

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

Zur Morphologie und Mikrochemie der tierischen Zelle.

Nachweis der Zellmembran.

Von

Dr. med. M. Gutstein.

Mit 18 Textabbildungen.

(Eingegangen am 7. April 1927.)

Inhaltsübersicht.

I. Darstellung des Membransystems (S. 807).

A. Mittels saurer Beizen (S. 806).

- a) Einfache Färbungen (S. 807).
 - 1. Tannin-Fuchsin-Methode (S. 807).
 - 2. Wasserblau-Soda-Tannin-Safranin-Methode (S. 810).
- b) Doppelfärbungen (S. 809).
 - α) Vorfärbung mit sauren Farbstoffen (S. 809).
 - 2. Eosin-Soda-Tannin-Methylenblau-Methode (S. 809).
 - 3. Wasserblau-Soda-Tannin-Safranin-Methode (S. 810).
 - β) Vorfärbungen mit basischen Farbstoffen (S. 811).
 - 4. Karbolmethyleneblau-Tannin-Fuchsin-Methode (S. 811).
 - 5. Karbolfuchsin-Essigsäure-Tannin-Methylenblau-Methode (S. 813).

B. Mittels basischer Beizen (S. 814).

- 6. Alaun-Säureschwarz-Methode (S. 814).
- 7. Alaun-Hämatoein-Methode (S. 816).

II. Chemischer Bau des Membransystems (S. 821).

- 1. Nachweis des sauren Lipoids (S. 824).
- 2. Nachweis der basischen Grundsubstanz (S. 825).

Während in der Bakteriologie hauptsächlich basische Farbstoffe verwendet werden, die die Bakterien direkt (substantiv) anzufärben gestatten, spielen in der Histologie und Histopathologie sog. adjektive Färbungen eine ziemlich wichtige Rolle. Bei dem letzteren Verfahren werden die *basophilen Zellkernsubstanzen* mit einem *sauren* Farbstoff sichtbar gemacht, und zwar dadurch, daß zwischen die *basophile Kernsubstanz* und den *sauren Farbstoff* eine *basische Beize als Bindeglied* zwischengeschaltet wird. Als Prototyp einer solchen Beizenfärbung sind die *Hämatoxylinfärbungen* anzusehen, bei denen mittels einer basischen Beize (Alaun, Eisenchlorid, Cu-Verbindungen usw.) saure Kernbestandteile (saure Lipoide) mit dem sauren Hämatoein gefärbt werden¹.

Dagegen sind bis jetzt *saure Beizen* zur Darstellung von Zell- und Gewebsstrukturen nur sehr selten verwendet worden. Nun haben wir in neuerer Zeit mit Erfolg zum *Nachweis des Ektoplasmas der Bakterien* eine saure Beize, das Tannin (ac. tannicum) herangezogen^{2, 3)}. Nach Beizung der Bakterienaussstriche mit 5- resp. 30 proz. Tannin und Nachfärbung mit einem *basischen* Farbstoff konnte das Ektoplasma der grampositiven, bzw. gramnegativen Bakterien *isoliert* sichtbar gemacht werden. Die *Tanninmethode* hat sich deswegen als sehr *wertvoll* erwiesen, weil sie es ermöglicht hat, *Zwei- und Mehrfarbenbilder* der Bakterien herzustellen, und auch einen *bequemen Nachweis des Kernes liefert*. Es lag nun sehr nahe, die Tanninmethoden auf ihre Brauchbarkeit zur Darstellung von Zell- und Gewebsstrukturen zu untersuchen. Breits 1924 konnten wir feststellen, daß ebenso wie bei Bakterien auch bei tierischen Zellen durch die Tanninmethode die *oberflächlichen Hüllen* derselben *isoliert* gefärbt werden, *nämlich Membran der Zelle*, des *Kernes* und *gewisser Protoplasmagranula*, die von mir als das *Membransystem* der tierischen Zelle zusammengefaßten Gebilde. — Über den Nachweis und mikrochemischen Bau des Membransystems habe ich in einem Vortrag vor der Pathologischen Gesellschaft in Berlin im Dezember 1924 kurz berichtet⁴.

Das Tannin ist in der histologischen Technik mehrfach verwendet worden, aber fast ausschließlich als *Nachbeize*, d. h. nach vorangegangener Färbung mit basischen Farbstoffen. So beitzt *Laveran*⁵ Methylenblaupräparate, *Harris*⁵ Toluidinblaupräparate mit Tannin nach. *Unna*⁶ behandelt histologische Präparate, die mit polychromem Methylenblau oder Carbolfuchsin vorgefärbt sind, mit konzentriertem Tannin nach. Bei diesen Methoden wirkt das Tannin, wie *Unna* bereits hervorgehoben hat und wir durchaus bestätigen können, teils auf Grund seiner Säureeigenschaften (ac. tannicum) als Differenzierungsmittel, indem es einen Teil des aufgenommenen basischen Farbstoffes weglöst, und teils als Fixationsmittel, indem es an einigen Zellteilen den Farbstoff fixiert. In derselben Weise benutzt *K. Herzheimer* (Berlin. klin. Wochenschr. 1915, Nr. 40) das Tannin, mit dem er nach Giemsa 24—48 Stunden lang gefärbte Schnitte $\frac{1}{2}$ Stunde nachbehandelt.

Wesentlich anders jedoch wirkt das Tannin, wenn es, wie bei meinen Methoden als *Vorbeize* verwendet wird. Da es sich hierbei um eine *saure Vorbeize* handelt, kommt *nur* eine Nachfärbung mit *basischen* Farbstoffen in Frage. Das Wesen dieser Färbemethoden beruht, wie ich an anderer Stelle nachgewiesen habe⁷, darauf, daß das Tannin mit *basischen* Zellbestandteilen einerseits und einem basischen Farbstoff andererseits eine *Tripelverbindung* eingeht.

Soweit ich die Literatur übersehe, hat nur *Rawitz*⁵ die Tanninbeizung der eigentlichen Färbung vorausgeschickt. Die *Rawitzsche Methode* — 24stündige Beizung mit 20% Tannin, Nachbehandlung mit 1— $2\frac{1}{2}$ proz. Brechweinstein mehrere Stunden, Färbung mit Fuchsin oder Methylenviolett — die dem in der Technik der Baumwollfärberei üblichen Verfahren nachgebildet ist, färbt nur den

Zelleib. Abgesehen von der völlig anderen Technik, insbesondere der der Färbung vorausgehenden Brechweinsteinbehandlung bei der Rawitzschen Methode, liefern die hier zu beschreibenden Färbungen ganz abweichende Ergebnisse, nämlich die *isiolierte* Färbung des Membransystems der tierischen Zelle. Übrigens möchte ich hier nebenbei bemerken, daß sich mir die Verwendung des Brechweinsteins, die ich ohne Kenntnis der Literatur versucht habe, nicht bewährt hat. Im allgemeinen haben aber die Autoren der Tanninbehandlung keine Färbung mehr folgen lassen. Nur *Unna*⁸ setzt dem Tannin *sauere* Farbstoffe (Wasserblau, Pikrinsäure usw.) zu. Hierbei nehmen gewisse Zellbestandteile die sauren Farbstoffe *direkt* auf, da das ebenfalls saure Tannin für solche Farbstoffe als Beize nicht in Frage kommen kann. Die Ansicht von *Unna* (Chromolyse I. c.), daß bei Färbung der Gewebe mit Tannin + sauren Farbstoffen diese beiden Körper gleichzeitig von gewissen Zellbestandteilen, z. B. der Grundsubstanz der gewöhnlichen Kerne, aufgenommen werden, entspricht unserer Meinung nach nicht den Tatsachen. Jedenfalls hat *Unna* keinen Beweis dafür erbracht, daß die den sauren Farbstoff aufnehmenden Gewebsbestandteile auch das Tannin fixieren.

I. Darstellung des Membransystems mittels Tannins.

Technische Vorbemerkungen. Die besten Färbeergebnisse liefert eine Fixation des Gewebes mit Sublimat-Eisessig. Für die mikrochemischen Untersuchungen (Abschnitt II) wurde außerdem mit Formol-Alkohol oder Alkohol allein fixiertes Material herangezogen. Paraffineinbettung. Die Schnitte müssen möglichst dünn, etwa 3—5 μ , jedenfalls nicht über 5—8 μ dick sein. In der Hauptsache wurden die Organe (Leber, Lunge, Niere, Milz, Gehirn) von frischgetöteten Mäusen untersucht. Vergleichsweise wurden auch Meerschweinchenorgane und Leichenmaterial vom Menschen (Formalin-Alkohol) zur Färbung benutzt. Die entparaffinierten Schnitte (Xylol-Alkoholreihe) wurden gründlich mit Wasser abgespült, den einzelnen Färbungen unterworfen und dann nochmals gewässert. Die Präparate wurden sodann sorgfältig mit Filtrerpapier getrocknet, kurz über Aceton ($\frac{1}{2}$ bis 1 Min.) über Aceton-Xylol (3—5 Min.) Xylol, (5—10 Min.) in Balsam gebracht. Die verschiedenen Farbstoffe wurden, falls nichts anderes bemerkt ist in 1 proz. wässriger Lösung verwendet. Zur Vermeidung von Niederschlägen empfiehlt es sich, die Farblösung vor der eigentlichen Färbung zu filtrieren.

1. Tannin-Fuchsin-(Methylenblau-) Methode.

Technik. Die entparaffinierten Schnitte werden gründlich mit Wasser abgespült, mit einer filtrierten 5 proz. Tanninlösung 3—5 Min. bei gewöhnlicher Temperatur behandelt, gründlich abgespült und mit Fuchsin ca. $\frac{1}{2}$ —1—2 Min. nachgefärbt und abgespült. Statt mit Fuchsin kann auch mit Methylenblau, Safranin oder anderen basischen Farbstoffen gefärbt werden. Aceton ($\frac{1}{2}$ —2 Min.), Aceton-Xylol (2—5 Min.), Xylol, Balsam.

Färbungsergebnisse: Leber. Die Zellgrenzen der Leberläppchen treten sehr klar und scharf als schmale rote Stränge hervor. Kernmembran ist ebenfalls rot gefärbt. Innerhalb des Kernes erscheinen rötlich gefärbte Fäserchen und die Membran des Nucleolus. Die Erythrocyten sind hämoglobingelb, oft von einer schmalen rötlichen Membran umgeben. Der Zelleib ist von feinen roten Fäserchen, meist in radiärer Richtung durchzogen, zwischen denen verschieden zahlreich

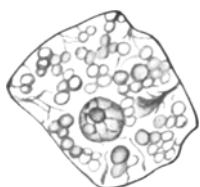


Abb. 1. Leber (Maus). Tannin-Fuchsin. $\frac{1}{12}$ Öl-immersion, Okular 4 (Leitz). Zell-, Kern- und Nucleolusmembran sind hellrot gefärbt. Im Protoplasma zahlreiche Granula mit dünner Membranfärbung. Zwischen den Granula feine, meist radiär angeordnete Fäserchen, zwischen Zell- und Kernmembran verlaufend.

Granula sichtbar werden, die eine rötliche äußere Umgrenzung und ein helles Zentrum erkennen lassen (Abb. 1)*.

Milz. Schmale rote Kernmembran, der Nucleolus ist zum Teil ganz rot gefärbt, zum Teil zeigt er ebenfalls eine Membranfärbung. Die Trabekel und feinsten Retikulumfasern treten äußerst klar und scharf hervor. An Zellen mit etwas breiterem Protoplasma sind auch die Zellmembranen deutlich zu erkennen.

Niere. Die Tunica propria wird als schmale rote Linie sichtbar. Kern- und Nucleolusmembran hellrot. Im Protoplasma zahlreiche rote Granula und zur Zellwand senkrecht verlaufende feine Fäserchen. An den Querschnitten der gewundenen Harnkanälchen ist der Bürstenbesatz als breite Linie zu sehen.

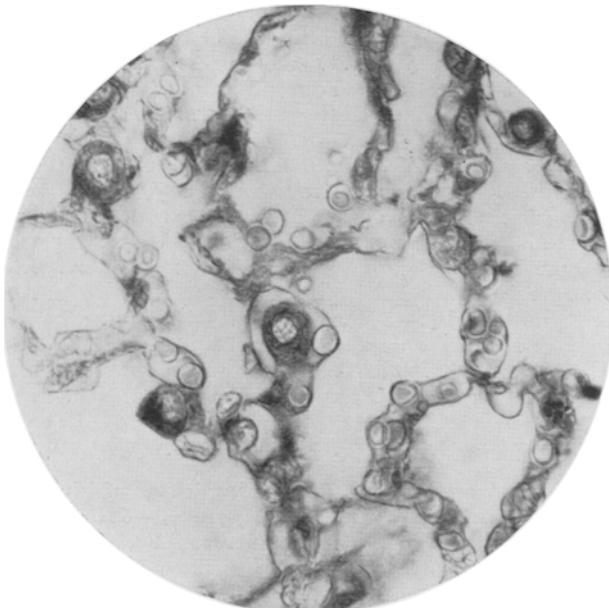


Abb. 2. Lunge. Mikrophotogramm. Zeiss-Imm., 3 mm, 4 Ap.-Komp., Okular 6. Tannin-Methylenblau. Die Alveolarsepten und Capillarwände treten äußerst ausgeprägt hervor. Die Alveolarepithelien zeigen eine blaue Färbung der Kern- und Zellmembran. Erythrocyten gelblich mit blauer Membran, oft einen runden ungefärbten „Innenkörper“ enthaltend.

Lunge. Die Alveolarsepten treten äußerst klar hervor, Kern- und Zellmembran der Alveolarepithelien sind rot gefärbt, Erythrocyten gelb, oft von einer Membran umgeben. Der Kerninhalt ist ungefärbt (Abb. 2).

* Aus technischen Gründen wurden diese und die nächsten Abbildungen ganz oder teilweise schwarz wiedergegeben.

Die beschriebene Tanninmethode ist deswegen von besonderer Bedeutung, weil sie die Wirkung der sauren Beize auf die histologischen Präparate anschaulich vor Augen führt: färbt man nämlich einen unvorbehandelten Gewebsschnitt mit einem basischen Farbstoff, so erhält man eine starke Färbung der Zellkerne, einschließlich des Kerninhalts, und eine schwächere des Protoplasmas; nach vorausgegangener Beizung mit Tannin liefert derselbe basische Farbstoff dagegen nur eine *Hüllenfärbung*, nämlich die Membranen des Kernes, Nucleolus und der Zelle, sowie der Protoplasmagranula. Daneben werden auch sämtliche Bindegewebsfasern dargestellt, mit Ausnahme der *elastischen**. Die Tanninmethode empfiehlt sich besonders dann, wenn es auf eine *isolierte* Darstellung der Zellgrenzen ankommt. Sie liefert Bilder, die sich wie ein Negativ zu den üblichen Kernfärbungen mit basischen Farbstoffen verhält. Im übrigen hat sie aber keinen großen praktischen Wert, da sie wenig übersichtliche Bilder ermöglicht. Wesentlich schönere Ergebnisse erhält man dagegen mittels *Doppelfärbungen*. Hierbei kann der eigentlichen Tanninbeizung (und Nachfärbung mit einem basischen Farbstoff) eine Vorfärbung mit einem *sauen* oder *basischen* Farbstoff vorausgeschickt werden. Die kontrastreichsten Bilder liefern die Methoden, die basische Farbstoffe zur Vorfärbung benutzen.

Doppelfärbungen.

a) Vorfärbung mit sauren Farbstoffen.

2. Eosin-Soda-Tannin-Methylenblau-methode.

Technik. Die Schnitte werden mit Eosin ca. 2—5 Min. gefärbt, abgespült, mit 2 proz. Sodalösung ca. 1—2 Min. differenziert, gründlich abgespült, dann mit 5 proz. Tannin 5 Min. nachgebeizt, gründlich gewässert und kurz mit Methylenblau ($\frac{1}{2}$ —1 Min.) nachgefärbt, abgespült und getrocknet. Aceton, Aceton-Xylol, Xylol, Balsam.

Färbungsergebnisse. Leber: Protoplasmagranula rötlich, ebenso Nucleolus und Kernfasern. Kern- und Zellmembran blau, Erythrocyten gelblichrosa, oft von einer bläulichen äußereren Umgrenzungslinie umgeben (Abb. 3).

Niere: Kerninhalt und Nucleoli rötlich, Kern- und Zellmembran blau, Tunica propria und Bürstenbesatz dunkelblau. Im Zelleib besonders der gewundenen Harnkanälchen zahlreiche rötliche Granula mit schwachbläulicher äußerer Begrenzungslinie (Abb. 4).

Milz: Zellkerne und Nucleoli rosa, Zellmembranen blau, ebenso treten die Reticulumfasern als feines bläuliches Geflecht hervor.

Statt des Eosins oder Erythrosins können auch andere saure Farben zur Vorfärbung der Schnitte benutzt werden, und zwar indem z. B. zuerst mit grünen oder blauen sauren Farbstoffen vorgefärbt wird und,

* Die elastischen Fasern nehmen, wie ich mit meinem Mitarbeiter Blumen-saat festgestellt habe, das Tannin nicht auf.

nach Tanninbeizung, mit roten basischen Farbstoffen — Fuchsin, Safranin, Pyronin — nachbehandelt wird. Von besonderem Interesse ist jedoch nur die nachstehende:

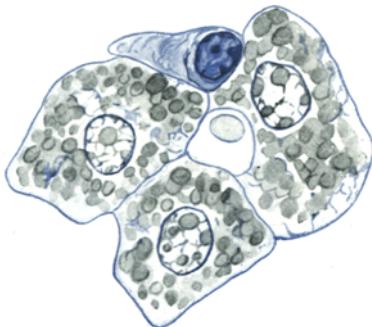


Abb. 3. Leber. Eosin-Soda-Tannin-Methylenblau. Vergr. wie Abb. 1. Leber- und Sternzellen sind von einander durch eine ziemlich schmale blaue Membran getrennt. Kernmembran und Vena centralis sind ebenfalls blau gefärbt. Im Protoplasma zahlreiche rötliche runde Granula, oft mit ausgeprägter Membranfärbung, zwischen den Granula bläuliche, radiär verlaufende Fäserchen.

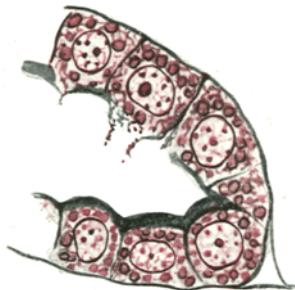


Abb. 4. Niere (Maus). Eosin-Soda-Tannin-Methylenblau. Vergr. wie Abb. 1. Tunica propria und Bürstenbesatz der gewundenen Harnkanälchen blau; Zellwände ebenso gefärbt. Kernmembran rötlich-violett. Im Protoplasma rötliche Granula mit bläulicher Randfärbung.

3. Wasserblau-Soda-Tannin-Safraninmethode.

Die besondere Bedeutung dieser Methode beruht darauf, daß sie neben den Kernen auch die *elastischen* Fasern in blauer Farbe darstellt, während die kollagenen in der Kontrastfarbe — rot — erscheinen.



Abb. 5. Niere. Wasserblau-Soda-Tannin-Safranin. Vergr. wie Abb. 1. Protoplasmagranula und Nucleoli hellblau. Kernmembran und Zellgrenzen sind bläulichrot gefärbt.

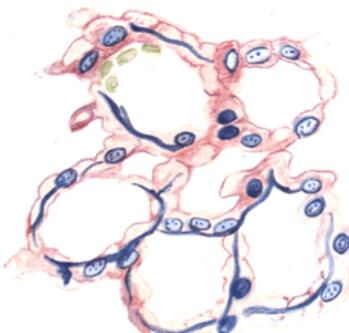


Abb. 6. Lunge. Wasserblau-Soda-Tannin-Safranin. Vergr. wie Abb. 1. Kerne der Alveolarepitheliien (ebenso Gefäß-elastica) sind dunkelblau. Die elastischen Fasern der Alveolen werden in ihren feinsten Ausläufern in blauer Farbe sichtbar. Alveolarsepten und Capillaren sind rot gefärbt.

Technik: Die Schnitte werden 3—5 Min. mit Wasserblau (*Kahlbaum*) gefärbt, abgespült, mit 2proz. Sodalösung solange differenziert, bis sie völlig entfärbt sind (ca. $\frac{1}{2}$ —2 Min.), gründlich abgespült, mit 5proz. Tannin einige Minuten (2—3) gebeizt, wobei die Schnitte wieder die blaue Farbe annehmen, abgespült

und mit Safranin $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ Min. nachgefärbt, abgespült und getrocknet, kurz Aceton, Aceton-Xylol, Xylol, Balsam.

Färbungsergebnisse. *Leber:* Nucleolus und Protoplasmagranula blau, Kernmembran bläulichrot, Zellmembran rot.

Niere: Protoplasmagranula und Kerninhalt bläulich, Kern- und Zellmembranen sind bläulichrot (Abb. 5).

Lunge: Kerne dunkelblau, Gefäßelastica ebenso gefärbt, die elastischen Fasern der Alveolen sind hellblau und werden in den feinsten Ausläufern sichtbar. Das Bindegewebe in den Auskleidungen der Alveolarsepten ist rot (Abb. 6).

Milz: Zellkerne blau, Reticulumfasern rot, Elastica blau.

Viel elegantere und kontrastreichere Bilder erhält man durch Vorfärbung der Schnitte mit den Kernfarbstoffen par excellence, nämlich basischen Farben. Die nachstehenden Methoden sind auch aus dem Grunde ziemlich wertvoll, weil man zur Herstellung der Präparate nur wenige Minuten benötigt.

4. Karbolmethylenblau-Tannin-Fuchsinmethode.

β) Vorfärbung mit basischen Farbstoffen.

Technik. Die entparaffinierten Schnitte werden 3—5 Min. mit Carbolmethylenblau (1 proz. Methylenblau, 5 proz. Carbolwasser aa) gefärbt, abgespült mit 5 proz. Tannin 2—5 Min. gebeizt — die Schnitte erscheinen jetzt hellblau gefärbt —, gründlich abgespült und mit Fuchsin ca. $\frac{1}{2}$ bis 1 Min. nachgefärbt. Statt des Fuchsin kann man zweckmäßigerweise Safranin verwenden, falls das Zwischengewebe nicht so stark hervortreten soll. Kurz Aceton, Aceton-Xylol, Xylol, Balsam. In Formalin fixierte Schnitte halten die basischen Farbstoffe stärker fest, deshalb ist es notwendig, die Präparate nach der Carbolmethylenblaufärbung wenige Sekunden mit 2 proz. Essigsäure zu differenzieren, bis sie hellblau aussehen. Die weitere Färbung geschieht dann in gleicher Weise wie bei Sublimat-Eisessig-Präparaten.

Färbungsergebnisse. *Leber:* Die Membranen der Zellen und Leberläppchen sowie die Gefäßwände sind rot gefärbt. Kernmembranen und Nucleoli sind blau, Sternzellen dunkelblau bis violett. Im Protoplasma sind zahlreiche Granula mit bläulicher Membran und ungefärbtem Zentrum sichtbar. Zwischen Kern- und Zellmembran verlaufen in radiärer Richtung feine rötliche Fäserchen. Die Erythrocyten sind blau

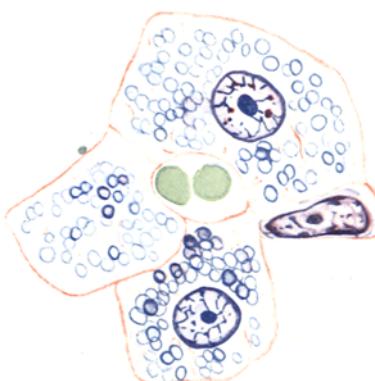


Abb. 7. Leber. Carboltoluidinblau-Tannin-Fuchsin. Vergr. wie Abb. 1. Erythrocyten grünlich. Die Leberzellengrenzen und die Membrane der Sternzellen sind rot gefärbt. Im Protoplasma zahlreiche runde Granula mit blauer Randfärbung und hellem Zentrum. Kerne der Leberzellen dunkelblau, der Sternzellen violett. Rötliche radiär verlaufende Fäserchen zwischen Zellmembran und Kern-

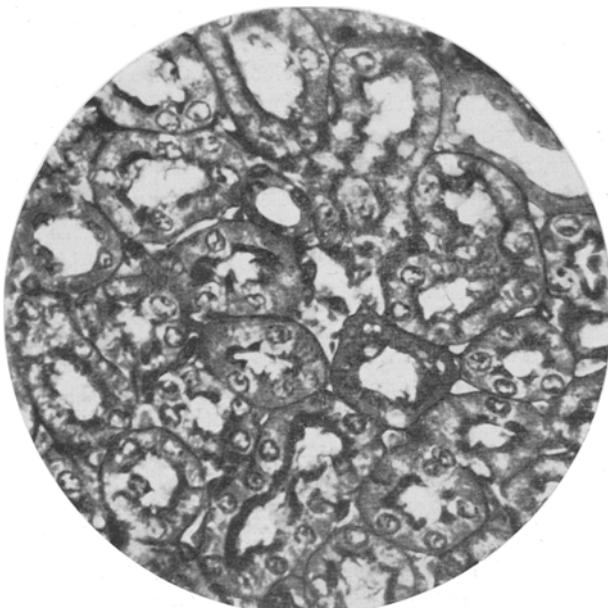


Abb. 8. Niere. Carbolmethylenblau-Tannin-Fuchsin. Mikrophotogramm. Zeiss 4 mm. 0,95. Ok. 6. Tunica propria und Bürstenbesatz treten in roter Farbe hervor. Kerne blau.

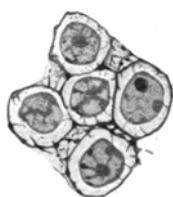


Abb. 9. Milz. Carbolmethylenblau - Tannin-Fuchsin. Vergl. wie Abb. 1. Die Kerne und Nucleoli sind blau. Die Zellgrenzen treten sehr scharf als rote kreisförmige od. ovale Figuren hervor. Zwischen den einzelnen Zellen sind rote feine Fäserchen zu sehen.

gefärbi, zeigen aber oft nur ein kleines rundes blaues Körperchen, während der Rest der Zelle ungefärbt ist (vgl. Abb. 7).

Niere: Kernmembran und Nucleoli sind blau gefärbt. Die Tunica propria und Bürstenbesatz treten sehr klar und in roter Farbe hervor (Abb. 8).

Milz: Die Kernmembranen und Nucleoli sind blau. Die Zellmembranen, Trabekel und die feinsten Reticulumfasern treten sehr schön in roter Farbe hervor (Abb. 9).

Lunge: Kernmembran und Nucleoli blau, Zellmembranen, Alveolarsepten und die kollagenen Bindegewebsfasern sind rot. Erythrocyten blau.

Gehirn: Die Kerne der Gliazellen sind blau, ebenso die der Ganglienzellen, deren Protoplasma feine dunkelblaue Granula aufweist. Sämtliche Nervenfasern erscheinen rot gefärbt.

Am Zentralnervensystem liefert diese Färbemethode sehr lehrreiche und übersichtliche Bilder, die denjenigen sehr ähnlich sind, die man mit der Giemsa-Lösung erhält. Gegenüber der Giemsa-Methode besitzt sie jedoch den Vorteil, daß man zur Herstellung der Präparate nur wenige Minuten benötigt und daß

außerdem die Farblösungen, die verwendet werden, viel billiger sind, ein Moment, daß besonders für Massenfärbungen sehr ins Gewicht fällt.

4a. Carboluidinblau-Tannin-Fuchsinmethode.

Färbt man die histologischen Präparate statt mit Carbolmethyleneblau mit Carboluidinblau vor, so erhält man ein *Dreifarbenbild*, nämlich *blaue Kerne*, *rote Zellmembranen* und *grünliche Erythrocyten*.

Technik: Wie bei Methode 4, nur mit dem Unterschied, daß mit Carboluidinblau (Toluidinblau 1,0 g, 5% Carbowasser 100,0) vorgefärbiert wird (3—5 Minuten).

5. Carbofuchsin-Essigsäure-Tannin-Methylenblaumethode.

Technik: Die entparaffinierten Schnitte werden mit *Ziehlscher Lösung* 2 bis 3 Min. gefärbt, gründlich abgespült, mit 2proz. Essigsäure solange differenziert, bis sie hellrot erscheinen (ca. $\frac{1}{2}$ —1 Min., bei Formalinpräparaten etwas länger). Nach Wasserspülung werden die Präparate mit 5proz. Tannin ca. 1—2 Min. gebeizt, gründlich mit Wasser abgespült und ca. 1 Min. mit wässriger Methylenblaulösung 1 : 3—400

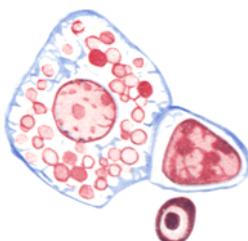


Abb. 10. Leber. Carbofuchsin-Essigsäure-Tannin-Methylenblaumethode. Vergr. wie Abb. 1. Die Membran der Leber- und Sternzellen ist blau, die Kerne rot, bzw. dunkelrot. Im Protoplasma der Leberzellen zahlreiche rote Granula mit ausgeprägter Membranfärbung, zwischen den Granula radiär verlaufende bläuliche Fäserchen. Das rote Blutkörperchen zeigt ein rundes Körperchen (Innenkörper).

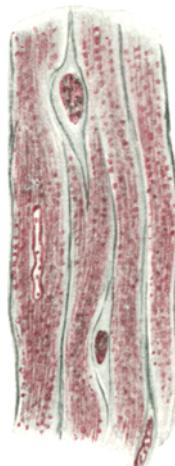


Abb. 11. Myokard. Carbofuchsin-Essigsäure-Tannin-Methylenblaumethode. Vergr. wie Abb. 1. Zellkerne dunkelrot, Muskelfibrillen rötlich. Das Sarkoleum ist blau, ebenso Zellmembranen. Zwischen den Fibrillen zahlreiche rötliche Granula.

gefärbt, abgespült und getrocknet. Aceton, Aceton-Xylol, Xylol, Balsam.

Färbungsergebnisse. Leber: Die Sternzellenkerne sind dunkelrot gefärbt, ebenso die Erythrocyten. Oft zeigen die roten Blutkörperchen nur ein kleines rundes, zentral oder etwas exzentrisch gelegenes Körperchen, während der Rest der Zelle ungefärbt ist bzw. nur eine rötliche Membranfärbung erkennen läßt (vgl. *Gutstein* und *Wallbach*, Über den Bau der Erythrocyten II. *Virchows Arch.*, 263). Kerninhalt und Nucleoli sind hellrot. Die Kernmembran ist rötlich bis rötlichblau, die Zellmembranen blau. Im Protoplasma sind zahlreiche rötliche Granula sichtbar, zwischen denen feine bläuliche Fäserchen verlaufen (Abb. 10).

Myocard: Die Zellkerne und Erythrocyten sind rot gefärbt. Die Muskelfibrillen sind hellrot, das Sarkolemm dagegen blau. Zwischen den Fibrillen befinden sich zahlreiche runde rote Granula, die meist in länglicher Anordnung, parallel zu den Fibrillen (Abb. 11), verlaufen.

Lunge: Kerne sind rot, Zellmembranen, Alveolarsepten und sonstige bindegewebigen Fasern sind dunkelblau gefärbt. Die Erythrocyten zeigen oft ein rundes Granulum — „Innenkörper“ — und eine Membranfärbung, während der Rest der Zellen ungefärbt ist (Abb. 12).

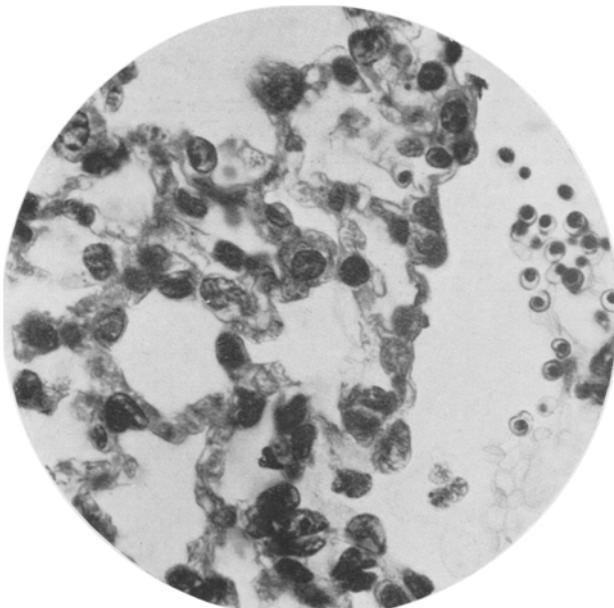


Abb. 12. Lunge. Carbofuchsins-Essigsäure-Tannin-Methylenblau. Mikrophotogramm. Vergr. wie Abb. 2. Die Kerne sind rot, die Zellmembranen, Alveolarsepten und Capillarwände blau gefärbt. Im rechten Teil des Gesichtsfeldes mehrere Erythrocyten mit rotem „Innenkörper und bläulicher Membran, während der Rest die Hämoglobinzone — ungefärbt ist.

Niere: Die Tunica propria und Bürstenbesatz sind blau, Kerninhalt und Nucleoli hellrot, während die Kernmembran bläulich erscheint. Im Zellprotoplasma, zwischen Kern- und Zellmembran, sind bläuliche Fäserchen sichtbar.

Milz: Erythrocyten dunkelrot, Zellkerne rötlich, mit bläulicher Membran, während die Zellmembranen und die feinsten Reticulumfasern dunkelblau gefärbt sind.

Gehirn: Kerne rot, meistens bläuliche Membran. Sämtliche Nervenfasern treten in blauer Farbe sehr klar hervor.

B. Darstellung des Membransystems mittels basischer Beizen.

Wie eingangs auseinandergesetzt worden ist, beruhen die Tanninfärbmethoden auf der Bildung der Tripelverbindung: basische Grund-

substanz (des Gewebes) — Tannin — basischer Farbstoff. Färbt man die Gewebsschnitte unter Verwendung basischer Beizen (Alaun, Eisenchlorid usw.), so entstehen ebenfalls, wie an anderer Stelle nachgewiesen worden ist¹, gefärbte Tripelverbindungen. Der Unterschied gegenüber dem Tannin besteht nur darin, daß die *basischen Beizen von sauren Gewebsbestandteilen aufgenommen werden und gleichzeitig mit gewissen sauren Farbstoffen schwerlösliche Verbindungen, sog. Lacke, bilden*. Ferner konnte nachgewiesen werden, daß die basischen Beizen, z. B. bei den üblichen Hämateinfärbungen, einen chemisch genau definierbaren Körper, nämlich ein saures Lipoïd (Phosphatid) darstellen, das in den gefärbten Zellstrukturen an Eiweiß gebunden — als Proteophosphatid — enthalten ist. In dem nächsten Abschnitt werden wir darauf noch zurückkommen.

Während bei den in der Histologie üblichen Hämalaun- oder ähnlichen Färbungen Beize und Farbstoff in der Farbflotte enthalten sind und *gleichzeitig* zur Einwirkung gelangen, sind die nachstehenden Fär bemethoden durch die *aufeinanderfolgende* Behandlung der Gewebs schnitte mit Beize und Farbstoff charakterisiert, d. h., daß zuerst die basische Beize auf die Präparate einwirkt, und erst *hinterher* die Färbung mit einem geeigneten sauren Farbstoff vorgenommen wird. Die beiden soeben genannten Methoden liefern deswegen ganz verschiedene Ergebnisse, weil bei der gleichzeitigen Färbung — Beize + Farbstoff — die in der Farbflotte enthaltene Beize gleichzeitig als Differenzierungsmittel wirkt. Das Ergebnis einer solchen Färbung ist dann eine isolierte — „reine“ — Kernfärbung. Läßt man hingegen Beize und Farbstoff *hinter einander* einwirken, so werden *sämtliche* Zellbestandteile gefärbt, die zuvor die Beize aufgenommen haben.

6. Alaun-Säureschwarzmethode.

Technik: Die entparaffinierten Schnitte werden 2—24 Stunden in einer gesättigten Alaunlösung gebeizt, abgespült und dann 15 Min. mit *Säureschwarz* (*Kahlbaum*) gefärbt, abgespült, getrocknet, Aceton, Aceton-Xylol, Xylol, Balsam. Die Präparate können übrigens auch über die Alkoholreihe in Balsam gebracht werden, da die Färbungen sehr alkoholfest sind.

Färbungsergebnisse: *Leber:* Kern und Nucleoli grauschwarz, Sternzellen dunkler gefärbt, die Zellmembranen sind grau, ebenso feine Fäserchen, die zwischen Zell- und Kernmembran verlaufen. Im Zell protoplasma sind außerdem zahlreiche runde grauschwarze Granula sichtbar. Die Erythrocyten sind oft *metachromatisch* gelblichbraun gefärbt (vgl. Abbildung in [1]).

Niere: Kern und Nucleoli blauschwarz, Granula besonders in den Zellen der gewundenen Harnkanälchen blaugrau. Die Tunica propria und Basalmembran treten deutlich hervor (Abb. 13).

7. Alaun-Hämateinmethode.

Technik: Die entparaffinierten Schnitte werden 24 Stunden in gesättigter Alaunlösung gebeizt, abgespült und mit einer wässrig-alkoholischen Hämateinlösung (Hämatein 1,0, Spiritus 10,0, Aq. dest. 90,0) ca. 10—15 Min. gefärbt, gründlich in Leitungswasser gewässert, Alkoholreihe, Xylo, Balsam.

Färbungsergebnisse. Leber: Kerne der Leberzellen blau bis bläulich-violett, Sternzellen etwas dunkler gefärbt, Granula hellblau, Zellmembranen grau gefärbt.

Statt der Vorbeizung mit Alaun kann man, wie wir gefunden haben, sich des Hämalauns bedienen (*P. Mayer*), das ja ebenfalls reichlich Alaun enthält.

Technik: Gewebsschnitte werden ca. 10—15 Min. mit Hämalaun gefärbt, abgespült und dann 10 Min. mit der erwähnten wässrigen alkoholischen Hämateinlösung nachgefärbt, in Leitungswasser gewässert usw.



Abb. 13. Niere. Alaun-Säureschwarz. Kerne und Nucleoli blauschwarz. Im Protoplasma äußerst zahlreiche Granula. Zellmembranen, Tunica propria und Bürstenbesatz treten sehr deutlich hervor.

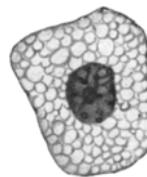


Abb. 14. Leber (Meerschweinchen). Hämalaun-Hämatein. Kerne dunkelblauviolett. Die Zellmembran ist als sehr schmale Linie sichtbar. Im Zelleib sehr dicht gelegene runde Granula mit hellem Zentrum und hellblauvioletter Randfärbung.

Färbungsergebnisse. Leber: Zellmembranen und Protoplasmagranula bläulichviolett. Kerne dunkelblauviolett. Sternzellenkerne noch intensiver gefärbt (Abb. 14).

Gehirn: Kernmembran und Nucleoli dunkelblauviolett, das Protoplasma der großen Ganglienzellen zeigt eine feine violette Granulierung. Sämtliche Nervenfasern sind hellviolett (Abb. 15).

Nach der Ansicht von *S. Becher* nehmen die tierischen Gewebe aus dem Hämalaun („Lacklösung“) die Beize nicht in gleicher Weise wie aus einer reinen Alaunlösung auf. Wie dieser Versuch lehrt, ist die Annahme dieses Forschers nicht zutreffend (vgl. ¹⁾).

Zur Morphologie der tierischen Zelle.

Die im Abschnitt I beschriebenen Färbemethoden lassen erkennen, daß man die Membran der tierischen Zelle, die des Kernes und des Kernkörperchens *gleichzeitig* zur Darstellung bringen kann. Besonderswert ist ferner, daß diese Zellstrukturen einerseits mit Tannin, also einer sauren Beize, andererseits ebensogut mit einer basischen Beize (Alaun) nachgewiesen werden können. Diese Tatsache macht es

daher ziemlich wahrscheinlich, daß die soeben genannten Strukturen, trotzdem sie verschiedenen Teilen der Zelle angehören, einen *ähnlichen* chemischen Bau aufweisen dürften. Wenigstens darf man u. E. die Ähnlichkeit des mikrochemischen Baues von Zell- Kern- und Nucleolus- membran aus ihrem gleichen Verhalten gegenüber den beschriebenen Färbemethoden erschließen.

Es erübrigt sich, auf die Bedeutung der neuen Färbemethoden einzugehen. Sieht man von der *Unna-Pappenheimschen* Methylgrün- Pyroninlösung ab, so sind bisher in der histologischen Technik basische

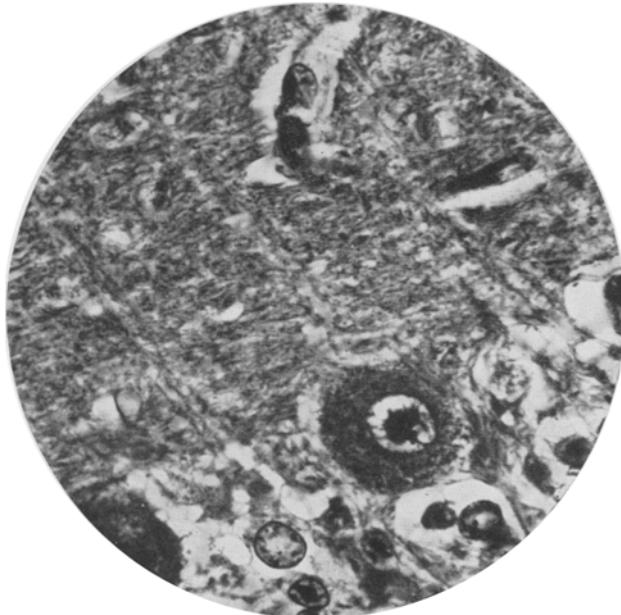


Abb. 15. Gehirn. Hämalaun-Hämatein. Das Protoplasma der großen Ganglienzellen zeigt eine feine Granulierung. Kernmembran und Nucleoi dunkelblauviolett, Nervenfasern hellblauviolett.

Farbstoffe nur selten verwendet worden, besonders wenn es sich um eine gleichzeitige oder nachfolgende Färbung einzelner Zellbestandteile mit *mehreren* basischen Farbstoffen handelt. Unsere Untersuchungen lehren aber, daß man mit Hilfe des Tannins sehr schöne und kontrastreiche Bilder durch Verwendung zweier basischer Farbstoffe (Methylenblau, Fuchsin) erhalten kann. Hiermit allein ist jedoch der Wert der Methoden nicht erschöpft. Vielmehr ist die Ausarbeitung der Tanninmethoden hauptsächlich aus dem Grunde erfolgt, weil sie den einwandfreien Nachweis ermöglichen, daß die 3 Hauptbestandteile der tierischen Zelle, nämlich Zelleib, Kern und Kernkörperchen von einer lückenlosen Membran begrenzt werden. Zwar ist *Unna* (Chromolyse 1. c. S. 33) die färberische

Darstellung der Kern- und Nucleolusmembran durch sein *Webgemisch* (Lösung der 3 sauren Farbstoffe Wasserblau-Eosin-Phloxin) geglückt. Dagegen ist bisher, soweit ich die Literatur übersehe, nicht der einwandfreie Nachweis geführt worden, daß *jede tierische Zelle* eine *anatomische Membran* besitze, die sie von der Umwelt abschließt. Allerdings ist von physiologischer Seite, besonders *Pfeffer* und *Overton*, seit langer Zeit bereits erkannt und betont worden, daß gewisse Funktionen der lebenden Zelle, insbesondere ihre Permeabilitätseigenschaften zur Annahme einer besonders differenzierten oberflächlichen Plasmeschicht geradezu zwingen. „Die „Plasmahaut“ (*Pfeffer*) oder wenigstens ihre oberflächliche Schicht, kann ein ultramikroskopisches Gebilde d. h. auch für stärkere Vergrößerungen unsichtbar sein und nur mittelbar erschlossen werden, ihre Existenz darf trotzdem als ebensogut begründet angesehen werden, wie irgend eine andere mit Notwendigkeit erschlossene Tatsache der exakten Wissenschaft“ (*A. Gurwitsch*, Morphologie und Biologie der Zelle, Kap. 3). Auch *Höber* (Physikalische Chemie der tierischen Zelle und Gewebe 1926) hebt ausdrücklich hervor: „einen einwandfreien direkten Nachweis der Plasmahaut gibt es bisher überhaupt nicht“, und „an keiner normalen Zelle ist bei der mikroskopischen Beobachtung etwas von ihr zu entdecken gewesen“ (S. 406/7). Deshalb ist es als ein besonderer Vorzug der Tanninmethoden anzusehen, daß sie gestatten, die Zellmembran *isoliert* oder in einer Kontrastfarbe zu den übrigen Zellbestandteilen (Kern, Protoplasma) sichtbar zu machen. Nebenbei möchte ich hier noch bemerken, daß mittels der Tanninmethode auch an Bakterien und Amöben die äußere Membran nachgewiesen werden konnte⁹. Ebenso ist bei den einzelnen Blutzellen z. B. den roten Blutkörperchen und Leukocyten die äußere Membran färberisch sichtbar gemacht worden¹⁰.

Es ist oben erwähnt worden, daß die Physiologen aus rein theoretischen Gründen zur Erklärung des vorliegenden Tatsachenmaterials an jeder Zelle eine äußere Membran anzunehmen sich genötigt gesehen haben. Es muß noch hinzugefügt werden, daß dieser supponierten Membran- oder Plasmahaut eine bestimmte chemische Zusammensetzung von physiologischer Seite zugeschrieben worden ist. Insbesondere hat *Overton* auf Grund seiner Permeabilitätsstudien sich zu der Annahme genötigt gesehen, daß die Plasmahaut Lipoide, speziell etwa Lecithin und Cholesterin enthalten dürfte. Wenn auch für das Vorhandensein von Cholesterin in der Zellmembran bisher keine Anhaltspunkte, wenigstens durch farbenanalytische Methoden gewonnen werden konnten, so ist es doch bemerkenswert, daß unsere Untersuchungen (vgl. Abschnitt II) es wahrscheinlich machen, daß die Zellmembran zwar kein freies Lipoid, wohl aber eine Lipoideiweißverbindung enthält. Der Gehalt der Zellmembran an diesen Verbindungen — Proteophosphatiden — reicht aber

aus, um die Permeabilitätseigenschaften der tierischen Zellen — Durchlässigkeit nur für lipoidlösliche Körper und Wasser — hinreichend zu erklären. Wenn auch die Durchlässigkeit einer solchen Lipoideiweißverbindung experimentell nicht geprüft werden kann, da bisher eine solche Substanz noch nicht in reinem Zustand erhalten werden konnte, so erscheint mir trotzdem die Annahme ungezwungen, daß eine solche organische Verbindung hinsichtlich der Permeabilität die Eigenschaften ihrer beiden Anteile, nämlich des Eiweißes (Durchlässigkeit für Wasser) und eines Lipoides (Durchlässigkeit für lipoidlösliche Stoffe) in sich vereinigt.

Kurz eingehen muß ich noch auf den Bau des Protoplasmas. Mit den neuen Methoden lassen sich an einzelnen Organen im Zelleib zahlreiche Granula nachweisen, und zwar sowohl mit sauren Farbstoffen (Methode 2—3), als auch mit basischen Farbstoffen (Methode 4—5). An Präparaten, die mit Carbolmethylenblau (oder Carboltoluidinblau)-Tannin-Fuchsin gefärbt sind, erscheinen besonders an den Leberzellen runde Kreise mit hellem Zentrum, also eine negative Granuladarstellung. Ebenso erscheinen die Granula oft bei den Methoden 6 und 7. Sie haben etwa die Größe von Streptokokken (beide bei Ölimmersion betrachtet). Dagegen sind die Granula bei der Carbolfuchsinfärbung und bei den Methoden 2 und 3 vollständig gefärbt und von demselben Größenmaß. Merkwürdigerweise haben wir bisher die Granula nur in den Leber- und Nierenzellen und Muskelfasern gefunden, nicht aber z. B. in der Milz und Pankreas. Es drängt sich nun von selbst die Frage auf, ob die mit den beschriebenen Methoden dargestellten Protoplasmagebilde dasselbe sind wie die bekannten *Altmannschen* Granula oder nicht. Gegen die Gleichheit spricht allerdings, daß *Altmann* seine Granula in fast allen Organen nachgewiesen hat, im Gegensatz zu unseren bisherigen Befunden. Immerhin lassen sich aus dieser Tatsache allein keine so weitgehenden Schlüsse ziehen. Diese Frage läßt sich mit einiger Sicherheit nur durch systematische Studien an zahlreichen Organen möglichst vieler Tierklassen entscheiden. Übrigens möchte ich noch bemerken, daß die von uns dargestellten Granula keineswegs etwa aus gespeicherten Fetten bestehen. Diese Annahme läßt sich deswegen mit Leichtigkeit ausschließen, weil diese Körper schon bei der Fixation (Alkohol) und Entparaffinierung (Xylol) gelöst sein müßten*.

Dagegen muß die Frage aufgeworfen werden, ob die mit den neuen Methoden darstellbaren Zellstrukturen, insbesondere die Membranen von Zelle, Kern und Nucleolus und die Granula wirklich in der lebenden Zelle in gleicher Weise und in gleicher Lokalisation enthalten sind, oder

* Dagegen scheinen mir die hier an fixierten Gewebsschnitten dargestellten Granula denen zu entsprechen, die bei der Vitalfärbung von vielen Untersuchern erhalten worden sind (sog. Farbstoffvakuolen).

ob nur *künstlich*, besonders durch die vorausgegangene Fixation erzeugten Gebilde sichtbar gemacht worden sind. Die Frage erscheint deswegen berechtigt, weil von *Tellyesniczky*¹¹ vor kurzem wieder unsere Fixationsmethoden einer eingehenden Kritik unterzogen hat. Man darf aber mit Recht die Ansicht dieses Forschers als unzutreffend bezeichnen, der *alle* durch Färbung erhaltenen Strukturen für ein Kunstprodukt erklärt, wenn sie nicht in der lebenden Zelle in gleicher Weise nachgewiesen werden können. Von *Tellyesniczky* übersieht bei seinem verneinenden Standpunkt die Tatsache völlig, daß an der lebenden ungefärbten Zelle einzelne Strukturen nur dann sichtbar werden können, wenn sie sich von ihrer Umgebung durch abweichende Lichtbrechung unterscheiden. Ist diese Voraussetzung aber nicht erfüllt, so müssen evtl. in der Zelle enthaltene Gebilde unsichtbar bleiben. Aus der Tatsache also, daß das lebende Protoplasma unter dem Mikroskop *homogen erscheint*, darf daher nicht geschlossen werden, daß es auch in Wirklichkeit *strukturlos* ist.

Immerhin geben die kritischen Einwendungen des genannten Verfassers Veranlassung, Ergebnisse, die an fixierten Zellen erhalten worden sind, durch Untersuchungen zu ergänzen, die an der lebenden Zelle angestellt werden. Dies ist möglich, wenn man bestimmte basische Farbstoffe auf die Gewebe, beziehungsweise Gewebsbestandteile eines frisch getöteten Tieres einwirken läßt. Diese *supra- oder postvitale Färbemethode* wurde von uns zuerst zur Darstellung der Membran der lebenden Erythrocyten angewandt¹⁰.

Technik. Von den Organen einer soeben getöteten Maus wird auf einem Objekträger in einem Tropfen physiologischer Kochsalzlösung ein möglichst feines Zupfpräparat hergestellt. Dann werden 2—3 Ösen einer frisch filtrierten 0,2—1 proz. wässrigen Nilblausulfat-, Viktoriablau- oder Methylviolettlösung so hinzugesetzt, daß der Farbstoff gerade den Kochsalztropfen von einer Seite her berührt. Deckt man mit einem Deckgläschen zu, so diffundiert der Farbstoff mit hellblauer bzw. hellvioletter Farbe in das Zupfpräparat hinein.

Unter dem Mikroskop kann man dann sofort oder nach wenigen Minuten folgendes beobachten. Die *Kernmembran* tritt sehr deutlich als *dicker dunkelblau* bzw. *dunkelviolett gefärbter Kreis* hervor. Innerhalb des Kernes sieht man bei Vermeidung einer Überfärbung 1—2 Kernkörperchen, ebenfalls mit ausgeprägter Membran. Soweit ganze Zellen im Präparat enthalten sind, was besonders oft bei der Milz der Fall ist, wird die *Zellmembran* als eine *diinne hellblaue* (hellviolette) *Linie* sichtbar. Im Protoplasma der *Nieren- und Leberzellen* sieht man zahlreiche, in Haufen angeordnete *Granula*, die eine *hellblaue* (hellviolette) *Membranfärbung* mit hellem Zentrum erkennen lassen. Die Granula, die etwas größer als an den fixierten Präparaten erscheinen, sieht man auch einzeln liegen. An den Milzzellen, die keine Granula enthalten, sieht man oft schmale und zarte Fäserchen, die in radiärer Richtung zwischen Kern- und Zellmembran verlaufen.

Da die Ergebnisse der Supravitalfärbung mit den Befunden an fixiertem Material übereinstimmen, so darf der Nachweis der Zellkern- und Nucleolusmembran als sicher erbracht angesehen werden. Ebenso muß bezüglich der Protoplasmagranula der Einwand eines Kunstproduktes als unzutreffend zurückgewiesen werden.

II. Chemischer Bau des Membransystems.

Wie die im 1. Abschnitt beschriebenen Färbemethoden zeigen, läßt sich das Membransystem (Membran der Zelle, des Kernes, des Nucleolus, kollagene Fasern) einerseits mit sauren, andererseits aber auch mit basischen Beizen zur Darstellung bringen. Es wurde dort bereits angedeutet, daß Tannin an eine basische Zellsubstanz ansetzt, während die basischen Beizen von einem sauren Bestandteil dieser Zellstrukturen aufgenommen werden¹. Demnach muß also geschlossen werden, daß das beschriebene Membransystem mindestens zwei Stoffe, einen sauren und einen basischen Körper enthalten müsse. Mit diesen Feststellungen ist jedoch die gestellte Aufgabe noch nicht erschöpft, vielmehr erscheint es wichtig, die chemische Natur dieser beiden Körper näher zu charakterisieren. Aufschluß hierüber geben Lösungsversuche nach den Grundsätzen, die *Unna* zuerst in seiner *Chromolyse* angegeben hat.

Für die Lösungsversuche sind die Präparate, die mit Sublimat-Eisessig fixiert sind, nicht geeignet. Es kann nämlich mit Recht der Einwand gemacht werden, daß die betreffenden Gewebssubstanzen durch die vorausgegangene Behandlung mit dem ziemlich differenten Fixationsmittel, besonders des in ihm enthaltenen Schwermetalles eine wesentliche Änderung ihrer Löslichkeit erfahren haben. Für die Versuche wurden daher in Alkohol und Formalin-Alkohol fixierte und in Paraffin eingebettete Präparate mit herangezogen. Es ergab sich aber der Befund, daß die Fixationsmethode auf die Löslichkeit der in Frage stehenden Substanzen keinen nennenswerten Einfluß ausübt, sodaß auch Sublimat-Eisessigpräparate ebenfalls für die Chromolyse verwendet werden konnten. Letztere Fixationsmethode hat nämlich den Vorzug vor den Alkohol oder Formalin-Alkoholpräparaten, daß sie die Zellstrukturen viel besser und klarer hervortreten läßt.

Mit Hilfe der chromolytischen Methodik läßt sich nun mit Leichtigkeit nachweisen, daß die in Frage stehenden Substanzen keine Eiweißkörper enthalten, die in HCl löslich sind. In diesem Lösungsmittel sind nämlich nach *Unna*¹ Nucleoproteide, Albumosen und Globuline leicht löslich*. Stellt man also die entparaffinierten Schnitte — nach

* Anmerkung bei der Korrektur: Neuerdings bestreitet *E. Wermel* (Zeitschr. f. Zellforschung u. mikrosk. Anat. 5, 410. 1927), daß die Hämateinfärbung der Kerne auf sauren Lipoiden beruht und bezieht sie vielmehr auf Nucleoproteide.

Wasserspülung — in eine Cuvette mit 10% HCl (HCl conc. 10, Aq. dest. 90,0) und läßt sie darin 24—48 Stunden verweilen, so sind die Strukturen des Membransystems noch völlig unverändert erhalten. Wenigstens lassen sich durch Färbeversuche keine nennenswerten Veränderungen feststellen: Sowohl mit Hilfe der Tanninmethoden als auch mit basischen Beizen läßt sich das Membransystem völlig unverändert nachweisen, und nicht nur durch diese adjektive, sondern auch durch direkte substantielle Färbemethoden: Nach HCl-Vorbehandlung lassen sich die Schnitte sehr gut mit zahlreichen basischen Farben, z. B. pol. Methylenblau, Carbolmethyleneblau, Safranin, Fuchsin, Viktoriablau, sehr gut färben. Besonders schöne Bilder liefern Fuchsin, oder Carbofuchsin mit nachfolgender Essigsäuredifferenzierung.

Technik. Die mit HCl vorbehandelten Schnitte werden gründlich mit Leitungswasser abgespült, mit Ziehlscher Lösung 2—3 Min. gefärbt, abgespült und in 2 proz. Essigsäure so lange differenziert (ca. $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ Min.) bis der Schnitt hellrot aussieht, abgespült, getrocknet, kurz Aceton, Aceton-Xylol, Balsam.

Färbungsergebnisse. Leber: Die Leberläppchen und die einzelnen Leberzellen sind, von einer schmalen roten Membran begrenzt, sehr deutlich zu erkennen. Im Protoplasma sind zahlreiche rot gefärbte Granula sichtbar. Kernmembran dunkelrot, Kerninhalt und Nucleoli rot.

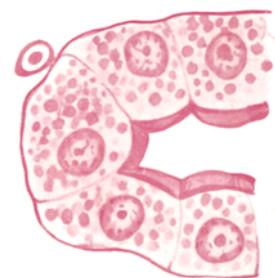


Abb. 16. Niere. Mit 10% HCl vorbehandelt (48 Stunden). Carbofuchsin-Essigsäure. Tunica propria, Bürstenbesatz und Kerne rot. Zellgrenzen und Protoplasmagranula etwas heller gefärbt.

den Tubuli recti sehr deutlich hervor. In den Tubuli contorti sind im Protoplasma zahlreiche Granula zu sehen. Die Tunica propria der Tubuli, die Glomeruluskapsel sowie die bindegewebige Auskleidung der Glomeruli treten einzeln deutlich hervor. Kerne und Nucleoli sind unverändert erhalten (Abb. 16).

Ebenso sind an den übrigen Organen alle Zell- und Kernstrukturen noch gut erhalten. Jedoch haften die basischen Farbstoffe an solchen

Wermel hat jedoch nicht dieselben Lösungsmittel wie ich verwendet. Zur Lösung der Nucleoproteide benutzte ich 10% HCl (24—48 Stunden Einwirkungsdauer). Danach fallen die Färbungen mit Hämalau und anderen basischen Beizen noch positiv aus, während *Wermel* mit NaCl und Natr. acet. (letzteres löst nur freie Nucleinsäure!) gearbeitet hat. Zur Lösung der gebundenen Lipoide verweise ich, wie früher an Bakterien, 25% HCl, gelöst in Alkohol abs., und nicht 1% HCl in 70% Alkohol, wie *Wermel* annimmt. Auch muß ich betonen, daß wohl für Phosphatide nachgewiesen worden ist, daß sie in vitro dieselbe Farbenreaktion wie die Hämateinfärbung der Kerne liefern. Dieser Nachweis ist aber bislang für Nucleoproteide nicht geführt worden. Bezüglich der Frage, ob die Nuclealfärbung, auf der die Schlußfolgerungen *Wermels* beruhen, für Thymonucleinsäure spezifisch ist, werde ich an anderer Stelle noch zurückkommen.

Präparaten nicht so fest wie an unvorbehandelten. Bei Färbung mit Carbofuchsin muß daher die nachfolgende Essigsäuredifferenzierung vorsichtig und kurz erfolgen, da sonst die Schnitte zu stark entfärbt werden. Auch eine Nachbehandlung mit Methylenblau-Tannin ist möglich, nur muß jetzt ganz kurz (1—2 Sekunden) mit verdünntem Methylenblau nachgefärbt werden. (Bei längerer Färbung erscheinen alle Strukturen fast rein blau.)

Wesentlich für die chemische Natur des sauren Körpers, der im Membransystem enthalten ist und durch basische Farbstoffe direkt oder adjektiv durch basische Beizen und einen sauren Farbstoff (Methoden 6 und 7) nachweisbar ist, ist die Tatsache, daß er in *HCl-Alkohol löslich* ist. Während nämlich die mit HCl vorbehandelten Schnitte einige Tage mit 25% HCl-Alkohol nachbehandelt, nehmen sie basische Farbstoffe im allgemeinen nicht mehr auf, resp. geben sie beim Abspülen wieder ab. Auch mit basischen Beizen ist dann eine Färbung nicht mehr zu erzielen. Dagegen nehmen die Gewebsschnitte begierig saure Farbstoffe auf. Nach Tanninbeizung färben sie sich auch wieder mit basischen Farbstoffen.

Technik. Die entparaffinierten Schnitte werden nach Wasserspülen 1—2 mal 24 Stunden mit 10 proz. Salzsäure behandelt, gründlich abgespült, an der Luft getrocknet und dann für die Dauer von 3—4 mal 24 Stunden in eine Cuvette mit 25 proz. HCl-Alkohol (Ac. mur. conc. 25,0 Alkohol abs. 75,0) gestellt. Nach der Herausnahme aus letzterem Lösungsmittel sind die Schnitte, zwar sehr dünn, aber noch in voller Größe vorhanden. Da sie beim Wasserspülen leicht abschwimmen, empfiehlt es sich, die Objektträger an der Luft trocknen zu lassen, evtl. unter Benutzung von Filtrierpapier, dann werden sie vorsichtig in einer Wasserschale gewässert und gefärbt.

Carbolmethylenblau färbt dann überhaupt nicht mehr; ebenso verhält sich Safranin. Durch Fuchsin, Methylviolettt werden die Schnitte zwar gefärbt, geben aber beim gründlichen Abspülen den Farbstoff wieder vollständig ab. Viktoriablau färbt zwar noch, doch ist es nicht möglich, die Schnitte in Balsam einzubetten, da sie bei noch so kurzer Berührung mit Aceton völlig entfärbt werden.

Beizt man einen solchen Schnitt 24 Stunden mit Alaun, so gibt Hämatein oder Säureschwarz keine Färbung mehr. Ebenso versagt die Hämalaunfärbung vollständig. Dagegen färben sie sich sehr rasch mit sauren Farben. Wenn die HCl-Alkoholbehandlung nicht allzulange gedauert hat, (z. B. 2—3 mal 24 Stunden), gibt eine Eosinfärbung ($\frac{1}{4}$ Minute und noch kürzer) noch alle Zellstrukturen einschließlich der Granula wieder (vgl. Abb. 17). Nach Tanninbeizung färben die Schnitte sich auch mit basischen Farben, z. B. Methylenblau, Fuchsin, Safranin usw.

Diese Lösungs- und Färbeversuche lehren also: 1. *Der in den erwähnten Strukturen —Membransystem — enthaltene saure Körper ist ein*

Lipoid (Unlöslichkeit in HCl, Löslichkeit in HCl-Alkohol). 2. *Das saure Lipoid ist an einen basischen Körper* (basische Grundsubstanz) gebunden, der sich mit sauren Farben nachweisen läßt. 3. *Die Tanninmethoden beruhen darauf, daß die Beize an die basische Grundsubstanz ansetzt*, weshalb sie auch nach Lösung des Lipoids noch eine Färbung der Schnitte ermöglichen. 4. *Die basischen Beizen werden von dem sauren Lipoid aufgenommen*, weshalb sie nach HCl-Alkohol ein negatives Ergebnis liefern.

Mit einigen Worten möchte ich noch auf die Natur des Lipoids eingehen. Da es auf Grund der Farbenanalyse saure Eigenschaften besitzen muß, so dürfte aller Wahrscheinlichkeit nach es sich um Phosphatide handeln. Der einfachste Prototyp dieser Lipoide — das *Lecithin* — zeigt wenigstens färberisch dieselben Eigenschaften, nämlich leichte Färbbarkeit mit zahlreichen basischen Farbstoffen, bzw. nach Behandlung mit basischen Beizen mit gewissen sauren Farben (Hämatoxin usw.)⁹. Abgesehen von den sauren Eigenschaften sind die in Frage stehenden

Lipoide noch dadurch charakterisiert, daß sie in der tierischen Zelle, übrigens auch in der Bakterienzelle, in gebundener Form — als Proteophosphatide — enthalten sind. Dafür spricht vor allem die Tatsache, daß sie in Alkohol allein unlöslich sind und daß zu ihrer Lösung außerdem noch eine starke Mineralsäure, wie Salzsäure, nötig ist, die die Abspaltung von den Eiweißkörpern wahrscheinlich bewirkt. Durch ihre Bindung an Eiweißsubstanzen der Zelle unterscheiden sich die Membranlipoide in wesentlicher Beziehung von ähnlichen Substanzen, die

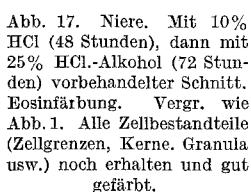


Abb. 17. Niere. Mit 10% HCl (48 Stunden), dann mit 25% HCl-Alkohol (72 Stunden) vorbehandelter Schnitt. Eosinfärbung. Vergr. wie Abb. 1. Alle Zellbestandteile (Zellgrenzen, Kerne, Granula usw.) noch erhalten und gut gefärbt.

in der Zelle in freier Form enthalten sind, wie z. B. die Neutralfette, und die hauptsächlich neutralen Lipoide der Nebenniere (Cholesterin und Cholesterinester), die daher durch Alkohol allein oder ähnliche Lösungsmittel aus der Zelle entfernt werden. Da die Phosphatide in neuerer Zeit mit Recht als ein unentbehrlicher Bestandteil der Zellen des lebenden Organismus angesehen werden, so ist es wohl verständlich, daß sie nicht in freier Form enthalten sind, da sie sonst die lebende Zelle leichter durch äußere Einflüsse verlassen und dadurch zu den schwersten Störungen für die Fortsetzung des Lebens und eines ungestörten Ablaufes ihrer Funktionen führen würden.

v. Tellyesniczky¹¹ gibt vor kurzem seinem Erstaunen lebhaften Ausdruck, daß man die fettähnlichen Stoffe, die in der lebenden Zelle enthalten sind, keineswegs erkennen kann, trotzdem sie sich durch andere, stärkere Brechungsverhältnisse von den Eiweißstoffen unterschieden. Das ist aber jetzt durchaus erklärlich, da sie ja nicht frei, sondern an Eiweiß gebunden sind. Sehr leicht lassen sie sich aber sicht-

bar machen und durch Sudan III nachweisen, wenn man die Gewebe nach E. K. Wolff¹² einer sterilen Autolyse unterwirft, wobei wohl durch fermentative Wirkungen eine Abspaltung der Lipoide von den Eiweißstoffen erfolgt. Die Verteilung der gebundenen Lipoide auf die einzelnen Teile der tierischen Zelle wird durch das nachstehende Schema anschaulich (Abb. 18).

Es muß aber ausdrücklich hervorgehoben werden, daß die durch die farbenanalytischen Untersuchungen nachweisbaren gebundenen Zell-lipoide zwar das gemeinsam haben, daß sie der großen Gruppe der sauren Lipoide (wohl Phosphatide) angehören, im Gegensatz z. B. zu den Cholesterinestern (neutrale Lipoide) und dem Cholesterin — ein sekundärer Alkohol —, die basische Farbstoffe überhaupt nicht aufnehmen.

Dagegen dürften sie sich von einander dem Grade, vielleicht auch der Art nach weitgehend unterscheiden. Auf die Unterschiede weist ihr Verhalten gegenüber den verschiedenen färberischen

Darstellungsmethoden (basische Farbstoffe, basische Beizen) deutlich hin. So werden bei der Carbol-fuchsinfärbung durch nachfolgende Essigsäuredifferenzierung die Lipoide der Zellmembran völlig entfärbt, nicht aber die Kern-Nucleoluslipoide sowie die Lipoide der Protoplasma-granula. Auch gegenüber der Gramschen Färbung, die ebenfalls auf Lipoiden beruht, verhalten sich die einzelnen Zell-lipoide verschieden¹.

Zum Schluß möchte ich noch auf die bemerkenswerte Tatsache hinweisen, daß dieselben Färbemethoden an Bakterien und tierischen Zellen zu gleichen morphologischen Ergebnissen führen. So stellen z. B. die Carbolfuchsins-Essigsäure-Tannin-Methylenblau-, bzw. Carbolmethylenblau-Tannin-Fuchsin-Methoden an den tierischen Zellen den Kern in roter, bzw. blauer Farbe und die Zellmembran in blauer, bzw. roter Farbe dar. Dieselben Methoden liefern bei den Bakterien ein rotes, bzw. blaues Makrogranulum, während ihre äußeren Membranen — Ektoplasma — in blauer, bzw. roter Farbe erscheinen. Diese Tatsache bestätigt nicht nur unsere frühere Auffassung⁹, daß das Makrogranulum als der „Kern“ der Bakterien anzusehen ist, sondern zeigt auch recht deutlich, daß wesentliche Unterschiede zwischen dem Bau der Bakterien- und der tierischen Zelle nicht bestehen.

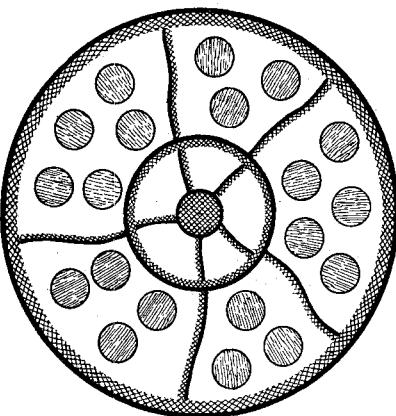


Abb. 18. Verteilung der sauren Lipoide (Phosphatide) in der tierischen Zelle (schematisch).

■ = basische Grundsubstanz;
— = saure Lipoide
(Phosphatide).

Literaturverzeichnis.

- ¹ *Gutstein, M.*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **261**, H. 3. —
² *Gutstein, M.*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **93**. — ³ *Gutstein, M.*, Ibid. **100**. — ⁴ *Gustein, M.*, Klin. Wochenschr. 1925, Nr. 12, S. 568. — ⁵ Zitiert nach Handbuch der mikroskopischen Technik von *Krause*. 2. Aufl. Artikel Tannin. — ⁶ *Unna, P. G.*, Monatshefte f. prakt. Dermatol. **20**, 140. 1895. — ⁷ *Gutstein, M.*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **95**, H. 1. — ⁸ *Unna, P. G.*, Chromolyse. Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden von *Abderhalden*. Bd. 6, Teil 2. — ⁹ *Gutstein*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **95**, H. 7, 8. — ¹⁰ *Gutstein*, Folia haematol., Abt. Arch. **33**. 182. 1927. — ¹¹ *Tellyesniczky*, Artikel Fixation im Handbuch der mikroskopischen Technik. 3. Aufl. Bd. 2. — ¹² *Wolff, E. K.*, Zentralbl. f. Pathol. **35**, 270. 1924.
-