuch im isolierten Zustande 20 Stunden gelegen hat: In diesem Herzen fand die Speicherung der Farbengranula in den Endothelzellen in geringerem Maße statt, was als eine Erniedrigung der Funktion der Zelle angesehen werden muß. Dieselbe verschwindet fast gänzlich in jenen Zellen, deren Protoplasma und Kern sich diffus zu färben beginnen. Folglich bewahrt die Vitalfärbungsmethode, bei ihrer Anwendung auf isolierte Froschorgane, in vollem Maße ihren Wert und ihre Bedeutung als morphologisches Kriterium des normalen oder pathologischen Zustandes der Zelle.

Der kolloiden Farbe gegenüber verhalten sich die Zellen der Warmblüterherzen und sogar des Menschenherzens ähnlich wie die Zellen des Froschherzens, jedoch kann ich dieses Verhalten nicht als identisch bezeichnen, obwohl das Warmblüterherz in funktioneller Hinsicht keinen Unterschied aufweist und lange Zeit ($2\frac{1}{2}$ — $3\frac{1}{2}$ Std.) seine regelmäßige rhythmische Fähigkeit bewahrt.

Die „Identität“ ersehe ich im Umstande, daß ich in diesen Herzen „Histiocyten“ feststellen konnte, die ihre Fähigkeit bewahrt haben, am Protoplasma die im Gewebe zirkulierende Farbe in Form von Granula abzulagern; ebensolche Zellen, freiliegend, wurden auch im Lumen zweier Venen im Herzen des Kindes gefunden.

Der Unterschied aber liegt darin, daß ein Gewebe, wie der quergestreifte Muskel, und solche Zellen, wie das Endothel von Arterien, Venen und Capillaren, eine diffuse Färbung ergeben, im ersten Falle des Kernes der contractilen Substanz, im zweiten der Zelle überhaupt und zwar bei einer Konzentration der Farbe (1: 300), die schwächer war als die beim Frosch (1: 100) angewandte, und auch bei kürzerer Einwirkungsdauer ($2\frac{1}{2}$ — $3\frac{1}{2}$ Std., während beim Frosch die Versuche $4\frac{1}{2}$ —9 Std. währte). Die Endothelzellen färben sich öfters diffus, lösen sich von der Wand ab und werden mit dem Flüssigkeitsstrom in kleine Venen und Capillaren getragen, wo sie sich anhäufen und das Lumen verschließen. Je länger der Versuch dauert, je später das Organ isoliert worden ist, desto ausgeprägter sind die Erscheinungen der diffusen Durchfärbung und der Ablösung des Endothels.

Diese von mir festgestellten Tatsachen legen den Gedanken nahe, daß das isolierte Warmblüterherz und das Herz des Kindes, trotz der lange bewahrten funktionellen Tätigkeit, die ihren Ausdruck in den regelmäßigen rhythmischen Kontraktionen findet, — dennoch die vitalen Eigenschaften einiger Zellelemente und der contractilen Substanz des Muskelgewebes verliert. Das „Überleben“, im Sinne einer Bewahrung der biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften, ist in diesen Bausteinen teils geschwächt, teils womöglich verschwunden.

Dieser Gedanke wird unterstützt durch die Ergebnisse, die beim Studium der Leber, der Milz, des Ohres und hauptsächlich der Nieren gewonnen wurden.

Bevor ich nun zur Beurteilung der gewonnenen Ergebnisse der Vitalfärbungsmethode an diesen Organen übergehe, möchte ich noch einen Umstand erwähnen, der von großem Interesse ist und ein besonderes Studium verdient: Es handelt sich um die Ablagerung von Carmin in den Herzkappen der Meerschweinchen und Kaninchen. Dieser Umstand verdient um so mehr unterstrichen zu werden, als das gleiche Bild nur noch stärker ausgeprägt, von mir auch am Herzen vom Axolotl beobachtet wurde, als diesem vital Carmin in die paravertebralen lymphatischen Räume eingeführt wurde.¹⁾

Diese Versuchsergebnisse sind in der Hinsicht lehrreich, daß sie gestatten, eine Parallel zu ziehen zu dem Auftreten von Lipoiden im Herzen des Menschen, und können somit als ein wichtiger Beweisgrund für die Erklärung der Klappenatherosklerose als einer Infiltration gelten

Nur in einem Experimente mit isolierter Leber des Kaninchens, wo dieselbe 1 Stunde und 15 Minuten nach der Isolierung im Apparat

1) Noch unveröffentlichte Arbeit.

instilliert wurde, gelang es mir, bei einer Einwirkung der Farbe (Carmin 1: 2000) im Laufe von 2 Stunden, nach langem, sorgfältigem Suchen, bloß einige granulahaltige *Kupffersche* Zellen zu finden, die im Protoplasma blaßrosa gefärbte Granula enthielten. In den anderen Versuchen, obwohl sie ebensolange dauerten, konnte ich, bei Anwendung verschiedener Konzentrationen von Farbe, keine Ablagerung der Farbe in den Sternzellen feststellen; es ließ sich dagegen nur eine diffuse Färbung der Kerne, wie dieser Zellen, so auch der Leberzellen feststellen, welche immer zuerst an der Peripherie des Läppchens auftrat; auch eine Färbung des Gefäßendothels war vorhanden. Wurde bei gleicher Versuchsdauer eine stärkere Konzentration der Farbe gewählt, so führte sie zu einer stärkeren ausgeprägten Durchfärbung, mitunter fast des gesamten Läppchens, d. h. aller seiner Zellen.

Untersuchungen an isolierten Ohren des Kaninchens ergaben fast die gleichen Resultate: unter 4 Fällen konnte nur einmal in den Präparaten das Vorhandensein von einzelnen Histiocyten festgestellt werden, dieselben enthielten eine geringe Anzahl schwach blaugefärster Granula (Trypanblau 1: 2000). Sehr oft wurde eine Ablagerung der Farbe auf der Elastica interna der Arterien, eine diffuse Durchfärbung der Gefäßendothelzellen und eine Desquamation der letzteren gefunden. Die übrigen Zellen, speziell die Histiocyten wiesen bloß hin und wieder eine diffuse Färbung des Kernes und des Protoplasmas auf.

In 15 Versuchen an isolierten Nieren, bei Anwendung der Farbe in verschiedenen Konzentrationen (von 1: 500 bis 1: 2000) und bei einer Versuchsdauer von 3—6 Stunden, konnte ich kein einziges Mal eine Ablagerung der Farbe in den oberen Abschnitten der Harnkanälchen finden. Dieser Umstand kann in dem Sinne gedeutet werden, daß das Epithel dieser Kanälchen das Vermögen einbüßt, in seinem Protoplasma kolloide Substanzen abzulagern. Indem es seine funktionelle Festigkeit verliert, beginnt es sich in verschiedenen Abschnitten der Kanälchen zu färben, hauptsächlich in den oberen Abschnitten, d. h. dort, wo normalerweise eine Speicherung der Farbe in Form von Granula stattfinden sollte.

Ebenso verhielten sich der Farbe gegenüber die Glomeruli und das Gefäßendothel; dabei erfolgte gleichzeitig eine Durchfärbung der Elastica interna an den Stellen, wo diese vorhanden war.¹⁾

Diese Erscheinungen einer diffusen Färbung des Kernes und des Protoplasmas der Zellen hängen offenbar von pathologischen Verände-

¹⁾ Die von mir festgestellte Ablagerung der Farbe auf der Elastica interna bestätigt die Untersuchungen von *Petroff*, der entgegen den Behauptungen von *Ribbert* und *Goldmann* bewiesen hat, daß die Farbe, folglich auch andere kolloide Substanzen, durch das Endothel in die Intima vordringt und sich an der inneren elastischen Lamella ablagert. (*Zieglers Beitr. z. pathol. Anat. u. z. allg. Pathol.* **71**, 115. 1922).

rungen der letzteren ab; sie treten noch schärfer hervor in Organen, die aus Kinderleichen 6—10 Stunden nach dem Tode genommen wurden.

Das Endothel der Milz, die nach 10 Stunden entnommen wurde, färbte sich diffus fast in allen Arterien. Eine diffuse Färbung wird auch in den Kernen der glatten Muskeln beobachtet. Lymphocyten, die um die zentrale Arterie in den *Malpighischen* Knötchen herum liegen, färben sich ebenfalls in bezug ihrer Kerne in eine dunkelrote Farbe.

Der Umstand, daß es sich bei fortschreitender diffuser Färbung der Zellelemente in isolierten Organen um einen Schwund ihrer Funktionen handelt, und daß dabei eine Abhängigkeit besteht — einerseits von dem Zeitraum, der zwischen der Isolierung und dem Beginn des Versuches verstrich, andererseits von dem pathologischen Vorgang, der den Tod des Organs bewirkte, muß in Erwägung gezogen werden bei der Beurteilung des Versuches mit der isolierten Hundemilz. Dieselbe wurde 1 Stunde nach ihrer Isolierung verwendet, wobei zwecks einer Aktivierung des Protoplasmas, einer Stärkung der Funktion der Reticulumzellen, vorher im Laufe von 30 Min. der *Lockeschen* Flüssigkeit eine Lösung von Caseosan (1: 2000) zugesetzt wurde.

Die mikroskopische Untersuchung ergab ein gänzlich verschiedenes Bild: Ein gefärbtes Endothel der Arterien wurde zwar angetroffen, doch war es keine verbreitete Erscheinung, und eine Färbung der Lymphocytenkerne wurde fast gar nicht beobachtet, dagegen aber wiesen die meisten Reticulumzellen eine positive Reaktion auf, indem in ihrem Protoplasma eine Speicherung von Typanblau-granula vorhanden war.

Die letzten 3 der angeführten Versuche, wo die Farbe angewandt wurde nach einer vollständigen Entblutung und einer sorgfältigen Nachspülung mit *Lockescher* Flüssigkeit, ergaben mir beim Studium der Leber, der Milz, der Nieren und der Nebennieren in bezug auf die ersten zwei Organe ein positives, hinsichtlich der anderen ein negatives Resultat. Jedoch kann ich dieses negative Resultat in bezug der Nieren und der Nebennieren nicht als ein endgültiges bezeichnen, da die Versuchsanordnung in mancher Hinsicht verändert werden muß, so daß eine gleichmäßige Durchströmung der Flüssigkeit und eine regelmäßige Ablagerung der Farbe erzielt würde. Außer diesen bezeichneten Organen habe ich auch die Lungen untersucht, die dank einer roten Färbung die Aufmerksamkeit auf sich lenkten. In ihren Capillaren konnten in großer Anzahl Zellen festgestellt werden, die im Protoplasma gefärbte Granula enthielten. Wie ich schon früher erwähnte, wird es richtiger sein, diese Zellen als eingeschwemmte zu betrachten, und ihren Ursprung in die Capillaren der Leber zu verlegen.

Wodurch läßt sich nun ein günstigeres Resultat, im Sinne einer Farbenablagerung im Protoplasma der Zellen, in diesen 3 Versuchen erklären? Wie mir scheint, liegt der Grund dafür in zweierlei Bedingungen:

die erste wäre die, daß alle Zellen nach der Entblutung des Kaninchens für keinen Augenblick ohne eine umströmende, ihre Funktionen unterhaltende, isotonische Flüssigkeit verblieben; dadurch kam es, daß die Farbe, die der Flüssigkeit zugesetzt wurde, im Zellprotoplasma dieselben unveränderten physiko-chemischen Bedingungen antraf, die für ihre Ablagerung notwendig sind.

Jedoch wäre es verfehlt, diesen Umstand als die einzige Bedingung anzusehen, ihm die Hauptrolle zuzuschreiben und somit anzuerkennen, daß der Gesamtorganismus, der entblutet ist und bei dem das Blut nicht sogleich durch die durchströmende *Lockesche* Flüssigkeit ersetzt wird, somit auch das Speicherungsvermögen von Farbe im Protoplasma verliert. Einer solchen Anerkennung würde der Versuch mit dem isolierten Herzen eines Neugeborenen widersprechen, wo erst 5 Std. 30 Min. nach dem Tode das Herz dem Leichnam entnommen und in den Apparat gebracht wurde; ebenso würde dagegen auch der Versuch mit der Hundemilz sprechen, wo die *Ringer-Lockesche* Flüssigkeit und die Farbe erst nach einer Stunde nach der Isolation durchgeleitet wurden, wobei die genannte Funktion der Milz erhalten war.

Nicht minder wichtig und nicht minder biologisch begründet erscheint mir dagegen ein zweiter Umstand: die Bewahrung eines Zusammenhangs zwischen dem zu untersuchenden Organ, hauptsächlich seiner Gefäße, mit dem Gefäßsystem anderer Organe und Gewebe. Dieser Zusammenhang bietet uns die Möglichkeit, die isotonische *Lockesche* Flüssigkeit einer isophysiologicalen näher zu bringen. Der Grund dafür liegt darin, daß die *Lockesche* Flüssigkeit, trotzdem sie zum Teil durch die Carotis herausfließt und zum Teil transsudiert, dennoch — während sie einzelne Gewebe und Organe im ganzen Körper durchläuft — von den Zellen derselben wahrscheinlich gewisse Substanzen erhält, wie z. B. genuines Eiweiß — Proteine oder zusammengesetztere eiweißhaltige Verbindungen — Proteide, und diese können auf das Protoplasma der Zellen des retikulo-endothelialen Apparates, wie bekannt, im Sinne einer Aktivierung wirken.

Ich glaube, es würde kein Paradox sein, wenn man annehmen wollte, daß auch andere Stoffe aus den Zellen in die durchströmende *Lockesche* Flüssigkeit gelangen können, wie z. B. Lecithin, an dem die Grenzschichten des Zellplasmas so reich sind und das so wichtig für die Unterhaltung der normalen Zelleistung ist.

Außerdem ergaben die von Schkawera im Laboratorium von Krawkow ausgeführten Versuche an isolierten Nebennieren, daß die aus ihnen herausströmende Flüssigkeit Substanzen enthält, die dem Adrenalin nahe stehen, d. h. Substanzen, die ein Produkt der Nebennierenzellen darstellen.

Dieser Umstand erlaubt anzunehmen, daß auch Produkte anderer Organe mit innerer Sekretion, durch welche die Flüssigkeit hindurch-

strömt (die Durchströmung wird durch Ablagerung von Farbe in denselben bewiesen), einen Bestandteil der zirkulierenden *Lockeschen* Flüssigkeit bilden und in einer bestimmten Weise auf die Bewahrung der Zellfunktionen wirken können, speziell auf diejenigen, die mit dem Vermögen, Farbe abzulagern verbunden sind.

Diese beiden Faktoren waren es, durch die in den letzten 3 Versuchen günstige Ergebnisse erzielt wurden.

Indem ich nun diese Mitteilung abschließe, will ich nochmals kurz auf die Fragen eingehen, welche ich durch die 40 ausgeführten Versuche zu lösen mich bemühte. Die 1. Frage lautete: Kann die Vitalfärbungsmethode als ein morphologisches Mittel gelten, womit man die Norm oder die Pathologie der Zelle beurteilen könnte?

Auf diese Frage kann die Antwort positiv lauten. Bewahrt die Zelle ihre, ihr im Organismus übliche Eigenschaft der Farbenspeicherung in Form von Granuli im Protoplasma, so muß sie normal betrachtet werden. Von einer pathologischen Erscheinung können wir nur dann reden, wenn die Zelle (Histiocyt), die normalerweise die Eigenschaft der Granulaspeicherung besitzt, nun dieselbe verliert, ohne dabei eine diffuse Färbung anzunehmen, und dabei den äußerlichen morphologischen Bau des Kernes und des Zelleibes beibehält. Mit großer Vorsicht müssen wir an die Lösung dieser Frage herantreten in bezug derjenigen Zellen, welche eine diffuse Durchfärbung aufweisen. Es muß hierbei mit in Erwägung gezogen werden der von *Boemer-Patzelt*¹⁾ festgestellte Umstand, daß eine diffuse Durchfärbung des Protoplasmas der Granulabildung zuweilen vorangeht, d. h. daß in einer gewissen Periode der Farbenspeicherung im Innern der Zelle, diese diffuse Durchfärbbarkeit eine normale Erscheinung darstellen kann. Wir werden die Erscheinungen in der Zelle als pathologisch beurteilen in den Fällen, wo die diffuse Durchfärbung bei den späteren Stadien der Durchleitung der Farbe durch das isolierte Organ offenbart wurde, und wo diese Durchfärbung mit ausgesprochenen Veränderungen der Kernstruktur verbunden ist. Noch verwickelter erscheint die Frage, ob die Zelle noch am Leben oder tot ist.

Ich werde vom Tode der Zelle nur dann sprechen, nur dann behaupten, daß sie tot ist, wenn sie eine strukturlose, diffusgefärbte Bildung darstellt; jedoch aber, auf Grund der Vitalfärbungsmethode könnten wir nicht das gleiche behaupten hinsichtlich derjenigen Zellen, die ihr eigenständliches morphologisches Bild noch nicht ganz verloren haben. Diese Methode kann vorerst noch nicht als Kriterium des Lebens oder des Todes der Zelle gelten. Mit ihrer Hilfe können wir noch nicht jene Grenze finden, wo diesseits eine diffus durchfärbte Zelle wieder zum Leben zurückkehren kann und die bewahrte Eigenschaft des Wachstums und

¹⁾ Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. **34**, H. 3/6, S. 336. 1923.

der Vermehrung zum Ausdruck bringt, sobald sie in andere Bedingungen gebracht wird — und wo jenseits dieser Grenze diese Eigenschaften derselben Zelle als unwiderruflich verloren gelten müssen.

Mir will es scheinen, daß, so lange die wahre Struktur des Protoplasmas, an welches die Eigenschaften der lebenden Substanzen gebunden sind, außer dem Bereich der mikroskopischen Sichtbarkeit liegen wird, so lange wird auch außer dem Bereich der direkten morphologischen Beobachtung jene Struktur des Protoplasmas liegen, an welche die speziellen Eigenschaften der „toten“ Substanz geknüpft sind.

Somit messe ich der Vitralfärbungsmethode, als morphologischem Kriterium des Lebens oder des Todes der Zelle, nur eine relative Bedeutung bei; ich muß aber betonen, daß diese Methode eine große Bedeutung hat, wenn es mit ihrer Hilfe gelingt, in den Zellen von isolierten Organen eine bewahrte Funktion der Farbstoffspeicherung in Form von Granula nachzuweisen.

Ich erinnere an den Versuch mit dem Herzen eines Kindes, wo dieses $5\frac{1}{2}$ Stunden nach dem Tode isoliert wurde. In diesem Falle würden, auf Grund der üblichen Untersuchungsmethoden, nicht nur die Klinik, sondern auch das Laboratorium, dieses Organ als tot befunden haben; jedoch auf Grund der Vitalfärbung, dank der in manchen Histiocyten des Myocards eine Ablagerung von Farbstoffgranulis festgestellt werden konnte, kann eine derartige Behauptung nicht aufgestellt werden.

Vom physikalisch-chemischen Standpunkt aus werden wir somit dieses Organ nicht als tot, sondern als sterbend bezeichnen.

Die letzte von mir gestellte Frage ist die: Kann man, auf Grund gewonnener Resultate, an isolierten Organen der Tiere und des Menschen, an das Studium verschiedener, rein pathologischer Vorgänge herantreten?

Wie ich schon früher erwähnte, kann diese Frage in bezug auf den Frosch positiv beantwortet werden, in bezug auf Warmblüter und des Menschen muß ich dieselbe *einstweilen* mit einem „Nein“ beantworten.

Meine Versuche haben bloß einige Wege in dieser Richtung ange deutet, und diese Wege müssen weiter betreten werden, bis die gestellten Aufgaben gelöst werden und eine einschlägige Antwort erlangt wird.

Ich spreche Herrn Prof. N. P. Krawkov meinen innigsten Dank aus für das freundliche Entgegenkommen, dank welchem der experimentelle Teil der Arbeit ausgeführt werden konnte, für sein lebhaftes Interesse an dieser Arbeit und für seine wertvollen Ratschläge und Anweisungen.