Aus dem Anatomischen Institut zu Greifswald.

Die Bedeutung von sauren Kolloiden und Lipoiden für die vitale Farbstoffbindung in den Zellen.

Von

Wilhelm von Moellendorff.

(Abgeschlossen Oktober 1916.)

Inhalt:

	Seite
1. Einleitung	503
2. Über die Granulafärbung entscheidet die Fällungskraft nicht allein .	505
a) Der Einfluss der Farbstoffkonstitution auf die Granulafärbung	505
b) Direkte Messung der Fällungskraft basischer gegenüber sauren Farbstoffen	508
3. Die Diffusfärbung der Grundmasse des Protoplasmas in supravitalen Versuchen	510
a) Die Tatsachen	510
b) Der Grad der Diffusfärbung ist von der Dispersität der Farb- stoffe nicht abhängig; das Problem der Zellpermeabilität . . .	515
c) Die Diffusfärbung ist von den Zellipoiden abhängig	521
4. Die Lipoidlöslichkeit verschlechtert die Elektivität der Granulafärbung durch basische Farbstoffe	533
5. Zusammenfassung und Zusätze	539
6. Literaturverzeichnis	541

I. Einleitung.

In der vorangehenden Arbeit in dieser Zeitschrift habe ich zu begründen versucht, dass die vitale und supravitale Färbung mit basischen Farbstoffen als Reaktion des basischen Farbstoffes mit sauren, granulär in den Zellen abgelagerten Substanzen aufzufassen sei. Die Gründe, die ich in der erwähnten Mitteilung anführte, waren morphologischer und experimenteller Art. Morphologisch verläuft der Vorgang der Granulafärbung unter Fällungserscheinungen, die besonders gut an den grossen Granulis embryonaler Amphibienzellen beobachtet werden können, aber auch z. B. an den Granulis von Zellen der Mäuseniere deutlich werden. Es

konnte ferner gezeigt werden, dass die Anfärbung saurer Farbstoffgranula unter den gleichen Erscheinungen abläuft, wie die der zelleigenen Granula, dass somit die sauren Farbstoffgranula geradezu als analoge Bildungen mit den basisch färbbaren Zellgranulis aufzufassen sind. Es wurde daraus geschlossen, dass zum Zustandekommen der basischen Granulafärbung besondere vitale Eigenschaften der Granula nicht erforderlich sind, dass vielmehr nur das Vorhandensein eines sauren reaktionsfähigen Körpers in den Granulis Voraussetzung für die Vereinigung mit dem basischen Farbstoff ist. In einem Falle ist dieser Körper (als saurer experimentell eingelagerter Farbstoff) bekannt, seine Beziehungen zu dem zur Färbung gewählten basischen Farbstoff also *in vitro* erforschbar; die Eigenschaften der zelleigenen Granula dagegen lassen sich aus der gleichartigen Reaktionsweise auf denselben basischen Farbstoff bis zu einem gewissen Grade erschliessen. Die vitale Ablagerung saurer Farbstoffe in den Zellen ist daher geeignet, ein sehr brauchbares Mittel zur Erforschung der Zellgranula zu werden.

Zweifellos ist die Parallele zwischen der Färbbarkeit der Zellgranula und der künstlich in den Zellen abgelagerten sauren Farbstoffe überraschend vollkommen; das lehrt die in der erwähnten Mitteilung auf Seite 489 abgedruckte Tabelle. Es war damit die Möglichkeit gegeben, die Art der Reaktionsweise der basischen Farbstoffe mit den Zellgranulis näher zu erforschen.

Eine kurze Überlegung und die Betrachtung der bereits bekannten Tatsachen über die Wirkungsweise der Farbstoffe zeigt, dass abgesehen von den Eigenschaften der beiden miteinander reagierenden Substanzen (basischer Farbstoff und saurer Farbstoff, resp. saure Granulasubstanz) noch mindestens ein besonderer Faktor zum Zustandekommen der vitalen Granulafärbung notwendig ist. Denn eine der eigenartigsten Seiten dieses Vorganges ist es ja, dass unter einer grossen Zahl bisher versuchter Farbstoffe sich nur relativ wenige als geeignet herausgestellt haben. Ehe also nicht gefunden ist, wovon die Reaktionsweise der basischen Farbstoffe mit den Zellgranulis in so vielen Fällen ungünstig beeinflusst wird, kann die bisher hauptsächlich morphologisch erschlossene Ansicht von der Bedeutung kolloidchemischer Reaktionen bei dem Zustandekommen der vitalen Granulafärbung nicht als bewiesen gelten.

Es ist also die schon vielfach aufgeworfene, bislang aber nicht befriedigend gelöste Frage, welchen Eigenschaften unsere guten vitalen Granulafarbstoffe diese ihre Eignung verdanken, die ich durch meine Versuche einer Lösung näher zu bringen hoffe.

II. Über die Granulafärbung entscheidet die Fällungskraft nicht allein.

a) Der Einfluss der Farbstoffkonstitution auf die Granulafärbung.

Nachstehend sind die von mir verwandten basischen Farbstoffe mit den Molekulargewichten aufgeführt, die nach den Angaben in den Farbstofftabellen von Schulz und Julius berechnet wurden.

Triphenylmethanfarbstoffe

Diamantfuchsin kl. Krist. (Bayer)	ca. 409
Rosanilin Base (Kalle & Co.)	ca. 344
Auramin konz. (Höchst. Farbw.)	303
Methylviolett 5 B (Bayer)	392
Kristallviolett 6B Pulver (Akt.-Ges. f. Anil.-Fabr.)	407
Malachitgrün Krist. chem. rein (Höchst. Farbw.)	363

Xanthonfarbstoffe

Irisamin G extra (Bad. Anil.-Fabr.)	541
Acridinrot 3 B (Leonhardt)	274
Rhodamin S extra (Bad. Anil.-Fabr.)	374
„ G extra (Kahlbaum)	407
„ B („)	478
„ B extra (Bad. Anil.-Fabr.)	478
„ 3B extra („)	506
„ O (Höchst. Farbw.)	478

Azine

Indazin M (Cassella & Co.)	493
Neutralrot (Gruebler)	287
Safranin G extra (Bad. Anil.-Fabr.)	ca. 357
Basler Blau R (Durand & Huguenin)	432
Basler Blau BB (Durand & Huguenin)	404

Azofarbstoffe

Bismarckbraun (Gruebler)	334
Vesuvium 4BG (Höchst. Farbw.)	227
Chrysoidin R (Durand & Huguenin)	248

Oxazine

Nilblausulfat (Gruebler)	349
Nilblauschlorhydrat (Gruebler)	437
Capriblau GON (Bayer)	317

Thiazine

Toluidinblau (Gruebler)	306
Methylengrün extra gelbl. O (Höchst Farbwerk)	409
Methylenblau BB (Bayer)	393
Methylenblau rectific. (Gruebler)	393
Methylenblau BX (Gruebler)	393

Diphenylnaphthylmethanfarbstoffe

Viktoriablau B (Bad. Anil. Fabr.)	505
" R (")	447
" 4RS (")	519

Den hier genannten Firmen bin ich für die freundliche Überlassung von Proben dieser sowie vieler anderer Farbstoffe den grössten Dank schuldig.

Die Untersuchung der Konstitution der genannten Farbstoffe führte zu keinem befriedigenden Ergebnis; ich konnte im wesentlichen die Angaben von Fischel bestätigen. Besonders ergibt sich die Verstärkung der granulafärbenden Eigenschaften durch Substitution des Wasserstoffrestes in der Ammoniakgruppe durch Alkoholradikale; unter den Triphenylmethanfarbstoffen liegen die Verhältnisse folgendermassen:

Farbstoff	auxochrome Gruppen	Art der Färbung
Diamantfuchsin	3 NH_2 -Gruppen	Keine bis schlechte Granulafärbung
Rosanilin Base	"	
Auramin konz.	1 HN_2 , 2 N $(\text{CH}_3)_2$	
Methylviolett	1 NH $(\text{CH}_3)_2$, 2 N $(\text{CH}_3)_2$	mässiger Granulafärber gute Granulafärber
Kristallviolett	3 N $(\text{CH}_3)_2$	
Malachitgrün	2 N $(\text{CH}_3)_2$	

Ebenso ist wohl in der Reihe der Thiazine die Verbesserung der Granulafärbung mit zunehmender Substitution aufzufassen. Thionin (mit 2 NH_2) färbt schlecht, Toluidinblau (NHCH_3 , N $(\text{CH}_3)_2$) und Methylenblau, Methylengrün (2 N $(\text{CH}_3)_2$) sind gute Granulafärber.

Die Wirkung der auxochromen Gruppen darf aber nicht verallgemeinert werden. Zahlreiche Farbstoffe, die eine gute Substitution ihrer Ammoniakgruppen zeigen, sind trotzdem nur schlechte Granulafärber. Hierher gehören z. B. sämtliche Rhodamine. Die Feststellung von Fischel, dass die Substitution eines H durch einen Anilinrest das Färbevermögen aufhebe, könnte vielleicht für Basler Blau R und BB zur Erklärung ihrer schlechten

Farbeergebnisse herangezogen werden; doch lässt vor allem die schlechte Wasserlöslichkeit die Färbung dieser Stoffe schwer beurteilen. Andererseits ist Indazin M ein Granulafarber, trotzdem es ein Gemenge aus

darstellt, ebenso wissen wir ja aus den Untersuchungen von Michaelis, Laguesse u. a., dass Janusgrün trotz der safraninartigen Konstitution als Granulafärber zu betrachten ist. Endlich sei darauf hingewiesen, dass Viktoriablau, wie schon Hoeber zeigte, Granula zu färben imstande ist. Viktoriablau B besitzt ebenfalls, wie auch Fischel hervorhebt, ein durch den Anilinrest substituiertes Ammoniakradikal. Damit muss man wohl die von Fischel an seinem Material erhobene Feststellung, dass die Substitution durch den Anilinrest das Färbevermögen verhindert, fallen lassen.

Weiter ist hervorzuheben, dass auch Farbstoffe, die nur einfache NH_2 -Gruppen enthalten, als Granulafarbstoffe zu bezeichnen sind; so besonders die Azofarbstoffe Chrysoidin R mit 2, Vesuvlin 4 BG mit 3 und Bismarckbraun mit 4 NH_2 -Gruppen.

Aus diesen Betrachtungen geht nur soviel hervor, dass bei gewissen Farbstoffgruppen, die in ihrem Molekül den gleichen Grundstock besitzen, das Hinzutreten bestimmter auxochromer Gruppen, so besonders der wachsenden Substitution der Ammoniakreste durch Alkoholradikale, die Tendenz zur Granulafärbung in bestimmter Weise beeinflusst. Darüber hinaus spielen aber andere, noch nicht zu übersehende Einflüsse der Konstitution des Farbstoffmoleküls eine Rolle. Sie zu übersehen, muss immer noch künftiger Forschung vorbehalten bleiben. Vor allem erscheint es notwendig, Versuchsreihen, wie die hier mitgeteilten, mit reinen Farbstoffen anzustellen, da ja sicherlich die vielfachen Zusätze und Verunreinigungen der hier ausschliesslich verwandten technischen Farbstoffe für die Beurteilung sehr störend sein müssen.

b) Direkte Messung der Fällungskraft basischer gegenüber sauren Farbstoffen.

Da also durch die Betrachtung der Strukturformeln ein Zusammenhang zwischen einer Struktureigenart und dem Vermögen der Farbstoffe, mit den Granulis zu reagieren, nicht erkannt werden konnte, wählte ich den direkteren Weg, indem ich die Reagierfähigkeit der basischen Farbstoffe mit den verschiedenen zu den Versuchen verwandten sauren Farbstoffen im Reagenzglas prüfte.

Alle sauren Farbstoffe lassen sich in vitro durch basische Farbstoffe fällen; bei der Bildung der Neutralfarbe tritt eine messbare Wärmeentwicklung auf (Seyewetz). Im allgemeinen reagieren die basischen Farbstoffe mit sauren im Mengenverhältnis 3:1, 2:1 oder 1:1 (Vaubel und Bartlet). Ich habe allerdings bei meinen zahlreichen Versuchen auch ganz andere Mengenverhältnisse angetroffen.

So reagiert Trypanblau mit 9 Molekülen Akridinrot 3B, mit 15 Mol. Rhodamin O.

Vaubel und Bartlet fanden, dass die Zahl der Sulfosäuregruppen in sauren Farbstoffen eine gewisse Bedeutung für die Reaktion mit basischen Farbstoffen besitzt. Ist nur eine Sulfogruppe vorhanden, so fixiert sich nur ein Methylenblaumolekül, bei Anwesenheit mehrerer Sulfogruppen zwei.

„Aus der Gesamtheit dieser Tatsachen ist zu schliessen, dass die sauren Farbstoffe sich mit den basischen verbinden, indem sie Salze bilden, die übrigens wenig beständig und leicht spaltbar sind.“ (Pelet-Jolivet, Theorie des Färbeprozesses Seite 43, dessen Darstellung ich auch sonst hier folge.)

Auf die Ausfällung des Reaktionsproduktes ist der Kolloidzustand der miteinander reagierenden Farbstoffe von bedeutendem Einflusse (Teague und Buxton, 1907).

Ich habe nach der Methodik von Pelet-Jolivet eine grosse Anzahl von Farbstoffpaaren untersucht.

Zu den Versuchen wurden $\frac{1}{100}$ Normallösungen der Farbstoffe verwandt; von der Lösung des basischen Farbstoffes wurde zu der des sauren vorsichtig so lange hinzugemischt, bis eine möglichst vollständige Ausfällung des Neutralproduktes erreicht war. Bei manchen Farbstoffkombinationen wurde ein scharfer Neutralpunkt nicht erreicht, besonders, wenn der basische Farbstoff sehr diffusibel war. Zur Kontrolle wurde jeweils ein Tropfen der Mischung auf Fliesspapier aufgetropft; der Überschuss eines der beiden Farb-

stoffe kommt dann durch Ringbildung der betreffenden Farbe um den durch das Fällungsprodukt gebildeten Fleck herum zum Ausdruck. Hält, wie es z. B. beim Überschuss eines hochkolloidalen Farbstoffes die Regel ist, der Überschuss dieses Farbstoffes einen Teil des Fällungsproduktes in Lösung, so entstehen häufig drei Zonen: in der Mitte das ausgefallene Produkt, das gelöste Fällungsprodukt als Ring in der Mischfarbe und aussen die reine Farbe des im Überschuss befindlichen Farbstoffes.

Für Trypanblau erhielt ich auf diese Weise folgende Ergebnisse:

- 1 Mol Trypanblau wird gefällt durch
 - 1 Mol von Neutralrot, Diamantfuchsin, Chrysoidin, Malachitgrün, Toluidinblau,
 - 2 Mol von Auramin, Rhodamin S extra, Safranin B extra, Methylviolett,
 - 3 Mol von Bismarckbraun, Kristallviolett, Methylengrün, Rhodamin B extra.

Schon dieses eine Beispiel zeigt, dass die Erwartung, dass etwa die Fällungskraft der basischen Farbstoffe die Erklärung für ihre verschiedenartige Eignung zu einer Anfärbung saurer Substanzen im biologischen Versuche abgeben könnte, nicht zutrifft. Man hätte ja denken können, dass Farbstoffe, bei denen schon 1 Mol genügt, um eine entsprechende Menge sauren Farbstoffes auszufällen, bessere Granulafärber sein müssten, als solche basische Farbstoffe, von denen hierzu 2 oder 3 Mol notwendig sind. Dagegen lehrt der Vergleich der obigen Zahlen mit dem Ergebnis der supravitalen Färbungsversuche, dass in allen drei Gruppen sowohl gute als auffallend schlechte Granulafärber enthalten sind.

Gute Granulafärber sind: Neutralrot, Malachitgrün, Toluidinblau, Auramin, Methylviolett, Bismarckbraun, Kristallviolett, Methylengrün, ganz schlecht färben dagegen Granula: Diamantfuchsin, Rhodamin S extra, Safranin B extra, Rhodamin B extra

Es war daher von vornherein klar, dass zur Erklärung der verschiedenartigen Ergebnisse der biologischen Versuche bei den einzelnen basischen Farbstoffen noch andere Gesichtspunkte angewandt werden mussten. Ich will hier nur darauf hinweisen, dass auch für andere saure Farbstoffe ihre Fällbarkeit durch basische Farbstoffe untersucht wurde, mit dem gleichen Ergebnis, dass Fällbarkeit im Reagenzglas und im biologischen Versuche nicht miteinander übereinstimmten.

3. Die Diffusfärbung der Grundmasse des Protoplasmas in supravitalen Versuchen.

a) Die Tatsachen.

Trotzdem also die morphologische Betrachtung der granulären Färbung in ihrem Zustandekommen und die Möglichkeit, dieselben Färbungseffekte mit basischen Farbstoffen auch dann zu erzielen, wenn saure Farbstoffe den wesentlichen Bestandteil des Granulums bilden, trotzdem also diese Tatsachen durchaus für das reaktive Zustandekommen der basischen Granulafärbung sprachen, erweist sich die rein chemische Beurteilung der Frage nach der Elektivität gewisser Farbstoffe, nach deren Ursachen als völlig unzureichend.

Sollte trotzdem an der Deutung der Granulafärbung als eines Reaktionsvorganges festgehalten werden, so musste nach den Gründen geforscht werden, die für die Behinderung eines an sich gut reaktionsfähigen basischen Farbstoffes, die Granula zu färben, verantwortlich sein können.

Wo diese Gründe zu suchen seien, war nur auf dem Wege des Experiments zu ergründen. Es war naheliegend anzunehmen, dass vor allem andere Teile der Zelle einen solchen hindernden Einfluss auf bestimmte Farbstoffe auszuüben imstande sind. Diese Annahme war um so naheliegender, als ein Einfluss und eine rege Anteilnahme des lebenden und überlebenden Protoplasmas an dem Vorgang der vitalen Granulafärbung für bestimmte Fälle sogar schon einigermassen analysiert ist. Ich erinnere hier an die schon lange zurückliegenden Beobachtungen über die Färbbarkeit (phagozytierter Massen) Br. Hofer 1891, A. Plato 1900); hier ergab sich, dass Infusorien, Bakterien und andere phagozytable Massen, die im freien Zustande nur schlecht oder garnicht färbbar waren, nach der Aufnahme in den Protoplasmaleib von Protozoen oder Leukozyten intensiv durch basische Farbstoffe gefärbt werden konnten. Plato konnte sogar zeigen, dass eine solche Färbung nur im Endoplasma eintritt, während Gonokokken im Exoplasma die Farbe wieder abgaben. E. Nirenstein konnte nachweisen, dass die Färbung der Nahrungsmassen von der Produktion von Säure seitens des Protoplasmas abhängig ist.

Wie sich in diesen Fällen ein Einfluss der Protoplasmatätigkeit auf die vitale Färbbarkeit beobachten lässt, so sind die Einflüsse des lebenden Protoplasmas zum Teil sicher in ihrer Trag-

weite noch gar nicht zu übersehen. Ich will hier nur an die Möglichkeit erinnern, dass das Protoplasma eine reduzierende oder oxydierende Wirkung auf Farbstoffe ausüben kann.

Wenig beachtet ist dagegen bisher die Tatsache, dass eine ganze Reihe von Farbstoffen, denen offenbar die Fähigkeit, Granula zu färben, abgeht, trotzdem eine Färbung in den Zellen hervorbringen, die anscheinend diffus den ganzen Zelleib durchtränkt, ohne dass einzelne Gebilde stärker gefärbt würden.

Dass wir es hier mit einer für die Farbstoffwirkung charakteristischen Tatsache zu tun haben, lehrt ein kurzer Überblick über meine Ergebnisse an supravitalen Versuchen.

Über die Technik dieser Versuche siehe die vorhergehende Arbeit Seite 486.

Die folgende Tabelle führt die untersuchten Farbstoffe auf; sie sind geordnet nach ihrer Fähigkeit, das Zellenprotoplasma diffus zu färben; gleichzeitig sind in einer dritten Kolumne die Angaben aus meiner eingangs erwähnten Arbeit über die Güte der Granulafärbung wiedergegeben. Die Tabelle ist das Ergebnis zahlreicher Versuche; die Diffusfärbung bildet sich bei jedem basischen Farbstoff in allen Versuchen in der gleichen, angegebenen charakteristischen Weise aus, ganz gleich, ob das Versuchstier vor dem Versuch unbehandelt war, oder ob vorher durch saure Farbstoffe eine Granulabildung in den beobachteten Zellen hervorgerufen worden war.

Das Ergebnis der Tabelle stimmt mit den allgemeinen Erfahrungen gut überein; die Tendenz zur Diffusfärbung ist im allgemeinen um so stärker, je weniger gut eine Granulafärbung zu erzielen ist. Der Begriff „Diffusfärbung“ ist morphologisch schwer exakt zu definieren. Er kann nur ausdrücken, dass im Gegensatz zu anderen Färbungen, bei denen wohl charakterisierte Zellelemente gefärbt werden, hier eine mehr allgemeine Färbung des Zellprotoplasmas gefunden wird. Es ist dabei möglich, dass entweder eine Lösung des Farbstoffes in der Grundsubstanz des Protoplasmas (dem Dispersionsmittel, wenn man das Protoplasma im Sinne Lepeschkins 1913 als eine emulsionskolloide Lösung betrachtet) stattfindet, oder dass der Farbstoff sich durch Adsorption oder chemische Affinität an kleine Körperchen von ultramikroskopischen Dimensionen anlagert. Über die Art der Farbstoffbindung an das Protoplasma gibt eben die Betrachtung

Farbstoff	Grad der Diffus-färbung	färbt Granula beim normalen Tier	Konzentration	Wasser-löslichkeit	1 ccm 2% Lezi-thinxylol absorbiert aus 10 ccm der n/10 000 Lsg.
Safranin G extra	stark	nicht	n. 10000	gut	n. 4000
Rhodamin G					
extra	"	fraglich	n/10000	"	n/5000
Rhodamin B	"	schlecht	n/10000	"	n/10000
Rosanilin Base	"	nicht	n. 1000	schlecht	n 10000
Kristallviolett	"	mittel	n/10000	gut	n/10000
Methylviolett	"	mittel	n/10000	"	n. 10000
Irisamin G extra	"	fraglich	n 10000	"	n/15000
Chrysoidin R	"	schlecht	n/10000	"	n/17500
Rhodamin B					
extra	"	schlecht	n/10000	"	n/30000
Viktoriablau					
4 RS	"	mittel	n/10000	"	n/40000
Rhodamin O	"	nicht	n/10000	"	n/10000
Rhodamin 3 B					
extra	"	schlecht	n 10000	"	n 5000
Diamantfuchsin					
kl. Krist.	"	nicht	n/10000	"	n/15000
Viktoriablau R	mittel	gut	n/5000	mittel	n/20000
Auramin konz.	"	mittel	n/10000	gut	n/20000
Toluidinblau	"	gut	n/10000	"	n 25000
Malachitgrün	"	mittel	n/10000	"	n 10000
Vesuvín 4 BG	"	mittel	n/10000	"	n/30000
Rhodamin S					
extra	"	fehlt	n/10000	"	n/40000
Indazin M	"	mittel	n/10000	"	n 40000
Acridinrot 3 B	"	fehlt	n/10000	"	Spur
Viktoriablau B	"	mittel	n/5000	schlecht	n 3000
Nilblauschlor-					
hydrat	schwach	gut	n/1000	schlecht	n/25000
Capriblau GON	"	mittel	n/10000	gut	n/50000
Nilblausulfat	"	gut	n/10000	"	n/50000
Neutralrot	"	gut	n/10000	"	n/50000
Bismarckbraun	"	mittel	n/10000	"	Spur
Methylenblau BB	"	gut	n/10000	"	Spur
Methylenblau BX	"	gut	n/10000	"	Spur
Methylenblau					
rectif.	"	gut	n/10000	"	Spur
Methylengrün					
extra gelb O	"	gut	n 10000	"	Spur

des mikroskopischen Bildes keinen Aufschluss. Diffuse Färbungen in Zellen sind jedem Beobachter vitaler und supravitaler Färbungsvorgänge geläufig. Im allgemeinen werden sie als Zeichen der verlöschenden Vitalität des Protoplasmas aufgefasst; in der Tat wissen wir ja, dass stark geschädigtes oder abgestorbenes Protoplasma sowohl saure wie basische Farbstoffe stark anzureichern imstande ist.

Ich erinnere hier an die wiederholten Beobachtungen in experimentell geschädigten Organen, in denen bis zu einem gewissen Grade geschädigte Zellen nicht imstande sind, saure Farbstoffe granulär zu speichern, was an einer diffusen Protoplasmafärbung, verbunden mit Kernfärbung, zum Ausdruck kommt.

In meinen Versuchen aber handelt es sich nicht um geschädigte oder gar abgestorbene Zellen, an die die Farbstoffe herantreten; das völlig gesunde Organ wird sorgfältig dem Tierkörper entnommen, die selbstverständlich durch die Herausnahme aus dem Organismus verursachte Schädigung ist für alle Versuche annähernd gleich. Wenn also in vielen Fällen eine starke, bald nach dem Versuche einsetzende diffuse Durchtränkung des Protoplasmas mit dem Farbstoff beobachtet wird, bei anderen Farbstoffen dagegen sich immer wieder nur ganz schwache Diffusfärbung einstellt, so kann aus diesem Ergebnis geschlossen werden, dass der Grad der Diffusfärbung von der Eigenart der verwandten Farbstoffe abhängt.

Unabhängig von dem von mir hier hauptsächlich behandelten Problem der Möglichkeit, Farbstoffe im unfixierten Protoplasma zur Speicherung zu bringen, ist die Frage, inwieweit das Protoplasma unzweifelhaft lebender, d. h. im Verbande des lebenden Tieres befindlicher Zellen diffus gefärbt werden kann. Hierfür sind in der Literatur die Angaben R. Hoebers (1909), der diffuse Färbungen mit Rhodaminen beobachtete, vor allem aber von A. Garmus (1912), der nach Eingabe von Rhodamin B bei Fröschen interessante Beobachtungen machte, zu verwerten.

Nach Garmus bleibt eine Granulafärbung bei diesem Farbstoffe stets aus; bei vollkommenem Wohlbefinden des Frosches zeigen dagegen besonders die Zellen der Nickhautdrüsen, die er bei dem lebenden Tiere durch eine sinnreiche Versuchsanordnung beobachten konnte, eine deutliche diffuse Färbung, die nach 24 Stunden wieder verschwindet. Gleichzeitig injiziertes Methylenblau färbt in den durch Rhodamin rot gefärbten Zellen die Granula.

Aus den Beobachtungen von Garmus geht also hervor, dass auch im lebenden Organismus eine reparable Diffusfärbung vorkommt, und ich möchte annehmen, dass bei allen Farbstoffen mit geeigneten physikalisch-chemischen Eigenschaften (siehe darüber unten Seite 521 ff.) auch im lebenden Organismus eine diffuse Färbung erreicht werden müsste, wenn nicht manche Faktoren dieser Diffusfärbung hinderlich wären, Faktoren, die in meinen supravitalen Versuchen teils nicht, teils in geringerem Masse in Betracht kommen. Vor allem spielt die Giftigkeit der Farbstoffe eine grosse Rolle.

Aus noch unveröffentlichten Versuchen meiner Schülerin L. Kummer geht hervor, dass bei einer Reihe nicht granulär sich ablagernder saurer Farbstoffe nur dann ein erheblicher Grad von Diffusfärbung in den Zellen der Körperparenchyme gefunden wird, wenn die Tiere auch äusserlich schwer erkrankt erscheinen. Es muss also, besonders, da mit denselben Farbstoffen im supravitalen Versuche stets starke Diffusfärbung zu erzielen ist (so bei Rose bengale, Erythrosin, Eosin usw.), angenommen werden, dass das lebende Protoplasma bis zu einem gewissen Grade die Fähigkeit besitzt, sich gegen die Farbstoffinvasion zu schützen, indem entweder durch Reduktion und Oxydation oder durch andere Mechanismen der Farbstoff zerstört wird. Ausserdem lassen diese Versuche den Schluss zu, dass die Farbstoffwirkung möglicherweise eben durch die diffuse Einlagerung in das Zellenprotoplasma zur vollen Geltung kommt und die in diesem sich abspielenden wichtigen Lebensvorgänge zu stören vermag.

Dass aber Diffusfärbung und Giftwirkung nicht identisch sind, zeigt schon die oben erwähnte Beobachtung von Garmus; es muss jedenfalls für jeden Farbstoff im vitalen Versuche erst sorgfältig sein Schicksal verfolgt werden, ehe sich ein Urteil gewinnen lässt, wie sich der Farbstoff physikalisch-chemisch zu der speichernden Substanz des Protoplasmas verhält.

Für Protozoen hat E. Nirenstein (1913) eine offenbar sehr eingehende Untersuchung dieser Fragen angestellt, die mir leider erst bei der Niederschrift dieser Arbeit zu Gesicht kam. Er untersuchte an Paramäcien im ganzen 119 Farbstoffe und teilt diejenigen, die eine sichtbare Färbung hervorriefen, ein in Granulafarbstoffe und diffusfärbende Substanzen.

Unter bestimmten nicht näher charakterisierten Bedingungen sollen sich die kleinen Granula des Paramäciendoplasmas vergrössern und dann viel besser färbbar werden; sie werden von Granulafarbstoffen auch in Konzentrationen gefärbt, die die kleinen Granula ungefärbt lassen, und ein Teil der diffusfärbenden Farbstoffe färbt nun ausser dem Endoplasma auch die grossen Granula solcher Paramäcien. Es ist aus den kurzen Mit-

teilungen Nirensteins nicht ersichtlich, warum die grossen Granula aus den kleinen Granulis hervorgegangen sein sollen; ich kann daher auch nicht übersehen, warum der Autor den Granulis eine endoplasmatische Natur zuschreibt.

Jedenfalls geht aus diesen Angaben hervor, dass auch bei den Versuchen Nirensteins der Unterschied der beiden Farbstoffgruppen nur graduell, nicht prinzipiell besteht. Diese Bestätigung meiner Befunde ist mir um so wertvoller, weil diese an gänzlich andersartigem Material erhoben wurden. Allerdings bin ich nicht in der Lage, unsere Ergebnisse im einzelnen zu vergleichen, da genaue Angaben in der kurzen Mitteilung Nirensteins fehlen.

Ich glaube aber nicht, dass Nirenstein mit der Behauptung recht hat, dass alle diffus färbenden Substanzen nur die Granula nicht stärker färben als das Protoplasma. Ich konnte bei den Versuchen, in denen saure Farbstoffgranula die Stelle von zelleigenen Granulis vertraten, bei allen rein diffus färbenden Stoffen die reine Farbe des sauren Farbstoffes auf dem diffus gefärbten Grunde deutlich erkennen. In diesen Fällen ist eben geradezu weniger Farbstoff in die Granula gezogen, als sich in deren Umgebung ansammelte. Es ergibt sich daraus, dass es auch reine Diffusfärbegibt, die die Granula gänzlich verschmähen.

Aus der Konstanz, mit der bei den einzelnen Farbstoffen in allen Versuchen annähernd der gleiche, in der Tabelle zum Ausdruck gebrachte Grad von Diffusfärbung auftrat, ist zu schliessen, dass wir es jedenfalls mit einer den einzelnen Farbstoffen eigenartigen Funktion zu tun haben. Die auffallende Beziehung, dass die diffusfärbenden Stoffe im allgemeinen die Granula schlecht färben, lässt vermuten, dass eine engere Beziehung zwischen den beiden unterschiedenen Arten der Färbung besteht. Ehe jedoch dieser Schluss gezogen werden kann, muss untersucht werden, ob nicht für die Diffusfärbung Momente in Betracht zu ziehen sind, die für die Granulafärbung gänzlich ohne Belang sind.

b) Der Grad der Diffusfärbung ist von der Dispersität der Farbstoffe nicht abhängig; das Problem der Zellpermeabilität.

Es könnte ja zunächst die naheliegende Vermutung aufkommen, dass ein Farbstoff um so leichter diffus färben wird, je leichter er in das Zellenprotoplasma einzudringen befähigt ist. Es müssten demnach eben die Faktoren, die die Permeierfähig-

keit der Farbstoffe bestimmen, auch für den Grad der Diffusfärbung ausschlaggebend sein.

Das Problem der Zellpermeabilität kommt für meine Untersuchungen nur sekundär in Betracht. Bekanntlich hat E. Overton zum ersten Male nach ausgedehnten Studien den Satz aufgestellt, dass über den Eintritt in das Zellenprotoplasma eine Lipoidhaut entscheide, so dass auch nur solche Farbstoffe in das Zellinnere eintreten, die sich in Lipoiden lösen. Gegen diese Art der Auffassung sind im wesentlichen zwei Arten von Einwänden gemacht worden: es ist nachgewiesen, dass eine grosse Zahl von Farbstoffen in das Zellinnere eindringt, ohne lipoidlöslich zu sein, und andererseits sehr stark lipoidlösliche Farbstoffe in manche Zellen gar nicht, in andere nur schwer permeieren. (W. Ruhland, R. Hoerber 1914 u. a.) Welche Hilfhypothesen man auch hierbei aufstellen will, die Bedeutung der Lipoide für das Problem der Permeabilität ist dadurch sehr zweifelhaft geworden. Die andere Gruppe von Einwänden basiert auf der Meinung, dass wohl Lipoide für die Stoffaufnahme und Verarbeitung eine grosse Bedeutung besitzen können, dass ihre Bedeutung jedoch nicht in ihrem Sitze an einer Oberflächenschicht zu suchen sei, sondern in ihrer Anwesenheit im Zellenprotoplasma überhaupt. S. Loewe zeigte, dass Methylenblau aus verdünnten wässrigen Lösungen relativ am meisten, aus konzentrierteren Lösungen dagegen relativ weniger ausgezogen wird. Ein kurzer Blick auf meine Tabelle S. 524 zeigt, dass fast alle lipoidlösliche Farbstoffe diese Eigentümlichkeit besitzen. Eine Ausnahme machen hier die extrem lipoidlöslichen Farbstoffe, wie die Rhodamine und andere. Jedenfalls haben wir es hier mit einer unter Farbstoffen weitverbreiteten Eigenschaft zu tun, wie auch E. Herzfeld schon zeigte. S. Loewe denkt sich demnach den Vorgang der Lipoidlöslichkeit als eine Adsorption des Farbstoffes an die im organischen Lösungsmittel kolloidgelöste Lecithinphase. Er zieht aus dieser Vorstellung den von R. Hoerber nicht akzeptierten Schluss, dass eine Lipoidhaut eher als Speicherungsmedium dienen müsste, jedenfalls also ein Hindernis für ein Eindringen lipoidlöslicher Farbstoffe in das Zellinnere bilden müsste. Ich kann nicht umhin diesen Einwand S. Loewes gegen das Bestehen einer Lipoidhaut als berechtigt anzusehen. Denkt man sich nämlich die Zelllipoide an der Oberfläche der Zelle angeordnet, so würden

sie in der Tat als Speicherungsmedium gerade einem in verdünnter wässriger Lösung dargebotenen Farbstoffe gegenüber dienen und nur schwer an ein lipoidfreies Zellinnere den Farbstoff abgeben. Denn wenn man zum Beispiel eine intensiv gefärbte Lezithinxyllösung über reines Wasser schichtet, so werden bei den meisten Farbstoffen nur minimale Mengen an das Wasser abgegeben: Der Farbstoff haftet fest am Lipoid. Nur die Gegenwart von besonderen Substanzen in der wässrigen Phase ermöglicht einen stärkeren Austritt des zum Beispiel basischen Farbstoffes aus der Lipoidphase (Beeinflussung durch sauren Farbstoff, s. S. 535). Man müsste also schon im Protoplasmainnere derartige, den Austritt aus der Oberflächenlipoidhaut bewirkende Faktoren annehmen, wenn man sich an das Bestehen einer solchen halten will. Schon von früheren Autoren (W. Ruhland, W. Lepeschkin) ist hervorgehoben worden, dass eine Anreicherung lipoidlöslicher Farbstoffe in den Oberflächenschichten der Zellen nicht beobachtet wurde. Lepeschkin aussert sich auf Grund anderer Experimente: „Alles spricht also dafür, dass die chemische Beschaffenheit der oberflächlichen Protoplasmaschicht von derjenigen des inneren Protoplasmas qualitativ nicht verschieden ist, und dass das Protoplasma keine wässrige Lösung darstellt (S. 189).“

Es ist also zum mindesten fraglich, ob mit einer besonderen Oberflächenschicht des Protoplasmas, die für das Permeabilitätsproblem im Sinne Overtons Bedeutung hätte, zu rechnen ist. Die Farbstoffexperimente haben in ihrer Gesamtheit keinen Beweis für das Bestehen einer Lipoidhaut erbracht. Damit ist aber die grosse Reihe von Experimenten, die Overton und viele andere Forscher angestellt haben und die die Bedeutung der Lipoidbeziehungen für den Stoffwechsel der Zelle meines Erachtens ausser Zweifel setzen, nicht so hinfällig geworden, wie das wohl von vielen Seiten angenommen wird. Gesetzt den Fall, dass wirklich nicht die Lipoiden über den Eintritt der Substanzen in die Zelle entscheiden, so können und müssen sie durch ihre gleichmässige Verteilung in der Zelle eine grosse Rolle für alle Fragen des Stoffaustausches spielen. Da solche Beziehungen zweifellos festgestellt sind, so muss nun morphologisch versucht werden, den Sitz und die Verteilung der Lipoiden in der Zelle zu ergründen, um das physiologisch gefundene Tatsachenmaterial für die Lehre von der Zellfunktion zu verwerten.

Ich sehe an dieser Stelle von den mannigfachen Versuchen, die Verteilung und Anordnung der Lipoidsubstanzen in fixierten Präparaten zu ergründen, ab. Um deren Ergebnisse für die wirkliche Anordnung in lebenden Zellen zu verwerten, ist wie bei allen Fixationsbildern, die Untersuchung der Fixationsmittelwirkung auf die lipide Substanz erforderlich. Bisher sind einheitliche Resultate nicht erzielt.

Wenn nun die Lipoidhypothese zweifellos dem Verhalten der Farbstoffe nicht gerecht wird, so ist doch zu betonen, dass auch die anderen bisher aufgestellten Theorien nicht völlig befriedigen. Ohne hier genauere Angaben zu machen, möchte ich auf die Schriften W. Ruhlands (1912, 1914) und auf R. Hoebers „Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe“ verweisen, in denen das Tatsachenmaterial von verschiedenem Standpunkt aus kritisch beleuchtet ist.

Ob die „Ultrafilterregel“ W. Ruhlands wirklich für alle Zellkategorien gültig ist, ist noch heute nicht zu sagen. Bei Pflanzenzellen scheinen ja die Verhältnisse einfacher zu liegen als im tierischen Organismus, wo wir mit so vielen für ganz spezielle Zwecke angepassten Zellarten zu rechnen haben. Es ist in der Tat schwer möglich, anzunehmen, dass zum Beispiel in dem resorbierenden Dünndarmepithel die so einfachen, für andere Zellarten physikalisch gut deutbaren Speicherungsbedingungen für saure Farbstoffe fehlen, und nur deshalb bei der ganz überwiegenden Mehrzahl derselben keine sichtbare Speicherung von Farbstoff zustande komme. Ich glaube viel eher, dass wir aus den für verschiedene Zellkategorien gefundenen Tatsachen bisher nur den Schluss ziehen können, dass Farbstoffexperimente wenigstens im tierischen Organismus für die Erforschung des Permeabilitätsproblems einen engbegrenzten Anwendungsbereich haben.

Wir müssen uns vorläufig damit bescheiden, festgestellt zu haben, dass in den Zellarten, in denen bisher saure Farbstoffe während des Lebens gespeichert aufgefunden wurden, für das Eindringen und für die Speicherung anscheinend lediglich der Lösungszustand, die Dispersität, entscheidend ist. Es ist wahrscheinlich, dass diese Zellarten hinsichtlich ihrer Oberflächenbeschaffenheit eine gewisse primitive Stufe bewahrt haben und zwar aus dem Grunde, weil bei Pflanzen diese Abhängigkeit von dem Dispersitätsgrade der zugeführten Substanz viel allgemeiner verbreitet zu sein scheint. Bei vielen anderen Zellarten, in

denen Speicherung saurer Farbstoffe bisher nicht, oder doch in von dem gewöhnlichen Typus abweichender Weise gefunden wurde, kann es für das Verhalten drei Gründe geben: 1. der Farbstoff dringt ein, wird aber zerstört; 2. der Farbstoff dringt ein, wird aber nicht sichtbar, weil er nicht gespeichert wird; 3. der Farbstoff dringt nicht ein.

Unter diesen Möglichkeiten ist bisher noch nicht entschieden, und es ist zweifelhaft, ob die Farbstoffe berufen sind, in diesen Fragen eine Entscheidung herbeizuführen.

Meine Untersuchungen wurden nun aber an einer Zellart ausgeführt, der Nierenzelle, für die die Bedeutung der Dispersität wenigstens saurer Farbstoffe für die Permeierfähigkeit in diese Zellen festgestellt ist, und auch für basische Farbstoffe sind genügend Anhaltspunkte vorhanden (E. Herzfeld 1916), um anzunehmen, dass bei dieser Zellart nur die Dispersität der Farbstoffe über den Grad der Permeierfähigkeit entscheidet. Es war daher möglich, an dieser Zellart zu entscheiden, ob die Diffusfärbung nur von dem Grade des Eindringungsvermögens, das heisst von der Dispersität der Farbstofflösung, abhängt.

Umstehende Tabelle bringt für die verwandten Farbstoffe die Diffusionswerte nach 24, 48 und 120 Stunden, wie sie durch Ablesung nach dem Traubeschen Verfahren in einem 10⁰/oigen Gelatinegel gefunden werden. Es wurde reinste Handelsgelatine in der genannten Konzentration aufgelöst, sorgfältig bis zu neutraler Reaktion mit Sodalösung versetzt, davon je 10 ccm in Reagensröhrchen gebracht und nach dem Erkalten mit 1 ccm einer n/100 Farbstofflösung überschichtet.

Es ergibt sich ohne weiteres, dass unter den ausgesprochenen Granulafärbern sowohl wie unter den stark diffus färbenden Stoffen Substanzen von ganz verschiedener Diffusionsgeschwindigkeit enthalten sind. Es lässt sich wohl sagen, dass die Intensität der sich ausbildenden Färbung sehr gering ist wenn die Diffusionsgeschwindigkeit gering ist. (Basler Blau R und BB, Indazin M), im übrigen aber enthalten sowohl die ausgesprochen diffus färbenden wie die ausgesprochenen Granulafärber Farbstoffe verschiedenster Diffusionsgeschwindigkeit.

Die Werte in der obigen Tabelle stimmen im allgemeinen gut mit den von Traube und Koehler angegebenen überein; gewisse Abweichungen (Methylgrün, Malachitgrün) mögen aus der Verschiedenheit des Farbstoff-

Farbstoff	Diffusionsfortschritt in mm			Grad der Granulafärbung	Grad der Diffusfärbung
	nach 24 Std.	nach 48 Std.	nach 5 Tagen		
Malachitgrün	18 (7)*	27 (10)	38 (15)	mittel	mittel
Safranin G extra	18 (3)*	25 (18)	37 (29)	stark	stark
Rhodamin G extra	17 (7)*	22 (13)	40 (22)	fraglich	stark
Methylengrün	17	23	32	gut	schwach
Methylenblau BB	17 (9)*	25 (14)	38 (17)	gut	schwach
Irisamin G extra	18	24	38	fraglich	stark
Auramin konz.	18	28	42	mittel	mittel
Capriblau GON	16	23	40	mittel	schwach
Rhodamin 3 B					
extra	16 (10)*	21 (12)	35 (19)	schlecht	stark
Rhodamin B					
(Kahlb.)	15 (8)*	20 (8)	34 (13)	schlecht	stark
Rhodamin S extra	15 (5)*	20 (13)	34 (20)	nicht	mittel
Rhodamin O	15 (7)*	20 (10)	30 (13)	nicht	stark
Bismarckbraun	15	23	40	mittel	schwach
Methylgrün	15	25	37	gut	fehlt
Methylenblau					
rectif.	14	21	41	gut	schwach
Rhodamin B extra	14 (5)*	21 (11)	35 (19)	schlecht	stark
Methylenblau BX	13	17	28	gut	schwach
Diamantfuchsin	13	23	28	nicht	stark
Akridinrot 3 B	13	20	22	nicht	mittel
Chrysoidin R	12	25	31	schlecht	stark
Kristallviolett 6 B	11	16	25	mittel	stark
Rosanilin Base	11	18	23	nicht	stark
Methylviolett 5 B	10	16	27	mittel	mittel
Neutralrot	10 (4)*	15 (6)	22 (8)	gut	schwach
Vesuvín 4 BG	10	17		mittel	mittel
Nilblauschlor-					
hydrat	8 (2)*	15 (3)	20 (4)	gut	schwach
Nilblausulfat	7	13	17	gut	schwach
Indazin M	7	13	19	mittel	mittel
Toluidinblau	4	21 (11)*	24 (13)	gut	mittel
Viktoriablau R	4	6	8	gut	mittel
Viktoriablau 4 RS	1,5	5	7	mittel	stark
Viktoriablau B	2	2	3	mittel	mittel
Basler Blau R	(1)**	(2)	(3)		
Basler Blau BB	(4)**	(5)	(7)		

* Die Klammerzahl bezieht sich auf die Zone dunkelster Färbung.

** Die Klammerzahl bedeutet eine anders gefärbte Vorzone.

bezuges herrühren. Es ist aber vor allem immer wieder darauf hinzuweisen, dass das Alter der Farbstofflösungen einen grossen Einfluss auf den Dispersitätsgrad besitzt, so dass man eigentlich vor jedem Versuch mit einer längere Zeit nicht benutzten Lösung sich von dem Dispersitätsgrad derselben überzeugen muss.

Kurz zusammengefasst mag man die Bedeutung der Dispersität, des Lösungszustandes der Farbstoffe für die Permeabilität darin erblicken, dass ein gewisses Maß von Dispersität zweifellos Erfordernis ist, falls ein Farbstoff in das Zellenprotoplasma eindringen soll. Im übrigen lässt sich aus der Beobachtung des Färbungsbildes nicht ohne weiteres ein Rückschluss auf den Grad der Permeierfähigkeit eines basischen Farbstoffes ziehen, da offenbar noch andere Einflüsse die Anreicherung dieser Farbstoffe in den Zellen hervorrufen.

Nach den Angaben, die ich oben über die Lipoidtheorie Overtons gemacht habe, lag es nahe, der Lipoidlöslichkeit der Farbstoffe Beachtung zu schenken und zu untersuchen, ob nicht diese Eigenschaft vielleicht für die Diffusfärbung verantwortlich gemacht werden könnte. Aus den bisherigen Angaben über die Lipoidlöslichkeit von Farbstoffen, die ich in der Literatur gefunden habe, liess sich ein befriedigendes Bild nicht gewinnen, besonders deshalb, weil im allgemeinen nur bemerkt ist, ob ein Farbstoff lipoidlöslich ist oder nicht; zahlenmässige Vergleiche zwischen einer grösseren Reihe von Farbstoffen sind bisher nicht gemacht worden. Deshalb und weil die Farbstoffe vielfach trotz Verwendung gleicher Fabrikmarken wechselnde Eigenschaften zeigen, habe ich die Lipoidlöslichkeit der von mir verwandten Farbstoffe untersucht.

c) Die Diffusfärbung ist von den Zellpoiden abhängig.

Nach anfänglichen Vorversuchen habe ich schliesslich alle Untersuchungen auf Lipoidlöslichkeit mit einer 2%igen Lösung von Lezithin in Xylol angestellt. Das Lezithinpräparat wurde von Merck (Darmstadt) bezogen und ist eine wachsartige gelbbraune Masse. In Xylol löst es sich leicht und gibt eine klare gelbe Lösung. Wegen seiner Quellbarkeit ist Lezithin für derartige Versuche in letzter Zeit verpönt; die Löslichkeitswerte, die für die Farbstoffe gefunden wurden, sollen nicht für das Lipoid allein charakteristisch sein, sondern zum Teil auf dem Wassergehalt beruhen. Ich vermag mangels eigener Erfahrungen die Berechtigung dieses Einwandes nicht zu beurteilen. Zweifellos trübt für die physikalisch-chemische Ausdeutung der Versuche die Tatsache das Bild erheblich, dass das käufliche Lezithin keine reine Substanz ist, sondern (nach Nirenstein) durch Zer-

setzung sowohl Fettsäure als organische Base gelöst enthält. Es ist nach den Ergebnissen dieses Autors sowohl, wie nach denjenigen Fauré-Fremiets (1910) wohl möglich, dass ein gewisser Gehalt an sauren und basischen freien Bestandteilen die Lezithinlöslichkeit für basische und saure Farbstoffe beeinflusst.

Weiterhin halte ich es nicht für wahrscheinlich, dass sämtliche zu den lipoiden Substanzen gerechneten Körper ein dem Lezithin analoges Verhalten zeigen werden.

Die Berechtigung, das Lezithin als Untersuchungsmittel für die von mir bearbeiteten Probleme zu verwenden, ergibt sich einerseits aus der Erwägung, dass wir mit lezithinartigen Substanzen wohl in allen Zellen zu rechnen haben. Ferner werden, so hoffe ich, die Versuchsergebnisse die Wahl dieses Körpers rechtfertigen.

Um ein Urteil über das Verhalten der zur Untersuchung dienenden Farben zu Lezithinxytol zu bekommen, untersuchte ich zunächst die sogenannte maximale Löslichkeit.

Hierbei kommt folgendes in Betracht:

1. Die gefundenen Zahlen können nicht als absolute Zahlen aufgefasst werden. Sie stellen das Ergebnis von Versuchen dar, in denen in Lezithinxytol die Farbstoffsubstanz bis zur Sättigung in der Kälte aufgelöst wurde. Bei stärkerer Erwärmung liess sich bei allen lezithinlöslichen Farbstoffen eine beträchtlich höher konzentrierte Lösung herstellen. Die gefundenen Zahlen haben ihren Wert nur in der Vergleichung der für die verschiedenen Farbstoffe gefundenen Werte.

2. Bei einer Reihe von Farbstoffen waren die Endkonzentrationen in der Lezithinlösung beträchtlich grösser, wenn der Farbstoff der Lezithinlösung in Wasser gelöst dargeboten wurde gegenüber der direkten Auflösung der Farbstoffsubstanz in Lezithinxytol. Besonders waren es kristallisierte Farbstoffe, bei denen dieses Phänomen beobachtet wurde. Eine Verbesserung der Löslichkeit in Lezithinxytol aus Substanz wurde oft schon durch feines Zerreiben der Farbstoffkristalle erreicht.

Die untersuchten Farbstoffe zeigten sehr erhebliche Differenzen in ihrer Löslichkeit in Lezithinxytol; um einen zahlenmässigen Anhalt für diese Differenzen zu bekommen, wurde grundsätzlich mit äquimolekularen Lösungen gearbeitet. Soweit die Farbstoffe sich gut lösten, wurde eine n/100-Lösung als Ausgangslösung gewählt. Die Konzentration der Lezithinlösung wurde durch Auftropfen auf Fliesspapier und Vergleich dieses getrockneten Fleckes mit einer Skala ermittelt, die durch Auftropfen verschiedener Verdünnungen der wässrigen Lösung gewonnen worden war.

Der Umstand, dass hier die Farbtönung der Lipoidlösung mit der Farbtönung einer wässrigen Lösung verglichen wurde, ist zunächst nicht unbedenklich. Tatsächlich spricht vieles dafür, dass möglicherweise gleich-

stark gefärbte Lösungen eines Farbstoffes in Wasser einerseits, in Lezithinxylool andererseits keineswegs die gleiche Farbstoffkonzentration besitzen. Für unsere Fragen aber, bei denen es sich nur um die Möglichkeit des Vergleiches handelt, kann dieser möglicherweise den Versuchen anhaftende Fehler ausser Betracht bleiben, da einerseits die Wertverschiedenheit bei den untersuchten Farben sehr gross ist, andererseits angenommen werden kann, dass der aus dem oben erwähnten Umstand sich ergebende Fehler bei allen Farbstoffen annähernd gleich gross ist.

Die Art der Untersuchung ist andererseits so bequem, dass sie jederzeit leicht durchführbar ist. Aus kolorimetrischen Bestimmungen gewonnene Zahlen können ja ohnehin nur bis zu einem gewissen Grade als zuverlässig gelten.

Hier, wo es sich, wie gesagt, darum handelt, in erster Linie Vergleichswerte zu bekommen, ist die Methode ausgezeichnet brauchbar.

Ausser diesen direkten Messungen der Löslichkeit der Farbstoffe in der Lezithinxyloollösung wurde auch die Fähigkeit der Lezithinlösung geprüft, die Farbstoffe aus wässrigen Lösungen herauszuziehen; es wurde zu diesem Zwecke 1 ccm der Lezithinlösung über 10 ccm einer $n/100$ resp. $n/10\,000$ wässrigen Lösung geschichtet. Lässt man die Versuche eine genügend lange Zeit stehen, so erübrigt sich das Umschütteln. In meinen Versuchen liess ich die Lösungen stets 3 Tage aufeinander wirken. Die Ergebnisse der drei Versuchsreihen zur Prüfung der Farbstoffe auf ihr Verhalten zur Lezithinxyloollösung zeigt die umstehende Tabelle.

Da in den mir bekannten Arbeiten die Angaben über den Grad der Löslichkeit der Farbstoffe in Lipiden nur allgemein gehalten sind, lässt sich nur sagen, dass im grossen und ganzen die Ergebnisse mit denen der früheren Untersucher übereinstimmen. Nur zu einigen Farbstoffen müssen einige Bemerkungen angefügt werden.

Malachitgrün ist nach Ruhland und Overton sehr wenig löslich in Cholesterin-Öllösung, wo es sich erst bei 70° ein wenig löst. In Benzol-Lezithinlösung dagegen (Overton) ist es leicht löslich, wie ich auch bestätigen konnte. In starken Benzol-Cholesterinlösungen (40 Teile auf 100 Benzol) löst sich der Farbstoff auch in der Kälte leicht (Overton).

Nilblausulfat und Nilblauchlorhydrat lösen sich aus $n/100$ wässriger Lösung recht gut in Lezithinxylool, zu einem grossen Teil aber, wie auch schon andere Beobachter fanden, als freie Base mit rötlicher Farbe. Tropft man von solcher Lezithin-

xylollösung auf Fliesspapier, so wird der Fleck beim Antrocknen blau, wahrscheinlich durch die Kohlensäure der Luft. Die so schwache Konzentration bei Nilblausulfat, wenn die Farb-

**Löslichkeit basischer Farbstoffe in 2% igem
Lezithinxylol.**

Farbstoff	Konzentration			Be- merkungen
	bei direkter Lösung	bei Adsorption aus wässriger Lösung von der Konzentration		
		n 100	n/10000	
Rhodamin B (Kahlb.)	n 110	n 100	n/10000	{ stärker als 1/100 von der konz. w. Lösung
Rhodamin O	n/125	n/100	n/10000	
Rhodamin B extra	n 200	n/100	n/30000	
Irisamin G extra	n 200	n 1000	n/15000	
Safranin G extra	n 200	n 250	n/4000	
Rhodamin G extra	n 300	n/100	n/5000	
Rhodamin 3 B extra	n 500	n 200	n/5000	
Rosanilin Base	n/600			
Malachitgrün	n 700	n/700	n/10000	
Viktoriablau 4 RS	n 1000	n 300	n 40000	
Chrysoidin R	n 2000	n 500	n 17500	
Capriblau GON	n 2000	n/20000	n/50000	
Diamantfuchsin kl. Kr.	n 2000	n/5000	n 15000	
Indazin M.	n 2000	n/5000	n/40000	
Auramin konz.	n 2000	n/1500	n/20000	
Vesuvium 4 BG	n 3000	n/3000	n/30000	
Methylviolett 5 B	n 3000	n 1000	n/10000	
Kristallviolett 6 B	n 3000	n/2000	n/10000	
Viktoriablau R	n 4500	n/400	n/20000	
Viktoriablau B	n/5000		n/3000	
Nilblausulfat	n 5000	n/30000	n/50000	
Methylenblau BX	n/5000	n/15000	Spur	
Neutralrot	n 10000	n/25000	n/50000	
Methylenblau BB	n/20000	n/20000	Spur	
Rhodamin S extra	n/20000	n/15000	n/40000	
Methylengrün	n/20000	n 20000	Spur	
Toluidinblau	n 30000	n 10000	n/25000	
Bismarckbraun	n/50000	n/50000	Spur	
Nilblausulfat	n 80000	n 2000	n/25000	
Methylenblau rect.	Spur	Spur	Spur	
Methylgrün OO	0	Spur violett	0	
Acridinrot 3 B	0	n/10000	Spur	

stoffsubstanz in Lezithinxylol aufgelöst wird, findet sich nur in Versuchen bei Zimmertemperatur. Schon durch mässiges Erwärmen lassen sich relativ stabile Lösungen bis zu $n/4000$ in Lezithinxylol herstellen; die relativ hohe absolute Löslichkeit dieses Farbstoffes in Lezithinxylol zeigt zudem der Versuch aus $n/100$ wässriger Lösung, wo die Konzentration $n/2000$ in Lezithinxylol erreicht wird.

Neutralrot war in meinen Versuchen stets mit roter Farbe in Lezithinxylol gelöst; mit Ruhlands (08) Angaben stimmt die relativ schwache Löslichkeit dieses Farbstoffes gegenüber vielen anderen basischen Farbstoffen überein.

Methylenblau zeigt in den verschiedenen verwandten Marken ein recht verschiedenartiges Verhalten. Methylenblau rectif. von Ehrlich ist in Lezithinxylol fast unlöslich; während M BB und BX etwa mit Nilblausulfat und Neutralrot auf einer Stufe stehen.

Methylengrün ist nach Overton in Benzol-Cholesterin und Lezithin gut löslich. Ruhland, der die Höchster Marke extra gelblich verwandte, erklärt den Farbstoff für vollkommen lipoidunlöslich. Ich bekam von den Höchster Farbwerken die Marke extra gelblich O, die in Lezithinxylol etwa die gleiche Löslichkeit besitzt, wie Methylenblau BB. Bismarckbraun, das nach Ruhland (08) praktisch lipoidunlöslich, nach Hoeber in Terpentin-Cholesterin eine deutlich gegen reines Terpentin vergrösserte Löslichkeit zeigt, was Rost (11) auch für Lezithinxylol bestätigt, ist in meinen Versuchen zwar sehr schwach, aber deutlich lezithinlöslich. In Xylol ist es nur in geringer Konzentration löslich.

Methylgrün OO (Grübler) ist mit Methylviolett verunreinigt; dies ist der einzige Bestandteil, der sich im Lipoid löst. Der grüne Farbstoff wird im Lezithinxylol nicht sichtbar. Dies Ergebnis stimmt überein mit der Angabe Rosts (1911), während Ruhland (08), der offenbar auch mit einem von Grübler bezogenen Präparat arbeitete, angibt, dass der Farbstoff in Cholesterin löslich sei, auch Overtons Angaben lauten so.

Aus diesen kurzen Mitteilungen erhellt, dass die Angaben schwankend sind. Im allgemeinen kann bestätigt werden, dass Cholesterin, wie auch andere Autoren stets betonen, ein schlechteres Lösungsmittel für Farbstoffe ist, als Lezithin. Daraus wird ein

Teil der unterschiedlichen Angaben erklärlich. Zum Teil handelt es sich aber wohl um die Verwendung verschiedener Präparate.

Das lehren zum Beispiel die hier mitgeteilten Ergebnisse mit verschiedenen Marken von Rhodamin. Im Gegensatz zu den Marken B (Kahlbaum), O, 3 B extra, G extra, B extra, die sämtlich zu den am besten in Lezithinxytol löslichen Farbstoffen gehören, ist Rhodamin S extra auffallend wenig lipoidlöslich. Besonders seine maximale absolute Löslichkeit scheint gering zu sein, während aus verdünnten wässrigen Lösungen eine relativ bedeutende Speicherung in der lipoiden Phase stattfindet. Rhodamin S extra verhält sich auch, wie gezeigt werden soll, biologisch etwas abweichend.

Trotzdem auf den ersten Blick die Verhältnisse nicht ganz übersichtlich sind, so ist doch unverkennbar, dass eine auffallende Beziehung zwischen der Fähigkeit der Farbstoffe, diffus das Protoplasma zu färben, und ihrer Löslichkeit in Lezithinxytol besteht. Man betrachte hierzu die Tabelle auf S. 512, in deren letzter Reihe die Zahlen verzeichnet sind, die die Konzentration angeben, in der sich die Farbstoffe in 1 ccm 2% Lezithinxytol bei Überschichtung über eine n/10 000-Farbstofflösung anreichern.

Diese Zahlen wurden gewählt, weil diese Reihe der Reagenzglasversuche am ehesten als Modell für die biologischen Versuche angesehen werden kann, in denen ja auch eine n/10 000-Farbstofflösung jeweils verwandt wurde. Selbstverständlich sind die im Reagenzglasversuche gewonnenen Werte infolge der schwachen Lezithinkonzentration sehr viel kleiner, als sie ausfallen würden, wenn etwa reines Lezithin zu den Versuchen verwandt worden wäre. Bei den verdünnteren Lösungen hat man jedoch den Vorteil, die Abstufung verschieden starker Löslichkeit bei verschiedenen Farbstoffen leichter prüfen zu können. Ich wollte diesen Punkt nur hervorheben, weil die Zellfärbungen in der Tat beträchtlich stärker ausfallen als die im Reagenzglas gefundenen Konzentrationswerte. Entscheidend für die folgenden Besprechungen ist nur die charakteristische, mit den Reagenzglasversuchen übereinstimmende Abstufung der Farbstoffe.

Man beachte: 1. von den stark diffusfärbenden Substanzen, Safranin G extra, Rosanilin Base, Kristallviolett, Irisamin G extra, Chrysoidin R, Viktoriablau 4 RS, Diamantfuchsin kl. Krist., sämtlichen untersuchten Rhodaminen, mit Ausnahme der Marke S extra, sind nur Rhodamin B extra (n/30 000) und Viktoriablau 4 RS (n/40 000) etwas weniger stark löslich in Lezithinxytol. Diese

beiden Farbstoffe haben aber eine sehr hohe absolute Löslichkeit in Lezithinxytol ($n/100$ resp. $n/300$ sind die höchsten gefundenen Werte). Die starken Diffusfärber sind also sämtlich auffallend stark in Lezithin löslich.

2. In der Gruppe der mittleren Diffusfärber sind die Werte schwankend. Die Werte für die Lezithinlöslichkeit sind bei der Mehrzahl der Farbstoffe (Viktoriablau R, Toluidinblau, Vesuvin + BG, Rhodamin S extra, Indazin M) $n/20\,000$ — $n/40\,000$. Der für diese Gruppe auffallend hohe Wert bei Viktoriablau B erklärt sich daraus, dass die Löslichkeit dieses Farbstoffes in Wasser bei kaltem Ansetzen der Lösung sehr begrenzt ist. In dem Reagenzglasversuch wurde die Lösung durch Erwärmen hergestellt. Aus dieser Lösung nimmt das Lezithinxytol reichlich Farbstoff auf. Auch Viktoriablau R gehört zu den lipoidlöslichsten Farbstoffen (s. auch Ruhland).

Ich war gleich bei den ersten Versuchen mit diesen Farbstoffen überrascht, dass sie im supravitalen Versuch so rasch und intensiv färben. nachdem Ruhland für Pflanzen ein Eindringen dieser Farbstoffe in Abrede gestellt hatte, und auch Hoeber zugegeben hatte, dass mit diesen hochhochkolloidalen Farbstoffen eine relativ schwach ausgedehnte Granulafärbung eintritt.

In meinen Versuchen war regelmässig schon nach 10—15 Minuten eine ausgedehnte mittelstarke Diffusfärbung, mit gleichzeitig sich ausbildender Granulafärbung, zu beobachten. Diese Diskrepanz mit vitalen Versuchen liegt zweifellos an der Methodik. Die dem Organismus entnommenen Zellen vermögen nicht mehr die dem lebenden Organismus eigenen Schutzkräfte auszuüben. Würde sich im lebenden Tiere in lebenswichtigen Organen eine so intensive diffuse Protoplasmafärbung ausbilden, so würde in kürzester Zeit eine so enorme Schädigung Platz greifen, dass das Tier an der Giftwirkung einginge. Nach meiner Erfahrung gibt es nur ganz ausnahmsweise im lebenden Organismus eine Diffusfärbung. Nur, wenn schon äusserlich das Versuchstier schwer geschädigt ist, ist eine ausgeprägte Diffusfärbung in vivo zu erkennen. Im supravitalen Versuche fällt diese Lebensfrage weg. Wir sehen hier nur die physikalisch-chemische Fähigkeit des Protoplasmas, Farbstoffe aufzunehmen oder nicht. Die Funktion der Zelle, über die wir in solchen Versuchen Näheres nicht aussagen können, bleibt in diesen Versuchen ausser Betracht.

In diesem Sinne ist für mich das Resultat mit Viktoriablau B und R um so charakteristischer, als für die schlechte Löslichkeit der Farbstoffe in Wasser das Zustandekommen einer mittelstarken Diffusfärbung erstaunlich ist. Bekanntlich sind die Farbstoffe sehr grobdispers (Ruhland 1912), als solche sind sie zweifellos zum Eindringen in das Protoplasma weniger befähigt als die grosse Mehrzahl der Farbstoffe, die zur Gruppe der starken

Diffusfärber gehören. Die Lösungen beider Farbstoffe sind aber ausserdem recht instabil, besonders in physiologischer Kochsalzlösung, auf deren Verwendung man natürlich angewiesen ist.

Nach diesen Erwägungen halte ich es für gerechtfertigt, die Viktoriablaufarbstoffe der Gruppe der starken Diffusfärber einzureihen, ihre *revera* relativ schwächere Diffusfärbung dagegen auf Rechnung der hohen Kolloidität und der schlechten Löslichkeit zu setzen.

Die umgekehrte Erwägung ist bei Acridinrot 3 B am Platze: dieser Farbstoff ist sehr gut wasserlöslich, leicht diffusibel, aber von begrenzter Lezithinlöslichkeit. Die Bezeichnung „Spur“ soll heissen, dass die Konzentration nicht zu bestimmen war, das Ergebnis des Versuches einer Speicherung in Lezithinxylole aus einer $n/100$ -Lösung zeigt aber, dass seine Löslichkeit in der Tat nicht gross ist. Die mit diesem Farbstoff gesehene Diffusfärbung ist besonders auffallend, weil eine Granulafärbung in diesen Versuchen nicht zu erzielen war. Wir werden unten darauf zurückkommen.

3. Sehr klar liegen die Verhältnisse endlich bei der Gruppe der schwachen Diffusfärber. Mit Ausnahme von Nilblauchlorhydrat erreichen diese Farbstoffe keine grössere Konzentration in Lezithinxylole (bei Überschichtung des Lezithinxylole über $n/10000$ -Lösung) als $n/50000$. Nilblauchlorhydrat gehört möglicherweise aus denselben Erwägungen wie bei Viktoriablau B und R zu der Gruppe der mittleren Diffusfärber; seine wässrige Lösung ist ausserst instabil, so dass es schwer ist, einwandfreie, mit den andern Farbstoffen vergleichbare Ergebnisse zu bekommen. Die Farbstoffe also (Capriblau GON, Nilblausulfat, Neutralrot, Bismarckbraun, Methylenblau BB, BX und rectif., Methylengrün extra gelbl. O), sämtlich ausgezeichnete Granulafärber, sind auffallend wenig in Lezithin löslich.

Einige andere in der Tabelle nicht mit aufgeführte Farbstoffe wurden nicht so genau untersucht, ergaben aber keine dem Ergebnis widersprechenden Resultate. Basler Blau R und BB eignen sich zu diesen Versuchen schlecht wegen ihrer schlechten Wasserlöslichkeit, Methylgrün OO (Gräßler) ist gar nicht lezithinlöslich in meinen Versuchen. Das Ergebnis ist demgemäss besonders interessant.

Methylgrün OO, aus dessen wässriger Lösung sich nur ein violetter Farbstoff ausschütteln lässt (in schwacher Konzentration, schon von A. Fischer (1899) für eine Beimengung von Methyl-

violett erklärt), gibt wohl granuläre Zellfärbung, auch färbt sich der Kernsaft hellgrün; dass Protoplasma nimmt jedoch nur einen sehr langsam zunehmenden violetten Farbenton an. Dementsprechend ist ja auch Methylviolett ein guter Diffusfärber.

Dies Ergebnis, die völlige Abhängigkeit der supravitalen Diffusfärbung von der Löslichkeit der Farbstoffe in Lezithin, erscheint mir wichtig, besonders deshalb, weil, wie mir scheint, die Bedeutung der Lipoide für die Anreicherung von Substanzen wieder in das rechte Licht gerückt wird. Seitdem mit Sicherheit erwiesen war, dass für die Farbstoffe, mithin wohl auch für ungefärbte Substanzen, die Lipoidlöslichkeit nicht die einzige Bedingung für den Eintritt in die Zelle ist, dass also jedenfalls nicht an der Oberfläche der Zelle eine Lipoidhaut vorhanden sein kann, die ganz allgemein lipoidunlöslichen Substanzen den Eintritt verwehrt, war man vielfach in das andere Extrem verfallen und hatte die Lipoide der Zelle für völlig bedeutungslos für den Stoffaustausch der Zellen angesehen.

Aus meinen Versuchen geht nun zwar nichts hervor, das für eine solche Bedeutung der Lipoide im normalen Zellenleben sprechen würde. Es ist nur, so scheint mir, bestätigt, was von anderer Seite auf Grund ganz andersartiger Überlegungen behauptet worden ist, dass im Zellenprotoplasma in jedenfalls ultramikroskopischer Weise verteilte Lipoide einen wichtigen Anteil an der Zusammensetzung dieses bislang noch unbekanntesten Zellenteiles nehmen.

Ich erinnere hier kurz an die Vorstellungen, die uns E. Albrecht über den Bau des Zellenprotoplasmas übermittelt hat. In seinem Vortrag auf dem Anatomentag zu Halle (1902) äusserte er sich zusammenfassend folgendermassen: „1. Es existiert in den Zelleibern aller untersuchten Zellen eine Substanz in diffuser Verteilung, welche a) sehr leicht abspaltbar ist, b) schon durch Aufbewahrung bei Körpertemperatur (Diffusion von Plasma?) zu Ausbreitungserscheinungen (Myelintropfenbildung) gebracht werden kann, und welche c) bei Unterbindung und Wiederlösung von Nierenarterienligaturen eine diffuse und massenhafte Myelintropfenbildung (Pseudo-Fettdegeneration) in den Nierenzellen erzeugt. 2. Diese Substanz oder Substanzkategorie (Myelin = Lezithin?) erscheint demnach geeignet, die Leichtigkeit zu erklären, mit welcher sich durch einfache Salzlösungen, ja auch

durch Wasser das Zytoplasma entmischen lässt. Wahrscheinlich handelt es sich bei der tropfigen Entmischung um eine Bildung minimaler Mengen von Seifen, welche alsdann die entweder nur in Eiweiss gelösten (Quincke) oder mit diesem in äusserst lockerer Verbindung stehenden Myelinsubstanzen zu einer explosionsartigen Ausbreitung an der Oberfläche kleinster dadurch gebildeter Tropfen bringt. Die auffällige Gleichmässigkeit dieser Tropfen weist auf eine ziemlich gleichmässige Verteilung der betreffenden Substanzen in der Zelle hin. (1902.)“

In neuester Zeit führten kolloidchemische Experimente und Überlegungen W. W. Lepeschkins (1913) zu der Auffassung, dass „die Hauptmasse des Protoplasmas eine emulsionskolloide Lösung mit flüssigem Dispersionsmittel darstelle, welche wahrscheinlich zugleich molekular und mehrphasig ist.“ Das Auftreten von Granulis, Fibrillen und anderen Strukturelementen fasst er als durch eine Dispersionsverringering bedingt auf. Da Lepeschkin, wie auch schon andere vor ihm, zu einer strikten Ablehnung der Hypothese kommt, es gäbe eine besonders differenzierte Oberflächenschicht des Protoplasmas, so sucht er den Grund dafür, dass eine Vermischung des Protoplasmas mit der umgebenden Flüssigkeit nicht eintritt, in dem Umstande, dass das Dispersionsmittel des Protoplasmas eine ölartige Substanz sei. Diese Flüssigkeit muss aber Wasser, und zwar molekular, lösen können, weil bei der Plasmolyse und Deplasmolyse Wasser durch das Protoplasma bekanntlich sehr schnell durchdringt; hätte sich aber Wasser dabei im Protoplasma kolloid gelöst, das heisst, wäre es nur in ultramikroskopisch kleine Teilchen zerteilt, so würden sich die im Zellsaft molekular gelösten Stoffe auch in diesen kolloiden Wasserteilchen gelöst erhalten und mit denselben durch das Protoplasma hindurchgehen, was nicht der Fall ist. (S. 189.)

Lepeschkin stützt sich für diese Auffassung unter anderem auch auf das Verhalten von Farbstoffen. Bei den Farbstoffen, welche gleich schnell durch die Zellenwand diffundieren, hat die Löslichkeit in ölartigen Substanzen eine grosse Bedeutung: die öllöslichen Farben diffundieren viel schneller durch das Protoplasma, als die in Öl unlöslichen. (S. 190).

Mit den Lipiden innig verbunden sind die Eiweisskörper, die das Wasser in Lösung enthalten: „diese Verbindung (der Lipide mit den Eiweisskörpern) muss flüssig sein und nach

ihrer Zersetzung Eiweisskörper in fester Form und in ihnen gelöstes Wasser ausscheiden, so dass die homogene flüssige Grundmasse der lebenden Substanz nach dem Absterben und der stattgefundenen Koagulation als eine porige, schwammartige Masse erscheint, deren Kanäle mit Wasser erfüllt sind und die infolgedessen für alle in Wasser löslichen Stoffe gleich permeabel wird.“

An den Ausführungen Lepeschkins interessiert für jetzt besonders, dass sie die diffuse Verteilung lipoider Substanzen in der Grundmasse des Protoplasmas sehr wahrscheinlich machen.

Es ergibt sich demnach, dass die Beziehung der Farbstoffe zur Grundmasse des Protoplasmas, die meine Experimente darstellen, sehr wohl so erklärt werden kann, dass wir es in diesem Falle tatsächlich mit einem Lösungsvorgange zu tun haben. Die Diffusfärbung wäre demnach nichts weiter als der Ausdruck für die Lösungsfähigkeit eines Farbstoffes in der kolloiden Lösung der Protoplasmagrundmasse

Hierbei ist allerdings die Einschränkung zu machen, dass bisher noch keine befriedigende Erklärung für die Tatsache der Lipoidlöslichkeit gegeben wurde: welcher Art die Lösungsvorgänge in Lipoiden sind, ob es sich dabei um Adsorptionserscheinungen handelt, ob andere chemische oder physikalische Vorgänge hierbei mitspielen, ist noch nicht genügend erklärt. So lange wir jedenfalls die Aufnahme der Farbstoffe in die Lipoiden als eine Lösung betrachten, so lange sind wir auch berechtigt, von einer Lösung der Farbstoffe im Protoplasma zu sprechen.

Wie eigene noch unveröffentlichte Versuche und solche meiner Schülerin L. Kummer zeigen, ist das Parallelgehen von Lezithinlöslichkeit und Diffusfärbungsgrad nicht auf die basischen Farbstoffe beschränkt. In einer Reihe von zirka 40 sauren Farbstoffen, die eine mehr oder weniger starke Löslichkeit in Lezithinxylole besitzen, stufte sich ebenfalls die im supravitalen Versuche gefundene Diffusfärbung nach dem Grade der Lezithinlöslichkeit ab.

Ich halte es für noch nicht an der Zeit, in ausgedehnte Erörterungen über das Problem der Farbstoffbindung an Bestandteile des Protoplasmas einzutreten, da bisher wirklich brauchbares ausführlich bearbeitetes Material für diese Fragen noch spärlich vorliegt. Auch hier sind es, so viel ich sehe, nur die Untersuchungen von E. Nirenstein, die zu dem gleichen Problem Stellung nehmen.

Die Diffusfärbung des Protoplasmas ist nach Nirenstein gebunden an ein Lipoid, das sich wie ein Gemisch von Öl und etwas fettlöslicher Säure (Ölsäure) und Base (Diamylamin) verhält. Das käufliche Lezithin hat eine grosse Übereinstimmung mit dem oben bezeichneten Gemisch, soll diese aber einer durch teilweise Zersetzung bewirkten Verunreinigung durch Säuren und Basen verdanken. Die Übereinstimmung mit meinen Ergebnissen ist evident; mir lieferte die Verwendung von Lezithin die gleiche Beziehung wie Nirenstein das Öl-Ölsäuregemisch.

Die wesentliche Übereinstimmung mit den mir bei Aufindung der Beziehungen zwischen Lipoidlöslichkeit und Diffusfärbungsvermögen der Farbstoffe gänzlich unbekannten Versuchen Nirensteins gibt meinem Schlusse eine erhebliche Sicherheit. Es ergibt sich also, dass in dem Protoplasma in erheblichen Mengen ein Lipoid, vermutlich lezithinartiger Natur, vorhanden sein muss. Dieses Lipoid beeinflusst in supravitalen Versuchen in ausschlaggebender Weise die Farbstoffspeicherung. Aus der Art dieser Farbstoffspeicherung lässt sich schliessen, dass das Lipoid im Protoplasma gleichmässig verteilt ist und nicht etwa seinen Sitz in Teilen der vital färbbaren Granula hat.

Diese Tatsache hat meines Erachtens eine weittragende Bedeutung für die Auffassung des Zellenbaues. Es muss dabei besonders hervorgehoben werden, dass von den zu beobachtenden Färbungserscheinungen ausschliesslich die Diffusfärbung mit dem Grade der Lipoidlöslichkeit parallel geht. Die Tendenz zur Granulafärbung verhält sich geradezu umgekehrt, wie die Angaben der Tabelle auf S. 512 deutlich zeigen. Im wesentlichen lässt sich das so ausdrücken, dass geradezu ein relativ geringer Grad von Lipoidlöslichkeit nötig ist, um eine Granulafärbung in den Zellen zu ermöglichen; vielleicht würde die Granulafärbung bei einem vollständig lipoidunlöslichen Farbstoff, sofern er nur basisch ist, die höchste Elektivität erreichen.

Aus dieser Tatsache schliesse ich, dass Lipoide für das Zustandekommen der Granulafärbung nicht in Betracht kommen, wodurch also auch die Schlüsse ihre Bestätigung finden, die wir aus dem morphologischen Bilde und der Entstehung desselben bei der basischen Granulafärbung zogen. Wie ich weiter unten erörtern werde, befinde ich mich mit dieser Auffassung im

Gegensatz zu Nirenstein, der sich die Granula ebenfalls aus Lipoiden aufgebaut denkt.

Ich glaube, dass die Ergebnisse meiner supravitalen Versuche, die Beachtung der Diffusfärbung und ihrer Abhängigkeit von der Lipoidlöslichkeit wohl geeignet sind, zu einer Revision der bisherigen Ergebnisse der Lipoidhypothese von Overton anzuregen. Viele Tatsachen, die früher auf den Lipoidgehalt einer Oberflächenschicht bezogen wurden und so wohl fälschlicherweise für das Permeabilitätsproblem verwertet wurden, dürften durch den Nachweis der Beziehungen der lipoidlöslichen Farbstoffe zum intergranulären Protoplasma in ein neues Licht gerückt werden.

4. Die Lipoidlöslichkeit verschlechtert die Elektivität der Granulafärbung durch basische Farbstoffe.

Die Angaben des vorigen Kapitels haben abgesehen von der Bedeutung der Zellipoide für die Diffusfärbung auch schon das bemerkenswerte Ergebnis gefördert, dass der Grad der Lipoidlöslichkeit der basischen Farbstoffe gerade im umgekehrten Verhältnis steht zu der Güte der Granulafärbung, die mit den Farbstoffen erzielt werden kann (vergleiche dazu die Tabelle S. 512). Dies Ergebnis ist deshalb wichtig, weil es die erste Feststellung einer allgemeinen Eigenschaft der Farbstoffe ist, die mit dem wechselnden Wert dieser Farbstoffe für eine vitale Granulafärbung parallel geht.

Fast alle guten Granulafarbstoffe sind relativ wenig lipoidlöslich; unter den sehr stark lipoidlöslichen Farbstoffen zeigen nur die Viktoriablaufarbstoffe eine, allerdings mit beträchtlicher Diffusfärbung verknüpfte deutlich ausgeprägte Granulafärbung. Unter den Farbstoffen von mittlerer Lezithinlöslichkeit fallen durch das Fehlen der Befähigung, Granula zu färben, zwei Farbstoffe auf: Rhodamin S extra, Acridinrot 3B.

Die Beziehungen sind so auffallend, dass man schon durch sie zu dem Schlusse gedrängt wird, dass die Lezithinlöslichkeit der basischen Farbstoffe dadurch auf die Granulafärbung hindernd einwirkt, dass die Farbstoffe sich zum grössten Teile in dem intergranulären, lipoidhaltigen Protoplasma einlagern. Dieser naheliegende Schluss liesse aber den Einwand zu, dass Färbung des Protoplasmas und Granulafärbung keineswegs so innig mit-

einander verknüpft seien, sondern dass beide Erscheinungen nur nebeneinanderhergehen. Ausserdem mussten die auffallenden, oben erwähnten Ausnahmen noch erklärt werden.

Ich suchte daher die nach den bisherigen Feststellungen vermuteten Zusammenhänge zwischen den Lipoiden des Protoplasmas und den Granulasubstanzen im Reagenzglas nachzuahmen und ging dabei von folgender Überlegung aus: Der Farbstoff, der in dem Aussenmedium enthalten ist, muss jedenfalls, ehe er an die Zellgranula kommt, die Grundmasse des Protoplasmas durchdringen. Hierbei kommt er in innige Berührung mit den gleichmässig in der Zelle verteilten Lipoiden. Ist er in diesen sehr gut löslich, so wird er, bevor er die Zellgranula erreichen kann, im Protoplasma haften bleiben: er wird diffus färben. Auf die Lokalisation des basischen Farbstoffes wirkt aber andererseits ohne Zweifel der Zug der sauren Substanzen ein, die in den Zellgranulis ihren Sitz haben. Ist dieser Zug stark, haftet andererseits der Farbstoff nicht zu stark an den Zelllipoiden, so wird es zu einer vorwiegend granulären Färbung kommen.

Besteht wirklich dieser Widerstreit zwischen dem Einfluss der Lipoiden und den sauren Granulasubstanzen, so kommt es darauf an, zu untersuchen, wie der in Lezithinxytol gelöste basische Farbstoff sich zu einer mit Lezithin nicht mischbaren Säure verhält. An Stelle der unbekannten Säuren in den normalen Zellgranulis konnte ich in die wässrige Phase gewisse Mengen saurer Farbstoffe geben, da ja die Übereinstimmung saurer Farbstoffgranula mit den normalen Zellgranulis bei Färbung durch basische Farbstoffe erwiesen ist.

Demnach schichtete ich Lezithinlösungen basischer Farbstoffe von bekannter Konzentration über bestimmte Quantitäten in Wasser gelöster saurer Farbstoffe; bemerkenswerterweise wird ein Teil der basischen Farbstoffe durch die Anwesenheit des sauren Farbstoffes in der wässrigen Phase aus dem Lipoid ausgezogen, während andere viel weniger oder gar nicht beeinflusst werden.

Für die Art meiner Versuche mag folgendes Beispiel angeführt werden:

Auramin, das mit Wasserblau im Verhältnis 2:1 ausgeflockt wird, wurde durch Erwärmen in Lezithinxytol bis zur Konzentration n/500 gelöst; von dieser Lösung wurden je 1 ccm über a) 1 ccm Aq. dest., b) 1 ccm n/1000 Wasserblaulösung geschichtet. Nach gleichmässigem Umschütteln

beider Gläschen war die Endkonzentration der Lipoidphase bei a) auf $n/600$, bei b) dagegen auf $n/1100$ gesunken. Die wässrige Phase im Gläschen a hatte einen hellgelben Ton angenommen; im Gläschen b dagegen war die Wasserblaulösung vollständig ausgefällt. Auramin war also durch das Vorhandensein des Wasserblau in der wässrigen Phase stark aus der lipoiden Phase herausgezogen worden.

Rhodamin S extra, das mit Trypanblau, dem gegenüber sich Auramin ebenso verhält wie gegenüber Wasserblau, sich auch im Verhältnis 2:1 gut ausflockt, wird aus einer $n/2000$ -Lösung in Lezithinxyloil durch einen Gehalt von $n/2000$ Trypanblau in der wässrigen Phase aus dem Lezithin nicht stärker ausgezogen als durch die reine wässrige Phase. In beiden Fällen stellt sich die Endkonzentration $n/3000$ ein.

In dieser Weise fand ich, dass alle guten Granulafärber aus der Lezithinlösung durch Trypanblau ausgezogen werden, dass dagegen die ausgesprochenen Diffusfärber durch die Anwesenheit von Trypanblau nicht beeinflusst werden.

Von Farbstoffen, die mit Trypanblau bei Vermischung beider Farbstoffe in wässriger Lösung im Verhältnis 1:1 reagieren, werden durch Trypanblau aus dem Lipoid herausgezogen: am stärksten Neutralrot, gut, aber weniger reichlich Toluidinblau und Malachitgrün, gar nicht Diamantfuchsin.

Dies Verhalten entspricht vollständig der Tatsache, dass Neutralrot der beste Granulafärber, Toluidinblau und Malachitgrün neben mittelstarker Diffusfärbung gute Granulafärbung, Diamantfuchsin bei starker Diffusfärbung sehr schlechte Granulafärbung ergibt.

2:1 fällen sich mit Trypanblau Auramin, Rhodamin S extra, Safranin G extra, Methylviolett; Auramin und Methylviolett werden etwa so stark durch Trypanblau dem Lipoid entzogen, wie Malachitgrün, Safranin in kaum eben erkennbarer Menge, Rhodamin S extra gar nicht.

3:1 fällen sich mit Trypanblau Kristallviolett, Methylengrün, Rhodamin B extra. Kristallviolett und Methylengrün werden wieder mittelstark durch Trypanblau der Lezithinlösung entzogen, während Rhodamin B extra durch dieselbe vollkommen unbeeinflusst bleibt.

Von der Mitteilung weiterer Versuche, die die hier gemachten Angaben bestätigen, sehe ich ab. Auch die zahlenmässig von mir bestimmten Werte glaube ich nicht mitteilen zu müssen, weil sie nur für den Untersucher Wert haben. Ich will hier nur zur Orientierung angeben, dass die Konzentrationsabnahme der lipoiden Phase in dem günstigsten Fall (Neutralrot) von $n/3000$ nach $n/10000$ lag. Werte, die beim Auftropfen auf Fliesspapier und Vergleich mit einer Fleckenskala sehr leicht annähernd genau bestimmt werden können. Bei den mittelstark abnehmenden Farbstoffen (Malachitgrün, Methylviolett usw.) betrug die Konzentrationsdifferenz etwa $n/2000$ bis $n/4000$, also einen Abfall auf die $\frac{1}{2}$ Konzentration, was auch noch sehr scharf bestimmt werden kann.

Die mitgeteilten Versuche haben mich überzeugt, dass die in dem Modellversuch untersuchte Beziehung zwischen einer lipoiden Phase und einer wässrigen sauren Phase in der Tat die Verhältnisse wiedergibt, die in der Zelle zwischen Grundmasse des Protoplasmas und den durch basische Farbstoffe färbbaren Zellgranulis hergestellt sind.

Damit ist der Weg angebahnt, um zu einem befriedigenden Verständnis der Tatsache zu kommen, warum unter einer grossen Reihe basischer Farbstoffe die einen Granula färben, andere diffus färben, noch andere endlich sowohl Granula wie diffus färben. Ehe ich aber dazu übergehe, zusammenfassend darzulegen, wie der ganze Vorgang der vitalen Färbung nach diesen Untersuchungen aufzufassen ist, muss ich noch auf einige Punkte hinweisen, die möglicherweise der Beweiskraft meiner Versuche entgegengehalten werden könnten.

Ich habe zunächst nur gezeigt, dass bei basischen Farbstoffen von gleicher Fällungskraft ein stärkeres Haften an der lipoiden Phase die Reaktion mit dem sauren Farbstoffe behindert, dass es also darauf ankommt, ob die Zugkraft des Lipoids oder die Zugkraft der Säure grösser ist, um eine Granulafärbung zu befördern oder zu verhindern.

Es könnte ja aber auch sein, dass an und für sich die stärkere Lipoidlöslichkeit ein Grund wäre für das Versagen der Granulafärbung. Demgegenüber ist aber auf die Farbstoffe hinzuweisen, die trotz relativ geringer Lipoidlöslichkeit schlecht oder gar nicht zu einer Granulafärbung zu bringen sind. Hierhin gehört Rhodamin S extra. Ebenso ist das Ergebnis bei Acridinrot 3 B zu erklären: dieser Farbstoff reagiert ganz auffallend wenig mit sauren Farbstoffen (mit Trypanblau z. B. 1:9). Es ist klar, dass nach dem oben Gesagten eine so geringe Fällungskraft selbst bei geringerer Lipoidlöslichkeit keine erkennbare Anreicherung des Farbstoffes in den Zellgranulis bewirken wird.

Es zeigt sich aber auch weiter, dass unter Farbstoffen, die sich annähernd gleich gut in Lezithinxylol lösen, gute Granulafärber und schlechte Granulafärber vorkommen. In diesen Fällen werden die guten Granulafärber durch Trypanblau aus der lipoiden Phase herausgezogen, die schlechten dagegen kaum erkennbar oder gar nicht: Auramin, Methylviolett, Kristallviolett, Malachitgrün werden

gut aus der lipoiden Phase herausgezogen, sind demgemäss trotz hoher Lipoidlöslichkeit gute Granulafärber, das heisst, die Granula, besonders wenn sie sauren Farbstoff enthalten, werden zuerst gefärbt, während Diamantfuchsin weder aus der lipoiden Phase extrahiert wird, noch Granula färbt.

Das Ergebnis der supravitalen Färbung mit basischen Farbstoffen wird also bestimmt durch das Konkurrieren der diffus im Zellenprotoplasma verteilten Lipide mit den granulär abgelagerten sauren Substanzen (vermutlich Eiweisse) um den Farbstoff.

An dieser Deutung, die sich mir aus den Versuchen mit allen daraufhin geprüften basischen Farbstoffen ergeben hat, halte ich auch fest angesichts der mir erst nachträglich bekannt gewordenen Mitteilungen E. Nirensteins (1913). Dieser Autor, der bezüglich der Diffusfärbung und ihrer Abhängigkeit von der Lipoidlöslichkeit zu ganz ähnlichen Ergebnissen kam wie ich, dehnt seine Theorie der vitalen Färbung auch auf die Färbung der Granula aus. Er nimmt an, dass die Färbung der Granula ebenfalls auf einem Lösungsvorgange der Farbstoffe beruht. Diese Annahme ist aber, wenigstens in dem Bericht über den Vortrag, der mir vorliegt, in keiner Weise gestützt. Im Gegenteil hatte schon Nirenstein (1905) ebenso wie schon viele andere Forscher vor ihm gezeigt, dass die Färbung der Nahrungsvakuolen bei Protozoen von dem Säuregehalt abhängig ist, dass der Inhalt der Nahrungsvakuolen nur so lange mit basischen Farbstoffen färbbar ist, so lange in der Vakuole saure Reaktion herrscht, ein Ergebnis also, das vielmehr für die Deutung der Färbung als einer Reaktion des Farbstoffes mit dem Vakuoleninhalt spricht, als für die Annahme eines Lösungsvorganges. Ich möchte zudem noch einmal darauf hinweisen, dass die genaue morphologische Betrachtung die Frage zu Gunsten einer kolloidchemischen Reaktion entschieden hat.

Nirenstein fand nun, dass Farbstoffe nur dann imstande sind, die Granula stärker zu färben als das übrige Protoplasma, wenn ihre Löslichkeit in Öl durch den Zusatz einer fettlöslichen Säure (Ölsäure) verstärkt wird. Dies ist der Fall nur bei basischen Farbstoffen, während saure und indifferente Farbstoffe nur durch den Zusatz einer fettlöslichen Base (Diamylamin) zu Öl in ihrer Löslichkeit beeinflusst werden. Ich halte es durchaus für richtig, dass die von Nirenstein gefundene Parallelität besteht, sehe aber nicht, wie durch diese Auffassung die Besonder-

heit der Granulafärbung gegenüber der diffusen Protoplasmafärbung erklärt wird.

Die Beeinflussung der Granulafärbung durch den Säuregehalt der Granula halte ich mit Nirenstein für erwiesen. Nirenstein musste aber zu Fehlschlüssen kommen dadurch, dass er die Eigenschaften der Lipoidlöslichkeit und der Säurebeeinflussung nicht getrennt prüfte; er verwischte das Bild geradezu dadurch, dass er eine fettlösliche Säure zu seinen Experimenten wählte. Er musste darum zu der Vorstellung gelangen, dass auch in den Granulis stark saure Lipide die stärkere Färbung bedingen. Nachdem aber erwiesen ist, dass auch an sicher nicht lipoiden (sauren Farbstoff-) Granulis die basische Vitalfärbung gelingt, ist die ganze Vorstellung Nirensteins bezüglich der Granula hinfällig.

In der Tat glaube ich, dass bisher einzig das oben S. 534 beschriebene Modell den tatsächlichen Verhältnissen nahe kommt. Der Farbstoff, der in die Zelle eingetreten ist, sieht sich einem Milieu gegenüber, das zu einem grossen Teil aus Lipiden aufgebaut ist. Diese Lipide sind im Zelleib diffus, möglicherweise als Dispersionsmittel für die emulsionsartige Masse des Protoplasmas (Lepeschkin 1913), verteilt. In ihm lösen sich die Farbstoffe nach Massgabe ihrer Lipoidlöslichkeit (nach Nirenstein gemessen in einem Öl, dem etwas Ölsäure und etwas Diamylamin zugesetzt ist, nach mir in Lezithinxylo). Ob ein Farbstoff fähig ist, sich in stärkerer Masse an die im Zelleib suspendierten sauren Granula anzulagern hängt ab: 1. von der Fällungskraft des basischen Farbstoffes (basische Farbstoffe mit minimaler Affinität wie Acridinrot 3 B färben schlecht) oder 2. bei gleicher Fällungskraft zweier basischer Farbstoffe davon, ob die Fällungskraft die Lipoidlöslichkeit überwiegt oder nicht.

Die Granulafärbung einerseits, die diffuse Protoplasmafärbung andererseits sind also nicht etwa graduell voneinander verschieden, wie E. Nirenstein meint, sondern sind zwei prinzipiell voneinander streng zu sondernde Vorgänge, die sich gegenseitig beeinflussen. Die diffuse Färbung ist das Ergebnis einer physikalischen Lösung der Farbstoffe in den Lipiden des Zelleibs, die Granulafärbung kommt durch die Reaktion entgegengesetzt geladener Kolloide zustande und wird durch einen stärkeren Grad von Lipoidlöslichkeit behindert.

Zusammenfassung und Zusätze.

a) Morphologische Bewertung der Granula auf Grund vorstehender Versuche.

1. Die Granula, die mit basischen Farbstoffen vital und supravital färbbar sind, sind in der Regel präformierte, aber nicht integrierende Bestandteile des Zelleibs.

Es ist wohl möglich, aber nicht sicher erwiesen, dass im Protoplasma gelöste gehaltene Eiweissstoffe durch die Einwirkung basischen Farbstoffes ausgefällt werden, wodurch neue Granula entstehen könnten. Prinzipiell unterscheidet sich diese Möglichkeit nicht von der Fällung saurer Inhaltsmassen an der Oberfläche der Granula oder im Inneren derselben, ein Vorgang, der von mir genau beobachtet wurde.

Trotz der vielfach (A. Fischel 1901, E. Goldmann 1909, 1912) betonten Tatsache, dass die Granula lange Zeit, unverändert im Zelleib erhalten bleiben, sind die Granula keine unveränderlichen, zur Zelleibstruktur zugehörigen Bildungen. Ihre lange Lebensdauer hängt mit der Art ihres Zustandekommens zusammen. Als anodische Substanzen werden sie durch Dispersitätsverminderung solange in den Zellen deponiert, bis die zuströmende Flüssigkeit keine neue Zufuhr solcher Substanzen mehr bringt. Das dürfte im normalen Zelleben niemals eintreten. Deswegen sind stets derartige Granula aufzufinden. Dass sie aber nicht konstant sind, lehrt die Granulabildung, die experimentell durch die Zufuhr saurer Farbstoffe hervorgerufen werden kann. Solche Granula entstehen und werden um so stärker konzentriert, je länger eine gewisse Konzentration des Farbstoffes der speichernden Zelle zuströmt. Hört die weitere Zufuhr auf, so wird durch Dispersitätserhöhung der grösste Teil der Granula zum Ablassen und zu allmählichem Schwunde gebracht. Hier haben wir also den Beweis für die Vergänglichkeit und Veränderlichkeit des Granulainhaltes.

2. Es ist bisher noch nicht aufgeklärt, unter welchen Bedingungen sich Plastosomen, das heisst integrierende Bestandteile des Zelleibes, färben.

Bisher fehlt eine systematische Erforschung dieser Fragen so gut wie vollständig. Die zur Plastosomenfärbung angewandten Farbstoffe sind stark lipoidlöslich (Janusgrün, Methylviolett, Dahlia). Die Färbung geht, soviel aus der Literatur ersichtlich, langsam vor sich im Gegensatz zu der schnellen Granulafärbung. Dass tiefgreifende postmortale Veränderungen notwendig sind, um Plastosomen zu färben, ist noch nicht auszuschliessen.

b) Physiologische Bewertung der Granula.

1. Die Granula haben an der Farbstoffaufnahme keinen aktiven Anteil.

Die Granulafärbung ist zurückzuführen auf den Gehalt der Granula an sauren Substanzen. Darüber hinaus haben die Granula keinen Anteil an der Färbung.

Dieser Auffassung bereitet auch die Möglichkeit der Oxydasefärbung an diesen Zellgranulis keine Schwierigkeit. Die Oxydasereaktion verläuft vollständig ebenso wie die supravitale Granulafärbung, wie auch schon von anderer Seite hervorgehoben wurde. Der Oxydasefarbstoff wird sicherlich im intergranulären Protoplasma gebildet; den Granulis gegenüber zeigt er das Verhalten eines gewöhnlichen basischen Farbstoffes. Auch an sauren Farbstoffgranulis gelingt die Oxydasereaktion! Die Oxydase hat also in den Zellgranulis ihren Sitz nicht.

2. Die Granula sind einer ständigen Veränderung unterworfenen kuglige Einschlüsse des Protoplasmas mit einem flüssigen Inhalt, der vermutlich eine wässrige Lösung kolloid gelöster Stoffe (Eiweisse, Kohlehydrate, vielleicht auch Fettsäuren) darstellt.

In die Granula können sich Pigmente einlagern, ebenso wie kolloide saure Farbstoffe. Die Zahl der Granula kann vermehrt werden je nach der Zufuhr „granulafähiger“ Substanzen.

Dass der Inhalt der Granula in der Regel flüssig ist, zeigt die Beobachtung Brownscher Molekularbewegung, feiner Körnchen in „ausgeflockten“ Granulis. Nur bei extremer Konzentration, vollständiger Ausflockung, kann der Inhalt des Granulums fest werden.

Über die Natur der Inhaltsstoffe ist bisher nichts Bindendes auszusagen. Er ist jedenfalls sehr veränderlich. Dass Fettsäuren (Nirenstein) sich an dem Aufbau der Granula beteiligen, ist nicht völlig auszuschliessen; jedenfalls ist die Anwesenheit von lipoiden Substanzen für die Färbbarkeit unwesentlich, die Anwesenheit von Säuren notwendig.

Das Bestehen der Granula in der vermutlich wesentlich aus Lipoiden zusammengesetzten Lösung des Protoplasmas spricht für den Aufbau der Granula aus einer mit Lipoiden nicht mischbaren Flüssigkeit. Wahrscheinlich sind die Granula also Tröpfchen einer wässrigen Lösung.

3. Die Granula können wahrscheinlich entgiftend wirken durch Bindung basischer Gifte. Möglicherweise kommt dieses Verhalten bei der Einwirkung der Alkaloidbasen in Betracht.

Alle wesentlichen Lebensprozesse spielen sich wahrscheinlich in der Grundmasse des Protoplasmas ab; hier hat zum Beispiel die Oxydase ihren Sitz usw. Die Granula verhalten sich bei der vitalen Färbung passiv. Die Giftwirkung eines Farbstoffes entfaltet sich vermutlich um so stärker, je mehr der Farbstoff entweder infolge starker Lipoidbeziehungen oder nach Absättigung der Granula sich in die Grundmasse des Protoplasmas einlagert. Vermehrt man die Menge der sauren Zellorte im Körper durch granuläre Ablagerung saurer Farbstoffe, so wird die Giftwirkung basischer Farbstoffe abgeschwächt (s. E. Herzfeld 1916).

c) Die Färbung der Granula.

1. Die Färbung der Granula ist bewirkt durch eine Reaktion des basischen Farbstoffes mit der in den Granulis vorhandenen kolloidalen Säure.

Ob die Reaktion unter Salzbildung verläuft oder eine kolloidchemische Fällung darstellt, ist nicht entschieden. Die Vorgänge bestätigen jedenfalls die Heidenhainsche Ansicht von der Umsetzung zwischen Eiweisskörpern und Anilinfarben. Nur muss auch in diesen Fällen die physikalisch-chemische Forschung noch entscheiden, ob es sich um Kolloidfällung oder typische Salz-bildung handelt.

Ein Lösungsvorgang kommt nicht in Betracht; jedenfalls ist er stets sekundär beteiligt und analog der Lösung des Fällungsproduktes im Überschuss einer der beiden reagierenden Komponenten (saurer und basischer kolloidaler Farbstoff). Eine spezifische Löslichkeit der Farbstoffe in einer lipoiden Substanz (A. Pappenheim, R. Hoeber, E. Nirenstein u. a.) kommt für die Granula nicht in Betracht.

2. Die Färbung der Granula wird beeinflusst durch die im intergranulären Protoplasma (Grundmasse) vorhandenen Lipide.

Entscheidend ist das Verhältnis zwischen Lipoidbeziehung und Fällungskraft jedes basischen Farbstoffes. Ist bei zwei gegebenen basischen Farbstoffen die Lipoidlöslichkeit gleich gross, wird derjenige die Granula besser färben, dessen Fällungskraft die Lipoidlöslichkeit überwindet. Wenig lipoidlösliche Farbstoffe mit starker Fällungskraft sind gute Granulafärber, stark lipoidlösliche Farbstoffe mit schlechter Fällungskraft sind vorwiegend Diffusfärber.

7. Literaturverzeichnis.

1. Albrecht, E., 1902: Artefacte zur Cytologie. Verh. Anat. Ges., Halle a. S., 211—213.
2. Fischel, A., 1901: Untersuchungen über vitale Färbung. Anat. Hefte, Bd. 16, 417—519.
3. Derselbe, 1910: Vitale Färbung. Enzykl. d. mikr. Techn. 2. Aufl., 589—601.
4. Fischer, A., 1899: Fixierung, Färbung u. Bau d. Protoplasmas. Jena, 1899.
5. Garmus, A., 1912: Fortgesetzte Untersuchungen über die physiologische Permeabilität der Zellen IV. Zeitschr. f. Biol. N. F. 58, 185—236.
6. Goldmann, E., 1909: Die äussere und innere Sekretion des gesunden Organismus im Lichte der „vitalen“ Färbung. Tübingen, Laupp.
7. Derselbe, 1912: Neue Untersuchungen über die äussere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der „vitalen“ Färbung. Tübingen, Laupp.
8. Derselbe, 1913: Vitalfärbung und Zentralnervensystem. Abh. d. Kgl. Preuss. Akad. Wissensch. 1913, Physik-math. Cl.
9. Heidenhain, M., 1911: Plasma und Zelle, II. v. Bardeleben's Handb. d. Anat. 8, 434—487 (dort weitere Literatur).
10. Herzfeld, E., 1916: Über die Natur der am lebenden Tier erhaltenen granulären Färbungen bei Verwendung basischer und saurer Farbstoffe. Anat. Hefte, Bd. 54, 447—523.
11. Hoeber, R., 1901: Über die Resorption im Darm. Pflüg. Arch. 86, 199—214.
12. Derselbe, 1909: Die Durchlässigkeit der Zellen für Farbstoffe. Biochem. Zeitschr. 20, 56—99.

13. Derselbe, 1914: Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe, 4. Aufl. (dort weitere Literatur).
14. Derselbe und Nast, O., 1913: Weitere Beiträge zur Theorie der Vitalfärbung. Biochem. Zeitschr. 50, 418—437.
15. Hofer, Br., 1890: Experimentelle Untersuchungen über den Einfluss des Kernes auf das Protoplasma. Jen. Zeitschr. f. Nat. 24, 105—175.
16. Laguesse, E., 1912: Méthode de coloration vitale des chondriosomes par le vert Janus. Compt. rend. Soc. Biol. Paris, 73, 150—153.
17. Lepeschkin, W. W., 1913: Über die kolloidchemische Beschaffenheit der lebenden Substanz und über einige Kolloidzustände, die für dieselbe eigentümlich sind. Kolloidzeitschrift 13, 181—192.
18. Loewe, S., 1912: Zur physikalischen Chemie der Lipide, I—IV. Biochem. Zeitschr. 42, 150—218.
19. Michaelis, L.: Die vitale Färbung, eine Darstellungsmethode der Zellgranula. Arch. mikr. Anat. 55, 558—575.
20. Moellendorff, W. von, 1918: Zur Morphologie der vitalen Granulafärbung. Arch. mikr. Anat. (dort weitere Literatur).
21. Nirenstein, E., 1905: Beiträge zur Ernährungsphysiologie der Protisten. Zeitschr. allg. Physiol. 5, 435—510.
22. Derselbe, 1913: Das Wesen der Vitalfärbung. Verh. Ges. Deutsch. Naturf. u. Aerzte, 85. Vers. Wien 1913, II. 2, S. 8—78.
23. Overton, E., 1900: Studien über die Aufnahme von Anilinfarben durch die lebende Zelle. Jahrb. wiss. Bot. 34, 669—701.
24. Pappenheim, A., 1911: Über die Vitalfärbung und die Natur der vital färbbaren Substanzen der Blutkörperchen. Fol. haemat. 12, Arch. 289—301 (dort weitere Literatur des Autors).
25. Pelet-Jolivet, L., 1910: Die Theorie des Färbeprozesses. Dresden, Steinkopff. (dort ausführliche Erörterung der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Farbstoffe mit Literaturangaben).
26. Plato, J., 1900: Über die vitale Färbbarkeit der Phagozyten. Arch. mikr. Anat. 56, 868—917.
27. Rost, Fr., 1911: Über Kernfärbung an unfixierten Zellen und innerhalb des lebenden Tieres. Pflüg. Arch. 137, 359—421.
28. Ruhland, W., 1913: Zur Kritik der Lipoid- und der Ultrafiltertheorie der Plasmahaut nebst Beobachtungen über die Bedeutung der elektrischen Ladung der Kolloide für ihre Vitalaufnahme. Biochem. Zeitschr. 54, S. 59 (dort weitere Literatur des Autors).
29. Seyewetz, A., 1900: Sur les combinaisons des matières colorantes acides avec les matières colorantes basiques. These de Lyon.
30. Teague, O. und Buxton, B. H., 1907: Die Agglutination in physikalischer Hinsicht, IV. und V. Zeitschr. physik. Chem. 60, 469—506.
31. Traube, J. und Koehler, F., 1915: Über Farbstoffe. Intern. Zeitschr. physik.-chem. Biol. 2, 197—226.
32. Vaubel und Bartlet, 1906: Über die Verwendung von Methylenblau zur quantitativen Bestimmung von Sulfosäuren aromatischer Amido- und Oxyverbindungen. Zeitschr. f. Farbenind. 5, 102.