

Hämatoxylin als Reagens auf Eisen.

(II. Mitteilung.)¹

Von

M. Mühlmann, in Gemeinschaft mit Dr. I. Seemel.

(Eingegangen am 10. Mai 1928.)

In der ersten Mitteilung habe ich festzustellen gesucht, daß weder die Nucleintheorie noch die Lipoidtheorie zur Erklärung der Hämatoxylinfärbung ausreichen. Die Schwierigkeit, welche mit der Untersuchung der Grundlage der Hämatoxylinfärbung verbunden ist, kommt daher, daß Hämatoxylin ein universelles Färbemittel ist. Es färbt Zellen, Fasern und Intercellularsubstanz. Diese Schwierigkeit wird allerdings durch die Tatsache erleichtert, daß Eisen sehr verbreitert im Organismus vorkommt, und überall, wo Hämatoxylin färbt, Eisen durch chemische Analyse nachweisbar ist. Es ist aber zu beweisen, daß Hämatoxylin Eisen *elektiv* färbt. Daß diese Elektivität von ungeheurer biologischer Tragweite sein kann, braucht wohl kaum besonders hervorgehoben zu werden. Es muß zu ihrem Nachweis ein solcher Weg gefunden werden, welcher von jedem Einwurf frei wäre. Die Anwendung der Hämatoxylinlacke wird für eine derartige Untersuchung wohl kaum zum Ziele führen, da Hämatoxylinlack alles mögliche färbt. Hämatoxylinlack ist selbst schon gefärbt, und die Gewebsfärbung damit besteht in seiner Adsorption durch Gewebsbestandteile. Diese Adsorption kann von physikalischen Umständen abhängen, die vielleicht mit der chemischen Natur der zu färbenden Gewebsteile nicht unmittelbar in Zusammenhang stehen. Jedenfalls wird die Untersuchung durch die Anwendung der Hämatoxylinlacke verwickelt, da dieselben bereits eine Verbindung von Hämatoxylin mit Metalloxyden darstellen. Das Zustandekommen der Färbung mußte seitens derjenigen, die die Eiweiß- bzw. Lipoidnatur der Hämatoxylinfärbung vermuteten als eine Tripelverbindung betrachtet werden. Die Eisentheorie muß dann entweder eine zweifache Metallverbindung annehmen oder den Ersatz der Beize durch das Gewebseisen nachzuweisen suchen. Bis dies geschieht, glaubte ich den Untersuchungsweg zu vereinfachen, indem ich mir zur Aufgabe stellte, in den Geweben den Angriffspunkt nicht des Hämatoxylinlacks,

¹ Die erste ist in Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **266**, H. 3 gemacht worden.

sondern des Hämatoxylins allein zu finden. Hämatoxylin ist farblos oder gelblich, seine wässrige Lösung färbt gewöhnlich nicht. In meiner ersten Mitteilung unterließ ich mitzuteilen, daß unter den Forschern, die Hämatoxylin zum Eisennachweis benutzten, *Macallum*¹ zu nennen ist, welcher wässrige Hämatoxylinlösung für die Unterscheidung von maskiertem und unmaskiertem Eisen empfiehlt. Diese Lösung soll nur unmaskiertes Eisen, nicht aber maskiertes färben. Ich glaube aber eben maskiertes damit nachweisen zu können.

Damit die Färbung mit Hämatoxylin zustande käme, muß es oxydiert werden. Dies wird durch Alkalisierung der Lösung erreicht, was auch die Lackierung mit Metallbeize bezweckt. Da in den Geweben Eisen vorhanden ist, so suchte ich das Gewebseisen zur Beize zu machen. Zu diesem Zweck behandelte ich die Gewebe mit Alkalien, um darin Eisenoxydulhydrat niederzuschlagen und es mit einer neutralen Hämatoxylinlösung zu verbinden. Wenn dadurch im Gewebe eine Blaufärbung eintreten sollte, dann glaubte ich meinen Zweck erreicht zu haben und die Elektivität des Hämatoxylins zu Eisen nachgewiesen zu haben. In der ersten Mitteilung habe ich schon darauf hingewiesen, daß auf diese Weise die Granula der Eosinophilen mit wässriger Hämatoxylinlösung blau gefärbt werden. Dazu behandelte ich die Blutaustriebe mit schwacher Alkalilösung. Weitere Untersuchungen habe ich an Blutgerinseln angestellt, weil die Blutaustriebe bei der Behandlung mit starker Alkalilösung abgeschwemmt werden.

Ich zog zunächst schwache Lösungen vor, um dem Gewebe weniger Schaden anzutun. Die Wirkung derselben erwies sich aber als unbeständig. Daher habe ich Blutgerinsel von Linsengröße und weniger, wobei ich die obere Schicht, welche weiße Blutkörper enthielt, benutzte, mit konzentrierter Ammoniak- resp. 15proz. Natronlauge behandelt, tüchtig mit destilliertem Wasser mehrmals ausgewaschen, durch Alkohol möglichst rasch durchgeführt, in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit 1proz. neutraler Hämatoxylinlösung 15 Minuten lang gefärbt. Weder die roten noch die weißen Blutkörperchen werden gefärbt, dagegen erscheinen im Präparat zahlreiche blaue körnige Flecke von unregelmäßiger Form und Größe, die den Eindruck von Kunstprodukten, Farbenniederschlägen machen. Ich würde in jedem anderen Präparat dieselbe für wertlos gehalten haben, wenn ich nicht den Zweck im Auge gehabt hätte, welchen ich durch meine Versuchsanordnung verfolgte. Das Eisenoxydulhydrat, welches durch die Alkalibehandlung der Präparate sich bilden sollte, konnte in diesem Falle deshalb frei gefunden werden, weil das Eisen aus seinem Sitze gelockert und regellos im Gewebe niedergeschlagen wurde. Die erhaltenen Flecke machen den Eindruck von Kunstprodukten, weil sie regellos im Schnitt zerstreut sind; dagegen spricht aber ihre blaue

¹ Ergebn. d. Physiol. 1908.

Farbe und die Regelmäßigkeit, mit welcher sie auftreten. Wenn die Färbung durch Einwirkung des etwa frei gebliebenen Alkali (dem ich durch tüchtiges Auswaschen des Präparates vorzubeugen suchte) zustande gekommen wäre, dann hätten wir eine gleichmäßige Färbung bekommen, weil das Hämatein dann gelöst würde; wir hätten dann auch eine Färbung von organisierten Teilen bekommen. Aber gerade die Niederschlagsbildung spricht für die Bildung des kolloidalen Eisenoxydhydrat, welches in Wasser unlöslich ist.

In Vergleichspräparaten waren keine körnigen Haufen vorhanden. Nach Behandlung frischer Präparate treten sie nicht mit der Regelmäßigkeit auf, wie in formalinisierten. Allerdings darf die Formalinisierung (5–10% Formalin) nicht länger als 2 Tage dauern, sonst werden die Niederschläge, welche sich durch die Alkalibehandlung bilden, nicht blau, sondern braun gefärbt. Eine längere Oxydierung verwandelt sie wohl in Eisenoxydhydrat, welches das neutrale Hämatoxylin in Hämatein nicht umwandelt. Da die Haufen keine bestimmte Lokalisation im Präparate aufweisen, konnte ich nicht herausbekommen, woher dieses Eisen kommt. Das Alkali zerstört ja sowohl die roten, als die weißen Blutkörperchen. Die Kerne der Leukocyten färben sich danach mit Alaunhämatoxylin, aber sie werden entstellt, so daß es gewagt wäre, etwas Bestimmtes zu sagen. Der einzige Schluß, welcher aus diesen Versuchen gemacht werden kann, ist der, daß das Eisen der Blutbestandteile durch die Alkalibehandlung aus denselben herausgeschwemmt, niedergeschlagen und mittelst Hämatoxylin sichtbar gemacht wird.

Aber auch dieses Ergebnis ist für die Biologie und Pathologie von Wert, nachdem die hervorragende Bedeutung des Eisens in der tierischen Atmung von Warburg¹ festgestellt ist. Er stellt geradezu eine Theorie auf, daß die Zellatmung aus Eisenkatalyse besteht. Die andere wichtige Entdeckung Warburgs², daß im Blutserum Kupfer regelmäßig zu finden ist, ist für die Hämatoxylinfärbung ebenso wichtig, weil Hämatoxylin mit Kupfer gleichfalls eine Lackverbindung bildet. Wenn sich auch in den Geweben Kupfer finden wird, dann wird die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen sein, daß die universelle Hämatoxylinfärbung auch dem Kupfergehalt zu verdanken sein kann, aber die Versuchsanordnung, wie sie in dieser Mitteilung vorgeschlagen ist, kann nur für Eisen gelten, da Kupferverbindungen in Ammoniak löslich sind.

¹ O. Warburg, Über die katalytischen Wirkungen der lebenden Substanz. 1928.

² Ebenda.