

(Aus der parasitologischen und vergleichend-pathologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin. — Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Lubarsch.)

Zur Theorie der Hämatoxylinfärbungen. Ein Beitrag zum färberischem Nachweis der Zellipoide.

Von

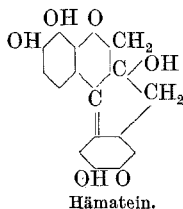
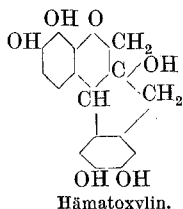
Dr. med. M. Gutstein, Berlin.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 30. März 1926.)

Zu den am häufigsten in der Histopathologie angewandten Färbemethoden gehören zweifelsohne die Kernfärbungen mit den zahlreichen Hämatoxylinlösungen verschiedenster Zusammensetzung (nach *Ehrlich*, *Weigert*, *Delafield*, *Böhmer*, *P. Mayer*, *R. und M. Heidenhain*, *Benda* u. v. a.). Die Bevorzugung dieses natürlich vorkommenden Farbstoffes durch die Pathologen beruht wohl darauf, daß er vermittels gewisser Zusätze zur Farbflotte mit den Zellkernen ziemlich alkohol- und säureechte Verbindungen, sog. Lacke bildet. Gerade wegen seines, in morphologischer Beziehung sehr großen Wertes, erscheint daher die Frage sehr wichtig, *welche chemische Bestandteile des Kernes eigentlich das Hämatoxylin aufnehmen*. Zur Beantwortung dieser Frage ist es notwendig, einiges über die Chemie dieses natürlichen Farbkörpers vor auszuschicken.

Der aus *Hämatoxylon campechianum* gewonnene Extrakt enthält das *Hämatoxylin*, das jedoch zum Färben wenig geeignet ist. Dagegen ist sein Oxydationsprodukt *Hämätein* der eigentliche Farbkörper, der fast ausschließlich zum Färben benutzt wird. Nach neueren chemischen Untersuchungen (1) kommen dem Hämatoxylin $C_{16}H_{12}O_6$ und Hämätein $C_{16}H_{14}O_6$ wahrscheinlich folgende Konstitutionsformeln zu:



Wie aus den vorstehenden Konstitutionsformeln ersichtlich, ist das Hämätein infolge seiner zahlreichen OH-Gruppen ein stark *saurer* Kör-

per, wie z. B. das Phenol. Das Hämatein vermag jedoch dem tierischen Gewebe nur eine geringfügige schmutzig-bräunliche Färbung zu erteilen. Dies hängt damit zusammen, daß das Hämatein 2 OH in Orthostellung enthält. Solche organische Verbindungen sind nach einer bekannten Beizenregel (*Liebermann* und *v. Konstantecki*) *vorzügliche Beizenfarben*, die mit Metalloxyden widerstandsfähige Färbungen (Lacke) bilden. Zur Erzielung einer ausreichenden Hämateinfärbung sind bisher in der Histologie Chromsäure (*R. Heidenhain*), Alaun (*Böhmer*, *Mayer*, *Ehrlich*), Eisenverbindungen (*Benda*, *Weigert*, *M. Heidenhain*) und Kupfersalze (*Weigert*, *Benda*) meist verwendet worden. Als Beizen wirken in diesen Verbindungen die elektropositiven Metalle Cr, Al, Fe und Cu. Der Mechanismus der Färbung beruht darauf, daß *saure* Gewebsteile basische Metalloxyde aufnehmen, die ihrerseits mit Hämatein eine Tripelverbindung eingehen [*P. Mayer*²), *Pappenheim*³), *Becher*⁴)]. Die Fe-, Cu- und Cr-Verbindungen des Hämateins sind in Wasser schwer löslich, daher muß das Gewebe zuerst mit diesen Metallverbindungen behandelt werden, um nachträglich mit dem Farbstoff einen Farblack zu bilden. Eine Ausnahme hiervon bildet nur das Aluminium, dessen Hämateinverbindung wasserlöslich ist, und das daher gleichzeitig mit dem Farbstoff zur Anwendung gelangen kann. Daß aber hierbei ebenfalls eine Tripelverbindung entsteht, kann dadurch bewiesen werden, daß man die Gewebsschnitte mit einer Aluminiumverbindung [Alaun, Aluminiumchlorid, Liq. alum. subacet. (*Becher*)] vorbehandelt und nach dem Abspülen mit einer Hämateinlösung färbt. Dabei wird dieselbe blauviolette Färbung erzielt, wie mit Alaun-Hämatein [*P. Mayer*²), *Gutstein*⁵)].

Die schönen und sehr wertvollen Untersuchungen von *S. Becher*⁴) haben uns eine ziemlich große Zahl synthetischer saurer Farbstoffe kennen gelehrt, die ähnlich dem Hämatoxylin vermittlels verschiedener Metallbeizen echte Kernfärbungen zu erzielen gestatten. Auch hier liegt nach *Becher*, mit dem wir völlig übereinstimmen, eine Tripelverbindung vor (Gewebsbestandteil-Metalloxyd-saurer Farbstoff). Es unterliegt nicht dem geringsten Zweifel, daß solche Beizenfärbungen echte chemische Verbindungen darstellen, die, wie *Tschugajeff*, *A. Werner* und *R. Pfeifer* nachgewiesen haben, auf der Bildung einer inneren Metallkomplexverbindung beruhen⁶).

In einer vor kurzem erschienenen Arbeit versuchen von *Möllendorff* und *Tomita*⁷) die Beizenfärbung (mit Hämatein und den Becherschen Farbstoffen) auf 2 Grunderscheinungen der *Durchtränkungs-* (Dfg) und *Niederschlagsfärbung* (Nfg) zurückzuführen. Diese Unterscheidung hat *v. Möllendorff* früher schon bei der substantiven Färbung der Gewebe mit sauren und basischen Farbstoffen gemacht. Die Dfg-Färbung wird nach ihm von allen sauren Farbstoffen hervorgerufen, bestehe in einer Farbeinlagerung in das *Innere* aller Strukturen und beruhe auf einer physikalischen Adsorption. Bei der Färbung mit gewissen basischen Farb-

stoffen komme neben der Dfg. noch eine Nfg. vor, die sich im wesentlichen an der *Oberfläche* der Zellstrukturen bilde. Nfg. geben solche basische Farbstoffe, die mit sauren Kolloiden (Nucleinsäure, Trypanblau, Phosphormolybdänsäure) sich ausflocken lassen. Es würde den Rahmen dieser Arbeit bei weitem übersteigen, wenn ich hier auf eine eingehende sachliche Kritik der Befunde von *v. Möllendorff* und *Tomita* eingehen würde. Bemerken möchte ich aber, daß sie mit der Aufstellung dieser neuen Begriffe unsere Erkenntnisse über das Wesen der histologischen Färbung meines Erachtens nicht vorwärts gebracht haben. Geben sie doch selbst zu, daß sie eine Erklärung für die Tatsache nicht zu geben vermögen, warum die Nfg. *nur* an der Oberfläche der Zellstrukturen zustande kommt. (Welche saure Kolloide sollen denn eigentlich an der Oberfläche der Zellstrukturen vorliegen? Es ist äußerst unwahrscheinlich, daß die Nucleinsäure gerade an diesen Stellen vorkommen soll.) Hier sei noch ein grundsätzlicher Einwand gegen die Auffassung von *v. Möllendorff* und *Tomita* gemacht. Die Zellgewebe enthalten doch auch basische Substanzen, höchstwahrscheinlich ebenfalls in einem kolloidalen Zustande. Warum geben aber dann saure Farbstoffe keine Nfg. mit den basischen Gewebeskolloiden, trotzdem allgemein bekannt ist, daß solche Kolloide wie Eisenhydroxyd und Tonerde durch saure Farbstoffe ausgeflockt werden.

Daß physikalische Eigenschaften, insbesondere die Diffusionsfähigkeit der verwandten Farbstoffe bei der histologischen Färbung eine wichtige Rolle spielen, wird von niemandem bestritten und ist ja von *Pappenheim*³⁾ besonders eingehend erörtert und betont worden. Wenn *v. Möllendorff* den Begriff der *Strukturdichte* einführt, so stellt dieser nur eine andere Umschreibung für die *Porengröße Pappenheims*, und ist daher nicht als Fortschritt zu bezeichnen. Wir müssen aber *P. G. Unna*⁴⁾ recht geben, daß die Porengröße eine völlig hypothetische und nicht genau festzustellende Größe ist, mit deren Einführung unsere Erkenntnis nicht vorwärts gebracht worden ist.

Die Tatsache, daß die Diffusionsfähigkeit der Farbstoffe, also eine physikalische Eigenschaft, für das Zustandekommen einer guten histologischen Färbung maßgebend ist, steht aber durchaus nicht in Widerspruch mit der Annahme, daß die *Verteilung* der sauren und basischen Farbstoffe auf die einzelnen Gewebstrukturen hauptsächlich durch chemische Einflüsse bedingt ist. Unserer Meinung nach liegt für den Histologen keine Veranlassung vor; an der chemischen Natur der meisten histologischen Färbungen zu zweifeln, eine Ansicht, die zuletzt besonders von *Becher* und *Unna* vertreten wurde, insbesondere da maßgebende Farbenchemiker (*R. Pfeifer*) auch bei den Textilfärbungen echte chemische Verbindungen zwischen Faser und Farbstoff als vorliegend erachten⁶⁾.

Es verdient besonders betont zu werden, daß die chemische Theorie der histologischen Färbung als außerordentlich fruchtbar und von bedeutendem, heuristischem Wert sich erwiesen hat. Zum Beweise für diese Behauptung brauche ich nur an die Arbeiten von *P. G. Unna* und *Becher* zu erinnern, die, von *chemischen* Grundlagen ausgehend, eine beträchtliche Zahl neuer Färbemethoden geschaffen haben. Im Gegensatz hierzu vermag die Unterscheidung von Dfg. und Nfg. (*v. Möllendorff*) uns keinerlei Fingerzeige für die Auffindung neuer Färbungen zu geben.

Auf eine eingehende Widerlegung der Anschauungen von *v. Möllendorff* und *Tomita* über die Natur der Beizenfärbung glaube ich um so mehr verzichten zu können, als in dieser Arbeit gezeigt wird, daß *chemisch genau bestimmte Stoffe* (*saure Lipoide*), die in gebundener Form in den einzelnen Zellbestandteilen enthalten sind, *basische Metalloxyde aufnehmen und mit gewissen sauren Farbstoffen* (Hämatoxilin [*Becherschen Farbstoffen*]), die *Farblackfärbungen liefern*. Diese Lipoide

befinden sich an den Strukturoberflächen in reichlichen Mengen und sind die Ursache für die Entstehung der von *v. Möllendorff* sog. Nfgen. Der Nachweis, daß die Hämatoxylinfärbungen auf sauren Lipoiden beruhen, hat es ermöglicht, einige neue histologische Doppelfärbungen aufzufinden, über die ich später ausführlich berichten werde.

Wie eingangs erörtert worden ist, beruhen die Färbungen mit Hämatoxylin und anderen sauren Beizenfarbstoffen darauf, daß die basischen Metalloxyde einerseits mit den Gewebsbestandteilen, andererseits mit den sauren Farbstoffen, eine Tripelverbindung, nach Art eines Amboceptors, eingehen. Demnach müßten die Zellbestandteile, die durch solche Beizenfärbungen dargestellt werden, saure Körper enthalten, die mit den Metalloxyden eine chemische Verbindung bilden. Es muß nun weiter die Frage aufgeworfen werden, welche sauren Körper hierdurch gefärbt werden. Nach der landläufigen Anschauung [vgl. *Pappenheim*³⁾] soll es sich bei den Beizenfärbungen um das Chromatin, also die sauren Nucleine bzw. Nucleoproteide des Kernes handeln, die man auch mit basischen Farbstoffen direkt und substantiv färben kann.

Diese Anschauung entspricht jedoch nicht den Tatsachen. Es ist ein großes Verdienst von *Unna*⁸⁾, zuerst nachgewiesen zu haben, daß die Alaun-Hämateinfärbungen nicht auf den Nucleinen des Kernes beruhen. Denn nach Entfernung dieser sauren Eiweißkörper durch Vorbehandlung der Gewebsschnitte mit verdünnter Salzsäure, liefert dieser Beizenfarbstoff noch eine unverändert gute Kernfärbung. Dagegen fand *Unna*, daß vorausgegangene Behandlung der Gewebsschnitte mit konz. Salzsäure die Alaun-Hämateinfärbung vernichtet. *Unna* faßte diese Kernsubstanz als ein basisches (oxyphiles), in konz. Salzsäure lösliches Eiweiß auf. Die Basizität dieses Kernbestandteils begründet *Unna* damit, daß Hämatein ein saurer Farbstoff ist und Alaun chemisch sauer reagiert. Das Alaun-Hämatein wirke als saurer Farbstoff, der als solcher vom basischen Kerneiweiß aufgenommen würde. Im Gegensatz zu den übrigen Forschern behauptet *Unna*, daß Alaun für sich allein von den Geweben nicht gebunden würde, vielmehr durch Wasserspülen sich auswaschen ließe. Die letztere Behauptung von *Unna* läßt sich jedoch mit den Tatsachen nicht vereinbaren. In Übereinstimmung mit *P. Mayer* fand ich⁵⁾, daß das Aluminiummetall aus Alaun oder Aluminiumchlorid oder noch besser aus basischer essigsaurer Tonerde (*Becher*) tatsächlich von den Geweben aufgenommen wird, was sich dadurch beweisen läßt, daß ein mit diesen Lösungen vorbehandelter und nachher abgespülter Gewebsschnitt mit einer Hämateinlösung ohne Beize eine ähnliche Färbung liefert wie Alaun-Hämatein (bekanntlich ist durch Hämatein allein ohne Beizung des Gewebes eine Färbung nicht zu erzielen). Bemerkenswerterweise hatte *Unna* nur das Alaun-Hämatein in den Kreis seiner histochemischen Untersuchungen gezogen. Bei Verwendung anderer Metalloxyde, z. B. Eisen- und Chrom-

verbindung, ist der Mechanismus der Färbungen dadurch sehr ersichtlich, daß in diesen Fällen zuerst eine Behandlung des Gewebes mit den verschiedenen Metallbeizen und erst dann eine Färbung mit einer wässerigen Hämateinlösung erfolgen muß.

Demnach ist an der Tatsache, daß die Gewebe bzw. Gewebsbestandteile direkt Metalloxyde (Aluminium, Eisen, Chrom, Kupfer) aufnehmen, nicht zu zweifeln; und die Beizenfärbungen kommen dadurch zustande, daß die von den Geweben aufgenommenen Metalloxyde mit dem Hämatein einen schwer löslichen Lack bilden. Hieraus folgt aber, daß die Metalloxyde von einer *sauren* Gewebssubstanz aufgenommen werden müßten. Dies geht auch daraus hervor, daß man mit basischen Farbstoffen eine substantive Färbung derselben Zellstruktur wie mit Hämatein + Beizen erhalten kann. Daß aber auch bei der substantiven Färbung es sich nicht um die sauren Nucleine resp. Nucleoproteide handelt, wird dadurch bewiesen, daß auch an Schnitten, die mit verdünnter Salzsäure vorbehandelt worden sind — also nach Entfernung der Nucleoproteide —, mit zahlreichen basischen Farbstoffen, z. B. Safranin, Fuchsin, Karbolmethylenblau und auch nach Giemsa noch eine gute Kernfärbung zu erzielen ist.

Unsere eingehenden Untersuchungen¹⁰⁾ an tierischen Zellen haben zu dem Ergebnis geführt, daß die durch Hämatein + Beize adjektiv oder durch basische Farbstoffe substantiv darstellbare Gewebsschicht aus *sauren* Lipoiden sich zusammensetzt. Und zwar handelt es sich nicht um freie in den Zellen enthaltene Lipoiden, sondern um solche, die an einen basischen Eiweißkörper, die sog. basische Grundsubstanz von *Unna* chemisch gebunden sind. Zu diesem Ergebnisse führen nämlich die Lösungsversuche: die in Frage stehende Mittelschicht der tierischen Gewebe ist in *Salzsäurealkohol*, *nicht aber in Alkohol allein oder Salzsäure allein löslich*. Nach einer Vorbehandlung mit Salzsäurealkohol lassen die tierischen Gewebe weder mit Hämatein + Beizen noch mit basischen Farbstoffen irgendeine nennenswerte Färbung mehr erkennen. Wohl ist aber dann mit allen sauren Farben eine Darstellung der basischen Grundsubstanz von *Unna* mit Leichtigkeit zu erzielen.

Die Auffindung der gebundenen sauren Lipoiden ist merkwürdigerweise zuerst an Bakterien gelungen. Wie neuere Untersuchungen ergeben haben [*Gutstein*⁵⁾ ⁹⁾, *Schumacher*¹¹⁾] enthalten die Bakterien und Hefezellen auch nach Entfernung der sauren Eiweiße (Nucleoproteide) saure, durch basische Farbstoffe nachweisbare Stoffe, die nicht in Alkohol, wohl aber in Salzsäure-Alkohol löslich sind. Die Lipoiden sind in den verschiedenen Teilen der Bakterien, Ektoplasma, Endoplasma und Kern enthalten [*Gutstein*⁵⁾], und sie dürften zum Teil mit Lecithin übereinstimmen (*Gutstein*⁵⁾). Auf einem sauren Lipoid beruht auch die Gramsche Färbung der grampositiven Bakterien [*Schumacher*¹¹⁾, *Gutstein*¹⁴⁾].

Daß tatsächlich gewisse Lipoiden in färberischer Beziehung sich ebenso wie die erwähnte Mittelschicht der tierischen Gewebe verhalten, läßt

sich an einem einfachen Modellversuch beweisen. *Objektträgerausstriche von chemisch reinem Lecithin geben mit zahlreichen basischen Farbstoffen (Carbolmethylenblau, Fuchsin, Safranin usw.) eine gute Färbung⁵⁾*. Behandelt man aber solche Ausstriche mit *Metallverbindungen*, z. B. mit einer Lösung von Eisenchlorid, Alaun, Aluminiumchlorid, Kaliumbichromat, so nehmen sie basische Farbstoffe ziemlich schlecht auf. Dagegen liefern sie dann mit einer *wässrigen Hämateinlösung vorzügliche Färbungen*, und zwar werden die *Lecithinausstriche* nach Vorbehandlung mit *Eisenverbindungen* schwarz bis violettschwarz mit *Aluminiumverbindung* blaviolett, mit *Bichromat* schwarz-violett gefärbt, also in derselben Nuance wie die Kerne der tierischen Zelle. Auch mit anderen sauren Farbstoffen, z. B. Säureviolett 6 B geben gebeizte Lecithinausstriche ausreichende, allerdings nicht so starke Färbungen wie mit Hämatein.

Es ist sehr merkwürdig, daß man auf diesen einfachen Zusammenhang zwischen Hämatoxylinfärbungen und sauren Kernlipoiden bisher nicht gekommen ist. Trotzdem einige mikrochemische Befunde diese Annahme geradezu nahelegen. Denn nachdem *Carl Weigert* 1884/85 seine bekannte Methode der färberischen Darstellung der Markscheiden der Nerven mittels kombinierter Metallbeizen (Bichromat, Chromflorid, Kupferacetat) und Nachfärbung mit Hämatein bekannt gegeben hatte, wies *Wlassak* 1898 nach¹²⁾, daß Protagon und Lecithin ähnliche färberische Reaktionen, nämlich Bildung eines Farblackes mit Metalloxyden + Hämatein aufweisen. Später hat *Escher*¹³⁾ durch einwandfreie Versuche gezeigt, daß besonders unzersetzt Lecithin die *Weigertsche* Reaktion gibt, die nur auf dem Gehalt der Markscheiden an diesem Phosphatid beruhen kann. Nichts lag also näher, als der Frage nachzugehen, ob auch die üblichen Kernfärbungen mit Hämatein + Beizen auf ähnlichen Stoffen beruhten. Zwar erwähnt *Escher*, daß es auffallen müßte, „wieso denn das allbekannte histologische Reagens der Zellkerne“ nämlich einer Alaun-Eisen-Hämateinlösung „gerade von Lecithinen und Zellkerneweißstoffen in so gemeinsamer Weise aufgenommen wird“. Für diese auffällige Tatsache versucht *Escher* durch Analogien in der chemischen Konstitution von Lecithin (Glycerin [Triose], Phosphorsäure, Cholin) und Nucleine (Pentose, Phosphorsäure, Kosselsche Basen [Adenin usw.]) eine annehmbare Erklärung zu geben. Auf den naheliegenden Gedanken, daß die Hämatoxylinfärbung der Zellkerne ebenfalls auf Phosphatiden beruhen könnte, ist *Escher* wahrscheinlich deswegen gar nicht gekommen, weil er in der landläufigen Anschauung (*Pappenheim*) befangen ist, daß diese Beizenfärbungen sog. Chromatin färbten. Daß aber diese Annahme den Tatsachen nicht entspricht, hat *Unna* schon früher — wie oben erwähnt — dadurch nachgewiesen, daß die Zellkerne auch Nachbehandlung der Gewebe mit Nucleoproteide

lösenden Reagenzien noch eine unveränderte Hämateinfärbung geben. Diese Feststellung von *Unna* in Verbindung mit den Befunden von *Wlassak-Escher*, daß Phosphatide die Weigertsche Färbung geben, führt aber folgerichtigerweise zu dem Ergebnis, daß die Hämateinlackfärbung der Zellkerne auf ihrem Lipoidgehalt beruhen muß. Wenn aber *Unna* gefunden hat, daß Behandlung der Gewebsschnitte mit konz. Salzsäure die Alaun-Hämateinfärbung vernichtet, so spricht diese Tatsache nicht gegen das Vorliegen eines Lipoids, denn auch die *Gramsche* Färbung der Bakterien, die, wie oben erwähnt, auf einem Lipoid beruht, wird ebenfalls durch konz. Salzsäure vernichtet, wahrscheinlich durch Zersetzung des Lipoids (*Gutstein*¹⁴).

Charakteristisch für die bisher gebräuchliche Hämateinfärbung ist der Umstand, daß sie *nur* oder hauptsächlich zur Darstellung der Zellkerne benutzt werden. Daraus könnte man bei oberflächlicher Betrachtung schließen, daß nur in diesem Teil der Zelle saure Lipotide enthalten sind. Unsere eingehenden Untersuchungen führten doch zu dem Ergebnis, daß diese Annahme nicht zutreffen kann. Vielmehr sind Lipotide nicht nur im Kerne, besonders in der Kernmembran und im Nucleolus, sondern auch, allerdings in geringeren Mengen, in der Membran der Zelle und in gewissen mit neueren Methoden darstellbaren Protoplasmagranula enthalten. Die Erklärung für die Tatsache, daß die gebräuchlichen Hämateinfärbungen nur den Zellkern zur Darstellung bringen, liegt darin, daß die Untersucher gleichzeitig mit der Färbung oder hinterher ein Entfärbungsmittel zur Differenzierung benutzt haben. So gebraucht *Heidenhain* zur Differenzierung eine Eisen-Alaunlösung, *Benda* Essigsäure oder Liq. ferr. sulf., ebenso *Hansen*. Bei anderen Methoden wirkt Alaun, wenn er im Überschuß der Farbflotte zugesetzt wird, z. B. nach der Methode von *Ehrlich*, oder wenn er nach erfolgter Färbung benutzt wird, als Entfärbungsmittel, da er bekanntlich mit Hämatein eine wasserlösliche Verbindung eingeht.

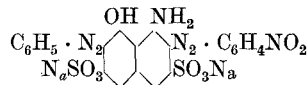
Das Bestreben, aus praktischen Gründen eine ausschließliche („reine“) Kernfärbung der Gewebe zu erzielen, hat *Becher*⁴) veranlaßt, bei seinen neuen Beizenfarbstoffen Methoden auszuarbeiten, die eine *simultane* Einwirkung von Beizenfarbstoffen plus Beizenmetall ermöglichen, nach *Bechers* Bezeichnung eine Farblacklösung. *Becher* betont wiederholt (l. c., S. 256), daß bei Behandlung der Gewebe mit Metalloxyden und nachheriger Färbung mit der wässerigen Lösung des Farbstoffes keine reine Kernfärbung erhalten wird, vielmehr dabei noch andere Zellbestandteile mitgefärbt werden.

Becher zieht hieraus den Schluß, daß „Metallbeizen oft und vielleicht immer eine andere Verteilung annehmen, als die gelösten Farblacke desselben Metalles.“ B. sieht sich daher zu der Annahme genötigt, daß die Lacklösung nicht als gleichartig mit der Mischung von Farbstoff und Metallsalz angesehen werden kann und vielmehr als neuer Farbkörper (Farblack) wirke, der meist eine reine Kernfärbung liefere. Meiner Meinung nach ist diese Anschauung *Bechers* nicht völlig zutreffend. Vielmehr nehmen die Gewebsbestandteile aus der Lacklösung das Metall *in grundsätzlich gleicher Weise wie bei Beizung mit der reinen Metallsalz-*

lösung auf. Die verschiedene färberische Wirkung der beiden Methoden beruht nur darauf, daß das in der Lacklösung im Überschuß enthaltene Metallsalz gleichzeitig als Differenzierungsmittel wirkt: Nur an Kern und Nucleolus, die reichlich Lipide enthalten, haften Metall und Beizenfarbstoff fest genug, während an den übrigen Strukturen der Zelle, die wesentlich weniger Lipide (vielleicht auch in qualitativer Hinsicht von den Kernlipiden verschieden) enthalten, die etwa entstandene Färbung wieder gelöst, wegdiffundiert wird. Nach meiner Auffassung nimmt außer dem Kern auch der Rest der tierischen Zelle aus der Lacklösung die Metallbeize auf. Meine Auffassung läßt sich durch folgenden Versuch stützen: Wird ein mit Mayers Hämalaun (Lacklösung nach Bechers Bezeichnung) gefärbter Gewebsschnitt nach Wasserspülung mit einer wässrigen Hämateinlösung ohne Beize nachbehandelt, so erhält man eine stärkere Kernfärbung und daneben eine etwas hellere Färbung des Protoplasmas, nämlich der Zellmembran und Protoplasmaorganula. Dieser Versuch zeigt meines Erachtens eindeutig, daß außer dem Kern noch die übrigen Zellstrukturen aus dem Hämalaun das Aluminiummetall aufgenommen haben müssen, da sonst nicht nachher durch Hämatein allein eine Färbung hätte eintreten können.

Vermeidet man jedoch jedes Differenzierungs- und Entfärbungsmittel, indem man die Färbung in der Weise vornimmt, daß die zuerst mit der Metallsalzlösung gebeizten Gewebsschnitte (Aluminium- und Eisenverbindung) nach Wasserspülung mit einer wässrigen Hämateinlösung nachbehandelt und genügend gewässert worden, so erkennt man unter dem Mikroskop folgende deutlich hervortretende Zellstrukturen (z. B. an Leberzellen): Kern und Nucleolus sind stark gefärbt, etwas weniger die äußere Zellhaut. Außerdem sieht man bei gut gelungener Färbung auch im Protoplasma runde, ungefärbte Granula mit deutlich gefärbter Membran. Dieselben Strukturen erhält man auch, wenn man nach Beizung des Schnittes mit Eisenchlorid oder Alaun oder basische essigsäure Tonerde mit Säureschwarz (Kahlbaum) nachfärbt (vgl. Textabbildung S. 854).

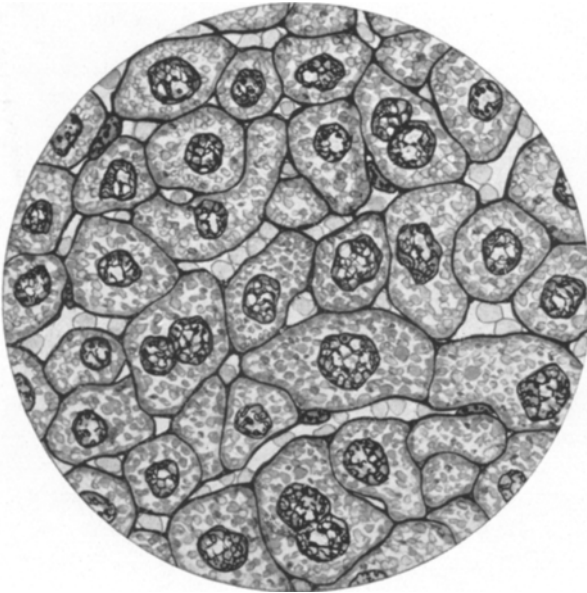
Säureschwarz hat die Formel:



enthält also eine OH-Gruppe in Orthostellung zum Chromophor. Diese Bedingung ist nach der Regel von Möhlau und Steinig⁴⁾ ausreichend für die Beizeigenschaften eines Farbstoffes, und erklärt die Tatsache, daß Säureschwarz sich trotz mehrerer Sulfogruppen als Beizenfarbstoff erweist. Über weitere Methoden zur Darstellung der verschiedenen Lipide in den tierischen Zellen werde ich später ausführlicher berichten.

In einer jüngst erschienenen Arbeit beschreiben Christeller und Kaiser¹⁵⁾ eine histochemische Methode zum Nachweis von Eisen, das von frischen Gewebstückchen durch Behandlung mit Eisensalzen aufgenommen worden ist. Der Nachweis geschieht mittels der Berlinerblau-Reaktion. Es muß jedoch bemerkt werden (vgl. meine Bemerkungen in der Aussprache zu dem obigen Vortrag der Verfasser), daß diese Versuche nichts grundsätzlich Neues enthalten, denn von Benda, Heidenhain, Weigert u. a. sind ähnliche Versuche bereits vor mehreren Jahrzehnten ausgeführt worden, und zwar indem die genannten Forscher das vom tierischen Gewebe aufgenommene Eisen mittels Hämatein nachgewiesen haben. Wenn auch

Hämatein kein *spezifisches* Reagens auf Eisen ist — es bildet ja, wie oben erwähnt, auch mit anderen Metalloxyden Lacke —, so ist trotzdem bei den Methoden von *Benda*, *Heidenhain*, *Weigert* sicher der Nachweis dieses von gewissen Zellbestandteilen aufgenommenen Metalles deswegen erbracht, weil ja nur dieses und kein anderes Metall dem Gewebe zugeführt worden ist, und also auch nur diejenigen Gewebsbestandteile mit Hämatein ohne Beize eine Färbung geben konnten, die durch die Vorbehandlung Eisen aufgenommen haben. Wichtiger ist es jedoch, auf die Deutung einzugehen, die *Christeller-Kaiser* ihren Versuchen gegeben haben. Vorher aber möchte ich noch bezüglich der Technik bemerken, daß man im allgemeinen dieselben Ergebnisse erhält, wenn man nicht frische Gewebstücke, sondern fixierte Schnitte mit Eisensalzen behandelt. Die letzte Methode, die ich zum Nachweis



Leberschnitt. Vorbehandlung mit Alaun. (1—2 Std.) Nachfärbung mit wässrigem Hämatein (5—10 Min.). Alkoholreihe, Balsam. $\frac{1}{12}$ Ölimmersion. Ok. 4. (Leitz). Kerne und Nucleoli stark blauviolett, Zellmembran hellviolett. Im Protoplasma zahlreiche Granula mit angelegter Membran. Zwischen den einzelnen Zellen sind die Erythrocyten sichtbar.

der Zell- und Kernmembran der tierischen Gewebe bereits früher benutzt habe [Vortrag Patholog. Ges., Berlin 1924¹⁰] gibt sogar bessere und klarere Färbungen als nach dem Verfahren von *Christeller-Kaiser*. Bei der Methodik dieser Autoren (Verwendung von kleinen Gewebstücken) erhält man nämlich oft ungleichmäßige Färbungen. Außerdem ist die Färbung mit Hämatein viel stärker und daher viel schärfer als die Berlinerblau-Reaktion. Bei Verwendung von Hämatein wird z. B. außer den oben erwähnten Zellstrukturen auch die Elastica und das kollagene Bindegewebe, letzteres allerdings nicht so stark, gefärbt.

Was nun die Zellsubstanz anbetrifft, die Eisen aufnehmen, so sprechen *Christeller-Kaiser* von Milchsäure und Eiweißstoffen. Das erstere ist meines Erachtens kaum möglich. Denn 1. ist Milchsäure in viel zu geringen Mengen in den Zellen enthalten, als daß sie sich im histologischen Präparat mikrochemisch nachweisen ließe, und 2. ist für jeden Chemiker klar, daß man mit Eisenverbin-

dungen deswegen nicht Milchsäure im Gewebsschnitt nachweisen kann, weil das sich evtl. gebildete Eisenlactat in Wasser löslich ist und daher aus den Gewebsschnitten durch bloßes Wässern herausgeschwemmt werden müßte. Auch Zelleiweißstoffe sind es in der Hauptsache nicht, die das Eisenmetall aufnehmen. Denn nach Behandlung der Gewebsschnitte mit verdünnter Salzsäure, wodurch alle sauren Eiweiße, auch die Albuminate gelöst werden, zeigen sie, wie ich in meinem Vortrag bereits angegeben habe, nach Beizung mit Eisenverbindungen und Hämateinnachfärbung dieselben Strukturen (Kern, Nukleolus, Membran der Zelle, Protoplasmagranula) wie bei unvorbehandelten Schnitten. Demnach können nur die in der Mittelschicht der Gewebe enthaltenen Lipoiden Eisen aufgenommen haben; denn nach Vorbehandlung mit Salzsäurealkohol ist eine solche Färbung mittels Eisenbeizung nicht mehr zu erhalten. In Übereinstimmung damit findet man, daß ein mit Eisenchlorid behandelter Lecithinausstrich mit Ferrocyankalium + Salzsäure bläulich gefärbt wird. Die Färbung ist jedoch nicht so stark wie bei Nachbehandlung mit Hämatein, wodurch eine prächtige schwarzviolette Färbung des Lecithinausstriches erhalten wird.

Dieselben Zellschubstanzen, nämlich die Lipoiden, nehmen nicht nur Eisen, sondern auch andere Metalle, z. B. Aluminium, Chrom auf, wie sich ebenfalls durch Hämateinfärbung nachweisen läßt.

Mit der Erkenntnis, daß die Hämateinmethoden (+ Beizen) gebundene Zelllipoiden zur Darstellung bringen, wird mit einem Schlage die Chemie zahlreicher Gewebssstrukturen aufgeklärt, die von verschiedenen Autoren durch Hämateinbeizenfärbungen dargestellt werden konnten. Ich erinnere an die *Hornsubstanzen* (*Heidenhains* Eisenhämatein) und an das *Fibrin* (Darstellung nach *Kockel* mit Chromsäure-Hämatein), die demnach saure Lipoiden enthalten dürften.

Es verdient besonders betont zu werden, daß die eben erwähnten Gewebssbestandteile (Fibrin, Keratinsubstanzen) auch mit Hilfe der *Gramschen* Färbung bzw. mit deren *Weigertscher* Modifikation gefärbt worden sind. Daß die *Gramsche* Methode nach neueren Untersuchungen auf Lipoiden beruht, habe ich bereits oben erwähnt. Die hier entwickelte Anschauung, daß die Hämateinfärbung saure Zelllipoiden darstellt, steht also in vorzüglichem Einklang mit der soeben erwähnten Tatsache, daß dieselben Gewebssbestandteile sowohl nach *Gram* als auch mit Hämatein + Beizen gefärbt werden können. Eine weitere Parallelität zwischen diesen beiden Färbemethoden lassen auch andere Zellbestandteile erkennen, z. B. Mitosen, Nucleolus und Epithelfasern. In der nachstehenden Übersicht sind diejenigen Zellbestandteile zusammengestellt, die einerseits nach *Gram-Weigert* und andererseits mit Hämatein + Beizen gefärbt worden sind, unter Angabe der betreffenden Forscher, die die Methoden zuerst bekannt gegeben haben (S. 856).

Aus diesen Untersuchungen geht also hervor, daß die sauren Lipoiden (Phosphatide) verschiedene Metalloxyde — Chrom, Aluminium, Eisen, Kupfer usw. — aufnehmen. Es drängt sich nun die Frage auf, ob auch andere Schwermetalle, wie z. B. Silber und Gold, ebenfalls von denselben Zellschubstanzen fixiert werden. In der Tat habe ich an den Bakterien ge-

Darstellung von Zellstrukturen nach Gram und durch Hämateinlacke.

Zellstruktur	Gramsche Färbung bzw. Weigertsche Modifikation	Autor	Hämateinlacke	Beize	Autor
Hornschicht	++	Ernst	++	Eisen	Zeroni
Fibrin	++	Weigert	++	Chromsäure	Kockel
Mitosen	++		++	Eisen	
Nucleolus	++		++	Eisen	
Epithelfasern	++	Benecke, Kromayer- Fischel	++	Eisen	Heidenhain

funden, daß deren Lipoid Silber aus den entsprechenden Salzlösungen aufnehmen. Daß dies auch für tierische Gewebe gilt, kann daraus geschlossen werden, daß die Achsenzyylinder der Nervenfasern nach *Cohnheim*, *Golgi*, *Ramony Cayal*, und *Bielschowsky* durch Gold- und Silbersalze geschwärzt werden. Ebenso nehmen die Zellgrenzen, also die Zellmembranen nach von *Recklinghausen* Argentum auf, in Übereinstimmung mit unseren Befunden, daß auch diese Zellteile saure Lipoiden enthalten. Demnach dürften auch die kollagenen Bindegewebsfasern solche Lipoiden enthalten, da sie nach *Bielschowsky-Maresch* mittels Silberimprägnation dargestellt werden konnten. Im Einklang damit steht die Tatsache, daß diese Fasern auch mit Hämatein gefärbt worden sind, z. B. nach der Methode von *Verocay* (Chromsäurebeizung und Nachfärbung mit *Delafields* Hämatein). Auch die Darstellung der Spirochäten mittels Silber nach *Levaditi* dürfte wohl auf ihrem Lipoidgehalt beruhen.

In all den genannten Bestandteilen der tierischen Zellen sind jedoch die Lipoiden nicht *frei* enthalten, da sie sich in Alkohol, Äther usw. nicht lösen lassen, sondern vielmehr an ein basisches Eiweiß *gebunden*. Aus diesem Grunde kann man die erwähnten Zellstrukturen auch mit sauren Farbstoffen ohne Beize färben, wodurch dann deren basische Grundsubstanz dargestellt wird. Das saure Lipoid kann aber nicht nur durch Beizen (Metalloxyde) und Hämatein oder andere saure Beizenfarbstoffe, sondern auch substantiv durch basische Farbstoffe gefärbt werden, und die Färbung wird nicht nur durch vorausgegangene Behandlung der Gewebe mit verdünnter Salzsäure — die die sauren Eiweiße löst — sondern durch Salzsäurealkohol zum Verschwinden gebracht.

In Übereinstimmung mit *Unna* sind also in den tierischen Zellen 3 Schichten zu unterscheiden, und zwar 1. Schicht der *sauren Eiweiße* (Nucleoproteide, Globuline, Cytose), die nach *Unna* dadurch charakterisiert sind, daß sie basische Farbstoffe aufnehmen und in verdünnter Salzsäure löslich sind. 2. Schicht der *gebundenen sauren Lipoiden*, nachweisbar durch substantive Färbung mit basischen Farbstoffen (nach Salzsäurevorbehandlung) oder adjektiv durch Metallbeizen + Hämatein. Diese Mittelschicht ist in Salzsäurealkohol löslich, und 3. die *Grundsub-*

stanz, ein basisches Eiweiß, nachweisbar durch saure Farbstoffe nach Entfernung aller sauren Körper. Die Grundsubstanz ist nach *Unna* in Alkalien löslich.

Die einzelnen Strukturteile der erwähnten Mittelschicht weisen in färberischer Beziehung sowohl in bezug auf die adjektive Färbung mit Hämatein + Beizen als auch in bezug auf substantive Färbung mit basischen Farbstoffen weitgehende Unterschiede auf. So hält der Zellnucleolus die Gramsche Färbung am längsten fest; die Färbung der Kernlipide durch Metalloxyde + Hämatein hält einer Differenzierung (mit Alaun usw.) stand, im Gegensatz zu den Lipoiden des Protoplasmas und der Zellmembran. Durch dieses verschiedene Verhalten ist es vielen Forschern gelungen, nur einzelne Strukturelemente, z. B. die *Weigertsche* Fibrinfärbung *elektiv* sichtbar zu machen. Aus diesen Tatsachen muß geschlossen werden, daß die in den einzelnen Zellstrukturen enthaltenen Lipide nach Menge und wahrscheinlich auch Art große Unterschiede aufweisen, auf denen ihr abweichendes färberisches Verhalten bezogen werden muß.

Literaturverzeichnis.

- ¹⁾ *Meyer, Fritz*, Chemie der organischen Farbstoffe. Springer, Berlin 1921, S. 230. — ²⁾ *Mayer, P.*, Enzyklopädie der histologischen Technik. Art. Hämatoxylin. — ³⁾ *Pappenheim, A.*, Grundriß der Farbenchemie. Berlin 1901. — ⁴⁾ *Becher, S.*, Untersuchungen über Echtfärbung der Kerne. Bornträger, Berlin 1921. — ⁵⁾ *Gutstein*, Zentralbl. f. Bakteriologie, **95**, H. 7/8. — ⁶⁾ Zit. nach *Becher*. — ⁷⁾ *v. Möllendorff und Tomita*, Zeitschr. f. Zellforsch. u. mikrosk. Anatomie **3**, H. 1. 1925. — ⁸⁾ *Unna*, Chromolyse. Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden von Abderhalden Bd. VI, T. 2. — ⁹⁾ *Gutstein*, Zentralbl. f. Bakteriologie, **95**, H. 1. — ¹⁰⁾ *Gutstein*, Vortrag d. Pathol. Ges., Berlin, Dez. 1924. Klin. Wochenschr. 1925. — ¹¹⁾ *Schumacher*, Zentralbl. f. Bakteriologie, **93**. — ¹²⁾ *Wlassak*, zit. nach *Escher*. — ¹³⁾ *Escher*, Korrespondenzbl. f. Schweiz. Ärzte. — ¹⁴⁾ *Gutstein*, Zentralbl. f. Bakteriologie, **94**, H. 3/4. — ¹⁵⁾ *Christeller-Kaiser*, Klin. Wochenschr. 1925, Nr. 46.