ZB MED - Informationszentrum Lebenswissenschaften

Histochemie der Haut

Unna, Paul Gerson

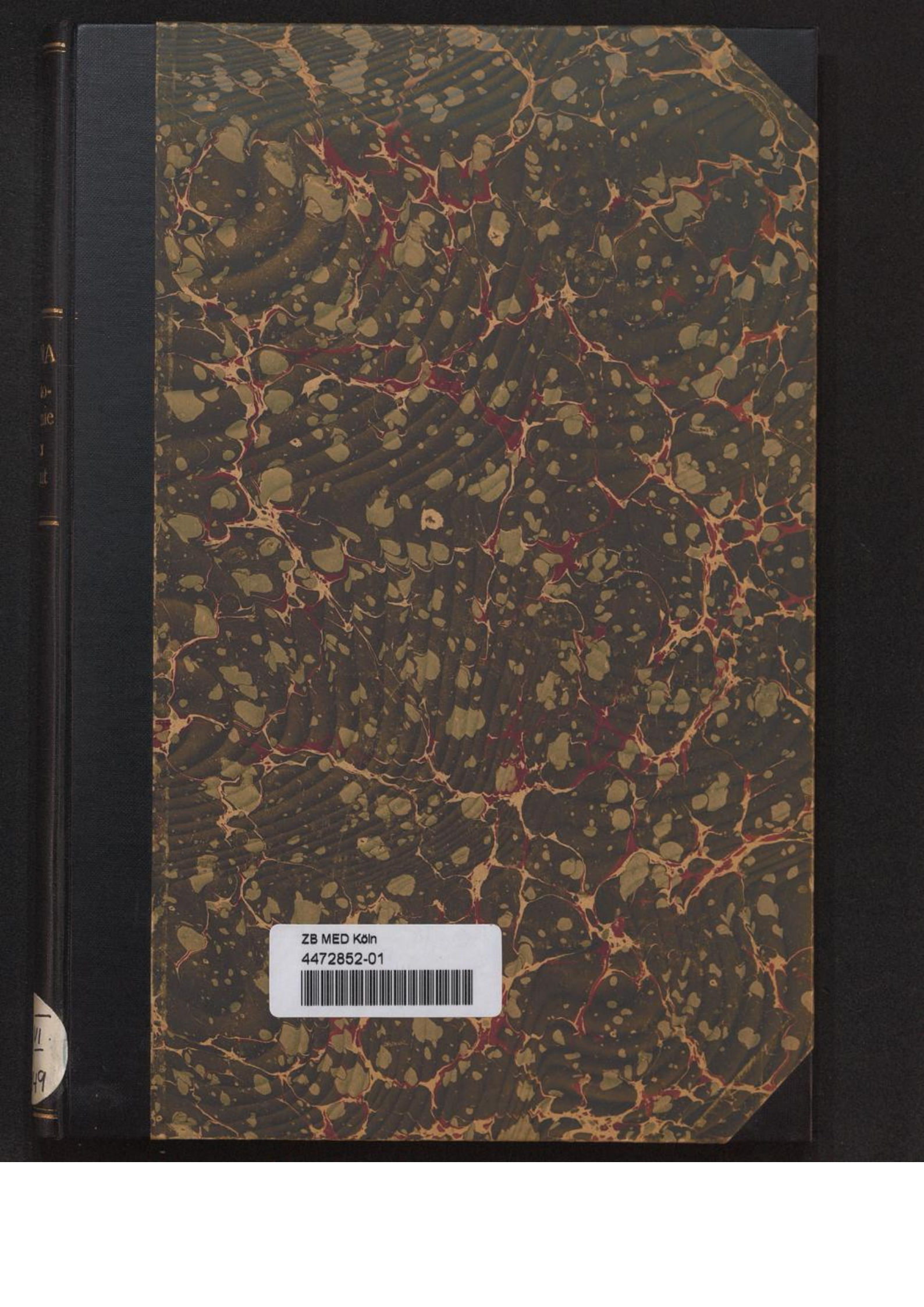
Leipzig [u.a.], 1928

ZB MED - Informationszentrum Lebenswissenschaften

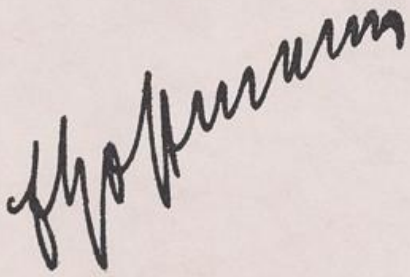
Shelf Mark: Ui VI 1849

urn:nbn:de:hbz:38m:1-125247

Visual Library


ZB MED Köln
4472852-01

AUS DER BIBLIOTHEK
ERICH HOFFMANN



1978

HISTOCHEMIE DER HAUT

VON

Ihrem dankbar ergebenen
Freunde PROF. P. G. UNNA Unna

HAMBURG

MIT 69 FARBIGEN ABBILDUNGEN IM TEXT
UND EINEM TINKTORIELL-CHEMISCHEN ZELLENSCHEMA

LEIPZIG UND WIEN
FRANZ DEUTICKE
1928

Verlags-Nr. 3159

Ambrožič, Dr. M., und Rach, Dr. E., Grundriß der Diätverordnungslehre nach dem Pirquetschen System in der Paediatrie. Mit 7 Abbildungen und 6 Tafeln. 1921. — Preis M 2,40.

Barrenscheen, Doz. Dr. H. K., und Willheim, Prof. Dr. R., Laboratoriumsmethoden an den Wiener Kliniken. — Im Druck.

Bartel, Prof. Dr. Julius, Sektionstechnik für Hörer der Medizin. 1919. — Preis M —,80.

Bechterew, Prof. W., Allgemeine Grundlagen der Reflexologie des Menschen. Leitfaden für das objektive Studium der Persönlichkeit. Mit 10 Abbildungen im Text und 19 Figuren auf Tafeln. Mit einem Vorwort von Prof. Ad. Czerny, Berlin. Nach der dritten Auflage herausgegeben von Prof. Martin Pappenheim, Wien. 1926. — Preis geh. M 26,—, geb. M 29,—.

Czerny, Prof. Dr. Ad., und Keller, Prof. Dr. A., Des Kindes Ernährung, Ernährungsstörungen und Ernährungstherapie. Ein Handbuch für Ärzte. Zweite, vollkommen umgearbeitete Auflage. I. Band komplett. 1925. Preis M 39,50, geb. M 42,—; II. Band 1. Teil. 1925. Preis M 18,—, 2. Teil im Drucke.

Czerny, Prof. Dr. Ad., Der Arzt als Erzieher des Kindes. Siebente Auflage. 1926. — Preis kart. M 3,20, geb. M 4,—.

Dattner, Dr. B., und Kauders, Dr. O., Kurzer Leitfaden der Malariatherapie auf Grund klinischer Beobachtungen und experimenteller Studien. Zweite, umgearbeitete Auflage. 1927. — Preis geh. M 2,40, geb. M 4,—.

Dimmer, Prof. Dr. F., Der Augenspiegel und die ophthalmoskopische Diagnostik. Dritte, vollständig umgearbeitete und vermehrte Auflage. Mit 146 Abbildungen im Text und 16 Tafeln. 1921. — Preis geh. M 12,60, geb. M 15,20.

Dimmer, Prof. Dr. F., und Pillat, Dr. A., Atlas photographischer Bilder des menschlichen Augenhintergrundes. 325 Abbildungen auf 84 Tafeln in Lichtdruck nach Photographien des lebenden Auges. 1927. — Preis geb. M 60,—.

Dost, Reg.-Med.-Rat, Dr., Physik und Chemie in der Krankenpflege. 1923. — Preis M —,40.

Elschnig, Prof. Dr. Anton, Die Funktionsprüfung des Auges. Für Studierende und Ärzte. Mit 68 Figuren im Text. Dritte, umgearbeitete Auflage. 1923. — Preis geh. M 6,60, geb. M 8,40.

Finger, Prof. Dr. Ernst, Die Blennorrhöe der Sexualorgane und ihre Komplikationen. Sechste Auflage. Mit 36 Abbildungen und 10 lithographierten Tafeln. 1905. — Preis M 10,—.

— **Lehrbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten** für Studierende und praktische Ärzte. II. Teil: Die Geschlechtskrankheiten. Siebente Auflage. Mit 8 lithographierten Tafeln. 1913. — Preis M 8,—.

Fritsch, Dr. H., Röntgentherapeutische Merkblätter für den praktischen Arzt. 1925. — Preis M —,80.

Fröschels, Doz. Dr. Emil, Lehrbuch der Sprachheilkunde (Logopädie) für Ärzte, Pädagogen und Studierende. Mit 104 Figuren und 5 Tafeln. Zweite Auflage. 1925. — Preis geh. M 32,—, geb. M 34,50.

— **Das Stottern. (Assoziative Aphasie.)** Mit 12 Figuren im Text. 1925. — Preis M 5,—.

— **Singen und Sprechen.** Ihre Anatomie, Physiologie, Pathologie und Hygiene. Mit 24 Figuren. 1920. — Preis M 4,20.

— **Psychologie der Sprache.** 1925. — Preis M 6,60.

Fuchs, Doz. Dr. Adalbert, Atlas der Histopathologie des Auges. I. Teil. Mit 191 Abbildungen auf 44 kolorierten Tafeln. 1923. — Preis in Leinwand geb. 10 Dollar. — II. Teil. Mit 108 Abbildungen auf 32 kolorierten Tafeln. 1927. — Preis in Leinwand geb. M 48,—.

— **Atlas of the Histopathology of the Eye.** I. Part. With 191 illustrations contained in 44 coloured plates. 1924. — Preis in Leinwand geb. 10 Dollar. — II. Part. With 108 illustrations contained in 32 coloured plates. 1927. — Preis in Leinwand geb. M 48,—.

HISTOCHEMIE DER HAUT

VON

PROF. P. G. UNNA
HAMBURG

MIT 69 FARBIGEN ABBILDUNGEN IM TEXT
UND EINEM TINKTORIELL-CHEMISCHEN ZELLENSCHEMA

LEIPZIG UND WIEN
FRANZ DEUTICKE
1928

M 2
M i VI
1849

Alle Rechte, besonders das der Übersetzung in fremde Sprachen, vorbehalten.

Copyright by Franz Deuticke, Leipzig und Wien.

Verlags-Nr. 3139.

Zentral-
bibliothek
der
Medizin
Köln

38 M

Druck von Rudolf M. Rohrer in Brünn.

Inhalt.

Seite

Einleitung 1

A. Darstellung der sauren Zelleiweiße durch basische Färbungen 5

I. Farbenindex des Granoplasmas: Blaues Polychrom 5

Tabelle: Methylenblau 6

Tabelle: Thiazine 7

Vergleichstabelle: Zytose, Globulin, Nukleoproteide 11

II. Farbenindex der Nukleoproteide: Methylgrün 11

III Farbenindex des ganzen Zelleibes: Methylgrün + Pyronin 13

Vergleichstabelle der Chromolyse von Zytose und Globulin 16

Bilder 1 und 2 17

Bilder 3 und 4 18

B. Darstellung der basischen Zelleiweiße durch saure Färbungen. — Farbenindex: Bordo — Hämatein + Alaun-Färbung 18

I. Die basischen Kerneiweiße 18

Tabelle: Bordo 19

Bilder 5 und 6 20

1. Darstellung des Mesoplastins der Kerne 22

Bilder 7 und 8 22

2. Darstellung des Plastins der Kerne 23

3. Darstellung des Mesoplastins und des Plastins der Kernkörperchen 23

Tabelle: Kernkörperchen — Eiweiße 24

II. Das basische Eiweiß im Zelleibe, das Spongioplasma 25

1. Darstellung des Spongioplasmas 25

Farbenindex: Bordo — Hämatein + Alaun 25

a) Talgdrüsenzellen 26

Bild 9 26

b) Schaumzellen 27

Bild 10 27

2. Epithelfaserfärbung 29

Farbenindex: Wasserblau + Orzein + Eosin — Safranin 29

Bilder 11—13 . . . . . 29, 30

Bild 14 31

Bilder 15 und 16 32

C. Die Stockwerktheorie 34

Die drei Stockwerke der Zelleiweiße 36

Tinktoriell-chemisches Zellenschema (Stockwerkschema) 37

Stockwerkbau der Kernmembranen 38

Seite

D. Darstellung der Sauerstofforte und Reduktionsorte 39
I. Reduktionsorte 39
1. Farbenindex: Kalipermanganat 39
Bilder 17 und 18 41
Bilder 19—21 . . . . . 42, 43
Mangan—Methylgrün-Methode 43
Bild 22 45
Bild 23 46
Bild 24 46
Bild 25 47
Bilder 26 und 27 . . . . . 48, 49
Bilder 28 und 29 50
2. Farbenindex: Eisen-Zyan-Mischung 51
3. Farbenindex: Tetranitrochrysophansäure 51
Nebenprodukte der Verhornung 53
1. Keratohyalin 53
Bilder 30, 31 und 32 . . . 54, 55
Bilder 33 und 34 . . . . . 56, 57
a) Die Mesoplastinfärbung des Keratohyalins 60
Farbenindex: Hämatein + Alaun — Kalipermanganat . 60
b) Die Globulin- und Zytose-Färbung des Keratohyalins 60
Farbenindex: Methylgrün + Pyronin 60
2. Eleidin 61
Farbenindex: a) Karmin 61
Farbenindex: b) Pikrokarmin 61
Farbenindex: c) Pikronigrosin 61, 62
Bilder 35—37 . . . . . 61, 62, 63
Farbenindex: d) Pikronigrosin nach Salzsäurebehandlung . . 63
Bild 39 65
Farbenindex: e) Flemmings Lösung — Nigrosin 63
Bild 38 63
3. Das Trichohyalin der Wurzelscheide 66
Farbenindex: a) Pikrobordofärbung für Trichohyalin 69
Bilder 40a und 40b 70
Farbenindex: b) Bordo — Hämatein-Färbung 69
Bild 41 71
Farbenindex: c) Methylgrün — Bordo-Färbung 70
Bild 42 72
Farbenindex: d) Methylviolett — Bordo-Färbung 71
Bild 43 73
Farbenindex: e) Nilblau — Bordo-Färbung 72
Bilder 44 und 45 . . . . . 73, 74
Farbenindex: f) Neutralviolettfärbung 75
Bilder 46 und 47 75
Farbenindex: g) Neutralrot — Nilblau-Färbung 75
Tabelle: Neutralrot — Nilblau 75
Bild 48 76
Farbenindex: h) Safranin nach Pepsin + HCl 77
Bilder 49 und 50 . . . . . 77, 78
Farbenindex: i) Safranin nach Trypsin + Soda 78
Bild 51 78

Seite

II. Sauerstofforte 79
Farbenindex: Rongalitweiß (RW.) 79
Bild 52 81
Bilder 53—55 . . . . . 82, 83
Bild 56 84
Bild 57a und 57b 85
RW. — Safranin-Färbung 88
Bilder 58 und 59 . . . . . 86, 87
Tabelle: Säureorte und Sauerstofforte des Gewebes 89

E. Darstellung der Sauerstoffermente 91

I. Katalase. — Farbenindex fehlt 91
Tabelle: Katalase 93

II. Peroxydase 94
Tabelle: Peroxydase 94
Farbenindex: Benzidin + H_2O_2 94
Bild 60 96

F. Eine zweite Darstellung der Sauerstoff- und Reduktionsorte 98
Farbenindex: Neutralviolett (NV.) 98
Bilder 61 und 62 102
Tabelle: Azinfarbstoffe 100
Vergleichstabelle: Kalipermanganat, NV. und RW. 101
Schema: Verwandtschaftskreis des Neutralvioletts zu den sauren Eiweißen 103
Schematische Bilder der sauren und basischen Eiweiße 104

G. Saure Kerne 106
Tabellen: Normale und saure Kerne 108–111
Farbenindex: a) Hämatein — Safranin — Tannin 108
Bild 63 107
Farbenindex: b) Wep 109
Farbenindex: c) Eosin — Methylgrün + Pyronin 110, 111

H. Die Hautfette 112

I. Das Hornschichtfett. — Cholesterinfette 112

II. Das Eigenfett der Hornschicht. Glykogen und Ölsäure 113
Farbenindex: Osmiumsäure 114
Bild 64 114
Farbenindex: Viktoriablau — Karmin 115
Bild 65 115
Farbenindex: Karmin, Karmin — Nigrosin 116
Bild 66a und 66b 116

III. Talgdrüsenfett und Knäueldrüsenfett 117

IV. Fett der Vernix caseosa 118

I. Plasmazellen 119
Farbenindex: Methylgrün+Pyronin+Karbol-Färbung (Pappenheim-Unna-Färbung) 119

Seite

K. Mastzellen 124

Farbenindex: Blaues Polychrom + Alaun 124

Tabelle: Thiazinrot 125

Tabelle: Mastkörner 128

Vergleichstabelle: Mastkörner und Granoplasma 132

L. Kollagen 133

Farbenindizes:

I. Sulfosaure Salze der Rosanilinfarbstoffe 135

a) Blaues Polychrom — Säurefuchsin + Tannin-Methode 137

b) Safranin — Wasserblau + Tannin-Methode 137

II. Sulfosaure Azofarbstoffe 138

III. Sulfosaure Induline und Nigrosine 138

IV. Sulfosaures Indigoblau (Indigokarmin) 138

V. Orceïn 139

a) Orceïn — blaues Polychrom — Glyzerinäther-Methode 140

b) Blaues Polychrom — Ozeïn-Methode 140

M. 140

I. Elastin 140

Vergleichstabelle: Kollagen und Elastin 142

a) Elastinfärbung nach Weigert 143

Tabelle: Affinität 144

b) Elastinfärbung nach Taenzer-Unna 145

II. Elazin 146

Farbenindex: a) Blaues Polychrom — Tannin 147

Farbenindex: b) Blaues Polychrom — Tannin + Orange 147

Farbenindex: c) Orceïn — Salzsäure — Blaues Polychrom — Tannin . . 148

Bilder 67—69 . . . . . 147, 148

Formeln 149

Sachverzeichnis 157

Namenverzeichnis 162

Einleitung.

An das chemische Studium der einzelnen Zellbestandteile ist man bisher noch wenig herangetreten. Nur die Chemie der Kerne hat, da diese leicht zu isolieren sind, bereits bedeutende Fortschritte gemacht, aber auch nur, soweit die Nukleoproteide derselben in Betracht kommen; die übrigen Eiweiße des Kernes sind auch noch sehr wenig studiert worden. Die Nukleoproteide verdanken diesen Vorzug allein der in ihnen enthaltenen Nukleinsäure und deren leichter Färbbarkeit mit basischen Farben, wodurch ihre Lage innerhalb des Kernes genau präzisiert werden kann. Das Kernkörperchen, das neben wenig Nukleoproteiden noch mehrere andere Eiweiße enthält, ist auf seine chemische Struktur hin bisher nur wenig bearbeitet worden. Ebenso steht es um die chemische Kenntnis des Zellprotoplasmas. Man hat sich damit begnügt, es als diffus, und zwar mit sauren Farben diffus färbbare Substanz den mit basischen Farben färbbaren Nukleoproteiden gegenüberzustellen und hiernach ganz allgemein die Farben in kernfärbende und diffus- oder plasmafärbende einzuteilen. Man übersah dabei, daß auch ein sehr wichtiger Teil des Protoplasmas, das Granoplasma, mit basischen Farben färbbar ist und daß andererseits auch im Kerne noch zwei andere Eiweiße vorhanden sind, die, basischer Natur, zu ihrer Färbung saurer Farben bedürfen. Die Einteilung der Farben in kernfärbende und plasmafärbende muß daher in Zukunft ganz aufgegeben werden. Sie hat nur in die Irre geführt und der genaueren Erforschung der Zellchemie lange hindernd im Wege gestanden. Wir sind jetzt soweit, daß wir die zur Charakteristik der Zellbestandteile notwendigen Farben nach den verschiedenen Eiweißen, zu denen sie eine chemische Verwandtschaft besitzen, einteilen können, und diese Einteilung ist natürlich eine rein chemische. So ist beispielsweise in der Pappenheim-Unna-Färbung Methylgrün der Nukleoproteidfärber, Pyronin der Zytose- und Globulinfärber, in der Bordo-Hämatein-Färbung Bordo der Plastin-, Hämatein der Mesoplastinfärber.

Den ersten wichtigen Schritt auf dem Wege der Zellchemie verdanken wir Paul Ehrlich, der uns lehrte, daß die Eiweiße teils saurer, teils basischer Natur sind und daß erstere sich mit basischen, letztere mit sauren Farben färben lassen. Auf diesem Wege war die Möglichkeit gegeben, einen Eiweißbestandteil der Zelle nach dem anderen zunächst tinktoriell zu charakterisieren und damit seine Lage und sein Verhältnis zur Umgebung festzulegen.

Für die Erkenntnis seiner chemischen Beschaffenheit war damit allerdings noch wenig gewonnen. Um diese zu erkennen, mußte ein exakter Weg gefunden werden, der der gewöhnlichen chemischen Analyse angepaßt war, und das konnte nur der einer systematischen Folge von Lösungsversuchen sein. Lö-

sungen einzelner Zellbestandteile waren schon vielfach versucht worden und hatten auch schon einzelne Ergebnisse gezeitigt. Die Genauigkeit solcher Versuche war aber früher dadurch beeinträchtigt, daß sie nicht mit geeigneten Färbungen kombiniert wurden, deren vollkommenes Versagen erst die vollkommene Lösung des fraglichen Eiweißes anzeigt. Dieser Weg, zu einer exakten Methode ausgebaut, war der zweite große Fortschritt auf dem Gebiete der Zellchemie; es ist die Methode der Chromolyse[1]).

Dieselbe besteht in einer systematischen Folge von Lösungsversuchen an einem durch spezifische Färbungen gut charakterisierbaren Zellelement. Ohne eine solche Chromolyse wird man schwerlich in die Chemie der einzelnen Zellbestandteile eindringen können.

Aber schon ehe dieser Weg mit Erfolg beschritten wurde, hatte es sich gezeigt, daß die Ehrlichsche Einteilung nicht ausreichte und daß mit der bloßen Scheidung in saure und basische Eiweiße die Fülle und Verschiedenheit der natürlich vorkommenden Zelleiweiße nicht erschöpft sei. Es war die Anwendung einiger an der äußeren Haut zuerst makroskopisch erprobten Sauerstoffreagenzien auf Gefrierschnitte der Haut, welche zeigte, daß der Sauerstoff, dieses biologisch stets vorhandene und doch bis dahin sehr vernachlässigte Zellelement, von den einzelnen Bestandteilen der Zelle in sehr verschiedener Weise aufgenommen, festgehalten und verbraucht wird. Mit der Verfolgung dieser Reaktionen wuchs mit einem Male die Untersuchung über die Histochemie der toten Haut hinaus zu einer Histochemie der lebenden, und wir hatten nun nicht mehr bloß nach der Säure und Basizität des einzelnen Zellelementes zu fragen, sondern auch nach seinem Verhältnis zum Sauerstoff. Dieses war der dritte große Fortschritt, den die Zellchemie neuerdings erfuhr. Es ist die neue, umwälzende Lehre von den Sauerstofforten und Reduktionsorten des Gewebes.

Die Entdeckung der Sauerstofforte, die natürlich an überlebendem, unfixiertem Gewebe gemacht wurde, und ihre konsequente Verfolgung an Gefrierschnitten zeigte nun aber außerdem, daß das alte Dogma, der Färbung müsse eine Fixation des Gewebes vorhergehen, unhaltbar geworden war. Gerade die bisher stets gesuchte und so oft als unmöglich hingestellte Lebendfärbung des nicht fixierten Gewebes wurde nicht nur Tatsache, sondern die tägliche Erfahrung wies auch den einfachen Weg, um bei jedem beliebigen Gewebe die „Lebendfärbung" mit der bisher geübten „Totfärbung" zu vergleichen und aus der Verschiedenheit der beiden gefärbten Bilder Schlüsse auf die charakteristischen und wesentlichen Faktoren des Lebensvorganges zu ziehen. Es bedarf dazu nur der Färbung eines Gefrierschnittes und seines Vergleiches mit einem Schnitt desselben Gewebes, der vorher durch Alkohol in Zelloidin oder Paraffin gebracht und dadurch abgetötet worden ist. Dieser wird dann mit einem solchen Färbemittel (Rongalitweiß oder Neutralviolett) gefärbt, das nur am lebenden Material bestimmte Farbenunterschiede erzeugt. Das Ausbleiben dieser Färbung beweist dann die vorhergegangene Abtötung des Gewebes.

---

[1]) P. G. Unna, Chromolyse. Sauerstofforte und Reduktionsorte. Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden (Abderhalden), Abt. V, Teil 2, Heft 1. Urban & Schwarzenberg, Berlin und Wien 1921.

War aber die Fixierung durch Eiweiß fällende Mittel (Formalin, Metallsalze) auch gar nicht nötig, so entfiel damit der wichtigste Einwand, der bisher für die chemische Erforschung der Zelleiweiße berechtigterweise gegen diese gemacht war, daß nämlich unsere gefärbten Zellbilder der lebenden Zelle überhaupt nicht mehr entsprächen, daß ganz andere chemische Verbindungen an ihre Stelle getreten seien. Mit dem Fortfall der Fixationsprozeduren, dem vierten großen Fortschritt, und ihrem Ersatz durch bloßes Gefrieren, wurde die chemische Erforschung der Zelle plötzlich auf ganz einfache und chemisch durchsichtige Maßnahmen reduziert. Es handelte sich jetzt nur noch darum, das vereiste, unfixierte Material mit einem spezifischen Farbenindex zu versehen, um zu erkennen, ob einige und welche der angewandten Lösungsmittel die spezifisch färbbaren Zellteile aufzulösen imstande sind, was zu sicheren Schlüssen auf ihre chemische Natur berechtigt.

Unser Studium jedes einzelnen Zellelementes zerfällt demnach in zwei Teile. Wir haben uns zuerst mit der Färbung desselben in lebendem und totem Zustande zu beschäftigen, sodann mit der Lösung seiner färbbaren Teile.

Über das Wesen der Färbung ist viel gestritten worden und der Vorgang der Färbung ist von manchen Seiten als ein sehr komplizierter hingestellt, viel zu kompliziert. Die Sache ist doch sehr einfach, wenn man sich die Deutung der Färbung nicht durch Fixationen unnötig erschwert.

Alle Färbungen sind in ihrem Anfange rein physikalische Vorgänge, bei denen der in Lösung befindliche Farbkörper in die gröberen und feineren Poren des Gewebes eindringt und sich hier nach physikalischen Gesetzen (Kapillarität, Oberflächenanziehung) verteilt und anhäuft. Diese rasch, in wenigen Minuten, erreichte erste Phase jeder Färbung hat noch kein chemisches Interesse und läßt noch keine chemischen Schlüsse zu. Wäscht man innerhalb derselben das Substrat mit dem für die Farbe gebrauchten Lösungsmittel gut aus, so verschwindet die Farbe nahezu vollständig. Doch gewöhnlich nicht ganz, da schon während dieses ersten Stadiums Substrat und Farbe sich so nahe gekommen sind, daß chemische Verwandtschaften ins Spiel treten und nun erst die zweite Phase, die eigentliche Färbung, ein rein chemischer Vorgang, beginnt.

Diese bedarf einer längeren Zeit, unter Umständen sogar 24—48—72 Stunden, da sie in der fortgesetzten Auslese besteht, welche die einzelnen Strukturelemente auf die in Lösung befindlichen Farbmoleküle ausüben. Die chemisch verschiedenen Strukturelemente überwinden dabei das dem Färbeakt entgegenarbeitende Lösungsbestreben des flüssigen Mediums, in dem die Farbe gelöst war. Je schwächer die Konzentration der Farblösung, desto länger dauert daher der Färbeprozeß, desto feiner ist aber oft die Farbenauslese und desto fester die endgültige chemische Verbindung. Die Farbe läßt sich nun mit demselben Lösungsmittel, gewöhnlich Wasser, nicht mehr auswaschen, wohl aber mit anderen stärkeren Lösungsmitteln, z. B. Alkohol, Säuren usw., die in diesem dritten Stadium der Färbung, dem der Entfärbung, die zuerst getroffene chemische Auslese modifizieren können und meistens auf eine engere Auswahl beschränken.

Das so entstandene fertige Präparat ist ein neues chemisches Individuum, in dem bestimmte Affinitäten einzelner Strukturelemente sich mit wahlverwandten Affinitäten der Farblösung ausgeglichen, neutralisiert, also chemisch verbunden haben.

A. Darstellung der sauren Zelleiweiße durch basische Färbungen.

Die heutige Kenntnis der Histochemie des Protoplasmas beruht auf der erfolgreichen Färbung desselben mit basischen Farben, nachdem die frühere Darstellung mit sauren Farben (Eosin, Pikrokarmin, van Gieson) sich in dieser Beziehung unfruchtbar erwiesen hatte. Die darin wirksamen sauren Farben (Eosin, Pikrinsäure) färben nämlich nur einen Teil des Protoplasmas, seine Grundlage, das Spongioplasma, einen Eiweißkörper von noch unbekannter Zusammensetzung und basischer Reaktion. Derselbe ist allen tierischen Zellen eigen und von sehr einheitlichem Charakter. Der zweite, vielgestaltigere Anteil des Protoplasmas ist im Gegensatze dazu ein saurer Eiweißkörper, in fast allen Zellen in verschiedener Menge und charakteristischer Anordnung vorhanden und bereits nach seinen chemischen Eigenschaften so gut bekannt, daß er einer bestimmten Eiweißgruppe zugeordnet werden konnte. Ich habe ihn das Granoplasma genannt; zusammen mit dem Spongioplasma bildet er das tierische Protoplasma.

I. Farbenindex des Granoplasmas: Blaues Polychrom.

Die Entdeckung des Granoplasmas (1891)[1]) verdanken wir der Anwendung der „polychromen Methylenblaulösung", einer Farblösung, welche aus dem Methylenblau durch Kochen mit Kalikarbonat entstand und dessen Polychromie durch die Anwesenheit von Methylenviolett und basischem Thiazinrot[2]) bedingt war. Diese äußerst stark basische Farblösung wurde allmählich das Hauptfärbemittel aller sauren Eiweiße. Ihr verdanken wir auch die Entdeckung der an dem sauren Granoplasma reichen Plasmazellen. Es zeigte sich übrigens bald, daß das dem Methylenblau nahverwandte Toluidinblau jenes mit Vorteil teilweise zu ersetzen imstande war, so daß die Mischung beider Farben noch farbkräftigere Bilder lieferte. Wir benutzen daher jetzt eine alkalische Farbmischung, die durch Kochen beider Farbstoffe zugleich mit Pottasche hergestellt wird, unter dem Namen „Blaues Polychrom".

Man löst von beiden Farbstoffen 0·5 *g* in wenig 75%igem Alkohol auf, gießt beide Lösungen zusammen in 100 cm^3 einer 1%igen Pottaschelösung und kocht diese Mischung unter beständigem Rühren 2 Minuten lang. Nach dem Erkalten wird die Mischung filtriert.

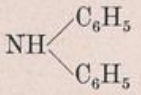
---

[1]) P. G. Unna, Über Plasmazellen, insbesondere beim Lupus. Monatshefte für praktische Dermatologie, 1891, Bd. 12, S. 296.

[2]) P. G. Unna und Baudisch, Thiazinrot. Dermatologische Wochenschrift, 1919, Bd. 68, S. 49.

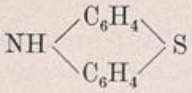
Das Methylenblau selbst baut sich auf auf einer basischen Gruppe, die aus zwei Phenolen mit einem sie zusammenhaltenden Amin (NH) besteht, dem

Diphenylamin



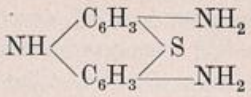
Wird diese offene Kette durch ein Schwefelatom geschlossen, so entsteht das

Thiodiphenylamin



das Chromophor der Thiazine, einer für uns sehr wichtigen Farbgruppe. Zu einem richtigen Farbstoff wird das Thiodiphenylamin erst durch Aufnahme zweier basischen Seitenketten von NH_2. Es entsteht dann eine Vorstufe des Methylenblaus: die Base des

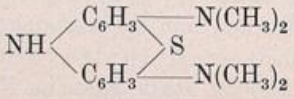
Thionins



eines der ältesten synthetischen Farbstoffe (Lauthsches Violett).

Indem nun hier in den Seitenketten 4 Wasserstoffatome noch durch 4 Methylgruppen (CH_3) ersetzt werden, entsteht die Base des Leukomethylenblaus, d. h. des noch reduzierten Methylenblaus, oder des

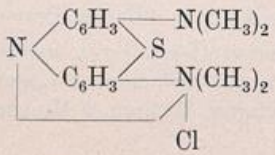
Methylenweiß:



$(+ HCl, \div H_2)$

Erst wenn dieses mit HCl zum Farbsalze ergänzt und durch Entziehung von 2 H-Atomen oxydiert wird, entsteht das bekannte blaue Salz des Tetramethylthionins oder

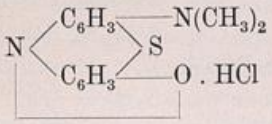
Methylenblaus:



Dabei tritt die Salzsäure (HCl) an eine der beiden basischen Seitenketten und verliert dabei ein Wasserstoffatom, welches frei wird. Das zweite, für die Umwandlung des Methylenweiß in Methylenblau notwendige Wasserstoffatom wird von der NH-Gruppe des Methylenweiß abgegeben.

Die blaue Farbe des Methylenblaus entsteht also nicht etwa durch Hinzufügung von Sauerstoff zu dem farblosen reduzierten Methylenweiß, sondern stets dadurch, daß diesem sogenannten Leukokörper Wasserstoff entzogen wird. Dasselbe Prinzip gilt nicht nur für den Versuch im Reagierglas, sondern auch für die Färbung im Gewebe. Die „Sauerstofforte" des Gewebes sind es, die dem Methylenweiß bei der Rongalitweißfärbung Wasserstoff entziehen. Dabei färben sie sich blau mit dem dann sofort entstehenden Methylenblau.

Eine wirkliche Addition von Sauerstoff zum Methylenblau dagegen findet in alten Methylenblaulösungen unter dem Einfluß des Alkalis des Glases und des Luftsauerstoffes statt, wobei eine ganze methylierte Stickstoffgruppe, die Seitenkette: $N(CH_3)_2$, abgestoßen und durch ein Sauerstoffatom ersetzt wird. Der hierdurch entstehende Körper



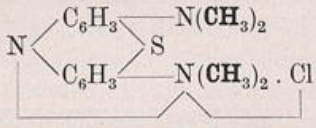
heißt Methylenviolett und hat wegen seines O-Gehaltes weniger Affinität zum sauerstoffhaltigen Granoplasma als zu dessen Muttersubstanz, dem stark reduzierenden Spongioplasma. Da er aber im blauen Polychrom auch stets vorhanden ist und das Spongioplasma gleichzeitig violett anfärbt, während das Methylenblau vom Granoplasma gespeichert wird, so resultiert bei der Färbung mit blauem Polychrom eine sehr vollständige, dunkel blauviolette Färbung des Gesamtprotoplasmas.

Das Toluidinblau ist um eine Methylgruppe ärmer als das Methylenblau; es ist ein Trimethylthionin, gehört also auch wie jenes in die Thiazingruppe.

Thiazine.

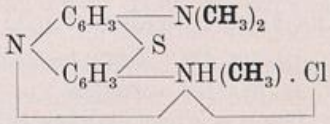
Tetramethylthionin

Methylenblau:



Trimethylthionin

Toluidinblau:



Durch den Verlust einer Methylgruppe ist das Toluidinblau farbstärker geworden als das Methylenblau[1]).

Die Färbung der Schnitte (Gefrierschnitte) mit blauem Polychrom gibt außer der Protoplasmafärbung auch eine Gesamtdarstellung sowohl der Nukleoproteide wie aller anderen sauren Eiweißkörper. Sie färbt vermöge ihrer starken Basizität alle sauren Bestandteile des Gewebes so intensiv, daß beim Versagen dieser Färbung nach Vorbehandlung der Schnitte mit Lösungsmitteln mit Sicherheit auf den völligen Schwund der betreffenden sauren Zellbestandteile

[1]) Es ist eine häufig wiederkehrende Erscheinung, daß eine Substanz an chemischer Wirkung gewinnt, wenn sie eine CH_3-Gruppe verliert; so ist Cignolin therapeutisch wirksamer als Chrysarobin, ein Pararosanilin jodfester als ein Rosanilin.

geschlossen werden kann. Man vermag sogar die Stärke der Säure dieser letzteren nach der Tiefe der Blaufärbung abzuschätzen. Wir brauchen es daher als Farbenindex bei der Erforschung der sauren Zelleiweiße und benutzen zu diesem Zwecke als Zellmaterial die großen Epithelzellen des spitzen Kondyloms oder eines anderen Akanthoms.

Die besonders starke Färbung der Zellen durch das blaue Polychrom erfordert eine gute, nachträgliche Entfärbung des umgebenden Gewebes, speziell des Kollagens. Eine solche leistet die einfache Alkoholentfärbung nicht. Dagegen erhalten wir eine vollständige Entfärbung des Kollagens durch Glyzerinäther, welcher sich seit 1891[1]) für diesen Zweck am besten bewährt hat.

Derselbe kommt im Handel vor unter dem Namen: Glyzerinäthermischung.

Der Glyzerinäther ($C_6H_{10}O_3$), ein Anhydrid des Glyzerins, ist eine stechend riechende, gelbliche Flüssigkeit von folgender Formel:

$$2\,C_3H_8O_3 - 3\,H_2O = \begin{matrix} C_3H_5\text{——}O \\ \\ C_3H_5\text{——}O \end{matrix}\!\!>\!O = C_6H_{10}O_3$$

Glyzerin Wasser Glyzerinäther

Der Äther des Glyzerins wird durch trockene Destillation von 50 cm^3 reinen Glyzerins mit 10·0 Kalziumchlorid (siccum) in einem Destillierkolben dargestellt. Man sammelt sämtliche von 100—220° übergehende Fraktionen, deren Mischung eine trübe, braune Flüssigkeit ergibt. Diese wird mit Tierkohle vermischt und nochmals destilliert. Nun resultiert bereits bei zirka 100° eine hellgelbliche klare Flüssigkeit von dem bekannten stechenden Geruch des Glyzerinäthers. Ein ganz geringer Zusatz von Alkohol absolutus bringt die letzte Trübung des Glyzerinäthers zum Verschwinden. Dieser muß bei der Anwendung (zur Entfärbung) noch auf das Fünf- bis Zehnfache mit Wasser verdünnt werden.

Während der reine Glyzerinäther sich mit ätherischen Ölen und sogar mit Balsam direkt mischt, läßt sich natürlich dieses wässerige Glyzerinätherpräparat[2]) nicht mit den aufhellenden Ölen mischen; es ist aber trotzdem beim praktischen Arbeiten dem Gebrauch des reinen und allzu stark wirkenden Glyzerinäthers, abgesehen von seiner größeren Billigkeit, vorzuziehen.

Die Formel für diese Kollagenentfärbung lautet:

1. Blaues Polychrom 1—2 Minuten.
2. In Wasser abspülen.
3. Glyzerinäthermischung, mit Wasser auf das Fünf- bis Zehnfache verdünnt, ½—2 Minuten.
4. Besonders gute Ausspülung in Wasser 2—5 Minuten.
5. Alkohol absolutus, Bergamottöl, Balsam.

Man hat dafür zu sorgen, daß nach der Entfärbung jeder Rest des Glyzerinäthers durch längere Spülung mit Wasser aus dem Gewebe entfernt wird, weil sonst noch im fertigen, in Balsam liegenden Präparate nachträglich die Granoplasmafärbung leidet.

Fehler werden am meisten in der Richtung gemacht, daß nach Analogie mit anderen Entfärbern (Alkohol, saurem Alkohol) die Behandlung mit Glyzerin-

[1]) P. G. Unna, Glyzerinäther. Enzyklopädie mikr. Technik, 1910.
[2]) Bei Dr. Hollborn, Leipzig, vorrätig.

äther zu lange ausgedehnt oder der Glyzerinäther zu konzentriert gebraucht wird. Er soll die Entfärbung eben nur in die richtige Bahn leiten, d. h. das Methylenblau vom Kollagen durch Quellung desselben lockern, den Schluß der Entfärbung aber dem absoluten Alkohol überlassen. Bei zarten Gebilden, dünnen Schnitten tut man daher gut, die Glyzerinäthermischung auf das Zehnfache zu verdünnen und ½ bis höchstens 1 Minute wirken zu lassen. Oft genügt ein bloßes Eintauchen in dieselbe, um die weitere Entfärbung bis zur völligen Farbenfreiheit des Kollagens im Alkohol zu erreichen.

Das Prinzip der Entfärbung des Kollagens durch Glyzerinäther beruht auf dem Sauerstoffreichtum des Glyzerinäthers. Ein solcher hat, wie immer, die Folge, daß das Kollagen quillt, womit die Ablösung der basischen Farbe eingeleitet wird. Denn die Färbung des Kollagens mit basischen Farben ist um so stärker, je trockener[1]), und um so schwächer, je wasserhaltiger es ist. Man könnte die Quellung zur Einleitung der Entfärbung auch mit Wasserstoffsuperoxyd erreichen. Diese Quellung durch sauerstoffreiche Mittel ist besser als die Quellung des Kollagens durch Säuren (z. B. HCl), da der Sauerstoff das sauerstoffreiche Granoplasma schont, während HCl das basisch gefärbte Granoplasma stark angreift. Ebenso wie die Quellung des Kollagens beruht auch die Schonung des sauerstoffreichen Granoplasmas bei dieser Methode auf dem hohen Sauerstoffgehalt des Glyzerinäthers.

Man vergleiche in dieser Beziehung die Formel des ebenfalls farblösenden Glyzerins $(C_3H_5\begin{matrix}OH\\—OH\\OH\end{matrix})$ mit der des Glyzerinäthers $\begin{pmatrix}C_3H_5—O\\ \\C_3H_5—O\end{pmatrix}O)$.

Indem wir nun die mit dem blauen Polychrom zu behandelnden Schnitte vor der Färbung in verschiedene Lösungsmittel bringen, zeigt die nachträgliche Färbung mit blauem Polychrom an, welche sauren Eiweiße aus dem Bilde herausgelöst und verschwunden sind, und wir lernen dadurch eine charakteristische Eigenschaft der betreffenden Substanz kennen. Hierin besteht das Wesen der Chromolyse.

Der erste chromolytische Versuch besteht immer in der Behandlung der Schnitte mit destilliertem Wasser. Die Schnitte[2]) bleiben in demselben, durch Zusatz eines Tropfens Chloroform aseptisch erhalten, bei Körpertemperatur 18—24 Stunden. Die dann erfolgende Färbung mit blauem Polychrom und Entfärbung mit Glyzerinäther ergibt folgendes Bild der Stachelschicht des spitzen Kondyloms: die Kerne sind stark gefärbt, noch etwas mehr die Kernkörperchen. Bedeutend schwächer geworden ist aber die Blaufärbung des Zelleibes. Es ist nur ein wolkiger Rest geblieben, in welchem viele kleine und wenige gröbere Körnchen schwach blau sichtbar sind. Es ist dies der Rest des Granoplasmas, dessen größere Menge durch destilliertes Wasser vorher aufgelöst wurde. Eine ringförmige mittlere Zone desselben hält sich am längsten, während in Kernnähe und Wandnähe nur noch Spuren vom Granoplasma übrig sind. Diese Lösung

[1]) Die angetrockneten Schnittränder halten bekanntlich die basischen Farben so stark fest, daß sie kaum zu entfärben sind.

[2]) Für diese Chromolyse des Granoplasmas kann man auch und mit Vorteil die feineren Alkohol-Zelloidin- oder -Paraffinschnitte verwenden, da Granoplasma in Alkohol und Äther unlöslich ist.

des Granoplasmas geht um so schneller vonstatten, je mehr man das Wasser erwärmt. In kochendem Wasser ist sie bereits in 10 Minuten vollendet.

Dieses Verhalten dem Wasser gegenüber beweist, daß es sich beim Granoplasma nicht um einen genuinen Eiweißkörper, ein Albumin oder Globulin handeln kann, die in kochendem Wasser gerade gerinnen würden. Es kommen dagegen Peptone und Albumosen in Betracht. Peptone können leicht ausgeschlossen werden, da diese sich in 96%igem Alkohol, in Essigsäure und Pikrinsäure lösen würden, während das Granoplasma von diesen Flüssigkeiten ausgezeichnet gut konserviert wird. Dagegen besitzt das Granoplasma alle charakteristischen Eigenschaften der Albumosen und schließt sich, wie wir noch später sehen werden, am engsten der von Kühne und Robert Koch entdeckten Akroalbumose einerseits, den Deuteroalbumosen andererseits an, so daß man sie als eine Akro-Deutero-Albumose auffassen muß. Da man die Albumosen nach ihrer Herkunft zu benennen pflegt, so habe ich diese Albumose, die in fast allen Zellen zu finden ist, Zytose, d. i. Zellalbumose, genannt. Normalerweise kommt sie nur in Zellen vor; da sie aber so leicht in körperwarmem Wasser und daher ebenso leicht in der Lymphe löslich ist, so beobachten wir ihre Verbreitung mittels des Lymphstroms auch in den Interzellularsubstanzen, soweit diese eine besondere Affinität zur sauren Zytose besitzen, wie vor allem das kollagene Gewebe. Dieses hat, und zwar wegen der permanenten Durchspülung mit alkalischem Gewebssaft, basische Reaktion. Daher nimmt es, ohne aus sich heraus eine saure Albumose zu produzieren, in der Nachbarschaft von zytosereichem Epithel, also besonders unter pathologischen Umständen, gerne Zytose auf und verwandelt sich damit in „basophiles Kollagen".

Den nächsten chromolytischen Versuch nimmt man mit 2%iger Kochsalzlösung vor. Auch in dieser bleiben die Schnitte 18—24 Stunden aseptisch im Brutofen und zeigen dann das folgende Bild: Das Protoplasma ist gänzlich von Zytose befreit, während die Kernwand und ebenso die Wand des Kernkörperchens das blaue Polychrom gut aufgenommen haben. In sehr charakteristischer Weise aber erscheinen alle Kernkörperchen als blau gefärbte Ringe (eigentlich: Hohlkugeln), die den größten Teil ihres Inhalts verloren haben. Dieses salzlösliche Eiweiß der Kernkörperchenmitte ist, wofür auch alle sonstigen Lösungseigenschaften sprechen, ein Globulin. Wir müssen uns also jedes Kernkörperchen des tierischen Gewebes als eine Kugel aus Globulin vorstellen, die allseitig von einer Schale von Nukleoproteiden umgeben ist. Dieses Globulin findet sich normalerweise immer nur mitten im Kernkörperchen, d. h. im zentralsten Teile jeder Zelle. Bei der mitotischen Kernteilung ist das erste Symptom eine Ab- und Auflösung der Nukleinhülle des Kernkörperchens. Dadurch wird der Globulininhalt desselben frei und mischt sich dem Kerninhalt bei, der bei der Auflösung der nukleinhaltigen Kernwand dann weiter mit dem zytosehaltigen Zellinhalt zusammenfließt.

Ein dritter chromolytischer Versuch mit 1‰iger Kalilauge macht uns schließlich mit der Eiweißnatur der letzten sauren Zelleiweiße bekannt, welche der Lösung durch Wasser und Kochsalzlösung widerstanden haben, nämlich mit den Nukleoproteiden des Kernes. Diese werden durch Wasser nicht angegriffen, quellen durch Kochsalzlösung nur auf, ohne sich zu lösen, werden aber von der schwachen Kalilauge vollständig gelöst, ebenso übrigens wie die

Zytose und das Globulin. Nach der Behandlung mit Kalilauge sind also alle sauren Zelleiweiße verschwunden und das blaue Polychrom färbt, seiner Angriffspunkte ledig, die Schnitte überhaupt nicht mehr, die nur noch basische Eiweiße beherbergen.

Die folgende kleine Tabelle gibt eine kurze Übersicht über diese chromolytisch erforschten drei sauren Zelleiweiße und ihre Lösungsmittel. O bedeutet darin Lösung, + Erhaltenbleiben.

	Zytose	Globulin	Nukleoproteide
Wasser	O	+	+
Kochsalz	O	O	+
Kali	O	O	O

II. Farbenindex der Nukleoproteide: Methylgrün.

Das „blaue Polychrom" als Wegweiser für die Auffindung saurer Eiweiße ist von einer einzigartigen Universalität, indem es sich mit allen sauren Eiweißen ohne Unterschied verbindet. So wichtig diese seine Eigenschaft ist, wenn es sich darum handelt, die ganze Klasse der sauren Eiweiße von den basischen Eiweißen derselben Gewebe abzugrenzen, so sehr bedürfen wir andererseits für die Abgrenzung der einzelnen sauren Eiweiße unter sich einseitigerer basischer Farben. Eine solche mit einer für uns höchst wertvollen Beschränkung auf eine ganz bestimmte Gruppe saurer Eiweiße ist das Methylgrün. Dieses gibt eine spezifische Färbung nur der Nukleoproteide und ermöglicht es uns daher, alle Nukleinsäure enthaltenden Eiweiße in den Zellen zu erkennen und leicht von ihren anderen sauren Eiweißen: Zytose und Globulin zu unterscheiden.

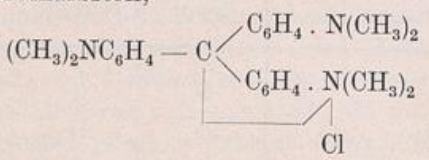
Da die Nukleoproteide in absolutem Alkohol, Äther und Xylol unlöslich sind, können wir zu ihrer Aufsuchung nicht bloß Gefrierschnitte, sondern auch Zelloidin- und Paraffinschnitte benutzen und gewinnen dabei nicht nur den Vorteil dünnerer Schnitte, sondern auch den, daß zugleich die Lipoide, speziell das mit basischen Farben tingible Lezithin, aus ihnen beseitigt sind.

Die Schnitte kommen auf etwa 20 Minuten in eine durch Schütteln mit Chloroform von dem verunreinigenden Methylviolett gereinigte Methylgrünlösung, werden dann in destilliertem Wasser abgespült und durch Alkohol in eine Mischung von Xylol und Bergamottöl $\overline{aa}$ und weiter in Balsam gebracht. Sie zeigen dann im ungefärbten Zelleib und ungefärbter Kerngrundsubstanz ein grünes Nukleoproteidgerüst und grüne Kernkörperchen.

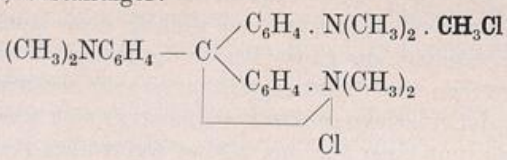
Die grüne Färbung der Kernkörperchen bestätigt zunächst die schon durch die Chromolyse mit dem Farbenindex „blaues Polychrom" gefundene Tatsache, daß die der Hauptmasse nach aus Globulin bestehenden Kernkörperchen eine Hülle von Nukleoproteiden besitzen, weist aber andererseits darauf hin, daß wir die wertvolle Eigenschaft des Methylgrüns nur dann vollkommen ausnutzen

können, wenn wir durch Herstellung eines Dibasichroms, d. h. eines homogenen Gemisches von Methylgrün mit einer anderen basischen Farbe ohne diese spezifische Affinität für Nuklein, die diesen eng benachbarten anderen Eiweiße gleichzeitig in Kontrastfarbe darstellen können. Mit einem solchen Dibasichrom wird sich das nächste Kapitel befassen. Vorher aber müssen wir uns mit der eigentümlichen Struktur des Methylgrüns bekannt machen, welche diesem Farbkörper eine so exzeptionelle Stellung erteilt.

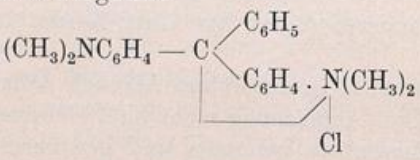
Das Methylgrün leitet sich ab von dem Methylviolett, einem Hexamethyl-Triphenyl-Methanfarbstoff,



dessen einsäurige Salze allein violett sind, während die zweisäurigen eine grüne, die dreisäurigen eine gelbe Farbe besitzen. Die zweisäurigen grünen Verbindungen sind unbeständig und gehen schon bei Behandlung mit Wasser unter Säureabspaltung in die einsäurige violette Verbindung über. Wird jedoch die Absättigung der zweiten Stickstoffgruppe anstatt durch Säure durch Anlagerung eines Moleküls Chlormethyl (CH_3Cl) bewirkt, so ist das entstehende grüne Salz, das Methylgrün, beständiger:



Einen Umschlag des Methylvioletts in eine grüne Verbindung erreicht man aber auch durch völlige Entfernung der zweiten basischen Stickstoffgruppe; es entsteht dann das Malachitgrün:



Dieses Malachitgrün hat in der Textilfärberei das Methylgrün verdrängt, weil es farbkräftiger und -beständiger ist. Der Mikroskopiker dagegen braucht mit Vorliebe das Methylgrün trotz seiner Farbschwäche und Unbeständigkeit, weil es eine feinere Auslese im Gewebe bewirkt.

Diese Auslese habe ich auf eine besondere „Reduktionsempfindlichkeit" des Methylgrüns zurückgeführt, eine Eigenschaft, die dem Malachitgrün fehlt. Um eine einfache Reduktion durch Anlagerung von 2 H-Atomen an das C und N des Methylgrüns kann es sich bei dem Versagen der Färbung gegenüber den Reduktionsorten des Gewebes allerdings nicht handeln, denn dann wäre diese Färbung reversibel und würde durch O-Zufuhr und H_2-Verlust auszugleichen sein. Man muß daher annehmen, daß im reduzierenden Gewebe nicht eine H_2-Gruppe addiert wird, sondern die ganze CH_3Cl-Gruppe verloren geht, die nur lose mit der Methylviolettgruppe des Methylgrüns gekuppelt ist. Das Fehlen

dieser CH_3Cl-Gruppe bedingt eben die Beständigkeit des Malachitgrüns gegenüber dem Methylgrün. Dieses aber ist durch den Besitz der reduktionsempfindlichen Gruppe CH_3Cl ein wichtiger Indikator geworden für das Vorhandensein der Nukleinsäure und ihrer sämtlichen Eiweißverbindungen, der es uns ermöglicht, bei pathologischen Verhältnissen unter der Menge der aus den Zellen frei gewordenen Eiweißpartikel immer noch die Kernabkömmlinge durch ihre grüne Farbe von den roten Plasmaresten zu unterscheiden.

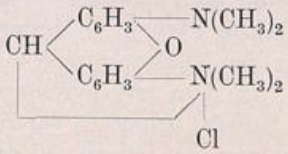
Ein einfacher Versuch belehrt über diese Empfindlichkeit des Methylgrüns gegenüber Alkalien und starken Reduzentien. Läßt man einen Tropfen einer 1%igen Methylgrünlösung auf ein Löschpapier fallen, der sich in Gestalt eines grünen Kreises ausbreitet, und setzt neben denselben sowohl einen Tropfen einer 1%igen Natronlösung wie einen zweiten Tropfen destillierten Wassers, zu dem man einige Körnchen Rongalit fügt, so dringen diese beiden Tropfen in Gestalt hellgeränderter, violetter Kreise in den grünen Kreis hinein. Es haben also sowohl das Alkali wie das saure, aber reduzierende Rongalit aus dem Methylgrün, durch Vernichtung der CH_3Cl-Gruppe Methylviolett frei gemacht. Dieser Versuch hat ein negatives Resultat, wenn man dem Methylgrün das Malachitgrün substituiert, welchem die $N(CH_3)_2 . CH_3Cl$-Gruppe fehlt; weder Alkalien noch Rongalit vermögen aus dieser Verbindung Methylviolett zu erzeugen.

III. Farbenindex des ganzen Zelleibes: Methylgrün + Pyronin.

Die wertvolle Eigenschaft des Methylgrüns, als Indikator der Nukleoproteide zu dienen, kommt erst völlig zur Geltung in seiner Kombination mit Pyronin, die wir Pappenheim verdanken.

Das Pyronin ist eine schön rote, basische Farbe von ähnlichem Bau wie das Methylenblau (vgl. dieses S. 6), bis auf die Zusammensetzung der Brücke (N—S).

Diese enthält hier statt des N die ebenfalls dreiwertige Gruppe CH und statt des gegenüberliegenden S die ebenfalls zweiwertige Gruppe O.



Dieses Pyronin gibt nicht bloß einen guten Farbenkontrast zum Methylgrün, sondern ist im Gegensatz zu diesem wählerischen Farbstoff sehr wenig empfindlich. Es färbt alle sauren Eiweiße wahllos an und besetzt daher alle Säureorte, die nicht, wie die Nukleoproteide, vom Methylgrün in Beschlag genommen werden. Das von Pappenheim benutzte Dibasichrom besteht aus einem Teil Pyronin und drei Teilen Methylgrün; mit ihm färbten sich die Lymphozyten des Blutes befriedigend. Als Pappenheim aber dieses Gemisch auf Gewebsschnitte anwenden wollte, versagte es, und Pappenheim fragte mich in dieser Verlegenheit um Rat. Ich riet ihm nach einigen Versuchen zur Anwendung einer Beize, und zwar einer Resorzinbeize, die sich denn auch bewährte. Bei dem großen Interesse derselben Fragestellung aber für die Haut nahm ich

die Anregung von Pappenheim auf und arbeitete eine für alle festen Gewebe passende Vorschrift der Methylgrün + Pyronin-Methode aus.

Dafür mußte sie in zwei wesentlichen Punkten verändert werden. Zunächst war das Verhältnis der beiden basischen Farben dem festen Gewebe anzupassen. In diesem war, entsprechend dem Vorwiegen reduzierender Gewebsmassen, das reduktionsliebende Pyronin gegenüber dem sauerstoffliebenden und reduktionsfeindlichen Methylgrün erheblich zu verstärken; statt 1 : 3 mußte es 5 (Pyronin): 3 (Methylgrün) heißen. Sodann vereinfachte ich die Pappenheimsche Methode, indem ich die Beize der Farbflüssigkeit selbst einverleibte und das zuerst von mir vorgeschlagene Resorzin durch Karbolsäure ersetzte, während ein Zusatz von Alkohol die Niederschlagsfreiheit der komplizierten Mischung garantierte.

Die Ausfärbung nach Pappenheim-Unna geschieht also in folgender Weise. Man stellt sich die Mischung in diesen Verhältnissen her:

Methylgrün	0·15
Pyronin	0·25
Alkohol	2·5
$^1/_2$%iges Karbolwasser ad	100·0.

1. Die Schnitte kommen in diese Mischung 20 Minuten kalt;
2. werden dann in (alkalischem) Leitungswasser kurz abgespült;
3. in Alkohol absolutus entwässert 1 Min. (!) und
4. durch Xylol in Öl und Balsam gebracht.

Diese Vorschrift genügt bei frischem Material oder solchem, das auf einem Wattebausch über absolutem Alkohol rasch gehärtet wurde. Wenn sich das Material in der sehr empfindlichen Farblösung weniger gut färbt, sei es, daß die Stücke in nicht absolutem Alkohol verweilt haben oder sonstwie geschädigt sind (z. B. durch provisorisches Einlegen in Formalin), so kann man es doch noch zu einer guten Färbung bringen, wenn man die Schnitte zuerst mit blauem Polychrom kräftig vorfärbt und dieses dann in einem zweiten Färbeakte durch die Mischung von Pyronin und Methylgrün verdrängt.

Durch eine gut ausgeführte Pyronin + Methylgrün-Färbung erhalten wir eine vorzügliche Abgrenzung der Nukleoproteide in der Zelle von den anderen sauren Eiweißen derselben. In dem mit pyroninrot gefärbtem Granoplasma mehr oder weniger erfüllten Zelleibe bemerken wir zunächst einen methylgrünen Kern (Bild 1). Mehr könnte man von einem mit zwei Farben arbeitenden Dibasichrom eigentlich nicht verlangen. Die Methylgrün + Pyronin-Methode leistet aber unerwarteterweise mehr. Bei ihr erscheinen nämlich vollständig eingeschlossen von dem Methylgrün des Kernes, im Innern des letzteren ein oder mehrere wiederum pyroninrote Kernkörperchen, welche trotz der gleichen Färbung nicht aus Granoplasma bestehen, wie die rote Substanz außen vom Kern im Zelleibe, sondern wie bereits oben (S. 10) erörtert, aus Globulin. Wir sehen also, daß unter besonders günstigen Verhältnissen mit einem Dibasichrom sogar drei saure Eiweiße scharf begrenzt und daher der mikrochemischen Analyse zugeführt werden können, dann nämlich, wenn sie in konzentrisch scharf geschiedenen Zonen liegen, so daß die Lokalisation jede Verwechslung ausschließt. Es gehört nur dazu, daß die gleichgefärbten, aber verschiedenen

Eiweiße überall durch die Substanz, welche die Kontrastfarbe aufnimmt, sauber getrennt sind, wie es hier der Fall ist. Durch diese günstige Farbenverteilung war es schon bald nach Bekanntgebung der chromolytischen Methode möglich, die chemische Differenz der zwei rotliebenden Eiweiße innen und außen von der Kernmembran zu bestimmen.

Legt man nämlich die betreffenden Gewebsschnitte vor der Färbung in destilliertes Wasser bei Körpertemperatur 24 Stunden oder bei 60° 6 Stunden, so ergibt die Pappenheim-Unna-Färbung ein vollständiges Fehlen des den Kern umgebenden Granoplasmas, während der Kernkörpercheninhalt intakt geblieben ist und nun dunkelrot aus dem blaßgrünen Kern noch schärfer als gewöhnlich hervorleuchtet. Die Zellenalbumose (Zytose)[1]) ist eben geschwunden, das Zellenglobulin dagegen erhalten geblieben.

Dieser einfache Versuch zeigt recht eindringlich, daß die gleiche Färbung verschiedener Gewebsteile mit einer Farbe, wie hier mit Pyronin, noch kein Beweis für die chemische Gleichheit derselben, sondern immer nur ein Index dafür ist, ob sie durch unsere Lösungsmittel entfernt sind.

Ein weiteres Licht auf die chemische Natur wirft der ebenso einfache Lösungsversuch mit 2%iger Kochsalzlösung; dann ist weder außen vom Kern noch im Kernkörperchen ein pyroninrotes Eiweiß bei der Pappenheim-Unna-Färbung mehr zu finden. An Stelle des letzteren ist nur noch ein grüner Ring vorhanden. Nach einem dritten Lösungsversuch mit 1‰iger Kalilösung ist auch dieser verschwunden, was seine Nukleoproteidnatur beweist.

Die Chromolyse auf Grund der Pappenheim-Unna-Färbung bestätigt also das Vorhandensein der drei sauren Eiweiße, wie wir sie bereits mit dem blauen Polychrom als Farbenindex gefunden haben. Sie gibt aber vermöge ihrer guten Farbenkontraste im kleinsten Raume dasselbe Resultat noch schärfer.

Wir werden diesen Farbenindex daher bei der genaueren Chromolyse der sauren Zelleiweiße vorzugsweise anzuwenden haben. Mittels derselben soll nun das, was wir bisher aus nur drei Lösungsversuchen — nach Art von Stichproben — entnommen haben, exakt bewiesen werden.

In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten Lösungen (= 0) und Fällungen (= +) der beiden Eiweiße: Zytose und Globulin zum Vergleich gruppenweise aufgeführt. Die erste Gruppe umfaßt ihr Verhalten zu Wasser und Alkohol. Es zeigt sich, daß das Globulin des Kernkörperchens unter allen Umständen im Wasser unlöslich ist, während die Zytose des Plasmaleibes nur in der Kälte mehr oder weniger unlöslich (angedeutet durch O+), bei Körpertemperatur und beim Erhitzen aber vollkommen löslich ist (Bild 1 und 2). Auch in der Alkoholgruppe zeigt sich eine Differenz zwischen Globulin und Zytose, indem von 33%igem wässerigen Alkohol Zytose bereits gelöst, Globulin gefällt wird, während in stärker prozentuiertem Alkohol beide Eiweiße unlöslich sind.

Die Gruppe der Säuren enthält zunächst Borsäure, die in 1%iger Lösung Globulin fällt, Zytose löst, in 4%iger Lösung beide fällt. Dann Essigsäure, die

---

[1]) P. G. Unna und Golodetz, Zur Chemie der Haut, X. Über Granoplasma und eine allgemeine Methode zur mikrochemischen Erforschung eiweißartiger Zellbestandteile. Dermatologische Wochenschrift 1913, S. 2.

P. G. Unna, Granoplasma. Enzyklopädie der mikroskopischen Technik 1926.

Vergleichstabelle der Chromolyse von Zytose und Globulin.

	Konzentration	Temperatur	Zytose	Globulin
Aqua dest.		kalt	O +	+
Aqua dest.		37°	O	+
Aqua dest.		90°	O	+
Alkohol	33 %		O	+
Alkohol	65—96 %		+	+
Borsäure	1 %		O	+
Borsäure	4 %		+	+
Essigsäure	10 %		+	+
Essigsäure	100 %		+	O
HCl und H_2SO_4	1 ‰		+	+
	1 %		+	+
	5 %		O	O
HNO_3	1 ‰		+	+
HNO_3	5 %		+	+
HNO_3	10 %		O	O
Kochsalz	2 %		O	O
Kochsalz	gesättigt		+	+
Kochsalz mit 2 % Essigsäure angesäuert	2 %	kalt	+	+
Kochsalz mit 2 % Essigsäure angesäuert	2 %	90°	O	O
Ammoniumsulfat Natriumsulfat	2 %		O	O
Ammonsulfat Natriumsulfat	gesättigt		+	+
Zinksulfat	2 %		+	+
Magnesiumsulfat	gesättigt		+	+
Bleiazetat Silberazetat			+	+
Kupferazetat Kupfersulfat	2 %		O	+
Gerbsäure Pikrinsäure Trichloressigsäure			+	+
Phosphorwolframsäure mit HCl angesäuert Phosphormolybdänsäure mit HCl angesäuert Jodkaliumjodquecksilber mit HCl angesäuert			+	+
Jodkaliumlösung Jodtinktur Bromwasser			+	+
Pepsin O, 5 % + HCl O, 2 %	1 %		O	+

unter allen Umständen Zytose fällt, Globulin in 10%iger Lösung ebenfalls fällt, aber in 100% löst. Es folgen die Mineralsäuren, HCl und H_2SO_4, die in 1‰iger und 1%iger Lösung beide Eiweiße fällen, aber von 5%iger Lösung angefangen beide lösen (Bild 4). Diese Lösung bei höherer Konzentration beginnt bei HNO_3 erst mit 10%.

In der Neutralsalzgruppe treffen wir zuerst NaCl, das bei 2% beide Eiweiße löst (Bild 3), bei Sättigung beide fällt, bei Zusatz von Essigsäure aber auch schon bei 2% beide fällt, um sie bei Erhitzung auf 90° wieder in Lösung zu bringen. Ebenso wie Kochsalz verhalten sich Ammonsulfat und Natriumsulfat, während Zink- und Magnesiumsulfat in allen Konzentrationen fällen, ebenso Blei- und Silberazetat. Isoliert stehen Kupferazetat und -sulfat da, welche in 2%iger Lösung Zytose lösen, aber Globulin fällen.

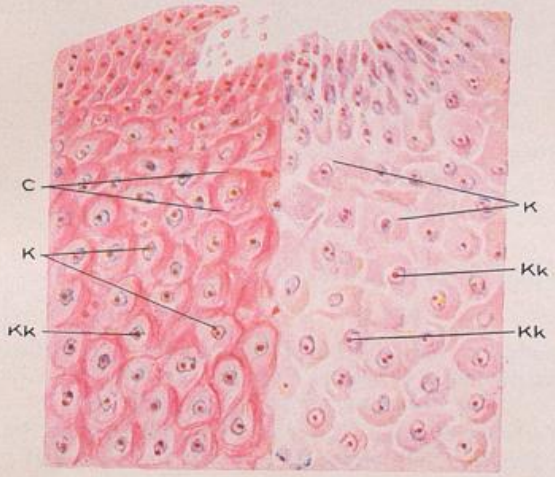


Bild 1. Bild 2.

Bild 1. Epithelzellen. Spitzes Kondylom. Paraffinschnitt. Pappenheim-Unna-Färbung: Zytose (C) rot, Kerne (K) grünlichblau, Kernkörperchen (Kk) rot.

Bild 2. Dasselbe. Vorbehandlung mit warmem Wasser. Zytose (C) verschwunden, Kerne (K) und Kernkörperchen (Kk) erhalten, Schlußfolgerung: Zytose ist wasserlöslich, Nukleoproteide und Globulin der Kernkörperchen nicht.

In der Tabelle folgen nun die Alkaloidfäller: Gerbsäure, Pikrinsäure, Trichloressigsäure, angesäuerte Phosphorwolfram- und -molybdänsäure, Jodkaliumjodquecksilber, dann noch Jodkaliumlösung, Jodtinktur und Bromwasser. Alle diese Reagenzien fällen beide Eiweiße. Den Schluß macht Pepsin + HCl, welches Zytose löst, Globulin fällt. Alle diese Lösungs- und Fällungsreaktionen sind ebenso gut an Schnitten nachzuweisen mit Benutzung der Methylgrün + Pyronin-Methode als Farbenindex wie makrochemisch an Globulinlösungen (z. B. aus Pferdeblut, Kuhmilch) und an der im großen gewonnenen Zytose.

Überblickt man die ganze Tabelle, so erkennt man nur an sechs Stellen, die durch Rahmen hervorgehoben sind, Unterschiede zwischen Zytose und Globulin. Diese betreffen Wasser und Alkohol, Borsäure und Essigsäure,

Kupfersalze und Pepsin + HCl. Die Lösung in 1%iger Borsäure gibt ein bequemes Mittel, die Zytose aus den Geweben im großen rein zu gewinnen, ohne Verunreinigung durch Globulin und ohne daß bakterielle Zersetzungen stattfinden.

Gleich verhalten sich Zytose und Globulin gegenüber 2%igem Kochsalz und 5%iger Salzsäure als Lösungsmittel. Die Figuren 3 und 4 geben die betreffenden Bilder an Schnitten von spitzem Kondylom mit dem Färbungsindex:

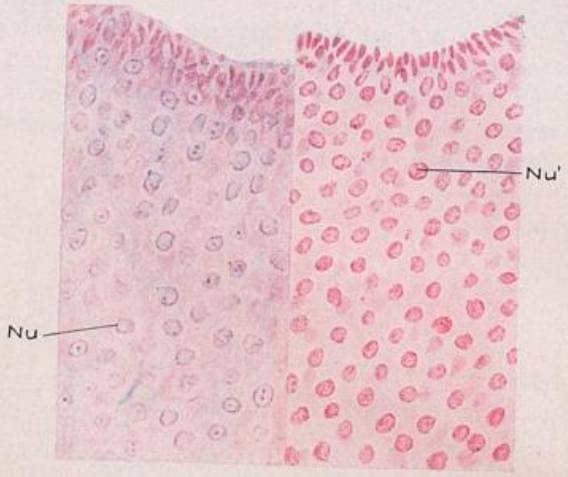


Bild 3. Bild 4.

Bild 3. Spitzes Kondylom. Paraffinschnitt. Pappenheim-Unna-Färbung. Vorbehandlung mit 2%iger Kochsalzlösung: Zytose und Globulin verschwunden. Nukleoproteide (Nu) der Kerne gequollen, nahezu unfärbbar.

Bild 4. Dasselbe. Vorbehandlung mit 5%iger Salzsäure: Globulin und Zytose verschwunden. Nukleoproteide in Nuklein (Nu^1) verwandelt, scharf konturiert und pyroninrot gefärbt.

Pappenheim-Unna. In beiden ist sowohl Zytose wie Globulin aus den Epithelzellen verschwunden, und doch besteht ein wesentlicher Unterschied zwischen ihnen. Derselbe beruht auf dem Verhalten der Nukleoproteide gegen Salze einerseits, Säuren andererseits. In Kochsalz (Bild 3) quellen dieselben bis zur Unfärbbarkeit, in Salzsäure treten sie im Gegenteil schärfer hervor (Bild 4), da sich die Nukleoproteide dabei in Nuklein umwandeln, welches ganz säureunlöslich ist.

B. Darstellung der basischen Zelleiweiße durch saure Färbungen. — Farbenindex: Bordo — Hämatein + Alaun-Färbung.

I. Die basischen Kerneiweiße.

Ein Fundamentalsatz der Zellchemie besagt, daß, wenn durch geeignete Lösungsmittel sämtliche saure Eiweiße aus dem Zellleibe herausgelöst sind, ein Zellenrumpf zurückbleibt, der aus

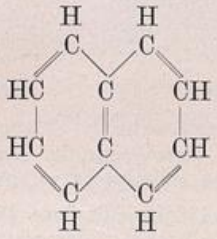
basischem Eiweiß besteht und nur noch mit sauren Farben färbbar ist. Diese Herauslösung der sauren Eiweiße geschieht durch sehr einfache Mittel; 1%ige Kochsalzlösung löst Globulin und natürlich erst recht alle Zytose auf, 1‰ige Kalilauge sämtliche Nukleoproteide.

Ob wirklich diese sauren Eiweiße alle entfernt sind, lehrt eine darauf folgende Färbung mit blauem Polychrom; diese muß negativ ausfallen. Ist dieser Punkt erreicht, dann ergibt eine Färbung mit der sauren Beizfarbe: Hämatein + Alaun noch ein völlig positives Kernbild. Kerne und Kernkörperchen sind dann ebenso stark gefärbt wie in einem Normalschnitt, der seiner sauren Eiweiße nicht beraubt worden ist. Es ist mithin für die saure Beizfarbe ganz belanglos, ob sie die basischen Eiweiße, die sie allein zu färben vermag, noch im Zusammenhang mit den sauren Eiweißen vorfindet, oder befreit von ihnen.

Aber die basischen Eiweiße, welche Hämatein + Alaun als charakteristische Formelemente dunkelblau zu färben vermag, stellen noch nicht die letzte Grundlage des Kernes dar; diese kann man an den widerstandsfähigen Zelloidin- und Paraffinschnitten rein darstellen, wenn man sie durch 15%ige Salzsäure von den hämatoxylinliebenden basischen und zugleich auch von allen ihren sauren Eiweißen befreit. Man erhält dann einen Zellenrumpf, an dem auch die Hämatein + Alaun-Färbung versagt, in dem aber alle Zellgebilde, Zelle, Kern und Kernkörperchen durch einfach saure Farben, wie z. B. Bordo noch gut färbbar sind.

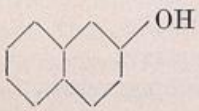
Bordo ist ein intensiv färbender, sehr dauerhafter saurer Farbstoff, der sich vom Naphthalin ableitet.

Naphthalin



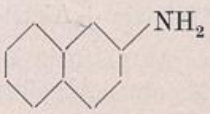
$C_{10}H_8$

Naphthol



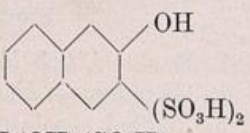
$C_{10}H_7(OH)$

Naphthylamin (Amidonaphthol)



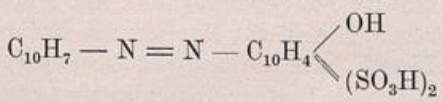
$C_{10}H_7(NH_2)$

Naphtholdisulfosäure



$C_{10}H_5(OH)\,(SO_3H)_2$

Naphthylamin—azo—Naphtholdisulfosäure



= **Bordeaux B (Bordo).**

Ein Vergleich eines solchen durch 15%ige Salzsäure wesentlich verkleinerten und dann mittels Bordo gefärbten Zellenrumpfes mit einer vollständigen, normalen Bordozelle zeigt in bezug auf das Gefärbte wieder volle Identität. Es gilt also auch für die zwei basischen Eiweiße des Kernes das Gesetz, daß sei von den ihnen wahlverwandten sauren Farben stets in derselben Weise gefärbt werden, ob sie noch miteinander in Verbindung sind, oder nicht. Erst mit der Doppelfärbung, Bordo — Hämatein + Alaun erhält man also die Gesamtheit der basischen Kerneiweiße gefärbt.

Die besten Bilder beider basischen Eiweiße erhalten wir, wenn wir die Schnitte zuerst mit Bordo färben und dann die Hämatein + Alaun-Färbung folgen lassen (Bild 5).

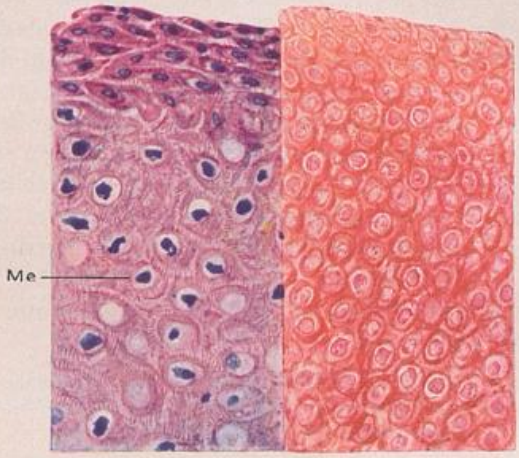


Bild 5. Bild 6.

Bild 5. Spitzes Kondylom. Paraffinschnitt. Färbung: Bordo, Hämatein + Alaun. Vorbehandlung: 5%ige Salzsäure. Mesoplastin der Kerne erhalten (Me). Nukleoproteide, Globulin und Zytose verschwunden.

Bild 6. Dasselbe. Vorbehandlung: 15%ige Salzsäure. Färbung: Bordo, Hämatein + Alaun. Die drei sauren Eiweiße und das basische Mesoplastin der Kerne verschwunden; das allein erhaltene basische Plastin der Kerne und Spongioplasma der Zelleiber mit Bordo rot gefärbt.

Bordo — Hämatein + Alaun-Färbung.

1. Bordo ½% 3 Minuten. Abspülen in Leitungswasser.
2. Hämatein + Alaun 3 Minuten. Abspülen in Leitungswasser.
3. Alkohol absolutus, Öl, Balsam.

Das Bordo färbt nur die letzte, in kalter 15%iger Salzsäure unlösliche Grundlage der Zelle, die wir im Bereich des Plasmas: Spongioplasma (Bild 6), in dem des Kernes mit Reinke und Zacharias: Plastin nennen. Die in 15%iger Salzsäure lösliche Eiweißschicht aber, die sich bei allen Kernen noch zwischen die sauren Eiweiße und die basische Grundlage derselben einschiebt, wollen wir im Gegensatz zum Plastin: Mesoplastin nennen. Nur diese ist mit Hämatein + Alaun spezifisch und dunkel färbbar, und nur der positive Ausfall

mit dieser Färbung liefert bei der Chromolyse den Beweis, daß Mesoplastin in den Schnitten noch vorhanden ist. Diese merkwürdige, durch ihre Löslichkeit in kalter, 15%iger Salzsäure und ihre spezifische Färbung mit Hämatein + Alaun so gut charakterisierte, albuminoide Zwischenlage hat in den Kernen offenbar die Funktion, die wichtigen, aber leicht löslichen sauren Kerneiweiße (Nukleoproteide und Globulin) an das viel stabilere basische Eiweiß der Kerngrundlage (Plastin) zu binden.

Färbt man nämlich die durch 5%ige Salzsäure ihrer sauren Eiweiße beraubten Schnitte mit Hämatein + Alaun, so entsteht das bekannte Bild blau gefärbter Kernwandungen und eines blauen Kerngerüstes an denselben Stellen, wo vor der Salzsäurebehandlung mit der Methylgrün + Pyronin-Färbung eine methylgrün gefärbte Kernwand und ein grünes Kerngerüst von Nukleoproteiden bestand. Es ist also sicher, daß die so verteilten Nukleoproteide eine ihrer Form genau entsprechende **Mesoplastingrundlage** besitzen. Zwischen diesen Formelementen erscheint der übrige Kern ganz frei von Mesoplastin. Die Existenz des in 15%iger Salzsäure löslichen Mesoplastins reicht nur so weit wie die Färbungsmöglichkeit mit Hämatein + Alaun.

Die dann noch ungefärbt bleibende Kernmasse nannte Richard Hertwig seinerzeit: Kernsaft, indem er sie mit dem flüssigen Inhalt einer Weinbeere verglich. Diese kurze, bequeme Bezeichnung habe ich in dem tinktoriellen Schema der Zelle in dem Buche: Lebensvorgänge in der Haut usw. (Deuticke, Wien) auch noch gebraucht.

Dieser Zellbestandteil ist allerdings nur durch negative Merkmale gekennzeichnet; er ist unfärbbar mit basischen Farben und zeigt mit Hämatein + Alaun nur eine schwache, diffuse Färbung wie mit sauren Farben, dagegen keine diskreten Formelemente. Alle diese Eigenschaften teilt er aber auch mit dem Plastin, der Kerngrundlage, und es erscheint fraglich, ob er mit dieser ganz zu identifizieren ist oder aus derselben als ein flüssiges Nebenprodukt abgeschieden wird.

Für das Vorhandensein einer Flüssigkeit im Kern spricht dessen Neigung, sich zur Kugel abzurunden, die erst dem alternden Kern verloren geht, wenn in der Nähe der Verhornungsgrenze die Schrumpfung des Kernes beginnt. Auch diese kann man am besten erklären durch den Verlust einer wässerigen Flüssigkeit auf osmotischem Wege, durch die Kernmembran hindurch. Der Kern der jugendlichen Stachelzellen ist mithin von gequollener Beschaffenheit und gibt mit dem Älterwerden das Quellwasser ab. Eine frei bewegliche Flüssigkeit im Kern anzunehmen, dafür liegt kein Grund vor; auch nicht für die von Flemming geäußerte Vermutung, daß die Flüssigkeit im Kern in Vakuolen eingeschlossen sei.

Die Zellsubstanz besteht also sicher aus drei ganz verschiedenen Eiweißschichten, aus der schwerlöslichen, basischen Grundlage (Spongioplasma im Zelleibe, Plastin im Kern), der leichter löslichen basischen Einlage oder Zwischenlage im Kern und der sehr leicht löslichen Schicht der sauren Eiweiße in Plasma und Kern. Wo die Zwischenlage fehlt, wie im Zelleibe, sind nur zwei eng miteinander verbundene Schichten vorhanden, das basische Spangioplasma und das saure Granoplasma (Zytose).

1. Darstellung des Mesoplastins der Kerne.

Um das Mesoplastin in den Kernen bloßzulegen, müssen wir auf milde Weise sämtliche saure Kerneiweiße unter Schonung der Zellen herauslösen. Dieses kann durch Alkalien oder durch Säuren geschehen.

Für beide eingreifende Techniken benutzen wir Zelloidin oder Paraffinschnitte, da einerseits Gefrierschnitte dieselben nicht vertragen, andererseits Mesoplastin in Alkohol und Äther unlöslich ist.

Als alkalische Lösungmittel dienen 1%ige Lösungen von Natronlauge, Soda oder Ammoniak, in welchen die Schnitte 12—24 Stunden verweilen. Während sie vor einer solchen Behandlung durch den positiven Ausfall der Methylgrün + Pyronin-Färbung noch das Vorhandensein aller sauren Eiweiße

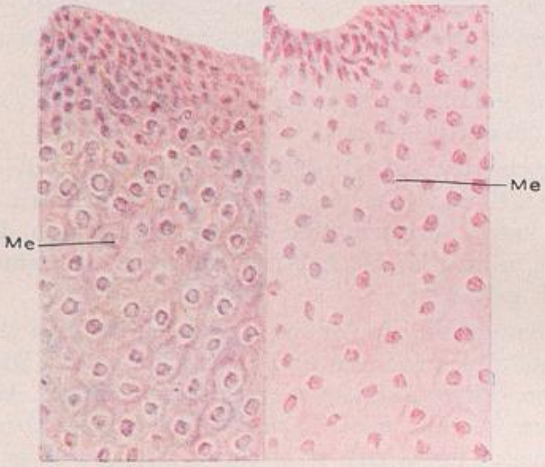


Bild 7. Bild 8.

Bild 7. Spitzes Kondylom. Paraffinschnitt. Vorbehandlung mit 1%iger Sodalösung. Färbung: Bordo, Hämatein + Alaun.

Bild 8. Dasselbe. Vorbehandlung mit Liqu. ammon. caust. Ph. germ.
In beiden Bildern ist Zytose und Globulin verschwunden, Mesoplastin (Me) erhalten.

(Nukleoproteide, Zytose und Globulin) anzeigen, versagt jetzt diese Färbung vollkommen. Dagegen erhalten wir mittels der Hämatein + Alaun-Färbung noch ein Bild aller Formelemente des Kernes und Kernkörperchens. Die einfachen Mesoplastinbilder nach Beseitigung der sauren Kerneiweiße zeigen die Bilder 7 und 8, und zwar Bild 7 nach 1%iger Sodabehandlung, Bild 8 nach Ammoniakbehandlung.

Dasselbe Resultat, nämlich den Schwund der sauren Eiweiße unter Erhaltenbleiben des Mesoplastins, erreichen wir durch eine 24stündige Vorbehandlung der Zelloidin- oder Paraffinschnitte mit 5%iger Salzsäure. Sowohl nach dieser Vorbehandlung wie nach der mit Alkalien muß in allen Fällen, vor der Färbung natürlich, eine sehr gründliche, mehrstündige Auswaschung der Schnitte in destilliertem Wasser stattfinden. Die schließliche Färbung mit Hämatein + Alaun fällt auch hier positiv aus und beweist damit, daß die Zwischenlage von Mesoplastin noch vorhanden ist.

2. Darstellung des Plastins der Kerne.

Zu diesem Zwecke müssen die sauren Kerneiweiße und das Mesoplastin aus den Schnitten herausgelöst werden. Man arbeitet mit Zelloidin- oder Paraffinschnitten und vergewissert sich zunächst durch eine positiv ausfallende Pyronin + Methylgrün-Färbung, daß die sauren, und durch eine Bordo — Hämatein-Färbung[1]), daß beide basischen Kerneiweiße in ihnen noch vorhanden sind.

Man kann diese Eiweiße in zwei Absätzen ausziehen, die sauren durch eine Mischung von 1%iger warmer Kochsalzlösung und 1‰iger Kalilösung und die basischen darauf durch 15%ige Salzsäurelösung. Da die letztere aber auch alle sauren Eiweiße der Schnitte zugleich beseitigt, so ist es einfacher und schonender, wenn man die letztere Lösung allein gebraucht.

In den Schnitten liegt dann die letzte Kerngrundlage bloß, die wir Plastin nennen. Ihre charakteristischen Merkmale sind: die Unlöslichkeit in 15%iger Salzsäure in der Kälte, ihre basische Natur, welche nur eine Färbung mit sauren Farben zuläßt, und die negative Eigenschaft, daß bei einer Färbung mit der sauren Hämatein + Alaun-Mischung die bekannten Formelemente des Mesoplastins (früheren Kernchromatins) in ihr nicht mehr sichtbar werden (Bild 6).

Man erhält diese letzte basische Eiweißgrundlage der Kerne aber auch durch Behandlung der Schnitte mit 1%iger Sodalösung oder 1‰iger Natron- oder Kalilauge in der Kälte während 48 Stunden. Man hat nur dafür zu sorgen, daß die Schnitte mit einer dünnen Zelloidinlösung vorher auf dem Objektträger begossen, wie wir sagen „gefirnist“ werden, so daß die Eiweißlösung durch das Zelloidinfilter hindurch stattfindet und das Gewebe im ganzen dabei gut erhalten bleibt. Auch dann treten bei der Färbung mit Hämatein + Alaun die oxyphilen basischen Formelemente des Kernes, das Mesoplastin, nicht mehr hervor, man hat es mit anderen Worten nur noch mit der Plastingrundlage der Kerne zu tun (Bild 6).

3. Darstellung des Mesoplastins und des Plastins der Kernkörperchen.

Genau so wie mittels der Methylgrün + Pyronin-Mischung als Farbenindex die Verteilung der sauren Eiweiße: Globulin und Nukleoproteide im Kernkörperchen nachgewiesen werden kann, erfahren wir die Lokalisation der beiden basischen Eiweiße: Mesoplastin und Plastin im Kernkörperchen mittels der Bordo — Hämatein + Alaun-Färbung als Farbenindex.

Bei dieser Doppelfärbung umschließt im Kernkörperchen ein blauer Randsaum das dunkelrot gefärbte Zentrum desselben. Für dieses charakteristische Bild des Kernkörperchens ist es einerlei, ob die Schnitte ganz unbehandelt

---

[1]) Es ist nicht gleichgültig, mit welcher sauren Farbe das Plastin gefärbt wird. Bisher hat man dazu empirisch besonders das Eosin in der bekannten Mischung mit Hämatoxylin benutzt. Unbewußt trennte man in den durch diese Doppelfärbung gefärbten Schnitten bereits das Plastin von dem nur durch Hämatein + Alaun färbbaren Mesoplastin. Aber das farbschwache Eosin versagt oft bei den eingreifenderen Untersuchungen über die basischen Zelleiweiße.

oder ob sie durch 5%ige Salzsäure ihrer beiden sauren Eiweiße beraubt sind. Es erfährt erst eine radikale Veränderung, wenn die Paraffinschnitte statt in 5%iger in 15%iger Salzsäure 18 Stunden verweilt haben. Dann ist auch alles Mesoplastin aufgelöst. Hämatein + Alaun färbt überhaupt nicht mehr an, und die rote Bordofärbung dominiert dann natürlich überall: ein dunkelrotes Kernkörperchen hängt in einem roten Kerngerüst, umgeben von rotem Spongioplasma (Bild 6).

Aus diesem Resultat der Chromolyse geht hervor, daß das Kernkörperchen dadurch ausgezeichnet ist, daß hier, d. h. an der zentralsten Stelle der Zelle, vier Eiweiße im engsten Raume zusammentreffen und daß zwischen den beiden sauren Eiweißen derselbe topographische Unterschied zwischen Mitte und Rand besteht wie bei den beiden basischen. Das basische Mesoplastin ist am Rande die Grundlage des sauren Nukleoproteids, das basische Plastin in der Mitte die des sauren Globulins. Dieses für die Kontrastfärbung so glückliche „Nebeneinander" der Eiweiße herrscht aber nur im Kernkörperchen. In der Kernwand und im Kerngerüst fallen Mesoplastin und Plastin aufeinander; sie decken sich. Dabei kommen aber nie beide basische Eiweiße zur Geltung, es entsteht keine violette Mischung des roten Bordo mit dem blauen Hämatein + Alaun, sondern stets herrscht das Blau der Beizfarbe Hämatein + Alaun vor, wo beide zusammentreffen; blau ist hier stets dominant, rot rezessiv. Rot kommt nur dort zur Geltung, wo das Blau des Mesoplastins überhaupt fehlt, wie im Spongioplasma, oder wo es, z. B. durch 15%ige Salzsäure, entfernt wurde. Wo Mesoplastin vorhanden ist, deckt es entweder das Rot des Plastins — so im Kerngerüst —, oder es umgibt es mosaikartig, wie im Kernkörperchen. Übrigens ist auch hier die Trennung nicht scharf; es besteht keine Grenzlinie zwischen Mesoplastin und Plastin, geschweige eine trennende Membran, sondern die Trennung ist auch hier nur als eine örtlich verstärkte Anhäufung von Substanz, nämlich von Mesoplastin am Rande, von Plastin im Innern des Kernkörperchens, aufzufassen, wie es die folgende Tabelle zeigt.

	Kernkörperchen	
	Rand	Mitte
Saure Eiweiße	Nukleoproteide	Globulin
Basische Eiweiße	**Mesoplastin** Plastin	Mesoplastin **Plastin**

Der — noch unbekannte — chemische Gegensatz dieser beiden basischen Eiweiße kann mithin nicht groß sein, nicht entfernt so bedeutend wie der Unterschied zwischen den beiden überlagernden, sauren Eiweißen, den Nukleoproteiden und dem Globulin.

Seit Walter Flemmings Arbeiten wußten die Histologen bereits, daß das Kernkörperchen aus einer anderen Substanz besteht wie das Kerngerüst. Die vollständige Aufklärung seiner komplizierten chemischen Natur, seiner Zusammensetzung aus vier verschiedenen Eiweißen, hat uns aber erst die Chromolyse gegeben.

II. Das basische Eiweiß im Zelleibe, das Spongioplasma.

Im Protoplasma der Zellen haben wir nur ein saures Eiweiß: das Granoplasma, an ein basisches, das Spongioplasma, gekettet. Es fehlt hier nicht nur das Mesoplastin oder ein ihm vergleichbares, leichter lösliches basisches Eiweiß, wie es im Kern vorkommt; es fehlen auch die sauren Eiweiße des Kernes, die Nukleoproteide und das Globulin. Daher haftet am Spongioplasma keine Färbung mit Methylgrün, und die mit Pyronin nur, soweit Granoplasma vorhanden ist. Hämatein + Alaun erteilt dem Spongioplasma nur eine diffuse Färbung, nicht anders als wie alle sauren Farben es vermögen, und die Doppelfärbung Bordo—Hämatein + Alaun zeigt den Zelleib nur bordorot ohne blaue Einsprengungen von Mesoplastin. Das Protoplasma enthält also weder die sauren Bestandteile des Kernes noch dessen basische Zwischenlage; Kern und Zellenleib sind völlig verschiedene Eiweißkomplexe. Der sehr geringen, lediglich auf saure Farben beschränkten Tingibilität entspricht das einseitige Verhältnis des Spongioplasmas zum Sauerstoff, den es nur zu verzehren, absolut nicht zu speichern geeignet ist.

Und doch ist dieses wegen seiner geringen Farbenfreudigkeit bisher wenig erforschte, anscheinend indifferente Spongioplasma die wichtigste lebende Zellsubstanz, die Muttersubstanz aller übrigen basischen sowie sauren Zelleiweiße, das „Protoplasma“ im eigentlichen Wortsinne.

In dieser unscheinbaren, schaumigen Ursubstanz haben wir zugleich den Urzustand der tierischen Zelle vor uns, wie wir ihn noch heute bei den niedersten Tieren (Amöben) finden, die sich nicht mit basischen Farben, sondern nur mit Hämatein + Alaun und nur schwach und diffus färben lassen. Diese brauchen auch noch keinen Sauerstoff zu speichern, da sie nackt in einem sauerstoffreichen Medium leben. Wo bei den höheren Tieren (Würmern, Insekten) eine äußere undurchlässige Hülle sich ausbildet und nunmehr viele im Körper selbst verteilte Sauerstofforte nötig werden, da bilden sich zuerst saure Substrate im Körper, die aus den basischen Grundsubstanzen: Spongioplasma, Mesoplastin und Plastin durch Abbau hervorgehen. Von nun an ist die Zelle kein bloßer Sauerstoffverzehrer mehr. Sie wird nicht nur in den Stand gesetzt, Sauerstoff zu speichern (Kernkörperchenglobulin,Granoplasma), sondern auch zu aktivieren (Nukleoproteide).

So wird die ursprünglich aus basischem, reduzierendem Eiweiß bestehende, sauerstofflose Zelle stellenweise sauer und dadurch befähigt, diese Orte zu Sauerstofforten umzugestalten. Damit entwickelt sich aus den niedersten Protozoen allmählich die ganze reiche Pflanzen- und Tierwelt.

Es wird eine reizvolle Aufgabe der Zukunft sein, die anatomische Entwicklung des Kernapparats und parallel damit die physiologische des Sauerstoffapparates in der ursprünglich kern- und sauerstofflosen Zelle der Protozoen zu verfolgen.

Diese anfängliche spongioplastische, basische Grundlage bleibt der Zelle immer; aus ihr und in ihr erneuern sich die sauren Substanzen selbst dann, wenn sie durch pathologische Prozesse (z. B. ein Übermaß salzhaltiger Lymphe) ausgewaschen werden, und häufen sich sogar in extremer Weise an, wenn rasche Zellneubildung oder ein ungewöhnlich großer Sauerstoffvorrat dem Gewebe

nottut (Bildung von Plasmazellen). Nicht mit dem Schwunde des Granoplasmas, sondern erst mit dem Zerfall des Spongioplasmas, geht die Zelle zugrunde.

Um die Struktur des Spongioplasmas zu erkennen, befreit man die Schnitte erst durch Einlegen in warme 2%ige Kochsalzlösung von ihrem Granoplasma, färbt sie 5 Minuten in der kalten 1%igen Bordolösung vor und dann mit einer Hämatein + Alaun-Lösung zur Färbung des Mesoplastins der Kerne nach. Bordo stellt dann lediglich das Spongioplasma der Zelleiber in roter Farbe dar. Hierzu dienen am besten in Zelloidin oder Paraffin eingebettete, großzellige Akanthome wie spitze Kondylome oder Karzinome.

Weit besser aber noch tritt das spongioplastische Gerüst der Zelle hervor, wo es durch einen physiologischen oder pathologischen Abbau bereits isoliert



Bild 9.

Talgdrüse. Rhinophym. Paraffinschnitt. Bordo, Hämatein + Alaun-Färbung. Spongioplasma (sp) der Talgdrüsenzellen und Plastin (pl) der Kernkörperchen bordorot. Mesoplastin (me) der Kerne hämateinblau.

und in der Zelle allein zurückgeblieben ist. So treffen wir es nach der physiologischen Verfettung des Granoplasmas in den Talgdrüsen (Bild 9) an, die aus der Verfettung der Epithelien der Stachelschicht des Haarbalges entstehen. Dabei bleibt außer den Kernen nur das Spongioplasma zurück, und zwar in großwabigem, durch die Fettkugeln ausgedehntem Zustande. An Zelloidin- oder Paraffinschnitten ist auch das Fett ausgezogen und die Bordo — Hämatein + Alaun-Methode ergibt anschauliche Bilder des Restes, der von den Epithelzellen übrig geblieben ist: Kern und Spongioplasma (Bild 9).

Auch der chemische Gegensatz des reduzierenden Spongioplasmas zum sauerstoffreichen Kern gestattet eine gute Darstellung des ersteren mittels der Mangan-Methylgrün-Methode, da sie das Spongioplasma braun, die Kerne und Kernreste grün darstellt (Bild 22).

An den für gewöhnlich schmächtigen Bindegewebszellen erleben wir dasselbe Schauspiel hochgradiger Anschwellung und Isolierung des Spongioplasmas

bei verschiedenen pathologischen Prozessen, die mit Ödem einhergehen, so ganz besonders bei der Aktinomykose. Hier kommt es zu einer massenhaften Produktion von Schaumzellen (Bild 10). Mit diesem Namen habe ich das Extrem hydropischer Bindegewebszellen bezeichnet, welches sich bei den meisten chronischen Ödemen der Haut, wenigstens an einzelnen, besonders weichen Stellen, bildet. Das Protoplasma dieser Schaumzellen nähert sich am meisten dem von Bütschli gezeichneten, ganz aus flüssigem Wabeninhalt und flüssigen Wabenwänden bestehenden, in labilem Gleichgewicht befindlichen Plasma niederer Tiere, nur daß hier die Wände der Waben nicht flüssig sind, wie dort. Durch die maximale Ansammlung von Gewebssaft aber schwellen die Waben des Spongioplasmas wie die Höhlen eines in Wasser getauchten Schwammes

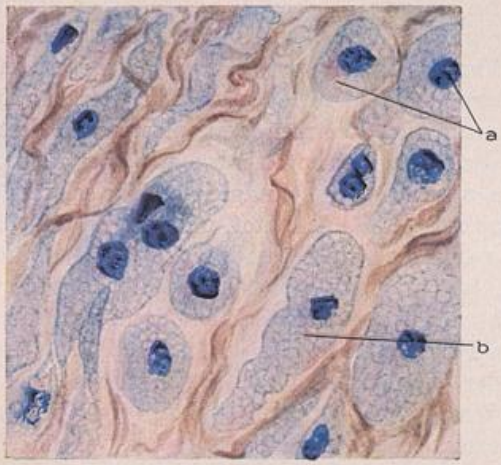


Bild 10.

Schaumzellen aus den weichen Partien eines Rhinophyms. Alkohol-Paraffinschnitt. Färbung: Blaues Polychrom, neutrales Orzein.

a) Schaumkugeln, b) spiralige und wurstförmige Schaumzellen.

hochgradig an unter Verdünnung und gegenseitiger Abplattung der Wabenwände, wobei der ganze Wabenkomplex, die Zelle, der Kugelgestalt zustrebt. Die kleineren Bindegewebszellen im lockeren Bindegewebe nehmen dabei die Formen wirklicher, isolierter Schaumkugeln an (Bild 10 a), deren Oberfläche glatt oder, wenn die peripheren Waben durch starke Füllung halbkugelig vorspringen, auch zuweilen brombeerförmig gestaltet ist.

Da der flüssige Inhalt dieser Zellen ungefärbt ist, so sind sie auch durchsichtig wie Schaum und fallen an gefärbten und aufgehellten Präparaten zunächst unter allen Zellformen am wenigsten in das Auge. Bei näherer Betrachtung und genügender Abblendung gewahrt man, daß sie nicht alle kugelig gestaltet sind, sondern vielfach in Zellfortsätze übergehen, von denen manche auch schaumig verändert sind, d. h. aus unregelmäßigen, dicht aneinander gereihten, kleinen Bläschen bestehen. Also auch diese feinen Zellausläufer sind im Grunde nicht homogen, sondern wabig gebaut.

Noch imposantere Gestalten erzeugen die größeren Fibroblasten bei der hydropischen Schwellung. Die Umwandlung der Waben in Schaumbläschen beginnt an einzelnen Stellen, meist an einem Ende. Dabei bewahren die Zellen zunächst ihre ovalen, länglichen, spiraligen, bandartigen Formen unter Abrundung der Konturen. Bei immer weitergehender Schwellung entstehen aus ihnen dicke, wurstförmige Gebilde (Bild 10 b) und schließlich wieder, nun aber sehr viel größere, Schaumkugeln.

Da der aus Zytose bestehende Wabeninhalt sich viel leichter in Wasser und Lymphe löst als die Nukleoproteide der Kerne, bleiben diese letzteren überall gut erhalten und färbbar. In den größeren Schaumzellen finden sich häufig zwei und mehr Kerne.

Gegenüber diesen extremen Formen des Zellabbaues mit Isolierung des Spongioplasmas bei Talgzellen und Schaumzellen gewinnt man verschiedenartige Bilder des graduellen Abbaues bei den Bläschenbildungen des Ekzems, des Herpes, der Variola. Das Wesen der retikulierenden Degeneration des Deckepithels beruht auf der hervorragenden Widerstandskraft des Spongioplasmas im Vergleich mit dem leichtlöslichen Granoplasma und dessen Abbauprodukten.

Innerhalb des Spongioplasmas haben wir aber im Deckepithel noch zwei Formelemente zu unterscheiden, eine gleichmäßig schaumige Substanz, welche sich zirkulär um die Kerne ausbreitet, und eine faserförmig gestaltete, welche von den Kernen radiär ausstrahlt und, indem sie von einer Epithelzelle in die andere übertritt, das ganze Deckepithel mit einem zusammenhängenden Fasersystem durchzieht und zusammenhält, dem Epithelfasersystem. Chemisch sind diese beiden Formelemente, das schaumige Plasma und das Fasersystem, nicht so verschieden wie morphologisch. Beide färben sich mit demselben sauren Farbengemisch (Wasserblau + Orzein + Eosin) in gleicher Weise und scheinen aus derselben plasmatischen Grundmasse durch verschiedene Druck- und Zugkräfte sich different entwickelt zu haben.

Jede Epithelzelle besteht mithin aus dem zentral liegenden Kerne, dem ihn direkt umgebenden Plasma, dem dieses radiär durchsetzenden Fasersystem und ein bis drei Kernkörperchen, welche dem System seinen Sauerstoffvorrat garantieren (siehe Kapitel Sauerstofforte).

Innerhalb des Plasmas der Epithelzellen haben wir schließlich noch zwei sich durch ihre etwas verschiedene Färbung unterscheidende Zonen zu trennen, eine innere, dem Kerne nähere und daher sauerstoffreichere und stärker färbbare, das Endoplasma, und eine äußere, vom Kern und dessen Sauerstoffreichtum entferntere, nur schwach färbbare, das Ektoplasma. Dieses nahezu farblose Ektoplasma hat man früher für hohle Lymphräume um die Epithelzellen gehalten (Key und Retzius), bis die Epithelfaserfärbung bewies, daß sie die soliden Außensäume aneinanderstoßender Deckepithelien sind. Die genaue Bekanntschaft mit der Färbemethode der Epithelfasern ist daher für die Kenntnis vom feineren Bau der Stachelzelle entscheidend. Wer sie geübt und stets die gleichen Resultate erhalten hat, kann behaupten, in die Struktur der Oberhaut eingedrungen zu sein.

Am besten benutzt man das großzellige Material von spitzen Kondylomen, teils in Alkohol, teils in Formol fixiert, in Alkohol gehärtet, in Zelloidin oder Paraffin eingebettet und auf 5—10 μ geschnitten.

Epithelfaserfärbung.

Die Färbung der basischen Grundlage der Epithelfasern muß zuerst erfolgen, und zwar mit einer sauren Farbmischung, die die drei Farben: Wasserblau, Orzein und Eosin enthält. Es wird eine Stammlösung vorrätig gehalten:

Wasserblau	1
Orzein	1
Eisessig	5
Glyzerin	20
Alkohol	50
Aqua dest. ad	100

Von dieser vorrätigen Mischung, der: „Wasserblau+Orzein-Mischung", kommen 6 Tropfen auf 54 Tropfen einer spirituösen Eosinlösung (1 *g* Eosin ad 100 Alkohol absol.).

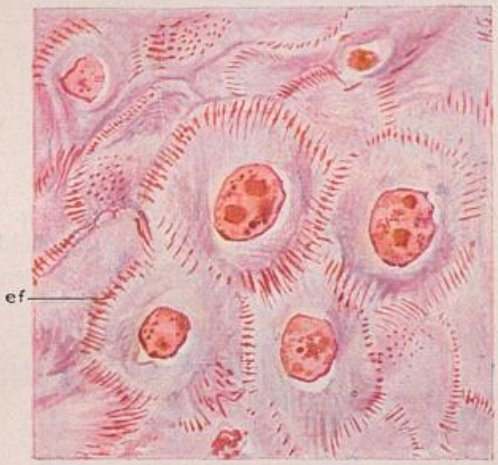


Bild 11.

Spitzes Kondylom. Epithelfaserfärbung (ef). Beschreibung siehe im Text.

In dieser: „Wasserblau + Orzein + Eosin-Mischung" bleiben sie 10 Minuten. Dann werden die Schnitte in Wasser abgespült und sind nun bereit zur Nachfärbung der sauren Deckschicht der Epithelfasern mit einer 1%igen Lösung des basischen Safranins O (10 Minuten). Nach einer gründlichen Abspülung in destilliertem Wasser kommen sie kurz, nämlich 10—15 (!) Sekunden in eine 1%ige Lösung von Kali bichromicum; von hier über Wasser in Alkohol und schließlich in Öl und Balsam.

Da die Säure des doppeltchromsauren Salzes die Wasserblaukomponente des Schnittes, nicht aber die Orzein- und Eosinkomponenten einseitig verstärkt, wechselt das Resultat der Färbung je nach der Zeit des Verweilens im Kalibichromat. Man erhält, wie die Bilder zeigen, rote Fasern in hellviolettem Plasma (Bild 11) oder dunkelviolette Fasern in bläulichviolettem Plasma (Bild 12) oder blauviolette Fasern in hellblauem Plasma (Bild 13).

Betrachtet man eine einzelne Zelle mit dem von ihr ausstrahlenden Faserkranze, so macht ihr peripherer Abschnitt einen ähnlichen Eindruck wie der stachelige Flossensaum eines schollenartigen Fisches, so daß der Name: Stachel-



Bild 12.

zelle für sie und der Name: Stachelschicht für das gesamte Deckepithel vollkommen gerechtfertigt ist. Die „Flossensäume“ zweier benachbarter Zellen sind durch die hindurchziehenden, ihnen beiden gemeinschaftlichen Stacheln punkt-



Bild 13.

Bild 12 u. 13. Spitzes Kondylom. Epithelfaserfärbung (ef). Beschreibung siehe im Text.

weise miteinander verlötet, und diese etwas verdickten Lötstellen der Fasern sind die „Ranvierschen Knötchen“. Verbindet man diese durch eine Linie, so erhält man die äußere Grenze der Zelle. Von hier bis zum stärker gefärbten,

kernhaltigen Endoplasma erstreckt sich das schwer färbbare und meist ungefärbte Ektoplasma. Man bemerkt nun, daß die helleren Räume zwischen den Epithelzellen aus zwei aneinanderstoßenden Ektoplasmen bestehen und daß die Zellgrenzen die letzteren in Form einer Reihe Ranvierscher Knötchen halbieren.

Bei der Musterung eines größeren Epithelkomplexes gewahrt man, daß nicht alle Fasern von einer Zelle zur nächsten ziehen, sondern daß manche, einzeln und in Gruppen, die nächsten Zellen vermeiden, um die übernächsten oder noch entferntere Epithelien zu erreichen, in die sie sich einpflanzen. Dieses sind die sogenannten langen Epithelfasern. Ihre Entstehung erklärt sich aus dem unregelmäßigen Wachstum der Epithelzellen.

Wenn diese in der Keimschicht sich mitotisch teilen, bleibt eine Tochterzelle an der Kutis mit ihren Fasern haften (Kromayers Haftfasern (Bild 14),



Bild 14.
Spitzes Kondylom. Epithelfaserfärbung. Spiralen in der Keimschicht (sp). Haftfasern (hf).

während die andere nach dem Ort des schwächsten Widerstandes in die Höhe gedrückt wird, ohne daß beide ihren Faserzusammenhang verlieren. Die aufsteigende Zelle ist aber auch mit den darüberliegenden Zellen durch Fasern verbunden, wie diese untereinander. Ist diese Verbindung stärker als der Auftrieb der neuen Zelle, so fügt sich diese der nächsthöheren Zellenreihe einfach ein; ist sie aber schwächer als der Auftrieb der neuen Zelle, so schlüpft diese zwischen ihnen durch und gelangt in eine höhere Lage, d. h. nur ihr wachsendes und sich teilendes Plasma, das an den langen Fasern aufwärts gleitet, während diese selbst ihre Verbindung mit der Kutisgrenze bewahren. Auf diese Weise können unter Umständen junge Epithelien in eine weit höhere Lage gelangen, als es ihrer Ursprungsstätte entspricht, und sie schweben dann über dieser wie ein Fesselballon, gehalten durch sie umgreifende lange und meist spiralig gedrehte Fasern. Darin spricht sich eine gewisse Unabhängigkeit der Zellplasmen von den in ihnen selbst gebildeten Epithelfasern aus.

Die dickeren Fasern, welche ältere Zellen der höheren Lagen mit der Kutisoberfläche verbinden, verlaufen in den unteren Teilen der Stachelschicht



Bild 15.
Spitzes Kondylom. Paraffinschnitt. Epithelfaserfärbung. Lange Epithelfasern (lef). Leukozyten zwischen Epithelien (leu).

und der Keimschicht einzeln oder bündelweise, zwischen den jüngeren Epithelien, also lose in den Lymphwegen derselben (Bild 14). Sie zeigen daher vielerwärts das Phänomen der spiraligen Drehung, wie alle stabförmigen



Bild 16.
Dasselbe. Leukozyten (leu), überbrückt von Epithelfasern.

Elemente in Hohlräumen, deren feste Ansatzpunkte künstlich genähert wurden. Die hier massenhaft vorkommenden Spiralen (Bild 14 sp) sind mithin die Folge

der allgemeinen, mit der Fixierung verbundenen Gewebsschrumpfung einerseits, des partiellen Ödems mit Erweiterung der Lymphwege in der unteren Stachelschicht und Keimschicht andererseits.

Diese letztere hat nebenbei zur Folge, daß zahlreiche Leukozyten von der Kutis her in die Stachelschicht eindringen. Dann erweitern sich die Lymphwege zwischen den Stachelzellen noch mehr, wobei die sie verbindenden Fasern sich verschieden verhalten. Teilweise bleiben sie erhalten und überbrücken die zwischen ihnen (Bild 16) hindurchschlüpfenden Leukozyten; teilweise schrumpfen sie unter dem Einflusse der anliegenden weißen Blutkörperchen und schwinden spurlos wie die Hörnchen einer Schnecke bei Berührung, wo dann die Leukozyten von weiten, leeren Lymphspalten umgeben sind.

Die Kenntnis der Spiralen verdanken wir Karl Herxheimer (1889), welcher unter Weigerts Leitung dessen Fibrinfärbung auf die Oberhaut anwandte. Diese benutzt eine basische Farbe (Gentianaviolett) und eine saure Beize (Jod), entspricht also dem zweiten Teile meiner Epithelfaserfärbung (Safranin und Kalibichromat). Es fehlt ihr der erste Teil, das saure Farbgemisch (Wasserblau + Orzein + Eosin), welche die basische Grundlage des gesamten Fasersystems darstellt und dadurch auch den Zusammenhang der Spiralen mit den übrigen Fasern liefert, der Herxheimer noch entging, aber schon bald von Kromayer mittels einer Modifikation der Weigertschen Fibrinfärbung gefunden wurde.

Schon das saure Farbgemisch allein läßt die Epithelfasern deutlich erkennen und zeigt auch sonst eine weitgehende Differenzierung der basischen Grundlagen des Gewebes, wenngleich keine sehr starke Färbung. Besonders fällt auf, daß alle Kernkörperchen und sauren Kerne eosinrot, die Kernkörperchenhüllen dagegen wasserblau gefärbt sind.

Statt nun den zweiten Teil der gewöhnlichen Epithelfaserfärbung folgen zu lassen, kann man diesen auch durch andere basische Farben nebst Beize ersetzen. Hierzu eignet sich besonders Karbolfuchsin[1]) oder Karbolgentianaviolett[2]), wodurch das Fasersystem dem Plasma gegenüber stark in roter oder violetter Farbe hervorgehoben wird. Durch diese Kombinationen gewinnen wir also zwei neue, vorzügliche und einfache, auch die Spiralen zeigende Epithelfaserfärbungen:

I.

1. Wasserblau + Orzein + Eosin-Mischung 10 Minuten, Wasser.
2. Karbolfuchsin 5 Minuten, Wasser.
3. Alkohol, Öl, Balsam, und

II.

1. Wasserblau + Orzein + Eosin-Mischung 10 Minuten, Wasser.
2. Karbolgentianaviolett 10 Minuten, Wasser.
3. Alkohol, Öl, Balsam.

---

[1]) Fuchsin . . . . . 1 *g*
Alkohol absol. . . . . 10 *cm*³
$2^1/_2$%ige Karbolsäure ad . . . . . 100 *cm*³

[2]) Gentianaviolett . . . . . 1 *g*
Alkohol absol. . . . . 10 *cm*³
$2^1/_2$%ige Karbolsäure ad . . . . . 100 *cm*³.

Es ist zu beachten, daß bei diesen Kombinationen der Wasserblau + Orzein + Eosin-Mischung mit basischen Farben als Beize nur Karbolsäure verwendbar ist, nicht das sonst für Gentianaviolett gebräuchliche Anilinöl, da diese Beize als Zusatz zum Fuchsin oder Gentianaviolett die Faserfärbung vollständig aufhebt.

C. Die Stockwerktheorie.

Die Chromolyse hat uns die sichere Erkenntnis vermittelt, daß die morphologisch unterscheidbaren Formelemente der Zelle aus der Kombination von sauren und basischen Eiweißen bestehen, welche sich durch ihre Verwandtschaft zu basischen und sauren Farbstoffen unterscheiden und sich deshalb durch geeignete Färbemethoden mikroskopisch scharf erkennen und unter günstigen Umständen auch makrochemisch isolieren lassen.

Schon dieser erste Fundamentalsatz der Zellchemie stellt unser Vorstellungsvermögen vor eine schwierige Aufgabe. Wir müssen uns danach jeden gefärbten Punkt einer tierischen Zelle, so klein er sein mag, z. B. einen Punkt vom Rande oder der Mitte eines Kernkörperchens als eine komplizierte, räumliche Konstruktion, sagen wir ein kleines Gebäude, vorstellen, in welchem wenigstens drei Stockwerke[1]) für die Aufnahme der verschiedenen Eiweißgruppen vorgesehen sind. Wir haben gesehen, daß das, was in jedem Stockwerk vor sich geht, ein in vielen Beziehungen unabhängiges Leben führt, daß z. B. ein Schnitt, den man mit Kochsalz- und Sodalösung seiner sauren Eiweiße beraubt hat, da diese nur den „oberen" Stock einnehmen, uns, mit Bordo — Hämatein + Alaun gefärbt, noch eine anscheinend normale Struktur darbietet, weil diese Färbung nur den „mittleren und unteren" Stock allein für sich in Anspruch nimmt.

Wir müssen uns also mit dem Gedanken vertraut machen, daß die grundverschiedenen Eiweiße, die wir mit den verschiedenen Färbemethoden nachweisen können, in der Zelle fest aufeinander gepreßten Lagen entsprechen, die erst zusammen die bisherigen bekannten Formelemente darstellen.

Hier bestand längere Zeit für unser Vorstellungsvermögen eine Schwierigkeit, die erst vor einigen Jahren — es war mitten im Kriege — behoben wurde. Die damals alltägliche Zerstörung mehrgeschossiger Gebäude legte den Vergleich der sukzessiven Abtragung der Eiweißschichten einer Zelle mit der stufenweisen Zerstörung der Stockwerke eines Hauses sehr nahe, besonders da sich hier die leichtere Abtragung des Dachgeschosses von selbst zum Vergleiche mit der leichten Entfernung der sauren Eiweiße aus dem Zellgehäuse anbot, ebenso wie die schwierigere Zerstörung des Erd- und des Kellergeschosses mit den basischen Grundeiweißen der Zelle. Dieser Vergleich der drei Eiweißschichten (saure Eiweiße, Mesoplastin, Plastin) mit den drei Stockwerken eines Hauses hat sich

---

[1]) Die Ausdrücke „oberer", „mittlerer" und „unterer" Stock, die den Aufenthalt von drei tinktoriell ganz verschiedenen Eiweißen in der Zelle bezeichnen sollen, konnte ich leider bisher noch nicht durch bessere ersetzen, obwohl der Begriff des Stockes eine merkliche Höhenausdehnung einschließt. Was ihn aber geeignet macht, ist die strenge Scheidung, die beim Gebäude räumlich, in der Zelle durch Färbung und Lösung gegeben ist.

in den folgenden Jahren in der Tat bewährt, und wir fragen uns heute unwillkürlich bei jeder gelungenen Färbung: In welchem Stockwerk des betreffenden Zellelementes befindet sie sich?

Zunächst gilt das für alle dreischichtig gebauten Kerne, die im oberen „Stocke" die sauren Eiweiße nebst allem Sauerstoff und die basischen Färbungen beherbergen, im „Mittelstock" allein das Mesoplastin und die Hämateinfärbung und im „unteren" das Plastin und die Färbungen mit einfach sauren Farben. Im Zelleib fehlt die Mittellage und damit das Mesoplastin. Wir haben da nur einen „Oberstock" mit Granoplasma, Sauerstoff und den basischen Färbungen und die basische Grundlage, einen „Unterstock" von Spongioplasma mit einfach sauren Färbungen.

Die Sauerstofforte der Zelle befinden sich also nur in den Obergeschossen von Zelle, Kern und Kernkörperchen, in den so leicht auswaschbaren sauren Eiweißen derselben.

Es kommt allerdings bei Leichenmaterial oder nach Aufbewahrung in schlechtem oder verdünntem Alkohol oder in Formalin oft, ja man kann sagen regelmäßig vor, daß die sauren Eiweiße des oberen Stockes ausgewaschen oder unfärbbar geworden sind, so daß die Färbung mit basischen Farben und natürlich erst recht die mit Rongalitweiß vollkommen versagt. In allen solchen Fällen ist dann wegen der schwereren Angreifbarkeit der basischen Eiweiße im mittleren und unteren Stock das Substrat für die Färbung mit der gebräuchlichen Mischung: „Hämatoxylin + Eosin" noch gut erhalten und ergibt einen positiven Erfolg. Dieses ist der Grund für die weite Verbreitung der Hämatoxylin + Eosin-Färbung, besonders bei den Pathologen, die auf Leichenmaterial angewiesen sind; es ist gleichzeitig aber auch der Grund für die weitgehende Unbekanntschaft der wichtigen Zytose- und Globulinbilder bei den Histologen und infolge davon der Vernachlässigung des Granoplasmas bei den Zellstudien und Zelltheorien.

Während die Speicherung der sauren Eiweiße in dem sonst allgemein reduzierenden tierischen Gewebe erst die Bedingung schafft, daß sich Sauerstoff in demselben anhäufen kann, genügt diese Bedingung allein noch nicht dem Sauerstoffbedürfnis des Gewebes selbst, welches einen stets fließenden Sauerstoffstrom verlangt. Dieser entsteht erst durch die Abgabe von aktiviertem Sauerstoff von einigen bevorzugten Gewebsteilen aus, welche außer dem Sauerstoff noch das Sauerstoff abspaltende Ferment: Peroxydase enthalten, wie die Mastzellenkörner und alle Kerne.

Dieser durch die Peroxydase eingeleitete Sauerstoffstrom würde aber stocken und schließlich lahmgelegt werden, wenn nicht durch ein zweites Ferment, das in den basischen, reduzierenden Grundeiweißen seinen Sitz hat, die Katalase, der hier anlangende Sauerstoff inaktiviert, wieder abgestoßen und den Sauerstoffaktivatoren im oberen Stockwerk zur Reaktivierung zugeführt würde. Vor Aufstellung der Stockwerktheorie war eine besondere Funktion der Katalase unbekannt. Erst die notwendige Unterscheidung von chemisch verschiedenen Stockwerken in der Zelle betraute die Katalase mit der höchst notwendigen Funktion der Ortsveränderung des Sauerstoffs in der Zelle, wodurch der Sauerstoffstrom erst geschlossen und dadurch konstant und dauerhaft wird[1]).

[1]) Näheres siehe Kapitel Katalase S. 91.

Wir können mithin die Peroxydase und Katalase als die notwendigen, sauerstofftreibenden Gegenfermente bezeichnen, die ebenso grundsätzlich verschieden sind wie der obere Stock mit seinen sauren, leicht löslichen Eiweißen von den beiden unteren mit ihren basischen, schwer löslichen Proteiden überhaupt. Nur im oberen Stock und nur solange wir demselben seine sauren Eiweiße gelassen haben, meldet die Rongalitweißmethode einen Überschuß von Sauerstoff. Solche Sauerstofforte enthalten die Kerne und Kernkörperchen mit ihren Nukleoproteiden, sodann die ganz der Sauerstoffaktivierung gewidmete Mastzellenkörnung, weiter die sauerstoffspeichernden Eiweiße: Zytose und Globulin, und die ganz der Arbeit mit diesen Eiweißen geweihten Plasmazellen, sodann die Hauptzellen des Magens und die Nisslkörper des Kleinhirns und endlich die Knorpelsubstanz, welcher ihr Gehalt an Chondroitinschwefelsäure die Speicherung eines Sauerstoffüberschusses erlaubt.

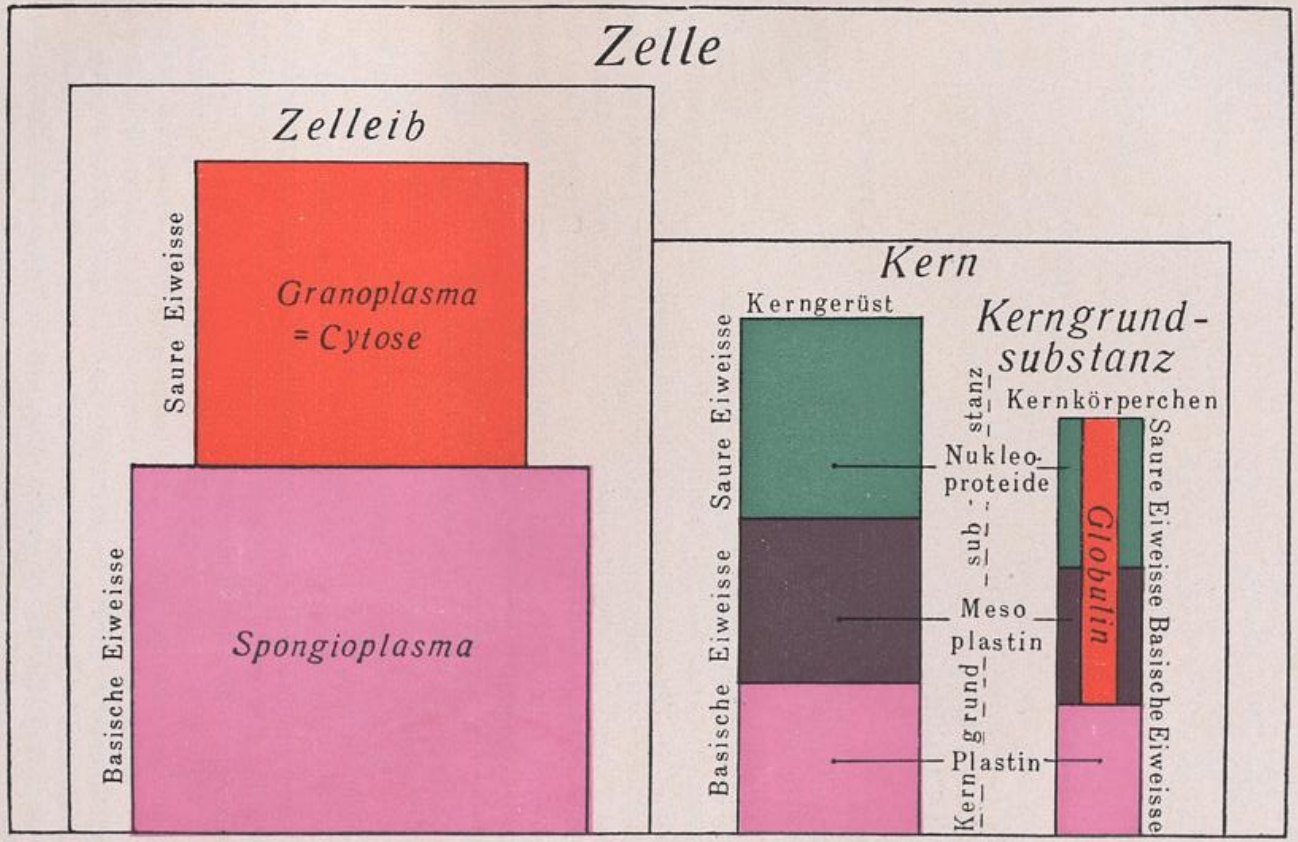
In den Eiweißen des mittleren und unteren Stockes finden wir von allem das Gegenteil: Basische Reaktion der Eiweiße, schwierige Löslichkeit und mehr oder minder starkes Reduktionsvermögen derselben, das wir am besten und einfachsten an der Bräunung einer Kaliumpermanganatlösung messen. Die löslichere Mittellage basischen Eiweißes, das Mesoplastin, zusammen mit der basischen letzten Eiweißgrundlage, dem Plastin, welches selbst konzentrierter Salzsäure in der Kälte widersteht, bilden dasjenige Zellgerüst, welchem die reduzierenden Eigenschaften jeder Zelle zukommen. Da sie keiner Zelle vollständig fehlen, so reduzieren, in geringem Grade wenigstens, auch alle Zellelemente in ihren unteren Stöcken und reduzieren natürlich im selben geringen Maße auch Kaliumpermanganatlösung. Die biologisch so wertvolle und notwendige Gegensätzlichkeit von Sauerstofforten und Reduktionsorten im lebenden Tierkörper, welche sich auf derjenigen von sauren

Die drei Stockwerke der Zelleiweiße.

	Reaktion	Eiweiße	Löslichkeit	O-Verhältnis
I. Oberer Stock	Sauer	**Zytose** **Globulin** **Nukleoproteide**	Löslich in: **Aq. dest.** **NaCl**-Lösung **Kali**-Lösung	Sauerstofforte
II. Mittlerer Stock	Basisch	**Mesoplastin**	Löslich in: **HCl 15%** Unlöslich in: **Aq. dest.** **NaCl** **Kali 1‰** **HCl 5%**	Reduktionsorte
III. Unterer Stock	Basisch	**Plastin**	Unlöslich in: **HCl 15%**	Reduktionsorte

Tinktoriell-chemisches Zellenschema.

(Stockwerkschema.)



und basischen Zellelementen aufbaut, wird ebenso wie diese verständlich im Lichte der Stockwerktheorie der Zelleiweiße, da hiernach ein Nebeneinander von sauren und basischen, Sauerstoff speichernden und Sauerstoff verzehrenden Eiweißen wohl bestehen kann, ohne daß diese für das Leben notwendigen Eigenschaften sich gegenseitig aufheben.

Indem wir sodann von den für die sauren und basischen Eiweiße als Farbenindizes zugrunde gelegten zwei Doppelfärbungen, der Methylgrün + Pyronin-Färbung und der Bordo — Hämatein + Alaun-Färbung, in schematischer Weise Gebrauch machen, gelangen wir auch zu einem übersichtlichen Farbenschema der ganzen Zelle.

Da wir in jedem körperlichen Punkt der Zelle eine Zusammensetzung aus zwei oder drei Stockwerken anzunehmen haben, so gilt dieses Gesetz auch für die eiweißartigen Hüllen, mit denen sich Kern und Kernkörperchen gegen die Zellsubstanz abgrenzen und schützen. Durch geeignete Färbungen wird sich diese Annahme prüfen lassen.

Stockwerkbau der Kernmembranen.

Es ergibt sich nun, daß wir in den gewiß sehr dünnen Membranen der Kerne und der Kernkörperchen einen Aufbau aus sogar drei Stöcken anzunehmen haben. Wie die einfache Färbung mit Bordo zeigt, grenzen sich die Kernkörperchen nach außen gegen die Kernsubstanz und die Kerne wiederum gegen das umgebende Zellplasma scharf ab; diese Membranen besitzen also eine feine Grundlage aus dem bordoliebenden Plastin. Als selbständiger Körper, als wirkliche, doppeltkonturierte Membran kommt diese viel besser zur Anschauung bei Färbung mit dem homogenen Gemisch zweier saurer Farben: Bordo + Wasserblau, und zwar besitzt von diesen beiden Farben Wasserblau die stärkere Affinität für die Kernmembran, so daß sie sich rein blau von der bordoroten Kerngrundlage abhebt. Ebenso ist es bei dieser Färbung mit dem Kernkörperchen, wenn auch dessen Membran feiner und daher weniger stark gebläut ist. Es kommt dem Kernkörperchen dabei zu statten, daß das Plastin der Kernkörperchenmitte das Rot der Gegenfarbe: Bordo annimmt.

Die gleiche Erfahrung macht man bei der Färbung mit dem homogenen sauren Gemisch: Wep[1]). Auch dabei nimmt die Membran des Kerns stark und die des Kernkörperchens schwächer nur das Wasserblau an, und die letztere kommt hauptsächlich dadurch zur Wahrnehmung, daß sie gegen die hier eosinrote Kernkörperchenmitte einen guten Kontrast bildet. Wasserblau ist also ein bevorzugtes Membranfärbemittel.

Hiermit ist bewiesen, daß beide Membranen eine rein basische Plastingrundlage mit besonderer Affinität zur Sulfofarbe: Wasserblau besitzen.

Um zu erfahren, ob die Membran auch eine mittlere Schicht von Mesoplastin enthält, haben wir sie mittels der heterogenen Mischung von Eosin mit der Beizfarbe: Hämatein + Alaun zu färben. Auch hierbei tritt die Kernmembran blau gefärbt hervor, in starkem Kontrast zum eosinroten Plastin des Kerns. Ebenso nimmt die Membran des Kernkörperchens Hämatoxylin auf; da dies

[1]) Wasserblaulösung 1% 6 Tropfen + wässerige Eosinlösung ½% 15 Tropfen + Phloxinlösung 1% 15 Tropfen.

38M.

aber ebenfalls das Mesoplastin der Kernkörperchenmitte tut, wird hier die Membran an dem durchweg blau gefärbten Kernkörperchen nicht kontrastierend sichtbar.

Um endlich zu entscheiden, ob die Membranen auch ein oberes, saures Stockwerk haben, färben wir die Schnitte zunächst mit dem blauen Polychrom. Die starke Blaufärbung der Kernmembran im Gegensatz zu deren nur bläulicher Mitte beweist, daß die Kernmembran in erheblichem Grade auch saures Eiweiß gespeichert hat. Am Kernkörperchen mißlingt diese Probe wiederum, da nicht bloß die Oberschicht der Membran, sondern auch das ganze globulinhaltige, obere Stockwerk des Kernkörperchens sich tief dunkelblau färbt. Man muß hier zu dem Dibasichrom: Methylgrün + Pyronin greifen und erhält nun in der Tat einen durch Nukleoproteid blaugrünen Rand des Kernkörperchens, gut abgesetzt gegen ein pyroninrotes Zentrum desselben.

Es unterliegt also keinem Zweifel, daß alle drei Stockwerke in beiden Membranen durch entsprechende Eiweiße besetzt sind, welche auch vermöge ihrer differenten Färbung einer chromolytischen Analyse zugängig sein werden. Von diesen Stöcken ist der unterste offenbar am stärksten ausgebildet, da das Wasserblaubild die Membran am dicksten zeigt; das Hämatoxylinbild ist schon schwächer und das Methylgrünbild am schmächtigsten entwickelt. Also auch hier sind die Bilder in den drei Stockwerken nur annähernd, aber durchaus nicht vollständig identisch. Zudem beobachtet man bei einem Vergleich der Membranen in den verschiedenen Höhen der Stachelschicht, daß mit dem Altern der Kerne die Dicke der wasserblau gefärbten Grundschicht zunimmt auf Kosten der methylgrünen Oberschicht. Diese Wahrnehmung entspricht dem allgemeinen Satze, daß gegen die Verhornungsgrenze zu die basischen Eiweiße der Kerne im allgemeinen auf Kosten der sauren an Volumen zunehmen.

D. Darstellung der Sauerstofforte und Reduktionsorte.

I. Reduktionsorte.

1. Farbenindex: Kalipermanganat.

Der Gedanke, der Paul Ehrlich in seinem Werke über „das Sauerstoffbedürfnis des Organismus“ vorschwebte (1885), daß nämlich die verschiedenen Organe verschieden hohe Ansprüche an die Versorgung mit Sauerstoff machen, ist von ihm nicht bis in die einzelnen Zellen verfolgt worden. Dieser Gedanke wurde zum ersten Male auch histologisch realisiert durch einen höchst einfachen Versuch mit Kalipermanganat.

Es waren durch Alkohol und Zelloidin gebrachte Fußsohlenschnitte, die in einer Lösung von Kalipermanganat lagen und sich darin bräunten, welche zu der Beobachtung Veranlassung gaben, daß diese Färbung mit dem Reduktionsprodukte Mangansuperoxyd (MnO_2) in den verschiedenen Teilen der Schnitte verschieden stark war, so daß ein regelmäßiges Bild von schwarzbrauner Hornschicht, brauner Stachelschicht und hellgelber Kutis entstand.

Solche Farbenunterschiede zwischen Epithel und Kutis waren ja von Färbungen mit basischen Farben her bekannt, aber durchaus ungewöhnlich mußte es erscheinen, daß alle Epithelkerne sich nahezu ungefärbt, nämlich blaßgelb, aus den braunen Leibern der Stachelzellen abhoben, während doch gerade die Epithelkerne bei den basischen Färbungen am stärksten gefärbt sind. Es mußte also bei der Färbung mit dem basischen Kalipermanganat ein ganz anderes Prinzip der Färbung, eine andere Art Affinität für das Gewebe im Spiele sein. Während diese für die basischen Farbsalze durch die von Ehrlich entdeckte Säure-Basen-Affinität, nämlich durch die Säureorte des Gewebes (Kerne, Granoplasma), gegeben ist, herrscht bei der Manganfärbung eine andere Affinität, nämlich die zwischen sauerstoffreichen und sauerstoffarmen Substanzen, welche ich 1909 entdeckt und mit dem Namen der „oxypolaren Affinität" bezeichnet habe. In diesem Falle handelt es sich um den „oxypolaren" Gegensatz zwischen sauerstoffarmem Gewebe und hochoxydiertem Färbemittel ($KMnO_4$).

Diese Gegensätze suchen sich auszugleichen, zu neutralisieren, und die Folge von diesem Ausgleichungsbestreben ist die chemische Verbindung von Hornsubstanz und MnO_2, die Manganfärbung der Schnitte. Sie läßt uns in sehr feiner Weise schon durch die Dunkelheit der braunen Färbung die Stärke des Sauerstoffbedürfnisses an den verschieden stark gefärbten Teilen des Gewebes erkennen. Wir können mithin durch das Permanganat und die Tiefe der Färbung, die es erzeugt, das Reduktionsvermögen der Gewebe erkennen, ja geradezu messen.

Reduktionsfärbung

(für Gefrier-, Zelloidin- und Paraffinschnitte).

1. Farbenindex: Kalipermanganat.

1. 1%ige wässerige Lösung von $KMnO_4$ für Gefrierschnitte: 1 Minute; für Zelloidin- und Paraffinschnitte: 2—5 Minuten.
2. Abspülung in Leitungswasser.
3. Alkohol, Öl, Balsam.

Am stärksten reduzieren an Hautschnitten die Hornschicht (Bild 17) und die Wurzelscheide des Haares (Bild 18), mittelstark die gebräunte Stachelschicht der Oberhaut und des Haarbalges, am schwächsten die Kerne und die von sauerstoffhaltiger Lymphe durchspülte Kutis. In dieser reduziert Kalipermanganat das Elastin stärker als das Kollagen, so daß sich die elastischen Fasern gebräunt vom gelblichen Kollagen abheben.

Wenn die Alkohol—Zelloidin-Schnitte oder auch Gefrierschnitte mit der leicht zersetzlichen Permanganatlösung zusammenkommen, so zerfällt diese in Mangansuperoxyd, Kalilauge und Sauerstoff. Die Sauerstofforte (Kerne) nehmen den freien Sauerstoff auf, was sich an einer verstärkten, nachfolgenden Methylgrünfärbung derselben erkennen läßt; das Mangansuperoxyd, welches freilich selbst ein Reduktionsprodukt des Permanganats ist, aber doch noch überreichlich O enthält (MnO_2), verbindet sich oxypolar mit den Reduktionsorten und färbt diese gelblich bis braunschwarz.

$$2\ KMnO_4 + H_2O = 2\ MnO_2 + 2\ KHO + O_3$$

Kalipermanganat + Wasser = Mangansuperoxyd + Kalilauge + Sauerstoff.

Freilich ist es bekannt, daß die Permanganatlösung unter besonderen Umständen auch reduzieren kann, wenn sie nämlich mit anderen hochoxydierten Substanzen, z. B. H_2O_2, und einer starken Säure zusammenkommt. Dann werfen

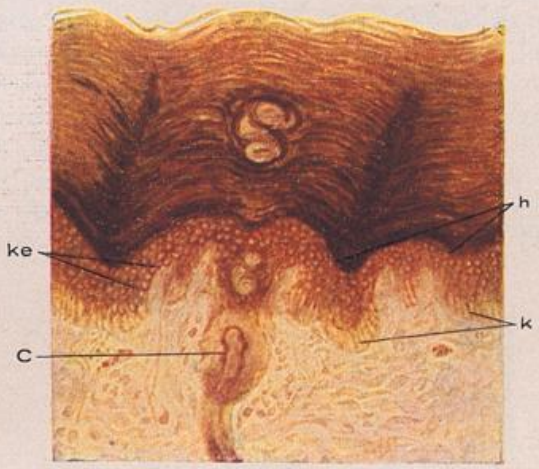


Bild 17.

Deckepithel der Fußsohle. Paraffinschnitt. Manganfärbung. Helle Kerne der Stachelschicht (ke). Helle Keimschicht (k). Dunkle basale Hornschicht (h). Dunkle Cuticula des Schweißporus (c).

beide (H_2O_2 und Kalipermanganat) gleichzeitig ihren O ab. Das Kalipermanganat reduziert also hier das H_2O_2. Doch kommen diese besonderen Umstände im tierischen Gewebe nicht vor.

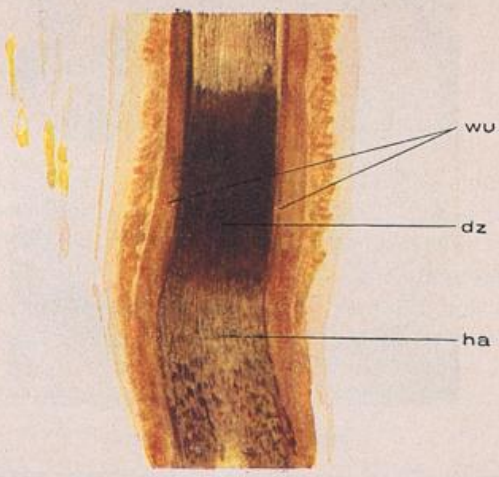


Bild 18.

Kopfhaar, frisch. Manganfärbung. Wurzelscheide (wu) braun. „Dunkle Zone" (dz) des Haarschaftes oberhalb der Papille und von dieser durch den helleren Haaranfang (ha) getrennt.

Die Veränderung des Gewebes bei der Reduktion des Kalipermanganats und seine Bräunung durch MnO_2 ist daher einer Sauerstoffanreicherung gleichzusetzen.



Bild 19.

Tasthaar. Rattenschnauze, frisch. Mangan — Methylgrün-Färbung. Dunkelbraune Muskeln (m). Goldgelbe Nerven (n). Methylgrüne Wurzelscheide (wu).

In mehr oder minder hohem Grade zeigen diese künstliche Oxydation durch Kalipermanganat alle zelligen Teile des Gewebes, viel weniger die Inter-

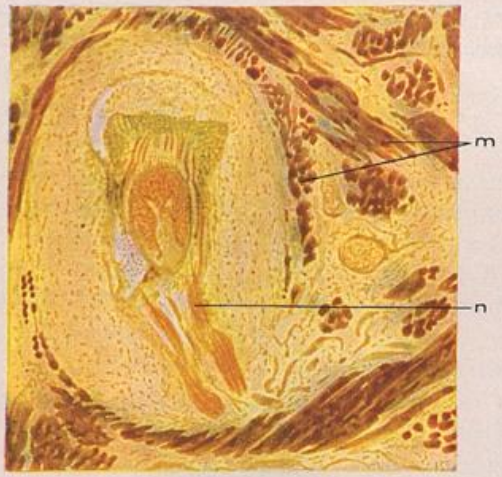


Bild 20.

Tasthaar der Rattenschnauze. Bezeichnung wie im Bild 19.

zellularsubstanzen, und die Kerne nur in ihrer basischen Grundlage. Je weniger aber die Teile MnO_2 speichern, um so besser nehmen sie danach noch basische Farben auf. Daher eignet sich die braune Manganierung des Gewebes vorzüglich

zu Doppelfärbungen mit blauen und grünen, basischen Farben, welche die Sauerstofforte des Gewebes anfärben. Besonders gut paßt hierzu die Nachfärbung mit Methylgrün, da diese Farbe überhaupt nur sauerstoffreiche Gewebe intensiv anfärbt. Man erhält dann grüne Sauerstofforte (Kerne, Mastzellen) neben gelben bis dunkelbraunen Reduktionsorten (Hornschicht, Wurzelscheide), und die so erzielten färberischen Kontraste haben eine durchsichtige biologische Bedeutung. Es ist daher ratsam, die Schnitte nicht bloß der Haut, sondern aller Gewebe, die mit Kalipermanganat vorbehandelt sind, mit Methylgrün nachzufärben, weil sie dadurch viel lehrreicher werden. Einen erheblichen Nebengewinn haben dieselben für die normale und pathologische Haut überdies dadurch, daß alle markhaltigen Nerven sich in homogener Weise gelb färben (Bild 19 und 20), mithin in der schwach oder gar nicht gebräunten Lederhaut als gelbe

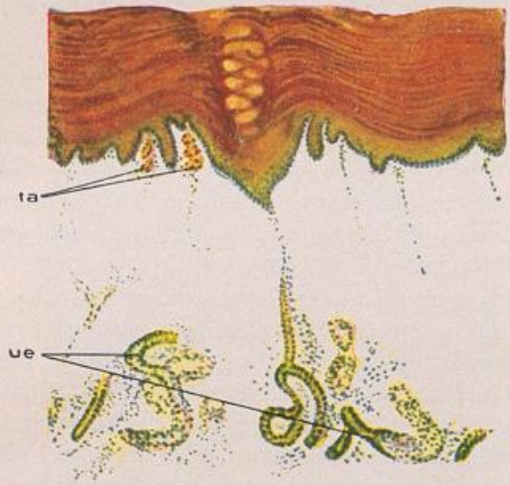


Bild 21.

Fußsohle, frisch. Hornschicht dunkelbraun. Übergang (ue) der Knäueldrüsen in den Ausführungsgang. Tastkörperchen (ta).

Bänder gut sichtbar werden. Auch für die Auffindung und Darstellung der Meißnerschen Tastkörperchen (Bild 21) in den Papillen der Hohlhand gibt es keine einfachere Methode als die Mangan—Methylgrün-Färbung, die auf Alkoholmaterial ebenso gut anwendbar ist wie auf Gefrierschnitte. Man sieht dann auf jedem Schnitte schon bei schwacher Vergrößerung die braunen Tastkörperchen in den an grünen Kernen reichen Papillen hervortreten.

Mangan—Methylgrün-Methode

(kurz: **MM.-Methode**)[1]).

1. 1%ige Lösung von Kalipermanganat, 1 Minute.
2. Ausspülen in Wasser, solange noch violette Farbwolken abgehen.

---

[1]) P. G. Unna und Luise Fezer, Zur Färbung der Nervenfasern am frischen Gewebe. Virchows Archiv Bd. 246, S. 183—193.

3. Mehrere Schnitte werden auf einen Objektträger aufgezogen, je mit einem Tropfen Glyzerin versehen und mit einem zweiten Objektträger zugedeckt. Sie verbleiben so eine Nacht.

4. Abspülen in Wasser.

5. 1‰ige wässerige Methylgrünlösung, 10 Sekunden.

6. Wasser, Alkohol, reines Bergamottöl.

7. Einbettung in Zedernöl.

Die Glyzerinpassage (Nr. 3 der Formel) bewirkt hierbei einerseits einen schönen goldgelben Ton der Nerven, andererseits unterstützt sie das Erhaltenbleiben der Methylgrünfärbung im eingebetteten Präparat. Die Methylgrünlösung darf nur 1‰ig sein, da durch eine 1%ige nach der Oxydation des Schnittes mit $KMnO_4$ eine grüne Überfärbung des ganzen Schnittes eintreten würde. Demselben Zwecke der Methylgrünerhaltung dienen weiter: die Vermeidung des Xylols bei der Aufhellung in Bergamottöl sowie der Ersatz des Kanadabalsams durch Zedernöl.

Wenn man zur Verbesserung der Konsistenz die Gewebe zunächst mit Formalin behandelt, so muß die Manganeinwirkung entsprechend länger, bis 3 Minuten, dauern. Eine zu stark gewordene Manganierung kann man überdies leicht durch Eintauchen in eine 1%ige Oxalsäurelösung wieder aufheben.

Nächst den Nerven der Haut bilden die Talgdrüsen ein lohnendes Objekt der MM.-Methode, da in solchen Präparaten ein schöner Gegensatz von braunem Spongioplasma und goldgelbem Fettinhalt entsteht (Bild 22).

In den Knäueldrüsen kommt der Gegensatz des Knäuelepithels zum Gangepithel (Bild 21 ue) zur vollen Geltung. Letzteres färbt sich erheblich dunkler und schließt nach dem Lumen zu mit der kontinuierlichen Linie der Kutikula so scharf ab, daß die Lichtung überall hell hervortritt (Bild 23), wodurch geradezu das Gangepithel gegenüber dem Knäuelepithel charakterisiert wird. In dem letzteren gewahren wir, an Gefrierschnitten oder an formalinisiertem Alkoholmaterial, neben grünen Kernen, graubräunlichem Spongioplasma und dunkelbraunen, mit Blut gefüllten Kapillaren (Bild 23), in allen Zellen jene feintropfigen, bläschenförmigen Kügelchen, die ich 1894 auf dem Kongreß in Bristol an vielen osmierten Präparaten demonstriert und als ein den Knäueldrüsen eigentümliches Fett bezeichnet habe[1]). Ein solches Bild zeigt Bild 23, in dem die Fettkügelchen auf dem grünlichbräunlichen Grund der Knäuelepithelien als dunkle Tröpfchen sehr deutlich hervortreten.

Noch deutlicher zeigt sich dieses tröpfchenförmige Knäuelfett, wenn man der MM.-Färbung eine Osmierung oder längere Formalinbehandlung voranschickt (Bild 24, Fett).

Auch im Haarschaft selbst deckt die MM.-Methode einige Besonderheiten auf, die bei den bisher gebräuchlichen Färbungen nicht ins Auge fallen. Ich habe bereits in meiner Dissertation[2]) vor 50 Jahren einen sich stark mit

---

[1]) Unna, Deutsche Med.-Ztg. 1895, Nr. 1, Vortrag in Bristol, gehalten in der Sektion für Dermatologie der Jahresversammlung der British Med. Association 1. August 1894.

[2]) Unna, Beiträge zur Histologie und Entwicklungsgeschichte der menschlichen Oberhaut und ihrer Anhangsgebilde. Arch. mikr. Anat., Bd. XII (1876), Taf. 31, Fig. 14.



Bild 22.

Kopfhaut, frisch. Talgdrüse (t). Knäueldrüsen (kn). Fettkügelchen der Knäueldrüsen (f). Blutkapillaren (bl).

Karmin färbenden Anfangsteil des Haarschaftes in Bild 14 abbilden lassen, ohne im Text näher auf denselben einzugehen. Soviel ich sehe, hat sich von allen Histologen nur Rabl mit dieser Übergangsstelle zwischen den Mutterzellen des Haares und den fertigen Haarzellen beschäftigt. Er sagt[1]):

„Das Auftreten einer körnigen Substanz läßt sich bei diesem Prozeß hier nicht beobachten; trotzdem halten einige Autoren (Reinke, v. Brunn) die Anwesenheit von Eleidin nicht für ausgeschlossen. Denn während sich einerseits die Matrix der Rindensubstanz tinktoriell wie das Stratum germinativum

[1]) Rabl, Hans, Histologie der normalen Haut des Menschen. Handbuch der Hautkrankheiten (Mraček), Bd. I, S. 64.

der Haut verhält, dem es ja auch physiologisch gleichzusetzen ist, und andererseits das Haar in seinem total verhornten Anteile bei den gewöhnlichen Me-



Bild 23.

Fettkügelchen der Knäueldrüsen. Kopfhaut, frisch.
Mangan — Methylgrün-Färbung.
cut = Cuticula der Knäueldrüsen. cap = Blutkapillare. f = Fettkügelchen. ke = Kerne.

thoden keinerlei Farbe annimmt, trifft man an der Grenze dieser beiden Abschnitte eine Zone, welche sich sowohl mit basischen als sauren Anilinfarben intensiv färbt. Sie besitzt eine beträchtliche Breite, schließt sich ohne scharfe

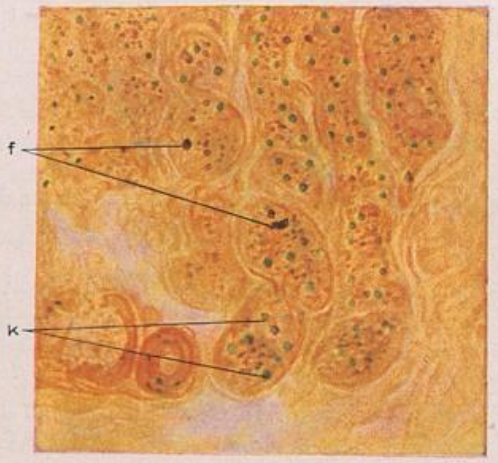


Bild 24.

Fetttröpfchen der Knäueldrüsen. Kopfhaut, frisch. Vorbehandlung mit Osmiumsäure. Färbung: Mangan — Methylgrün. Braune Fettkügelchen (f) neben grünen Kernen (k).

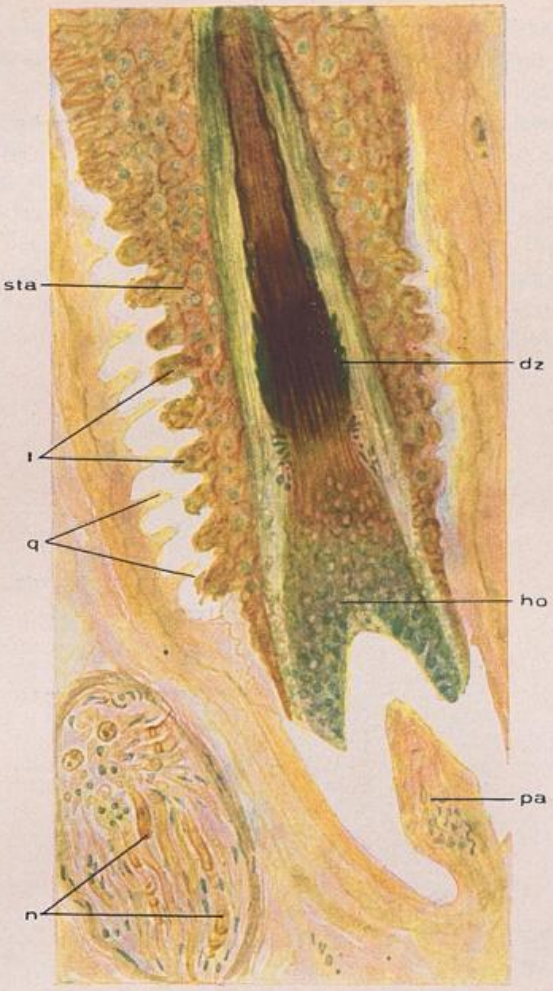


Bild 25.

Die „dunkle Zone" des Haarschaftes (dz). Kopfhaut, frisch. Mangan — Methylgrün-Färbung (MM.-Färbung). Von der Papille (pa) abgehobene Hohlwurzel (ho). Von der Balgwand abgehobene Leisten (l) der Stachelschicht (sta) des Haarbalges und in diese hineinpassende Querfalten (q) der inneren Schicht der Balgwand. Schrägschnitt eines größeren Hautnervenbündels (n).

Grenze an die weichen Zellen des Haares an, geht aber nach aufwärts rasch in die verhornten Zellen über. Der Umstand, daß sich in dieser Zone die Haarzellen färben, mag vielleicht auf einer diffusen Durchtränkung der Substanz der Rindenzellen mit flüssigem Eleidin beruhen. Doch läßt sie sich auch durch die Annahme erklären, daß sich die im Laufe der Verhornung eintretende Änderung der chemischen Konstitution des Zellprotoplasmas in einem Stadium durch eine besondere Färbbarkeit desselben kundgibt."

Rabls Beschreibung hebt ganz richtig die zwei Hauptveränderungen hervor, durch welche sich diese Anfangszone des Haarschaftes auszeichnet, ihre



Bild 26.

Neutralviolettfärbung des Papillenhaares. Kopfhaut, frisch. Längsschnitt. Kerne neutralrot (k). Suprapapilläre Verschmälerung (su) neublau. Verbreiterte „dunkle Zone“: (dz) dunkel blauviolett. Henles Scheide: (hs) tief neutralrot.

besondere Breite und Färbbarkeit. Ihre Längenausdehnung ist etwa dieselbe wie die der Papille; sie beginnt aber erst in einer Höhe, wo die Papille bereits aufhört. Da wir jetzt in der MM.-Färbung und auch im Neutralviolett (siehe unten) gute Färbungen dieser Zone besitzen, wodurch sie einer chromolytischen Untersuchung zugänglich wird, so will ich ihr einen eigenen Namen geben und bezeichne sie als die „dunkle Zone“ des Haarschaftes (Bild 25).

Diese dunkle Anfangszone des Haarschaftes tritt bei der MM.-Färbung in sehr auffallender Weise hervor, aber auch schon an ungefärbten Gefrierschnitten erkennt man ihre Lage ungefähr, wenn sie auch weder oben noch unten so scharf abgegrenzt ist wie bei der MM.-Färbung. Daraus geht hervor, daß bei der Dunkel-

heit dieser Zone außer der Farbenaffinität auch noch ein physikalischer Umstand wesentlich mitspricht. Stärkere Vergrößerungen an ungefärbten Schnitten zeigen denn auch, daß wo über dem Halse des Papillenhaares die Dunkelheit beginnt, der Haarschaft von stark lichtbrechenden Längsfasern durchsetzt wird, die die schwarze Färbung total reflektierender Luftbläschen zeigen. Streifen echter Pigmentkörnchen dagegen können nicht die Ursache dieser vorübergehenden Dunkelheit sein, da auch an blonden Papillenhaaren die Erscheinung auftritt, wo die geringe Menge des zellulären braunen Pigments der Wurzel bereits am Halse des Papillenhaares vollkommen verschwindet. Das stärkere Hervortreten der dunklen Zone durch die MM.-Färbung beruht mithin darauf, daß die in dieser neu auftretenden Fasern vom Manganoxyd und Methylgrün olivengrün



Bild 27.

Wurzel eines Papillenhaares. Kopfhaut, frisch. Längsschnitt. Färbung: Gentianaviolett. „Dunkle Zone" (dz) tiefblau. Wurzelscheide (wu) blau. Deutliche Faserung der „dunklen Zone".

gefärbt werden, so daß sich hier dunkle Färbung und Lichtreflexion vereinigen. Die Einschiebung der Fasern, welche wohl mit den Waldeyerschen Haarfasern identisch sind, erklärt auch gleichzeitig die Verbreiterung der dunklen Zone. Wir haben mithin im Haarschaft, von der Wurzel angefangen, erst eine geringe, halsartige Verschmälerung, dann die Verbreiterung innerhalb der dunklen Zone und darauf erst die starke und definitive Verschmälerung an Stelle des ganz verhornten Haarschaftes zu unterscheiden.

Rabl hat schon ganz richtig bemerkt, daß die dunkle Haarzone sowohl saure wie basische Farben aufnimmt. Außer dem Methylgrün der MM.-Methode eignet sich von den basischen Farben besonders das Neutralviolett zu ihrer Darstellung. Sie nimmt aus dieser Farbmischung nur das Neublau (Bild 26) auf, während das Neutralrot von den Kernen und von der Wurzelscheide in ihren älteren Abschnitten gebunden wird. Auch die einfachen basischen Farben: Fuchsin, Gentianaviolett (Bild 27), Safranin, wenn man ihnen Karbolsäure als

Beize zusetzt, heben die dunkle Zone gut hervor und zeigen bei starker Vergrößerung und Ölimmersion auch die Faserung der Zone. Die sauren Farben

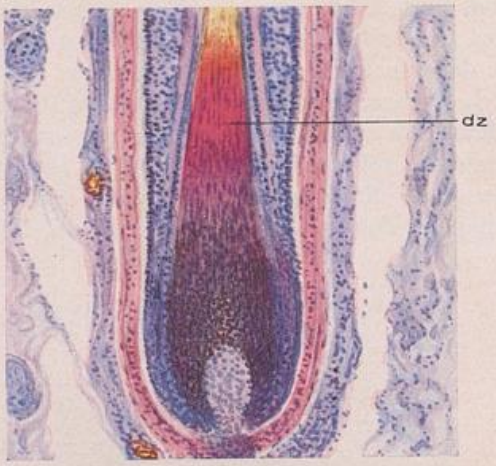


Bild 28.

dagegen, wie Säurefuchsin (Bild 28), Bordo (Bild 29), Diamingrün, Pikrokarmin und Pikronigrosin, färben wohl die dunkle Zone auch in hervorragender Weise, aber diffus, ohne Hervorhebung des Faserapparates. Sie verdecken denselben vielmehr, indem sie das umgebende Protoplasma der Haarzellen intensiv an-

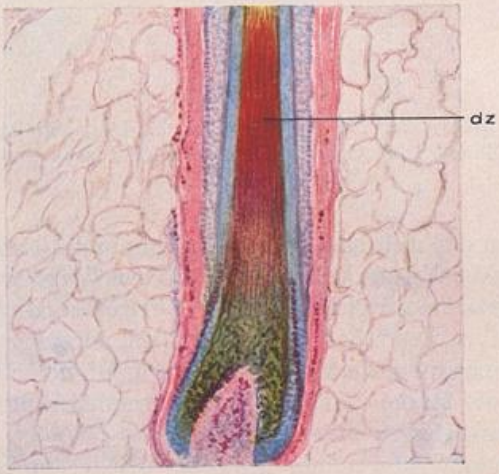


Bild 29.

Bild 28 und Bild 29 geben die „dunkle Zone" (dz) mit sauren Farben (Säurefuchsin und Bordo), ebenfalls tief gefärbt, aber ohne Andeutung der Fasern.

färben. Zwischen den Haarzellen selbst und den in ihnen entstehenden Fasern besteht also ein chemischer Kontrast: das Plasma reagiert basisch, die Fasern sauer.

Natürlich tritt die „dunkle Zone" auch sehr gut hervor bei einfacher Färbung mit Kalipermanganat, und zwar als ein schwarzbrauner Abschnitt unterhalb des eigentlichen Haarschaftes, von der Papille noch durch den etwas helleren Haaranfang (ha) getrennt (Bild 18).

* * *

Zur Bestimmung der Reduktionsorte sind wir nicht allein auf das Kalipermanganat angewiesen. Schon seit langem kennen wir noch zwei andere Farbenindizes, welche die Reduktionsorte anzeigen. Es ist das in erster Linie die Eisen-Zyan-Färbung, in zweiter die Nitrochrysophanfärbung.

2. Farbenindex: Eisen-Zyan-Mischung.

1. Mischung von 1%igen Lösungen von Eisenchlorid und Ferrizyankalium in Wasser zu gleichen Teilen, 5 Minuten.
2. In Leitungswasser abspülen.
3. Alkohol, Öl, Balsam.

Hier reduzieren die Reduktionsorte von der von ihnen aufgenommenen Mischung das Ferrizyankalium zu Ferrozyankalium, das sich mit dem ebenfalls aufgenommenen Eisenchlorid zu Berlinerblau verbindet. Die blaue Färbung durch das letztere kann also nur dort im Gewebe eintreten, wo Reduktionsorte sind.

$K_3FeCy_6 + KHO + H = K_4FeCy_6 + H_2O$
Ferrizyankalium + Alkalisch reduzierendes Gewebe = Ferrozyankalium + Wasser

$3\,K_4FeCy_6 + 4\,FeCl_3 = Fe_4(FeCy_6)_3 + 12\,KCl$
Ferrozyankalium + Eisenchlorid = Berlinerblau + Kaliumchlorid.

In diesem Falle bedeutet aber die Reduktionsfärbung keine Anreicherung von Sauerstoff, sondern eine Abgabe von Wasserstoff und Alkali aus dem alkalisch reduzierenden Gewebe der Reduktionsorte (z. B. des Spongioplasmas, der Hornschicht usw.).

Diese „Eisen-Zyan-Färbung" ist jedoch nicht so universell brauchbar wie die Manganfärbung, da es Orte gibt, wo sie versagt, so an der Stelle der basalen Hornschicht. Die hier bestehende basische Reaktion, durch Abscheidung der basischen Albumose: Eleidin bedingt, bewirkt an dieser Stelle eine Abscheidung von gelbem Eisenoxydhydrat, wodurch die blaue Reduktionsfärbung unmöglich gemacht wird.

3. Farbenindex: Tetranitrochrysophansäure.

Wieder andere Prozesse begleiten die Herstellung von Reduktionsbildern mittels der Tetranitrochrysophansäure ($C_{15}H_6O_4(NO_2)_4$), welche entsteht, wenn man zu einer Lösung von Chrysarobin in Eisessig rauchende Salpetersäure hinzufließen läßt. Die Schnitte kommen für diese Färbung in Xylol oder Chloroform, da die Tetranitrochrysophansäure in Wasser nicht löslich ist, und von da 5 Minuten in die gelbe Lösung von Tetranitrochrysophansäure in Chloroform oder Xylol, in welcher sich die Reduktionsorte rot färben. Auf diesem

Farbenumschlag beruht die dritte, noch seltener gebrauchte Reduktionsfärbung, die Nitrochrysophanmethode.

Charakteristisch für dieselbe — im Gegensatz zur Manganfärbung — ist das Hellbleiben nicht bloß der basalen Hornschicht, sondern auch der oberflächlichen Hornschicht. Da die Reaktion der Rotfärbung dadurch zustande kommt, daß in der Nitrochrysophansäure NO_2-Gruppen durch NH_2-Gruppen ersetzt werden, so ist das Ausbleiben der Reaktion der basalen und oberflächlichen Hornschicht wohl dadurch zu erklären, daß diese Orte keine NH_2-Gruppen freimachen können.

Am wenigsten von Nebenumständen beeinflußbar ist von den drei Reduktionsfärbungen die Manganfärbung. Wenn daher alle drei Färbungen in ihren Resultaten übereinstimmen, kann man selbstverständlich diese Bilder mit Sicherheit als reine Reduktionsbilder auffassen. Weichen dagegen die beiden letzten Färbungen stellenweise durch abnorme Färbung vom Manganbilde ab, so hat man Nebenumstände anzunehmen, wie z. B. alkalische Reaktion, welche das einfache Reduktionsbild beeinflussen. In solchen Fällen hat man sich natürlich allein an das Manganbild zu halten.

Es war nicht zufällig, daß die Existenz und Bedeutung der Reduktionsorte zuerst an der Haut gefunden wurde, und zwar dort, wo die Oberhaut in mächtigster Form verhornt ist, in der Fußsohle. Denn der Prozeß der Verhornung geht mit einer bedeutenden Abnahme des Sauerstoffgehaltes und Erhöhung des Reduktionsvermögens einher.

Unserer Beobachtung kommt dabei der regelmäßige Schichtenbau der Oberhaut sehr zustatten, da hier jede äußere Zellenlage gegenüber der inneren trockener und sauerstoffärmer ist und wir von der saftreichen und sauerstoffreichen Keimschicht durch die Stachelschicht hindurch Schritt für Schritt zu immer trockeneren und stärker reduzierenden Zellen gelangen, bis wir in den Hornzellen ein Maximum der Trockenheit und Reduktion erreichen.

Wenn wir von diesen extremen Verhältnissen an der Hornschicht der Fußsohle absehen, so haben wir aber in dem Plastin und Mesoplastin der Kerne und dem Spongioplasma einer jeden Zelle bereits sauerstoffarme, reduzierende Eiweiße vor uns, welche positiv auf unsere Reagentien für Reduktion reagieren, wenn auch nicht so stark wie das verhornte Eiweiß, das Keratin.

Der ungemein rasche Abbau des Kernes und seiner Sauerstoff aktivierenden Nukleoproteide beim Beginn des Verhornungsprozesses hat aber noch eine eingreifende weitere Folge für den ganzen Inhalt der Epithelzelle. Mit dem Verschwinden der Nukleoproteidhüllen, welche normalerweise sowohl Kern wie Kernkörperchen einschließen und beide voneinander trennen, tritt ein plötzlicher Zerfall beider, ein Freiwerden ihrer Bausteine und eine Vermischung dieser mit dem Granoplasma des Zelleibes ein. Aus diesen Trümmern bilden sich noch vor vollendeter Verhornung charakteristische Eiweißkomplexe, die wir, da sie nicht mit in die Hornsubstanz eingehen, als Begleit- oder Nebenprodukte der Verhornung bezeichnen. Die wichtigsten dieser Nebenprodukte sind das Keratohyalin, das Eleidin und das Trichohyalin. Aus dem weiteren Zerfall dieser entstehen wiederum einfachere Produkte, wie Glykogen und Ölsäure.

Nebenprodukte der Verhornung.

Keratohyalin.

Die körnchenhaltigen Zellen, welche Auffhammer unterhalb der Hornschicht entdeckte, und Langerhans als eine konstante Schicht der Oberhaut nachwies, ohne ihren Übergang in Hornzellen zu erkennen, wurden erst von P. G. Unna als normale Übergangsstufe im Verhornungsprozeß nachgewiesen und als Körnerzellen, daher die ganze Schicht als Körnerschicht (Stratum granulosum) der Oberhaut in die Wissenschaft eingeführt. Er wies nach, daß die betreffenden Körner bereits in den tieferen Lagen der Stachelschicht zuerst um den Kern herum auftreten, daß dann die Körnerschicht entsteht, indem rasch innerhalb ein bis zwei Zellagen die Körner sich bis zur Anfüllung des ganzen Zelleibes vermehren und daß sofort in der nächsthöheren Zellenlage die Körner wieder in der Weise verschwinden, daß um jedes einzelne Körnchen sich ein heller Hof bildet. Die Körnerschicht ist also eine vorübergehende, nicht absolut notwendige, aber sehr charakteristische Begleiterscheinung der Verhornung der Deckepithelien.

Waldeyer wies dann nach, daß die Substanz der Körner mit dem Hyalin von v. Recklinghausen übereinstimmt, und nannte sie deshalb Keratohyalin, da sie mit dem Prozeß der Verhornung eng verbunden ist. Das Keratohyalin schiebt sich als eine das Licht stark reflektierende Substanz zwischen die durchsichtige Stachelschicht und die durchscheinende Hornschicht wie eine mattgeschliffene Glasplatte ein und blendet in sehr wirksamer Weise die rote Farbe der Blutkapillaren an der weißen Haut des Europäers ab, wie es besonders deutlich an der Grenze des Lippenrots, am Lippensaum, hervortritt. Denn das Lippenrot ist mit einer besonders dicken Hornschicht bekleidet, die aber, beim Fehlen einer Körnerschicht, die rote Farbe der Blutkapillaren allein nicht zu verdecken vermag. Bei der Überhornung gut granulierender roter Wunden erkennt man deutlich, wie sich zuerst ein durchsichtiger Hornschichtsaum irisblendenartig über die Wunde vorschiebt und dann erst etwas später die Körnerschicht als ein tiefer liegender, bläulichweißer, undurchsichtiger Saum nachfolgt. Die sich hier gleich anfangs dokumentierende Unabhängigkeit der Verhornung von der Keratohyalinbildung treffen wir auch beim Fötus, wo die Bildung der Hornschicht der der Körnerschicht lange vorangeht, wie denn überhaupt an vielen Stellen, z. B. am Nagel, am Beethaar, an den Oberhäutchen des Papillenhaares und pathologisch bei allen Parakeratosen Hornsubstanzen auftreten, ohne daß überhaupt eine Körnerschicht gebildet wird.

In der Stachelschicht zeigt sich die Unabhängigkeit beider Bildungen schon einfach darin, daß die Verhornung der einzelnen Oberhautzelle an ihrer Peripherie vor sich geht, während das Keratohyalin gleichzeitig in ihrer Mitte aus dem Zerfall innerer Zellteile hervorgeht. Für die sonstigen Eigentümlichkeiten des Keratohyalins hat die Erforschung seiner chemischen Zusammensetzung durch die Chromolyse zureichende Erklärungen geliefert, so für die Form und Tingibilität der Körner, für ihr plötzliches Auftreten und Verschwinden.

Es hat sich nämlich gezeigt, daß die Keratohyalinkörner aus drei ganz verschiedenen Eiweißen bestehen, dem basischen Mesoplastin, dem sauren

Globulin und der sauren Zytose; erstere stammen beide aus dem Kern, die letztere aus dem Zelleib.

Betrachten wir zuerst die Form der Körner. Diese zeigt sich verschieden, je nachdem wir das Keratohyalin mit Hämatein + Alaun, dem Hauptfärbemittel seines basischen Eiweißes einfach färben, oder auf seine Überfärbung eine Entfärbung folgen lassen. Bei progressiver, einfacher Färbung erscheint unterhalb der Hornschicht ein dunkles, zusammenhängendes Netz mit massig eingesprengten Körnern von grober, eckiger, unregelmäßiger Form und sehr verschiedener Größe. Dann ist außer dem Keratohyalin noch das Plastin der Kerne und Spongioplasma der Epithelien, wenn auch schwächer, mitgefärbt. Entfärben wir diese Teile durch sauren Alkohol oder Eintauchen in Eisessig, so tritt das Keratohyalin regressiv viel deutlicher hervor als ein Schwarm feinerer, verschieden

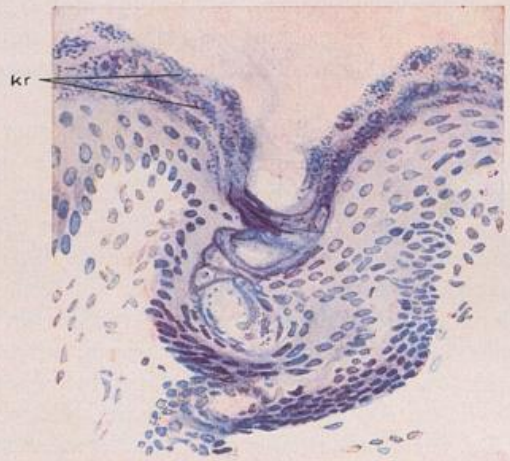


Bild 30.

Keratohyalin (kr). Fußsohle, frisch. Hämatein (Böhmer) 10 Minuten. 3%iger HCl-Alkohol. Alkohol, Öl, Balsam.

großer, rundlicher, glatter, vollkommen voneinander isolierter Körner (Bild 30). Sie sind am dichtesten um den Kern gelagert, werden gegen den äußeren Saum der Epithelzellen immer spärlicher und feiner, um schon vor diesem ganz aufzuhören. Noch stärker, nämlich blauschwarz gefärbt, erhält man die isolierten Keratohyalinkörner, wenn man sie nach der Hämatein + Alaun-Färbung 10 Sekunden in Kalipermanganat $^1/_2{}^0/_{00}$ig taucht, ehe sie in saurem Alkohol entfärbt werden (Bild 31).

In diesen Bildern haben wir nur das aus dem Kerne ausgetretene Mesoplastin vor uns. In der Mitte eines solchen Schwarmes finden wir den atrophischen, aber zum Teil noch gut gefärbten, also noch Mesoplastin enthaltenden Kernrest, während in anderen Körnerzellen die Kernhöhle bereits, wie in den Hornzellen, leer ist.

Man kann auch durch einfache saure Farben ohne Beize das Mesoplastin gefärbt erhalten, und zwar durch den Kontrast zweier saurer Farben, von denen

die eine stärkere Affinität zum Kernplastin, die andere zum Mesoplastin besitzt. Eine solche Darstellung gibt Bild 32. Man färbt mit Nigrosin vor und mit Bestschem Karmin nach. Letzteres verdrängt das Nigrosin aus der gesamten

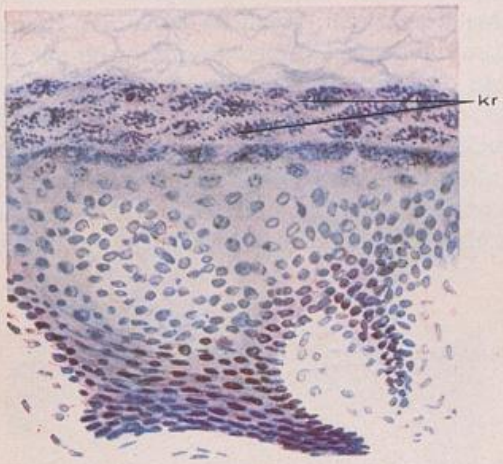


Bild 31.

Keratohyalin (kr). Fußsohle, frisch. Hämatein 10 Minuten, Aqua. $^1/_2{}^0/_{00}$iges Kali hyp. 10 Sekunden, Aqua. Alkohol, Öl, Balsam.

Hornschicht, wobei die infrabasale Schicht, dunkelrot, besonders hervortritt, und färbt außerdem alle Kerne der Stachelschicht. Das Nigrosin bleibt auf dem basischen Kollagen der Kutis fixiert und gibt eine hübsche Darstellung der

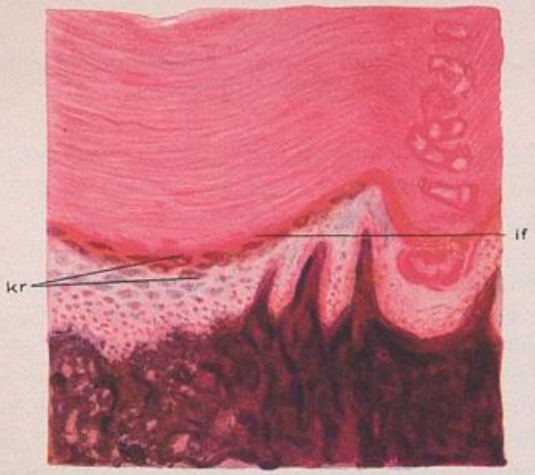


Bild 32.

Keratohyalin (kr). Infrabasale Hornschicht (if). Fußsohle. Alkohol-Paraffin. 1%iges Nigrosin 30 Minuten, Aqua. Karmin Best 5 Minuten. Differenzierungsflüssigkeit: Methylalkohol 10, Aqua destill. 10, NH_3 1 Tropfen. Alkohol, Öl, Balsam.

Papillen. Außerdem gewahrt man schon in der mittleren Stachelschicht schwärzliche Höfe um sämtliche Kerne, die sich, gegen die Hornschicht zu dunkler werdend, bis zur Körnerschicht, als Keratohyalin, verdichten. Unmittelbar über dieser ist die infrabasale Hornschicht als dunkelkarminrotes Band sichtbar.

Das basische Mesoplastin, wenn es auch die Hauptmasse des Keratohyalins ausmacht, verbindet sich in diesem doch noch mit zwei sauren Eiweißen, wie die Chromolyse desselben bei basischen Färbungen lehrt.

Ein Vorversuch mit der Methylgrün + Pyronin + Karbol-Methode beweist zunächst durch das Ausbleiben der Methylgrünfärbung, daß Nukleoproteide im Keratohyalin nicht mehr vorhanden sind. Dagegen wird es von der basischen Farbe: Pyronin und auch von allen anderen basischen Farben außer Methylgrün, so von Methylenblau, Toluidinblau, Fuchsin, Gentianaviolett und Safranin

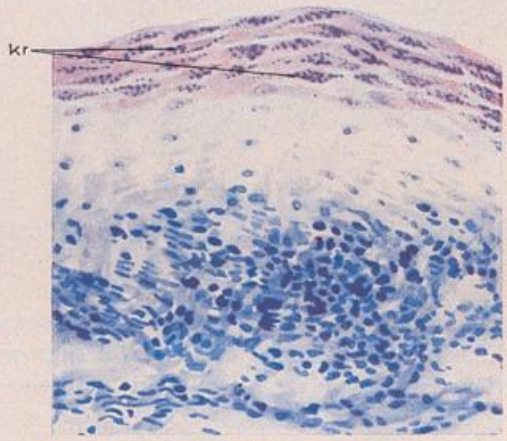


Bild 33.

Keratohyalin (Lichen acum.) (kr). Alkohol, Paraffin, 1% Toluidinblau ½ Stunde Wasser, Alkohol, Öl, Balsam.

gefärbt, unter denen sich Toluidinblau als besonders farbkräftig empfiehlt. Es zeigt sich nun, daß die mit Toluidinblau färbbare Komponente des Keratohyalins durch eine Vorbehandlung mit Wasser von 15°, 37° und 80° und ebenso durch eine 36%ige Kochsalzlösung nicht ausgezogen wird, mithin nicht aus Albumin besteht.

Dagegen spricht ihre Unlöslichkeit in kaltem und heißem Wasser, in konzentrierter Kochsalz- und Ammonsulfatlösung, in Trichloressigsäure, 1%iger Salzsäure und 1%iger Schwefelsäure dafür, daß wir es hier mit einem Globulin zu tun haben. Bild 33 ist das Globulinbild des Keratohyalins, dargestellt in einem Alkohol-Paraffin-Schnitt (von einem Lichen acuminatus) mittels Färbung durch das basische Toluidinblau. Bild 34 zeigt auch das Vorhandensein saurer Eiweiße im Keratohyalin an, und zwar durch Färbung nach Pappenheim-Unna. Während dann das Keratohyalin die basische Farbe Pyronin annimmt, färben sich die Kernreste gleichzeitig mit dem basischen Methylgrün in Kontrastfarbe. Die Kerne der Stachelschicht und Kutis sind blaugrün gefärbt, das Plasma und der größte Teil der Hornschicht rot.

Diesen Globulingehalt des Keratohyalins fand Unna[1]) 1914 auf chromolytischem Wege, und bereits im nächsten Jahre publizierten Kreibich[2]) und im folgenden Herxheimer und Nathan[3]) die interessante Tatsache, daß in den Zellen der Körnerschicht regelmäßig die Kernkörperchen aus dem Kern in den Zellenleib auswandern. Da diese die einzigen Formelemente der Zelle sind, welche innerhalb einer Nukleoproteidhülle Globulin enthalten, so erklärte sich dadurch mit einem Male die Anwesenheit des Globulins auch in dem Komplex des sich frei in der Zelle bildenden Keratohyalins.

Nun war nur noch die Anwesenheit der Zytose in diesem Komplexe festzustellen oder, mit anderen Worten, nachzuweisen, daß auch das in der ganzen Zelle zerstreute Granoplasma bei der Bildung des Keratohyalins beteiligt sei. Dieser Bestandteil des Keratohyalins war schon seit langer Zeit aus zwei Um-

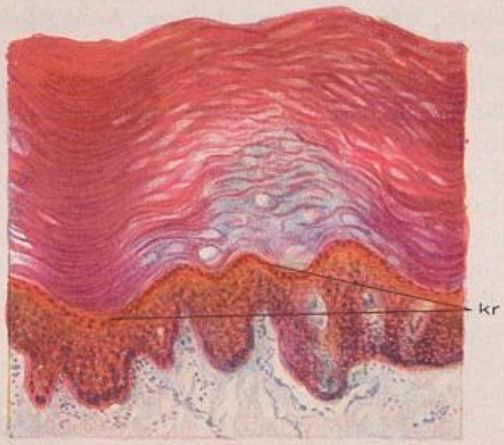


Bild 34.
Keratohyalin (kr). Fußsohle, frisch. Pappenheim-Unna-Färbung 20 Minuten, Wasser, Alkohol, Öl, Balsam.

ständen, allerdings nur mit großer Wahrscheinlichkeit erschlossen worden. Einerseits, weil das Gesamtvolumen des Keratohyalins in einer Körnerzelle stets bei weitem größer war als das des Kerns. Es mußte somit auch ein Bestandteil des Zellenleibes einen Beitrag zu seiner Bildung geliefert haben. Andererseits entsprach die Verteilung des Keratohyalins in der Körnerzelle der des Granoplasmas in den Stachelzellen, aus denen die Körnerzellen hervorgehen. Die Substanz, aus der das Granoplasma besteht, die Zytose, mußte also, wenn diese Schlußfolgerungen richtig waren, neben dem Globulin im Keratohyalin nachgewiesen werden.

Das war nun nicht so ganz leicht, da beide Eiweiße nicht nur die tinkto-

---

[1]) P. G. Unna, Zur Chemie der Zelle. Keratohyalin. Berliner klinische Wochenschrift 1914, Nr. 13.

[2]) Kreibich, Keratohyalin. Archiv für Dermatologie 1915, Bd. 121, Heft 2.

[3]) Herxheimer und Nathan, Über Herkunft und Entstehung des Keratohyalins. Archiv für Dermatologie 1916, Bd. 123, S. 399.

riellen, sondern auch manche chemische Eigenschaften gemeinsam haben, so die Löslichkeit in schwachen und Unlöslichkeit in konzentrierten Neutralsalzlösungen. Doch gelang der chromolytische Nachweis beider nebeneinander unter Benutzung einiger Lösungsverhältnisse, welche bei beiden Substanzen verschieden sind.

Man löst aus denselben Schnitten einer keratohyalinreichen Oberhaut, z. B. der Fußsohle, einerseits nur die Zytose durch heißes Wasser, andererseits nur das Globulin durch konzentrierte Essigsäure heraus. In beiden Fällen erhält man dann bei der Färbung mit Toluidinblau Bilder der sauren Bestandteile des Keratohyalins. Diese Partialbilder des Keratohyalins sind aber nicht gleich. Das mit heißem Wasser behandelte, zytosefreie, globulinhaltige Präparat zeigt es grobkörnig, das mit Essigsäure hergestellte, globulinfreie, zytosehaltige dagegen sehr feinkörnig, staubförmig.

Außerdem gibt dann noch die „Kernkörperchenprobe" auf Globulin einen weiteren Beweis, daß in den mit heißem Wasser behandelten Schnitten das Globulin noch erhalten, in den mit Essigsäure behandelten verschwunden ist. Diese Probe liefern die stets mit Globulin erfüllten Kernkörperchen der Keimschicht und Stachelschicht an denselben Schnitten, die zum Nachweis des Globulins im Keratohyalin mit globulinlösenden Mitteln behandelt werden. Was dort Globulin löst (konzentrierte Essigsäure), beseitigt auch die Hauptmasse aller Kernkörperchen in der Keim- und Stachelschicht derselben Schnitte. Diese „Kernkörperchenprobe" auf Globulin ist einer allgemeinen Anwendung in der Histochemie fähig.

Mit diesem Nachweis der beiden in jeder normalen Epithelzelle vorkommenden sauren Eiweiße neben dem basischen Mesoplastin in dem Komplex des Keratohyalins war nicht nur eine volle Harmonie zwischen den chemischen und histologischen Tatsachen erreicht, sondern auch ein befriedigendes biologisches Verständnis der Keratohyalinbildung. Diese läßt sich nämlich biologisch am einfachsten erklären, wenn man sie als einen Folgezustand des allgemeinen Sauerstoffverlustes auffaßt, der den Beginn jeder Verhornung einleitet. Wie das Sauerstoffreagens, Rongalitweiß zeigt, gehört ein maximaler Sauerstoffgehalt zu den normalen Bestandteilen jedes Kernnukleoproteids, und es ist daher sehr begreiflich, daß ein Sauerstoffverlust an dieser Stelle einen Abbau der Nukleoproteide überhaupt zur Folge hat. Ebenso begreiflich ist es, daß ein solcher Nukleoproteidabbau zuerst an dem abgelegensten, am weitesten vom Blutsauerstoff entfernten Nukleoproteidorte eintreten muß. Dieses ist die Nukleoproteidhülle des ganz zentral gelegenen Kernkörperchens. Ihr Schwund an dieser Stelle macht aber den Globulininhalt des Kernkörperchens frei, und dieser wandert nun — gleichsam aus Nukleoproteidnot — zunächst an den noch nukleoproteidreichen Rand des Kernes, überall die Schmelzfäden des fadenziehenden Nukleoproteids nach sich ziehend, ähnlich wie bei dem künstlichen Transport der Kernbestandteile in Schnitten, die man mit konzentrierten Salzlösungen behandelt[1]), und tritt dann weiter in den Zellenleib selbst ein.

---

[1]) P. G. Unna, Über spontanen und künstlichen Transport von Zellsubstanzen und über Kochsalz als mikrochemisches Reagens. Monatshefte für praktische Dermatologie 1901, Bd. 33, S. 342.

Derselbe, Histologischer Atlas, 6/7, Taf. XXXVIII und XXXIX.

Dem Abbau des Kernkörperchens folgt der des größten Sauerstoffortes, des Kernes, selbst, und an diesem führt der Nukleoproteidverlust zur Bloßlegung des Mesoplastins. Anstatt mit dem sauren Nukleoproteid, verbindet sich nun das freigewordene basische Mesoplastin mit den anderen beiden sauren Eiweißen der Zelle, dem freigewordenen sauren Globulin des Kernkörperchens und weiterhin mit der sauren Zytose des Zellenleibes.

Die Keratohyalinbildung bedeutet also die Entstehung eines vergänglichen Gebildes in der Epithelzelle, das sich beim Untergang ihrer Sauerstofforte: des Kernkörperchens und des Kernes, und zwar in dem Augenblicke bildet, wenn das sie alle überziehende und auseinanderhaltende Nukleoproteid an Sauerstoff verarmt und dem Schwunde anheimfällt. Dieses transitorische Restgebilde, das vollkommen sauerstofflose Keratohyalin, kann natürlich Rongalitweiß nicht mehr bläuen und sich mit Methylgrün nicht mehr färben. Es geht aber seiner Zusammensetzung nach mit den oben genannten basischen Farben, die alle Globulin- und Zytosefärber sind, Verbindungen ein ebenso wie mit dem spezifischen, sauren Mesoplastinfärber: Hämatein + Alaun.

Es fragt sich, ob bei dieser gründlichen Auflösung der Kernsubstanz auch noch deren freiwerdende letzte Grundlage, das Plastin, mit in den Keratohyalinkomplex eingeht. In diesem Falle müßte man, da das Plastin sich mit allen sauren Farben färbt, auch mit einer einfach sauren Farbe ein Bild des Keratohyalins gewinnen. Das ist aber, wenn überhaupt, nur in sehr beschränktem Maße der Fall. Von den gebräuchlichen sauren Farben erzielt man nur mit den stärksten, Wasserblau und Bordo, ein Bild der gröbsten Körner, und diese treten nur undeutlich hervor, da das umliegende Plastin und Spongioplasma stark mitgefärbt werden. Eine gute, isolierte Färbung des Keratohyalins erhält man mit einfachen sauren Farben also nicht. Die in dasselbe eventuell eingehende Plastinmasse ist jedenfalls zu gering und spielt neben der bedeutenden Masse des Mesoplastins keine Rolle.

Gar keinen Teil an der Entstehung des Keratohyalins haben sodann die widerstandsfähigeren Teile der Stachelzelle: das Spongioplasma, die Zellmembran und die basische Grundlage der Epithelfasern, die sämtlich unverändert aus der Stachelschicht durch die Körnerschicht in die Hornschicht übergehen.

Es sind also drei Eiweiße: Mesoplastin, Globulin- und Zytose, aus denen sich beim Schwund der Nukleoproteide diese glänzende Begleiterscheinung der Verhornung aufbaut. Das Wunderbarste dabei ist die Schnelligkeit, mit der sich diese Geburt vor unseren Augen vollzieht. An den meisten Stellen der Haut läuft der ganze Prozeß in einer einzigen Zellenlage ab. Nur an hochgeschichtetem Epithel, wie an der Fußsohle, beim spitzen Kondylom, füllen sich mehrere Zellenlagen (4—6) mit Keratohyalin, ehe die Verhornung eintritt.

Ebenso plötzlich und geschwind vollzieht sich dann wieder der Abbau des Keratohyalins, wobei außer einem Kohlenhydrat eine Reihe gut charakterisierter und tinktoriell nachweisbarer Eiweiße und Lipoide und gewisse Aminosäuren frei werden und die nächsten 2—4 Zellenreihen erfüllen. Es sind dies: Glykogen, die basische Albumosenverbindung: Eleidin, Ölsäure und die Hemigruppe Kühnes: Tyrosin, Tryptophan und Zystin, die ihrerseits wieder zum Aufbau der Hornzellenmembran dienen.

Wie der plötzliche Schwund des Nukleoproteids bei dem eintretenden

Sauerstoffmangel die Entstehung des Keratohyalins einleitet, so signalisiert der rasche Zerfall des Keratohyalins die beginnende Verhornung der Oberhautzelle.

Die Aufklärung der chemischen Struktur des Keratohyalins gibt uns ferner auch Fingerzeige für die möglichen tinktoriellen Darstellungen desselben. Den drei Eiweißen, aus denen es besteht, müßten eigentlich drei verschiedene Färbungen entsprechen. Da aber die Färbungen für das Globulin und für die Zytose zusammenfallen, gibt es nur zwei grundverschiedene Arten der Färbung, eine saure für das basische Mesoplastin und eine basische für die gleichzeitige Färbung des Globulins und der Zytose. Will man auch diese getrennt erhalten, so muß man die Schnitte vor der Färbung, wie schon erwähnt, entweder mit heißem Wasser oder konzentrierter Essigsäure behandeln.

a) Die Mesoplastinfärbung des Keratohyalins (Bild 30).

Sie geschieht mit dem spezifischen Färber des Mesoplastins, einer Lösung von Hämatein + Alaun. Nach Überfärbung mit dieser entfärbt man gewöhnlich mit salzsaurem Alkohol oder Essigsäure. Das hat seine Berechtigung, da das Mesoplastin in beiden Säuren unlöslich ist. Aber noch farbkräftigere Bilder erhält man, wenn man das Hämatein in den Schnitten vor der Entwässerung in Alkohol durch Eintauchen in stark oxydierende Mittel noch weiter oxydiert, z. B. durch Wasserstoffsuperoxyd, Chromsäure oder Kalipermanganat, am besten durch letzteres.

Die Formel für diese Färbung (Bild 31) lautet also:

1. Lösung von Hämatein + Alaun, 5 Minuten.
2. In Leitungswasser gründlich abspülen.
3. $^1/_2\,^0/_{00}$ige Lösung von Kalipermanganat, nur kurz eintauchen.
4. In Leitungswasser gründlich abspülen.
5. Alkohol absolutus, Öl, Balsam.

b) Die Globulin- und Zytose-Färbung des Keratohyalins (Bild 34).

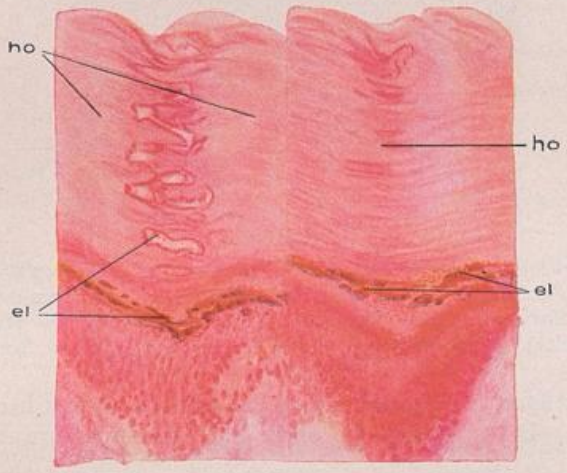
Diese Färbung geschieht am zweckmäßigsten mit dem Dibasichrom von Pappenheim-Unna, da man dann gleichzeitig die Kerne durch das Methylgrün in Kontrastfarbe und dadurch besonders klare Bilder über den Zerfall des Kernes und die Bildung des Keratohyalins erhält; allerdings nur eines kleineren Teiles vom Keratohyalin, nämlich nur seiner sauren Eiweiße. Daher sind diese Bilder sehr fein und viel zarter als die gröberen Mesoplastinbilder. Man hat aber nicht nur den Vorteil, neben den pyroninroten Keratohyalinkörnern noch die sauren Nukleoproteidreste als blaugrüne Tropfen zu erkennen, sondern durch die pyroninrote Färbung der Granoplasmakörnchen im Zellenleibe den Übergang auch dieser in das Keratohyalin der Körnerschicht. Dadurch entsteht hier ein wolkiges, weniger scharf abgesetztes Bild der Körnerschicht als bei ihrer Mesoplastinfärbung.

Die Formel der Pappenheim-Unna-Färbung hierfür lautet:

1. Methylgrün + Pyronin + Karbol-Mischung, 20 Minuten.
2. Kurz abspülen in Wasser.
3. Kurz Alkohol absolutus.
4. Öl, Balsam.

Eleidin.

Das Eleidin wurde von Ranvier entdeckt, welcher vorzugsweise mit dem Dioxychrom: Pikrokarmin arbeitete. Diesem scharfsinnigen Histologen konnte es nicht entgehen, daß in den von ihm aus freier Hand gemachten Schnitten durch die Hornschicht der Fußsohle neben der pikringelb gefärbten, harten Hornsubstanz eine dickflüssige Masse vorhanden war, welche sich gleichzeitig mit dem Karmin seines Pikrokarminats rot färbte und, besonders klar in der Höhe der basalen Hornschicht, aus den angeschnittenen Hornzellen hervorquellend, sich auf deren Oberfläche in Form von Strandlinien ablagerte. Da diese tropfbar flüssige Masse fettähnlich glänzend aussah, nannte er sie: Eleidin.



Oberfläche. Unterfläche.

Bild 35.

Eleidin (Fußsohle, Alkohol-Paraffin) zeigt in einem Doppelbild das auf die Oberfläche und Unterfläche eines und desselben Schnittes heraustretende Eleidin (el) in der Höhe der basalen Hornschicht (ho). Karminfärbung nach Best 5 Minuten. Zweimal Differenzierungsflüssigkeit: Aqua destill., 10 Tropfen, Methylalkohol 10 Tropfen, Liqu. ammon. caust. 1 Tropfen, 5 Minuten und 3 Minuten. Alkohol, Öl, Balsam.

In Bild 35 sind die Tröpfchen des Eleidins mittels des Bestschen Karmins dargestellt, und zwar die Bilder der Ober- und Unterfläche eines und desselben Schnittes nebeneinander, wie sie beim Gebrauche der Mikrometerschraube sukzessive hervortreten. Das Bild 36 zeigt uns die Eleidintropfen im Kontrast mit einer vorhergehenden Pikrinfärbung. Auch stellen wir heute noch das Eleidin nach dem Prinzip von Ranvier dar mittels eines pikrinhaltigen Dioxychroms; nur haben wir den Karmin durch Nigrosin ersetzt (Wile[1], 1909). Das Pikronigrosin gibt noch schärfere Kontraste zwischen gelber Hornschicht und blauschwarzem Eleidin. Das Bild 37 zeigt einen solchen Schnitt durch die in Alkohol und Paraffin gebrachte Fußsohlenhaut. Die Kutis ist durch Nigrosin dunkelblau

[1]) Udo J. Wile, Das Eleidin der basalen und superbasalen Hornschicht. Monatshefte für praktische Dermatologie 1909, Bd. 48, S. 245.

gefärbt, ebenso die Kerne der Stachelschicht, während das reduzierende Plasma etwas Pikrinsäure aufgenommen hat, so daß die Stachelschicht im ganzen

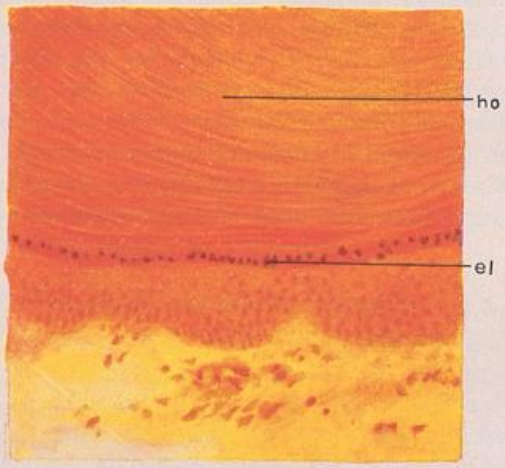


Bild 36.

Eleidin (el). Fußsohle, .Alkohol-Paraffin. Eleidintropfen der Oberfläche des Schnittes in der Höhe der basalen Hornschicht (ho). Färbung: Pikrokarmin (nach Best). Die Pikrinsäure färbt die Cutis durch Säure-Basen-Affinität, die Hornschicht durch oxypolare Affinität. Pikrinsäurevorfärbung 2 Minuten, Karmin Best wie Bild 35.

grünlichgrau erscheint. Die basale Hornschicht ist als stark reduzierende Schicht rein pikringelb gefärbt; ebenso die obere und mittlere Hornschicht. Nur die

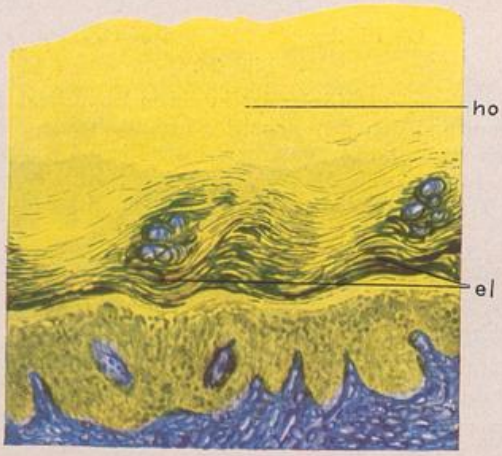


Bild 37.

Eleidin (el). Fußsohle, frisch. Pikrinsäure. Nigrosin. Hornschicht (ho).

suprabasale Hornschicht zeigt, besonders um die Schweißporen, durch ihre blauschwärzliche Färbung mit dem sauren Nigrosin einen erheblichen Gehalt der Hornzelle an dem basischen Eleidin an.

Dieser Eleidingehalt der Hornschicht tritt schon sehr früh, in den letzten Embryonalmonaten, auf, viel früher als die Keratohyalinbildung beginnt. Das Eleidin findet sich daher bereits wohlausgeprägt in der Vernix caseosa des Neugeborenen. Bild 38 gibt einen Schnitt durch die Haut eines Neugeborenen wieder mit darauf sitzender Vernix. Die Fixation geschah in Flemmings Lösung; durch die Osmiumsäure wurde der Inhalt einer Talgdrüse (ta) geschwärzt und oberflächliche Lagen der Vernix gelblichgrau gefärbt. Eine Nigrosinfärbung des Schnittes ergab dann eine blauschwarze Linie, dem Eleidingehalt dieser jugendlichen Oberhaut entsprechend (Bild 38).

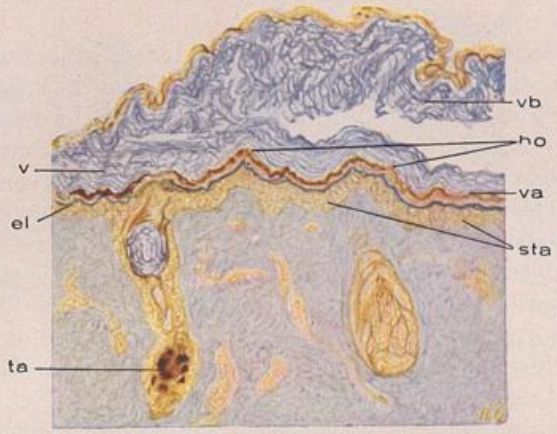


Bild 38.

Eleidin der Haut eines Neugeborenen, die noch mit Vernix caseosa (v) bedeckt ist. Fixierung in Flemmings Lösung. Nigrosinfärbung. (Vgl. auch Kapitel: Vernix caseosa.) V. a = haftende Vernixschicht. V. b = sich ablösende Vernixschicht. ta = Talgdrüse. sta = Stachelschicht. el = durch Nigrosin blaugefärbte Lage des Eleidins. ho = durch Osmium geschwärzte Lage der Hornschicht des Neugeborenen.

Sowohl beim Pikrokarmin wie beim Pikronigrosin benutzen wir den Umstand, daß — im Gegensatz zum Eleidin — die Hornsubstanz stark reduziert ist und daher eine besonders starke Affinität zu der hoch oxydierten Pikrinsäure besitzt, während sie das saure Nigrosin dem basischen Eleidin überläßt. Bei dieser Methode walten mithin beide Arten der Affinität ob, beim Eleidin die Base-Säure-Affinität, beim Keratin die oxypolare.

Pikro-Nigrosin-Färbung.

1. Konzentrierte wässerige Pikrinsäurelösung 5 Minuten, Wasser.
2. 1%ige wässerige Nigrosinlösung 1 Minute, Wasser.
3. Alkohol, Öl, Balsam.

Gegen Ranviers Ansicht, daß im Eleidin ein fettähnlicher Körper vorliege, erhob sich zunächst Ciliano[1]) (1908), der auf Lösungsversuchen fußend, die glänzende in der basalen Hornschicht eingeschlossene Flüssigkeit für ein

[1]) Ciliano, Eleidin. Monatshefte für praktische Dermatologie, 1908, Bd. 46, S. 435.

Albumin, also ein genuines Eiweiß erklärte. Ihm gegenüber vermutete dagegen Liebreich in dem Eleidin ein Gemisch von Eiweiß und Fett und kam damit der Wahrheit ziemlich nahe. Wile endlich konstatierte das Vorkommen von Eleidin in Form perinukleärer Ringe in der superbasalen Hornschicht, und Lorberbaum[1]) (1925) fand es bei chromolytisch vorbehandelten Schnitten in allen Lagen der Hornschicht, so daß sich die Lagerung um die Kernhöhlen der Hornzellen allgemein als ein Zeichen beginnender Lösung des Eleidins erwies. Derselbe Autor konnte auch, gestützt auf die chromolytische Untersuchung von Gefrierschnitten der Hornschicht, nachweisen, daß bei der gebräuchlichen, kurzen Alkoholfixation der Hornschicht immer schon ein Teil des Eleidins der Lösung anheimfällt und nicht im Schnitt erscheint.

Erst die Darstellung des Eleidins in Gefrierschnitten ergibt denn auch das vollständige, das wirkliche Bild des Eleidins. Dasselbe zeigt topographische Verschiedenheiten je nach dem Sitze und der Dicke der Hornschicht. Es verhält sich anders in der Fußsohlenmitte, wo die Hornschicht dünner ist, als in der dicken Hornschicht der Hacke und der Zehenballen. Dort unterscheidet man durchweg drei Schichten, eine untere, eleidinfreie, bei Pikronigrosinfärbung gelbe, infrabasale, sodann eine mittlere, blauschwarze, die basale und mittlere Hornschicht umfassende, die reich an Eleidin ist, und eine obere, mit der Endschicht zusammenfallende, die wiederum gelb ist und des Eleidins entbehrt. An der dicken Hornschicht der Hacke und Fußballen tritt zu dieser horizontalen Schichtung des Eleidins eine vertikale infolge der hier steilwelligen Anordnung des epithelialen Leistensystems und des Papillarkörpers und der daher möglichen Unterscheidung von „Bergen“ und „Tälern“ in der Hornschicht.

In den Wellenbergen oberhalb der Papillenköpfe, wo in der dicken Hornschicht sich ein Flüssigkeitsmaximum befindet, zeigt die Pikronigrosinfärbung auch einen reichen Gehalt an blauschwarzem Eleidin; man kann hier also auch von einem Eleidinmaximum reden. Im Gegensatze dazu sind die Wellentäler der Hornschicht sehr arm an Eleidin, ebenso wie die Endschicht; diese trockensten Regionen der Hornschicht scheinen nur aus Hornsubstanz zu bestehen.

Es ist das Verdienst von Lorberbaum, gezeigt zu haben, daß dieser Schein trügt. Bei Vorbehandlung der Schnitte mit Säuren und Alkalien, welche eine Quellung der Schnitte bewirken, zeigt die nachfolgende Pikronigrosinfärbung auch diese Hornschichtregionen beladen mit Eleidin, welches in trockenem Zustande, von Keratin umhüllt, nicht färbbar war. Lorberbaum nannte dieses erst bei der Chromolyse sichtbar werdende Eleidin: latentes Eleidin.

Das Bild 39 gibt einen Schnitt derselben Fußsohlenhaut wie das Bild 37, aber nach dreistündiger Vorbehandlung mit 3% Salzsäure. Aus den Hornzellen ist dadurch das Eleidin freigeworden und färbt sich durch Pikronigrosin blauschwarz. Man sieht, daß nur die Wellentäler frei davon sind, während die Wellenberge ein Maximum davon tragen sowie die normalerweise davon ganz freie Endschicht.

Das latente Eleidin hat ganz dieselben Lösungs- und Fällungseigenschaften wie das normale Eleidin. Es ist wie dieses völlig löslich in kochendem Wasser,

---

[1]) Leon Lorberbaum und P. G. Unna, Das Eleidin. Eine chromolytische Studie. Dermatologische Wochenschrift 1925, S. 1519.

bei Körpertemperatur in starken und mittelstarken Säuren und Alkalien, dagegen unlöslich in Essigsäure, Salzlösungen und Alkaloidreagenzien.

Die Löslichkeit in kochendem Wasser und warmer Salpetersäure spricht genauer dafür, daß der eiweißartige Anteil des Eleidins eine Albumose, und seine Färbbarkeit nur mit sauren Farben, daß er eine basische Albumose ist. Lorberbaum konnte diese als ein Histon dadurch näher kennzeichnen, daß sie auch schon von verdünnten Salzlösungen und von Alkaloidreagenzien in neutraler Lösung gefällt wird. Von den basischen Protaminen unterscheidet sich der Eiweißanteil des Eleidins durch seine Löslichkeit in Pepsin + HCl.

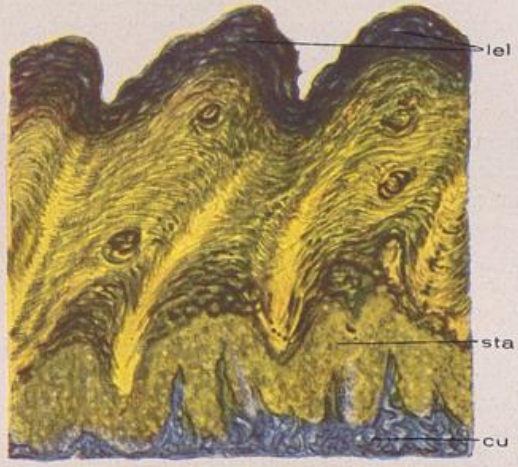


Bild 39.
Latentes Eleidin (lel). Fußsohle, frisch. Vorbehandlung mit 3%iger Salzsäure. Pikrinsäure, Nigrosin. Stachelschicht (sta), Cutis (cu).

Somit stellt das Eleidin chemisch eine Verbindung dar von Histon mit den Cholesterinestern, die bereits Unna und Golodetz[1]) als universelle Bestandteile der Hornschicht nachgewiesen haben. Diese beiden Anteile des Eleidins, der eiweißartige und fettartige, sind so fest verbunden, daß, um die Hornschicht von beiden gleichzeitig zu befreien, die Lösung nur eines Anteils bei genügend langer Einwirkung ausreicht; so kann es z. B. allein durch Kochen mit Wasser ebenso gut geschehen wie allein durch längere Behandlung mit Benzin bei 60°.

Lorberbaum kommt zu dem Schlusse, daß die von Unna und Golodetz[2]) makrochemisch dargestellten Hornalbumosen identisch sind mit dem Eleidin der Histologen und also auch eine chemische Verbindung von Histon mit Cholesterinestern darstellen.

---

[1]) P. G. Unna und Golodetz, Zur Chemie der Haut, I. Der mikrochemische Nachweis des Cholesterins in der menschlichen Haut. Monatshefte für praktische Dermatologie 1908, Bd. 47, S. 179 und 242.

Dieselben, Die Cholesterinester der Hornschicht. Biochemische Zeitschrift 1910, Bd. 25, Heft 4/5, S. 425.

[2]) P. G. Unna und Golodetz, Neue Studien über die Hornsubstanz, I. Monatshefte für praktische Dermatologie 1907, Bd. 44, S. 397. und II. Ebd. 1908, Bd. 47, S. 62.

Dieselben, Die Hornalbumosen und ihre Bedeutung für die Dermatologie. Dermatologische Wochenschrift 1917, S. 369.

Das Trichohyalin der Wurzelscheide.

Die feinere Histologie der Wurzelscheide ist nicht so bekannt, daß es sich nicht verlohnte, ehe wir auf die Histochemie derselben eingehen, vorher einen kurzen Überblick über die hier in Betracht kommenden histologischen Elemente zu geben.

Wenn sich aus dem in die Tiefe der Haut vorgedrungenen Epithelfortsatz ein Haar bildet, erhebt sich nicht nur in der Mitte desselben über der Papille durch rasches Epithelwachstum ein nach oben zugespitztes kegelförmiges Gebilde, der „primitive Haarkegel", sondern gleichzeitig mit ihm vom Halse der Papille aus in der Form eines Kegelmantels ein Epithelgebilde eigener Art, welches den Haarkegel allseitig umgibt, ein aus drei Zellenlagen bestehender Hohlkegel. Dieser ist die Anlage der Wurzelscheide.

In diesem eigenartigen Hüllgebilde klingen die nicht unbedeutenden Druckkräfte ab, welche vom stark wachsenden Haarkeime ausgehen und allen Zellenlagen dieser Region besondere Formen aufprägen. Nach außen davon bleibt die übrige Stachelschicht des Epithelfortsatzes ruhig liegen, vom Haarwachstum unberührt[1]). Nur die Wurzelscheide wächst mit dem Haar aus der Tiefe hervor und wird, wenn das schneller wachsende Haar die Oberfläche der Haut erreicht, von diesem durchbrochen. Im oberen Drittel des Haarbalges, in der Gegend, wo die Talgdrüsen ihr Sekret dem Haare zuführen, bröckelt auch die Wurzelscheide Zelle für Zelle ab, es sei denn, daß sie, unter pathologischen Verhältnissen stärker zusammenhaltend, das Haar noch streckenweise begleitet und dann wie eine Manschette umgibt.

Da die Wurzelscheide gerade dort abbröckelt, wo das Haar sich frei über die Oberfläche der Haut erhebt, kann man sie nicht als eine Schutzhülle für das Haar betrachten. Ebensowenig hat sie eine mechanische Funktion gegenüber dem Epithel des Haarbalges zu verrichten. Sie ist nur die Folge und der Ausdruck der übermächtigen Zellvermehrung des Keimepithels an der Papille mit ihrem halbkugelförmig nach außen und oben gerichteten Wachstumsdruck, welches durch den Widerstand des zylindrischen, nach unten abgeschlossenen Haarbalges in eine einseitig nach oben gerichtete, vertikale Bewegung gedrängt wird. Indem sie diese Umformung der Druckrichtungen aus einer ursprünglich die Papille gleichmäßig umgebenden Hohlkugel in einen der Papille aufsitzenden Hohlzylinder in sich aufnimmt, stellt sie als Ganzes, trotz ihrer Zusammensetzung aus drei Zellenlagen, einen einheitlichen, fest zusammengepreßten Hohlzylinder dar, die Gleitschiene des Papillenhaares für seinen Durchgang durch den Haarbalg.

---

[1]) Es ist eine zu Mißverständnissen führende, aber hartnäckig wiederkehrende Bezeichnung, welche diesen Rest der Oberhaut des Haarbalges „äußere Wurzelscheide" nennt; sie ist so widersinnig, als wenn man den Kasten, in dem ein in seiner Scheide steckender Säbel aufbewahrt wird, als „äußere Säbelscheide" bezeichnen würde. Sie stützte sich bei Henle, welcher die Ausdrücke: „äußere und innere Wurzelscheide" einführte, auf die falsche Ansicht, daß die Wurzelscheide die Hornschicht der Oberhaut des Haarbalges sei, also von außen nach innen wüchse. Schon Reichert wies ihm nach, daß sie vom Grunde des Balges nach oben wächst. 1875 gab ich dann die genaue Beschreibung der Mutterzellen der Wurzelscheide am Grunde des Haarbalges, am Papillenhalse, die 1876 von v. Ebner bestätigt wurde. 1889 nahm Kölliker in seinem klassischen Lehrbuche meine Bezeichnungen: Wurzelscheide und Oberhaut (Stachelschicht) des Haarbalges an statt: „zweier Wurzelscheiden", deren Annahme von jeher eine unnötige und verwirrende Komplikation in die Lehre vom Haar gebracht hat. Es gibt also nur eine Wurzelscheide. Das ist nun seit 50 Jahren bekannt; aber die Lehrbücher wiederholen immer noch den alten Irrtum von den „zwei Wurzelscheiden".

Diese einheitliche Funktion der Wurzelscheide verträgt sich sehr wohl mit einer großen Verschiedenartigkeit der Zellformen der einzelnen Lagen innerhalb derselben, welche sich daraus erklärt, daß die Mutterzellen nicht auf einer ebenen Fläche, sondern in verschiedenen Höhen des Papillenhalses angeordnet sind. Dadurch wird es bewirkt, daß die äußere der drei Lagen, die Henlesche Schicht, welche tiefer unten am Papillenhalse entsteht, die etwas höher oben entspringende Huxleysche Schicht von außen umgreifen muß, wodurch sie natürlich einem größeren Gegendrucke von außen ausgesetzt ist. Ein sicherer Beweis hierfür ist die Tatsache, daß sie bedeutend früher, d. h. tiefer unten im Balge, bereits verhornt als die Huxleysche Schicht.

Besonders in die Augen springend ist der die Verhornung begünstigende Einfluß des äußeren Druckes am Kreise des größten Druckes, am Papillenäquator, indem hier nicht die dem Haare näher liegende Huxleyschicht, wohl aber die weiter nach außen liegende Henleschicht plötzlich verhornt.

Abgesehen von etwas verschiedenen Zellformen (Henlezellen breiter, polygonal, quer abgestutzt; Huxleyzellen schmäler, spitzer ausgezogen, spindelförmig) und dem verschiedenen Termin der Verhornung sind die beiden äußeren Lagen der Wurzelscheide sonst ziemlich gleichartig gebaut, wie sie denn auch weiter oben im Balge wieder zu einer einheitlichen Membran verschmelzen. Abweichend gebaut ist dagegen die innerste, dritte Lage, das „Oberhäutchen der Wurzelscheide". Seine Mutterzellen am Papillenhalse erhalten den geringsten Nachschub, bilden daher keine Folge von Zylinderzellen, sondern bleiben kubisch und werden durch den radiären Druck zu flachen Bändern gepreßt, welche senkrecht zu den Zellen der beiden anderen Schichten, also im Balge horizontal mit spiraliger Aufwärtsdrehung orientiert sind. Die dürftige Ausbildung und der minimale Zellinhalt harmonieren mit der besonderen Funktion des Oberhäutchens der Wurzelscheide, die Grenzschicht gegen das rascher innen aufsteigende Haar zu bilden. Als solche hat sie ihr Gegenstück in dem Oberhäutchen des Haares selbst, welches von ähnlich plasmaarmen Zellen gebildet wird, die aber vertikal wie die Haarzellen selbst orientiert sind. Beide Oberhäutchen entspringen von benachbarten und völlig gleichen — nämlich pigment- und trichohyalinlosen — Mutterzellen am Papillenhalse und sind eine Zeitlang nach ihrer Verhornung noch sperrzähnig verbunden, lösen sich aber weiter oben im Balge voneinander, wodurch sich jene kapilläre Spalte zwischen Wurzelscheide und Haarschaft vorbereitet, welche für das Eindringen von Spalt- und Fadenpilzen in das Haar später so wichtig ist.

Würde nun die Verhornung der Henleschicht und Huxleyschicht so einfach vor sich gehen wie bei den beiden Oberhäutchen, als bloße Abplattung, Eintrocknung, Homogenisierung, so würde es nicht zu jenen auffallenden tinktoriellen Gegensätzen kommen, welche von jeher das Studium der Wurzelscheide ebenso interessant wie rätselvoll gemacht haben. Diese tinktorielle Auszeichnung verdankt die Wurzelscheide in erster Linie dem Auftreten eines Begleit- oder Nebenproduktes der Verhornung, dem Trichohyalin.

Das Trichohyalin stellt bei der Verhornung der Haarwurzelscheide und des Haarmarks eine ebenso regelmäßige Begleiterscheinung dar wie das Keratohyalin bei der Verhornung des Deckepithels. Es erhielt sogleich nach seiner Entdeckung durch Unna[1]) und Ebner[2]) eine gewisse Bedeutung in der Frage,

[1]) Unna, Beiträge zur Histologie und Entwicklungsgeschichte der menschlichen Oberhaut und ihrer Anhangsgebilde. Dissertation Straßburg und Archiv für mikroskopische Anatomie 1876, Bd. XII, S. 32.

[2]) v. Ebner, Mikroskopische Studien über Wachstum und Wechsel der Haare. Wiener Sitzungsberichte, Bd. 74.

ob die Wurzelscheide, damals sogenannte „innere Wurzelscheide“ genannt, ein einheitliches Gebilde darstelle, oder aus zwei genetisch verschiedenen Schichten bestände. Henle und nach ihm Bisiadecki hatten letzteres angenommen und glaubten, daß die äußere (Henlesche) Zellenlage von der Stachelschicht des Haarbalges als deren Hornschicht abzuleiten sei, während die innere (Huxleysche) zum Haarschaft gehöre. Da trat nun die tiefrote schöne Färbung, welche die Mutterzellen der gesamten Wurzelscheide bei der Pikrokarminfärbung annehmen, entscheidend ein. Mit Hilfe derselben konnte gezeigt werden, daß beide Schichten einen einheitlichen Mutterboden am Papillenhalse besitzen und daß die Mutterzellen sämtlich durch einen reichen Gehalt an dunkelkarminrot sich färbenden Körnchen ausgezeichnet sind, und zwar so scharf, daß die außen angrenzenden Stachelzellen des Haarbalges ebenso leicht und sicher von ihnen unterschieden werden können wie die innen angrenzenden der beiden Oberhäutchen.

Denn diesen fehlen eben bei der Pikrokarminfärbung — innen wie außen — die roten, jetzt Trichohyalin genannten Körner gänzlich. Dadurch entsteht bei dieser Färbung ein höchst auffallendes Bild im untersten Teil der Haarwurzel, nämlich eine konzentrische Umhüllung der letzteren durch eine sich rot färbende körnchenhaltige Schicht[1]).

Es blieb Vörner[2]) vorbehalten, die von Anfang an beobachteten Verschiedenheiten zwischen diesen karminophilen Körnern und den ähnlichen Keratohyalinkörnern des Deckepithels genauer zu schildern und daraufhin ihnen einen eigenen Namen: Trichohyalin zu geben, wie er präziser nicht gewählt werden konnte. Denn eine Substanz von gleichen morphologischen und chemischen Eigenschaften wurde bisher noch nirgends als eben nur im Haar gefunden. Andererseits konnte man erst nach Aufstellung eines solchen Parallelbegriffes zum Keratohyalin ernstlich daran gehen, die bei aller äußerlichen Ähnlichkeit doch grundverschiedene Beschaffenheit dieser beiden „Nebenprodukte der Verhornung“ festzustellen.

Gemeinsam mit den Keratohyalinkörnern hat das Trichohyalin nur sein plötzliches Auftreten in einer verhornenden Epithelzelle, seinen Glanz und seine starke Tingibilität mit Karmin. Dagegen ist es von weicherer Konsistenz, zähflüssig und daher in seiner Form ganz von seiner Umgebung abhängig, teils rundlich, teils stäbchenförmig; durch äußeren Druck wird es eingedellt und sogar perforiert.

Wesentlicher noch ist seine völlige Unabhängigkeit vom Kern, der neben dem Trichohyalin erhalten bleibt und weder atrophiert noch zerfällt, wie beim Keratohyalin. Das Trichohyalin nimmt daher auch keinen Kernbestandteil in sich auf, vor allem kein Mesoplastin und färbt sich daher auch nicht, wie das Keratohyalin, mit Hämatein + Alaun.

---

[1]) Unna nannte dieselbe vorläufig den „roten Mantel“ der Haarwurzel und ließ sie in den Figuren 7, 8, 10 und 12 seiner Dissertation (Straßburg 1876) abbilden. Derselbe „rote Mantel“ gleichzeitig mit dem Trichohyalin des Haarmarks ist dann 1883 noch einmal bei starker Vergrößerung in Fig. 11 seiner Entwicklungsgeschichte und Anatomie der Haut (Ziemssens Handbuch der speziellen Pathologie und Therapie, Bd. XIV, S. 63) abgebildet worden.

[2]) Vörner, Über Trichohyalin. Dermatologische Zeitschrift 1903, Bd. X, Heft 4.

Während das Keratohyalin sich nur wenige Zellenlagen hindurch erhält, ehe es in der Hornschicht verschwindet, findet man das Trichohyalin unverändert in einer langen Folge von Zellen, ehe diese in die verhornte, glasige Wurzelscheide übergehen. Dabei behält die innere, Huxleysche Schicht ihr Trichohyalin viel länger bei als die äußere, Henlesche, an den Kopfhaaren beispielsweise durch 42—50 Zellen, während die Henlesche bereits nach 15—20 Zellen verhornt (v. Brunn). So kommt es, daß die trichohyalinhaltigen und daher nach außen bucklig gestalteten Zellen der noch nicht verhornten Huxleyschen Schicht die ihnen außen dicht anliegenden, aber bereits verhornten Plättchen der Henlescheide auseinander treiben und sie als Ganzes durchlöchern. Eine „gefensterte Membran" wird somit die Henlesche Schicht der Wurzelscheide erst durch den Druck von innen her, den die mit ihr zusammengepreßten und das flüssige Trichohyalin beherbergenden Vorsprünge der Huxleyschen Zellen auf sie ausüben. Gerade wegen der flüssigen Konsistenz ihres Inhaltes sind diese Vorsprünge geeignet, den Gesamtdruck der Haarwurzel punktweise nach außen zu übertragen, nämlich an den Stellen, wo ihnen die in Rückbildung begriffenen Henleschen Zellen außen dicht anliegen. So kommt es hier zu jener auffallenden inneren Deformation der Haarhüllen durch Druck, als deren Ergebnis wir die von Henle zuerst 1841 beschriebene „gefensterte Membran" der Wurzelscheide anzusehen haben.

Es wäre empfehlenswert, der mithin nicht unwichtigen, zähflüssigen Konsistenz des Trichohyalins im Gegensatz zu der festen Beschaffenheit des Keratohyalins dadurch Ausdruck zu verleihen, daß man die einzelnen Körner des Trichohyalins fortan als Tropfen oder Tröpfchen bezeichnete. Dieselben bestehen aus einer basischen Eiweißsubstanz, die sich intensiv mit sauren Farben färbt.

In früherer Zeit bediente man sich dazu des Pikrokarmins nach Ranviers Vorschrift, welche Färbung auch zur Entdeckung des Trichohyalins geführt hatte. An seine Stelle trat neuerdings das Pikrobordo.

a) Pikrobordofärbung für Trichohyalin (Bilder 40 a und b).

1. 1%ige Bordolösung $^1/_2$ Minute, Wasser.
2. Konzentrierte alkoholische Pikrinsäurelösung 1 Minute, Wasser, bis kein Pikringelb mehr abgeht.
3. Alkohol absolutus + 3 Tropfen einer 3%igen Ammoniaklösung, welcher durch weitere Entfärbung zur Isolierung des Trichohyalins führt.
4. Alkohol, Öl, Balsam.

Der Zusatz von Pikrinsäure ist auch bei der Azofarbe: Bordo notwendig, um die Färbung auf das basische Trichohyalin zu beschränken und dieses zugleich vor Auflösung zu bewahren.

Im Gegensatz zu den sauren Farben: Karmin und Bordo, färbt das saure Farbgemisch: Hämatein + Alaun das Trichohyalin nicht, eignet sich aber deswegen gerade für eine Doppelfärbung der Mutterzellen der Wurzelscheide, in denen sich dann die Kerne mit Hämatein blau färben und von bordoroten Trichohyalintropfen umringt sind.

b) Bordo—Hämatein-Färbung (Bild 41).

1. 1%ige Bordolösung, $^1/_2$ Minute ,Wasser.
2. Hämatein + Alaun-Lösung 15 Sekunden, Wasser.

3. Alkohol absolutus + 3 Tropfen 3%iger Ammoniaklösung, 30 Sekunden.
4. Alkohol, Öl, Balsam.

Zu einer Kontrastfärbung der Kerne der Wurzelscheide gegen deren Trichohyalin kann man außer dem Gegensatz: Mesoplastin gegen Trichohyalin natürlich auch den Gegensatz: Nukleoproteid gegen Trichohyalin benutzen. Hierzu dient die

c) Methylgrün—Bordo-Färbung (Bild 42).

1. $^1/_4$%iges Methylgrün 10 Sekunden, Wasser.
2. Ammoniakalische Bordolösung $^1/_2$ Minute,

$$\left.\begin{matrix} 4 \text{ Teile } 1\%\text{iges Bordo} + \\ 2^1/_2 \text{ „ } 3\%\text{iges } NH_3 \end{matrix}\right\}, \text{ Wasser.}$$

3. Zweite Färbung mit $^1/_4$%igem Methylgrün 30 Sekunden, Wasser.
4. Ammoniakalkohol

$$\left.\begin{matrix} \text{auf 1 Schälchen Alkohol absolutus} \\ 3 \text{ Tropfen } 3\%\text{iges } NH_3 \end{matrix}\right\}$$

bis der Schnitt nur noch schwach rot ist.

5. Zweimal Alkohol absolutus zur vollständigen Entwässerung, wobei der Schnitt noch rot bleibt.
6. Bergamottöl, worin der Schnitt wieder ergrünt, Balsam.

Der neu eingeführte Zusatz von NH_3 zur Bordolösung verfolgt den doppelten Zweck, erstens die Bordofärbung auf das basische Trichohyalin zu beschränken und weiter die sauren Eiweiße (Nukleoproteid und verhornte Wurzelscheide) in

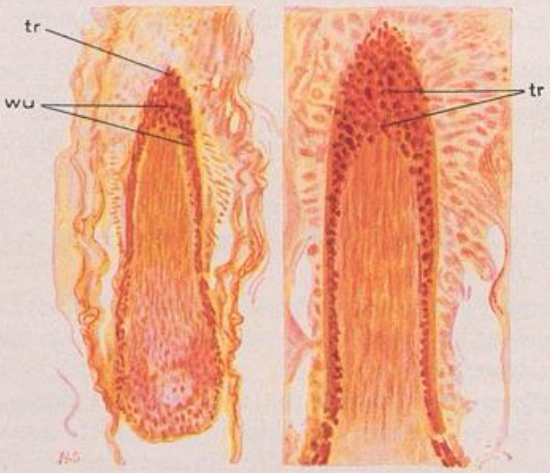


Bild 40 a. Bild 40 b.

Bild 40 a. Trichohyalin (tr). Kopfhaut in Alkohol fixiert, Paraffin. Papillenhaar. Längsschnitt etwas schräg nach vorn übergeneigt, so daß der Schnitt oben in einen Flachschnitt der Wurzelscheide (wu) übergeht. Pikro-Bordo-Färbung.

Bild 40 b. Dasselbe vergrößert, um die verschiedene Form der Trichohyalintröpfchen (tr) zu zeigen.

ihrem Säuregrad abzuschwächen. Dadurch wird erreicht, daß die Kernfärbung hinter der Trichohyalinfärbung zurücktritt. Allerdings wird die grüne Wurzelscheidenfärbung durch die ammoniakalische Bordofärbung so sehr abgeschwächt, daß sie durch eine zweite Färbung (Formel 3), verstärkt werden muß.

Mit dem Übergange der trichohyalinhaltigen in die verhornten Zellen der Wurzelscheide ändert sich plötzlich der chemische Charakter der Zellen und damit ihr Färbevermögen vollständig. Die verhornten Plättchen der Henleschen und Huxleyschen Scheide nehmen in hervorragender Weise alle basischen Farben auf, dagegen keine sauren wie das Trichohyalin. Noch einfacher als die Kontrastfärbung von Kern und Trichohyalin (Bild 41 und 42) ist diejenige von Trichohyalin und verhornter Wurzelscheide wegen dieser entgegengesetzten Farbaffinitäten zu erzielen.

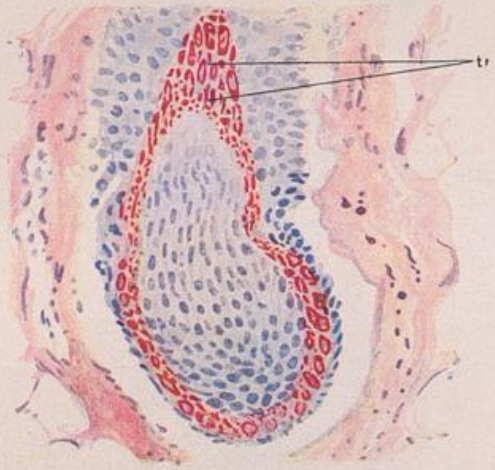


Bild 41.

Trichohyalin. Kopfhaut. Alkohol, Paraffin. Schräger Längsschnitt durch die Wurzel eines Papillenhaares. Bordo — Hämatein-Färbung. Das flüssige bordorote Trichohyalin (tr) umgibt hüllenartig die hämateinblauen Kerne der Wurzelscheide. Der Farbenkontrast zwischen Mesoplastin der Kerne (blau) und Trichohyalin (rot).

Färbt man die Wurzelscheide mit einer basischen Farbe, z. B. Methylviolett, vor und mit einer sauren, z. B. Bordo, nach (Bild 43),

Methylviolett—Bordo-Färbung.

1. 1%ige Methylviolettlösung 2 Minuten, Wasser.
2. 1%ige Bordolösung 1 Minute, Wasser,
3. Alkalischer Alkohol, Öl, Balsam,

so setzen sich die bordoroten Mutterzellen unmittelbar in die schwarzblauen verhornten Zellen derselben fort. Nur eine Übergangszelle (ue) zwischen beiden bleibt ungefärbt, da sie ihr basisches Trichohyalin plötzlich verliert und noch nicht völlig verhornt ist. Sie reagiert daher den Farben gegenüber neutral und findet sich an den nach einer Seite geknickten Wurzeln der Kopfhaare immer genau an der Knickungsstelle.

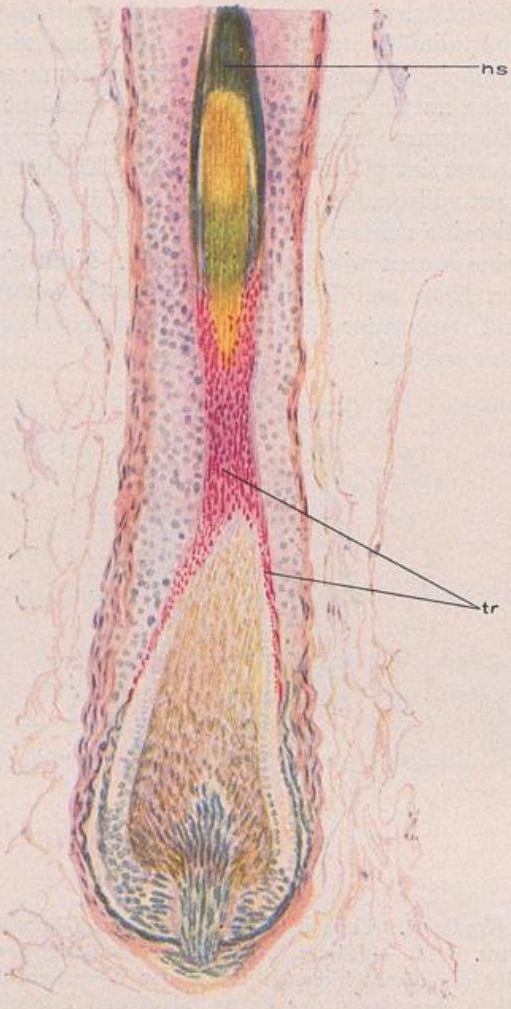


Bild 42.

Trichohyalin und Wurzelscheide. Kopfhaut. Alkohol, Paraffin. Längsschnitt eines Kopfhaares. Bordo — Methylgrün-Färbung. Kerne blaugrün, Trichohyalintröpfchen (tr) bordorot, Henles Schicht der Wurzelscheide dunkelgrün (hs).

Läuft die Schnittebene zufällig auf der Grenze zwischen Henle- und Huxley-Scheide hin, so erhält man ein äußerst zierliches und charakteristisches Bild, in welchem durch die Fenster der ersteren die Hyalintropfen der letzteren hindurchschauen. So ist das folgende Bild mit Nilblau und Bordo gewonnen (Bild 44).

Nilblau—Bordo-Färbung.

1. 1%ige wässerige Nilblaulösung 5 Minuten, Wasser.
2. 1%ige Bordolösung 1 Minute, Wasser.
3. Alkalischer Alkohol, Öl, Balsam.

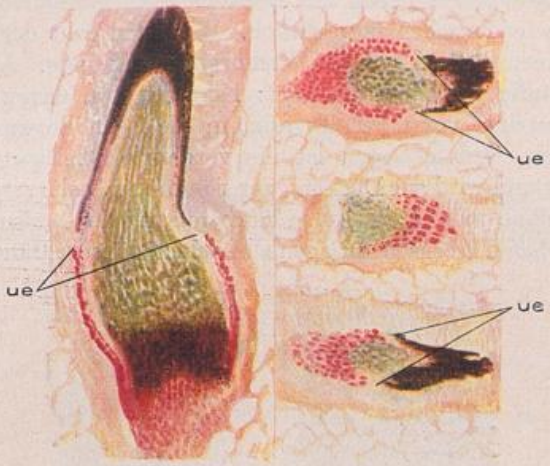


Bild 43.

Trichohyalin. Kopfhaut, Alkohol-Paraffin. Längsschnitte eines Papillenhaares. Unverhornte Wurzelscheiden mit bordorotem Trichohyalin. Verhornte, durch Methylviolett schwarz gefärbte Henleschicht der Wurzelscheide. Ungefärbte Übergangszellen zwischen unverhornter und verhornter Wurzelscheide (ue).

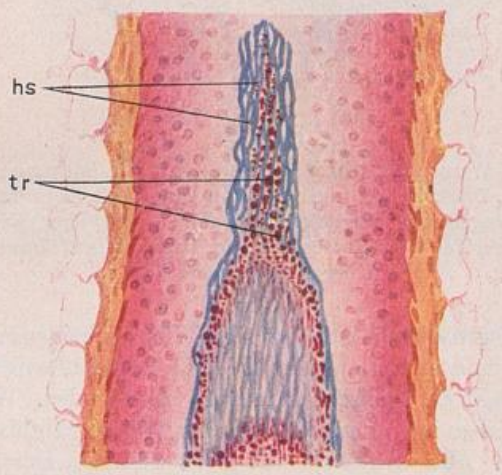


Bild 44.

Trichohyalin. Kopfhaut, Alkohol-Paraffin. Längsschnitt eines Papillenhaares, der die Grenze zwischen Henles und Huxleys Schicht der Wurzelscheide getroffen hat. Nilblau — Bordo-Färbung. Die bordoroten Trichohyalintropfen (tr) blicken durch die Fenster der nilblauen Henleschicht (hs) hindurch.

Bild 45 zeigt bei derselben Bordo—Nilblau-Färbung an einem Längsschnitt und zwei Querschnitten das Verhältnis des (roten) Trichohyalins zur (blauen) verhornten Wurzelscheide und an dem Längsschnitt auch beiderseits die farblosen Übergangszellen (ue) in der Höhe der Knickungsstelle.

Von den verhornten Zellen des Deckepithels unterscheiden sich die verhornten Wurzelscheidenzellen beträchtlich. Bei jenen geht der größte Teil des Kernes und Binnenplasmas vor der Verhornung zugrunde. Aus ihren Resten bildet sich vorläufig das Nebenprodukt: Keratohyalin, das wiederum zerfällt und dessen Bausteine, vor allem Tyrosin, in die Zellhülle wandern und diese mit bilden helfen. Infolgedessen ist die verhornte Oberhautzelle substanzarm, nahezu leer und wird zur Deckung der sich immer mehr vergrößernden, aber keinen Zellenzuschuß mehr erhaltenden Körperoberfläche — also durch äußeren Zug — in den höheren Hornschichtlagen zu flachen, dünnen Bändern ausgedehnt.



Bild 45.

Trichohyalin und Wurzelscheide. Nilblau — Bordo-Färbung. Ein Längsschnitt. Zwischen bordorotem Trichohyalin und nilblauen Wurzelscheidenzellen jederseits an der Knickungsstelle eine ungefärbte Übergangszelle (ue). Zwei Querschnitte. Farbenkontrast zwischen den bordoroten Trichohyalintröpfchen der Huxleyscheide innen und den nilblauen Zellen der Henlescheide außen.

In krassem Gegensatze dazu behält die Wurzelscheidenzelle inmitten einer dichten Zellenmasse und unter dem seitlichen, äußeren Druck des wachsenden Haares ihre ursprüngliche, kubische Form unverändert bei. Wohl tritt auch in ihr ein Zerfall ein, indem im Innern ein basisches Eiweiß zähflüssig ausgeschieden wird (Trichohyalin). Aber dieses zerfällt nicht weiter in elementare Bausteine, sondern vereinigt sich als Ganzes wieder mit dem sauren Reste der Wurzelscheidenzelle zu einem substanzreichen, auch im Innern soliden, backsteinförmigen, glasig aussehenden Zellkörper, der im Zentrum sogar noch einen zusammengepreßten Kernrest einschließt.

Die so verhornten, sauren Wurzelscheidenzellen färben sich, im Gegensatz zu den noch unverhornten, mit allen basischen Farben, und zwar so intensiv, daß sie an den Haarquerschnitten als dunkle, breite Ringe auffallend hervorleuchten, während die anderen sauren Formelemente derselben Schnitte, wie die Epithelkerne der Stachelschicht des Haarbalges, wohl auch gefärbt sind, aber gegen die Wurzelscheidenringe doch ganz zurücktreten, so z. B. in bläulicher

Farbe gegen die schwarzviolette Färbung der Wurzelscheide bei Neutralviolettfärbung (Bild 46):

Neutralviolettfärbung.

1. 1%iges Neutralviolett 2 Minuten, Wasser.
2. 1%ige HCl + Alkohol absolutus, 30 Sekunden.
3. Alkohol, Öl, Balsam.

Es gelingt sogar durch Kombination des Eurhodins: Neutralrot mit dem weniger stark basischen Sulfat des Oxazins: Nilblau innerhalb der Wurzel-

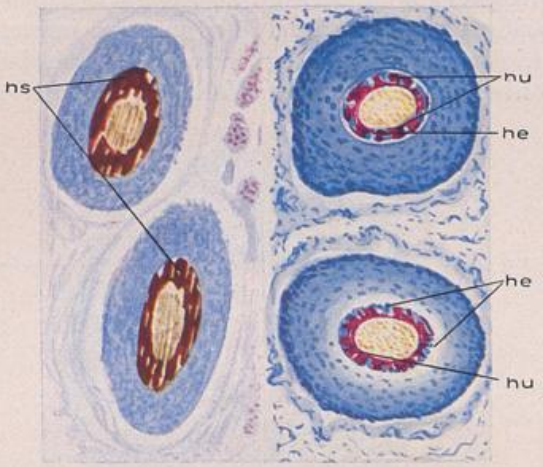
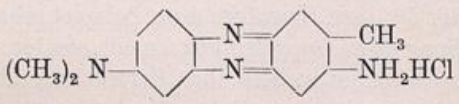


Bild 46. Bild 47.

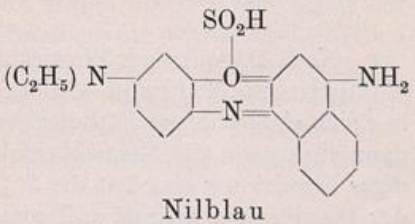
Bild 46. Wurzelscheide. Kopfhaut, frisch. Haarquerschnitte. Färbung: Neutralviolett. Stachelschicht des Haarbalges blau, Henles gefensterte Membran dunkelviolett (hs).

Bild 47. Haarquerschnitte. Neutralrot — Nilblau-Färbung. Neutralrote Zellen der Huxleyscheide (hu). Nilblaue Zellen der Henlescheide (he). Nilblaue Kerne und Zellen der Stachelschicht des Haarbalges.

scheidenringe die Henlesche von der Huxleyschen Scheide durch Kontrastfärbung zu trennen (Bilder 47 und 48).



Neutralrot



Nilblau

Neutralrot—Nilblau-Färbung.

1. 1%iges Neutralrot 5 Minuten, Wasser.
2. 1%ige HCl + Alkohol absolutus 30 Sekunden, Wasser.
3. 1%iges Nilblau $^1/_2$ Minute, Wasser.
4. Alkohol, Öl, Balsam.

Dasselbe Wurzelscheidenbild (Bild 48) bei stärkerer Vergrößerung:

Die nilblauen Zellen dieses Wurzelscheidenbildes entsprechen den an Trichohyalin ärmeren Zellen (der Henlescheide), die neutralroten den trichohyalinreichen (der Huxleyscheide), so daß auf diese Weise in der scheinbar einheitlichen Wurzelscheide histochemische Differenzen aufgedeckt werden, die auf der verschiedenen Menge beider Scheiden an Trichohyalin beruhen.

Diese tinktorielle Analyse läßt sich auch chromolytisch noch etwas weiter verfolgen, indem man die Neutralrot—Nilblau-Färbung auf solche Quer- oder Schrägschnitte der Wurzelscheide anwendet, die vorher mit starken Säuren oder Verdauungssäften behandelt worden sind. Dabei zeigt sich, daß dasjenige Eiweiß, welches sich spezifisch mit Neutralrot färbt und der inneren, Huxleyschen, Lage angehört, bei der Säurebehandlung viel rascher verschwindet als das Eiweiß der äußeren, Henleschen, Lage, welche Vorliebe für das Nilblau besitzt.

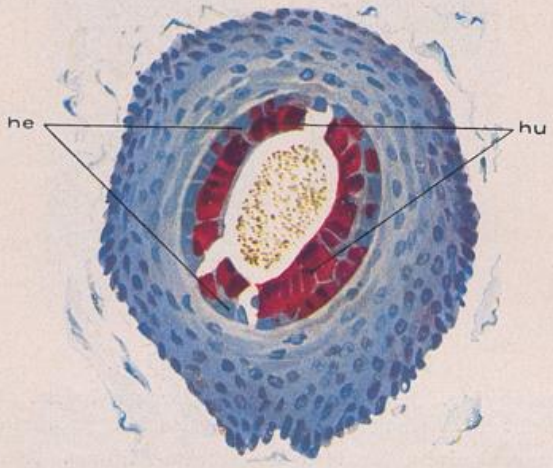


Bild 48.

Wurzelscheide. Kopfhaut, frisch. Haarquerschnitt stärker vergrößert. Färbung: Neutralrot — Nilblau. Neutralrot sind die trichohyalinhaltigen Zellen der Huxleyscheide (hu). Nilblau sind die trichohyalinlosen Zellen der Henlescheide (he) und die Kerne und Zellen der Stachelschicht des Haarbalges.

Nach $1^1/_2$stündiger Einwirkung einer $5^0/_0$igen Salzsäure zum Beispiel gibt die kombinierte Neutralrot—Nilblau-Färbung keine Doppeltinktion mehr, sondern nur eine einfach blaue Färbung der Wurzelscheide; in denselben Schnitten sind dann auch noch alle Kerne ebenfalls erhalten und blau gefärbt. Nach $2^1/_2$stündiger Einwirkung aber hat die $5^0/_0$ige HCl auch das sich blau färbende Eiweiß der Henleschen Scheide vollkommen aufgelöst, von den Nukleoproteiden der Kerne jedoch noch immer färbbare Anteile zurückgelassen.

Eine $5^0/_0$ige Salpetersäure andererseits läßt in derselben Zeit von dem sich blau färbenden Eiweiß nur sehr wenig übrig, während die Nukleoproteide der Kerne nach dieser Säurebehandlung noch sehr gut erhalten sind. Mithin hat die HNO_3 nicht die einfache Lösungseigenschaft der HCl, sondern dieselbe wird gehemmt durch die eiweißfällende Kraft, welche der HNO_3 eigen ist. Ein

analoges Resultat ergibt die konzentrierte HNO_3, welche schon nach 30 Minuten einen Eiweißrumpf der Wurzelscheide hinterläßt, der bei der Neutralrot—Nilblau-Färbung neben einer ganz farblosen Wurzelscheide schwach blau gefärbte Kerne zeigt.

Die Pepsin + HCl-Mischung löst dieselben Wurzelscheideneiweiße in derselben Folge auf wie die HCl allein, nur natürlich viel rascher und hat den Nachteil, das Bindegewebe so vollkommen aufzulösen, daß die einzelnen Teile der Haarbälge auseinanderfallen, wodurch es sehr erschwert wird, etwaige durch die Verdauung hervorgerufene Veränderungen der Wurzelscheide wahrzunehmen. Man sieht aber wenigstens soviel deutlich, daß es sich zunächst nicht um eine Auflösung der einzelnen Wurzelscheidenzellen handelt, sondern nur um eine



Bild 49.

Verdauung der Wurzelscheide. Kopfhaut, frisch. Längsschnitt von Papillenhaaren. Safraninfärbung nach Vorverdauung mit Pepsin + HCl. Safraninrote Reste der Henlescheide.

Quellung derselben, dann um eine Zerklüftung und Aufspaltung und schließlich einen Zerfall in einzelne rechtwinklige Blöcke. Mithin bleibt nach Verlust der sauren Komponenten noch eine sehr solide Grundlage der Wurzelscheidenzellen übrig, die zu sauren Farben gar keine Affinität mehr besitzt und daher an bordogefärbten Schnitten als eine farblose Membran sich deutlich abhebt, während basische Farben sie, wenn auch nur noch schwach, anzufärben imstande sind. Diesen Umstand kann man benutzen, um den Zerfall der Wurzelscheide weiter zu verfolgen.

Man verdaut im Pepsin + HCl-Gemisch $^1/_2$ Stunde und färbt die übrig gebliebenen Haarreste mit Safranin. Dann erhält man noch balkenartige Reste der zerklüfteten Wurzelscheide (Bild 49) und bei weiterem Fortgang des Prozesses einen völligen Zerfall der Wurzelscheide, der zum Ausfallen der noch unveränderten Haarabschnitte aus den Follikeln führt. Wenn die Pepsinverdauung soweit gediehen ist, enthalten die leeren Haarbälge nur noch an ihren Wandungen einen breiartigen Rest der zerfallenen Wurzelscheide (Bild 50).

Ganz im Gegensatz hierzu greift die Trypsin + Soda-Mischung die Wurzelscheide gar nicht an. Dieselbe tritt ebenso maximal gefärbt bei der Neutralviolettfärbung hervor wie in den unverdauten Schnitten. Erst nach 48stündiger

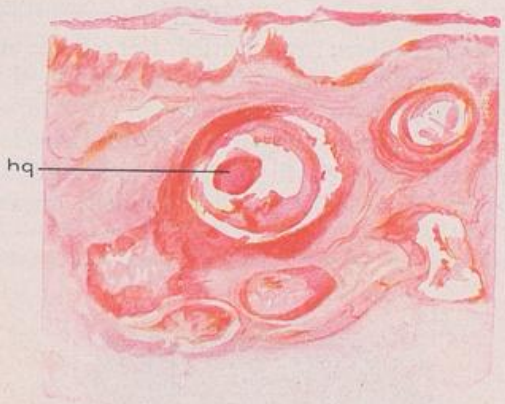


Bild 50.

Zerfall der Wurzelscheide. Kopfhaut, frisch. Weitere Verdauung der haarhaltigen Schnitte mit Pepsin + HCl. Safraninfärbung. Zerfall der Wurzelscheide und Ablösung der Haarquerschnitte (hq). NB. Zu vergleichen mit der wohlerhaltenen Wurzelscheide nach Trypsinverdauung (Bild 51).

Verdauung mit Trypsin + Soda kommt es zur Auflösung aller färbbaren Eiweiße der Haarschnitte bis auf die der Wurzelscheide und damit zu einer scharfen tinktoriellen Isolierung der Wurzelscheide, die sich durch basische Färbungen, nun optimal gefärbt, als gefensterte Membran darstellt (Bild 51).

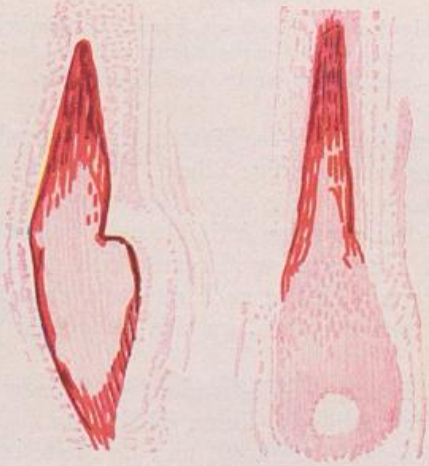


Bild 51.

Längsschnitte von Papillenhaaren. Safraninfärbung nach Verdauung der haarhaltigen Schnitte mittels Trypsin + Soda. Isolierte Färbung der gefensterten Henleschen Membran mit Safranin.

Es ist mithin geradezu für die verhornte Wurzelscheide die beste Methode tinktorieller Isolierung, wenn man die Haare enthaltenden Schnitte vorher mit Trypsin + Soda einen Tag verdaut und sie dann mit einer basischen Farbe (z. B. mit Safranin) färbt.

II. Sauerstofforte.

Farbenindex: Rongalitweiß (RW.).

Das Reagens, mit welchem wir die Gewebsschnitte abtasten, um ihren Sauerstoffüberschuß kennen zu lernen, stammt nicht, wie das Kalipermanganat, aus alter Zeit, sondern gehört der neuesten Forschungsperiode an und mußte erst speziell für diesen Zweck konstruiert werden. Es konnte natürlich nur in einem Farbstoff gesucht werden, der auf die Berührung mit freiem Sauerstoff leicht anspricht und darauf mit einem Farbenumschlag antwortet. Dieser Farbstoff mußte, zweitens, die Eigenschaft haben, sich mit den Gewebsschnitten fest zu verbinden und diejenigen Orte, an denen das Gewebe den Farbenumschlag bewirkte, auch in der Farbe des oxydierten Farbstoffes dauerhaft anzufärben.

Die Wahl fiel auf das Methylenblau, und zwar auf dessen reduzierte Vorstufe, das farblose Leukomethylenblau oder Methylenweiß, welche sich besonders leicht oxydieren läßt mit Umschlag in das Methylenblau selbst, das bekanntlich die meisten Gewebe stark anfärbt. Nun aber bestand die Schwierigkeit, das Methylenweiß gerade wegen seiner leichten Reoxydierbarkeit an das Gewebe heranzubringen, ohne daß es vorher schon durch den Luftsauerstoff bereits wieder reoxydiert wurde. Das Reagens mußte mit anderen Worten: luftfest gemacht werden. Das gelang durch Mischen mit einem starken Reduktionsmittel, welches das Methylenweiß auf der Passage bis zum Gewebe umhüllt und vor Reoxydation bewahrt. Ein solches Reduktionsmittel ist das Rongalit, und das so kombinierte Sauerstoffreagens hat daher von mir den Namen: Rongalitweiß erhalten. Dieses ist also das Instrument, mit welchem wir die Gewebsschnitte auf ihren Gehalt an überschüssigem Sauerstoff abzutasten haben. Wir wissen nun schon[1]), daß das Farbsalz des Methylenblaus aus der farblosen Base des Methylenweiß oder Leukomethylenblaus dadurch entsteht, daß HCl hinzugefügt, aber gleichzeitig H_2 entzogen wird, von dem ein H von dem NH, das zweite von der HCl geliefert wird. Damit schlägt die weiße Farbe in Blau um und das Farbsalz kettet sich an die Eiweißorte, welche, durch ihren lose gebundenen Überschuß an O dem Methylenweiß H_2 entzogen haben. Zugleich verengt sich das große Farbmolekül, es tritt eine neue innere Bindung zwischen beiden N-Atomen ein, und das N der Seitenkette, das früher dreiwertig war, wird fünfwertig.

Die Oxydation des Methylenweiß zu Methylenblau entsteht also nicht durch Hinzufügung von O, sondern durch Entziehung von H_2, durch Dehydrierung. Es ist ganz unmöglich, durch Hinzufügung von O das Methylenweiß zu oxydieren, wie man sich durch einige Versuche leicht überzeugen kann.

---

[1]) Vgl. oben S. 6.

Wir blasen einen Luftstrom durch das in einem Schälchen befindliche RW. (Rongalitweiß); es bläut sich nicht. Wir erzeugen einen Sauerstoffstrom durch Erhitzen von Kalichlorat oder durch ein Gemisch von H_2O_2 und Kali-hypermanganicum-Lösung und blasen ihn durch RW. hindurch. Auch hierbei bläut sich das RW. nicht. Fügen wir aber dem Schälchen RW. einen Tropfen Wasserstoffsuperoxyd (H_2O_2) oder Eisenchloridlösung ($FeCl_3$) oder von einer Lösung von rotem Blutlaugensalz (K_3FeCy_6) oder Ferrizyanwasserstoffsäure hinzu, so tritt sofort ein starker methylenblauer Farbenumschlag ein.

Nun wissen wir ja aber auch, daß, um Methylenweiß zu Methylenblau zu oxydieren, es gar keiner Zufuhr von O zu ersterem bedarf. Die Bläuung des ersteren ist mithin kein Zeichen, daß O in den Komplex von Methylenweiß eingetreten, sondern daß H_2 aus demselben entfernt ist. H_2O_2 z. B. bedingt die Bläuung hier nicht nach der Formel: $H_2O_2 = H_2O + O$, sondern nach der Dehydrierungsformel: $H_2O_2 + H_2 = 2\,H_2O$, d. h. H_2O_2 nimmt dem Methylenweiß H_2 fort und bildet Wasser.

Eisenchlorid wird reduziert nach der Formel:

$$2\,FeCl_3 + H_2 = 2\,FeCl_2 + 2\,HCl;$$

es nimmt dem Methylenweiß also H_2 fort und bildet HCl und Eisenchlorür.

Ferrizyanwasserstoffsäure (H_3FeCy_6) entzieht dem Methylenweiß H_2 und bildet Ferrozyanwasserstoffsäure nach der folgenden Formel:

$$2\,(H_3FeCy_6) + H_2 = 2\,(H_4FeCy_6).$$

Alle diese Versuche mit positivem Resultat erklären sich mithin gar nicht durch O-Zufuhr, sondern durch H_2-Abgabe. Sauerstofforte (O-Orte) sind also solche Formelemente im Gewebe, die imstande sind, dem mit ihnen in Berührung gebrachten Methylenweiß H_2 zu entziehen, es zu „dehydrieren".

Nachdem wir so den einen Bestandteil des Rongalitweiß genauer kennen gelernt, wenden wir uns zu dem zweiten, dem Rongalit. Dieses ist ein in der Praxis der Textilfärber vielgebrauchtes Mittel, um die stärksten Reduktionen auszuführen. Es entsteht durch die Verkettung von zwei starken Reduktionsmitteln, des sulfoxylsauren Natrons: $NaHSO_2$ und des Formaldehyds: HCOH und hat die Formel:

$$NaHSO - O - HCOH.$$

Man sieht, daß beide Seiten des Moleküls das Bestreben haben, O anzuziehen, die linke Seite, um wieder schwefligsaures und schwefelsaures Natron, die rechte, um wieder Ameisensäure zu bilden. An der Luft bildet das pulverige Rongalit auch beständig kleine Mengen von Ameisensäure und Schwefelsäure. Die wässerige Lösung von Rongalit reagiert aber alkalisch. Sie reduziert Methylenblau, bei Gegenwart von Säuren bereits ohne Erhitzung, besser aber unter Erwärmung bis auf 70—80°.

Eigenschaften und Darstellung des Rongalitweiß (RW.).

Wenn man Methylenblau durch Rongalit reduziert, bildet sich beim Erhitzen auf 40° bereits etwas H_2SO_4 und HCOOH. Dadurch reagiert das RW. sauer und ist einigermaßen luftfest. Um aber eine Zersetzung des RW. beim

Erhitzen zu vermeiden und die Luftfestigkeit noch zu erhöhen, wird stets etwas Salzsäure hinzugesetzt.

Methylenblau	0·2
Rongalit	0·4
Salzsäure (25%)	4 Tropfen
Wasser	10·0.

Die Mischung wird bis zur Entfärbung erwärmt. Trübt sie sich beim Erkalten, so wird sie filtriert.

Die Färbung mit RW. verlangt als Substrat ein in bezug auf seinen freien, d. h. lose gebundenen Sauerstoff völlig intaktes Gewebe, wie es außer Ausstrichpräparaten nur die Gefrierschnitte liefern. Diese dehydrieren das RW.

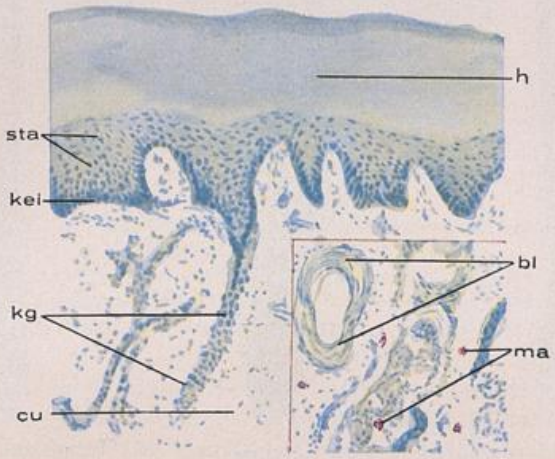


Bild 52.

Rongalitweiß. Fußsohle, frisch. Blau gefärbt: Kerne der Stachelschicht (sta) und Keimschicht (kei), Hornschicht (h), Knäuelgänge (kg), Cutis (cu), Blutgefäß (bl). Blauviolett: Mastzellen (ma).

nur an der Stelle ihrer Sauerstoff im Überschuß enthaltenden O-Orte zu Methylenblau, welches sich mit diesen O-Orten sofort in statu nascendi unter Blaufärbung verbindet.

Die O-Orte der Haut befinden sich im Deckepithel an Stelle der Keimschicht. Hier sind alle Kerne tiefblau gefärbt und stehen sich so nahe, daß das sie umgebende, aber an Masse sehr zurücktretende Protoplasma ausnahmsweise von Sauerstoff überschwemmt und daher ebenfalls gebläut wird (Bild 52). In der darauffolgenden Stachelschicht stehen die gebläuten Kerne weniger dicht und sind nur noch allein, und zwar nach der Oberfläche zu in abnehmendem Grade gebläut, bis zu ihrem völligen Schwund in der Hornschicht.

Analog ist es am Haare, wo der hohe Kernreichtum des Bulbus und der eingeschlossenen Haarpapille eine intensive Bläuung hervorruft. Bei stärkerer Vergrößerung gewahrt man, daß dieselbe auch hier sich nicht allein auf die Kerne beschränkt, sondern, genau wie der Sauerstoff selbst, Zellplasma und Kollagen überflutet. Ebenso erstreckt sich die Blaufärbung des Wurzelepithels

über die Keimschicht hinaus in die höheren Lagen der Stachelschicht. Daher die tiefblaue, diffuse Färbung der ganzen Haarwurzel (Bild 53 A), welche erst mit der Verhornung der Haarzellen nachläßt, um dort, wo das Haar an die Oberfläche der Haut gelangt, ganz aufzuhören.

Die Bräunung der Haarepithelien mit Kalipermanganat andererseits (Bild 53 B) nimmt mit der Ausbildung der Haarzellen gegen den Haarbalgtrichter zu. Aber es verhalten sich dabei die verschiedenen Schichten des Haares gegen das Mangansalz äußerst verschieden. Die Stachelschicht des Haarbalgs

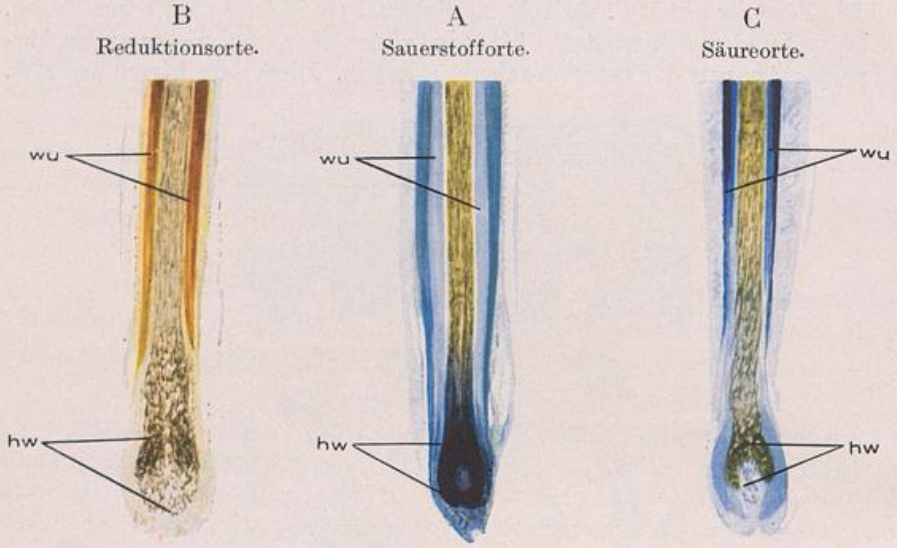


Bild 53.

Vergleich der RW.-Färbung der Wurzelscheide des Kopfhaares (A), einerseits mit der Manganfärbung (B) (Sauerstofforte gegen Reduktionsorte), andererseits mit der Methylenblaufärbung (C) (Sauerstofforte gegen Säureorte) derselben.

Die Haarwurzel (hw) ist von Sauerstoff überflutet und wird daher vom Permanganat (B) nicht gebräunt, aber von RW. dunkelblau gefärbt (A). Die Wurzelscheide (wu) wird als reduzierender Körper vom Permanganat stark gebräunt, von RW. fast gar nicht gebläut. Die aus sauren Eiweißen bestehende Haarwurzel (hw) wird von alkalischem Gewebssaft durchströmt und daher von Methylenblau als Säureort nur schwach gebläut, die saure Wurzelscheide (wu) dagegen, die der alkalische Gewebssaft nicht erreicht, wird von Methylenblau maximal gefärbt.

bräunt sich in mäßigem Grade wie die des Oberflächenepithels. Sehr viel stärker bräunt sich im mittleren und oberen Drittel die Wurzelscheide (Bild 53 B) und bei längerer Behandlung mit Kalipermanganat bräunen sich auch die beiden Oberhäutchen. Ganz ungefärbt bleiben dagegen die Rindenzellen des Haarschaftes und erscheinen in ihrer Naturfarbe: gelb, blond, braun pigmentiert, während die Zellen des Haarmarks wiederum die dunkelbraune Manganfarbe annehmen.

Das Auffallendste dabei ist die völlige Abweisung des Mangansalzes von Seite der Haarrinde; es beweist, daß von der Papille an, auf der die Keimschicht der Haarzellen ruht, ein ununterbrochener Überschuß von Sauerstoff sie in ihrem Wachstum nach oben begleitet.

Unsere Sauerstoffreagenzien scheiden daher alle Papillenhaare in zwei grundsätzlich verschiedene Gebiete, in die Haarwurzel, die bei der Manganfärbung sich

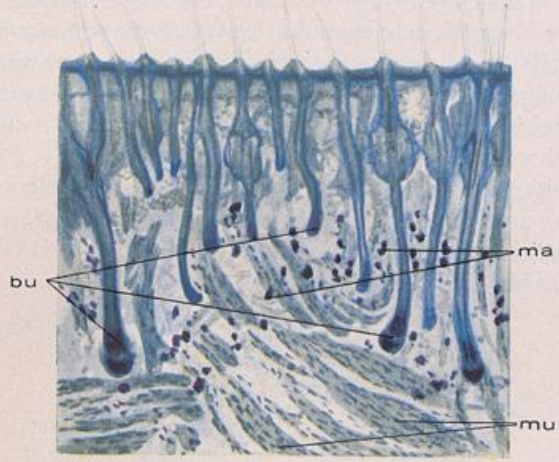


Bild 54.
Lanugohaare der weißen Ratte zwischen den Tasthaaren. Gefrierschnitt. Rongalitweißfärbung.
Alle Haarbulbi (bu) sind diffus und stark gebläut. Außerdem die Kerne der Muskeln der Tasthaare, während die reduzierenden Muskeln (mu) selbst nur schwach grünlichblau sind. Die vielen Mastzellen (ma) sind als Sauerstofforte ersten Ranges tief blauviolett gefärbt.

gar nicht bräunt und bei der Rongalitweißfärbung prachtvoll schwarzblau hervorleuchtet, mithin einen Hauptsauerstoffort darstellt (Bilder 53, 54 und 55), und die oberen Zweidrittel des Haarbalges, welche Reduktionsorte sind.

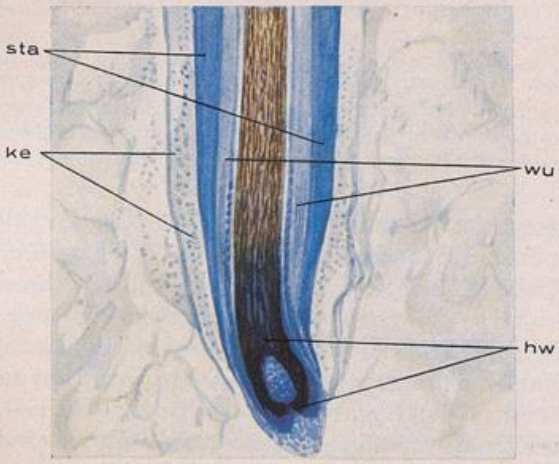


Bild 55.
Der Papillarteil eines Kopfhaares. Gefrierschnitt. Rongalitweißfärbung.
Isolierte Blaufärbung der Kerne des Haarbalges (ke) und der Papille. Diffuse Blaufärbung der Stachelschicht (sta) des Haarbalges. Schwache Bläuung der Wurzelscheide (wu). Starke diffuse Bläuung der Haarwurzel (hw).

Auch an den Beethaaren (Bild 56), denen, wie dem größten Teil des Nagels, die Papillen fehlen und die daher keine Gelegenheit zu einer Rongalitweißbläuung geben, zeichnet die Manganfärbung das Haarbeet durch eine exquisite Bräunung aus. Bei stärkerer Vergrößerung bemerkt man, daß die schwarz-braunen, eigentlichen Beethaarzellen von einem kontinuierlichen Kranze schwächer gebräunter Haarbeetzellen umgeben werden, die mittels zackiger Fortsätze fest miteinander vernietet sind. Das übrige Haarbeet und das Beethaar selbst reduzieren das Kalipermanganat viel weniger, so daß die Umwandlungszone der Beethaarzellen in das Haar sich ungemein dunkel und scharf nach beiden Seiten abhebt.

Die Bläuung durch Rongalitweiß ist also auch beim Haar, wie sonst überall, das reine Gegenstück zu der Bräunung durch $KMnO_4$. Die O-Orte und die Reduktionsorte ergänzen sich, wie immer.

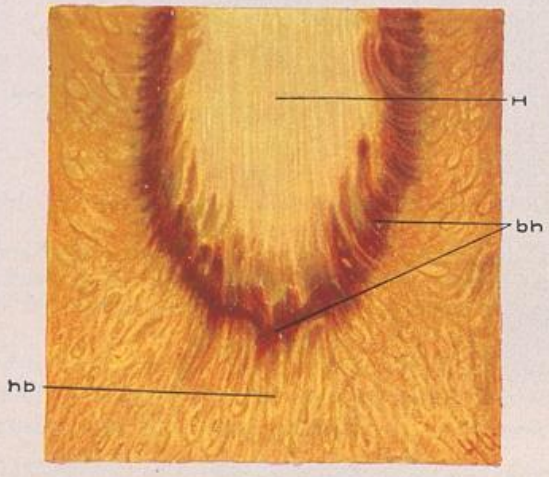


Bild 56.

Beethaar. Kopfhaut. Alkohol-Paraffin-Schnitt. Kalipermanganat.
H = Beethaar, ungefärbt. bh = stark gebräunte Beethaarzellen, hervorgehend aus den Zellen des Haarbeetes durch direkte, einfache Verhornung und übergehend in die ungefärbten Zellen des Beethaares. hb = Zellen des Haarbeetes, schwach gebräunt.

Sehr interessant ist es ferner, daß in der Talgdrüse die pyknotischen Reste der Kerne in den Talgzellen noch stark von Rongalitweiß gebläut werden, obwohl sie längst ihre Kraft, Mitosen zu bilden, verloren haben. Man sieht daraus, daß die O-Funktion des Kernes ganz unabhängig von seiner Zellneubildungseigenschaft ist und diese noch überdauert, solange noch eine Spur von Nukleinsäure zugegen ist. Sie ist ganz allein an die Gegenwart dieser Säure gebunden. Im Bindegewebe der Kutis fallen bei Behandlung mit RW. außer den Kernen vor allem die Mastzellenkörner durch ihre tiefe, metachromatische, blauviolette Färbung auf (Bild 54).

Wo der Schnitt einen knorpligen Bestandteil trifft, hat man Gelegenheit, die den Mastzellen ganz analoge blauviolette Tönung des Knorpels zu beobachten. Man bemerkt, daß in der mit Methylenblau tiefgefärbten Knorpelspange des Nasendaches einer Ratte (Bild 57 a) die Kerne der Knorpelzellen als hellere Kreise hervor-

leuchten, ein Zeichen, daß das sehr saure Chondromukoid des Knorpels den Knorpelkernen ihren Sauerstoff größtenteils entzogen und in sich aufgespeichert hat.

Dieselbe Wanderung des Sauerstoffs von den Kernen in die Umgebung, hier die Mastzellenkörner, zeigt Bild 57 b, das demselben Schnitt wie die Knorpelspange (Bild 57 a) entstammt. Man sieht im Verlaufe der Hautmuskeln (mu) zahlreiche metachromatisch blaugefärbte Mastzellen, in welchen die tief blau-violett gefärbten Körner die ungefärbten Kerne wie ausgesparte Lücken umkreisen.

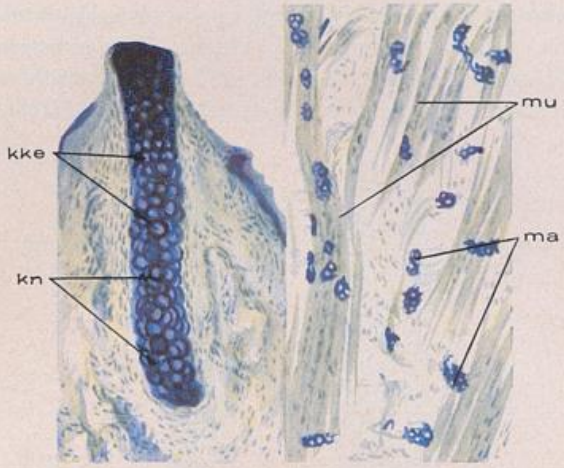


Bild 57 a. Bild 57 b.

Bild 57 a. Knorpel aus dem Nasendach einer Ratte. Rattenschnauze, frisch. RW.-Färbung. Kerne der Knorpelzellen (kke) viel schwächer gefärbt und daher hell hervortretend aus den Knorpelzellen und der umgebenden Knorpelmasse (kn).

Bild 57 b. Mastzellen aus demselben Präparat.
mu = Muskelfasern. ma = dazwischen eingestreute Mastzellen, deren ungefärbte Kerne sich von dem blauviolett gefärbten Mastzellenleibe scharf abheben.

Die Resultate aller dieser RW.-Untersuchungen wurden gewonnen an solchen Gefrierschnitten, die noch mit keinem Fixierungsmittel in Berührung gekommen waren. Denn die O-Orte werden vollständig vernichtet durch die Einbettungsmethoden in Zelloidin oder Paraffin, größtenteils auch schon durch eine vorläufige Behandlung mit dem reduzierenden Formalin.

Bei der Einwirkung von RW. auf Gefrierschnitte sehen wir nun, daß die Bläuung durch den Sauerstoff des Gewebes durchaus nicht alle Elemente betrifft, sondern nur ganz bestimmte, und zwar nur eine Auswahl aus den sauren Elementen des Gewebes. Natürlich nur aus diesen, da Methylenweiß wie Methylenblau eine basische Farbe ist und nur saure Eiweiße färben kann.

Diese engere Auswahl unter den sauren Eiweißen hängt zusammen mit der Menge des überschüssigen Sauerstoffs bei dem betreffenden Gewebseiweiß und hierdurch unterscheidet sich die Rongalitweißfärbung grundsätzlich von der damit oft fälschlich identifizierten Methylenblaufärbung, bei welcher es **nur** auf die Säure und nicht auf den Überschuß an Sauerstoff ankommt. Methylenblau färbt wahllos alle Säureorte des Gewebes,

Rongalitweiß nur solche Säureorte blau, welche ihm den zu ihrer Blaufärbung nötigen **Wasserstoffverlust** beibringen können. Das tun die „Sauerstofforte" genannten Gewebselemente, deren überschüssiger Sauerstoff sich mit dem disponibeln Wasserstoff des Methylenweiß zu Wasser verbinden kann. Es sind die stark sauren Teile der Kerne, die Nukleoproteide, sodann das Globulin im Kernkörperchen und das Granoplasma des Zelleibes, ferner die Mastzellenkörnung, der Inhalt der Hauptzellen des Magens, die Nisslkörper der Ganglien und die Knorpelsubstanz.

Noch charakteristischer vielleicht, weil in noch beschränkterer Auswahl vorhanden, sind die „Reduktionsorte", welche ganz außerstande sind, dem Methylenweiß Wasserstoff zu entziehen, da sie keinen überschüssigen Sauerstoff besitzen und offenbar selbst reich an Wasserstoff sind: nämlich gewisse Teile

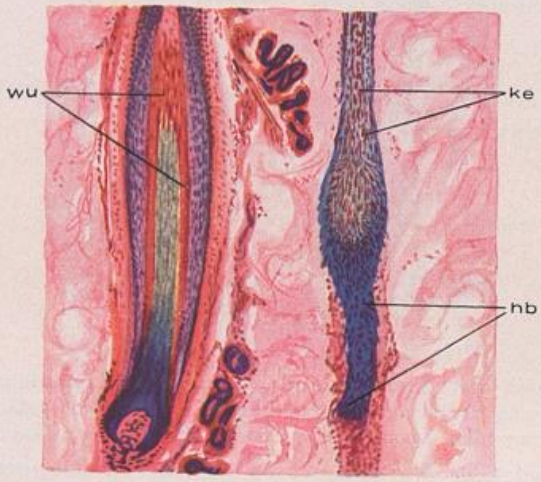


Bild 58.
Rongalitweiß — Safranin-Färbung. Kopfhaut, frisch.
Papillenhaar: Methylenblau: Kerne der Stachelschicht des Papillenhaares und ganze Haarwurzel. Safraninrot: Wurzelscheide des Papillenhaares (wu).
Beethaar: Kerne (ke) safraninrot. Fortsatz des Haarbeetes (hb) methylenblau.

der Hornsubstanz, einerseits die basale Hornschicht des Deckepithels, andererseits die Wurzelscheide der Haare. Am besten eignet sich die Wurzelscheide der Kopfhaare dazu, um die radikale Verschiedenheit der RW.- von der Methylenblaufärbung am normalen Gewebe zu demonstrieren. Die natürliche O-Armut der Wurzelscheide bedingt ihre Farbschwäche bei der RW.-Färbung (Bild 53 A), während Methylenblau geradezu eine schwarzblaue Färbung der Wurzelscheide als Säureort veranlaßt (Bild 53 C).

Man kann den prinzipiellen Unterschied zwischen der Färbung der Wurzelscheide und sonstiger Säureorte auch durch einen hübschen Farbenkontrast zeigen, indem man Kopfhaarschnitte zuerst in gewöhnlicher Weise mit RW. färbt und dann mit unreduziertem Safranin nachfärbt (Bild 58). Dann färben sich alle Kerne des Bindegewebes und der Stachelschicht des Haarbalges als Sauerstofforte stark blau, die verhornte Wurzelscheide als Reduktionsort wenig

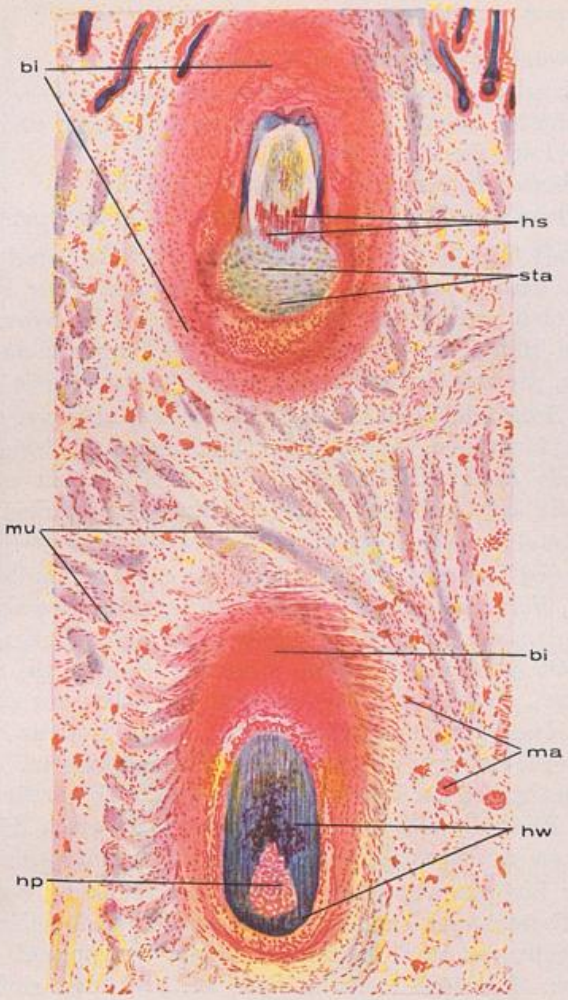


Bild 59.

Rongalitweiß-Safranin-Färbung. Rattenschnauze, frisch.
Zwei Abschnitte eines Sinushaares.
Oberer Abschnitt: Blau: Haar, Stachelschicht (sta) des Haarbalges. Rot: Henlescheide (hs), Kerne der Stachelschicht, bindegewebiger (bi) Haarbalg.
Unterer Abschnitt: Blau: Haarwurzel (hw). Rot: Haarpapille (hp), bindegewebiger (bi) Haarbalg, Kerne des Bindegewebes. Rotorange: Mastzellen (ma). Hellviolett: Muskeln (mu).

oder gar nicht. Diese nimmt dagegen bei der nun folgenden Safraninfärbung als Säureort eine tiefrote Farbe an. Unter den Kernen, deren Sauerstoffgehalt wechselt, zeigt die blaue Färbung ein Sauerstoffmaximum an, die rote Säurefärbung ein Sauerstoffminimum.

Diese RW.—Safranin-Methode ist auch nicht ohne Wert für die Erkennung einzelner Wurzelscheidenzellen im Haarbalg im Gegensatz zu den ungefärbt bleibenden Kutikula- und Rindenzellen.

RW.—Safranin-Färbung.

1. Gefrierschnitte 2 Minuten in RW.-Lösung.
2. In 3 Schalen ausgekochten Wassers abspülen.
3. Die Schnitte werden auf Objektträger aufgezogen und 4 Stunden bis eine Nacht der Luft exponiert, dann
4. $1^1/_2$ Minuten in Safranin O Grübler gefärbt.
5. Gründliche Abspülung in Wasser; Alkohol, in Zedernöl eingebettet.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Verschiedenheiten der Färbung eines und desselben Gewebes (Schnauze der Ratte) einerseits durch Methylenblau, andererseits durch das reduzierte Methylenblau: Rongalitweiß. Die linke Hälfte der Tabelle zeigt die Färbung der Säureorte durch Methylenblau, die rechte die Färbung der Sauerstofforte durch RW.

Die erste Horizontale gibt das Resultat der Färbung von ganz unfixierten Gefrierschnitten; hier finden wir die größte Differenz in der Färbung der Wurzelscheide, die als saures Formelement von Methylenblau maximal gefärbt wird, in RW. als sauerstoffloses Gebilde, trotz seines starken Säuregehaltes, farblos bleibt.

Die folgenden Horizontalreihen zeigen den enormen Einfluß einiger Fixationen (Alkohol, Formalin) und des stark reduzierenden Neosalvarsans auf das RW.-Bild, von dem am Methylenblaubilde so gut wie nichts zu erkennen ist. Zu diesen das RW.-Bild auslöschenden Substanzen gehört, wie man sieht, auch das vielgebrauchte, obwohl stark reduzierende Formalin; nur die allerstärksten Sauerstofforte: Haarwurzel und Mastzellen, z. B. der Rattenschnauze, nehmen nach Formalin noch eine sehr abgeschwächte RW.-Färbung an. Betrachtet man die beiden Vertikalreihen der Wurzelscheide links und rechts für sich, so springt auf den ersten Blick die absolute Verschiedenheit zwischen Säureorten und Sauerstofforten ins Auge und ihrer Färbung durch Methylenblau und RW.

In zweiter Linie kommt eine örtliche Beschränkung der RW.-Färbung der Kerne in Betracht im Vergleich mit ihrer Methylenblaufärbung. Überall, wo die Kerne dicht von stark sauerstoffhaltigem Granoplasma umgeben sind, zeigt RW. keinen Sauerstoff mehr in ihnen an, so in den großen Ganglienzellen, wo der Kern von den aus Granoplasma bestehenden Nisslkörpern dicht umgeben ist, ebenso in den Plasmazellen, den Knorpelzellen und vielen Drüsenzellen. Es gibt keine andere Erklärung für diese eigentümliche Tatsache, als daß den Kernen der von ihnen aktivierte Sauerstoff fortdauernd von der sauerstoffgierigen Umgebung (Granoplasma, Knorpelgrundsubstanz usf.) entzogen wird, und diese Theorie wird dadurch über allen Zweifel sichergestellt, daß nach künstlicher Entfernung dieser O anlockenden Substanzen, z. B. des Granoplasmas der Plasmazellen und Ganglien aus den Schnitten durch 1%ige Borsäurelösung, die Kerne sich mit RW. wieder blau färben wie andere Kerne.

Hiermit ist bei RW. eine Abhängigkeit der Kernfärbung von dem umgebenden Eiweiß des Plasmas erwiesen, für die es bei der Methylenblaufärbung kein Analogon gibt.

Mit diesen Erscheinungen berühren wir einen hochwichtigen Vorgang im Sauerstoffwechsel aller Gewebe, die **Sauerstoffwanderung** vom Kern zum Granoplasma, Verschiebungen des Sauerstoffs, die sich ungemein rasch und

Säureorte und Sauerstofforte des Gewebes.

Schnauze der Ratte	Säureorte durch Methylenblau gefärbt						O-Orte durch RW. gefärbt					
	Kerne	Haar-wurzel	Mast-zellen	Muskeln	Nerven	Wurzel-scheide	Kerne	Haar-wurzel	Mast-zellen	Mus-keln	Ner-ven	Wurzel-scheide
Gefrierschnitte . . .	++	+++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+	++	0
Alkohol—Zelloidin-Schnitte	++	+++	+++	++	++	+++	0	0	0	0	0	0
Alkohol.	++	+++	+++	++	++	+++	0	0	0	0	0	0
Formalin	+	+++	+++	+	+++	+++	0	+	++	0	0	0
Neosalvarsan	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	0	0	0	0	0

offenbar sehr energisch vollziehen und eine große biologische Bedeutung besitzen. Die RW.-Färbung, welche uns bisher allein diesen Vorgang kennen lehrte, hat uns auch den Schlüssel zu seinem Verständnis geliefert. Wir haben unter den bei ihrer Anwendung blau gefärbten Gewebselementen grundsätzlich zwei verschiedene Arten zu unterscheiden. Erstens die primären, welche allen ankommenden molekularen (O=O) Sauerstoff in aktivierten (—O—O—) verwandeln und ihn als solchen an die Umgebung fortdauernd abgeben, die Sauerstoffspender. Dieses sind in erster Linie die Kerne, und die chemische Substanz, welche diese Umwandlung herbeiführt, ist die Nukleinsäure, welche einen mineralischen Katalysator, maskiertes Eisen, einschließt. In zweiter Linie kommen die Mastzellenkörner in Betracht, denen die Aktivierung des Sauerstoffs im Bindegewebe obliegt (siehe Kapitel: Mastzellen.)

Außer diesen primären Sauerstofforten und oft in ihrer nächsten Umgebung angehäuft, befinden sich chemische Substanzen, welche eine große Anziehungskraft für Sauerstoff besitzen und den von den Spendern (Kernen) gelieferten Sauerstoff beständig an sich reißen und aufspeichern. Diese nennen wir sekundäre Sauerstofforte. Dahin gehört vor allem das Granoplasma der Zelleiber und das Globulin der Kernkörperchen, dann auch die Knorpelgrundsubstanz, welcher der Sauerstoff von den Kernen der Knorpelzellen geliefert wird. An diesen Orten kann sich der Sauerstoff deswegen speichern, weil sie sämtlich sehr sauer sind; es sind die ungemein wichtigen Sauerstoffspeicher des tierischen Gewebes.

In ähnlicher Weise wie durch diese örtlichen Verhältnisse ist die RW.-Färbung auch durch zeitliche Umstände vielfach, im Gegensatz zur Methylenblaufärbung, beschränkt. Die maximale Färbung mit RW. erzielt man in 2 Minuten, darüber hinaus erreicht man keine bessere Färbung mehr, sondern von da ab blassen die Schnitte im Rongalitweiß sogar wieder ab, indem das Rongalit die Vorherrschaft behält und eine künstliche Sauerstoffverarmung herbeiführt.

Eine allgemeine natürliche Sauerstoffverarmung, die sich auch durch die RW.-Färbung an überlebenden Gefrierschnitten nachweisen läßt, findet sodann im Augenblick des Todes des Tieres ebenso wie beim Ausschneiden aus dem Tierkörper statt: die agonale Schwankung. Dieselbe gleicht sich an der Luft im Laufe einiger Stunden oder eines Tages aus, indem die überlebenden Kerne den Luftsauerstoff wieder aktivieren, der vom Granoplasma, Kernkörperchen usf. dann wiederum gespeichert wird. Allmählich aber versagt auch diese letzte Sauerstoffquelle und nach einigen Tagen, bei der Ratte am 4.—6., ist bei dem in der feuchten Kammer auf Eis aufbewahrten Gewebe jede RW.-Färbung unmöglich geworden, d. h. kein Sauerstoff mehr in den Geweben durch die Arbeit von Nukleinsäure und Eisen der Kerne frei und für RW. disponibel zu machen. Gerade zu dieser Zeit färben sich die ebenso behandelten, d. h. auf Eis gelegten Schnitte mit Methylenblau maximal, wegen der postmortalen Säuerung des Gewebes. Hier an den absterbenden Schnitten trifft also geradezu das Maximum der Methylenblaufärbung zusammen mit einem Minimum oder totalem Verlust der RW.-Färbung.

In mannigfaltigster Weise kommt der Unterschied in der Färbung mit Methylenblau und RW. natürlich auch zur Geltung, wenn wir selbst die Schnitte

künstlich durch reduzierende Mittel ihres Sauerstoffs berauben. Dann gibt es überhaupt keine O-Orte mehr, aber selbstverständlich sind die Säureorte in keiner Weise angegriffen, oder mit anderen Worten: RW. gibt dann unter solchen Umständen nur negative Resultate, Methylenblau dagegen positive wie bei den normalen Schnitten.

Eine solche Sauerstoffberaubung (Erstickung) der Gefrierschnitte ohne sonstige Beeinflussung kann man schon durch länger dauernden, z. B. einstündigen, Kontakt mit Alkohol oder Formalin erreichen.

Die sich in diesen Versuchen dokumentierende Empfindlichkeit der Sauerstofforte gegen alle Sauerstoff entziehenden Mittel tritt jedoch am krassesten zutage beim Vergleich der überlebenden Gefrierschnitte mit den sicher völlig abgetöteten Schnitten nach der Alkohol—Zelloidin- oder Paraffineinbettung. Die Betrachtung des Unterschiedes zwischen jener Lebendfärbung mittels RW. und dieser Totfärbung mittels blauen Polychroms oder der Pappenheim-Unna-Färbung führt uns mehr als irgend eine andere Untersuchung in das lebendige Geschehen innerhalb des Gewebes ein. Wir erkennen dadurch, wie sich die einzelnen Zellbestandteile zur Sauerstoffversorgung der Zelle verhalten, welche Bedingungen (Eiweiße) vorhanden sein müssen, daß jene dieses lebenswichtige Gas entweder nur aufspeichern oder auch aktivieren und wieder abgeben können, und welche es durch starke Reduktion vernichten. Kurz, wir erhalten einen lehrreichen Überblick der Beziehungen aller Zellen zum Sauerstoff.

* * *

Dieser Überblick wäre aber unvollständig und daher in vielen Beziehungen noch unklar, wenn wir außer den Eiweißbausteinen nicht auch noch der Sauerstofffermente gedächten, welche an jeder Zelle haften, der Katalase und Peroxydase.

E. Darstellung der Sauerstoffermente.

I. Katalase. — Farbenindex fehlt.

Je mehr wir in die Tiefe der biologischen Probleme eindringen und auf Schritt und Tritt die immer geschickte und meistens überraschend einfache Handhabung der natürlichen Vorgänge im Zellenleben zu verfolgen imstande sind, um so öfter treffen wir auf jenes Hilfsmittel, welches die Natur verwendet, um mit geringen Energiemengen, die überall zu Gebote stehen, schwierige und komplizierte Veränderungen zu bewirken. Der zwischen den Sauerstofforten und Reduktionsorten hin- und herflutende Sauerstoffstrom bedarf zu seiner glatten Abwicklung zweier Fermente ganz verschiedener Art, welche diesen chemisch verschiedenen Polen der Zelle genau angepaßt sind, etwa wie der Schlüssel dem Schloß nach dem Worte von Emil Fischer. Die Schwierigkeit der hier vorliegenden Aufgabe begreift man, wenn man bedenkt, daß der tierische Körper mit seinem Riesenaufbau von schwefel- und stickstoffreichen, also der Hauptsache nach reduzierenden Eiweißmassen einem kolossalen Labyrinth

mit tausend und aber tausend Kämmerchen gleicht, in die die Lebensluft des Sauerstoffs nur schwierig eindringen kann, zumal da die Kämmerchen, nämlich die einzelnen Zellen, meist voneinander getrennt und abgeschlossen sind und das reiche luftführende Kanalsystem fehlt, das die Pflanzen mit ihren Zellulosewänden durchzieht. Wie ist es möglich, daß da der Sauerstoff in alle abgeschlossenen Kämmerchen eindringt? Und er muß es doch — bei allen höheren Tieren wenigstens —, da sonst in wenigen Minuten der stolze Bau dem Tode verfallen ist. Zahllose Schlüsselchen, so scheint es, muß die Natur in Bewegung setzen, um dieses wichtigste Problem aller biologischen Probleme, die Durchflutung des tierischen Körpers mit dem lebensnotwendigen Sauerstoff ins Werk zu setzen. So scheint es zu sein. Wir werden aber sehen, daß die Natur in diesem Falle mit nur zwei Schlüsseln, mit zwei Oxydationsfermenten, auskommt.

Die Suche nach dem Mechanismus dieser lebenspendenden Oxydationsfermente ist seit Schönbein, dem ersten Entdecker auf diesem Felde, bereits eine recht große, reich an Ideen, aber auch an Widersprüchen und Rätseln. Erst der Schweizer Gelehrte Bach und der deutsche Chemiker Engler brachten eine größere Klarheit in dieses Problem, indem sie, unabhängig voneinander, dieselbe Theorie der Peroxyde aufstellten, die für alle Arten langsamer Verbrennung Geltung haben sollte und sich auch in der Tat für das Verständnis der Sauerstoffversorgung tierischer Zellen sehr nützlich erwiesen hat. Diese Peroxydtheorie beruht, wie die meisten Oxydationstheorien, auf der Zweiwertigkeit des Sauerstoffs, welche uns die Möglichkeit gibt, zwischen starken und schwachen Bindungen des Sauerstoffs zu unterscheiden. Eine starke Bindung stellt die Form des molekularen Sauerstoffs dar. Hier sind die zwei Wertigkeiten jedes Sauerstoffatoms vollständig gesättigt O= =O ⟶ O=O. Das entstehende Produkt heißt molekularer oder inaktiver Sauerstoff, da er für weitere Oxydationen nicht brauchbar ist. In dieser Form atmen wir ihn ohne jede Schädigung ein. Hängen dagegen beide O-Atome nur mit einer Bindung zusammen (—O—O—), so bleibt jedem noch eine freie Bindung übrig, die imstande ist, weitere Oxydationen auszuführen.

Die Peroxydtheorie von Bach und Engler besagt nun, daß bei jeder „langsamen" Verbrennung — und zu diesen gehören alle im Körper vor sich gehenden Oxydationen — die Oxydation damit beginnt, daß sich das ganze, ungespaltene O-Molekül an die sauerstoffbegierige Substanz anlagert. Bezeichnen wir diese reduzierende Substanz mit R, so entsteht also nicht gleich durch den vom Blute aus eindringenden Sauerstoff die feste, einfache Verbindung RO, sondern zunächst die hochoxydierte, aber lockere Verbindung $R\begin{smallmatrix}O\\|\\O\end{smallmatrix}$, ein Peroxyd, das den Ausgangspunkt zu allen weiteren Sauerstoffveränderungen und -wanderungen bildet.

Es unterliegt keinem Zweifel, daß sich das Peroxyd unter Umständen allmählich in die einfache, niedere, aber feste Oxydationsstufe von R (RO) umwandeln kann, und es geschieht das offenbar dann am leichtesten, wenn die Sauerstoffgier von R groß ist. Wir haben dann den Vorgang, den wir Verbrennung der organischen Substanz nennen und dessen Produkte:

CO_2, H_2O, H_2SO_4 usf. durch Lymphe und Harn aus dem Körper als unbrauchbare Schlacken entfernt werden.

Ist die Reduktionskraft von R aber geringer und das Gewebe daher nicht imstande, allen ihr gebotenen Sauerstoff zur Verbrennung mit Abstoßung der Verbrennungsprodukte zu verwerten, so bleibt die lockere Bindung des Peroxyds so lange bestehen, bis mit Hilfe der nun in Wirksamkeit tretenden „Sauerstoffermente" eine Lösung des Peroxyds erfolgt. Diese geht dann vonstatten, ohne daß zugleich eine Lockerung und Abstoßung weiterer Atome oder Atomgruppen (C, H, SO_2) aus den Gewebselementen dadurch bewirkt wird. Es handelt sich mithin nur um eine Abstoßung von Sauerstoff allein. Aber dieses kann doch noch in verschiedener Art, gleichsam „mit verschiedenen Schlüsseln", vor sich gehen. Wir kennen bisher mit Sicherheit zwei verschiedene solcher Sauerstoffschlüssel, die in allen Zellen vorhanden sind: die Katalase und die Hyper- oder Peroxydase. Beiden gemeinsam sind die Eigenschaften aller Fermente, daß sie in geringer Menge imstande sind, unverhältnismäßig große Mengen chemischer Verbindungen zu lösen oder zu knüpfen, ohne daß hierbei ihre eigene Menge merklich abnimmt, und daß sie ferner die betreffenden Umsetzungen in hohem Grade zu beschleunigen vermögen. Diese zwei Eigenschaften lassen sich in sehr einfacher Weise bei der Katalase nachweisen. Diese arbeitet nach der Formel

$$R\begin{matrix}O\\|\\O\end{matrix} \longrightarrow R + O{=}O,$$

d. h. sie spaltet aus dem Peroxyd wieder molekularen Sauerstoff ab, und zwar so rasch, daß — wie man berechnet hat — 1 Gramm rein gewonnener Katalase in 10 Minuten 4 Kilogramm H_2O_2 zersetzen kann. Die Katalase macht also nur die Entstehung des Peroxyds wieder rückgängig, und wir finden als Resultat das reduzierende Substrat und gewöhnlichen, molekularen Luftsauerstoff.

Dieses Resultat war für manche Autoren unbefriedigend, und aus diesem Gefühl heraus entstand die Theorie, die Katalase habe nur den Zweck, ein für das Gewebe giftiges „Übermaß von Peroxyd" zu vernichten. Diese Theorie erscheint aber unbefriedigender als die Tatsache, daß die Katalase Peroxyde rückverwandelt. Zwei Tatsachen hat man dabei übersehen, welche beide zeigen, daß die Katalase noch viel mehr und Wichtigeres vermag: 1. daß dieselbe eine Ortsveränderung des naszierenden Sauerstoffs bewirkt und 2. daß nur ein Teil des Gewebes, nämlich die „Reduktionsorte", Katalase besitzen, das Produkt ihrer Tätigkeit aber andere Orte, nämlich die „O-Orte", erreicht und hier reaktiviert wird. Dadurch bewirkt die Katalase erst die Nutzbarmachung der größeren Hälfte des Gewebes für den Zweck der O-Aktivierung. Würde die Katalase nicht existieren und wäre der Luftsauerstoff allein auf die O-Orte angewiesen, so würde der größte Teil des Gewebes gar nicht von aktivem Sauerstoff erreicht und die Durchlüftung des ganzen Gewebes vereitelt. Man kann das auch kurz so ausdrücken: Der Sauerstoffstrom des Gewebes erfordert die Katalase.

Will man die Katalase in einem Gewebe nachweisen, so braucht man nur ein Stückchen desselben, z. B. irgend ein Stückchen Lunge, Haut usw., mit

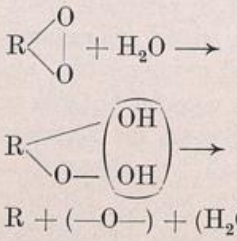
Hydroperoxyd (H_2O_2) zusammenzubringen, dasselbe damit zu übergießen oder es in die Flüssigkeit zu versenken, um sofort eine mehr oder minder stürmische Entwicklung von Sauerstoffbläschen zu erzeugen. Dieselben bilden auf dem Gewebe einen Schaum, indem sie sich sehr rasch vergrößern und zusammenfließen, wobei es unmöglich ist, weder mit freiem Auge noch mit dem Mikroskop die Herkunft der einzelnen Bläschen aus einzelnen Zellen oder sonstigen Teilen zu verfolgen. Die Katalasereaktion ist daher eine rein makroskopische. Man kann aber durch Messung und Vergleichung der Volumina des freiwerdenden und aufsteigenden Sauerstoffs einen Schluß ziehen auf die Menge der in einem Gewebe befindlichen Katalase und darnach die verschiedenen Gewebe in eine Reihenfolge ordnen.

Da hat sich nun eine nahe Beziehung der Katalase zu den Reduktionsorten der Gewebe ergeben, indem die größte Menge von Katalase von den protoplasmareichen und stark reduzierenden Geweben: der Leber, Niere, dem Herzmuskel und dem Blut geliefert wird, während ein protoplasmaarmes, aber sauerstoffreiches Gewebe, wie der Knorpel, die Sehne des Muskels, nur wenig Katalase liefern. Die Katalase ist also an die Reduktionsorte gebunden.

Die dritte Eigenschaft der Fermente, auf ganz bestimmte, einzelne Substanzen eingestellt zu sein, läßt sich mithin bei der Katalase nur indirekt durch vergleichende Messungen erschließen; die Reaktion hat nur eine makroskopische, keine mikroskopische Verwendung.

II. Peroxydase. Farbenindex: Benzidin + H_2O_2.

Ganz anders steht es mit der Peroxydase. Dieses Sauerstofferment arbeitet nur in Verbindung mit dem Wasser des Gewebes, nach der Formel:



$$R + (—O—) + (H_2O_2)$$

und scheidet den Sauerstoff des Peroxyds, nicht wie die Katalase in molekularer, sondern in aktiver Form (—O—) ab und daneben Hydroperoxyd (H_2O_2).

Hier kann man die stark oxydierende Wirkung des entstehenden —O— benutzen, um gleichzeitig an einem mit hinzugegebenen Indikator einen Farbenumschlag zu erzielen. Gehört der bei dieser Oxydation erzeugte Farbkörper zu den gewebsfärbenden Substanzen, so gelingt es gleichzeitig, den peroxydasehaltigen und sich nun färbenden Bestandteil als Herkunftsort der Peroxydase zu erkennen. Die Peroxydasereaktion ist daher eine mikroskopische Reaktion. Wir können nach stattgehabter Reaktion mit Muße die Gewebe nach gefärbten Teilen durchmustern und genau bestimmen, wo die Peroxydase im Gewebe gesessen hat, welche die einzelnen Farbenumschläge bewirkte. Wir gewinnen bei der Peroxydase nicht bloß eine ungefähre Schätzung des Fermentreichtums, wie bei der Katalase, durch die Messung der freiwerdenden O-Volu-

mina, sondern wir können mit Bestimmtheit jeden einzelnen Gewebsbestandteil auf seinen Peroxydasegehalt prüfen.

Da hat sich nun die bemerkenswerte Tatsache ergeben, daß nicht nur die peroxydasereichen Gewebe im allgemeinen mit den an Sauerstofforten reichen zusammenfallen, sondern daß im mikroskopischen Bilde genau diejenigen Formelemente sich als Sitz der Peroxydase erweisen, welche wir bereits als Hauptsitz der Sauerstofforte, als primäre Sauerstofforte, kennen: die Kerne und Mastzellen. Die Peroxydase ist mithin an die Sauerstofforte gebunden und hat die besondere Funktion, aus diesen den Sauerstoff in aktiver Form (—O—) abzuspalten und so für das ganze Gewebe nutzbar zu machen.

Ein solcher Indikator für Peroxydase ist das Benzidin ($NH_2 — C_6H_4 — — C_6H_4 — NH_2$), von dem eine 1%ige Lösung, dem H_2O_2 hinzugemischt, die Peroxydaseorte blau färbt. Als Schnitte kommen auch (nicht zu alte) Alkohol—Zelloidin-Schnitte in Betracht, da die Peroxydase in Alkohol ziemlich unlöslich ist. Am besten arbeiten wir aber mit Gefrierschnitten, die in Alkohol aufgefangen werden müssen, da sie in Wasser ihre Peroxydase verlieren würden.

Die Blaufärbung der Peroxydaseorte geschieht — im schärfsten Gegensatz zu den gewöhnlichen Gewebsfärbungen, bei denen keine Fermente mitwirken — **mit auffallender Geschwindigkeit.** Im Augenblick, wo die Luftblasen sich entwickeln, ist die Färbung auch schon vollendet. Die Schnitte werden dann, ohne den Schaum in Wasser abzuspülen, direkt in Alkohol übertragen, der mit Eisessig (1 Tropfen auf 1 Schälchen) angesäuert ist, und durch Xylol in Balsam gebracht. Doch hält sich die Färbung auch so nur einige Stunden, da das Blau durch weitere Oxydation in Gelb übergeht und dann verblaßt.

An gut gelungenen Präparaten zeigen sich die Kerne im allgemeinen blau, nur in den Mastzellen, deren Körner blauviolett gefärbt sind, bleiben die Kerne ungefärbt.

Im Gegensatz zu der oft diffusen Bläuung der O-Orte in den RW.-Präparaten, sind die Peroxydaseorte immer genau auf die genannten Stellen beschränkt. Die Peroxydase strahlt nicht wie der gasförmige O auf die benachbarten Gewebsteile aus (Bild 60).

Es liegt nun nahe, anzunehmen, daß die Koinzidenz von Peroxydaseorten mit den primären O-Orten eine vollkommene ist und daß die Gebiete der Peroxydase und Katalase sich ebenso scharf gegeneinander abgrenzen wie die O-Orte und Reduktionsorte.

Golodetz und Paul Unna jun.[1]) griffen diesen Gedanken auf und benutzten die Erfahrung, daß das kernhaltige Vogelblut sich mit Pepsin + HCl in 24 Stunden soweit verdauen läßt, daß nur die Kerne der roten Blutkörperchen erhalten bleiben. Im Maße als die Verdauung des Protoplasmas der Blutkörperchen fortschreitet, nimmt die durch H_2O_2 allein nachweisbare Katalase ab, während die durch Benzidin + H_2O_2 nachweisbare Peroxydase sich, ebenso wie die Kerne, länger erhält. Wenn die Kerne ganz plasmafrei und nackt geworden sind, ergeben die auf Objektträger ausgestrichenen Blutmassen noch etwa bis zum 6. Tage mit Benzidin + H_2O_2 die Peroxydasereaktion. Hiermit

---

[1]) Golodetz und Paul Unna jun., Über Peroxydase und Katalase innerhalb der Zelle. Berliner klinische Wochenschrift 1912, Nr. 24, S. 1134.

ist bewiesen, daß von den zwei mit Wasserstoffsuperoxyd in den Geweben reagierenden Fermenten nur die Katalase im Protoplasma, die Peroxydase dagegen in den Kernen ihren Sitz hat.

Die Verteilung der Sauerstofferment-Orte im tierischen Körper ist mithin ebenso mosaikartig beschaffen wie diejenige der Reduktions- und Sauerstofforte.

Diese feste Verteilung im Gewebe ist hier wie dort die Grundbedingung für den regelrechten Ablauf der Lebensvorgänge, soweit sie vom Sauerstoffstrom abhängen.

Als weitere Bedingungen zu ihrer regulären Tätigkeit haben wir noch das Vorhandensein dreier Faktoren erkannt, des molekularen, inaktiven Sauerstoffs, des Wassers und einer reduzierenden Eiweißverbindung (R.).

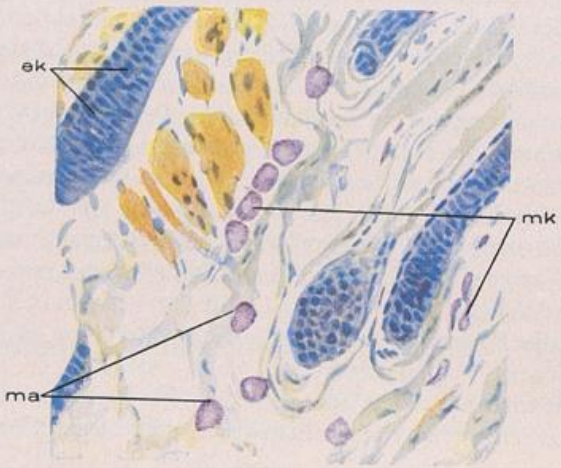


Bild 60.

Peroxydase. Ratten-Schnauze. Alkohol-Paraffinschnitt. Benzidin + H_2O_2-Färbung Epithelkerne (ek) der Haarbälge blau. Kerne der Mastzellen (mk) farblos. Granula der Mastzellen (ma) bläulichviolett.

Der Sauerstoff (O=O) wird vom Blute in allen Geweben gleichmäßig verteilt, das Wasser ist zu 70% in allen Geweben gleichfalls vorhanden. So bleibt also nur noch das Wesen der reduzierenden Substanz zu besprechen. Bach und Chodat haben diesem wesentlichen Faktor ihrer Peroxydtheorie den Namen: Oxygenase gegeben. Auch diese Substanz ist überall im tierischen Gewebe reichlich vorhanden, da sie die allgemeine Zellengrundlage bildet. Soweit die Gewebe Permanganat reduzieren, haben wir mithin Oxygenase anzunehmen.

Der auf den ersten Blick paradoxe Gedanke, daß eine in der Tiefe der Zelle liegende, gleichsam im Verborgenen schlummernde Reduktionskraft allein, bloß in Verbindung mit Wasser und inaktivem Sauerstoff die zureichende Ursache der tierischen Oxydation darstellt, erweist sich, je weiter unsere Erfahrung fortschreitet, um so mehr als der leitende Faden in dem bisherigen Wirrsal der Lehre von der tierischen Atmung. Denn er führt uns in die Zellen selbst aller einzelnen Organe hinein und erschließt uns daher

zum ersten Male eine Vorstellung von der Mitwirkung der einzelnen Zellteile bei der Atmung.

Die Oxygenase können wir lediglich in die beiden unteren Stockwerke[1]) aller Zellen und Gewebe verlegen, weil nur hier reduzierende Eiweiße vorkommen, und da die Natur der Oxygenase im übrigen noch recht unbestimmt ist, so können wir ihren Ort vorläufig mit den das Permanganat reduzierenden Schichten der Gewebe im allgemeinen identifizieren, bis weitere Untersuchungen über den genaueren Entstehungsort und die chemische Natur der Katalase in diesen Schichten Aufschluß geben. Wir verlegen also den Sitz der Katalase dorthin, wo die Manganmethode in den Schnitten durch Bräunung den Sitz der Reduktion nachweist, in das Plastin und Mesoplastin der Kerne und das Spongioplasma der Zelleiber.

Derselbe Ort ist aber dann natürlich auch der Entstehungsort der Peroxyde. Ich sage absichtlich: Entstehungsort, nicht Ort der Peroxyde. Denn da die Peroxyde, welche wir theoretisch annehmen müssen, sich praktisch — z. B. durch ein Gemisch von Benzidin und Meerrettichextrakt (Peroxydase) tinktoriell — im Gewebe nicht nachweisen lassen, so ist es müßig, von einem „Ort der Peroxyde" zu reden. Wo dieselben entstehen, ist auch Katalase vorhanden, um sie abzufangen und den Sauerstoff aus ihnen in inaktiver Form frei zu machen und als solchen in die Lymphe abzustoßen. Das geschieht aber nur dort, wo die reduzierenden Schichten nackt an die Lymphspalten anstoßen und wo Permanganat eine stärkere Bräunung hervorruft, kurz an den eben genannten Reduktionsorten der Zellen.

Überall dagegen, wo diese noch von einer sauren, oxydierenden Oberschicht bekleidet sind, vor allem bei den Kernen und Mastzellen, wo mithin an Stelle der Katalase die Peroxydase vorherrscht, hat das im unteren Stock sich bildende Peroxyd ein anderes Schicksal. Die Peroxydase der Sauerstofforte setzt auch hier den Sauerstoff in Bewegung und stößt ihn ab, aber in der Form des aktiven Sauerstoffs: —O—, und in dieser Form strömt er in die Lymphe und mit ihr in alle Organe.

Auf diesem Wege trifft der aktive Sauerstoff in allen parenchymatösen Organen die nukleoproteidreichen Keimschichten, vor allem der Oberhaut und der Haarpapille, die Keimzentren der Lymphdrüsen, der Milz usf. und regt in ihnen die Mitosenbildung an. Eine zweite Hauptaufgabe für den zirkulierenden aktiven Sauerstoff besteht sodann sicherlich in der Neutralisation und Entgiftung aller reduzierenden Abbauprodukte des Gewebes, die sich der Lymphe beimischen.

Aber damit sind seine wichtigen Aufgaben noch nicht erschöpft. Wo im Gewebe sehr saure Eiweiße vorkommen, also in erster Linie das Globulin sämtlicher Kernkörperchen, dann das Abbauprodukt: Zytose in allen größeren Epithelien, in den Plasmazellen des Bindegewebes, in den Hauptzellen des Magens und in den Nisslkörpern der Ganglien, endlich das Chon-

[1]) Eine nur scheinbare Ausnahme von dieser Regel machen die am stärksten reduzierenden und am dunkelsten durch Manganperoxyd gefärbten Endprodukte der Verhornung: Hornschicht, Haar und Nagel. Ihnen fehlt das zur Bildung von Oxygenase und Peroxyd notwendige Wasser. Es sind die trockensten Gewebselemente.

dromukoid des Knorpels, dort legt der aktive Sauerstoff der Lymphe Depots von inaktivem Sauerstoff an, welche sich aus dem Grunde hier aufstapeln können, weil einerseits die hier vorhandene Säure des Gewebes sie schützt, andererseits, wie das Benzidinreagens nachweist, keine Peroxydase in ihnen enthalten ist, welche den Sauerstoff frei machen könnte. Diese „sekundären" Sauerstoffreservoire sind mithin charakterisiert durch ihre Säure und die Abwesenheit von Peroxydase. Dadurch unterscheiden sie sich grundsätzlich von den primären, ebenfalls sauren, aber peroxydasehaltigen Sauerstofforten, wie den Kernen und den Mastzellen. Ein jeder Kern zeigt uns schon diesen fundamentalen Unterschied der sauren Eiweiße in seinem peroxydasehaltigen Kerngerüst und seinem peroxydasefreien Globulinzentrum des Kernkörperchens; jenes stößt seinen aktivierten Sauerstoff ab, dieses bildet aus inaktivem Sauerstoff einen Sauerstoffspeicher. So stellt sich schließlich die Durchlüftung aller tierischen Zellen mit Hilfe der beiden sich in die Hände arbeitenden Sauerstoffermente als ein überraschend einfacher Vorgang heraus, der die komplizierten Aufgaben der Sauerstoffversorgung aller Zellen spielend bewältigt.

F. Eine zweite Darstellung der Sauerstoff- und Reduktionsorte.

Farbenindex: Neutralviolett (NV.).

Die Lebendfärbung von Gefrierschnitten, diese notwendige Bedingung zum Zustandekommen der RW.-Färbung, stand, als diese wichtige Färbung entdeckt wurde, ganz isoliert, ohne Vorgänger in der Wissenschaft da. Im Gegenteil war die Meinung allgemein verbreitet, zu jeder regelrechten Färbung eines Gewebes gehöre eine vorherige und meist sehr eingreifende Fixation, die natürlich ohne Abtötung des Gewebes nicht denkbar war. Mit der Beseitigung dieses alten Vorurteils gewann die Wissenschaft aber plötzlich auch eine ganz neue Fragestellung von sehr weittragender Bedeutung. Wenn es möglich war, ein bestimmtes Gewebe in überlebendem Zustande, z. B. als Gefrierschnitt, zu färben, so konnte man natürlich auch das Resultat dieser Färbung vergleichen mit der Färbung eines gleichen Schnittes, zu dessen Herstellung das gleiche Material fixiert, eingebettet und dadurch sicher abgetötet war. Brauchte man nun zur Färbung eines solchen abgetöteten Schnittes dasselbe Färbemittel wie für den Gefrierschnitt und entdeckte in diesen beiden Schnitten konstante Unterschiede der Färbung, so waren natürlich diese Unterschiede nur auf die einzige Veränderung zu beziehen, die zwischen den Schnitten bestand, auf die Abtötung. Man hatte also ein Mittel an der Hand, die Wirkung der Abtötung histologisch zu studieren, und da in diesem besonderen Falle durch die Färbung nur die Existenz und Verteilung des Sauerstoffs aufgedeckt wurde, so war ein Mittel gegeben, die Abtötung eines Gewebes durch O-Entziehung, durch Erstickung, zu untersuchen; die Gefrierschnitte ergaben das Verhalten des überlebenden Gewebes, die Zelloidin- bzw. Paraffinschnitte das des toten Gewebes.

Ich nannte, um jede Verwechslung mit der Ehrlichschen Vitalfärbung zu vermeiden, die neue Methode: die Tot-Lebend-Färbungsmethode[1]).

Von diesem neu gewonnenen Standpunkte aus haben wir nun zunächst alle für die Sauerstoffrage in Betracht kommenden Färbemethoden zu betrachten und miteinander zu vergleichen.

Da sehen wir sofort, daß die Manganmethode nicht zu einer Tot-Lebend-Färbung gebraucht werden kann, da nur ganz vereinzelte Gewebsteile, wie die Knäueldrüsenkörner, sich bei der Manganfärbung an Gefrierschnitten anders verhalten wie an eingebettetem Material, die hauptsächlichen Färbungsdifferenzen aber (Hornschicht, Stachelschicht, Kerne, Keimschicht, Kutis usw.) genau gleich an Gefrierschnitten und Zelloidinschnitten ausfallen.

Ebenso können wir die Peroxydasefärbung durch Benzidin + H_2O_2 nicht zu einer Tot-Lebend-Färbung benutzen, da sie nicht bloß an Gefrierschnitten, sondern auch an Zelloidinschnitten, wenn auch nicht so gut, gelingt. Wenn sie aber gelingt, erblickt man die Peroxydaseorte an genau denselben Stellen wie an Gefrierschnitten, nämlich an Kernen und Mastzellen.

Werfen wir schließlich noch einen Blick auf unsere bewährteste Protoplasmafärbung an Alkoholmaterial, die Methylgrün + Pyronin-Färbung, und stellen die Frage nach ihrem Verhalten zu Gefrierschnitten und damit zur Sauerstofffrage, so ist zunächst zu sagen, daß diese Methode an Gefrierschnitten dieselben gewohnten Bilder ergibt wie an Zelloidin- und Paraffinschnitten. Sie ist also für eine Tot-Lebend-Färbung nicht anwendbar, und trotzdem gibt uns jeder Schnitt auch am eingebetteten Material heute bereits eine mikrochemische Analyse, aber doch nur deshalb, weil wir ganz unabhängig davon durch das Studium der RW.-Färbung und der Peroxydasefärbung gelernt haben, daß ein biologischer Unterschied besteht zwischen dem hier auftretenden Grün der Kerne und Mastzellen als den primären O-Orten und dem Rot der Kernkörperchen und der Zytoseanhäufungen (Granoplasma, Plasmazellen) als sekundären O-Orten.

Obgleich wir es hier also mit abgetötetem, in bezug auf seinen Sauerstoff verarmtem, ersticktem Gewebe zu tun haben, erkennen wir an den nach Pappenheim-Unna gefärbten, toten Schnitten auf den ersten Blick, allein durch die grüne und rote Färbung, biologische Unterschiede von großer Wichtigkeit. Der bloße Anblick eines so gefärbten Zelloidin- oder Paraffinschnittes gibt uns Aufschluß über die Orte der O-Aktivierung (grün) und dadurch auch über die Richtung des von hier ausgehenden Sauerstoffstromes und die Orte der O-Ansammlungen (rot), unserer O-Speicher.

Allerdings sind diese biologischen Schlußfolgerungen nur indirekte, aus anderen biologischen Beobachtungen erst abgeleitete. Nun haben aber die letzten Jahre uns mit einer neuen polychromen Färbung beschenkt, welche darin noch über jene Pappenheim-Unna-Färbung hinausgeht, daß sie — genau wie das Rongalitweiß — nur auf überlebende Gefrierschnitte anwendbar ist, nicht dagegen auf Alkohol—Zelloidin- oder Paraffinschnitte. Sie verlangt also auch zur Ausführung überlebendes Material. Sie ist wie die RW.-Methode als eine Tot-Lebend-Färbungsmethode zu gebrauchen und wie die letztere dadurch ebenfalls ein Reagens auf das Leben der Gewebe überhaupt.

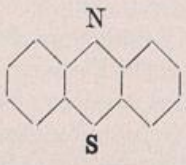
[1]) P. G. Unna, Vergleichende Tot-Lebend-Färbung. Dermatologische Wochenschrift 1918, S. 703.

Diese zwei Färbungen treten daher zusammen in einen bewußten Gegensatz zu sämtlichen früheren Färbungen und inaugurieren ein neues Kapitel in der biochemischen Analyse der Gewebe. Wir haben oben gesehen, daß von den bisher bekannten Sauerstoffärbungen nur die Rongalitweißfärbung zu den Lebendfärbungen gehört. Weder die Manganfärbung der Reduktionsorte noch die Benzidin + H_2O_2-Färbung der Peroxydaseorte ist unbedingt an Gefrierschnitte überlebenden Gewebes geknüpft, wenn auch dieses Material für sie das ideale bleibt. Für die neue Lebendfärbung aber sind Gefrierschnitte überlebenden Gewebes die Conditio sine qua non, gerade so wie für die Rongalitweißfärbung.

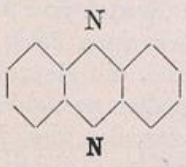
Der neue Farbstoff heißt Neutralviolett[1]) (Cassella) und besteht aus zwei basischen Farben, dem Azin: Neutralrot (2 Teile) und dem Oxazin: Neublau (1 Teil).

Azinfarbstoffe.

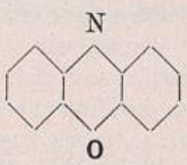
Thiazin



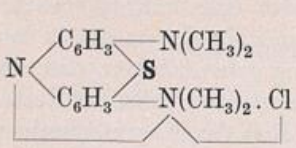
Azin



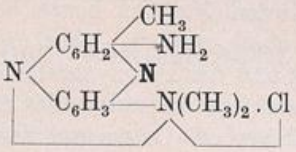
Oxazin



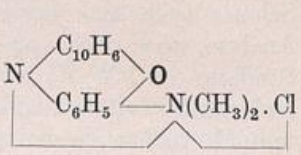
Methylenblau



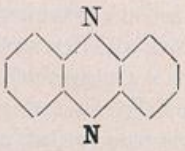
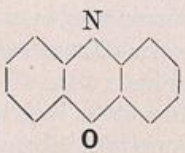
Neutralrot

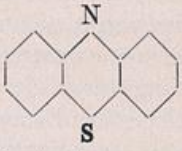


Neublau



Neutralviolett (NV.) ist eine Mischung von Neutralrot und Neublau.

Sowohl die Azine:  wie die Oxazine: 

haben eine ähnliche Konstitution wie die Thiazine:  , zu denen

das Methylenblau gehört, da sie alle nach dem Typus der Anthrazene gebaut sind. An Stelle des Schwefels der Thiazine tragen die Azine aber ein N-Atom an der Brücke, die Oxazine ein O-Atom. Das Neutralrot schließt sich auch in den Seitenketten dem Methylenblau sehr nahe an, während im Oxazin eine Seitenkette ganz fortfällt und im Kerne des Farbstoffes eine Benzolgruppe durch eine Naphtholgruppe vertreten ist.

---

[1]) Siehe Unna und Golodetz, Neutralviolett extra. Archiv für mikroskopische Anatomie, Bd. 90 (1917), S. 69.

Vergleichende Versuche mit den beiden Farben zeigen nun folgendes: Färbt man mit Neutralrot allein, so erhält man ein durchweg rotes, färbt man mit Neublau, ein rein blaues Bild aller Säureorte des Gewebes. Färbt man mit diesem Gemisch beider totes Gewebe, so nehmen alle Säureorte ein gleichmäßiges Violett an; färbt man mit dem Gemisch aber Gefrierschnitte, die ihren Sauerstoff noch besitzen, nach folgender Vorschrift, so erhält man eine schöne und sehr genaue Doppelfärbung.

Neutralviolett- (NV.-) Methode.

(Nur für Gefrierschnitte.)

1. Stücke in Wasser von 80° C 2 Minuten eintauchen zur Gerinnung der flüssigen Eiweiße.
2. Stücke gefriergeschnitten.
3. Schnitte in $^1/_2$%igem NV. 10 Minuten.
4. Kurz abspülen in Wasser.
5. Entfärben und entwässern in absolutem Alkohol.
6. Öl, Balsam.

Die Mischfarbe teilt sich also, und jeder Komponent färbt nur diejenigen Bestandteile, zu denen er eine besonders große, chemische Affinität besitzt. Und da zeigt sich, daß das Neublau nur zu den reduzierenden sauren Eiweißen: zu der Muskelsubstanz und dem Protoplasma an den Reduktionsorten, das Neutralrot zu den oxydierenden sauren Eiweißen an den O-Orten: Kernen, Mastzellen und Knorpel eine hervorragende Verwandtschaft besitzt.

So erhalten wir an überlebenden Gefrierschnitten auf die einfachste Weise durch NV. eine Übersicht über beides auf einmal, über die Reduktions- und O-Orte des Schnittes, welche wir früher allein durch Vergleich der Mangan- und Rongalitweißschnitte erhalten konnten.

Neutralviolett- (NV.-) Färbung (Bilder 61 und 62).

	Reduktionsbild durch Kalipermanganat	Bild der		Oxydationsbild durch Rongalitweiß
		reduzierenden sauren Eiweiße	oxydierenden sauren Eiweiße	
		durch das		
		Blau	**Rot**	
		des Neutralvioletts		
Muskeln	+ +	+ +	0	0
Epithelprotoplasma	+ +	+ +	0	0
Rote Blutkörperchen	+	+	0	0
Nerven	+	+	0	0
Kerne	0	0	+ +	+ +
Mastzellen	0	0	+ + +	+ + +
Knorpel	0	0	+ + +	+ + +
Wurzelscheide	+ +	0	+ +	0
Oberflächliche Hornschicht	+	0	+	0

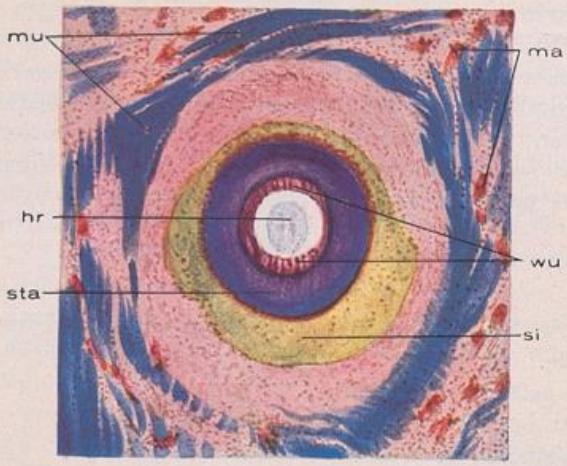


Bild 61.

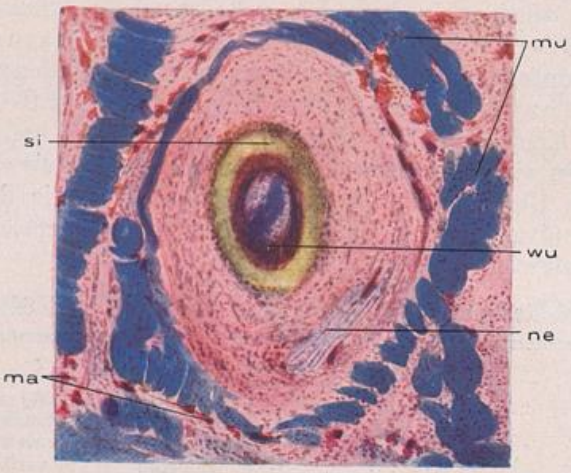


Bild 62.

Bild 61 und Bild 62. Tasthaar der Ratte, zwei Querschnitte, frisch. Färbung: Neutralviolett. Neublaufärbung: Hautmuskeln (mu), Stachelschicht des Haarbalges (sta). Grün: Blutsinus (si). Neutralrot: Kerne, Wurzelscheide (wu). Hellviolett: Nervenbündel (Bild 62, ne). Orangerot: Mastzellen (ma). Ungefärbt: Haar (hr) (Bild 62).

Die Teilung des NV. bei der Färbung von Gefrierschnitten ist in der Tabelle dadurch ausgedrückt, daß der mittlere Teil derselben in zwei Rubriken zerfällt, die Blaufärbung der reduzierenden sauren Eiweiße links und die Rotfärbung der oxydierenden sauren Eiweiße rechts.

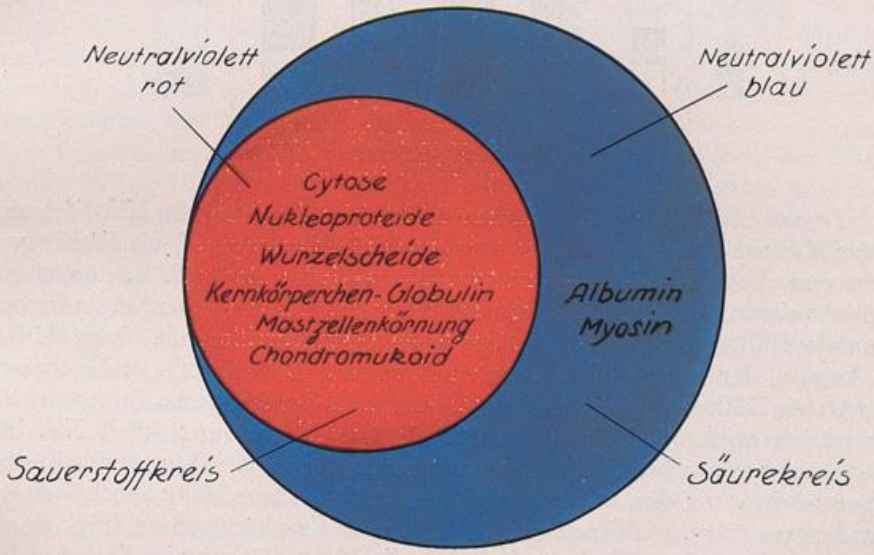
An die Blauseite ist nun, um den Vergleich zu erleichtern, das durch Mangan erzeugte Reduktionsbild angeschlossen, an die Rotseite das Oxydationsbild, wie es RW. ergibt. Man sieht, daß der obere Teil der Tabelle (ober-

halb des Striches) in der Tat eine absolute Übereinstimmung der blauen Reduktionsorte mit den braunen Manganorten einerseits und der roten O-Orte mit den blauen Orten des Rongalitweißbildes andererseits zeigt.

Der Teil der Tabelle unterhalb des Striches zeigt aber, daß dieser Parallelismus seine Grenze hat und daß der Verwandtschaftskreis des Neutralrots über den der O-Orte hinausgeht und in den der Reduktionsorte hinübergreift, denn zwei Formen verhornter Zellen, die Wurzelscheide des Haares und eine oberflächliche Hornschichtlage der Fußsohle, die im Manganbilde besonders braun sind, färben sich in Gefrierschnitten mit NV. nicht, wie man erwarten sollte, blau, sondern rot, als wären es auch O-Orte. Diese Tatsache beweist, daß die roten Orte des NV. einem größeren Kreise angehören als dem der Sauerstofforte, wie sie uns das RW. aufdeckt, nämlich dem Kreise der Säureorte.

Schon gleich bei der Entdeckung des Rongalitweiß war es ja klar, daß die O-Orte stets mit Säureorten zusammenfallen, aber daß nicht alle Säureorte = O-Orte sind, und allmählich ergab es sich, daß nur diejenigen Säureorte O-Orte sind, welche RW. dehydrieren können. Oder mit anderen Worten, daß der Kreis der O-Orte von beiden der kleinere ist und innerhalb des größeren Kreises der Säureorte zu liegen kommt.

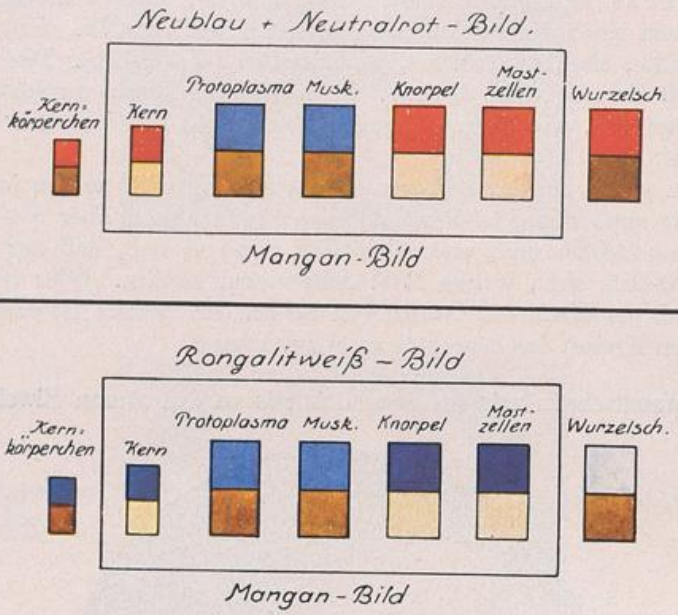
Verwandtschaftskreis des Neutralvioletts zu den sauren Eiweißen.



Die scheinbare Unstimmigkeit der Wurzelscheide und obersten Hornschicht, welche ein starkes Manganbild zeigen und von NV. doch nicht blau gefärbt werden, wie die Muskeln, sondern rot, läßt sich übrigens auf Grund unserer Erfahrungen über den Stockwerkbau der Zelle erklären. Denn es ist wohl möglich, daß die Grundlage der Wurzelscheide Kalipermanganat reduziert, während der saure Oberstock Neutralrot speichert. Wir haben eben die Tatsache zu registrieren, daß oberhalb einer basischen, reduzierenden Eiweißgrundlage ebensowohl saure reduzierende

Eiweiße mit Neublau, wie saure oxydierende Eiweiße mit Neutralrot oder Methylgrün nachgewiesen werden können. Das saure, reduzierende Eiweiß, das sich mit Neublau färbt, ist im Epithel wohl sicher: ein Albumin des Gewebssaftes, im Muskel: Myosin neben Albumin, Eiweiße, die natürlich in dem Oberstock der verhornten Wurzelscheide fehlen.

Schematische Bilder der sauren und basischen Eiweiße.



Die obere Hälfte dieses Farbenschemas ist, zum Vergleiche der NV.-Färbung mit der Manganfärbung entworfen; es ist noch nicht gelungen, beide Färbungen an ein und demselben Schnitte zu vereinigen. Jedes Rechteck in demselben entspricht einem materiellen Punkt eines bestimmten Formelementes, und zwar die untere Hälfte (der Sockel) den basischen Grundeiweißen, die obere Hälfte (der Aufsatz) den oberflächlichen sauren Eiweißen. Betrachtet man die oberen und unteren Hälften der Rechtecke nur innerhalb des Rahmens, so entspricht einer stärkeren Manganfärbung des Sockels eine Blaufärbung durch NV. im Aufsatz, einer schwachen Manganfärbung eine Rotfärbung. Aber außerhalb des Rahmens sehen wir die Wurzelscheide, die auf braunem Mangansockel einen roten Aufsatz trägt, und auch das Globulin des Kernkörperchens trägt einen roten, nicht einen blauen Aufsatz, trotzdem die Manganfärbung im Sockel recht bedeutend ist.

Diese beiden Ausnahmen von der Regel treten erst in das rechte Licht, wenn wir dieselben Formelemente der Färbung mit RW. unterwerfen und die dann entstehenden Blaufärbungen der Oberschicht auf dieselben Mangansockel setzen. Dann tritt die Gegensätzlichkeit zwischen starker und schwacher Blaufärbung im Aufsatz mit der schwachen und starken Manganfärbung im Sockel sehr deutlich hervor. Nun schließt sich aber hier auch die außerhalb des Rahmens

stehende Wurzelscheide den im Rahmen stehenden Gebilden an, welche die Regel repräsentieren. Ja, hier bildet sogar die Wurzelscheide das reinste Muster für die Regel, da der starken Manganreduktion des Sockels hier im Aufsatz eine noch schwächere Bläuung durch RW. entspricht als wie sie Protoplasma und Muskeln zeigen.

Wir müssen nach diesem Vergleiche mithin sagen, daß den beiden Sauerstoffärbungen gegenüber die Wurzelscheide sich in beiden Stockwerken als ein hochgradig reduzierendes Formelement darstellt. Nicht die Farbschwäche in der Oberschicht bei der RW.-Färbung ist paradox, sondern nur die Rotfärbung derselben bei der NV.-Färbung.

Mittels dieser Erwägungen haben wir jedoch nur die Möglichkeit einer Erklärung des paradoxen Wurzelscheidenbildes erhalten, nicht die Notwendigkeit. Diese können wir erst einsehen, wenn es uns gelingt, die chemische Natur des rot liebenden Oberstockes der Wurzelscheide zu erkennen, und das ist, wie in allen solchen Fällen, wiederum nur durch eine erfolgreiche Chromolyse möglich.

Unter den theoretischen Möglichkeiten, die paradoxe rote Färbung der Wurzelscheide bei der Neutralviolettfärbung zu erklären, nahm bis vor kurzem die Idee einer ungesättigten sauren Lipoidbeimengung den ersten Platz ein. Aber der Fortgang der Chromolyse machte diesem Gedanken ein Ende. Trotz aller Mühe gelang es nicht, durch fettlösende organische Lösungsmittel, wie Äther, Benzin, Benzol, Xylol, Chloroform und Mischungen derselben mit Alkohol, das Eintreten der roten Färbung zu verhindern. Ebensowenig durch Behandlung der Wurzelscheide mit Bromwasser, dem sichersten Mittel, um eine ungesättigte, Sauerstoff aktivierende Fettbeimischung zu neutralisieren. Ölsäure und ähnliche Fette konnten also nicht die Ursache der roten Färbung sein.

Dagegen zeigte sich ein positiver Erfolg bei der Vorbehandlung der Wurzelscheide mit Soda und Trypsin, den besten Mitteln, um saure Eiweiße aufzulösen. In diesen Mitteln verschwindet in der Tat allmählich die rote Färbung der Wurzelscheide, um einer blauen Platz zu machen bis auf die rot bleibenden Kernreste der Wurzelscheide. Und nun gewahrt man erst beim Ausziehen der sich rot färbenden Substanz die enorme Anzahl der Kernreste in der Wurzelscheide, die schon lange bekannt ist, aber etwas in Vergessenheit geraten war.

Wenn die Matrixzellen der Wurzelscheide verhornen, so bildet sich ähnlich wie bei der Verhornung des Oberflächenepithels eine hyalinartige Substanz in Form von Körnern, die wir im Gegensatz zum Keratohyalin des Deckepithels: Trichohyalin (Vörner) nennen. Aber bei diesem Vorgange verschwinden die Kerne nicht durch Abbau, wie beim Deckepithel, sondern bleiben großenteils erhalten, während das Plasma der Matrixzellen einfach vertrocknet. Die verhornten Wurzelscheidenzellen stellen also sehr schmächtige Zellen mit reichem Gehalt an Kernsubstanz, d. h. an Nukleinsäure, dar; es sind die nukleinsäurereichsten normalen Hornzellen. Dieser Umstand allein ist hinreichend, die rote Färbung durch Neutralviolett, die sonst hauptsächlich eine Kernfärbung ist, zu erklären. In dem Schema der Verwandtschaftskreise (S. 103) fällt die Wurzelscheide also in den inneren, roten Kreis, da die rote Färbung auf Nukleoproteide zurückzuführen ist. Aber diese sind ihres Sauerstoffs durch

die Verhornung vollständig beraubt, was wir sicher wissen, da die Wurzelscheide nicht imstande ist, RW. zu dehydrieren. Sie bleibt bei der RW.-Färbung nahezu ungefärbt, und dieser Umstand bildet bekanntlich einen der bezeichnendsten Unterschiede zwischen der RW.- und Methylenblaufärbung überhaupt. Die Rotfärbung des Aufsatzes der Wurzelscheide ist daher auch nicht auf irgend einen Sauerstoffgehalt zurückzuführen, sondern auf ein seines Sauerstoffüberschusses beraubtes, bloß saures Nukleoproteid.

G. Saure Kerne.

Aus der Stockwerktheorie der Eiweißfärbungen kann man weiter auch die Schlußfolgerung ableiten, daß es möglich sein muß, bestimmte Formelemente in ihren verschiedenen Stärken mit verschiedenen, z. B. einer sauren und einer basischen Farbe nacheinander zu färben, ohne daß diese sich gegenseitig beeinträchtigen. Das hat die Praxis schon seit langem erwiesen, so besonders in der Hämatein — Safranin — Tannin-Färbung der „sauren Kerne" im Epithel, z. B. beim spitzen Kondylom. In dieser Methode verbindet sich die saure Färbung des basischen Mesoplastins mit der basischen des Globulins unter Vermittlung einer sauren Tanninbeize.

Die Alkohol-Zelloidin-Schnitte erhalten zuerst mittels irgendeiner guten Hämatein + Alaun-Mischung eine kräftige Kernfärbung, werden darauf besonders gut in Wasser abgespült, kommen auf 10 Minuten in eine 1%ige Safraninlösung und, wiederum gut in Wasser abgespült, in eine 25%ige Tanninlösung, bis die rote Farbe der Schnitte in eine rotviolette umschlägt. Darauf muß die überschüssige Gerbsäure sehr gründlich ausgewaschen werden. Sie kommen dann auf längere Zeit zur Differenzierung in absoluten Alkohol und weiter durch Bergamottöl + Xylol in Balsam (Bild 63).

Das hierzu verwendete Safranin O ist ein Gemisch von Tolusafranin und Phenosafranin (bei Hollborn vorrätig); es löst sich besser in Alkohol + Aqua destillata als in Wasser allein. Man erwärmt 1 *g* Safranin O + 30 cm^3 95%igen Alkohol in einem Kolben im Wasserbade, setzt 70 cm^3 Aqua dest. hinzu und filtriert.

Bei dieser Doppelfärbung sind allein die Kernkörperchen und die sauren Kerne in den Epithelzellen safraninrot gefärbt. Die Veränderung der Kerne, die zur Bildung der sauren Kerne führt, beginnt bereits unmittelbar an der Kutisgrenze in einigen der jüngsten Epithelien. Hier färbt sich die normalerweise bläuliche Grundsubstanz (Plastin) rötlich, wodurch der ganze Kern mit blauem Kerngerüst und roten Kernkörperchen blauviolett bis rotviolett erscheint. In den folgenden Zellenreihen sind die sauren Kerne schon rein safraninrot. Genauere Untersuchung lehrt, daß in diesen gesättigt safraninroten Kernen auch noch das blaugefärbte Kerngerüst und die dunkelroten Kernkörperchen enthalten sind, obwohl sie färberisch nicht mehr zur Geltung kommen. Wenn diese Stufe erreicht ist, verändern sich die sauren Kerne nicht mehr; sie steigen mit den anderen, normalen, immer farbschwächer werdenden Kernen in die Höhe bis an die Verhornungsgrenze und werden in diesen höheren Lagen

durch ihre stark rot bleibende Färbung immer auffallender. Ja, sie gehen in die Hornschicht ein, ohne ihre Röte und Gestalt zu verlieren. Sie erleiden also nicht die normale Altersveränderung (Schrumpfung) der Epithelkerne; aus ihnen sind dauerhafte Gebilde geworden.

Die Erscheinung der sauren Kerne beruht also in erster Linie auf einer primären Veränderung der Grundsubstanz, indem diese basische Substanz sich mit demselben sauren Globulin füllt, welches normalerweise nur in den Kernkörperchen vorhanden ist. Man könnte diesen Prozeß daher auch die Globulinmetamorphose der Kerne nennen. Daß dieselbe eine reine Kernangelegenheit darstellt und gänzlich unabhängig vom Protoplasma ist, geht mit Sicherheit aus der Tatsache hervor, daß häufig im Epithel in einer Kernhöhle zwei Kerne vorkommen, von denen einer ein normaler, der andere ein saurer ist.

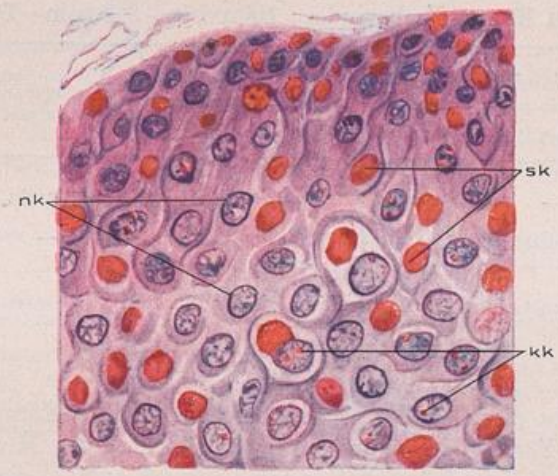


Bild 63.
Saure Kerne. Stachelschicht des spitzen Kondyloms. Färbung: Hämatein — Safranin — Tannin. Normale Kerne (nk) blau. Kernkörperchen (kk) und saure Kerne (sk) safraninrot.

Hand in Hand mit dieser Veränderung verliert der Kern sicher seine Fähigkeit, Mitosen zu bilden; noch niemals ist eine solche in einem sauren Kerne getroffen worden. Der auf diese Weise zugleich stabil und steril gewordene Kern repräsentiert gleichsam als Ganzes ein stark vergrößertes Kernkörperchen.

Die folgende Tabelle A gibt einen übersichtlichen Vergleich der Färbung der normalen Kernbestandteile bei der Hämatein — Safranin — Tannin-Methode mit denen der sauren Kerne in Tabelle B.

Die Tabelle A zeigt, daß nach der vorangehenden Hämateinfärbung der basischen Eiweiße im mittleren und unteren Stock die darauffolgende Färbung mit dem basischen Safranin und nachfolgender Tanninbeize von allen sauren Eiweißen des oberen Stockes nur das Globulin der Kernkörperchenmitte anzufärben vermag. Die am Rand des Kernkörperchens und allen Teilen des Kerngerüstes verteilten, sauren Nukleoproteide werden vom Tannin nicht gebeizt, sondern entfärbt, obwohl sie wegen ihrer sauren Reaktion zunächst Safranin aufzunehmen vermögen. Das Hämatein färbt, wie immer, das Plastin nur diffus

A. Normale Kerne (Farbenindex: **Hämatein—Safranin—Tannin**, siehe oben).

Stock	Kernkörperchen		Kerngerüst		Kerngrund-substanz	
	Rand	Mitte	Rand	Gerüst		
oberer .	—	**Safranin**	—	—	—	Globulin
mittlerer	Hämatein ++	Hämatein +	Hämatein ++	Hämatein +	—	Mesoplastin
unterer .	Hämatein +	Hämatein +	Hämatein +	Hämatein +	Hämatein +	Plastin

B. Saure Kerne (Farbenindex: **Hämatein—Safranin—Tannin**).

Stock	Kernkörperchen		Kerngerüst		Kerngrund-substanz	
	Rand	Mitte	Rand	Gerüst		
oberer .	—	**Safranin**	—	—	**Safranin**	Globulin
mittlerer	Hämatein ++	Hämatein +	Hämatein ++	Hämatein +	—	Mesoplastin
unterer .	Hämatein +	Hämatein +	Hämatein +	Hämatein +	Hämatein +	Plastin

und mäßig, ebenso die Mitte des Kernkörperchens und das Kerngerüst, während es die anderen Formelemente des mittleren Stockes, das Mesoplastin des Kernrandes und Kernkörperchenrandes stark anfärbt, was in der Tabelle durch ++ hervorgehoben ist.

Der Unterschied der sauren Kerne von den normalen besteht nun darin, daß hier die Kerngrundsubstanz, ebenso wie stets die Kernkörperchenmitte, Globulin gespeichert und damit einen sauren Oberstock geschaffen hat, der befähigt ist, unter Mithilfe der Tanninbeize Safranin aufzunehmen und festzuhalten.

Aber nicht nur im oberen Stock der Grundsubstanz[1]) findet sich zwischen normalen und sauren Kernen ein wesentlicher Unterschied; auch mit dem basischen Eiweiß des unteren Stockes ist eine grundsätzliche Veränderung vor sich gegangen. Die normale Grundlage von Plastin ist nämlich bei den sauren Kernen ersetzt durch ein besonderes basisches, eosinophiles Eiweiß.

Diese Tatsache tritt mit aller wünschenswerten Schärfe hervor, wenn wir zur Färbung derselben Schnitte die bekannte homogene Mischung saurer Farben: Wasserblau + Eosin + Phloxin = Wep benützen. Dann nehmen die gewöhnlichen Kerne im unteren Stock Wasserblau auf, so daß auch die Kern-

[1]) Ich habe dieselbe in den „Lebensvorgängen in der Haut der Menschen und der Tiere" (Deuticke, Wien) noch mit dem alten Flemmingschen Namen „Kernsaft" bezeichnet.

grundsubstanz bläulich bis blau erscheint; das Gerüst des Kernes färbt sich ebenfalls wasserblau, besonders dunkelblau aber der Rand der Kerne und der Kernkörperchen (++), wie es die Tabelle C wiedergibt.

C. Normale Kerne (Farbenindex: **Wep**).

Stock	Kernkörperchen		Kerngerüst		Kerngrund-substanz	
	Rand	Mitte	Rand	Gerüst		
oberer .	—	—	—	—	—	Globulin
mittlerer	—	—	—	—	—	Mesoplastin
unterer .	Wasserblau ++	**Eosin** ++	Wasserblau ++	Wasserblau +	Wasserblau +	Plastin

Im Gegensatz dazu nimmt die Mitte des Kernkörperchens reichlich und allein Eosin (+ Phloxin) aus der Mischung: Wep auf, ohne jede Beimischung von Wasserblau. Die Eosinaufnahme im unteren Stock entspricht also genau der örtlich beschränkten Safraninaufnahme im oberen Stock bei der Hämatein—Safranin—Tannin-Färbung der Tabelle A.

Die entsprechende Wep-Färbung der sauren Kerne gibt die Tabelle D wieder.

D. Saure Kerne (Farbenindex: **Wep**).

Stock	Kernkörperchen		Kerngerüst		Kerngrund-substanz	
	Rand	Mitte	Rand	Gerüst		
oberer .	—	—	—	—	—	Globulin
mittlerer	—	—	—	—	—	Mesoplastin
unterer .	Wasserblau O bis +	**Eosin** ++	Wasserblau O bis +	**Eosin** +	**Eosin** +	Plastin

Auch hier wie bei den normalen Kernen werden die einfach sauren Farben der Mischung: Wep natürlich nur im unteren Stock gespeichert, aber im Gegensatz zu ihnen nimmt nun nicht bloß die Kernkörperchenmitte, sondern auch das Kerngerüst und die Kerngrundsubstanz Eosin auf. Die normalerweise auf die Kernkörperchenmitte beschränkte „Eosinophilie“ (siehe Tabelle C) hat sich bei den sauren Kernen über den ganzen Bereich des Kernes ausgedehnt. In der Kerngrundsubstanz entspricht wieder die Eosinaufnahme im unteren Stock der Safraninaufnahme im oberen bei der Hämatein—Safranin—Tannin-Methode (siehe Tabelle B). Sie ist so stark, daß das Wasserblau in dem unteren Stock der Kerngrundsubstanz ganz von Eosin verdrängt wird, während in den Rändern von Kern und Kernkörperchen es sich allerdings neben dem Eosin mehr oder minder erhält, was in der Tabelle durch die Bezeichnung: Wasserblau O bis + angedeutet ist. Genauer gesagt, hängt die Färbung dieser Teile vom Grad der Eosinfärbung ab. Bei starker Eosinfärbung sind nur noch die

Ränder der Kerne blau umsäumt, während die der Kernkörperchen reine Eosinfarbe zeigen; bei schwächerer Eosinfärbung sind die Ränder der Kernkörperchen noch bruchstückweise blau gefärbt oder weisen noch Andeutungen von blauen Säumen auf. Durch diese fast reine Eosinfärbung erscheinen die sauren Kerne sehr hell, rötlichgelb und stechen sehr von den normalen, fast ganz blau gefärbten ab. Daß es sich bei diesen hellen Kernen wirklich um dieselben sauren Kerne handelt, welche bei der Hämatein—Safranin-—Tannin-Methode tiefsafraninrot hervorleuchten, dafür sprechen alle ihre sonstigen Eigenschaften: 1. ihre rundlich ovale Form und besondere Größe bis in die obersten Lagen der Stachelschicht und die Körnerschicht hinein, wo die gewöhnlichen Kerne bereits zackig werden und einschrumpfen, sodann 2. ihre gleichmäßige Verteilung in der Stachelschicht von der Keimschicht bis zur Hornschicht, 3. der Umstand, daß sehr oft in einer Kernhöhle zwei Kerne liegen und daß diese dann entweder beide eosinrot oder beide wasserblau sind, oder in scharfem Gegensatz zueinander einer eosinrot und der andere wasserblau ist, also dieselbe Art der Verteilung und Vergesellschaftung wie sie die sauren Kerne bei den Doppelkernen der Oberhaut auch sonst zeigen, und 4. endlich der vollkommene Parallelismus, welcher hier wie sonst zwischen sauren Kernen und der Kernkörperchenmitte der normalen Kerne besteht. Für diese Hervorhebung der sauren Kerne läßt sich das Eosin + Phloxin bisher durch keine andere saure Farbe ersetzen.

Sind wir durch die bisherigen beiden Färbungen, deren Resultate in den Tabellen A bis D verzeichnet sind, über den Eiweißgehalt der unteren beiden Stöcke orientiert, so haben wir schließlich noch einen kurzen Blick auf den obersten Stock und damit auf den Gehalt der sauren Kerne an sauren Eiweißen zu werfen, was in den folgenden Tabellen E und F geschehen soll. Dazu dient uns die Eosin — Methylgrün + Pyronin + Karbol-Methode. Dieselbe ist bereits 1906 als eine gute Färbung für saure Kerne mitgeteilt[1]).

Die Methylgrün + Pyronin-Mischung allein färbt keine sauren Kerne, wohl aber dann, wenn man ihr eine Färbung mit Eosin vorausschickt. Diese zweibasische, saure Farbe wird im unteren Stock gespeichert und dient dann als Beize für zwei basische Stoffe: das basische Plastin und das basische Pyronin, indem das Eosin mit beiden zusammen eine feste Tripelverbindung eingeht, ähnlich wie es in der Romanowsky-Färbung das basische Protozoenkerneiweiß an das basische Thiazinrot kettet.

E. Normale Kerne (Farbenindex: **Eosin—Methylgrün + Pyronin**).

Stock	Kernkörperchen		Kerngerüst		Kerngrundsubstanz	
	Rand	Mitte	Rand	Gerüst		
oberer .	Methylgrün	**Pyronin**	Methylgrün	Methylgrün	—	Nukleoproteide Globulin
mittlerer	—	—	—	—	—	Mesoplastin
unterer .	—	**Eosin**	—	—	—	Plastin

[1]) P. G. Unna, Histologischer Atlas zur Pathologie der Haut, Heft 8, Fig. 254.

Die Tabelle E zeigt nun bei der Eosin—Methylgrün + Pyronin + Karbol-Methode eine starke Pyroninfärbung der Kernkörperchenmitte neben einer Methylgrünfärbung von Kernrand, Kerngerüst und Rand des Kernkörperchens. Da wir aus der Wep-Färbung (Tabelle C und D) gelernt haben, daß die Kernkörperchenmitte eine starke Affinität zum Eosin im unteren Stock besitzt, müssen wir auch bei dieser Doppelfärbung eine solche annehmen, die nur, durch das Pyroninrot im oberen Stock gedeckt, hier nicht zur Geltung kommt. Diesen normalen Kernen gegenüber erscheint in den sauren Kernen der gesamte untere Stock eosinophil und dadurch das ganze Farbbild verändert.

F. Saure Kerne (Farbenindex: **Eosin—Methylgrün + Pyronin).**

Stock	Kernkörperchen		Kerngerüst		Kerngrund-substanz	
	Rand	Mitte	Rand	Gerüst		
oberer .	Methylgrün	**Pyronin**	Methylgrün	Methylgrün	**Pyronin**	Nukleo-proteide Globulin
mittlerer	—	—	—	—	—	Mesoplastin
unterer .	**Eosin**	**Eosin**	**Eosin**	**Eosin**	**Eosin**	Plastin

Hatten die normalen Kerne das Pyronin nur in der Kernkörperchenmitte gespeichert, so ist nun infolge der Eosinbeize auch die sonst farblose Kerngrundsubstanz befähigt, das basische Pyronin aufzunehmen. Dort, wo im oberen Stock Methylgrün gespeichert wird, im Kernrand, Kerngerüst und Kernkörperchenrand, macht sich die Aufnahme von Eosin in dem unteren Stock dadurch geltend, daß die normale grüne Farbe einer violetten Mischfarbe Platz gemacht hat. Die so im ganzen dunkleren sauren Kerne sind hier also durch ein violettes Kerngerüst, rote Kerngrundsubstanz und im Zentrum tiefrote Kernkörperchenmitte ausgezeichnet.

Fassen wir alles zusammen, so sind die sauren Kerne vor den gewöhnlichen Kernen ausgezeichnet durch den Gehalt an zwei besonderen Eiweißen, an saurem Globulin im oberen Stock und an eosinophilem, basischem Plastin im unteren Stock, während der mittlere Stock das normale Mesoplastin beherbergt. Dieser letztere Umstand ist auch der Grund, weshalb man früher bei den gebräuchlichen Hämatoxylinfärbungen der Kerne von dem Vorkommen und der Besonderheit der sauren Kerne nichts gemerkt hat und nichts bemerken konnte; man färbte eben nur den normalen mittleren Stock. Wenn in der Keimschicht hier und da die Entwicklung der sauren Kerne beginnt, halten die betreffenden Kerne ihre mittlere Mesoplastinlage fest und erfahren nur in ihrer basischen Grundlage eine „eosinophile Umwandlung", mit der zugleich eine „Globulinmetamorphose" des oberen Stockes einhergeht. Mit dem Ballast des Globulins in der Kerngrundsubstanz erlischt auch die Mitosenbildung dieser Kerne, sie bilden kein neues Epithelgewebe mehr und sinken zu Sauerstoffspeichern herab. Sie machen dieselbe Metamorphose im großen durch wie die mittleren Teile aller Kernkörperchen im kleinen, die als Sauerstoffspeicher für die aktivierende Randpartie der Kernkörperchen zu dienen haben.

Als die sauren Kerne zuerst bei seniler Degeneration und Verwitterung der Haut, sodann bei den Lepromen gefunden wurden, schien es so, als ob sie nur ein Zeichen herabgesetzter Ernährung und Mangel an Regenerationskraft seien. Dem schien aber ihr häufiges Vorkommen beim Embryo, an den Blutkapillaren und an den normalen Knäueldrüsen zu widersprechen. Licht in dieses Dunkel brachte erst die Entdeckung, daß die sauren Kerne in vergrößertem Kaliber die Rolle von Kernkörperchen spielen.

Die sauren Kerne sind also durch ihren normalen Nukleingehalt Aktivatoren und Sauerstoffabspalter, durch ihren besonders großen Globulingehalt aber zugleich sehr gute Sauerstoffspeicher, während die gewöhnlichen Kerne zwar gute Aktivatoren, aber nur mäßige Sauerstoffspeicher sind, da in ihnen nur das Kernkörperchen Sauerstoff speichern kann. Unter diesem Gesichtswinkel erscheint die Produktion des Gewebes an sauren Kernen von ähnlicher Bedeutung wie die von Granoplasma im Epithel. Es werden in beiden Fällen neben den Sauerstoffaktivatoren (Kernen) saure Eiweißmassen abgelagert, welche imstande sind, Sauerstoffvorräte zu binden und den aktivierten Sauerstoff vor sofortigem Verbrauche zu bewahren.

Von diesem Standpunkt aus begreifen wir natürlich ebenso sehr die Nützlichkeit der sauren Kerne beim Embryo und im Endothel der Blutkapillaren wie in der atrophischen Greisenhaut und im Leprom. Und wenn auch sicher durch die Ausbildung der sauren Kerne ebenso viele Einzelkerne dem Zellteilungsgeschäft entzogen werden, so tragen die gebildeten und Sauerstoff speichernden sauren Kerne doch insgesamt dazu bei, den Sauerstoffgehalt eines Gewebes zu erhöhen, und befördern damit indirekt auch seine mitotische, regenerative Kraft.

H. Die Hautfette.

I. Das Hornschichtfett. — Cholesterinfette.

Der Alkohol Cholesterin ($C_{27}H_{46}O$) ist ein charakteristischer Bestandteil aller jungen Zellen und so auch aller jungen Epithelien der Haut, besonders der Keimschicht des Deckepithels und des sezernierenden Teiles der Knäueldrüsen. Er geht hier Verbindungen ein mit den Fettsäuren der Oberhaut und bildet mit diesen die für die Hornschicht charakteristischen Hautfette. Die älteren Zellen der Stachelschicht verlieren schon allmählich ihren Cholesteringehalt, und alle verhornten Teile der Oberhaut, der Wurzelscheide und des Haares besitzen daher kein freies Cholesterin mehr.

Der Nachweis des Cholesterins geschieht mit der von Golodetz für Hautschnitte modifizierten Moleschottschen Reaktion des Cholesterins auf konzentrierte Schwefelsäure. Diese besteht in einer Verdünnung der konzentrierten Schwefelsäure (5 Teile) mit 30%igem Formalin (2 Teile). Durch diese Mischung werden die Gefrierschnitte, die für den Nachweis des alkohollöslichen Cholesterins nötig sind, nicht so stark angegriffen wie durch die konzentrierte H_2SO_4 allein, während die Färbung des Cholesterins dieselbe bleibt, ja sogar dunkler, braunschwarz wird.

Mit Hilfe der Moleschott-Golodetz-Färbung gelingt es, das Cholesterin auch neben den Fetten, zumal neben der Ölsäure nachzuweisen, an der die Haut reich ist. Diese erzeugt bekanntlich mit der Osmiumsäure, sowohl frei wie auch in ihren Verbindungen als Oleat, eine tiefschwarze Färbung, den sogenannten „schwarzen Rahmen" der osmierten Hautstücke. An der Verhornungsgrenze scheiden die Hautepithelien Ölsäure ab, die mit dem Rest ihres erhalten gebliebenen Cholesterins die schon genannten Verbindungen zu ölsauren Cholesterinestern eingeht, welche dann bis zur Oberfläche der Hornschicht erhalten bleiben.

Diese Cholesterinfette färben sich mit den Fettfärbemitteln (Sudan, Scharlach) wie die Glyzerinfette, geben aber nicht mehr, wie das freie Cholesterin, die Liebermannsche Reaktion, eine Farbenskala von Rot, durch Blau bis zu Grün, bei gleichzeitiger Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure und Essigsäureanhydrid.

Außer den Epithelien reagieren mit der Moleschott-Golodetzschen Reaktion, wenn auch in geringerem Grade, die Bindegewebszellen der Haut, wie denn diese Methode überhaupt eine spezifische Protoplasmafärbung darstellt. Die Zellkerne färben sich gar nicht und die kollagenen und elastischen Fasern so wenig wie die Hornschicht. Daher ist bei dieser Behandlung der Haut auch die Grenze zwischen Epithel und Kutis immer eine scharfe.

II. Das Eigenfett der Hornschicht. Glykogen und Ölsäure.

Unter den Fetten der Hornschicht haben wir von den Außenfetten, die ihr von den Talgdrüsen und Knäueldrüsen zugeführt werden, das Eigenfett zu unterscheiden, welches sie selbst produziert. Als solches haben wir die Ölsäure erkannt, welche unmittelbar nach Vollendung des Verhornungsprozesses in der basalen Hornzelle erscheint und hier eine besonders scharfe mikroskopische Grenze verursacht. Legen wir Hautstücke von der Fußsohle in Osmiumsäure, unser Hauptreagens auf Hornschichtfette, so setzt hier mit der basalen Hornschicht jener „schwarze Rahmen" ein, der seit seiner Entdeckung durch Langerhans (1873) in der Geschichte des Hautfettes eine hervorragende Rolle gespielt hat.

Die Verhornung ist bereits eine Zellenlage vorher, in der infrabasalen Hornschicht vollendet, aber diese wird nicht von der Osmiumsäure geschwärzt, sie gehört nicht zum „schwarzen Rahmen", da ihr noch das Eigenfett, die Ölsäure fehlt. Dafür ist sie erfüllt von der Muttersubstanz der Ölsäure, dem Kohlehydrat: Glykogen (Bild 64).

Die Entdeckung des Glykogens an dieser Stelle verdanken wir lediglich dem negativen Ausfall der Osmiumschwärzung daselbst. Ranvier ließ in der ersten Auflage seines Lehrbuches die durch Osmiumsäure geschwärzte Hornschicht unmittelbar oberhalb der durch Pikrokarmin dargestellten Körnerschicht beginnen. Durch mich darauf aufmerksam gemacht, daß sich zwischen beide Oberhautschichten noch eine dünne Zellenlage einschiebe, die weder das Keratohyalin der Körnerschicht wahrnehmen lasse, noch die osmierbare Ölsäure der basalen Hornschicht, verbesserte er jene Angabe in der zweiten Auflage seines Lehrbuches.

Wir nennen diese zwischen Körnerschicht und basaler Hornschicht sich einschiebende und bei der Osmierung hell bleibende Lage jetzt die infrabasale Hornschicht (Bild 64) und ich konnte nachweisen, daß dieselbe sich mit Jod braun, mit Bests Karmin rot, mit Paul Mayers Reagens auf Glykogen schwarz färbt, also Glykogen enthält. Das Kohlenhydrat Glykogen geht hervor aus dem Keratohyalin der darunter liegenden Körnerschicht, vermutlich aus dem Zerfall der in dieser Schicht verschwindenden Nukleinsäure, und bildet selbst wieder die Muttersubstanz für die Ölsäure, die wir in der darüber liegenden basalen Hornschicht antreffen. Morphologisch unterscheidet sich dieser Glykogenbefund darin von den meisten anderen, daß er nicht in Gestalt einzelner freier Körner, sondern in diffuser Verbreitung, wahrscheinlich verbunden mit Eiweiß, als ein Glykoproteid auftritt.



Bild 64.
„Schwarzer Rahmen" der Hornschicht. Alkohol-Paraffin-Schnitt der in Osmiumsäure fixierten Fußsohle.
Der „schwarze Rahmen" der Hornschicht (R). Basale Hornschicht (ba) enthält Ölsäure. Infrabasale, helle Hornschicht (if) enthält Glykogen, keine Ölsäure. Grünbräunliche Stachelschicht (sta) mit hellen Kernen. Hellgelbliche Cutis (cu). Schweißporus mit geschwärzter Cuticula (p).

Diese an den Oberhautschichten so deutliche Folge eiweißreicher Körnerzellen, glykogenreicher Infrabasalzellen und ölsäurereicher basaler Hornzellen stellt geradezu das Muster einer stufenweise eintretenden Zellverfettung dar und legt es nahe, auch bei den Zellverfettungen anderer Organe nach dem intermediären Vorkommen von Glykogenzellen vor der Verfettung zu fahnden.

Man färbt die Glykogenzellen am besten nach rascher Entwässerung der Haut (um Glykogenverluste zu vermeiden) in absolutem Alkohol und Paraffin- oder Zelloidineinbettung nach folgender Formel:

1. Entfernung des Zelloidins (Paraffins) durch Alkohol + Äther, absoluter Alkohol, Wasser.

2. Methylenblau (Viktoriablau), 1%ige Lösung in Spiritus dilutus oder Nigrosin (Diamingrün), 1%ige wässerige Lösung, 1 Minute, in Wasser abspülen.

3. Bestsche ammoniakalische Karminlösung 1 Minute, in Wasser abspülen.
4. Alkohol, Öl, Balsam.

Die Vorfärbungen mit blauen oder grünen Farben dienen dazu, die nächste Umgebung der Glykogenzellen derart zu präokkupieren, daß die darauffolgende Karminlösung dort weniger gut haftet und dadurch die infrabasale, glykogenhaltige Schicht isoliert wird und relativ stark hervortritt (Bild 65). Die basischen Farben präokkupieren das saure Keratin, und zwar Methylenblau besonders die basale Hornschicht, Viktoriablau die Hornzellen in der Umgebung der Schweißporen, welche die Glykogenzellen der letzteren umrahmen. Die sauren Farben (Nigrosin und Diamingrün) präokkupieren das basische Eleidin der Hornschicht, das auch, wie die Glykogenzellen, vom Bestschen Karmin angefärbt wird.

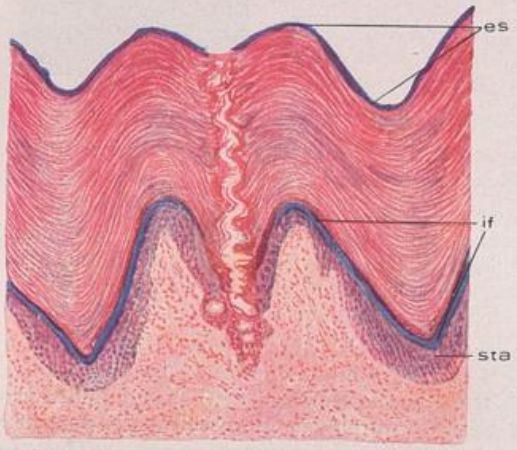


Bild 65.

Glykogenhaltige infrabasale Hornschicht. Oberhaut der Fußsohle. Alkohol-Paraffin-Schnitt. Färbung: Viktoriablau — Karmin (Best). Infrabasale Hornschicht (if) und Endschicht (es) viktoriablau, sowie einzelne Hornzellen der Mittelschicht. Karminrot: Kerne der Cutis und Stachelschicht (sta), Wandungszellen des Schweißporus und die meisten Zellen der mittleren Hornschicht.

Will man an osmierten Schnitten in der ungefärbten Infrabasalschicht das Glykogen nachweisen, so ist es am einfachsten, den Schnitt in Ehrlichs Jodgummi einzubetten, wo dieselbe sich allmählich leuchtend gelbrot färbt.

Alle drei Stufen der Verhornung: Körnerschicht, infrabasale und basale Hornschicht gewinnt man an Schnitten von Fußsohlenhaut, die 12 Stunden in Flemmings Lösung verweilt hat, auf folgende Weise: Sie kommen zuerst 1 Stunde in Bests Karminlösung. Darin färbt sich die nicht osmierte mittlere Hornschicht karminrot, während die unterhalb des schwarzen Rahmens befindliche infrabasale Schicht eine gelblichrote Färbung annimmt. Die Stachelschicht erscheint lachsfarben, die Kutis rosa (Bild 66 a). Die Körnerschicht tritt nicht hervor und läßt sich auf dem osmierten Gewebe auch nicht durch Hämatein + Alaun darstellen, wohl aber durch eine Nachfärbung von 10 Minuten in einer 1%igen Nigrosinlösung. Dann erscheint die Körnerschicht als ein dunkelviolettes Band unterhalb der roten infrabasalen Hornschicht, und in der

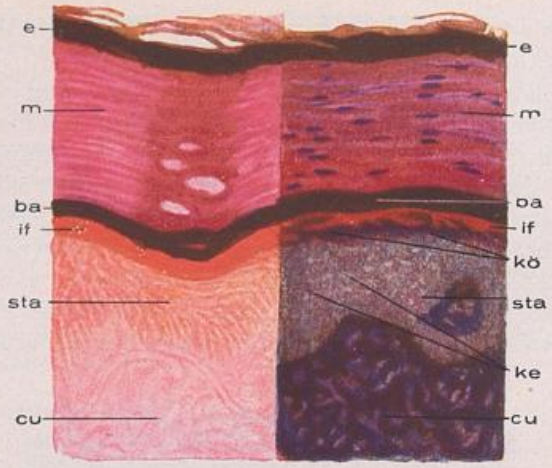


Bild 66 a. Bild 66 b.

Doppelbild 66 a und b. Die drei Übergangsschichten der Verhornung. Fußsohle, frisch. Flemmings Lösung 12 Stunden. 3 Stunden Auswaschen in fließendem Wasser. Alkohol, Paraffineinbettung.

Bild 66 a. „Schwarzer Rahmen" und infrabasale Hornschicht. Bests Karminlösung 1 Stunde. Spiritus dilutus. Alkohol absolut., Öl, Balsam. Basale Hornschicht (ba) („schwarzer Rahmen") und Endschicht (e) osmiumschwarz. Mittelschicht (m) karminrot. Infrabasale Hornschicht (if) gelblichrot. Stachelschicht (sta) lachsfarben. Cutis (cu) rosa.

Bild 66 b. „Schwarzer Rahmen", infrabasale Hornschicht und Körnerschicht. Bests Karminlösung 1 Stunde, Spiritus dilutus, 1%ige Nigrosinlösung 10 Minuten. Spir. dil. Alkohol, Öl, Balsam. Basale Hornschicht (ba) und Endschicht (e) schwarz, Mittelschicht (m) dunkel blaurot. Infrabasale Hornschicht (if) dunkelrot. Körnerschicht (kö) dunkelviolett. Stachelschicht (sta) bläulichgrau, Kerne (ke) hell. Cutis (cu) blauschwarz.

dunkelroten mittleren Hornschicht erscheinen die Kernreste blauschwarz, während sie in der bläulichgrauen Stachelschicht hell bleiben; die Kutis wird blauschwarz gefärbt (Bild 66 b).

Eine Verwechslung des Glykogens mit Eleidin ist bei Benutzung der Bestschen Karminfärbung schon deshalb ausgeschlossen, da sich in dieser das Eleidin allmählich auflöst, während das Glykogen immer stärker gefärbt hervortritt.

Brunner hat in bezug auf das Vorkommen von Glykogen einen interessanten Unterschied zwischen der Stachelschicht der Papillenhaare und der der Beethaare gefunden. Die erstere, die untätig ist und nicht für das Wachstum der Haare verbraucht wird, enthält viel Glykogen, die letztere, die im Haarbeet verhornt und zum Wachstum des Beethaares verbraucht wird, ist glykogenfrei wie die gewöhnliche Stachelschicht der Oberfläche.

An den Schweißporen ziehen sich die Glykogenzellen in spiraligen Windungen bis an die Oberfläche der Hornschicht hinauf und bilden an senkrechten Schnitten Ringe um dieselben, während nach dem Lumen zu die ölsäurehaltigen, durch Osmiumsäure geschwärzten Hornzellen die innere Auskleidung der Schweißporen an Osmiumschnitten darstellen. Auch nach dieser freien Oberfläche des Schweißporus geht also die fettige Hornzelle durch ein glykogenhaltiges Vorstadium hindurch.

III. Talgdrüsenfett und Knäueldrüsenfett.

Das Fett der Talgdrüsen, den Hauttalg, gewinnt man am reinsten durch Ausdrücken einzelner Talgdrüsen der Nase und Stirn bei Seborrhoea oleosa oder Akne und Beseitigung des obersten, mit der Luft in Berührung gewesenen Teiles des Fettzylinders. Dasselbe ist von heller, gelblichweißer Farbe, talgiger Konsistenz und hat einen verhältnismäßig hohen Schmelzpunkt (53°). Unna und Golodetz[1]) fanden darin 2·8% Cholesterin, sehr viel Oxycholesterin, dagegen, zum Unterschied vom Wollfett der Schafe, gar kein Isocholesterin.

Das Knäueldrüsenfett der Fußsohle erhält man durch mehrtägiges Tragen wollener oder baumwollener Sandalen, die vorher entfettet sind und durch Überstrümpfe in ihrer Lage festgehalten werden. Unna und Golodetz fanden in dem weichen, braunen Fette des Ätherextraktes 2·55% Cholesterin vor der Verseifung der Cholesterinester, nach derselben 4·17%.

Das Knäueldrüsenfett der Hohlhand kann man auf zwei verschiedene Weisen erhalten. Wenn im Sommer oder stark geheizten Zimmer viel Schweiß abgesondert wird, genügt die längere Umfassung eines entfetteten Wattebausches und periodische Abreibung der Hohlhand mittels desselben. Sonst umfaßt man vor dem Zubettgehen mit beiden Händen je einen entfetteten Wattebausch, schließt die Hände zur Faust und zieht über letztere und den ganzen Arm einen eng anschließenden Strumpf, der die Nacht sitzen bleibt und die Hand in geschlossenem Zustande erhält. Das so gewonnene Fett der Knäueldrüsen der Hohlhand ist heller als das der Fußsohle, gelbbräunlich, von wachsartiger Konsistenz und dem Schmelzpunkt 46·5°. Unna und Golodetz fanden vor der Verseifung der Cholesterinester 0·64% Cholesterin in demselben, nach der Verseifung 1·43%, nur sehr wenig Oxycholesterin und gar kein Isocholesterin.

Im Gegensatz zum Fett der Talgdrüsen, das eine hellere Farbe und höheren Schmelzpunkt besitzt, ist das Fett der Knäueldrüsen von dunklerer Farbe, niedrigerem Schmelzpunkte und von einem eigenartigen Geruch.

Das Fett der gesamten Oberhaut (Hornschicht + Stachelschicht) erhält man nach Ablösung derselben mittels 24—48stündiger Mazerierung in 1‰iger Essigsäure. Der Ätherextrakt ist dunkel, bräunlich, von wachsartiger Konsistenz und einem Schmelzpunkt: 48—49°.

Unna und Golodetz fanden darin vor der Verseifung 14·04%, nach derselben 16·1% Cholesterin und weder Oxycholesterin noch Isocholesterin.

Das Hornschichtfett wird gewonnen durch flache Abtragung schwieliger Stellen der Fußsohlenhaut mit dem Rasiermesser. Der Ätherextrakt ist wachsartig, wesentlich heller und von höherem Schmelzpunkt (51°) als das Gesamtfett der Oberhaut.

Unna und Golodetz fanden darin 10·71% Cholesterin vor und 19·62% (!) nach der Verseifung, kein Oxycholesterin und kein Isocholesterin. Das Hornschichtfett ist also das cholesterinreichste Fett aller Fettquellen der Haut, und der Gehalt an Cholesterin steigt bei der Verseifung der Cholesterinester fast auf das Doppelte (10·71 : 19·62). Mit anderen Worten: bei der Verhornung wird zirka die Hälfte des Cholesterins der Stachelschicht durch Bindung an Ölsäure in Cholesterinester verwandelt.

---

[1]) P. G. Unna und Golodetz, Die Hautfette. Biochemische Zeitschrift Bd. 20, S. 469.

Ähnlich dem Hornschichtfett des Erwachsenen verhält sich das der Vernix caseosa des Neugeborenen, welche die abgestoßene Hornschicht aus dem 6.—8. Fötalmonat ist und eine weiße, weiche Masse vom Schmelzpunkt 38—39° darstellt. Auch hier steigt der hohe Cholesteringehalt von 7·82% nach der Verseifung auf das Doppelte und mehr (16·2%). Daß hier das Oxycholesterin fehlt, ist nicht auffallend bei dem Aufenthalt der Vernix im Uterus; wichtig ist, daß auch hier das Isocholesterin, welches das Wollfett charakterisiert, fehlt.

Auch das Ohrenschmalz enthält weder Oxy- noch Isocholesterin und nur wenig Cholesterin: 2·9% vor und 3·5% nach der Verseifung, ist also der Hauptsache nach ein Sekret- und nur zu geringstem Teil Zellenfett.

Noch weniger Cholesterin, nämlich 0·14% vor und 0·18% nach der Verseifung, enthält das Fett der Subkutis; es ist ein nur mit wenig Cholesterin versetztes Glyzerinfett.

Das Vorhandensein von Cholesterinestern im Hautfett, das man früher irrtümlich auf Grund des positiven Ausfalles der Cholestolreaktion angenommen hatte (Liebreich), wurde zum ersten Male sicher qualitativ, quantitativ und mit genauer Lokalisation, nämlich lediglich in der Hornschicht, von Unna und Golodetz nachgewiesen. Im Gegensatz dazu enthält die Stachelschicht keine Cholesterinester, ist aber reich an Cholesterin.

In dem Sekretfett der Knäueldrüsen zerfallen umgekehrt wieder Cholesterinester unter Freiwerden von Cholesterin. So ist besonders das Fußknäuelfett reich an Cholesterin, an Säuren und an Oxycholesterin und wird in letzterem Punkte nur noch vom Sekret der Talgdrüsen übertroffen, welches zunächst für die Einfettung der Haare bestimmt ist. Hierin offenbart sich eine örtlich beschränkte Neigung zur Oxydation des Cholesterins, wie sie allgemein und in viel höherem Grade beim Wollfett des Schafes vorkommt.

Im Gegensatz zu den Sekretfetten bilden die in reduzierendes Zelleneiweiß eingeschlossenen, nicht mit der Luft in Kontakt kommenden Zellfette kein Oxycholesterin. Eine Ausnahme in dieser Beziehung macht nur die Nagelsubstanz, welche ziemlich viel Oxycholesterin enthält.

IV. Fett der Vernix caseosa.

(Vgl. auch das Bild 38.)

Die fettreiche Vernix caseosa der Neugeborenen ist ein Rest der Hornschicht einer früheren Fötalperiode vom 6.—8. Monat. Zu dieser Zeit wird noch kein Keratohyalin gebildet, wohl aber mit Nigrosin färbbares Eleidin und mittels ammoniakalischem Karmin (nach Best) darstellbares Glykogen. Das Fett der Vernix caseosa ähnelt in chemischer Beziehung nicht den Sekretfetten, sondern den Zellfetten der Haut der Erwachsenen und steht am nächsten dem Hornschichtfett. Die Sekretfette sind hauptsächlich durch den hohen Gehalt der Vernix caseosa an Cholesterin und Cholesterinestern ausgeschlossen.

Man unterscheidet ein in den Hornzellen der Vernix enthaltenes Innenfett von einem den Hornzellen anhaftenden und sie verklebenden Außenfett. Um ersteres zu isolieren, wird die frische V. c. (Vernix caseosa) eine halbe Stunde lang mit kalter Natronseifenlösung geschüttelt. Die so gewaschenen Vernixzellen trocknen leicht vollständig und lassen sich dann gut durch Osmiumdampf

osmieren. Durch Versuche im großen mit gewaschenen Vernixzellen ist erwiesen, daß deren Hornmembranen leicht von flüssigen Fetten durchdrungen werden. Es unterliegt daher keinem Zweifel, daß wir im Außenfett ein durch die Hornhüllen hindurchgeschwitztes Innenfett vor uns haben. Denn mikroskopische Schnitte der V. c. zusammen mit der darunterliegenden fötalen Haut haben ergeben, daß sich das zu dieser Zeit schon bestehende Fett der Talgdrüsen ohne jede Verbindung mit der Vernix befindet, während die Knäueldrüsen noch gar kein Fett, sondern erst dessen Vorstufe: Glykogen produzieren. Bei der Osmierung schwärzt sich die V. c. nicht wie die Hornschicht des Neugeborenen homogen, sondern in scheckiger Weise, indem die osmierten Hornzellen mit ungeschwärzten untermischt sind.

I. Plasmazellen.

Farbenindex: Methylgrün + Pyronin + Karbol-Färbung.

(Pappenheim-Unna-Färbung.)

Die Plasmazelle ist, wie auch das Kollagen, ein Endprodukt der Bindegewebszelle (Spindelzelle, Fibroblast, Gefäßendothelzelle). Sie stammt aber nicht, wie jenes, vom Spongioplasma, der basischen Eiweißgrundlage der Bindegewebszelle ab, sondern ist aufzufassen als eine partielle Hypertrophie zweier saurer Bestandteile derselben, der Nukleoproteide im Kern und der Zytose im Plasma.

In der Haut wie im Gehirn sind die Plasmazellen pathologische Bildungen, während sie im lymphatischen Gewebe, in vielen Drüsen und im Darm auch normalerweise vorkommen.

Die Nukleoproteidvermehrung führt zu ganz eigentümlichen Kernbildern, indem sich die Nukleoproteide mehr an der Peripherie des kugeligen Kernes in einzelnen groben Brocken anhäufen, als, wie gewöhnlich, entlang des Kerngerüstes. Die dadurch dunkelmethylgrüne Peripherie zusammen mit dem zentral liegenden pyroninroten Kernkörperchen hat Pappenheim und nach ihm andere Beobachter dazu verführt, dieses Bild als „Radkern" zu bezeichnen, ein ganz unzutreffender Vergleich, da den Plasmazellen nicht bloß die Scheibenform eines Rades, sondern auch die Speichen eines solchen fehlen. Die Bezeichnung: Hypertrophie der Nukleoproteide genügt vollständig zur Charakterisierung der Plasmazellen.

Die Hypertrophie des Granoplasmas muß man dort studieren, wo die Plasmazellen in Menge erzeugt werden, an jungen Plasmazellen. Die Zytose, aus der das Granoplasma besteht, ist viel hinfälliger als die Nukleoproteide, leicht löslich in Serum und Lymphe, und daher zeigen alle älteren Plasmazellen bereits Auflösungserscheinungen des Granoplasmas, die den jungen Plasmazellen nicht zukommen. Dahin gehören die hellen, perinukleären Höfe, die oft, aber fälschlich für ein Charakteristikum der Plasmazellen überhaupt erklärt wurden, aber nur ein Zeichen der schon beginnenden Granoplasmalösung (Granolyse) sind. Ferner die atrophischen Formen der Plasmazellen mit unregelmäßig ausgezackten, äußeren Konturen, in deren Umgebung fast immer noch abgebröckelte Granoplasmareste zu finden sind. Dahin gehören ferner die Verschiebungen der Hauptmasse der Zytose innerhalb der großen Epithelien an

eine Wand, ein Phänomen, das sehr häufig auf die Anwendung von verdünntem Alkohol während der Präparation zurückzuführen ist, aber auch bei älteren Plasmazellen sonst vorkommt.

Alle diese Alterserscheinungen fehlen den ganz normalen jungen Plasmazellen, die man zuerst nur dort studieren sollte, wo sie rasch und massenhaft entstehen, z. B. bei der Aktinomykose.

Empfehlenswert hierfür ist die Aktinomykose der Rinderzunge, welche jeder Schlachthof liefern kann. Man hat, um die Zytose in statu quo zu erhalten, nur dafür zu sorgen, daß die nicht zu großen, ausgeschnittenen Kuben in einem kleinen Gläschen auf einen Wattebausch gelagert werden und dann nur absoluter Alkohol bis an den oberen Rand der Watte aufgefüllt wird. Die dann eintretende Schnellhärtung erhält alle Zytose in situ. Verdünnter Alkohol löst schon etwas Zytose auf und verschiebt sie in der Zelle.

Bei der Entstehung der Plasmazellen kann man drei Stadien unterscheiden: 1. die Hypertrophie der Nukleoproteide, 2. die Hypertrophie des Granoplasmas und 3. die Loslösung der jungen Plamazelle aus dem Zellverbande.

In den normalen Bindegewebszellen tritt an denjenigen Stellen, wo Plasmazellen sich bilden wollen, zuerst eine auffallende Veränderung der bis dahin nukleinarmen, gewöhnlichen Kerne auf. Sie bilden mit großer Schnelligkeit neue Nukleoproteide und nehmen bei der Pappenheim-Unna-Färbung das charakteristische Aussehen dunkelblaugrüner, nukleinsäurereicher Kerne an mit wandständigen großen Nukleoproteidbrocken.

In diesem Stadium besteht noch keine Neigung der veränderten Bindegewebszellen, sich aus dem Zellverbande zu lösen. Diese beginnt erst, wenn sich um die nukleinsäurereichen Kerne abnorm viel amorphkörniges Granoplasma abscheidet, so daß die Umgebung der Kerne eine stark saure Reaktion erhält und sich bei der Pappenheim-Unna-Färbung mit Pyronin intensiv rot färbt.

Geschieht diese Granoplasmavermehrung innerhalb größerer Fibroblasten, welche schon eine Reihe nukleinsäurereicher Kerne gebildet haben, so tritt bald durch Dehnung und Anspannung ihres Spongioplasmas der Moment ein, wo durch Zerklüftung die einzelnen Plasmazellen frei werden und der große Fibroblast in so viele Plasmazellen zerfällt, als er Nukleoproteidzentren und Granoplasmahöfe um dieselben gebildet hatte.[1])

Neben dieser sehr häufigen endogenen Entstehung der Plasmazellen in Form von Gruppen und Reihen findet natürlich auch eine Umwandlung einzelner gewöhnlicher Bindegewebszellen in Plasmazellen durch rasche Nukleinsäure- und Zytosevermehrung statt, die aber nicht so auffallend ist, da hier der Zerklüftungsprozeß fortfällt. Aber der Bildungsvorgang ist immer derselbe: erst maximale Nukleoproteidvermehrung, dann maximale Zytoseanhäufung. Stets sind die jungen Plasmazellen so erfüllt, man möchte sagen: vollgestopft von sich rotfärbendem Granoplasma, daß von einem perinukleären, plasmafreien Hofe in ihnen nicht die Rede sein kann. Dieser ist immer erst das Zeichen von Granolyse bei älteren Plasmazellen.

Das erste Symptom dieser Granolyse ist die kugelige Abrundung der freigewordenen, anfangs noch kubischen und nun allerseits von Lymphe bespülten

[1]) P. G. Unna, Die Herkunft der Plasmazellen. Virchows Archiv Bd. **214**, S. 320 (1913).

Plasmazelle. Sobald diese völlig freigeworden, trägt sie auch keine Kennzeichen mehr an sich, an denen man ihren endogenen Ursprung erkennen könnte. Es ist daher von größter Wichtigkeit für die Lehre von ihrer Entstehung, daß die Abtrennung vom Mutterboden häufig unvollständig ist und daß dann die Plasmazellen noch Reste von Spongioplasma an sich tragen, die ihnen eine charakteristische Form verleihen. Natürlich finden sich solche Übergangsformen am meisten dort, wo von Anfang an die Mutterzellen reich an Spongioplasma waren, so daß der Abbau desselben zu Granoplasma nicht alles Spongioplasma völlig verbrauchen konnte.

Da die Spongioplasmareste meist die Formen von Platten, Schalen oder Stielen haben und die sich loslösenden Plasmazellen kugelige, mit Früchten vergleichbare Gestalten besitzen, so haben sich für diesen vielgestaltigen Komplex aus der Botanik entlehnte Vergleiche eingebürgert, wie „Frucht am Stiele", „Frucht auf der Platte", „Frucht in der Schale", „Frucht in der Schote", „Frucht im Korbe" usw.[1]). Diese die endogene Entstehung der Plasmazellen beweisenden Bilder finden sich in jedem Plasmom, aber natürlich am häufigsten in den mit fibrösen Wucherungen durchsetzten Plasmomen, wie bei der Initialsklerose, der Elephantiasis und ganz besonders reichlich bei der Aktinomykose.

Aber auch bei den weicheren Plasmomen wie beim Lupus und Ulcus molle, wo die gleichzeitige Fibrombildung zurücktritt und Plamazellenverbände ohne diese spongioplastischen Übergangsformen vorwiegen, finden sich überall Beweise für die endogene Entstehung der Plasmazellen. In erster Linie beweisend sind die Plasmazellenreihen, die eine in kubische Stücke zerfallene große Spindelzelle darstellen, deren Endstücke nicht kubisch geformt sind, sondern wie die ursprüngliche Spindelzelle kegelförmig spitz auslaufen. Sodann Reihen von Plasmazellen, die gemeinsame Fußstücke aufweisen, wie z. B. diejenigen, die aus Blut- oder Lymphkapillarendothelien entstanden sind. Sehr beweisend sind endlich die synzytienartigen Verbände von Plasmazellen, welche entweder nach außen geradlinig begrenzt oder nach innen geradlinig zerklüftet sind und geradlinig abgesprengte Zellbalken aufweisen. Denn alle diese Formen weisen auf einen Zytose-Ursprung, also auf einen endogenen Ursprung, hin; nur diejenigen Bindegewebszellen, deren Waben von Zytose prall erfüllt sind, zeigen diese auffallenden geradlinigen und rechtwinkligen Zerklüftungen.

Alle diese Zusammenhangs- und Zerklüftungsfiguren sind ebenso beweisend für die endogene Plasmazellenentstehung, wie sie die noch immer von einigen Forschern vertretene Lymphozytentheorie der Plasmazellen unmöglich machen. Echte, d. h. aus den Lymphdrüsen, Milz oder Knochenmark ausgewanderte Lymphozyten beteiligen sich bei den Plasmomen der Haut überhaupt nicht. Eine oberflächliche Analogisierung mit der Leukozytenauswanderung im Gewebe hat einige Forscher allerdings an eine „Lymphozytenauswanderung" denken lassen, von der der beste Zellkenner, Paul Ehrlich, schon nichts wissen wollte. Auch für eine solche müßte natürlich eine „Zusammenhangsfigur" verlangt werden, wie wir sie für die polymorphkernigen Leukozyten stets besessen haben, nämlich in dem Bilde eines kontinuierlichen Leukozytenstroms von den venösen

[1]) Siehe P. G. Unna, Die Herkunft der Plasmazellen. Virchows Archiv Bd. 214, S. 320 (1913).

Blutkapillaren bis zu dem Leukozytenherd. Ein analoger Lymphozytenstrom ist aber niemals nachgewiesen worden. Es ist also nicht mehr zeitgemäß, von in das Gewebe eingewanderten Lymphozyten zu sprechen. Die Lymphozyten gehören in die Lymph- und Blutdrüsen. Was man von kleinen „Rundzellen", um diesen alten, ehrlichen Namen wieder zu gebrauchen, in der Haut trifft, sind atrophische Abkömmlinge von Bindegewebszellen der Haut, häufig solche von Plasmazellen und weiter nichts. Nach dieser Richtung bedarf unsere Nomenklatur einer gründlichen Reinigung.

Seit der Entdeckung der spongioplastischen Zusammenhänge hat die Genese und Morphologie der Plasmazellen, seit der Entdeckung der Zytose ihre Chemie, seit ihrer Erkennung als wichtiger sekundärer Sauerstofforte ihre Biologie so große Fortschritte gemacht, daß heutzutage die Plasmazellen zu den am genauesten bekannten Zellen überhaupt gehören. Sie bergen nur noch ein einziges Rätsel, einen Umstand, den sie übrigens mit allen Zellen teilen, die Herkunft des hochkomplizierten Nukleinsäuremoleküls, mit dem ihre Entstehung beginnt.

Trotz dieser noch klaffenden großen Lücke in unserem chemischen Wissen ist die Funktion der Plasmazellen und das Zusammentreffen eines Maximums von Nukleinsäure und Zytose in ihnen auf das befriedigendste erklärt durch die Erfahrungen, die wir an ihnen mit unserem Sauerstoffreagens: Rongalitweiß gemacht haben.

Das Rongalitweißbild ergibt an Gefrierschnitten eine starke Bläuung der beiden sekundären Sauerstofforte in den Plasmazellen, eine sehr starke des Granoplasmas im Plasma und eine etwas schwächere des Globulins im Kernkörperchen, welches andererseits mit dem Permanganatreagens eine erheblich stärker reduzierende Grundlage als der übrige Kern besitzt. Granoplasma und Kernkörperchen sind also bei den Plasmazellen permanent sauerstoffreich. — Dagegen zeigt der primäre Sauerstoffort, der Kern der Plasmazelle, ein paradoxes Aussehen, da er nicht, wie sonst alle Kerne, sich mit RW. dunkelblau färbt, sondern im Gegenteil ganz ungefärbt bleibt. Diese Paradoxie teilt der Plasmazellenkern mit dem Ganglienzellenkern. Hier wie dort hat diese Anomalie dieselbe Ursache, nämlich die dichte Umlagerung des Kernes mit der sehr sauren und sauerstoffanziehenden Zytose, die in den Ganglien in Form der Nisslkörper erscheint. Die stetig Sauerstoff durch ihren Eisenaktivator aktivierenden Kerne der Plasmazellen und Ganglien besitzen zugleich die nötige Peroxydase, um den Kern von dem aktivierten Sauerstoff wieder zu befreien. Dagegen enthält die sie umgebende Zytose keine Peroxydase und speichert daher ungehindert den Sauerstoff, den sie den nächstgelegenen Kernen entzieht. Daher kommt es, daß die von allen Seiten von Zytose umgebenen Kerne der Plasma- und Ganglienzellen bei der Rongalitweißfärbung vollständig farblos erscheinen.

Wir haben hier den langgesuchten, sichtbaren Beweis für die Wanderung des Sauerstoffs im Gewebe und innerhalb der Zelle. Daß diese Wanderung abhängig ist von dem Sitz der Peroxydase in den Kernen einerseits, von der Anziehungskraft des Granoplasmas für Sauerstoff andererseits, kann man durch folgenden Versuch leicht beweisen. Man bringt Gefrierschnitte, welche Plasmazellen oder Ganglien enthalten, 24 Stunden in körperwarme physiologische Kochsalzlösung. Dann ist die Zytose aufgelöst, die Nukleinsäure aber noch

erhalten. Färbt man jetzt die betreffenden Schnitte mit Rongalitweiß, so färben sich die primären Sauerstofforte, die Kerne, wieder wie gewöhnliche Kerne, dunkelblau. Es ist also nur der Gehalt an Granoplasma, der die Kerne der Plasmazellen — und ebenso die der Ganglien —, indem er diese zu ganz hervorragenden sekundären Sauerstofforten, zu Sauerstoffspeichern, macht, zeitweise von ihrem Sauerstoff entblößt.

Mit der Erkenntnis, daß die Plasmazellen die ungeheuer wichtige Aufgabe haben, einem bedrohten oder geschädigten Gewebe neue Sauerstoffquellen zuzuführen, entfällt die Nötigung, ihnen noch andere Funktionen zu übertragen, z. B. die phagozytäre Aufnahme von Bestandteilen der Mikroorganismen und von verbrauchten Zellteilen. Bisher sind gerade in den Plasmazellen trotz eifrigsten Suchens keine Trümmer von Organismen, Blut- und Gewebszellen gefunden worden. Ihr großer Sauerstoffgehalt scheint sie gegen solche Fremdkörperinvasionen im Gegensatz zu den Spindelzellen und dem Spongioplasma der Leukozyten immun zu machen.

Die Funktion der Plasmazellen in der pathologischen Haut muß überhaupt eine sehr allgemein nützliche sein und sich nicht auf Vernichtung besonderer Toxine (Joannovics) beschränken, da sie sich in enormer Anzahl sowohl bei ganz benignen Affektionen (Akne, Trichophytie) wie bei ganz malignen (Karzinom) ausbilden. Gemeinsam ist diesen Fällen nur die Versenkung großer reduzierender Epithelmassen in das Bindegewebe, dort entzündeter Haarbälge mit Organismen, hier des wuchernden Epithels. Ein Gefrierschnitt durch ein Hautkarzinom zeigt bei Rongalitweißfärbung das Krebsgewebe gänzlich farblos, also sauerstofflos, während der umgebende Wall von Plasmazellen, dunkelblau, von Sauerstoff strotzt. Die oft gemachte Beobachtung, daß bei Hautkarzinomen der Plasmomwall um so breiter ist, je gutartiger der Krebs, würde sich, da der Wall keinen mechanischen Widerstand, wie fibröses Gewebe, leisten kann, wohl am besten folgendermaßen erklären. Wenn das umgebende Bindegewebe viele Plasmazellen produzieren kann, so bildet sich auf lange Zeit ein Gleichgewicht aus zwischen dem sauerstoffgierigen Karzinom und dem sauerstoffliefernden Plasmomwall. Wo dieser sich nicht ausbildet, strebt das Epithel sauerstoffsuchend in die Tiefe. Wo solche reduzierende Epithelmassen fehlen, wie beim Lupus, beim Syphilom, treten die sauerstoffbedürftigen Organismen (Tuberkelbazillen, Spirochaete pallida) selbst als Reiz zur Plasmazellenbildung auf. Die von diesen Organismen abgesonderten Toxine haben dagegen eher Beziehungen zu der Degeneration der Zellen (homogene Schwellung, Riesenzellenbildung) als zur Plasmazellenbildung.

Man kann auch im allgemeinen sagen, daß dort viele Plasmazellen, also neue Sauerstofforte sich im ernährenden Bindegewebe bilden, wo viel reduzierendes Eiweißmaterial sich anhäuft. So vermehren sich die Plasmazellen im Darmtraktus von Hunden bei der Verdauung und Überschwemmung desselben mit Verdauungsprodukten (Pirone, Joannovics), treten in der Thymus des Maulwurfs auf beim Zerfall der Drüsenelemente im Winter (Schaffer), häufen sich in der Retrolingualdrüse des Hundes an bei Unterbindung der Ausführungsgänge, schwinden dagegen nach Durchschneidung der sekretorischen Nerven (Maximow) und werden künstlich erzeugt durch Einführung von reduzierendem Organbrei und Muskeln (Joannowics) in die Gewebe.

K. Mastzellen.

Farbenindex: Blaues Polychrom + Alaun.

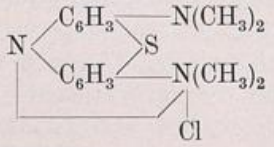
Paul Ehrlich entdeckte 1876 Bindegewebszellen, welche sich in einer mit Essig angesäuerten Dahlialösung von den gewöhnlichen violetten Zellen in abweichender rotvioletter Farbe darstellten. Er nannte die Zellen, da er sie hauptsächlich in überernährtem Gewebe fand: Mastzellen und diese Art von abweichender Nebenfärbung überhaupt: Metachromasie. In der Folge wurden zur Erzielung einer Metachromasie noch verschiedene andere basische Farben vorgeschlagen, so z. B. von Jadassohn: Safranin, das die Mastzellen mit gelber Nebenfarbe auszeichnet. Alle diese Mastzellenfärbungen wurden aber in Schatten gestellt durch die Färbung mit blauem Polychrom, da diese bei der üblichen Glyzerinätherentfärbung in schönem Kontrast die rotviolett gefärbten Mastzellen als normalen Nebenbefund neben den blau gefärbten Plasmazellen ergab und die einfache und sichere Unterscheidung dieser beiden Arten von Bindegewebszellen in den neunziger Jahren des vorigen Jahrhunderts bei der Untersuchung pathologischer Gewebe ein wichtiges Erfordernis war.

Man hat im allgemeinen zwei Arten von Metachromasie zu unterscheiden, eine physikalische und eine chemische. Physikalische Ursachen hat beispielsweise die Metachromasie des Jods, welches in Eiweiß mit gelber, in Chloroform mit violetter und in Stärke mit blauer Farbe gelöst wird. Die Metachromasie der Mastzellenkörner beruht aber auf einer chemischen Eigenschaft, auf ihrer Affinität zu einem Basenanhydrid der Farbsalze, welches im blauen Polychrom rot, im Safranin und Pyronin gelb gefärbt ist.

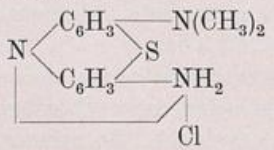
Die Kenntnis dieses roten Basenanhydrids in dem blauen Polychrom verdanken wir Kehrmann in Lausanne.

Es leitet sich folgendermaßen vom Methylenblau, dem vierfach methylierten Thionin, ab.

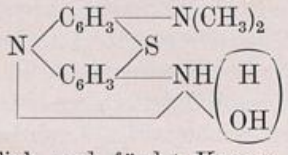
Salz des Tetramethylthionins (Methylenblau):



Salz des Dimethylthionins:

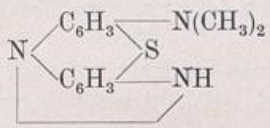


Das blaue Hydrat der Base des Dimethylthionins:



ist wasserlöslich, ätherunlöslich und färbt Kerne blau.

Wird dieser Farbbase Wasser entzogen, so entsteht das rote Anhydrid der Base des Dimethylthionins, das basische Thiazinrot:



Dasselbe ist ätherlöslich, wasserunlöslich und färbt Mastzellen, Schleim und Knorpel spezifisch rot.

Die Mastzellen entstehen aus gewöhnlichen Bindegewebszellen durch Einlagerung sehr saurer und daher stark basophiler Körnchen, der Mastzellenkörner, welche bei spezifischer Färbung als scharfkonturierte, runde, etwas verschieden große Körnchen oder Tröpfchen, als echte Ehrlichsche Granula hervortreten und, metachromatisch und intensiv gefärbt, sich auch von ihrem eigenen, ungefärbten Kern gut abheben. Dieselben können natürlich nur im oberen Stock der Mastzelle sich bilden, dort, wo bei anderen Bindegewebszellen sich Granoplasma anhäuft, und zwar aus folgenden Gründen:

1. weil nur im oberen Stock sich saure Eiweiße befinden;
2. weil nur den oberen Stock basische Farben — hier das Thiazinrot — anfärben;
3. weil nur im oberen Stock die Sauerstoffspeicherung vor sich gehen kann, welche die Mastzellenkörner auszeichnet;
4. weil schon sehr milde Lösungsmittel, wie alkalische salzhaltige Lymphe, die Körner aus den Mastzellen herauslösen, ohne die schwerer löslichen Eiweiße des unteren Stockes der Mastzellen anzugreifen.

Die Mastzellen besitzen einen besonders hohen Grad von Beweglichkeit, der sich in ihrer stets wechselnden Form (kugelig, keulen-, spindel-, spinnenförmig) und ihrer Wanderungsfähigkeit ausdrückt; letztere befähigt sie, analog den Leukozyten weit in die epithelialen Gebilde hinein vorzudringen, so in die Stachelschicht des Deckepithels und der Haarbälge, in Knäueldrüsen und deren Gänge; unter pathologischen Verhältnissen besonders bei Karzinom, Urticaria pigmentosa und Miliaria.

Zur Darstellung der Beziehungen der Mastzellen zum Sauerstoff sind die Schnauzen von weißen Ratten und Mäusen sehr geeignet, welche besonders in der Subkutis viele und dichtgedrängte, große Mastzellen enthalten, so daß man über die Natur dieser Zellen auch dann nicht in Zweifel sein kann, wenn irgendwelche Färbung derselben nur minimal ausfällt. Dieses ist bei der Untersuchung des Spongioplasmas der Mastzellen auf dessen Reduktionskraft durch die Permanganatmethode der Fall. Dabei erscheinen sie als ovale, hellbräunliche Flecke mit unscharfem Außenkontur, aber mit scharf ausgeschnittenem, hellgelbem Kern und heben sich von dem umgebenden Kollagen nur wenig ab. Das Plasma der Mastzellen besitzt in seinem unteren Stock mithin nur eine höchst unbedeutende, auffallend geringe Reduktionskraft.

In sehr charakteristischem Gegensatz dazu lehrt die Färbung mit Rongalitweiß, daß die im Plasma eingeschlossenen Granula äußerst reich an Sauerstoff sind, denn sie werden tiefblau gefärbt, mit metachromatischer violetter Tönung. Die von der Mastzellenkörnung eingeschlossenen 1—3 Kerne erscheinen

hell, zum Beweise, daß sie ihren Sauerstoff an die sie umgebenden Mastkörner abgegeben haben. Sie treten hiermit in Gegensatz zu den auf denselben Schnitten mitgefärbten Kernen der Epithelien, Muskeln und gewöhnlichen Bindegewebszellen.

Einen analogen Kontrast erblicken wir bei der Peroxydasefärbung der Mastzellen mit Benzidin und H_2O_2. Auch hier erscheinen die Kerne als helle Lücken in dem dunkelblau gefärbten Plasma der Mastzellen (Bild 60). Die Granula derselben enthalten mithin neben freiem Sauerstoff das Ferment Peroxydase.

Es unterliegt hiernach keinem Zweifel, daß einerseits die Aktivierung des molekularen Sauerstoffs und andrerseits seine Abstoßung in das Bindegewebe als die hauptsächliche Funktion der Mastzellen betrachtet werden müssen. Der letztgenannte Teil ihrer Tätigkeit wird ihnen dadurch offenbar sehr erleichtert, daß der dürftige Plasmaleib der Mastzellen für sich nur eine minimale Menge Sauerstoff verzehrt und die Menge des hier aktivierten Sauerstoffs also fast unmittelbar und ungeschmälert in die umgebende Lymphe gelangt.

Diese Hauptfunktion der Mastzellen erfordert natürlich in erster Linie eine stark saure Beschaffenheit der Mastkörner selbst; es ist auch diejenige Eigenschaft, die zu ihrer Entdeckung führte. Als Ehrlich zum ersten Male Schnitte in mit Essigsäure stark angesäuerter Dahlialösung färbte, fand er nicht bloß die Metachromasie der Mastkörner, sondern auch ihre hervorragende Säurefestigkeit. Die Folgezeit hat dann gelehrt, daß die Mastzellen neben den Nukleoproteiden der Kerne und dem Knorpel zu den sauersten Formelementen der Gewebe gehören. Sie färben sich mit allen basischen Farben, und nur mit solchen, und zwar ist ihre Basophilie absolut. Die Mastkörner lassen sich mit keiner sauren Farbe spezifisch färben. Dagegen sind die Säuren die gegebenen Entfärbungs- und Isolierungsmittel der bereits mit basischen Farben gefärbten Mastzellen. So resistent die Mastkörner gegen Säuren, so leicht löslich sind sie schon in schwachen alkalischen Flüssigkeiten und so auch in der normalen alkalischen Gewebslymphe. Durch diese werden sie in ähnlicher Weise wie das saure Granoplasma der Plasmazellen auch teilweise aus den Mastzellen ausgewaschen und dann ebenso leicht wieder von dem umgebenden basischen Kollagen gebunden.

Wie um die Plasmazellen durch Imbibition mit dem sauren Granoplasma das saure basophile Kollagen entsteht, so um die Mastzellen das saure metabasophile Kollagen, das sich wie die Mastzellen selbst metachromatisch, d. h. mit blauem Polychrom rot, mit Pyronin orangegelb färbt. Imprägniert sich auf diese Weise nur die nächste Umgebung der Mastzellen, so entstehen die sogenannten Mastzellenhöfe, z. B. bei den Mastzellen der Neurofibrome. Viel häufiger aber imbibieren sich durch Auflösung der Mastzellenkörner große Strecken des Bindegewebes und werden dadurch weithin metachromatisch gefärbt. Das findet hauptsächlich statt bei dem die Knäueldrüsen einhüllenden Bindegewebe und unter pathologischen Verhältnissen fast konstant bei dem bindegewebigen Stroma der Karzinome. Untersucht man solche mit blauem Polychrom rot gefärbten Bindegewebszüge genauer, so findet man fast stets noch übrig gebliebene Reste der abgebauten Mastzellen in Form versprengter Körnergruppen.

Die Einlagerung der Mastkörner hat, wie man sieht, eine fundamentale Veränderung der Bindegewebszellen im Gefolge, durch die sie zu den interessantesten, wichtigsten und vielseitigsten Zellen der Bindegewebsgruppe werden. Im Mittelpunkte dieser Veränderungen steht die stark saure Beschaffenheit der Mastkörner. Dadurch erhalten sie die Möglichkeit, Sauerstoff und Peroxydase zu speichern. Eine weitere Folge dieser Sauerstoffanreicherung ist ihre chemotaktische Anlockung durch das reduzierende Plasma der Epithelien und ihre Loslösung vom Mutterboden, womit auch ihre bunte Vielgestaltigkeit zusammenhängt. Im Gegensatz zu den Leukozyten, den stets mobilen Sauerstofforten des Bindegewebes, stellen sie dessen eingesessene und ursprünglich stabile Sauerstofforte dar, die sich aber bei starker Tätigkeit auch loslösen und wie die Leukozyten auf die Wanderschaft begeben können. Sie üben dadurch einen ungemein großen Einfluß auf den Sauerstoffwechsel und die Ernährung aller Bindegewebe enthaltenden Organe aus, sowohl im normalen, wie noch mehr im pathologischen Zustande, so daß für viele Prozesse, z. B. die Karzinome, ihre lokale Anhäufung ein geradezu charakteristisches Symptom darstellt. Ihre stark saure Beschaffenheit erleichtert dabei nicht bloß ihre Auffindung und Darstellung durch basische Farben im allgemeinen, sondern ihre spezielle Verwandtschaft zu den Anhydriden einiger Farbbasen ihre tinktorielle Isolierung im Gewebe durch die infolge derselben ihnen anhaftende Metachromasie.

Versuchen wir nun, in diesen verwirrenden Reichtum histologischer Besonderheiten der Mastzellen durch die chromolytische Untersuchung einiges Licht zu werfen, so stoßen wir zunächst auf eine große Schwierigkeit, wie sie kaum bei einem anderen Formelement sich in solcher Stärke geltend macht. So günstig nämlich die färberischen Eigenschaften der Mastzellen für die Chromolyse sind, so verwickelt gestalten sich ihre Löslichkeitsverhältnisse. Nicht bloß variieren dieselben von Tier zu Tier und von Organ zu Organ, ja selbst innerhalb eines Körnerschwarms, sondern es gilt auch der allgemeine Satz, daß beim selben Tier und selben Organ das Lebensalter einen bedeutenden Unterschied in der Löslichkeit der Mastkörner hervorruft, welcher die Aufstellung fester Löslichkeitstabellen ungemein erschwert. Im allgemeinen verhalten sich die embryonalen Mastzellen leichter löslich als die von jugendlichen und diese leichter als die der erwachsenen Individuen, ferner sind die in lockeres Bindegewebe eingebetteten leichter löslich als die Mastzellen fester Gewebe. Um daher Widersprüche in den Löslichkeitsangaben zu vermeiden, ist es geraten, die ganze tabellarische Aufnahme der Lösungsverhältnisse an einem ganz bestimmten, womöglich festen Bindegewebe durchzuführen oder, noch besser, zwei verschiedene Fundorte von sehr verschiedener Konsistenz miteinander fortlaufend zu vergleichen und nur die übereinstimmenden Ergebnisse zu verwerten.

Hierzu eignen sich von den leicht erhältlichen Geweben auf der einen Seite die Rückenhaut von erwachsenen Menschen (Leichen) und andrerseits die Schnauzen von weißen Ratten, die reich an leichter löslichen Mastzellen sind. Bei der Aufstellung der folgenden Tabelle wurde dieses Material verwertet.

In dieser Tabelle bedeutet: O die Auflösung der Mastkörner, + Verringerung ihrer Zahl, eventuell Hofbildung, ++ völlige Erhaltung der Körner.

Chromolyse der Mastkörner.

Lösungsmittel	Prozente		Bemerkungen
Aqua destillata	—	+ +	Bei 37°.
Aqua destillata			Bei 100° beg. die Aufl.
Alkohol	96 %	+ +	
Äther	—	+ +	
Chloroform	—	+ +	
Alkohol + Benzin	—	+ +	
Glyzerin	—	+	
Borsäure	1 %	+ +	
Borsäure	4 %	+ +	
Orthophosphorsäure	1 %	+	
Metaphosphorsäure	1 %	+	
Milchsäure	1 %	+ +	
Zitronensäure	1 %	+ +	
Apfelsäure	1 %	+ +	
Essigsäure	1 %	+ +	
Essigsäure	50 %	+	
Essigsäure	96 %	O	
Trichloressigsäure	1 %	+	
Pikrinsäure	**1 %**	**O**	
Osmiumsäure	1 %	+	
Chromsäure	1 ‰	+	
Schweflige Säure	1 %	+	
Oxalsäure	1 %	+	
Gerbsäure	1 %	+	
Salzsäure	1 %	+	Erhält nur in schwacher Prozentuierung.
Salzsäure	5 %	O	
Salzsäure	15 %	O	
Schwefelsäure	**1 %**	+	Löst nur bei höchster Konzentration.
Schwefelsäure	**5 %**	+	
Schwefelsäure	**15 %**	**O**	
Salpetersäure	**1 %**	**O**	Löst in allen Verhältnissen.
Salpetersäure	**5 %**	**O**	
Salpetersäure	**15 %**	**O**	
Pepsin 1 % + HCl ½ %	1 % + ½ %	+	

Lösungsmittel	Prozente		Bemerkungen
Alaun	2 %	+ +	
Doppeltschwefligsaures Kalzium	2 %	+ +	
Essigsaure Tonerde	2 %	+ +	
Bleiessig	2 %	+ +	
Aqua plumbi	5 %	+ +	
Kalilauge	1 ‰	O	
Liq. Ammon. caust.	1 ‰	O	
Soda 43 Stunden	1 %	O	
Soda 6 Stunden	5 %	O	
Aqua calcis 24 Stunden		—	Beginnende Quellung, keine Hofbildung.
Aqua calcis 48 Stunden		O	Fast völlige Lösung der Mastkörner.
Kochsalz	2 %	O	
Kochsalz	gesättigt	O	
Magnesiumsulfat	2 %	O	
Magnesiumsulfat	gesättigt	O	
Ammonsulfat	2 %	O	
Ammonsulfat	gesättigt	+	Bei 37° O.
Zinksulfat	2 %	O	
Zinksulfat	gesättigt	+	Bei 37° O.
Kupfersulfat	2 %	+ +	
Chlorsilber	2 %	+ +	
Sublimat	2 %	+ +	
Ammoniumpersulfat	2 %	O	
Natriumpersulfat	2 %	O	
Kaliumperkarbonat	2 %	O	
Hydrogenperoxyd	3 %	+	Angesäuert.
Perhydrol	3 %	O	Neutral.

Schon die erste Tatsache, die wir der Tabelle entnehmen, die Unlöslichkeit in Wasser, schließt eine große Reihe von Eiweißen aus, die Albumine, alle Albumosen und Peptone. Ebenso aber auch alle sauren Salze und freien Säuren.

Es kann sich bei den Mastkörnern auch nicht um Muzin handeln, was deshalb wichtig ist, weil Muzin die Metachromasie mit den Mastzellen teilt. Diese Ähnlichkeit mit Muzin ist bald nach ihrer Entdeckung der Grund gewesen, daß Raudnitz' Annahme, sie beständen aus Muzin, bei mehreren Forschern Anklang fand. Aber es fehlt den Mastkörnern schon das Quellungsvermögen in Wasser und in Alaunlösung, das Muzin eigen ist. Sie werden weiter nicht, wie Muzin, von Alkohol, Gerbsäure und Pepsin + HCl gelöst. Gerade umgekehrt verhalten sich beide Substanzen sodann gegen Neutralsalzlösungen, die bei schwacher Prozentuierung Mastkörnung, nicht aber Muzin lösen, während gesättigte Lösungen derselben Muzin fällen, die Mastkörner aber gerade auflösen. Es kann also keine Rede davon sein, daß Mastkörner aus Schleim bestehen.

Weiter kommen für die Mastkörner auch sämtliche Lipoide nicht in Frage, da sie von Lipoidlösern nicht angegriffen werden. Weder Alkohol noch Äther, weder Benzin noch Chloroform lösen sie; auch nicht die besonders stark fettlösenden Mischungen derselben. Auch Glyzerin verhielt sich gegen die Mastzellen unseres Materials ganz indifferent.

Die wichtigste Gruppe von Reagenzien der Tabelle ist die der Säuren, da die Säurefestigkeit allen Darstellungsmethoden der Mastzellen zugrunde liegt. Die Tabelle lehrt, daß sowohl schwache wie starke Säuren sich in diesem Punkte gleich verhalten. In Borsäure, beiden Phosphorsäuren, den organischen Säuren: Milchsäure, Zitronensäure, Apfelsäure, Trichloressigsäure und vor allen in Essigsäure, welche Ehrlich zu seiner ersten Darstellung benutzte, dann auch in den reduzierenden Säuren: schweflige Säure, Oxalsäure und Gerbsäure sind die Mastzellenkörner unlöslich, ein großer Teil derselben auch in den Mineralsäuren: Salzsäure und Schwefelsäure bei schwacher Prozentuierung (1—2%). Diese hervorragende Säurefestigkeit findet aber an zwei Punkten ihre Grenze. Erstlich lösen die letztgenannten Mineralsäuren in konzentriertem Zustande (15%) die Mastkörner vollständig auf, und so auch die konzentrierte Essigsäure (bei 96%). Sodann hört die Säurefestigkeit auch bei solchen Säuren auf, welche sehr reich an Sauerstoff sind und diesen leicht abgeben können, wie die Pikrinsäure (1%) und die Salpetersäure. Besonders verdient das starke Lösungsvermögen der Salpetersäure hervorgehoben zu werden, welche bei jeder Prozentuierung die Mastkörner angreift. Während diese als solche verschwinden, nimmt der Leib der Zellen nach der Behandlung mit Salpetersäure zunächst die gelöste Körnung auf und färbt sich in diffuser Weise metachromatisch. 1%ige Salzsäure und Schwefelsäure erhalten zwar den größten Teil der Körnung, laugen aber einige Körner aus, so daß die Zellen sich mit einem metachromatischen Hof von Bindegewebe umgeben.

Am eigentümlichsten ist das Verhalten der Schwefelsäure, welche bei 1% wie die Salzsäure Hofbildung und Verringerung der Zahl der Körner hervorruft, bei 5% aber, im Gegensatz zur Salzsäure und zur Salpetersäure, die Mastzellenkörnung erhält. Dieses Erhaltenbleiben unter der Einwirkung von starker (5%iger) Schwefelsäure läßt daran denken, daß die

Schwefelsäure vielleicht, wie beim Knorpel, eine Rolle beim Aufbau der Mastzellen spielt. Andrerseits spricht die Indifferenz der reduzierenden Säuren und der schädliche Einfluß der oxydierenden Säuren auf die Mastkörnung dafür, daß die eigene Säure der letzteren nicht zu den oxydierenden gehört.

Da schon eine schwache saure Reaktion des Lösungsmittels die Wirkung hat, die Mastkörner zu erhalten, so ist es kein Wunder, daß auch alle sauren Salze, wie der Alaun, das doppeltschwefligsaure Kalzium und die Säure abgebenden Salze: essigsaure Tonerde, Liquor plumbi subacetici, selbst Aqua plumbi (5%), die Mastzellen nicht auflösen.

Den reinsten Gegensatz zu den Säuren und sauren Salzen bilden die Alkalien und alkalischen Salze, welche bei genügender Dauer und Konzentration alle Mastzellenkörner auflösen. Die Versuche dürfen nicht in der Wärme ausgeführt werden, da sonst die Schnitte zu stark quellen und sich schwer montieren lassen; sie finden also bei Zimmertemperatur statt. Die makroskopisch wahrnehmbare Quellung der Schnitte gibt ein gutes Zeichen für die genügende Einwirkung des Alkalis, denn mit dem Beginn der Quellung fangen auch als erste Formelemente die Mastzellenkörner an, sich zu lösen. In 1‰iger Kalilauge quellen die Schnitte schon nach 1 Stunde, in mit Wasser stark verdünntem offizinellen Liquor Ammonii caustici (1‰) etwa nach 6 Stunden, in der offizinellen Aqua calcis erst nach 48 Stunden. In 1%iger Sodalösung sind die Mastzellenkörner nach 6 Stunden noch erhalten, in 5%iger gelöst.

Die Auflösung geht in allen Fällen langsam, aber sicher vor sich und hängt nur von der Konzentration und Dauer der Einwirkung ab. Es handelt sich dabei offenbar stets um die Herauslösung der für die Mastzellenkörner charakteristischen Säure durch ein Alkali, welches stärker ist als die Basis, an welche diese Säure in den Mastzellenkörnern gebunden ist. Die äußerst geringe und langsame Einwirkung der Aqua calcis spricht vielleicht für eine Bindung derselben an Kalk in den Mastzellenkörnern.

Auf einen anderen Baustein der Mastzellenkörner führt uns das eigentümliche Verhalten der Neutralsalze, nämlich auf einen Eiweißgehalt. Die Tabelle lehrt, daß diesen gegenüber die Mastzellenkörner sich wie Globuline und Heteroalbumosen verhalten, insofern schwache (1—2%ige) Lösungen sie auflösen, gesättigte sie erhalten, so das Ammonsulfat und Zinksulfat. Kochsalz und Magnesiumsulfat dagegen lösen die Mastzellenkörner ebensowohl in verdünntem wie gesättigtem Zustande, ein Verhalten, wie es die Albumine und Deuteroalbumosen zeigen. Umgekehrt wirken die Metallsalze: Kupfersulfat, Chlorsilber und Sublimat, welche sowohl in verdünntem wie gesättigtem Zustande die Mastzellenkörner erhalten.

Alle diese Lösungseigenschaften lassen keinen Zweifel darüber aufkommen, daß sich in dem Komplexe der Mastzellenkörner auch gewisse Eiweißkomponenten befinden, durch deren künstliche Herauslösung der ganze Komplex derselben zerfällt.

Schwenter[1]) hat, nachdem Unna die Kochsalzlösung als histologisches Reagens eingeführt hatte[2]), in einer sehr ausführlichen und sorgfältigen Arbeit

---

[1]) Schwenter, Ergebnisse von Untersuchungen an Mastzellen der Haut. Monatshefte für praktische Dermatologie 1906, Bd. **43**, S. 47 und 114.

[2]) P. G. Unna, Über spontanen und künstlichen Transport von Zellsubstanzen und über Kochsalz als mikrochemisches Reagens. Ebd. Bd. **33**, S. 342.
Derselbe, Histologischer Atlas S. **181**, Taf. XXXVIII und XXXIX.

über die Mastzellen die Lösung derselben in Salzen verfolgt und kam zu dem Resultat, daß außer der sauren und basischen Reaktion des Lösungsmittels auch die gleichzeitige Mitwirkung des Sauerstoffs von ausschlaggebender Bedeutung sei. Er wies zunächst nach, daß die Metachromasie der Mastzellen sowohl durch oxydierende wie durch reduzierende Mittel beeinträchtigt wird, so daß ein mittlerer Sauerstoffgehalt für ihren Bestand notwendig ist. Es leuchtet ein, daß dieser Umstand für die Chromolyse der Mastzellen von wesentlicher Bedeutung ist, da der Nachweis ihrer Existenz von dem der Metachromasie abhängt. Als reduzierende Mittel benutzte er Pyrogallol und schweflige Säure, als oxydierende Perhydrol und Persalze (Ammonium- und Natriumpersulfat, Kaliperkarbonat). Es zeigte sich, daß sowohl die schädigende Wirkung der Reduzentien auf die Metachromasie durch nachfolgende Behandlung mit oxydierenden Mitteln wieder aufgehoben werden konnte, wie umgekehrt, ohne daß die Mastzellenkörner dabei aufgelöst wurden. Andrerseits ergab sich aber aus dem Vergleich der Neutralsalze mit den entsprechenden Persalzen, daß die Sauerstoffabgabe der letzteren den Lösungseffekt der einfachen Salze in jedem Falle verstärkte.

Hiernach ist die Substanz, welche die Metachromasie erzeugt, an einen besonderen Teil des Mastzellenkorns gebunden und nicht mit dem ganzen Komplex desselben identisch. Schließlich fand Schwenter noch, daß die körnerlösende Eigenschaft der Salze ebensogut durch Säurezusatz (Eisessig) aufgehoben wird, wie die der Alkalien. Diese Erhaltung durch Säuren ist wohl sicher als die Aufhebung der Quellung zu betrachten, die durch Salze und Alkalien in gleicher Weise herbeigeführt wird.

Meine eigenen Versuche über die Wirkung des Sauerstoffs auf die Mastkörner haben ergeben, daß die offizinelle säurehaltige Wasserstoffsuperoxydlösung die Körner erhält, während eine 3%ige säurefreie Perhydrollösung sie langsam auflöst, derart, daß nach 4 Stunden noch ein großer Teil der Körner erhalten ist, während nach 48 Stunden die Schnitte vollkommen frei von Mastzellenkörnern sind. Dieses Ergebnis stimmt mit den Angaben Schwenters überein, daß ein Überschuß von freiem Sauerstoff für den Bestand der Mastzellen schädlich ist und die Auflösung der Körner zur Folge hat.

Das gesamte Resultat der Tabelle führt uns zu der Annahme, daß in dem Komplex des Mastkorns — außer locker gebundenem Sauerstoff — Schwefelsäure als Grundlage der Säurefestigkeit vorhanden und an Kalk gebunden, aber nicht ganz von demselben neutralisiert ist und dieser schwefelsaure Kalk weiter eine Verbindung mit noch näher zu bestimmenden Eiweißkörpern eingeht. Diese Arbeitshypothese kann weiteren chromolytischen Untersuchungen der Mastzellen zur Grundlage dienen.

Es verlohnt sich, nach dieser großen Lösungstabelle noch eine kleine Spezialtabelle über den Gegensatz der total verschiedenen Körnungen der Mastzellen und Plasmazellen zu geben, da diese beiden Zellenarten längere Zeit zusammengeworfen wurden. Gemeinsam haben beide nur ihren sauren Charakter und ihre Basophilie in tinktorieller Beziehung. Aber in den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts fand man schon, daß nur die Mastkörner den Typus der Ehrlichschen Granula aufweisen, das Granoplasma dagegen einen neuen Typus der Zelleinlagerung, eine amorphkörnige Abscheidung in den Waben

des Spongioplasmas darstelle, die wohl auch basophil, aber durchaus nicht metabasophil ist wie die Mastzellenkörner. Diesen bedeutenden Unterschieden schließen sich nach Maßgabe der in unserer Lösungstabelle zusammengestellten Befunde noch folgende Löslichkeitsdifferenzen an, die den ganz verschiedenen chemischen Charakter beider Einlagerungen beleuchten.

Tabelle der Löslichkeit von:

	Prozente	Mastzellenkörner	Granoplasma
Aqua destillata	—	+	0
Pepsin + HCl	1% + ½%	+	0
Alaun	1%	+	0
Kupfersulfat	2%	+	0
Essigsäure	96%	0	+
Salpetersäure	2%	0	+
Pikrinsäure	1%	0	+

Wie der chemische Charakter, so ist auch die Sauerstofffunktion der Mastzellen eine ganz andere als die der Plasmazellen. Diese letzteren dienen nur der Ansammlung von molekularem Sauerstoff, von dem sie einen großen Überschuß in ihrem Granoplasma bewahren, ohne ihn an die Umgebung weiterzugeben. In den Mastzellen dagegen wird der molekulare Sauerstoff nicht nur gesammelt, sondern durch die hier vorhandene Peroxydase in aktiven Sauerstoff verwandelt und als solcher in die Lymphe und das umliegende Kollagen abgestoßen. Jenes sind die Sauerstoffspeicher, dieses die Sauerstoffspender des Bindegewebes. Genauer hat man sich hiernach die Sauerstoff-Funktion der Mastzellen folgendermaßen vorzustellen.

In dem oberen Stock ihrer Kerne findet sich, wie in allen Kernen, durch Methylgrün nachweisbare Nukleinsäure, die die Aktivierung und Abstoßung des von der Lymphe herbeigebrachten molekularen Sauerstoffs besorgt. Derselbe wird aber nicht, wie in vielen großen Epithelien, sofort verbraucht und auch nicht, wie in den Plasmazellen, in saurem Granoplasma gespeichert, sondern gelangt in die sehr saure Mastkörnung des Plasmas, welche gleich den Kernen die Fähigkeit hat, vermöge ihres Peroxydasegehaltes den Sauerstoff in aktivem Zustande in die umgebende Lymphe abzustoßen. Diese Abgabe ohne merklichen Sauerstoffverlust ist dadurch gesichert, daß die Mastzellen, wie ihre schwache Permanganatfärbung beweist, nur wenig reduzierendes Spongioplasma besitzen. Unverweilt und nahezu unverkürzt, kann daher der Sauerstoff von den Mastzellen gleichwie von protoplasmalosen, nackten Kernen nach außen abgegeben werden.

Alle spezifischen Färbungen der Mastzellen gründen sich auf ihre besondere Säurefestigkeit. Jede basische Farbe läßt bereits bei Überfärbung und Ent-

färbung mit Essigsäure oder Mineralsäuren die Mastzellen vor den übrigen Bindegewebszellen hervortreten. Schöner und mehr spezifisch wird ihre Färbung, wenn man gleichzeitig ihre Metachromasie mitbenutzt und die Färbung mit blauem Polychrom ausführt. Am einfachsten gestaltet sich die dann entstehende Doppelfärbung, wenn man die abschwächende Säure in Form des sauren Salzes Alaun dem blauen Polychrom gleich hinzusetzt.

Auf dem blaßblauen Hintergrund der Kerne heben sich dann die durch Alaun nicht abgeschwächten Mastkörner, tief und metachromatisch rot gefärbt, sehr gut ab.

Mittels dieser Mischung von Alaun und blauem Polychrom (Unnas Mastzellenfärbung) färben sich neben den Mastzellen noch zwei andere Dinge metachromatisch rotviolett: der Knorpel und der Schleim.

L. Kollagen.

Die Grenze zwischen mittlerem und äußerem Keimblatt, d. h. zwischen dem kollagenen Gewebe und dem Epithel, sei es Deckepithel oder Haarbalg oder Knäueldrüse, ist überall dort scharf gezogen, wo die Epithelzellen sich mit dem sauren Granoplasma erfüllt haben. So schwer sich das reine Spongioplasma vom Kollagen tinktoriell trennen läßt, so leicht die granoplasmaerfüllten Zellen der Keimschicht. Denn die Nachbarschaft des Kollagens mit seinem Nährmaterial erzeugt in den untersten Epithelreihen nicht bloß mitotische Zellteilungen, d. i. einen Reichtum an sauren Nukleoproteiden in den Kernen, sondern auch eine Abspaltung des sauren Granoplasmas aus dem basischen Spongioplasma der Zelleiber. Dadurch entsteht in allen Keimschichten der Epithelformationen bei basischen Färbungen ein starker und wertvoller tinktorieller Gegensatz gegen das Bindegewebe, der bei sauren Färbungen vollständig fehlt, da diese ganz gleichmäßig das Kollagen und in den Epithelien nur das Spongioplasma färben, so daß der Gegensatz der Keimblätter bei einfach sauren Färbungen unkenntlich wird.

Im Gegensatz zur Zellsubstanz der Epithelien ist also das normale Kollagen ein viel weniger saurer Körper. Das rührt daher, daß in ihm die basischen Aminosäuren, besonders Arginin und Lysin, vorwiegen. Diese bedingen eine starke Affinität zu den sauren Farben, beispielsweise den Sulfofarben: Säurefuchsin und Wasserblau.

Hiermit hat sich das kollagene Gewebe dem es durchströmenden alkalischen Gewebssaft angepaßt, welcher von den Blutgefäßen aus zunächst das Kollagen als Träger der Blutgefäße durchspült, ehe er dem Epithel als Nahrungsbringer zuströmt. Ein saures Zellprodukt wäre hier unmöglich und würde, wenn es sich bildete, bald seiner sauren Bestandteile verlustig gehen.

Nur unter pathologischen Bedingungen kommt es vor, daß das Kollagen gelöste saure Eiweiße aufnimmt und sich mit ihnen ebenso wie künstlich mit sauren Farben sättigt. Das geschieht häufig mit demjenigen Kollagen, welches die an dem leicht löslichen Granoplasma überreichen Plasmome umgibt; es wandelt sich dann durch Aufnahme von Zytose in „basophiles Kollagen“

um. In ähnlicher Weise nimmt das Kollagen sehr oft in der Nachbarschaft von Karzinomen die dort reichlich gebildete und ebenfalls leicht lösliche, saure Mastzellenkörnung auf und teilt dann deren metachromatisches, bei blauem Polychrom: rotes, bei Pyronin: orangefarbenes Kolorit. Wir nennen es dann: metabasophiles Kollagen.

Das Kollagen als Endprodukt des Wachstums der Bindegewebszelle fordert zu einem Vergleich mit dem Keratin als Endprodukt der Stachelzelle des Deckepithels heraus. Beide sind Schutzbildungen des Körpers geworden, haben sich zu diesem Zweck aber in ganz extrem verschiedener Richtung ausgebildet. Die Stachelzelle, wenn sie ihre Sauerstoffperiode in der Keimschicht überwunden hat, ist bereits ein wesentlich reduzierender Eiweißkörper. Indem sie sich aber weiter zur Hornzelle umbildet, erliegt sie, wie das Kalipermanganatbild beweist, einer extremen Sauerstoffverarmung; die völlig reduzierte und selbst stark reduzierende Hornschicht erscheint hier braunschwarz (Bild 17). Geradezu umgekehrt ist es mit der Bindegewebszelle, wenn sie ihr Endprodukt: Kollagen produziert; während ihr Plasma noch Permanganat etwas reduzieren kann, hat das Kollagen die Reduktionskraft fast ganz verloren und erscheint im Manganbilde schwach gelblich, nahezu farblos.

Das normale Kollagen bildet also dem Deckepithel gegenüber nicht nur einen Gegensatz in betreff der Base-Säure-Reaktion, sondern noch radikaler in ihrem Sauerstoffgehalt. Mit diesem tinktoriellen Gegensatz harmonieren auch die Tatsachen, welche uns die Hydrolyse des Kollagens gelehrt hat. Im Gegensatz zum Keratin fehlen dem Kollagen die stark reduzierenden Aminosäuren: Tyrosin, Zystin und Tryptophan; es hat einen relativ hohen Sauerstoffgehalt (zirka 25%) bei relativ niederem Kohlenstoffgehalt (zirka 50%).

Auch dieser Mangel an Reduktionskraft ist eine notwendige Anpassung an den Beruf des Kollagens, die sauerstoffbringende Lymphe auf sauerstoffgieriges Epithel zu übertragen. Ein größerer Gehalt an jenen stark reduzierenden Eiweißen würde der Lymphe ihren Sauerstoff rauben, schon ehe sie ihr Ziel, das epitheliale Parenchym, erreicht hat.

Bei diesen klaren chemischen Gegensätzen zwischen Kollagen und Epithel ist es kein Wunder, daß wir schon seit langer Zeit über einen reichen Schatz spezifischer Kollagenfärbungen verfügen, der sich auch in Zukunft nach einfachen chemischen Grundsätzen beliebig vermehren lassen wird. Es handelt sich dabei immer um die zweckmäßige Verbindung zweier Farben, von denen entweder eine sauer ist, um das Kollagen zu färben, und eine basisch zur Färbung der Nukleoproteide, des Granoplasmas und der Mastzellenkörnung — dann benutzen wir den Gegensatz der Säure-Basen-Affinität —, oder um die Verbindung einer einfach sauren Kollagenfarbe mit einer hochoxydierten Spongioplasmafarbe — dann besteht der oxypolare Kontrast. Im letzteren Falle spielt schon seit den siebziger Jahren des vorigen Jahrhunderts eine Hauptrolle die hochoxydierte Pikrinsäure mit ihrem oxypolaren Gegensatz zu einfach sauren Farben, so in Ranviers Pikrokarmin und in van Giesons Pikro-Säurefuchsin. Dieser Kontrast ist allerdings ziemlich eng begrenzt und auf die Verbindung von meist roten, sauren Farben mit einer gelben Nitrofarbe beschränkt, die die Aufgabe hat, das reduzierende (gelbe) Spongioplasma vom nicht reduzierenden (roten) Kollagen abzugrenzen. Von einer solchen rein sauren

Mischung können natürlich die Kerne nur in ihrem dürftigen unteren Stockwerk angefärbt werden, weshalb man empirisch schon immer derartige Doppelfärbungen durch Vorfärbung mit Hämatoxylin in eine Tripelfärbung zur Darstellung auch des Mesoplastins der Kerne verwandelt hat.

Auch alle später empfohlenen Kollagenfarben gehören zu den einfach sauren Farben, die man in folgende Gruppen einteilen kann:

Farbenindizes:

I. Sulfosaure Salze der Rosanilinfarbstoffe.
II. Sulfosaure Azofarbstoffe.
III. Sulfosaure Salze der Induline und Nigrosine.
IV. Sulfosaures Salz des Indigoblaus (Indigokarmin).
V. Orzein.

I. Sulfosaure Salze der Rosanilinfarbstoffe.

In dieser Gruppe finden sich die gebräuchlichsten Kollagenfärber: Säurefuchsin und Wasserblau. Auch das wasserlösliche Anilinblau in der Kollagenmethode Mallorys gehört hierher. Mallory hat den fruchtbaren Gedanken in diese Färbungen mit Di- und Trioxychromen hineingebracht, das gegen alle alkalischen Substanzen und basische Färbungen ungemein empfindliche Säurefuchsin von den anderen sauren Farben abzutrennen und zuerst für sich mittels saurer Phosphormolybdänsäure ($H_3PO_4 + 11\ MoO_3$) zu fixieren, ehe die Schnitte in die durch Oxalsäure angesäuerte Mischung der zwei anderen sauren Farben (Goldorange und wasserlösliches Anilinblau) gebracht werden. Blau färben sich dann außer dem Kollagen noch Schleim, Amyloid, Hyalin, während das Säurefuchsin auf dem Plasma, dem Plastin der Kerne, dem Fibrin und Elastin in roter Farbe fixiert bleibt.

Hueter ersetzte die Phosphormolybdänsäure durch Phosphorwolframsäure ($H_3PO_4 + 11\ WoO_3$) und fügte mittels Karmin eine Mesoplastinfärbung hinzu.

Pasini erreichte eine Polychromie von sogar vier sauren Farben (Orzein, Wasserblau, Säurefuchsin und Eosin) durch anfängliche und nachherige Beize der Schnitte mit 2%iger Phosphorwolframsäure.

Romeis gibt das Verhältnis in diesem Tetraoxychrom genauer an:

Wasserblau + Orzein-Mischung (Unna)	0·3 cm^3
Gesättigte wässerige Säurefuchsinlösung	0·4 cm^3
2%ige Eosinlösung in 50% Alkohol	0·3 cm^3
Glyzerin	0·25 cm^3.

Hierin färben sich neben blauem Kollagen und hellblauem Spongioplasma das Kernplastin, Keratohyalin, Keratin und die Epithelfasern rot.

Die Malloryfärbung des Kollagens hat viel Anklang gefunden und ist von Wolley, Mall und Mc Gill in unwesentlichen Punkten modifiziert worden.

Traina hat ein Tetraoxychrom angegeben, in welchem das Sulfosalz Wasserblau mit Pikrinsäure gemischt ist, während eine Vorbeize mit Resorzin vorhergeht und auch eine Kernfärbung mit Akridinrot, welches außer der sauren Akridinfarbe das basische Pyronin enthält. So entsteht neben roten Kernen blaues Kollagen und grünes Spongioplasma sowie grüne Muskeln.

Gebräuchlicher als die Malloryfärbung ist aber immer noch die erste Art der Säurefuchsinanwendung geblieben, die Verbindung des Säurefuchsins mit der Pikrinsäure in der van Gieson-Färbung, die ursprünglich nur für das Zentralnervensystem empfohlen wurde. Sie besitzt eine Geschichte und hat zahlreiche Modifikationen erfahren, da der Kern derselben ein chemisch richtiger ist. In allen Abarten dieser Färbung funktioniert allein das Säurefuchsin als Kollagenfärber, während die Beigabe der Pikrinsäure bezweckt, alle reduzierenden Substanzen, Muskeln und Epithel in gelber Kontrastfarbe hervorzuheben und dadurch das Kollagen nach außen scharf zu begrenzen. Zudem besitzt sie durch ihren Gehalt an Säure und ihren Reichtum an Sauerstoff eine avivierende Wirkung auch auf die Säurefuchsinfärbung des Kollagens. Für ihre Anwendung an der Haut will ich nur zwei Modifikationen nennen, die einfach in der Anwendung sind und präzise Bilder des Kollagens ergeben, eine ältere Formel von mir (1894) und eine spätere von Hansen (1898). Sie unterscheiden sich dadurch, daß in der ersteren der für das Säurefuchsin notwendige Säurezusatz aus Salpetersäure, bei der Hansenschen Vorschrift aus Essigsäure besteht.

Meine Vorschrift für dieses Dioxychrom lautet:

Säurefuchsin	0·25
Pikrinsäure	1·5
Salpetersäure	1·5
Wasser ad	100.

Die Pikrinsäure wird in heißem Wasser gelöst, hierin erst das Säurefuchsin aufgelöst und dann die Salpetersäure tropfenweise zugegeben. In der Mischung bleiben die Schnitte 5—10 Minuten, werden dann kurz in Wasser abgespült und durch Alkohol in Öl und Balsam gebracht.

Weniger einfach ist die Vorschrift von Hansen. Er bereitet eine Stammlösung von 100 cm^3 kalt gesättigter Pikrinsäurelösung in Wasser mit 5 cm^3 einer 2%igen wässerigen Säurefuchsinlösung. Diese Lösung ist, im Dunkeln aufbewahrt, unbegrenzt haltbar.

1. Zu 3 cm^3 dieser Lösung fügt man eine minimale Menge 2%iger Essigsäure, nämlich $^1/_3$ Tropfen. Der Schnitt verweilt in dieser Farbflotte 1—20 Minuten.
2. In 3 cm^3 destillierten Wassers, dem 2 Tropfen der (angesäuerten) Farbflüssigkeit zugefügt worden sind, schnell abspülen.
3. Hinundherbewegen in 5 cm^3 96%igem Alkohol und noch einmal 2 Minuten in 96%igen Alkohol.
4. Zweimal in absolutem Alkohol bis zur Entwässerung.
5. Xylol (nicht Öl!); dieses wechselt man einmal und schließt zuletzt den Schnitt in
6. die eben nötige Menge dicken Xylol-Kanadabalsams ein.

„Es ist unbedingt nötig, die angegebene Methode genau zu befolgen, falls man konstante und zuverlässige Resultate wünscht." Soweit Hansen.

Das Resultat ist in beiden Fällen dasselbe: leuchtend rotes Kollagen; alles übrige Gewebe, auch Kerne und Elastin gleichmäßig gelb.

Alle bisher genannten Polyoxychrome haben einen schwachen Punkt, die Kernfärbung. Natürlich wird bei ihnen allen das Plastin im unteren Stock des

Kernes mitgefärbt, aber nur schwach, und sie treten daher gar nicht hervor. Wir sind aber gewohnt, uns gerade durch eine starke Kernfärbung in den Geweben, besonders in uns noch unbekannten, pathologischen, zu orientieren. Daher verfährt man gewöhnlich so, daß man dem Dioxychrom eine Vorfärbung des Mesoplastins mittels einer Hämatoxylinfärbung voranschickt. Auch diese Art der Ergänzung gibt von dem Reichtum der Gewebe an verschiedenen Eiweißen nur einen schwachen Begriff, da die Färbung aller sauren Eiweiße, der Nukleoproteide, des Granoplasmas und der Mastzellenkörnung noch fehlt. Hier treten nun einige ganz andere Kollagenmethoden helfend ein, deren Wesen darin besteht, daß zunächst alle sauren Eiweißorte intensiv durch blaues Polychrom vorgefärbt werden und dann erst das Kollagen eine saure Gegenfärbung erhält. Dieses kann unter Erhaltung der Kernfärbung dadurch erreicht werden, daß man die Sulfofarbe mit einer Tanninbeize verbindet. Auf diesem Wege erhält man zwei leicht auszuführende Methoden, die gute Übersichtsbilder liefern. In ihnen treten allerdings außer dem Kollagen nur noch die Nukleoproteide tinktoriell hervor. Die anderen beiden sauren Eiweiße, Granoplasma und Mastzellenkörnung, werden durch die Gerbsäure aufgelöst und erscheinen daher bei diesen beiden Methoden nicht.

a) Blaues Polychrom—Säurefuchsin + Tannin-Methode.

1. Blaues Polychrom 2—5 Minuten, um so länger, je dünner der Schnitt ist.
2. In Wasser gut abspülen.
3. $^1/_2$%ige Säurefuchsin + 33%ige Tannin-Mischung.
4. Lange Abspülung in destilliertem Wasser (oder kurze in dem immer basischen Leitungswasser).
5. Absoluter Alkohol, Öl, Balsam.

Anstatt der vorrätig gehaltenen Mischung der Tanninlösung mit Säurefuchsin kann man sich — und sogar mit Vorteil — eine solche extemporieren, indem man zu 3 cm^3 der 33%igen Tanninlösung zirka 5 Tropfen der vorrätigen $^1/_2$%igen Säurefuchsinlösung zusetzt. Mit dieser Methode werden alle oxyphilen Substanzen, außer Kollagen also auch: Spongioplasma und Muskeln säurefuchsinrot gefärbt, während auf den basophilen Eiweißen, den Nukleoproteiden, dem Granoplasma und dem Hyalin der Plasmazellen, das blaue Polychrom, dank der dem Säurefuchsin zugefügten Tanninbeize fixiert, erhalten bleibt. Zu dieser Methode sind außer dem Alkoholmaterial auch solche Gewebe geeignet, die in Chromsäure und Chromsalzen, in Sublimat und Pikrinsäure fixiert wurden. Dieser Umstand und ihre einfache Handhabung macht sie zu rascher Gewinnung guter Übersichtsbilder von rotem Kollagen und blauen Kernen sehr geeignet.

b) Safranin—Wasserblau + Tannin-Methode.

1. 1%ige wässerige Safraninlösung, 10 Minuten.
2. In Wasser gut abspülen.
3. Frisch bereitete 1% Wasserblau + 33% Tannin-Mischung (3 Tropfen einer 1%igen Wasserblaulösung auf 3 cm^3 einer 33%igen Tanninlösung), 10—15 Minuten.
4. Lange Abspülung in destilliertem Wasser.
5. Alkohol absolutus, Öl, Balsam.

Diese Methode hat dasselbe Anwendungsgebiet wie die vorhergehende. Gut eignet sie sich auch für Gewebe, die in Pikrinsäure und Salpetersäure fixiert sind, wie z. B. bei Entkalkungen. Da das alkalische blaue Polychrom hier durch die neutrale Safraninlösung ersetzt ist, so fallen die Färbungen bedeutend heller, durchsichtiger aus, was für Übersichtsbilder erwünscht ist. Hier kontrastiert das blaue Kollagen sehr gut mit den roten Kernen.

II. Sulfosaure Azofarbstoffe.

Jüngeren Datums als die Verwendung der sulfosauren Rosaniline ist die saurer Azofarbstoffe zur Darstellung des Kollagens; sie wächst aber bei dem unabsehbaren Reichtum dieser Farbengruppe fortwährend. Hauptsächlich verdanken wir Heidenhain ihre Einführung mit der Empfehlung des Azokarmins, des Blauschwarz und der Kongofarben. Es gehören hierhin aber auch das Orange und die Chromotrope, das Ponceau und Diaminblau (Curtis) sowie das Naphtholschwarz (Curtis, Merkel). Diesen sauren Azofarben gehört die Zukunft der Kollagenfärbung, nicht bloß wegen ihrer großen Zahl, sondern auch weil sie viel weniger gegen Alkalien empfindlich sind als die sulfosauren Rosaniline. Ebenso wie diese zweckmäßig mit der Spongioplasma färbenden Pikrinsäure kombiniert werden, hat Heidenhain aus dem Blauschwarz ein Pikro-Blauschwarz hergestellt, welches Kollagen schwarz, rote Blutkörperchen gelb, Muskeln gelblich färbt, und Merkel ein Pikro-Naphtholschwarz. In allen diesen Kombinationen hat die Beigabe der Pikrinsäure als hochoxydierter Farbe einerseits die Funktion, das Kollagen nach außen gegen das reduzierende, sich deshalb pikringelb färbende Spongioplasma tinktoriell abzugrenzen, andrerseits es durch ihren Säure- und Sauerstoffgehalt farbkräftiger, leuchtender zu machen.

III. Sulfosaure Induline und Nigrosine.

Diese Gruppe ist im Gegensatz zu den sauren Azofarben sehr beschränkt. Es kommen wesentlich nur die Empfehlungen eines Pikro-Nigrosins durch Freeborn und Schaffer in Betracht. Übrigens ist das dieselbe Mischung, welche ich zur tinktoriellen Isolierung der basischen Albumose Eleidin (schwarz) in der reduzierenden Hornschichtumgebung (gelb) angegeben habe (1909) und welche heute bei der chemischen Erforschung der Keratosen eine wichtige Rolle spielt.

IV. Sulfosaures Indigoblau (Indigokarmin).

Die Einführung dieser farbkräftigen Substanz zur Kollagenfärbung verdanken wir Eugen Fraenkel[1]). Hier wird die blaue Kollagenfarbe durch Pikrinsäurezusatz in eine grüne übergeführt, während eine Karminvorfärbung die Kerne rot, eine Vorfärbung mit angesäuerter Orzeinlösung das Elastin braunschwarz färbt und nur die stark reduzierenden Muskeln das Pikringelb allein bewahren[2]). So entsteht ein praktisch wertvolles Tetraoxychrom.

---

[1]) Schmorl, Histologische Technik, Färbung der elastischen Fasern.

[2]) Im Gegensatz zu der Methode von Traina, bei der die Muskeln sich durch Wasserblau und Pikrinsäure grün färben.

1. Lithionkarmin, Salzsäurealkohol, Wasser.
2. Orzeinlösung (+ HNO_3) 24 Stunden, 80% Alkohol.
3. Konzentrierte wässerige Pikrinsäure 200·0 / Indigokarmin 0·5 } 10—15 Minuten.
4. Eisessig 3·5 cm^3/100 Aq.
5. 96%iger Alkohol.
6. Alkohol absolutus.
7. Öl oder Xylol. — Balsam.

* * *

Da bei allen Färbungen des Kollagens mit Sulfosalzen, auch wenn man die Nukleoproteide durch Vorfärbung mit blauem Polychrom und durch eine Tanninbeize zu erhalten versteht, immer noch das Granoplasma und die Mastzellenkörnung im Bilde fehlen, so hat sich schließlich eine andere, ganz für sich stehende Kollagenfärbung doch noch als unersetzlich für das Studium erwiesen; das ist die Färbung mit der nicht angesäuerten Orzeinlösung. Taenzer fand bekanntlich in meinem Laboratorium, daß die angesäuerte Orzeinfärbung eine spezifische Färbung für Elastin ist. Dabei tritt auch stets eine orzeinrote Färbung des Kollagens auf, deren Stärke dem Säuregehalt der Lösung umgekehrt proportional ist. Diese Erkenntnis führte mich zu einer neuen Kollagenfärbung, deren Vorzüge ich 1894[1]) mitteilte und die sich seitdem bewährt hat.

V. Orceïn.

Das Orzein wird aus vielen Flechten des Mittelmeers, des Atlantischen und Stillen Ozeans gewonnen, indem man diese zerkleinert und der Einwirkung von Luft und Ammoniak aussetzt. Dabei bildet sich zunächst Orzin ($C_6H_5CH_3(CH)_2$) und aus diesem beim Fortgang derselben Behandlung: Orzein, welches ein Gemenge von gelbem Orzein ($C_{21}H_9NO_5$) und rotem Orzein ($C_{28}H_{24}N_2O_7$) darstellt. Es bildet ein karminrotes, kristallinisches Pulver, das nicht in Wasser, wohl aber in Alkohol löslich ist. Mittels einer 1%igen alkoholischen Lösung desselben erhält man in den mit blauem Polychrom vorgefärbten Hautschnitten neben orzeinrotem Kollagen und Spongioplasma blaue Nukleoproteide, blaues Granoplasma und thiazinrote Mastzellenkörnung, die einen blauen Mastzellenkern umgibt. Da ein Säurezusatz fehlt, wird durch diese Methode das Elastin nicht vor dem Kollagen hervorgehoben, wie durch die angesäuerte Orzeinlösung. Die glatten und quergestreiften Muskeln heben sich dagegen vom roten Kollagen durch ihre bläulichviolette Farbe ab. Dieselbe rührt nicht vom blauen Polychrom her, sondern vom Orzein selbst, welches sich mit Alkalien bläulichviolett verfärbt. Diese Färbung ist also ein Indikator für die frische Muskelsubstanz, ehe dieselbe bei der Totenstarre sauer wird.

Die Ausführung dieser Methode kann auf zweierlei Weise geschehen: entweder schickt man die Orzeinfärbung voran und entfärbt das darauf folgende blaue Polychrom durch die Glyzerinäthermischung, oder man läßt auf das blaue Polychrom die Orzeinfärbung folgen, welche dann gleichzeitig das Kollagen anfärbt und die Blaufärbung der sauren Eiweiße differenziert.

[1]) Unna, Die spezifische Färbung des Kollagens. Monatshefte für praktische Dermatologie, Bd. **18**, S. 509.

a) Orzein — blaues Polychrom — Glyzerinäther-Methode.

1. 1%ige spirituöse Orzeinlösung ohne Säurezusatz, 15 Minuten.
2. In Alkohol, 96%ig, und in
3. Wasser kurz abspülen.
4. Blaues Polychrom, 2—5 Minuten.
5. In Wasser kurz abspülen.
6. Glyzerinäthermischung 1 + 4 Wasser, 1—2 Minuten.
7. In Wasser gut abspülen.
8. Alkohol absolutus, Öl, Balsam.

Um den Gegensatz zwischen Kollagen und Zellplasma der Bindegewebszellen, für den diese Methode besonders geeignet ist, möglichst scharf herauszuarbeiten, hat man hauptsächlich darauf zu sehen, jede Spur von Granoplasma der Zellen in tingiblem Zustande dem Schnitte zu erhalten. Nur so bekommt man den wünschenswerten Kontrast: Orzeinrotes Kollagen gegen bläuliches Spongioplasma. Um das Granoplasma zu erhalten, muß das Material auf einem Wattebausch rasch in absolutem Alkohol gehärtet werden, mit keinem Fixationsmittel, besonders nicht mit Formalin und Tannin in Berührung kommen, und auch die Schnitte dürfen nur kurz bei den Spülungen gewässert werden.

b) Blaues Polychrom — Orzein-Methode.

1. Blaues Polychrom, 5—10 Minuten.
2. In Wasser gut abspülen.
3. Schnitte auf dem Spatel mit Fließpapier etwas entwässern.
4. 1%ige spirituöse Orzeinlösung ohne Säurezusatz, 15—25 Minuten.
5. Alkohol absolutus } eventuell beides wiederholen, falls der Schnitt noch
6. Bergamottöl } zu blau ist.
7. Balsam.

Diese Methode verfolgt denselben Zweck wie die vorhergehende und ist insofern einfacher, als sie die Entfärbung mit Glyzerinäther umgeht. Indem sie aber Entfärbung und Entwässerung gleichzeitig der spirituösen Orzeinlösung überläßt, stellt sie an das persönliche Geschick etwas höhere Ansprüche. So empfiehlt es sich, den Schnitt schon zuvor mechanisch durch Berührung mit Fließpapier zu trocknen, ehe er in die spirituöse Orzeinlösung kommt, um dieser die Entwässerung zu erleichtern. Die Entfärbung verbessert man am einfachsten mittels einer doppelten Passage durch Alkohol und Bergamottöl.

M.

I. Elastin.

Das Elastin stammt ebenso wie das Kollagen aus dem Plasmaleibe der Bindegewebszellen, aber, getrennt von jenem, nur aus deren festeren Kanten, wie die Untersuchungen von Taddei gelehrt haben. Von den Zellen sich ablösend, bilden sie gerade, scharfkonturierte, stielrunde Fäserchen. Diese wachsen

allmählich zu dickeren, geschweiften, teils stielrunden und teils bandartig abgeplatteten Fasern heran. Auch die dicksten derselben lösen sich nicht, wie die kollagenen Bündel, in feinere Fasern auf, verschmelzen aber im Gegensatz zu diesen zu starren Netzen, welche die kollagenen Bündel der Kutis, dieselbe senkrecht und schräg kreuzend, allseitig umspinnen und ihnen dadurch Widerstand gegen Druck und Zug verleihen. Da sie andrerseits sich an den Musculi arrectores inserieren und die Verbindung der Muskeln mit dem Kollagen der Kutis vermitteln, so hat die Kontraktion der Muskeln zunächst eine Anspannung des elastischen Gerüstes der Haut und erst mittelbar dadurch eine Verkürzung und Verdichtung der gesamten Kutis zur Folge, schon lange bevor sie bei höchster Anspannung auch ihren festeren Ansatzpunkt an den Lanugohaaren in Bewegung setzen und diese letzteren aus ihrer schrägen Lage in eine senkrechte überführen unter Bildung einer Cutis anserina (Gänsehaut).

An der Haut besteht also eine ähnliche funktionelle Zusammengehörigkeit zwischen glatten Muskeln und elastischen Fasern wie bei den größeren Blutgefäßen und Bronchien, im Darmkanal, in der Blase und Scheide. An diesen Organen ersetzt das Elastin zum Teil die Muskelsubstanz, indem es deren starke, aber örtlich beschränkte Kontraktion in eine schwächere, aber allgemeine Spannung des Gewebes verwandelt.

An der Haut bewirkt diese Spannung die elastische Rückordnung der Haut während der Körperbewegungen, bei denen sie stets mitbewegt wird.

Ohne eine nennenswerte Zugelastizität zu besitzen (Langer, Tomsa, Triepel), übt das Elastin doch eine erhebliche elastische Wirkung aus vermittels der ihm eigentümlichen Biegungs- und Torsionselastizität[1]). Ähnlich wie ein an und für sich unelastischer Stahldraht durch spiralige Umwicklung um einen Stab, z. B. als Feder in einer Matratze, einen hohen Grad von Biegungselastizität erhält, so die starren elastischen Fadennetze der Haut durch ihre natürliche Krümmung, die am besten bei ihrer Isolierung vom Kollagen durch Verdauung hervortritt. Die Hautmuskulatur verbraucht bei ihrer Anspannung des elastischen Netzes diese Biegungselastizität der elastischen Fasern. Die derart im Elastin aufgespeicherte Torsionsenergie setzt sich beim Nachlaß der Muskelspannung wieder in die Bewegungsenergie um, wie sie die Rückordnung des gespannten Elastinnetzes erfordert. Mit dem Elastin kehrt dann auch das sich passiv verhaltende Kollagen in seine normale Lage zurück.

Entsprechend den ganz verschiedenen physikalischen Leistungen sind auch die Unterschiede in der chemischen Konstitution von Elastin und Kollagen bedeutend. Elastin enthält nur sehr geringe Mengen der basischen Diaminosäuren. Es ist daher in Säuren weniger quellbar und überhaupt für Säuren weniger angreifbar als Kollagen.

Die frühere allein übliche Weise der Elastindarstellung ohne Färbung, wie sie beispielsweise Virchow übte, bestand lediglich in der Behandlung des Gewebes mit Essigsäure. Dabei quillt Kollagen und wird weniger sichtbar, während die nichtquellenden elastischen Fasern dunkel konturiert hervortreten.

Die sauren Hauptbestandteile des Kollagens: Glykokoll, Glutaminsäure, Prolin und Oxypyrrolidinkarbonsäure werden im Elastin vertreten durch Glyko-

---

[1]) Unna, Monatshefte für praktische Dermatologie 1883, S. 220 ff.

koll, Leuzin, Alanin und Phenylalanin; sie besitzen kein Gegengewicht in einer entsprechenden Menge der basischen Aminosäuren, besonders des Lysins und Arginins, wie beim Kollagen. Daher resultiert — dem Kollagen gegenüber — ein mehr saurer Charakter des Elastins.

Zusammensetzung von Kollagen und Elastin[1]).

Prozente von	Kollagen	Elastin
Glykokoll	19·25	25·75
Alanin	3·0	6·58
Valin	—	1·0
Leuzin	6·75	21·38
Asparaginsäure	0·56	—
Glutaminsäure	14·0	0·76
Prolin	7·7	1·74
Oxypyrrolidinkarbonsäure	6·4	—
Phenylalanin	0·4	3·89
Tyrosin	—	0·34
Histidin	0·4	0·53
Lysin	5·6	2·48
Arginin	9·3	1·86
Ammoniak	0·43	0·05

Dieser saure Charakter des Elastins wird allein berücksichtigt bei den älteren Färbungen mit basischen Farben von Taenzer und Manchot (Fuchsin) und Mibelli (Safranin). Um jede Mitfärbung des Kollagens dabei zu vermeiden, benutzte man auch hier die Quellung des letzteren in Säuren, wodurch seine Mitfärbung ausgeschlossen wird. Aus diesem Umstande erklärt sich die regelmäßige Zugabe von Säuren (Salpetersäure: Taenzer, Schwefelsäure: Manchot usw.) bei den Elastinfärbungen jener Zeit.

Ein noch wesentlicherer Unterschied zwischen Elastin und Kollagen ist durch den hohen Gehalt des ersteren an reduzierenden Aminosäuren gegeben, wobei neben dem sehr hohen Gehalt an Leuzin und dem mäßigen an Phenylalanin auch der geringe Gehalt an dem besonders stark reduzierenden Tyrosin ins Gewicht fällt. Denn Kollagen enthält wenig Leuzin, sehr wenig Phenylalanin und gar kein Tyrosin.

Die Reduktionskraft des Elastins im Gegensatz zum Kollagen wird durch die Mitfärbung desselben (neben Protoplasma, Hornschicht, Muskel und Nerv) bei den Reduktionsfärbungen bewiesen.

[1]) Nach Cohnheim, Chemie der Eiweißkörper, 3. Aufl., S. 246—259 (1911).

Legt man Hautschnitte (Gefrier-, Zelloidin- oder Paraffinschnitte) in eine Lösung von Kalipermanganat, so treten die elastischen Fasern durch Aufnahme von Mangansuperoxyd dunkelbraun aus dem Kollagen hervor. Ebenso speichert und reduziert das Elastin die hochoxydierten Metallsäuren: Osmiumsäure und Chromsäure durch oxypolare Affinität, ganz im Gegensatz zum Kollagen. Dadurch wird das Elastin stark angesäuert und nimmt nun mit besonderer Intensität basische Farben auf. Auf dieser Eigenschaft des Elastins beruhen viele ältere Färbemethoden desselben (Lustgarten, Unna, Martinotti, Schütz, Ferria, Krzysztalowicz u. a.), die sich der Flemmingschen Osmium + Chrom-Mischung zur Fixierung bedienen. In allen diesen Fällen tritt zunächst die Reduktionskraft des Elastins oxypolar in Wirksamkeit und bindet die hochoxydierten Metallsäuren. An die Stelle des normalen Elastins tritt damit eine saure Metallverbindung des letzteren; dann erst folgt die nun sehr verstärkte Säure-Basen-Affinität des angesäuerten Elastins zur basischen Farbe (Fuchsin, Gentianaviolett, Safranin).

Aus den Untersuchungen von Michaelis, Fischer und Pappenheim geht hervor, daß die beiden besten Elastinfärbungen, die einzigen, die heutzutage noch in großem Umfange gebraucht werden, sich ebenfalls wesentlich auf der reduzierenden Eigenschaft des Elastins aufbauen, das ist die Orzeinfärbung (Taenzer-Unna) und die Weigertsche Färbung des Elastins. Betrachten wir zunächst die letztere.

Elastinfärbung nach Weigert.

Gefrier- oder Paraffinschnitte werden vorgefärbt mit Lithionkarmin, dann differenziert in Salzsäurealkohol, Wasser, oder direkt in Alkohol.

Färben mit Weigertscher Farbflüssigkeit, 25—30 Minuten.
Abspülen in Alkohol.
Differenzieren in absolutem Alkohol, 2—18 Stunden.
Aufhellen in Xylol, Balsam.

Die Weigertsche Farblösung wird folgendermaßen hergestellt:

200 *g* einer 2%igen Resorzinlösung + 1 *g* Fuchsin werden in einer Porzellanschale zum Kochen erhitzt; dann setzt man 25 cm^3 Liq. ferri sesquichlor. hinzu und läßt unter Umrühren noch weitere 2—5 Minuten kochen. Hierbei bildet sich ein Niederschlag. Man läßt nun abkühlen und filtriert. Das getrocknete Filter mit Niederschlag kommt zurück in die getrocknete Kochschale und wird hier unter stetem Umrühren und unter allmählichem Herausfischen des vom Farbstoff befreiten Fließpapiers mit 200 cm^3 Alkohol von 94% gekocht; dann läßt man erkalten, filtriert und füllt das Filtrat mit Alkohol wieder auf 200 cm^3 auf. Nach Zusatz von 2%iger Salzsäure (zu 200 cm^3 Lösung: 4 cm^3) ist die Farblösung fertig, welche nur etwa 6 Wochen lang brauchbar ist; dann verdirbt die Lösung und färbt nicht mehr bloß Elastin, sondern auch Kollagen und Schleim.

Bei dieser Elastinfärbung nach Weigert sind zu einer einzeitigen Färbung vereinigt die Säure-Basen-Affinität des sauren Elastins zum basischen Fuchsin mit der oxypolaren Affinität des reduzierenden Elastins zum hochoxydierten Eisenchlorid. Diese letztere Affinität wird noch verstärkt durch die Zugabe des reduzierenden, zweiwertigen Phenols: Resorzin.

Fischer fand, daß auch die einfachere Verbindung: Fuchsin + Eisenchlorid, sein „Ferrifuchsin", ohne Resorzinzugabe das Elastin spezifisch färbt, aber nicht so gut wie mit Resorzinzusatz in seinem: „Ferrifuchselin".

Die chemische Formel für die Wirkung der Weigertschen Elastinfärbung heißt demnach:

Fuchsin—Elastin + Resorzin—Eisenchlorid
basisch sauer + reduzierend oxydierend
Base-Säure-Affinität Oxypolare Affinität

Das Eisenchlorid kann hierin durch andere stark oxydierende Mittel ersetzt werden, so durch Ammonpersulfat (Michaelis, Pappenheim), durch Chromsäure und Kalibichromat (Minervini). Aber einen Umstand hat das Eisenchlorid vor diesen voraus; es macht nämlich bei dem Färbeprozeß Salzsäure frei[1]), welche in höherem Grade als Schwefelsäure und Chromsäure die Nebenwirkung entfaltet, das Kollagen zu quellen und dadurch färberisch auszuschalten. Daher gelang es auch Pappenheim, gerade mittels Eisenchlorid und verschiedenen Phenolen aus Fuchsin eine große Reihe von Elastinfärbern zu erzeugen.

Während die Weigertfärbung des Elastins theoretisch sehr interessant ist, besitzt die Taenzer-Unna-Färbung praktisch eine größere Wichtigkeit. Hierüber sind sich die Elastinforscher einig. So sagt Krzysztalowicz: „Ein größerer Vorzug der Taenzer-Unnaschen Methode und zugleich der wichtigste Unterschied zwischen dieser und der Weigertschen ist der, daß, während die letztere eine komplizierte Färbung der Präparate behufs Differenzierung verschiedener Gewebe nicht zuläßt, die Taenzer-Unnasche Methode es ermöglicht, die Präparate mittels anderer spezifischer Methoden zu behandeln und auf diese Weise auf einem und demselben Präparate alle Gewebe nebst ihren Veränderungen durch differente Farben schön und klar darzustellen. Man kann endlich noch als einen Vorzug des Orzeins hervorheben, daß es in Präparaten aus Flemmingscher Lösung und Müllerscher Flüssigkeit die elastischen Fasern auch vortrefflich färbt, was bei der Weigertschen Methode nicht so gut gelingt." (Mon.-H. **30**, 284.)

Schneider findet die Orzeinfärbung besser, weil sie eine Nachfärbung mit Hämatein + Eosin zuläßt und bei Überfärbungen mit salzsaurem Alkohol leicht entfärbbar ist (Zeitschr. f. wiss. Mikr. **31**, 171).

Minervini hält die Weigertfärbung für weniger sicher als die Orzeinfärbung, wo es auf die feinsten Fasern ankommt (Taddei, Le fibre elastiche usw. Pathologisches Institut der Universität Padua).

Den Kernpunkt in dieser Angelegenheit traf aber Krzysztalowicz, indem er nachwies, daß die Weigertfärbung zwischen Elastin und Elazin keinen Unterschied macht, also für die wichtige Frage des Elazins gar nicht brauchbar ist.

---

[1]) Pappenheims Ansicht, daß Eisenchlorid ($FeCl_3$) eine „basische" Beize sei und seine darauf gebaute Theorie der Weigertschen Färbung (Monatshefte für praktische Dermatologie Bd. 38, S. 372) ist nicht haltbar. Die Nichtberücksichtigung der Kollagenquellung machte es Pappenheim auch schwer „verständlich, daß eine Elastinfärbung nach Weigert und Unna nur eintritt in saurer Lösung". (Monatshefte für praktische Dermatologie Bd. **39**, S. 143.)

Pappenheim vermutete im Orzein neben sauren auch basische Eigenschaften, hauptsächlich weil es außer Elastin auch Kerne färbt. Hierbei unterschied er nicht zwischen Kernnukleoproteid und Kernplastin. Nur das Nukleoproteid wird von basischen Farben gefärbt, das saure Orzein färbt andrerseits nur das basische Kernplastin, was man leicht nachweisen kann, wenn man erst das Nukleoproteid durch verdünnte Kalilauge entfernt.

Orzein ist eine rein saure Farbe, die sich mit dem sauren Elastin natürlich nur oxypolar verbinden kann. Das saure reduzierende Elastin hat oxypolare Verwandtschaft zu dem ebenfalls sauren, aber hochoxydierten Orzein; deshalb ist Orzein die einfachste und natürlichste Elastinfärbung, die weiter keine oxydierende Beize nötig macht, wie die Weigertfärbung. Um Elastin elektiv zu färben, bedarf es nur noch einer Quellung und Ausschaltung des Kollagens durch Säurezusatz (HNO_3, HCl). Dieser Säurezusatz hat nicht den Sinn, den Pappenheim angab, „Basizitäten im Orzein", die er aus der Herstellung des Orzeins mit Ammoniak und Kalk herleitete, zu binden. Diese Basen sind nur notwendig, damit die Muttersubstanz des Orzeins, das Orzin, eine genügende Sauerstoffmenge aus der Luft aufnimmt, um das Orzein zu bilden. Der Säurezusatz hat vielmehr die Funktion, das Orzein im Schnitte vom quellenden Kollagen auf das nichtquellende Elastin abzulenken und seine Farbkraft auf diesem zu konzentrieren.

Elastinfärbung nach Taenzer-Unna.

Orzein	0·2
Salpetersäure	2·0
70% Alkohol ad	100·0

Die Schnitte verweilen in dieser Lösung 8—24 Stunden.

Abspülen in Wasser, Alkohol, Öl, Balsam.

Man kann nachträglich eine beliebige Kern- und Plasmafärbung anbringen. Am besten eignet sich dazu das blaue Polychrom mit Glyzerinätherentfärbung.

Taddei[1]) hat gezeigt, daß die elastischen Fasern sich als Elastinstreifen an den Längskanten der Bindegewebszellen anlegen und sich dann in das umgebende Zwischengewebe abstoßen, um sich wieder neu in den Zellen zu bilden. Ist diese endozelluläre Entstehungsart allgemein gültig, wofür vieles spricht, und die frühere Vorstellung unrichtig, nach welcher sich die Elastinfasern durch Umprägung aus den kollagenen Fasern entwickeln sollten, so würde die Reduktionskraft des Elastins sich leichter verstehen lassen. Es stände dann dem reduzierenden Spongioplasma der Bindegewebszellen noch näher als das Kollagen. Dann würde sich auch das Verhältnis dieser beiden bindegewebigen Endprodukte zueinander auf befriedigende Weise folgendermaßen erklären.

Die dauernd von sauerstoffhaltiger Lymphe umspülten Bindegewebszellen verlieren bei der Bildung des Kollagens ihre Reduktionskraft bis auf einen reduzierenden Rest. Dieser spaltet sich in Form stielrunder Elastinfasern ab, die das aus denselben Mutterzellen entstehende Kollagen netzförmig durchziehen und umklammern. Bei übermäßiger Ausbildung des Kollagens, so in

[1]) A. a. O.

Narben, Keloiden, Fibromen, verbleiben keine Spongioplasmareste, die sich in Elastin umwandeln könnten; so erklärt sich deren Elastinlosigkeit.

Ebenso begreiflich ist der Schwund des Elastins bei entzündlichem Ödem, z. B. beim Erysipel, denn die Überschwemmung mit sauerstoffreichem, alkalischem Gewebssaft ist dem sauren, reduzierenden Elastin sicher noch verderblicher als dem Kollagen selbst. Sogar der bisher ziemlich unerklärliche trockene Schwund des Elastins bei der Entwicklung eines Plasmoms sowie bei der Granulationsbildung wird vollkommen verständlich unter dem Gesichtswinkel des hier herrschenden Sauerstoffüberschusses, der es gar nicht zur Bildung eines reduzierenden Zellrestes kommen läßt.

Das Sauerstoff speichernde Granoplasma und die reduzierende elastische Faser, beides sind Produkte der Bindegewebszelle, aber unter extrem verschiedenen Sauerstoffverhältnissen; wo sich Plasmazellen bilden können, gedeiht kein Elastin und umgekehrt. Dagegen verträgt sich das Elastin sehr gut mit den an Spongioplasma reichen Deckepithelien. Wenn die Krebsepithelien in das Bindegewebe der Kutis einwuchern, bleibt oft von dieser nur das Elastingerüst wohlerhalten stehen und wird von den Epithelien durchwachsen, während das sauerstoffführende Kollagen vollkommen verschwindet.

Mit dem Schwund des reduzierenden Elastins in den sauerstoffreichen Granulomen kontrastiert auf das schärfste sein Erhaltenbleiben in den Riesenzellen der Granulome, wo es vom absterbenden, stark reduzierenden Protoplasma umgeben und gleichsam eingemauert ist. Nur unter Mitberücksichtigung des histochemischen Faktors der Reduktionskraft läßt sich Auftreten und Schwund des Elastins im Bindegewebe der Haut vollständig verstehen.

II. Elazin.

In den unbedeckt getragenen Teilen der Haut, besonders in der Wangen- und Schläfengegend, erleiden die elastischen Fasern, und mit zunehmendem Alter in immer höherem Grade, eine Degeneration. Sie färben sich dann mit sauren Orzeinlösungen schwächer als sonst und erscheinen verbreitert, mithin wie gequollen; ihre Biegungen sind weniger scharf, die Verästelungen fehlen. Sie behalten aber ihre stielrunde Form bei und beschreiben große runde Bogen, die häufig, parallel zusammen gelagert, die kollagenen Fasern gruppenweise kreuzen. Ihr Hauptmerkmal ist aber ihre Basophilie; sie sind noch saurer geworden als die gewöhnlichen elastischen Fasern und haben daher von Unna den Namen Elazinfasern erhalten (Bild 67).

Mit basischen Farben, wie blauem Polychrom und Safranin, färben sie sich vorzüglich (Bild 67), und es ist daher leicht, sie durch Gegenfärbung mit einer sauren Farbe, z. B. Orange, von Kollagenfasern (Bild 68) zu unterscheiden. Will man im selben Bilde auch die normal gebliebenen Elastinfasern in Gegenfärbung darstellen, so muß man sich der sauren Orzeinlösung bedienen. Die Weigertsche Elastinfärbung ist hierzu nicht geeignet, wie Krzysztalowicz und nach ihm Schenck und Austerlitz gezeigt haben.

Die einfachste und zugleich sicherste Darstellung des Elazins neben Elastin erhält man durch langdauernde Vorfärbung mit saurem Orzein und darauffolgende Färbung mit blauem Polychrom nach folgender Formel: Vor-

färbung mit saurer Orzeinlösung eine Nacht, Entfärbung in 2%iger wässeriger Salzsäure, Alkohol absol., Wasser, dann blaues Polychrom 5 Minuten, Abspülen



Bild 67.

Elazin(el)-Färbung: Blaues Polychrom 5 Minuten, Wasser, konzentrierte Tanninlösung 5 Minuten, Wasser, Alkohol, Öl, Balsam.

mit Wasser und halbstündige Beizung und Entfärbung mit konzentrierter Tanninlösung (Bild 69). Durch diese Farbfolge wird der Faserfilz der Kutis



Bild 68.

Elazin(el)-Kollagen (k)-Färbung: Blaues Polychrom 5 Minuten, Wasser, konzentrierte Tanninlösung + 5 Tropfen einer 1%igen Orangelösung, Wasser, Alkohol, Öl, Balsam. Elazin dunkelblau, Kollagen gelb.

aufgelöst in orzeinrote feine Elastinfasern (el'), breite, bräunliche Kollagenfasern (k) und dicke bogenförmig geschwungene, blaue Elazinfasern (el).

Diese Kontrastfärbungen zeigen einen noch viel reicheren Gehalt an Elazinfasern, hauptsächlich im mittleren Teil der Kutis, während im Papillarkörper und in der Subkutis wohlerhaltenes Elastin vorwaltet.

Das Elazin kann in der Umgebung eines Karzinoms ebenso, unter Verdrängung des Kollagens, vom Epithel umwachsen werden wie das Elastin. Man erhält dann Karzinombalken, die von Elastin- und Elazinfäden wie gespickt erscheinen. Bei der Gilchristschen „Blastomykose", dieser chronischen, dem Lupus verrucosus ähnlichen Oberhauterkrankung, zeigt sich häufig ein ähnlicher



Bild 69.

Elastin(el')-Elazin(el)-Kollagen(k)-Färbung: Saure Orzeinlösung eine Nacht, gründliche Entfärbung in 2%iger wässeriger Salzsäurelösung, hierauf direkt in Alkohol absol. zur weiteren Entfärbung, Wasser, blaues Polychrom, in Wasser gründlich, bis keine blauen Farbwolken mehr abgehen, abspülen, konzentrierte Tanninlösung ½ Stunde, gründliche Spülung in Wasser; Alkohol, Öl, Balsam. Elastin orzeinrot, Elazin dunkelblau, Kollagen bräunlich.

Die Bilder 67, 68 u. 69 sind der Gesichtshaut eines alten Mannes entnommen. Alkohol-Paraffinschnitte.

Einschluß von präformiertem Elastin und Elazin in die karzinomähnlichen Epithelwucherungen. Wo diese aber im Zentrum erweichen, kommt es auch noch zu einer sekundären Umbildung der inkorporierten Elastinfasern in basophiles Elazin unter starker Anschwellung und Bildung merkwürdiger, tannenzapfen- und pilzsporenähnlicher Körperchen[1]).

Gegenüber solchen gelegentlichen Vorkommnissen bei Geschwülsten und in Narben bildet das Elazin einen regelmäßigen Bestandteil bei den Striae gravidarum, dem Myxödem, der senilen und kolloiden Degeneration der Gesichtshaut.

---

[1]) P. G. Unna, Über den Einschluß von Elastin und Elazin in das Epithel und einen Elazinbefund bei der Gilchristschen Krankheit. Monatshefte für praktische Dermatologie Bd. 41, S. 77—82 (1905).

Formeln.

Seite

Plasmafärbung mit Kollagenentfärbung 8

1. Blaues Polychrom, 1—2 Minuten.
2. In Wasser abspülen.
3. Glyzerinäthermischung, mit Wasser auf das Fünf- bis Zehnfache verdünnt, $^1/_2$—2 Minuten.
4. Besonders gute Abspülung in Wasser, 2—5 Minuten.
5. Alkohol absol., Öl, Balsam.

Methylgrün + Pyronin + Karbol-Methode (Pappenheim-Unna-Färbung) **für Plasma-Kernfärbung** 14

Methylgrün	0·15
Pyronin	0·25
Alkohol	2·5
$^1/_2$ %iges Karbolwasser ad	100·0
M.	

1. Die Schnitte kommen in diese Mischung 20 Minuten kalt,
2. werden dann in (alkalischem) Leitungswasser kurz abgespült,
3. in Alkohol absol. entwässert 1 Minute (!) und
4. durch Xylol in Öl und Balsam gebracht.

Bordo — Hämateïn + Alaun-Methode für Spongioplasma-Mesoplastin-Färbung 20

1. Bordo $^1/_2$%ig, 3 Minuten. Abspülen in Leitungswasser.
2. Hämateïn + Alaun, 3 Minuten. Abspülen in Leitungswasser.
3. Alkohol absol., Öl, Balsam.

Epithelfaserfärbung 29

1. **„Wasserblau + Orceïn-Mischung“:**

Wasserblau	1
Orceïn	1
Eisessig	5
Glyzerin	20
Alkohol	50
Aqua dest. ad	100

Von dieser vorrätigen Mischung (1) kommen
6 Tropfen
auf 54 Tropfen
einer spirituösen Eosinlösung (1 *g* Eosin ad 100 Alkohol absol.).
In dieser:

2. **„Wasserblau + Orceïn + Eosin-Mischung“** (= Mischung 2)
bleiben sie 10 Minuten.

Seite

Dann werden die Schnitte in
Wasser abgespült
und sind nun bereit zur
Nachfärbung der sauren Deckschicht der Epithelfasern mit

3. einer 1%igen Lösung des
basischen Safranins O, 10 Minuten.
Nach einer gründlichen Abspülung in
destilliertem Wasser
kommen sie kurz, nämlich 10—15 (!) Sekunden,
4. in eine 1%ige Lösung von
Kali bichromicum;
von hier über Wasser in Alkohol und schließlich in Öl und Balsam.

Zweite Epithelfaserfärbung 33

1. Wasserblau + Orceïn + Eosin-Mischung (Mischung 2) 10 Minuten, Wasser.
2. Karbolfuchsin 5 Minuten, Wasser.
3. Alkohol, Öl, Balsam.

Dritte Epithelfaserfärbung 33

1. Wasserblau + Orceïn + Eosin-Mischung (Mischung 2) 10 Minuten, Wasser.
2. Karbolgentianaviolett 10 Minuten, Wasser.
3. Alkohol, Öl, Balsam.

Bordo + Wasserblau-Methode zur Färbung von basischen Eiweißen 38

Wasserblau + Eosin + Phloxin (Wep)-Methode zur Färbung basischer Eiweiße 38

Wasserblaulösung 1%ig 6 Tropfen
+ Wässerige Eosinlösung $^1/_2$%ig 15 Tropfen
+ Phloxinlösung 1%ig 15 Tropfen.

Färbung der Reduktionsorte (der reduzierenden Eiweiße) = **Reduktionsfärbung** 39

(für Gefrier-, Zelloidin- und Paraffinschnitte).

1. **Farbenindex: Kalipermanganat.**
   1) 1%ige wässerige Lösung von $KMnO_4$ für Gefrierschnitte: 1 Minute, für Zelloidin- und Paraffinschnitte: 2—5 Minuten.
   2) Abspülung in Leitungswasser.
   3) Alkohol, Öl, Balsam.

Mangan — Methylgrün-Methode (MM.) zur Färbung von Sauerstoff- und Reduktionsorten 43

1) 1%ige Lösung von Kalipermanganat, 1 Minute.
2) Ausspülen in Wasser, solange noch violette Farbwolken abgehen.
3) Mehrere Schnitte werden auf einen Objektträger aufgezogen, je mit einem Tropfen Glyzerin versehen und mit einem zweiten Objektträger zugedeckt. Sie verbleiben so eine Nacht.
4) Abspülen in Wasser.

Seite

5) $1^0/_{00}$ige wässerige Methylgrünlösung, 10 Sekunden.
6) Wasser, Alkohol, reines Bergamottöl.
7) Einbettung in Zedernöl.

2. **Farbenindex: Eisen-Zyan-Mischung** 51
   1) Mischung von $1^0/_0$igen Lösungen von Eisenchlorid und Ferrizyankalium in Wasser zu gleichen Teilen, 5 Minuten.
   2) In Leitungswasser abspülen.
   3) Alkohol, Öl, Balsam.

3. **Farbenindex: Tetranitrochrysophansäure** 51
   (Lösung von Chrysarobin in Eisessig, dazu rauchende Salpetersäure.)
   Die Schnitte kommen in Xylol oder Chloroform, von da 5 Minuten in die gelbe Lösung von Tetranitrochrysophansäure in Chloroform oder Xylol.

Keratohyalin.

a) **Mesoplastinfärbung des Keratohyalins** 60
   1. Lösung von Hämateïn + Alaun, 5 Minuten.
   2. In Leitungswasser gründlich abspülen.
   3. $^1/_2{}^0/_{00}$ige Lösung von Kalipermanganat, nur kurz eintauchen.
   4. In Leitungswasser gründlich abspülen.
   5. Alkohol absol., Öl, Balsam.

b) **Globulin- und Zytosefärbung des Keratohyalins** 60
   1. Methylgrün + Pyronin + Karbol-Mischung, 20 Minuten.
   2. Kurz abspülen in Wasser.
   3. Kurz Alkohol absol.
   4. Öl, Balsam.

Eleïdin.

a) **Karminfärbung nach Best,** 5 Minuten 61
   Zweimal Differenzierungsflüssigkeit:

Aqua dest.	10 Tropfen,
Methylalkohol	10 Tropfen,
Liq. ammon. caust.	1 Tropfen,

   erst 5 Minuten, dann 3 Minuten.
   Alkohol, Öl, Balsam.

b) **Pikro-Karmin-Färbung (Karmin Best)** 62
   Pikrinsäure-Vorfärbung, 2 Minuten.
   Best-Karmin wie oben unter a).

c) **Nigrosinfärbung nach Flemmings Lösung** 63

d) **Pikro-Nigrosin-Färbung** 63
   Konzentrierte wässerige Pikrinsäurelösung 5 Minuten, Wasser.
   $1^0/_0$ige wässerige Nigrosinlösung 1 Minute, Wasser.
   Alkohol, Öl, Balsam.

e) **Pikro-Nigrosin nach $3^0/_0$iger Salzsäurebehandlung** 65
   (3 Stunden.)

Trichohyalin. Seite

a) **Pikro-Bordo-Färbung** 69
1. 1%ige Bordolösung $^1/_2$ Minute, Wasser.
2. Konzentrierte alkoholische Pikrinsäurelösung 1 Minute, Wasser, bis kein Pikringelb mehr abgeht.
3. Alkohol absol. + 3 Tropfen einer 3%igen Ammoniaklösung, welcher durch weitere Entfärbung zur Isolierung des Trichohyalins führt.
4. Alkohol, Öl, Balsam.

b) **Bordo — Hämateïn-Färbung des Mesoplastins neben Trichohyalin** . . . 69
1. 1%ige Bordolösung $^1/_2$ Minute, Wasser.
2. Hämateïn + Alaun-Lösung 15 Sekunden, Wasser.
3. Alkohol absol. + 3 Tropfen 3%iger Ammoniaklösung, 30 Sekunden.
4. Alkohol, Öl, Balsam.

c) **Bordo — Methylgrün-Färbung der Wurzelscheide neben Trichohyalin** . 70
1. $^1/_4$% Methylgrün 10 Sekunden, Wasser.
2. Ammoniakalische Bordolösung, $^1/_2$ Minute
$$\left\{\begin{array}{l} 4 \text{ Teile } 1\% \text{ Bordo} + \\ 2^1/_2 \text{ Teile } 3\% \ NH_3 \end{array}\right\}, \text{ Wasser.}$$
3. Zweite Färbung mit $^1/_4$% Methylgrün 30 Sekunden, Wasser.
4. Ammoniak-Alkohol
$$\left\{\begin{array}{l} \text{auf 1 Schälchen absol. Alkohol} \\ 3 \text{ Tropfen } 3\% \ NH_3 \end{array}\right\},$$
bis der Schnitt nur noch schwach rot ist.
5. Zweimal Alkohol absol. zur vollständigen Entwässerung, wobei der Schnitt noch rot bleibt.
6. Bergamotteöl, worin der Schnitt wieder ergrünt, Balsam.

d) **Bordo — Methylviolett-Färbung der Wurzelscheide neben Trichohyalin** . 71
1. 1%ige Methylviolettlösung 2 Minuten, Wasser.
2. 1%ige Bordolösung 1 Minute, Wasser.
3. Alkalischer Alkohol, Öl, Balsam.

e) **Bordo — Nilblau-Färbung der Wurzelscheide neben Trichohyalin** . . . 72
1. 1%ige wässerige Nilblaulösung 5 Minuten, Wasser.
2. 1%ige Bordolösung 1 Minute, Wasser.
3. Alkalischer Alkohol, Öl, Balsam.

Wurzelscheide.

a) **Neutralviolettfärbung der Wurzelscheide** 75
1. 1% Neutralviolett 2 Minuten, Wasser.
2. 1% HCl + Alkohol absol., 30 Sekunden.
3. Alkohol, Öl, Balsam.

b) **Neutralrot — Nilblau-Färbung der Wurzelscheide** 75
1. 1% Neutralrot 5 Minuten, Wasser.
2. 1% HCl-Alkohol absol. 30 Sekunden, Wasser.
3. 1% Nilblau $^1/_2$ Minute, Wasser.
4. Alkohol, Öl, Balsam.

c) **Safraninfärbung nach Verdauung mit Pepsin + HCl** 77

d) **Safraninfärbung nach Verdauung mit Trypsin + Soda** 78

Sauerstoff-Reagens I: Seite

Rongalitweiß (RW.) 81

Methylenblau	0·2
Rongalit	0·4
Salzsäure (25%ig)	4 Tropfen
Wasser	10·0

Die Mischung wird bis zur Entfärbung erwärmt. Trübt sie sich beim Erkalten, so wird sie filtriert.
(Nur für Gefrierschnitte.)

Färbung für Sauerstofforte und Säureorte: RW. — Safranin-Färbung . 88

1. Gefrierschnitte, 2 Minuten in RW.-Lösung,
2. In 3 Schalen ausgekochten Wassers abspülen.
3. Die Schnitte werden auf Objektträger aufgezogen und 4 Stunden bis eine Nacht der Luft exponiert, dann
4. $1^1/_2$ Minuten in Safranin O Grübler gefärbt.
5. Gründliche Abspülung in Wasser; Alkohol, in Zedernöl eingebettet.

Sauerstoff-Ferment:

Peroxydasefärbung 95

Benzidin + H_2O_2.
Schnitte aus dem Alkohol auf den Objektträger, 1 Minute lang.
Mit Benzidin betropfen,
dann H_2O_2 hinzu bis zur Blaufärbung, sodann in Alkohol absol., Öl, Balsam.

Sauerstoff-Reagens II:

Neutralviolett (NV.)-Methode für Sauerstofforte 101
(Nur für Gefrierschnitte.)

1. Stücke in Wasser von 80° C 2 Minuten eintauchen zur Gerinnung der flüssigen Eiweiße.
2. Stücke gefriergeschnitten.
3. Schnitte in $^1/_2$%igem NV., 10 Minuten.
4. Kurz abspülen in Wasser.
5. Entfärben und Entwässern in absolutem Alkohol.
6. Öl, Balsam.

Saure Kerne.

Hämateïn — Safranin — Tannin-Färbung 107

Hämateïn + Alaun $^1/_2$—1 Minute, Wasser.
Safranin 1%ig 20 Minuten, Wasser.
Tannin, konzentriert, 5 Minuten.
Tannin, konzentriert + 1 Tropfen alkoholischer konzentrierter Pikrinsäure $^1/_2$ Minute, Wasser.
Alkohol, Öl, Balsam.

Färbung Wep für das basische Eiweiß der sauren Kerne 108

Eosin — Methylgrün + Pyronin-Methode für saure Kerne 110

1%ige alkoholische Eosinlösung 2 Minuten, Wasser.
Pappenheim-Unna 20 Minuten, Wasser.
Alkohol, Öl, Balsam

Seite

Glykogen-Färbung 114, 115

(Alkohol-Paraffin- oder -Zelloidineinbettung.)

1. Entfernung des Zelloidins (Paraffins) durch Alkohol + Äther, absoluter Alkohol, Wasser.
2. Methylenblau (oder Viktoriablau), 1%ige Lösung in Spiritus dilutus, oder Nigrosin (oder Diamingrün), 1%ige wässerige Lösung, 1 Minute, in Wasser abspülen.
3. Bestsche ammoniakalische Karminlösung 1 Minute, in Wasser abspülen.
4. Alkohol, Öl, Balsam.

Färbung der Übergangsschichten der Verhornung.

Basale Hornschicht 116

Durch Fixierung in Flemmings Lösung, 12 Stunden.
Auswaschen in fließendem Wasser, 3 Stunden.
Alkohol-Paraffin-Einbettung.

Infrabasale Hornschicht 116

Durch Färbung mit Bests Karminlösung, 1 Stunde.
Spiritus dilutus.
Alkohol absol., Öl, Balsam.

Infrabasale Hornschicht und Körnerschicht 116

Durch Färbung mit Bests Karminlösung, 1 Stunde.
Spiritus dilutus und weitere Färbung mit 1%iger Nigrosinlösung, 10 Minuten.

Spiritus dilutus.
Alkohol, Öl, Balsam.

Kollagen.

1) **Unnas Vorschrift für die van Gieson-Färbung des Kollagens** 136

Säurefuchsin	0·25
Pikrinsäure	1·5
Salpetersäure	1·5
Wasser	ad 100

Die Pikrinsäure wird in heißem Wasser gelöst, hierin erst das Säurefuchsin aufgelöst und dann die Salpetersäure tropfenweise zugegeben. In der Mischung bleiben die Schnitte 5—10 Minuten, werden dann kurz in Wasser abgespült und durch Alkohol in Öl und Balsam gebracht.

2) **Blaues Polychrom — Säurefuchsin + Tannin-Methode** 137

1. Blaues Polychrom, 2—5 Minuten, um so länger, je dünner der Schnitt ist.
2. In Wasser gut abspülen.
3. ½%ige Säurefuchsin + 33%ige Tannin-Mischung.
4. Lange Abspülung in destilliertem Wasser (oder kurze in dem immer basischen Leitungswasser).
5. Absoluter Alkohol, Öl, Balsam.

Seite

3) **Safranin — Wasserblau + Tannin-Methode** 137

1. 1%ige wässerige Safraninlösung, 10 Minuten.
2. In Wasser gut abspülen.
3. Frisch bereitete 1% Wasserblau + 33% Tannin-Mischung (3 Tropfen einer 1%igen Wasserblaulösung auf 3 cm^3 einer 33%igen Tanninlösung), 10—15 Minuten.
4. Lange Abspülung in destilliertem Wasser.
5. Alkohol absol., Öl, Balsam.

4) **Orceïn — blaues Polychrom — Glyzerinäther-Methode** 140

1. 1%ige spirituöse Orceïnlösung ohne Säurezusatz, 15 Minuten.
2. In Alkohol, 96%ig, und in
3. Wasser kurz abspülen.
4. Blaues Polychrom, 2—5 Minuten.
5. In Wasser kurz abspülen.
6. Glyzerinäthermischung 1 + 4 Wasser, 1—2 Minuten.
7. In Wasser gut abspülen.
8. Alkohol absol., Öl, Balsam.

5) **Blaues Polychrom — Orceïn-Methode** 140

1. Blaues Polychrom, 5—10 Minuten.
2. In Wasser gut abspülen.
3. Schnitte auf dem Spatel mit Fließpapier etwas entwässern.
4. 1%ige spirituöse Orceïnlösung ohne Säurezusatz, 15—25 Minuten.
5. Alkohol absol. } Eventuell beides wiederholen, falls der Schnitt
6. Bergamottöl. } zu blau ist.

Elastin-Färbung 145

Orceïn	0·2
Salpetersäure	2·0
70% Alkohol ad	100·0

Die Schnitte verweilen in dieser Lösung 8—24 Stunden.
Abspülen in Wasser.
Alkohol, Öl, Balsam.

Man kann nachträglich eine beliebige Kern- und Plasmafärbung anbringen. Am besten das blaue Polychrom mit Glyzerinätherentfärbung.

Elacin-Färbung 147

(Alkohol-Paraffin- oder -Zelloidin-Schnitte.)

a) Blaues Polychrom 5 Minuten, Wasser.
Konzentrierte Tanninlösung 5 Minuten, Wasser.
Alkohol, Öl, Balsam.

Man kann der Tanninlösung zweckmäßigerweise auch Orange oder Säurefuchsin zusetzen.

Elacin gegen Kollagen:

b) Blaues Polychrom 5 Minuten, Wasser.
Konzentrierte Tanninlösung + 5 Tropfen einer 1%igen Orangelösung 5 Minuten, Wasser.
Alkohol, Öl, Balsam.

Seite
Elastin — Elacin — Kollagen: 148

c) Saure Orceïnlösung, eine Nacht.
Gründliche Entfärbung in 2%iger wässeriger Salzsäurelösung, hierauf direkt in Alkohol absol. zur weiteren Entfärbung, Wasser.
Blaues Polychrom, 5 Minuten.
In Wasser gründlich abspülen, bis keine blauen Farbwolken mehr abgehen.
Konzentrierte Tanninlösung, $^1/_2$ Stunde.
Gründliche Spülung in Wasser.
Alkohol, Öl, Balsam.

Sachverzeichnis.

(Die Hauptstellen sind fett gedruckt.)

Affinität 1, 3, 12, 20, 34, 38, 40, 55, 77, 90, 101, 111, 124, 127, 133
—, oxypolare **40**, **62**, **63**, 127, 134, 143, **144**.
—, Säure-Base- **40**, **62**, **63**, 134, 143, **144**.
Agonale Schwankung 90.
Akanthome 26.
Akne 117, 123.
Akridinrot + Pyronin 135.
Akroalbumose 10, 129.
Aktinomykose 27, 120, 121.
Alanin 142.
Albumin 10, 56, 104, 129.
Albumose 10, 59, 65, 104, 129, 138.
Amöben 25.
Amyloid 135.
Anilinblau 135.
Arginin 133, 142.
Azin **100**.
Azofarbstoffe 135, **138**.
Azokarmin 138.

Basale Hornschicht 62, 63, 64, 86, 114, 115.
Beethaar **53**, **84**, **86**, 116.
Beethaare und Papillenhaare 116.
Benzidin **94**.
Benzidin + H_2O_2 **94**, 99.
„Berge" und „Täler" in der Hornschicht 64.
Biegungselastizität 141.
Blastomykose 148.
Blaues Polychrom **5**, 11, 91, 139, **140**, 147.
Blaues Polychrom + Alaun **124**, 133.
Blaues Polychrom — Glyzerinäther 8, 140, 145.
Blaues Polychrom — Orzein 27, **140**, 148.
Blaues Polychrom — Säurefuchsin + Tannin 137.
Blaues Polychrom — Tannin 147, 148.
Blaues Polychrom — Tannin + Orange 147.
Blauschwarz 138.
Bordo **19**, 38, 50, 77.
Bordo — Hämatein + Alaun 1, **18**, **20**, 25, 34, 38, **69**.
Bordo — Methylgrün **70**.
Bordo — Methylviolett **71**.
Bordo — Nilblau **72**.
Bordo — Wasserblau 38.

Crabolfuchsin **33**.
Carbolgentianaviolett **33**, **49**.
Carcinom 123, 125, 126, 127, 134, 146, 148.
CH_3-Gruppe 7.
Cholesterin 65, **112**, 117.
Cholesterinester 65, 113, 117.
Cholesterinfett **112**.
Chondromukoid 85, 97/98.
Chromatin 23.
Chromolyse 2, 9, 11, 15, 24, 39, 53, 105, 127, **128**.
— des Granoplasmas **9**.
— von Zytose und Globulin **16**.
— der Mastkörner **127**.
Chromotrope 138.
Chrysarobin 7.
Cignolin 7.
Collagen s. Kollagen.
Condylome 18, 26, 29—32.
Cystin 59, 134.
Cytose 1, 10, 11, 15, **16**, 17, 20, 28, 35, **36**, 54, 57, 58, 59, **60**, 97, **119**.
— und Globulin 1, 15, **16**.
—, Globulin und Nukleoproteide **11**.
Cytose s. auch Granoplasma.

Dahlialösung 124, 126.
Dehydrierung s. Wasserstoffentziehung.
Deuteroalbumose 10.
Diaminblau 138.
Diamingrün 50, 114.
Dibasichrom 12, 14, 60.
Dimethylthionin **124**.
Diphenylamin 6.
Drüsen 88, 119.
S. auch Talgdrüsen, Knäueldrüsen.
„Dunkle Zone" 44—51.

Eisenzyan **51**.
Eiweiße, basische **18**, **36**, 65, **104**.
—, saure **5**, **24**, **34**, **36**, **104**, 125.
Eiweiß s. auch Albumose.
Ektoplasma 28.
Elacin **146**.
— und Elastin 144, 148.
— — und Kollagen 148.
— und Kollagen 147.
Elacinfärbung **147**.
Elastin 135, 136, 139, **140**.
— und Elacin 144, 148.
— — und Kollagen 148.
— und Kollagen **142**.
Elastinfärbung 143, **145**.
Elastizität 141.
Eleidin 52, 59, **61**, 116, 118, 138.
—, latentes **64**.
Elephantiasis 121.
Endoplasma 28.
Eosin 109, 135.
Eosin — Hämatein + Alaun **38**.
Eosin — Hämatoxylin 23, 35.
Eosin — Methylgrün + Pyronin 110, 111.
Eosin, Pikrokarmin 5.
Epithelfasern 28, **29**, 59, 135.
Epithelfaserfärbung **29**.
Eurhodin 75.

Farben, basische **5**, 125.
—, saure 1, **18**.
—, kernfärbende und plasmafärbende 1.
Färbeformeln 149.
Fermente 36.
S. auch Sauerstoffermente.
Ferrifuchsin 144.
Ferrifuchselin 144.
Fibrinfärbung 33, 135.
Fixation 2.
Flemmings Lösung — Nigrosin 63.
Formalinvorbehandlung 44.
Fraenkelfärbung 138, 139.
Fuchsin 33, 49, 56, 142, 143.

Ganglienzellen 88, 122.
S. auch Nerven.
Gänsehaut 141.
Gentianaviolett 33, 49, 56, 143.
Globulin 10, 15, **16**, 20, 22, 25, 35, **36**, 54, **57**, **60**, 86, 90, 106, 122.
— und Zytose 1, 11, **16**.
Globulin- und Zytosefärbung des Keratohyalins **60**.
Globulinmetamorphose der Kerne 107, 111.
Glutaminsäure 142.
Glyzerinäther **8**.
Glyzerinfett 113.
Glyzerinpassage bei der MM.-Färbung 44.
Glykogen 52, 59, **113**, 118.
Glykogenfärbung **114**, **115**.
Glykokoll 142.
Granolyse 119, 120.
Granoplasma 1, **5**, 15, 21, 26, 28, 37, 57, 86, 88, **120**, 133, 134, 137.
— s. auch Cytose.
— und Mastzellenkörner **132**.

Haar **44**, 53, **66**, **81**, 97, 101, 116, 118, 125, 141.
S. auch Tasthaare.
Haarbeet 84, 116.
S. auch Beethaar.
Haarfasern 49.
Haarschaft 44.
Haarzellen 50.
Hämatein + Alaun 59, **60**.
Hämatein Böhmer 54.
Hämatein — Safranin — Tannin 107, 108.
Hämatoxylin + Eosin 23, 35.
Haftfasern 31.
Hansenfärbung 136.
Hauptzellen des Magens 36, 86, 97.
Hautfette **112**.
Hemigruppe 59.
Herpes 28.
Histon 65.
Homogene Schwellung 123.
Hornalbumosen 65.
Hornschicht, basale, s. Basale Hornschicht.
— infrabasale, s. Infrabasale Hornschicht.
—, Eigenfett **113**.
—, Haar und Nagel 97.
Hornschichtfett **112**, 118.
Hyalin 53, 135, 137.
Hyperoxydase s. Peroxydase.

Indigoblau 135, **138**.
Indigokarmin 135, **138**.
Indulin 135, **138**.
Infrabasale Hornschicht 55, 64, 113, 114, 115, 116.
Initialsklerose 121.
Insekten 25.
Isocholesterin 117, 118.

Jod 124.
Jodgummi 115.

Kalipermanganat **39**, **82**, **84**, 99, 102, **104**, 134, 143.
— gegen Rongalitweiß **82**, **104**.
Karmin 55, 61, 62, 115, 118.
Katalase 35, 36, **91**, 95.
Katalysator 90.

Keratin 52, 63, 134, 135.
— und Kollagen 134.
Keratohyalin 52, **53**, 68, 114, 118, 135.
Keratohyalin und Trichohyalin **68**, 105.
Keratosen 138.
Kerne 1, 10, **18**, **23**, 25, 26, 35, **37**, 38, 40, **43**, 49, 54—60, 68, **81**, 88, 95—97, 99, 101, **104**, **106**, **119**, 135.
— der Drüsenzellen 88.
— der Ganglienzellen 86, 88.
— der Knorpelzellen 85, 88.
— der Mastzellen 132.
— der Plasmazellen 88, 119, 122.
—, saure 33, **106**.
— — und normale **108—111**.
— — und Kernkörperchen 107.
Kerngrundlage s. Plastin.
Kerngrundsubstanz 21, 37, 108—111.
Kernkörperchen 1, 11, 15, **23**, 26, 28, 33, 35, 57, 59, 86, 97, **106**, **119**.
— und saure Kerne 106.
Kernkörperchenprobe 58.
Kernkörperchenmembran **38**.
Kernmembranen **38**.
Kernsaft **21**, 108.
Knäueldrüsen **43**, **44**, 81, 116, 119, 125.
Knäuledrüsenfett **44**, **117**, 119.
Knötchen Ranvier 30, 31.
Knorpel 36, **85**, 90, 98, **101**, 125, 126, 133.
Körnerschicht **53**, 115.
Kollagen 8, 40, 55, 119, 125, **133**, 139, 144, **147**.
— und Elazin 147.
— — und Elastin 148.
— und Elastin **142**.
— und Keratin 134.
—, basophiles 126, 133.
—, metabasophiles 126, 134.
Kollagenentfärbung 8.
Kongofarben 138.

Lebendfärbung 2, 91.
Lecithin 11.
Leprome 112.
Leuzin 142.
Leukomethylenblau 6, 79.
Lichen acuminatus 56.
Lipoide 11, 59, 129.
Lupus 5, 121.
— verrucosus 148.
Lymphozyten 121.
Lysin 133, **142**.

Magen, Hauptzellen 86, 97.
Malachitgrün 12.
Mangan — Methylgrün (MM.) 42, **43**.
— — nach Formalin 46.
— — nach Osmiumsäure 46.
Mastzellen 43, **81**, 84, **85**, **89**, 95, 99, 101, **124**.
Mastzellenhöfe 126.
Mastzellenkörner 35, **84**, 90, 96, **125**, **128**, 139.
— und Granoplasma **132**.
Mesoplastin 1, **20**, **22**, **23**, 25, 26, 34, **36**, 52, 53, 54, 59, **60**, 97, **106**.
Mesoplastinfärbung des Keratohyalins **60**.
— gegen Trichohyalin 71.
Metabasophiles Kollagen 126, 134.
Metachromasie **124**.
Methylenblau **5**, 56, 79, **82**, **89**, **100**, 114, **124**.
— gegen Rongalitweiß **82**, 89.
Methylenviolett 5, 7.
Methylenweiß 6, **79**.
Methylgrün **11**.
Methylgrün + Pyronin + Karbol 1, **13**, 23, 38, 39, 56, **60**, 91, 99, **119**.
Methylgruppe **7**.
Methylviolett 12, 71.
Methylviolett — Bordo **71**.
Miliaria 125.
Mitosen 84, 97, 112, 133.
Mucin 125, 129, 133.
Müllersche Flüssigkeit 144.
Muskeln **85**, **101**, 135, 141, 142.
Myosin 104.
Myxödem 148.

Nagel 53, 84, 97.
Naphthalin 19.
Naphthol 19.
Naphtholdisulfosäure 19.
Naphtholschwarz 138.
Naphtylamin 19.
Narben 148.
Nebenprodukte der Verhornung **53**, 67.
Neosalvarsan 88, **89**.
Nervenfärbung **43**, 88, 101.
Neublau **100**.
Neutralrot **100**.
Neutralrot — Nilblau **75**.
Neutralviolett (NV.) 2, 48, **49**, **75**, **98**.
Nigrosin 50, **55**, **61**, **114**, **116**, **118**.
Nigrosine 135, **138**.
Nilblau — Bordo **72**.
Nisslkörper 88, 122.
S. auch Granoplasma und Cytose.
Nitrochrysophan s. Tetranitrochrysophansäure.
Nukleinsäure 90, 122.
Nukleoproteide 1, 10, **11**, 13, 18, **24**, 25, 28, **36**, **37**, 39, 52, 56, 58, 60, 86, 106, **119**, 133, 134, 137.
— gegen Trichohyalin **70**.

Ölsäure 52, 59, **113**.
Ohrenschmalz 118.
Orange 138, 146.
Orzein **139**, **144**, **145**, **146**, **148**.
Orzein — blaues Polychrom — Glyzeriniäther 140.
Orzein + Salpetersäure 145.
Orzein — Salzsäure — blaues Polychrom — Tannin 148.
Orzin 145.
Osmiumdampf 118.
Osmiumsäure **44**, **46**, **63**, **113**, 143.
Oxazin 75, **100**.
Oxycholesterin 117, 118.
Oxygenase 96, 97.
Oxypolare Affinität s. Affinität, oxypolare.
Oxypyrrolidinkarbonsäure 142.

Papillenhaar 53, **73**, **77**, 83, **87**, 116.
Papillenhaare und Beethaare 116.
Pappenheim-Unna-Färbung s. Methylgrün + Pyronin + Karbol.
Pararosanilin 7.
Peptone 10, 129.
Peroxyde **92**, **94**.
Peroxydase 35, 36, 91, 93, **94**, 99, 126, 127.
Phagozytose 123.
Phenylalanin 142.
Physikalisches bei Färbungen 3.
Pikrinsäure 134.
Pikro — Blauschwarz 138.
Pikrobordo **69**.
Pikrokarmin 50, 61, 62, 68, 69, 134.
Pikro — Naphtholschwarz 138.
Pikronigrosin 50, 61, **63**, **64**, 138.
— nach Salzsäurebehandlung **65**.
Pikrosäurefuchsin 134.
Plasmazellen 5, 26, 88, 97, **119**, 124, 131, 137, 146.
Plastin 1, **20**, **23**, 34, **36**, **37**, 52, 59, 97, **108**, 135.
Polychrom, blaues, s. Blaues Polychrom.
Ponceau 138.
Prolin 142.
Protoplasma 1, 5, 7, **25**, 50, 96, **101**.
Protozoen 25.

„**R**adkern“ 119.
Reduktionsfärbung **40**, 142.
Reduktionsorte 2, **36**, **39**, **82**, 91.
Resorcin 13, 144.
Retikuläre Degeneration 28.
Rhinophym 26, 27.
Riesenzellen 123, 146.
Rongalit 13, 79, **80**, 90.
Rongalitweiß (RW.) 2, 7, 36, 58 **79**, **80**, 98, 122, 125.
— gegen Kalipermanganat **82**.
— gegen Methylenblau **82**, **89**.
Rongalitweiß — Safranin **88**.
Rosaniline 7, **135**, 138.
„Roter Mantel“ 68.

Säure-Basen-Affinität s. Affinität, Säure-Base-.
Säurefuchsin **50**, 134, **135**.
— + Pikrinsäure **136**.
Säurekreis **103**.
Säureorte **82**, **89**, **101**, 103.
— gegen Sauerstofforte **82**, **89**, **97**, **101**, **103**, **104**.
Safranin 56, 124, 137, 142, 143.
Safranin und Rongalitweiß **88**.
Safranin nach Pepsin + HCl **77**, **78**.
Safranin nach Trypsin + Soda **78**.
Sauerstoff 2, 25, 28, 51, 58, 125, 134, 136, 138, 145.
—, aktiver 35, 79, 90, 92, **94**, 112, 122, **126**, 132.
—, molekularer 90, **92**, 96, **126**.
Sauerstoffermente 35, 36, **91**.
Sauerstoffkreis **103**.
Sauerstofforte 2, 7, 25, 28, 35, **36**, **39**, **79**, 103, **98**.
— gegen Säureorte **82**, **89**, **101**.
—, primäre 90, 95, 98.
—, sekundäre 90, 98, 122, 123.
Sauerstoffspeicher 90, 98, 112, 123, 132.
Sauerstoffspender 90, 112, **126**, 132.
Sauerstoffstrom 35, 80, 88, 93, 96, 132.
Saure Kerne s. Kerne, saure.
Scharlach (Farbe) 113.
Schaumzellen **27**.
Schleim s. Mucin.
„Schwarzer Rahmen“ **113**, **114**, **116**.
Seborrhoea oleosa 117.
Sekretfette 118.
Senile Degeneration der Gesichtshaut 146, 148.
Spiralen Herxheimer 31, 32.
Spirochaeta pallida 123.
Spongioplasma 5, 21, 24, **25**, 35, 44, 52, 54, 59, 119, 121, 133, 134, 137, 146.
Stockwerktheorie **34**.
Striae gravidarum 148.
Subcutisfett 118.
Sudan 113.
Superbasale Hornschicht 61.
Syphilom 123.

Talgdrüsen **26**, **44**, **45**, **63**, 84, **117**.
Talgdrüsenfett **117**.
Tasthaare **42**, **83**, **87**, 102.
Tastkörperchen 43.
Tetramethylthionin 7, **124**.
Tetranitrochrysophansäure **51**.

Thiazine **7**, **100**.
Thiazinrot 5, **125**.
Thiodiphenylamin 6.
Thionin 6.
Toluidinblau 5, 7, 56, 58.
Torsionselastizität 141.
Trichohyalin 52, **66**, 101.
Trichophytie 123.
Trimethylthionin 7.
Trypsin + Soda **78**, 105.
Tryptophan 134.
Tuberkelbazillen 123.
Tyrosin 134, **142**.

Ulcus molle 121.
Urticaria pigmentosa 125.

Variola 28.
Vernix caseosa **63**.
— —, Fett **118**.
Verwandtschaft s. Affinität.
Viktoriablau 114, 115.
Viktoriablau — Karmin 115.
Violett Lauth 6.

Wasserblau 135.
Wasserblau + Eosin + Phloxin (Wep) 38, 109.
Wasserblau + Orzein + Eosin — Karbolfuchsin 33.
Wasserblau + Orzein + Eosin — Karbolgentianaviolett 33.
Wasserblau + Orzein + Eosin — Safranin **29**.
Wasserstoffentziehung 51, **79**, **86**.
Wasserstoffsuperoxyd zur Sichtbarmachung der Katalase 93, 94.
Weigertfärbung 143.
Wep s. Wasserblau + Eosin + Phloxin.
Wollfett der Schafe 117, 118.
Würmer 25.
Wurzelscheide 40, 43, **66**, **82**, **89**, **101**, **104**.

Zellenfette 118.
„Zone, dunkle“ **44—51**.
Zystin s. Cystin.
Zytose s. Cytose.

Namenverzeichnis.

Abderhalden 2.
Auffhammer 53.
Austerlitz 146.

Bach 92, 96.
Baudisch 5.
Best 55, 62, 114, 115, 116.
Bisiadecki 68.
Böhmer 54.
v. Brunn 45, 69.
Brunner 116.
Bütschli 27.

Cassella 100.
Chodat 96.
Ciliano 63.
Cohnheim 142.
Curtis 138.

Deuticke 21.

v. **E**bner 66, 67.
Ehrlich 1, 40, 115, 124, 126, 129, 131.
Engler 92.

Ferria 143.
Fezer 43.
Fischer 143, 144.
—, Emil 91.
Flemming 63.
Fraenkel, Eugen 138.
Freeborn 138.

van **G**ieson 5, 134, 136.
Gilchrist 148.
Golodetz 15, 65, 95, 100, 112, 113, 117, 118.
Grübler 88, 153.

Hansen 136.
Heidenhain 138.
Henle 48, 66, 67, 68, 69, 72, 73, 75, 76.
Hertwig, Richard 21.
Herxheimer 33, 57.
Hollborn 8, 106.
Hueter 135.
Huxley 67, 68, 69, 72, 73, 75, 76.

Jadassohn 124.
Joannovicz 123.

Kehrmann 124.
Key 28.
Kreibich 57.
Koch 10.
Kölliker 66.
Kromayer 31.
Krzysztalowicz 143, 144, 146.
Kühne 10, 59.

Langer 141.
Langerhans 53.
Lauth 6.
Liebermann 113.
Liebreich 64, 118.
Lorberbaum 64, 65.
Lustgarten 143.

Mall 135.
Mallory 135, 136.
Manchot 142.
Martinotti 143.
Maximow 123.
Mayer, Paul 114.
Mc. Gill 135.
Merkel 138.
Mibelli 142.
Michaelis 143, 144.
Minervini 144.
Moleschott 113.
Mraček 45.
Müller 144.

Nathan 57.

Pappenheim 1, 13, 14, 15, 17, 18, 56, 99, 119, 120, 143, 144, 145.
Pasini 135.
Pirone 123.

Rabl, Hans 45, 47.
Ranvier 30, 31, 61, 69, 113, 134.

Raudnitz 129.
v. Recklinghausen 53.
Reichert 66.
Reinke 20, 45.
Retzius 28.
Romeis 135.

Schaffer 123, 138.
Schenk 146.
Schmorl 138.
Schneider 144.
Schönbein 92.
Schütz 143.
Schwenter 130, 131.

Taddei 140, 144, 145.
Taenzer 139, 142, 143, 144, 145.
Tomsa 141.
Traina 135, 138.
Triepel 141.

Unna, P. G. 1, 2, 5, 8, 15, 17, 18, 43, 44, 53, 56—58, 65, 67, 68, 95, 99, 100, 110, 117—121, 130, 133, 139, 141, 143, 144—146, 148.
Unna, Paul, jun. 95.

Virchov 141.
Vörner 43, 68.

Waldeyer 49.
Weigert 33, 53, 143, 144, 146.
Wile 61.
Wolley 135.

Zacharias 20.
Ziemssen 68.

