

(Aus dem Histologischen Institut der Aserbaidjaner Staats-Universität in Baku
und der Prosektur des Krankenhauses Aswodsdraw).

Hämatoxylin als Reagens auf Eisen. (Über Lipoidsiderose.)

Von

M. Mühlmann (Baku).

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. Juli 1927.)

In den letzten Jahren sind zahlreiche Arbeiten über den Eisengehalt des Zentralnervensystems erschienen. Besonders eingehend befaßte sich damit *Spatz*, gleichzeitig mit ihm *M. Müller*. Noch früher sind von *Lubarsch* und aus *Lubarschs* Laboratorium von *Odefey* Artikel darüber erschienen. Alle weisen auf *Guizzetti* hin, als den ersten, der, im Jahre 1915, die Aufmerksamkeit auf diese Frage gelenkt hat. Daß meine diesbezügliche Arbeit aus dem Jahre 1891 in Vergessenheit geraten ist, daran trage ich selbst Schuld, denn nachdem ich am Pigment der Hirngefäße die Eisenreaktion festgestellt hatte, habe ich mich bei meinen weiteren Pigmentstudien von der lipoiden Natur des gelben Pigments verlocken lassen und habe meine erste Arbeit wenig berücksichtigt. Nach Kenntnisnahme von meiner erwähnten ersten Veröffentlichung über dieses Thema kann man sich davon überzeugen, daß die neueren Untersuchungen von *Lubarsch*, *Spatz*, *Müller* im Einklang mit den Ergebnissen meiner Arbeit stehen. Ein Teil der von mir untersuchten Pigmente löste sich in fettlösenden Mitteln, ein großer Teil dagegen nicht und gab Eisenreaktion. Was von ganz besonderem Interesse ist, ist die Tatsache, daß ich die Reaktion an der unfixierten Pia nur in den ersten Tagen nach der Sektion feststellen konnte, daß sie aber bald verschwand und einer unbeständigen Hämatoidinreaktion Platz machte. Entweder löst sich also das Eisen inzwischen auf, oder es geht eine Verbindung ein, welche durch Ferrocyankaliumsalzsäure- oder Schwefelammoniumreaktion nicht aufgedeckt werden kann.

Am fixierten Material gab das gelbe Pigment der Nervenzellen und der Gefäßendothelien keine Eisenreaktion. Nur an manchen Zellen des neutralen Teiles der Substantia nigra konnte *Müller* die Turnbull-Blaureaktion nachweisen, aber *Spatz* bestreitet vollständig jeden Zusammenhang des gelben Pigments mit Eisen. Sonst ist die Reaktion

an den Gliazellen und Nervenzellen granulär oder diffus, aber nicht an Pigment gebunden (*Spatz*), ebenso wie perivascular und an den Gliazellen körnig gefunden worden (*Odefey, Müller*). Um „maskiertes“ (*Macallum*) Eisen, also solches, welches die übliche Eisenreaktion nicht gibt, aufzudecken, befolgte ich die Vorschläge *Macallums*, konnte aber an den Hirnpigmenten damit keinen Erfolg erzielen. Dann versuchte ich, nach *Best, Landau, Christeller* und *Kaiser* die Hirnpräparate mit Eisensalzen zu durchtränken. Die üblichen Reaktionen fallen in derartigen Präparaten unregelmäßig aus, und jedenfalls haftet dabei das zugesetzte Eisen nicht am Pigment. Das Mißgeschick, welches das Suchen des „maskierten“ Eisens erfahren hat, scheint daher zu rühren, daß man ohne ausreichende Begründung das Bestehen von zwei Erscheinungsformen des Eisens annahm, und zwar einer solchen, welche die bekannten chemischen Reaktionen gibt, und einer anderen, welche dieselbe nicht gibt. Den Fehler dieser Anschauung entdeckte *Hueck*, welcher zeigte, daß diese Reaktionen eine bestimmte Eisenmenge voraussetzen, welche nicht weniger als 15—50 mg% Trockensubstanz betragen muß. Und da die Eisenmenge im Gewebe unter dieser Größe angetroffen wird, so kann sie mit diesen Methoden nicht aufgedeckt werden. Eisen braucht dabei nicht „maskiert“ oder „festgebunden“ zu sein. Wie wir sehen werden, ist es in den Geweben ebenso locker wie das Hämosiderin, und es läßt sich wohl kaum eine Grenze zwischen Hämosiderin und Gewebeeisen feststellen.

Meine Aufgabe war, die geringe Menge von Eisen, welche ja sehr verbreitet im Organismus vorkommt, zu entdecken. Ich richtete meine Aufmerksamkeit auf die Eigenschaft des Hämatoxylin, Eisen zu färben. Hierauf wies zuerst *P. Mayer* hin, aber da Hämatoxylin nicht allein Eisen, sondern auch Aluminium, Kupfer und andere Metalle färbt, so kann seiner Meinung nach Hämatoxylin für diagnostische Zwecke nicht dienen. *Benda, Heidenhain, Weigert* benutzten Hämatein, um vom tierischen Gewebe aufgenommenes Eisen nachzuweisen. Aber keiner von ihnen wollte das Hämatoxylin als Reaktionsmittel auf Zelleisen benutzen.

Bei den üblichen Hämatoxylinfärbungen soll Hämatoxylin nicht unmittelbar die Zellbestandteile färben, sondern vermittelt einer Lackbildung mit Metalloxyden (*Böhmer, Mayer, Benda, Weigert, R. Heidenhain, Becher, Gutstein*). Die Lacke stellen gewissermaßen eine basische Salzverbindung dar, da das Hämatoxylin als Säure betrachtet wird, welche mit dem basischen Metalloxyd sich verbindet. Nach *Becher* gehen die Lacke mit den sauren Gewebsbestandteilen eine Tripelverbindung ein, welche in Wasser unlöslich ist und von Salzsäurealkohol differenziert werden kann. Eine entsprechende Auffassung vertreten neuerdings *Möllendorf* und *Tomita*.

Welcher Bestandteil der Zelle sich mit dem Hämatoxylinlack verbindet, wodurch die Färbung entsteht, ist bis jetzt nicht ermittelt. Die allgemein verbreitete, von *Pappenheim* hauptsächlich stammende, Meinung, daß es die Nucleine des Kernes sind, welche von Hämatoxylin gefärbt werden, wurde von *Unna* bestritten. Nach Entfernung dieser sauren Eiweißkörper durch Vorbehandlung der Gewebsschnitte mit verdünnter Salzsäure liefert nämlich Alaunhämatoxylin noch eine unverändert gute Kernfärbung. Dagegen wird nach Vorbehandlung der Gewebsschnitte mit konz. Salzsäure die Alaunhämatoxylinfärbung vernichtet. Daraus schließt *Unna*, daß die Kernsubstanz ein basisches, in konz. Salzsäure lösliches Eiweiß darstellt. Wir wissen aber ebensogut, daß im Kern „maskiertes“ Eisen vorhanden ist, und daß es solche Eisenverbindungen gibt, die der Salzsäure widerstehen. Dazu gehört namentlich das magnetische Eisenoxydoxydul, welches nach den neuesten Untersuchungen (*Baudisch* und *Velo*, *Kondratjew*) im biologischen Umsatz von großer Bedeutung sein soll. Und wenn wir die Tatsache berücksichtigen, daß Eisen für Hämatoxylin äußerst empfindlich ist, so muß beim Zustandekommen der Färbung nicht an Nuclein, sondern eher an Eisen gedacht werden.

Gutstein ist auch damit einverstanden, daß nicht die Nucleine den Hämatoxylinlack aufnehmen. Er meint aber, daß nicht allein eine basische Substanz der Zelle sich mit dem Hämatoxylinlack verbindet, sondern daß dazu noch ein saures Lipoid nötig ist. Er begründet seine Ansicht durch folgende Tatsachen: 1. Die Hämatoxylinfärbung findet nach Vorbehandlung des Gewebes mit Metalloxyden statt, also muß ein saurer Körper im Gewebe diese Beize aufnehmen. Damit ist aber noch nicht gesagt, daß er ein Lipoid sein muß. 2. Die Hämatoxylinfärbung findet nach Vorbehandlung des Präparats mit Salzsäurealkohol nicht statt. Alkohol allein soll keinen Einfluß auf die Hämatoxylinfärbung ausüben, weil die Lipide mit Eiweiß verbunden sind. Salzsäure allein soll nur das Eiweiß entfernen, aber die Lipide unberührt lassen. Dann bleibt unverständlich, warum nach der Einwirkung von schwacher Salzsäure die Hämatoxylinfärbung nicht ausbleibt, da Lipide mit Hämatoxylin sich substantiv nicht färben. Daß nach Alkoholwirkung die Färbung nicht ausbleibt, ist leicht zu erklären, wenn die Grundlage der Hämatoxylinfärbung im Eisen steckt. Die Einwirkung des Salzsäurealkohols kann meiner Ansicht nach derart erklärt werden, daß dabei nicht verdünnte Salzsäure einwirkt, wie es bei der Verdünnung mit Wasser der Fall ist, sondern konzentrierte, da Alkohol sowohl dem Gewebe, als der HCl Wasser entzieht, wodurch Eisen eher gelöst wird. Übrigens gibt *Gutstein* nicht den Verdünnungsgrad seiner HCl an, und welchen Salzsäurealkohol er anwandte. Für die Lipoidfrage ist das nicht so wichtig, wie für die Eisenfrage. 3. Lecithinausstriche färben

sich nach Behandlung mit Metalloxyden und darauf mit wässriger Hämateinlösung stark blau. Aber ebenso stark färben sich damit unter gewissen Umständen auch Metalloxyde ohne Lecithin.

Wenn wir uns mit den Erwägungen näher befassen, welche *Mayer*, *Pappenheim*, *Unna*, *Escher* und *Gutstein* zu ihren Schlußfolgerungen bezüglich der Grundlage der Hämatoxylinfärbung führten, so werden wir leicht einsehen, daß sie alle auf sehr schwachem Boden stehen, da die chemische Konstitutionsformel des Hämatoxylyns unbekannt ist. Die meisten wollen darin einen sauren Körper erblicken, weil er mehrere OH-Gruppen enthält (*Gutstein*); man kann es aber aus demselben Grunde als basischen Körper betrachten. Als ganz besonders fraglich müssen alle jene Schlußfolgerungen angesehen werden, welche sich auf die Lackverbindungen des Hämatoxylyns gründen, da dieselben sehr unbeständige Körper darstellen, indem sie fortwährend reifen, also fortwährend ihren chemischen Bestand ändern, also in jedem jeweiligen Zustand ganz verschiedene Verbindungen eingehen können. Aus dem Verhalten des Lecithins wird auf die Lipoidnatur des reagierenden Stoffes geschlossen, wenn auch noch mehrere andere, sowohl im Kern als auch in den Markscheiden vorhandene Stoffe sich durch Hämatoxylin färben lassen und die Vorbehandlung des Gewebes mit lipoidlöslichen Mitteln keineswegs die Hämatoxylinfärbung schädigt.

Aus diesen Gründen habe ich, ungeachtet der herrschenden Theorien, meine Aufmerksamkeit auf die starke Farbenreaktion, welche Hämatoxylin auf Eisen ausübt, gelenkt und eine Untersuchung der Frage vorgenommen, inwiefern die Hämatoxylinfärbung dem Eisengehalt zugeschrieben werden kann.

Dazu wurde ich ganz besonders durch *Millers* elektive Färbung veranlaßt. Dieselbe besteht darin, daß formalinisierte und chromierte Präparate mit Delafieldschem Hämatoxylin 2 Tage gefärbt und darauf mit Borax-Ferrieyankalium differenziert werden. Mit dieser Methode konnte *Miller* selbst Spuren von Hämoglobin, auch Kalk und Russelsche Körperchen färben. Er ist der Meinung, daß diese Färbung des Hämoglobins auf dem Lipoidgehalt der roten Blutkörperchen beruht. Es ist nicht schwer einzusehen, daß die Millersche Färbung eine modifizierte Weigertsche Markscheidenfärbung darstellt. Wenn bei der Weigertschen Färbung das Protagon gebeizt wird, wie es *Wlassak* nachzuweisen suchte, dann soll dem Hämoglobin dasselbe Lipoid beigemischt sein. Dann würde die Frage zu lösen sein, wie es kommt, daß dieselbe Färbung Kalk und Russelsche Körperchen elektiv färbt. Sollten den letzteren Lipoidspuren beigemischt sein? Wenn aber bei der Millerschen Färbung Hämatoxylin Eisen färbt, dann würden alle Färbungen, welche mit *Weigerts* oder *Smith-Dietrichs* oder *Millers* Methode erreicht werden, einer Eisenbeimischung zuzuschreiben sein,

und dann müßte man meinen, daß in den Versuchen von *Wlassak*, *Smith* und *Mair*, *Kutschera-Aichbergen* u. a. den Lipoiden Spuren von Eisen durch Instrumente oder Gefäße beigemischt waren, da keiner von ihnen angibt, daß er bei seiner Arbeit Glasinstrumente benutzte.

Um aus diesem Wirrwarr der Tatsachen ins reine zu kommen, habe ich mit Herrn Dr. *Mamedow* Hirnschnitte, welche nach *Weigert* fixiert waren, mit halb gesättigter Lösung von Oxalsäure behandelt, dann tüchtig mit Wasser ausgewaschen, nach *Weigert* gefärbt und folgendes Ergebnis bekommen: Die *Myelinscheiden*, welche in Vergleichspräparaten schön blau gefärbt waren, sind ganz farblos geblieben. Ich mußte daraus schließen, daß die Markscheidenfärbung nicht durch Myelin, sondern durch Eisen bewerkstelligt wird, welches, fein von den Lipoiden adsorbiert, von Chromsäure gebeizt, mit Hämatoxylin eine innige Verbindung eingeht, die von Borax-Ferricyankalium nicht entfärbt wird. Daß dem Kalk in verkalkten Gefäßwänden Eisen beigemischt sein kann, ist leicht zu begreifen. *Perebinosow* konnte bei seinen Untersuchungen der Tela chorioides nachweisen, daß in den konzentrisch geschichteten Ablagerungen dem Kalk Eisen gewöhnlich beigemischt ist. Russelsche Körperchen sind Gebilde entsprechender Natur. Die elektive Färbung *Millers* verdankt also ihr Zustandekommen einer Eisenbeimischung.

Nach der Feststellung dieser Tatsache habe ich maskiertes Eisen im Zentralnervensystem nachzuweisen gesucht. Ich habe dazu Hirnstückchen aus verschiedenen Teilen des Gehirns verschieden lange formalinisiert und chromiert (gleichzeitige Formalinisierung und Chromierung in Orthschem Gemisch erwies sich weniger zweckmäßig) und ohne vorheriges Auswaschen in Wasser in Paraffin eingebettet. Eine 7tägige Chromierung in Müllerscher Flüssigkeit bei 37° genügt, um die roten Blutkörperchen mit Delafieldschem Hämatoxylin nach Differenzierung in Borax-Ferricyankalium stark dunkelblau zu färben. Bei noch längerer Chromierung (1—2 Monate) werden außer den Erythrocyten auch die Pigmentkörnchen in den Nervenzellen dunkelblau gefärbt. Als Beispiel lege ich eine Abbildung von Zellen der Substantia nigra, welche 47 Tage chromiert wurden, in den Farben, wie sie nach *Millers* Behandlung erscheinen (Abb. 1)¹. Schon die stark blaue Färbung der Erythrocyten, welche an in weniger lang chromierten Präparaten exquisit erscheint, läßt an der Teilnahme der Lipide bei der Färbung zweifeln. Erythrocyten enthalten allerdings Spuren von Cholesterin und Lecithin; aber Cholesterin soll nach *Kutschera-Aichbergen*, ebenso wie nach *Kawamura* Hämatoxylinchromlack überhaupt nicht aufnehmen, und Lecithin ist in so geringen Spuren in den Erythrocyten

¹ Die Zeichnungen wurden von meinem Assistenten Dr. *J. Semmel* hergestellt.

vorhanden, daß die starke Färbung wohl kaum davon stammen könnte. Dagegen ist Eisen im Hämoglobin ein ständiger und reichlicher Bestandteil (0,34%) und zu Hämatoxylin besonders in alkalischer Lösung äußerst empfindlich.

Um zu entscheiden, ob die Färbung durch Eisen zustandegebracht wird, behandelte ich die Schnitte mit halbgesättigter Lösung von Oxalsäure innerhalb 1 Stunde bei 37°, wonach die Färbung nicht mehr erzielt werden konnte. Derselbe Erfolg wurde nach 24stündiger Behandlung der Präparate mit gesättigter Lösung von Bernsteinsäure und Apfelsäure erhalten, welche ebenso wie Salzsäure, lösliche Verbindungen mit Eisen bilden, aber Lipotide nicht zersetzen.



Abb. 1. Aus der Substantia nigra eines erwachsenen Mannes nach 47 tägiger Chromirung mit Delafieldischem Hämatoxylin gefärbt und nach Weigert differenziert. Die blauen Körnchen stellen das Liposiderin dar.

Darauf habe ich Hirnstückchen nach *Smith-Dietrich* bearbeiten lassen, wobei die Erythrocyten weniger regelmäßig, dagegen aber das Nervenzellpigment und die Körnelung in den Hirncapillarendothelien, ebenso wie die Markscheiden nach 24stündiger Entfärbung in Borax-Ferricyankalium stark blau gefärbt werden. Die Vorbehandlung der Gehirnschnitte mit Oxalsäure, Bernsteinsäure und Apfelsäure hat hier nicht denselben Erfolg wie bei der *Millerschen* Methode. Sowohl das Pigment als die Markscheiden bleiben auch nach der Säureeinwirkung stark blau. Ob der Unterschied durch die Präparierung (bei S.-D. Gefrierschnitte, bei M. Paraffinschnitte) oder durch die Hämatoxylinverbindung (bei S.-D. saures Hämatoxylin nach *Kultschitsky*, bei M. basisches Hämatoxylin nach *Delafield*) oder durch die Dauer der Ent-

färbung (bei S.-D. 24stündige, bei M. sekundenlange) verursacht wird, ist noch zu entscheiden. Am wahrscheinlichsten läßt sich die Ursache des Unterschiedes des Erfolges der Einwirkung darin suchen, daß bei *Millers* Methode die Säuren auf chromierte Schnitte einwirken, wo sowohl Eisen als Lipoiden gebeizt werden und die Chromverbindungen beider aufgelöst werden, bei *Smith-Dietrich* dagegen die Säuren auf die ungebeizten Stoffe einwirken, wo also das Eisen durch die Säuren aufgelöst, die Lipoiden aber nicht gelöst, sondern darauf durch Chrom gebeizt und deshalb gefärbt werden. Wenn, wie es allen Anschein hat, bei der Weigertschen Färbung nicht Lipoiden die Färbung entscheiden, sondern Eisen, so ist es klar, daß die nach Entfernung des Eisens zustandekommende Färbung nicht durch die Phosphatide, sondern durch ihre Chromverbindung, vielmehr durch das anhaftende Chrom zustandegebracht wird, worauf wir noch zurückkommen.

Nachdem ich mittels der Proben der Auflösung der Eisenverbindungen gewisse Anhaltspunkte zur weiteren Untersuchung bekam, unternahm ich Proben mit der Auflösung der Lipoiden. Die Einwirkung der lipoidlösenden Stoffe auf bereits chromierte Hirnstücke hat keinen merklichen Einfluß auf den Erfolg der Hämatoxylinfärbung, augenscheinlich weil sie die gebeizten Lipoiden nicht auflösen; ebenso waren die Markscheiden in Gefrierschnitten gefärbt, welche aus Alkoholpräparaten gemacht wurden und dann nach *Smith-Dietrich* behandelt worden sind. Selbstverständlich sprechen diese Tatsachen sehr gegen die Lipoidgrundlage der Markscheidenfärbung, um so mehr, als die Färbung auch nach Behandlung der Präparate mit Alkohol und Alkoholäther nicht verschwindet. Aber von entscheidendem Ergebnis erwies sich der Versuch, wenn die Gefrierschnitte aus alkoholfixierten und in Alkohol mehrere Tage gelegenen Präparaten nicht sofort nach *Smith-Dietrich* behandelt wurden, sondern auf 1 Tag in absoluten Alkohol, dann in Äther eingelegt wurden, ein Teil davon noch mit Aceton durchtränkt wurde und erst darauf nach *Smith-Dietrich* gefärbt und differenziert war. Je nach der Zeit der Einwirkung der lipoidlösenden Stoffe zerfallen die Markscheiden zuerst in blaue Körnchen, so daß von Markscheidenstruktur überhaupt nicht mehr die Rede sein kann, dann lösen sie sich vollständig auf und werden entfärbt. Dagegen bleibt die Pigmentkörnchelung der Nervenzellen, ebenso wie diejenige der Capillarendothelien bei noch so langer Entlipoidierung ausgezeichnet blau gefärbt. Allerdings werden sie etwas verringert, insofern als zwischen ihnen größere Zwischenräume entstehen, so daß jedes einzelne Körnchen sichtbar wird. Es bedarf also einer stärkeren Einwirkung der lipoidlösenden Mittel, um die Phosphatide der Markscheiden zu entfernen; aber auch nach der Entfernung der Lipoiden aus den Körnern der Zellen bleibt eine Substanz daran haften, die höchstwahrscheinlich Eisen ist.

Übrigens darf aus der Löslichkeit der Markscheidensubstanz in Alkohol und Äther nicht geschlossen werden, daß dadurch Lipoidstoffe allein aufgelöst werden. Nach *Becher* ist Eisenchlorid nicht nur in Alkohol reichlich, sondern auch in Äther, Benzol, Xylol und Toluol löslich. Die obenerwähnte Schlußfolgerung *Gutsteins* bezüglich der Lipoidnatur der Hämatoxylinfarbgrundlage in der Zelle auf Grund ihrer Löslichkeit in Alkohol fällt also weg. Es ist somit nicht ausgeschlossen, daß *auch in den Markscheiden die Hämatoxylinfärbung dem Eisen ihre Entstehung verdankt*; nur ist das Eisen dort in einer lockereren Verbindung mit dem Myelin als in den Nervenzellen und dem Endothel.

Als Ergebnis der Beobachtungen sind im Zentralnervensystem zweierlei Substanzen zu unterscheiden, die sich verschiedenartig zum Hämatoxylinlack verhalten: Einerseits die Substanz der Markscheiden, welche der Säureeinwirkung widersteht, aber in Alkoholäther löslich ist, andererseits die Pigmentkörnchen der Nervenzellen und des Capillarendothels, welche sowohl nach der Säureeinwirkung als nach Alkoholäther sich färben lassen. Die Frage, ob es Abbau- oder Aufbaueisen ist, welches da vorliegt, muß in dem Sinne entschieden werden, daß das Pigment, welches zum Alter hin sich anhäuft, also mit dem Abwelken des Organismus sich vermehrt, Abbaueisen enthält, wogegen dasjenige der Markscheiden eher als Aufbaueisen gedeutet werden kann.

Was die Bildung des Nervenzellpigments anbelangt, so fiel mir schon vor 36 Jahren auf, daß die Sektionsbefunde, in welchen das Endothel der Pialgefäße besonders reichlich mit Körnchen geladen war, Hirn- und Piaödem aufwiesen. Ich stellte dann den Druck auf die Gefäßwand als Ursache der Pigmentbildung auf. Die neueren Anschauungen über die Möglichkeit bei veränderter Blutströmung einer Durchträngung der Gefäßwand mit Blutplasma trugen auch dazu bei, die physiologische Hypertonie und die Arteriosklerose als Ursache der Lipoidablagerung anzusehen. Darüber wird folgender Aufsatz dieses Archivs das Nähere bringen. Kurz gefaßt, glaube ich zeigen zu können, daß die Enge der Hirncapillaren zu einem höheren Blutdruck in denselben im Vergleich mit dem Blutdruck in den Capillaren der übrigen Körperorgane führt. Das Blutplasma mit den Blutkörperchen dringt in das Endothel ein, und wenn man die Form der Körnchen in den Hirncapillarendothelien und ihre beträchtliche Größe in Betracht zieht, kann man nicht umhin, eine Phagocytose der Erythrocyten seitens der Endothelien zu erkennen. Die Körnchen stellen somit verkrüppelte Erythrocyten dar, was durch den Gehalt der ersteren an Lipoiden und Eisen bestätigt wird. Aus ihnen wandern diese Stoffe in die Neuroglia und die Nervenzellen. Die Nervenfasern sind weiter von den Blutcapillaren entfernt als die Nervenzellen, und dorthin gelangen noch stärker umgewandelte chemische Substanzen,

welche nur Spuren von Eisen, aber um so mehr Lipoide enthalten. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die Lipoide der Nervenfasern mit denjenigen des Blutes nichts zu tun haben, da die Markscheiden zu einer Zeit angelegt werden, in der Gefäße dort noch nicht vorhanden sind, namentlich wenn die Lipoide in den Ependymzellen auftreten und von da aus in die Nervenfasern gelangen (*Mühlmann*).

In den autochthonen Pigmentkörnchen der übrigen Körperorgane, welche *Lubarsch* als Abnutzungspigment bezeichnet, ich meinerseits zum Alternspigment zähle, liegt dieselbe Erscheinung vor, wie im Pigment der Nervenzellen. Es wird sowohl nach *Miller* (mehrmonatige Einwirkung vorausgesetzt) als auch nach *Smith-Dietrich* und nach



Abb. 2. Aus dem Herzen eines erwachsenen Mannes ebenso behandelt, wie in Abb. 1. Die blauen Körnchen enthalten Lipoidsiderin.

Weigert schön blau gefärbt. Derartige Präparate bekam ich vom Herzmuskel (Abb. 2), von der Leber und der Niere. Die Leberzellen sind ziemlich dicht von blauen Körnchen ausgefüllt, ebenso ist es an vielen Nierenzellen der Fall. So viel Pigmentkörnchen, wie diese Methode zeigt, kann man an unbehandelten Präparaten nicht sehen. Nach Einwirkung von Oxalsäure, Bernsteinsäure und Apfelsäure auf den Gefrierschnitt bleibt die Färbung erhalten, aber ebensogut wird sie nach der Alkoholätherbehandlung nachweisbar. Das Pigment besteht aus Lipoid und Eisen und kann demnach als *Lipoidsiderin* bezeichnet werden.

Der Untergang der roten Blutkörperchen findet also fast in allen Körperorganen statt. Unsere Untersuchung erklärt am einfachsten, wohin das Material der in ungeheurer Menge zugrunde gehenden roten

Blutkörperchen gelangt. Das Lipoidsiderin ist ein Leichenrest der Erythrocyten.

Der Untersuchung der Pigmente habe ich diejenige der menschlichen Erythrocyten angeschlossen, wobei mir Dr. *S. I. Bermann* und der Präparator Stud. med. *Litinskaja* behilflich waren.

Blutausstriche wurden mit denselben organischen Säuren, also 50% Oxalsäure, konk. Bernsteinsäure und Apfelsäure 1 Stunde lang bei 37° behandelt und der Hämatoxylinfärbung (*Mayers* Lösung) ausgesetzt. Erythrocyten bleiben ungefärbt resp. nehmen eine schwache Färbung, die Leukocyten eine stärkere Färbung an. Das Ausbleiben der Färbung der Erythrocyten nach der Säureeinwirkung kann in dem Sinne gedeutet werden, daß das Eisen derselben durch die Säuren aufgelöst wird; schwache Färbung an manchen Erythrocyten kann so gedeutet werden, daß, da Lipide durch organische Säuren nicht zerstört werden, sie mit Eisen eine innige Verbindung bilden, welche den Säuren widersteht und Hämatoxylin aufnimmt. Eine solche innige Verbindung scheint das Eisen in den Kernen der Leukocyten einzugehen, welche der Säureeinwirkung widersteht, oder aber das Eisen befindet sich darin in der erwähnten säurefesten Eisenoxydoxydulform. Jedenfalls kann die Färbung der Kerne nach der Säureeinwirkung nicht durch die Anwesenheit der Lipide allein erklärt werden, da Lipide sich mit Hämatoxylin substantiv nicht färben.

Nach 2stündiger Einwirkung von 0,5% Natri bicarbonici färbt Hämatoxylin die Erythrocyten schattenförmig, dagegen die Leukocytenkerne so stark, daß ihre Struktur nicht mehr zu enthüllen ist. Das Protoplasma wird auch blau gefärbt. Auch nach 8stündiger Einwirkung konnte die Hämatoxylinfärbung der Kerne und des Protoplasmas nachgewiesen werden; die Teile werden aber gequollen und verschwommen. Dieses Verhältnis kann aber in zweifacher Weise erklärt werden: Entweder schlägt die Sodalösung eine OH-Verbindung des Eisens nieder, welche den Kern entstellt, oder der Lipidanteil des Kerns wird verseift. Die zweite Möglichkeit ist wohl auszuschließen, weil Seife in Wasser löslich ist und nach 2stündiger, geschweige denn nach 8stündiger Einwirkung sich nicht erkennen lassen würde. Die Auflösung derselben würde vielleicht die stärkere Färbung des hinterbliebenen Eisens bewirken.

Die Behandlung der Blutausstriche mit Alkoholäther (24 und 48 Stunden) hat keinen Einfluß auf den Erfolg der Hämatoxylinfärbung, ja sie wird noch schöner. Die Erythrocyten werden gleichfalls, wenn auch viel schwächer als die Leukocytenkerne gefärbt, so daß von einer Lipidgrundlage der Hämatoxylinfärbung keine Rede sein kann. Vielmehr zeigt die Färbung der Erythrocyten nach der Entfernung der Lipide, daß die letzteren mit dem Eisen nicht eine chemische, sondern

eine physikalische Verbindung eingehen, welche im unbehandelten Ausstriche störend auf die Eisenfärbung wirkt.

Nach der Anwendung der Smith-Dietrichschen Methode werden die Erythrocyten blau gefärbt, die Kerne der Lymphocyten bleiben ungefärbt, diejenige der Granulocyten meist gefärbt. Für die Lipoidtheorie gibt also diese Behandlung keinen Anhaltspunkt, da von einer tief blauen Färbung nichts zu sehen ist. Die Vorbehandlung der Präparate mit Alkoholäther während 24 Stunden ändert am Erfolg der S.-D.-Färbung so gut wie nichts.

Die Millersche Methode gibt einen kleinen Unterschied, insofern als die neutrophilen Granulationen auch gefärbt werden. Nach der Alkoholätherbehandlung werden nicht nur die Kerne der Granulocyten, sondern auch diejenigen der Agranulocyten von Hämatoxylin gut gefärbt, die Granulationen werden aber entfärbt, so daß an ihre lipoide Natur zu denken ist. Die Ursache des Unterschiedes im Erfolg beider Färbungsmethoden ist noch zu untersuchen; er ändert aber nichts an der Tatsache, daß im Kerne nicht das Lipoid die Hämatoxylinfärbung hervorruft.

Das Verhalten der Lipoide und der Nucleinsäure zu verschiedenartigen Hämatoxylinlösungen habe ich an den Substanzen selbst, also an Lecithin, Cholesterin, Oleinsäure und Nucleinsäure im Probierglas geprüft und konnte mich überzeugen, daß zur Erzeugung einer Hämatoxylinfärbung die alkalische Reaktion eine unentbehrliche Vorbedingung ist. Verschiedene Reaktionen des Hämatoxylins mit Cholesterin, Lecithin, Nucleinsäure waren negativ, solange ihre Verbindungen in einer Lösung von destilliertem Wasser hergestellt wurden, und positiv, wenn eine Spur von Natronlauge oder Ammoniak zur Lösung zugesetzt wurde. Wie gering die alkalische Reaktion sein muß, um eine Farbreaktion zu bekommen, zeigt am besten die Tatsache, daß die Reaktionen positiv ausfielen, wenn statt destillierten Wassers Leitungswasser angewendet wurde, welches schwache alkalische Reaktion, wahrscheinlich infolge Zusatzes von doppeltkohlensaurem Natron oder Kalk, zeigt.

Weder Lecithin noch Cholesterin noch Nucleinsäure färben sich also mit Hämatoxylin substantiv. Die Farbreaktion, welche sie in alkalischer Lösung zeigen, stammt nicht von ihnen, sondern vom Alkalizusatz, denn eine geringfügige Lösung von Natronlauge, Soda oder Ammoniak in destilliertem Wasser wird ebenso von Hämatoxylin gefärbt. Hämatoxylin reißt begierig O aus dem Alkali an sich und wandelt sich in seine gefärbten oxydierten Stoffe um. Diese Eigenschaft zeigt Hämatoxylin in gewaltigem Maße, was am besten aus dem Reifungsprozeß ersichtlich ist. Und wenn in der zu färbenden Substanz ein Stoff vorhanden ist, welcher den Sauerstoff leicht übertragen kann, so kann die Verstärkung der Färbung ins Unendliche geschehen.

Einen solchen Stoff stellen eben die Eisenverbindungen dar, und zwar hauptsächlich das Eisenoxydul und seine Verbindungen. Eisenoxyd wird von Hämatoxylin nicht gefärbt. Wenn also im Kern die Grundlage der Hämatoxylinfärbung von Eisen geliefert wird, so müssen dort Eisenoxydulverbindungen gesucht werden. Die Bedeutung der Lipide für das Zustandekommen der Hämatoxylinfärbung kann nur darin gesucht werden, daß sie imstande sind, Eisen zu adsorbieren, und zwar sind es hauptsächlich die Fettsäuren, die dies tun. Darin konnte ich mich durch folgende Versuche überzeugen. Unter den Lipiden, mit welchen ich Versuche anstellte, gab oleinsaures Natron die stärkste Färbung mit Hämatoxylin. Während die Cholesterin- und Lecithin-emulsionen in Leitungswasser gute blaue Färbungen gaben, gab die Oleinsäure eine stark violette oder dunkelblaue Färbung. Der Verdacht von Eisenbeimischung veranlaßte mich, trotzdem die Präparate von der bewährten Firma Kahlbaum stammten, dieselben einer chemischen Untersuchung zu unterwerfen. Diese wurde in liebenswürdiger Weise von Herrn *Schick*, Vorsteher der chemischen Abteilung des Mikrobiologischen Institutes in Baku, ausgeführt und ergab eine beträchtliche Beimischung von Eisen zum oleinsauren Natron und Spuren davon zum Cholesterin. Ebenso ist das Lecithinum ovis eisenhaltig. Es ist möglich, daß die Eisenbeimischung nicht von vornherein da war, als das Präparat von der Firma abgelassen wurde, sondern beim Öffnen des Gefäßes und Wägen des Salzes durch Berührung mit eisenhaltigen Instrumenten hinzugemischt wurde. Das beweist aber, daß Fettsäure zu Eisen sehr avid ist und daß das letztere aus seinen Verbindungen durch die Ölsäure leicht ausgezogen wird. Und da Cholesterin und Lecithin in Fettsäuren zerfallen, so muß in den Versuchen stets darauf geachtet werden, daß Eisen aus denselben entfernt werde. Ebenso wie in Versuchen, werden auch im Leben von den Zellen, in Erythrocyten, in Leukocyten, wo Cholesterin und Lecithin stets zugegen sind, Eisenverbindungen adsorbiert und auf diese Weise wird die Hämatoxylinfärbung zustande gebracht.

Für das Zustandekommen der Hämatoxylinfärbung sind also 2 Vorbedingungen nötig. Erstens die alkalische Reaktion. Da Nucleinsäure dieselbe nicht besitzt, so muß die alkalische Reaktion entweder mit dem Hämatoxylin selbst hineingebracht werden, und dies ist in den üblichen Gemischen von Alaunhämatoxylin der Fall, oder die Präparate müssen vorerst alkalisch gemacht werden, was das Beizen gewöhnlich tut.

Ich kann mich hier nicht in die Theorie der Beizung vertiefen; darüber findet man eingehende Besprechung bei *Pappenheim*, *Michaelis*, *Witt*, *Becher* u. a. Das wichtigste Moment der Beizung besteht darin, daß das Metalloxyd als Base mit dem Farbstoff als Säure sich zu einem Salz verbindet, welches den Lack darstellt. Nach *Werner*, *Becher* stellen

die Lacke innere Komplexsalze dar, deren Bildung darauf beruht, daß der Farbstoff eine salzbildende und eine zur Erzeugung einer koordinierten Bindung mit dem Metallatom befähigte Gruppe enthält. Dieses Komplexsalz stellt nach *Becher* ein Lackion dar, welches basischer Natur ist, und mit den Säuren des Kerns wiederum ein Salz, und zwar ein unlösliches Salz bildet, wodurch allein die Echtheit der Färbung erreicht wird. „Aus der technischen Anwendung der Beizen“, sagt *Becher*, „geht hervor, daß sie alle auf ein Freimachen, d. h. Entstehenlassen des Hydroxyds, hinauslaufen.“ Die Forderung, welcher die Hämatoxylinfärbung entsprechen muß, und die in der Bewerkstelligung des Beizungsvorganges besteht, hat nur den Zweck, die erste Forderung zu erfüllen, namentlich die Herstellung der basischen Reaktion. Das Lackion muß durch seine Basizität Kernsäure neutralisieren und OH frei machen.

Aber welche Art Kernsäure kommt hierbei in Betracht? *Unnas*, *Gutsteins* und unsere Versuche zeigen, daß auch nach der Entfernung der Nucleinsäure die Hämatoxylinfärbung vonstatten geht. Es muß also im Kern ein anderer Stoff die Säure bilden, welche mit der Lackbase in Verbindung tritt. Es könnten im Kern Fettsäuren in Betracht kommen, welche mit Eisenoxydoxydul chemische oder physikalische Verbindung eingehen, und da Eisenoxydul von Hämatoxylin gefärbt werden kann, so muß geschlossen werden, daß der Lack als basisches Komplexsalz mit der Fettsäure Verbindung eingeht, Eisenoxydul freimacht, welches dann die Färbung aufnimmt. In dem Fall, wo die Beize unmittelbar auf die Zelle einwirkt, schlägt sie die Eisenoxydulhydratverbindung nieder, welche dann mit dem Farbstoff Verbindung eingeht. Da der Farbstoff meist schon in Lackform einwirkt, so muß das Kerneisen, welches stärkere Verwandtschaft zu Hämatoxylin aufweist, das Metalloxyd der Beize dissoziieren und ersetzen, z. B. Chromeisen bilden, welches sich dann färbt. Dann geht das Eisen des Kerns selbst gewissermaßen die Lackverbindung ein. Der ganze Prozeß geschieht fortschrittweise, in Übereinstimmung mit der Natur der magnetischen Eisenverbindungen, welche unter der Einwirkung des Luftsauerstoffs fortwährend ihren Bestand wechseln, durch ihre katalytische Wirkung Sauerstoff frei machen und auf das Hämatoxylin übertragen, welches somit auch während der Färbung reift.

Die zweite Bedingung für das Zustandekommen des Färbeprozesses mit Hämatoxylin ist also das Vorhandensein von Eisenverbindungen. Es ist ganz unbegreiflich, wieso man bisher Hämatoxylin zum Eisennachweis im Gewebe nicht ausnutzte. *Mayer*, *Gutstein* meinten, daß die Hämateinmethode für körperliches Eisen nicht anwendbar sei, weil sie für Eisen nicht spezifisch ist. Hämatein soll auch mit anderen Metalloxyden Lacke bilden. Dieser Einwand ist nicht stichhaltig.

Von anderen Metalloxyden könnten im Gewebe Kupfer, Aluminium in Betracht kommen. Abgesehen davon, daß sie in Spuren und nur an bestimmten Orten vorkommen, Eisen dagegen in allen Geweben und in viel beträchtlicherer Menge vorhanden ist, kann man sich doch mittelst chemischer Kontrolle davon überzeugen, ob wir es mit Eisen oder einem anderen Metall zu tun haben. Ich halte meine Aufgabe vorläufig für abgeschlossen, nachdem ich nachgewiesen habe, daß die verbreiteten Ansichten, daß Hämatoxylin entweder Nuclein oder Lipide färbt, nicht richtig sind, und daß alle meine Hämatoxylinproben für Eisen sprechen. Ganz besonders befestigt wurde das Ergebnis meiner Untersuchungen durch die Analyse der Lipide, in welchen Eisen gefunden wurde, was so leicht die Hämatoxylinfärbung derselben erklärte.

Ich glaube auch, daß die im Organismus nach den Untersuchungen von *Loele* so ausgedehnt vorkommenden naphtholbindenden Stoffe dem Eisengehalt die Phenolreaktion verdanken, da Eisenlösungen mit α -Naphthol violett gefärbt werden. *Loeles* Einwendungen dagegen sind nicht stichhaltig. Besonders schön läßt sich die Hämatoxylinreaktion an den naphtholbindenden eosinophilen Granula zeigen. Ich konnte diese Granula in 2 Fällen, wo das Blut 7 resp. 12% Eosinophile enthielt, eingehend untersuchen. Organische Säure lösen die α -Körnchen auf. Dagegen bleiben sie nach schwacher Alkaliwirkung 0,1—1% NaOH oder 0,5% NaHCO₃ nicht nur erhalten, sondern färben sich mit neutralem Hämatoxylin. Merkwürdig ist es, daß *Mayers* Hämatoxylin sie nach der Alkaliwirkung nicht färbt! Ich erkläre diese Erscheinung damit, daß die eosinophilen Körnchen Eisen enthalten, welches in Säuren aufgelöst, durch Basen niedergeschlagen und von neutralem Hämatoxylin deshalb gefärbt wird. Die Unfärbbarkeit mit Hämatoxylinlack kann daher kommen, daß der verstärkte Alkalizusatz die Hydratlösung des Eisens schließlich auflöst. Das Ergebnis der Untersuchung der eosinophilen Granula macht ihre Entstehung aus Hämoglobin wahrscheinlich.

Ich teile hier die Ergebnisse meiner Untersuchung der Hämatoxylinreaktionen an den Zellteilen der übrigen Organe nicht mit, weil dieselbe noch nicht abgeschlossen ist. Es erweist sich, daß die Verhältnisse dort sehr verwickelt sind, weil das Eisen sich je nach Organ, Tier und Alter verschieden verteilt. Wenn wir die große Bedeutung, welche das Eisen für den Stoffumsatz des Organismus hat, in Betracht ziehen, wenn man die Eigenschaft des Eisens bezüglich der O-Übertragung berücksichtigt, welches der fermentativen Tätigkeit gleichkommt — *Baudish* und *Velo* konnten ja im aktiven Eisenoxyd in der Lösung von 1:500000 katalytische Eigenschaft nachweisen —, so muß man anerkennen, daß der von mir entwickelte Standpunkt ein unübersehbares Feld für die Untersuchung eröffnet.

Von ganz besonderer Bedeutung muß sich der Befund von Eisen im Zentralnervensystem erweisen. Wenn Eisen an Myelin gebunden ist, so muß jede Störung des Eisenstoffwechsels auch auf den Myelinbestand wirken. Die riesige Teilnahme des Eisens am Oxydationsprozeß, die Inangriffnahme seines Bestandes durch Infektions- resp. Stoffwechselkrankheiten, durch Blut- und Leberkrankheiten muß ganz neues Licht auf die Entstehung vieler Nervenkrankheiten werfen, bei welchen eine Störung des Eisenstoffwechsels nachzuweisen ist. Diese Andeutungen ermutigen zu emsiger Arbeit.

Literaturverzeichnis.

- Baudish* and *Velo*, Studies from the Rockefeller Inst. 1925—1926. — *Becher*, Untersuchung über Echtfärbung der Kernstoffe. Berlin 1921. — *Best*, Verhandl. d. deutsch. pathol. Ges. 1911. — *Christeller* und *Kaiser*, Klin. Wochenschr. 1925. — *Gutstein*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **261**. 1926. — *Hueck*, Verhandl. d. deutsch. pathol. Ges. — *Kawamura*, Die Cholesterinverfettung. Jena 1911. — *Kondratjew*, Anat. Anz. 1926; Pridnjepr. med. Journ. 1927. — *Kutschera-Aichbergen*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **256**. 1925. — *Loele*, Die Phenolreaktion. Leipzig 1920.; Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. 1926. — *Lubarsch*, Berl. klin. Wochenschr. 1917; Arch. f. Psychiatrie u. Nervenkrankh. **67**. 1922. — *Mayer, P.*, Enzyklopädie der mikroskopischen Technik. Art. Hämatoxylin. — *Möllendorff* und *Tomita*, Zeitschr. f. Zellforsch. **3**. 1925. — *Müller, M.*, Zeitschr. f. d. ges. Neurol. u. Psychiatrie **77**. 1922. — *Odefey*, Zeitschr. f. Psychol. u. Physiol. d. Sinnesorg. **59**. 1918. — *Perebinosow*, Zur Frage über die Pathologie der Tela chor. Inaug.-Diss. Baku 1926. — *Smith* and *Mair*, Skandin. Arch. f. Physiol. **25**, 247. 1911. — *Spatz*, Zeitschr. f. d. ges. Neurol. u. Psychiatrie **77**. 1922. — *Unna*, Chromolyse. In Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethode Bd. 6. — *Wlassak*, Roux' Arch. f. Entwicklungsmech. d. Organismen **6**. 1898.