Über Anwendung der Ninhydrinreaktion auf mikroskopische Präparate zum Nachweis niederer Eiweißkörper:

1. In den Leberzellen (gespeichertes Eiweiß); 2. Im Blut.

Von
W. Berg.

(Aus dem Anatomischen Institut zu Königsberg i. Pr.)

(Eingegangen am 10. April 1922.)

Die histologische Methodik begnügt sich, was die Charakterisierung der Strukturen in den üblichen Canadabalsampräparaten betrifft, in der Regel damit, sie durch Färbung zu bewirken und spricht dann — von Spezialfärbungen wie diejenigen collagener und elastischer Fasern, von Fett, Glycogen, Myelin usw. kann in diesem Zusammenhang abgesehen werden — von Acidophilie, Basophilie usw., je nachdem die Zell-, bzw. Gewebsbestandteile sich mit sauren oder basischen Farbstoffen färben lassen. Diese Färbungsdifferenzen sind sehr wertvoll und haben eine Fülle von wichtigen Resultaten gezeitigt — man denke an den Begriff des Chromatins —; über chemisch faßbare Differenzen im Zelleiweiß sagen sie aber kaum etwas aus, wie denn nur ein Teil der chemischen Eiweißreaktionen auf das Gewebe anwendbar ist, wenn es seine Struktur behalten soll (z. B. die *Millonsche* Reaktion).

Bei dem großen Interesse, welches das Geschehen an den Eiweißkörpern in der Zelle und im Gewebe hat, ist die Feststellung chemischer irgendwie faßbarer Unterschiede an ihnen, wenn sie mit Beziehung auf die mikroskopische Struktur vorgenommen werden kann, von erheblicher Wichtigkeit. Auf Grund von früher gemachten Erfahrungen¹⁾ waren solche Qualitätsunterschiede aus Strukturdifferenzen zwischen den feinen Strukturen des fixierten Protoplasmas und den plumpen, tropfenähnlichen Gebilden zu erschließen, welche in den Leberzellen gut ge-

¹⁾ *A. Fischer*, Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas. Jena 1899; *G. Wetzel*, Verhandl. d. physiol. Ges. zu Berlin 1902/03, Nr. 10/11; *W. Berg*, a) Arch. f. mikr. Anat. **62**; b) **65**; c) Verhandl. d. physiol. Ges. zu Berlin 1903/04, Nr. 11.

nährter Tiere — bei Kaninchen und Kaltblütern — vorhanden sind, beim Hungern allmählich verschwinden und bei Hungertieren nur nach Fütterung von Eiweiß oder Eiweißabbauprodukten wiederkehren¹⁾). Diese Befunde sind jüngst von *Stübel*²⁾ für weiße Ratten bestätigt worden. Durch sie habe ich den Nachweis der Eiweißspeicherung in der Leber auf mikroskopischem Wege geführt.

Durch ihr Verhalten bei den histologischen Prozeduren und durch den positiven Ausfall der *Millonschen* Reaktion hatte ich im Präparat direkt gezeigt, daß die Tropfen aus Eiweiß bestanden; aus dem morphologischen Verhalten hatte ich geschlossen, daß dieses Eiweiß weniger hoch aufgebaut sein mußte als dasjenige der Protoplasmastrukturen. Wenn diese Annahme mir auch bewiesen zu sein schien, so hatte ich doch von vornherein in Aussicht genommen, die Tropfen durch weitere mikrochemische Methodik qualitativ näher zu charakterisieren. Teilweise ist dies inzwischen schon durch *Stübel* geschehen, welcher fand, daß sie durch Pepsinsalzsäure verdaut wurden. Im folgenden möchte ich nun über ziemlich lange ausgedehnte Untersuchungen berichten, welche bezweckten, die an gelösten Stoffen makroskopisch so mannigfaltig angewandte Ninhydrinreaktion in mikroskopisch brauchbarer Form auch auf das Gewebe anzuwenden, unter Bedingungen, welche den Nachweis erlauben, daß die Tropfen des in den Leberzellen gespeicherten Eiweißes aus Stoffen bestehen, welche als niedrig aufgebaute Eiweißkörper oder Eiweißabbauprodukte anzusprechen sind. Dabei ergaben sich weitere Befunde für das Blut, welche gleichfalls erörtert werden sollen.

Über Anwendung der Ninhydrinreaktion auf mikroskopisches Material sind mir nur drei Mitteilungen bekannt geworden³⁾).

O. Loew (1915) untersuchte die Giftwirkung des Ninhydrins gegenüber Bakterien, Algen, Phanerogamen, Protozoen plus Algen, Maus und Meerschweinchen. Bei *Spirogyra* fand er als Nebebefund nach Zusatz von Ninhydrin zur Kulturflüssigkeit bisweilen nach Absterben der Zellen Blaufärbung von Kern und Protoplasma, beim Meerschweinchen nach subcutaner Injektion eine Blaufärbung des Blutergusses an der Einstichstelle.

O. Loew [1918]⁴⁾ empfiehlt die Ninhydrinreaktion als mikrochemisches

¹⁾ *W. Berg*, d) *Anat. Anz.* Nr. 42; e) *Münch. med. Wochenschr.* 1913, 2; f) *Biochem. Zeitschr.* 61; g) *Münch. med. Wochenschr.* 1914, Nr. 19; h) *Zeitschr. f. Morphol. u. Anthropol.* 18; i) *Arch. f. mikrosk. Anat.* 96; k) *Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol.* 194; l) *W. Berg* und *C. Cahn-Bronner*, *Biochem. Zeitschr.* 61; *C. Cahn-Bronner*, *Biochem. Zeitschr.* 66.

²⁾ *H. Stübel*, *Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol.* 185.

³⁾ *O. Loew*, *Biochem. Zeitschr.* 1915, Nr. 69.

⁴⁾ *O. Loew*, *Flora*, N. F. 10. 1918.

Reagens auf Aminosäuren nach Versuchen an solchen rein dargestellten Körpern.

Auf die Abhandlung von *Laserstein*¹⁾ ist ausführlicher einzugehen. *Laserstein* untersuchte in der Absicht, eine Gewebsreaktion mit Ninhydrin zu erhalten, verschiedenes animalisches Gewebsmaterial, indem er ca. $\frac{1}{2}$ —1 cm Durchmesser haltende Stücke in 3—4 ccm einer Ninhydrinlösung von 0,1 : 50 ccm Wasser für 2—2 $\frac{1}{2}$ Minuten kochte. „Die Zelldurchdringung wird von der wässerigen Lösung und dem Kochprozeß entschieden stark beeinträchtigt.“ Nach dem Kochen färbten sich die Stücke fast plötzlich blau. Die Stücke wurden sofort in destilliertem Wasser mit dem Gefriermikrotom geschnitten und in Glycerin untersucht. Beließ man die Stücke nach dem Kochen einige Zeit in destilliertem Wasser, so teilte sich die blaue Farbe demselben mit. Bei Wiederholung des Kochens mit Ninhydrinlösung trat wiederum Blaufärbung des Stückes auf; an deparaffinierten Schnitten von Material, welches in Paraffin eingebettet war, mißlang die Reaktion. Froschmuskel ergab so behandelt: die Muskelfaserquerschnitte sind himmelblau gefärbt, keine Reaktion der Zwischensubstanz; Tubenquerschnitt und Ligamentum rotundum von der Frau: die Muskelzüge sind himmelblau gefärbt, die Randzone ungefärbt; Froschdarm dicht am Magen: gefärbt ist die Muskularis, weniger deutlich die Muskularis mucosae und die Becherzellen; Ausstrichpräparat von Blut, luftgetrocknet mit Alkohol behandelt, mit Ninhydrinlösung gekocht: scharfe Randfärbung der Blutkörperchen von Frosch, Kaninchen, Mensch. Beim Frosch ist die Umrandung der Kerne der Erythrocyten dunkelblau, das Stroma matter gefärbt, in den Kernen befindet sich eine große Zahl dunkelblauer Stränge. Blutarme Frauen haben eine schwächere Blaureaktion. Zotten einer ausgetragenen menschlichen Placenta: der Epithelsaum und die Blutgefäße reagieren; die kleineren Blutgefäße sind im ganzen Lumen gefärbt, die größeren im Bereich der Muscularis. Bei Injektion von Ninhydrinlösung in die Lymphsäcke des Frosches war nach 15 Minuten Reaktionslosigkeit des Tieres eingetreten; die Pigmentzellen färbten sich blau, die Muskulatur, namentlich von Bauch und Brust dunkelviolett. Injektion von Ninhydrinfarbstoff, durch Kochen mit Gewebe hergestellt, ergab dasselbe Resultat. Verfasser meint, daß die durch die Reaktion im Gewebe produzierte Färbung der Eosinfärbung ähnelt. Der Farbstoff löst sich in Wasser und kann andere Gewebe färben. Verfasser stellt die Hypothese auf, daß eine Reaktion auf Aminosäuren vorliegt, da diese weit empfindlicher als die höheren Eiweißstoffe auf Ninhydrin reagieren.

Die Veröffentlichung von *Laserstein* macht kritische Erörterungen notwendig:

¹⁾ *Laserstein*, Zeitschr. f. wissensch. Mikroskop. 1915, Nr. 32.

Das Ninhydrin ist nach *Abderhalden*¹⁾ und anderen Autoren ein äußerst scharfes Reagens auf Verbindungen, welche in α -Stellung zum Carboxyl eine Aminogruppe tragen. Es reagiert nicht nur mit Eiweißabbauprodukten, sondern, wenn auch schwächer, auch mit genuinem Eiweiß. Will man daher einen Schluß auf den Aufbau der die Reaktion gebenden Körper machen, so muß man Gruppen derselben von der Reaktion ausschließen und kann dann die Reaktion auf die restierenden Gruppen beziehen. Diesen Gesichtspunkt hat *Abderhalden* bei dem Nachweis der Abwehrfermente in der folgerichtigsten Weise durchgeführt. Da im Gewebe diffusible Körper vorhanden sind, welche die Reaktion geben, so wird bei Herstellung der Substrate (z. b. Placenta für die Schwangerschaftsreaktion) das abzubauen Gewebe gründlichst gewaschen, bis es — nach etwa 3 Stunden — schneeweiß und frei von Blut und Lymphe ist. Dann werden die enthaltenen Eiweißkörper durch wiederholtes Kochen (zunächst in 100facher Menge von Wasser für ungefähr $\frac{1}{2}$ Stunde) koaguliert und jede Spur auskochbarer Substanzen entfernt, welche die Ninhydrinreaktion geben. Wird das Substrat dann durch das zu untersuchende Serum fermentativ abgebaut, so werden die diffusiblen Abbauprodukte mittelst Dialyse durch Hülzen, welche für Pepton durchgängig sind, von ihm isoliert und im Dialysat nachgewiesen. Dabei sind mannigfaltige Kautelen notwendig, um nicht fehlerhafte Resultate zu erhalten.

In lebenden Organen sind, entsprechend ihrem Stoffwechsel, Eiweißstoffe und deren Derivate in verschiedenstem Aufbauzustand vorhanden. Wird nun frisches Gewebe in der 3- oder 5fachen Menge von Ninhydrinlösung 2—2 $\frac{1}{2}$ Minuten lang gekocht, so werden die höheren Eiweißkörper wohl zum Teil koaguliert, die reaktionsfähig bleibenden Eiweißkörper aber und die Abbauprodukte werden mit Ninhydrin reagieren und eine Blaufärbung ergeben. Diese aber auf die Anwesenheit von Aminosäuren zu beziehen, scheint nicht erlaubt zu sein, da man sich dann eigentlich nur auf die Unterschiede in der Minimalkonzentration der die Reaktion gebenden Körper stützt, und es völlig unübersichtlich ist, in welchen Mengen und Formen diese im Gewebe vorhanden sind. Außerdem ist aber noch ein weiterer Umstand zu berücksichtigen: Der bei der Reaktion auftretende Farbstoff löst sich in Wasser und kann auch andere Strukturen färben. Es ist auffällig, daß bei *Lasersteins* Versuchen Dinge die Blaufärbung gaben, welche durch saure Farbstoffe besonders elektiv gefärbt werden, z. B. Muskulatur und rote Blutkörperchen. Verfasser macht ja selbst auf die Ähnlichkeit mit der Eosinfärbung aufmerksam. Die diffusiblen Eiweißabbauprodukte geben die Reaktion beonders leicht. Ihnen ist *Laserstein* begegnet, als er fand, daß das destillierte Wasser, in dem er seine gekochten Stücke bisweilen einige Zeit liegen ließ, eine

¹⁾ *Abderhalden*, Abwehrfermente. 4. Aufl. Berlin 1914.

blaue Farbe annahm. Wenn nun auch bei der gewöhnlichen Anordnung des Verfassers diese gefärbten Körper im Stück blieben, so ist doch die Möglichkeit vorhanden, daß sie sich innerhalb des Stückes durch Diffusion verbreiteten und auf beliebige Gewebsbestandteile als Farbstoff wirkten. Es ist daher notwendig, diese sekundäre Färbung von der Reaktion von Gewebs- bzw. Zellgewebsbestandteilen in situ zu unterscheiden. Es scheint daher die Anordnung, die Ninhydrinreaktion an frischem Gewebe durch Kochen desselben in einer geringen Menge von Ninhydrinlösung vorzunehmen, nicht geeignet zu sein, um Resultate zu liefern, aus denen man verwertbare Schlüsse ziehen kann.

Will man die Reaktion am Gewebe zum Nachweis niederer Eiweißkörper usw. rationell anwenden, so muß man die höheren Eiweißkörper von der Reaktion ausschließen, die niederen Aufbauzustände reaktionsfähig erhalten und außerdem die sekundäre Färbung ausschließen.

Ich möchte nun im folgenden zeigen, wie man diese Forderungen erfüllen kann. Erleichtert wurden mir die dabei notwendigen Überlegungen durch meine langjährige Beschäftigung mit den Grundlagen der histologischen Fixation.

Fixiert man ein Gewebe, so sollen vor allem die in ihm enthaltenen Eiweißkörper (im weitesten Sinne) in eine irreversible Form gebracht werden. Im Idealfall braucht es hierbei infolge von Vorgängen, welche von geringerer als mikroskopischer Größenordnung sind, nicht zur Änderung der mikroskopischen Struktur zu kommen. Je höher die Eiweißkörper aufgebaut sind, um so leichter lassen sie sich in unlösliche Form überführen; die verschiedenen in außerordentlich großer Zahl zur Anwendung vorgeschlagenen Fixierungsmittel sind dabei je nach ihrer Zusammensetzung in verschiedener Intensität wirksam. Dieses läßt sich übersichtlicher zeigen, wenn man statt lebendes, in seinem chemischen und physikalischen Aufbau unendlich kompliziertes Gewebe zu fixieren, Lösungen von isolierten Eiweißkörpern mit Fixationsflüssigkeiten zusammenbringt und das Eintreten oder Nichteintreten der Ausfällungen beobachtet¹⁾. Stellt man Gemische von gelösten Eiweißkörpern her, welche miteinander nicht reagieren, so behalten die Komponenten die für sie charakteristischen Eigenschaften der Fällbarkeit, der Löslichkeit oder Unlösbarkeit des Niederschlages, der mikroskopischen Fällungsform usw.²⁾. Genuine Eiweißkörper lassen sich also aus ihren Lösungen leichter ausfällen als Albumosen und Peptone, diese wieder leichter als z. B. Polypeptidgemische, wie sie z. B. im Erepton vorhanden sind. Man kann demnach die Fixation so leiten, daß die höheren Eiweißkörper in irreversible Form gebracht werden, die niederen reaktionsfähig bleiben. Es kann — wie dies auch aus den weiter unten zu besprechenden Resul-

¹⁾ Vgl. *A. Fischer* und *W. Berg*, a—c.

²⁾ Vgl. *Fischer* l. c.

taten hervorgeht — angenommen werden, daß entsprechende Körper im Gewebe sich bei der Fixation ähnlich verhalten, wenn durch dieselbe das chemische und physikalische Gefüge der lebenden Substanz gesprengt wird, wie die isoliert untersuchten Bruchstücke derselben. Ich habe daher die früher gemachten Erfahrungen durch Fällungsversuche ergänzt, welche der vorliegenden Aufgabe angepaßt waren, und mit möglichster Vereinfachung mich auf zwei Körpergruppen als Testobjekte beschränkt: Die Produkte der Pepsinverdauung in Gestalt von Witte-Pepton als Vertreter der hochmolekulären, diejenigen der Erepsinverdauung in Gestalt von Erepton als Vertreter der kleinen Eiweißspaltstücke. Durch die Wahl des Witte-Pepton wurde die Reihe der höheren Eiweißkörper nur nach unten begrenzt, da ja die genuinen sich noch leichter ausfällen lassen. Als fällende Fixierungsmittel wählte ich: 5 proz. wässrige Sublimatlösung; 10 proz. wässrige Formollösung; ein Gemisch von 5 proz. Kaliumbichromatlösung plus 20% Formol (Fixierungsflüssigkeit nach *Ciaccio*). Ausgefällt wurde 5 proz. Witte-Peptonlösung und 5 proz. wässrige Ereptonlösung mit der 5fachen Menge der Fixierungsflüssigkeiten.

Das Resultat zeigt folgende Tabelle:

	5% Sublimat	10% Formol	Ciaccio
5% Witte-Pepton	+	+	+
5% Erepton	+	—	—

Sublimatlösung gab mit Witte-Pepton und Erepton eine starke, wasserunlösliche Fällung, das Filtrat keine Ninhydrinreaktion. Die Formol- und Ciaccio-Fällung des Witte-Peptons war zunächst nicht sehr stark; die Formolfällung wurde es aber nach 15—20 Minuten, die Ciacciofällung nach 2-3 Stunden; am nächsten Tage gab das Filtrat der Formolfällung keine Ninhydrinreaktion; der Niederschlag war nicht wasserlöslich. Ereptonlösung mit Formol versetzt blieb klar und gab trotz Anwesenheit des Formols deutlich Ninhydrinreaktion. Nach Zusatz von Ciaccioscher Flüssigkeit war wegen der starken gelben Eigenfärbung derselben die Ninhydrinreaktion nicht sicher zu beurteilen; Erepton-Ciaccio wurde nach dem Kochen dunkel. Mikroskopisch bestanden die Fällungen meist aus kleinen Granulis, die zu gerinnselähnlichen Bildungen zusammengefügt waren (vgl. *A. Fischer*).

Danach war als passende Fixation diejenige mit Formol oder nach Ciaccio zu wählen. Um nun im Reagensglasversuch zu ersehen, wie sich koaguliertes Witte-Pepton in Anwesenheit von gelöstem Erepton, entsprechend dem Zustand, welcher bei passender Fixation für die verwandten Körper im mikroskopischen Präparat anzunehmen wäre, bei Vornahme der Ninhydrinreaktion verhält, habe ich kleine Quanten von Sublimat- und Formalinniederschlag von Witte-Pepton gewaschen, in 10 ccm 1 proz. Ereptonlösung eingetragen und an der Aufschwemmung

die Ninhydrinreaktion angestellt. Diese wurde an der Flüssigkeit stark positiv. Entfernte man gleich nach dem Eintreten der Blaufärbung die Flöckchen des bei Sublimatfällung gröberen, sich mikroskopisch in der Peripherie anfärbenden, bei der Formolfällung lockeren, sich im ganzen leicht violett anfärbenden Niederschlages und untersuchte ihn in Wasser unter dem Mikroskop, so verlor sich die schwache Anfärbung sehr bald, namentlich wenn man Wasser zwischen Deckglas und Objektträger durchsaugte.

Aus diesen Vorversuchen ging also hervor, daß es möglich sein müsse, durch Fixierung mit Formol und nach Ciaccio den für die erstrebte Anwendung der Ninhydrinreaktion passenden Zustand der Eiweißstoffe des Gewebes herbeizuführen: daß die höheren Eiweißkörper von der Reaktion ausgeschaltet würden und nur die kleineren Bruchstücke reagierten. Der Versuch mit Peptonfällung plus Ereptonlösung zeigt, daß bei der Reaktion des Ereptons keine störende Sekundärfärbung des Niederschlages zu erfolgen brauchte bzw. daß sie leicht durch Wasser zu entfernen wäre.

Trocknete man allerdings Proben der gewaschenen Fällung von Sublimat-Witte-Pepton, Formol-Witte-Pepton, Sublimat-Erepton auf Objektträgern auf und färbte mit der stark blauvioletten Flüssigkeit, welche man durch Ninhydrinreaktion mit Ereptonlösung erhalten kann, und welche als Ninhydrinfarbe bezeichnet werden soll, so erhielt man je nach der Konzentration der verwandten Ereptonlösung nach 5–15 Minuten Einwirkung eine violettblaue Färbung der Niederschläge, welche auf Durchsaugen von Wasser etwas verblaßte, aber für die nächsten Stunden nicht verschwand. Hieraus erhellt die Notwendigkeit, besonders bei Trockenpräparaten und dergleichen, parallel mit der „Reaktion“ Färbungen mit dem Ninhydrinfarbstoff anzustellen, um die Effekte der letzteren zu konstatieren und bei den Effekten der Reaktion eine sekundäre Färbung ausschließen zu können.

Auf diese Weise waren die Richtlinien gegeben, nach denen das histologische Material zu bearbeiten war. Ich habe zur Untersuchung der Tropfen des in Leberzellen gespeicherten Eiweißes Lebern von *Salamandra maculata*, welche wie die kontrollierenden Parallelpräparate zeigen, die Eiweißtropfen reichlich (6 frisch gefangene gut genährte Tiere), oder nicht (4 Tiere, welche 9–10 Monate gehungert hatten) enthielten, in Würfeln von etwa 2–3 mm Kantenlänge für 18–24 Stunden in 50 ccm 10 proz. Formollösung oder Ciaccio-Flüssigkeit fixiert. Das Material wurde also für eine verhältnismäßig lange Zeit der Wirkung einer verhältnismäßig großen Menge des Fixationsmittels unterworfen. Danach wurde $\frac{1}{2}$ –1 Stunde lang in fließendem Wasser ausgewaschen und das Material mit einem Gefriermikrotom 10 und 15 μ dick, zu bestimmten Zwecken auch dicker, geschnitten. Die Schnitte wurden in

kleinen gläsernen Abdampfschalen mit Ninhydrinlösung 0,1: 50 einheitlich eine Minute lang gekocht und dann in Glycerin untersucht.

Es ist darauf hinzuweisen, daß man das histologische Material sehr genau kennen muß, an welchem man die Ninhydrinreaktion anstellen will, und daß diese in der angewandten Form nur eine ergänzende Methode der Untersuchung darstellt. Das Kochen ist für die Schnitte nicht gleichgültig; sie schrumpfen gewöhnlich recht stark und falten sich sehr leicht und sind deswegen bisweilen vielleicht nur in der Hälfte ihrer Fläche bequem bei starker Vergrößerung zu untersuchen. Am unempfindlichsten und dabei am besten konserviert waren die Ciaccioschen Präparate. Lebermaterial, in dessen Parenchymzellen viel Fett enthalten war, verändert sich weniger stark, da das inerte Reservematerial die Protoplasmastrukturen am Schrumpfen hindert.

Befunde an Salamanderlebern.

Vorausgeschickt sei, daß die Tropfen (oder Schollen) des in den Leberzellen gespeicherten Eiweißes plumpe, vielgestaltige homogene Gebilde sind, die sich deutlich von den feinen Strukturen des Protoplasmas unterscheiden. Läßt man Salamander, die sich wegen der Größe ihrer Leberzellen zu diesen Beobachtungen besonders gut eignen, ungefähr einige Wochen hungern, so verschwinden die homogenen Tropfen allmählich, indem sie sich vacuolisieren, gelbliche Eigenfarbe annehmen und andere als die bisherige histologische Färbbarkeit zeigen¹⁾. Stellte man an Schnitten von frisch gefangenen Salamandern die Reaktion wie oben beschrieben an, so waren die homogenen Eiweißtropfen in den Leberparenchymzellen deutlich violettblau gefärbt. Bei ihren Umwandlungsprodukten, den gelblichen vacuolisierten Tropfen, trat die Färbung bisweilen auf, bisweilen fehlte sie. Diese Differenz zeigte sich in gleicher Weise bei allen untersuchten Tieren und war bei den einzelnen von der Fixation unabhängig. In den Zellkernen war ab und zu die Substanz außerhalb der corpusculären Elemente des Kerns (Kernsaft) leicht violett getönt. Das Protoplasma der Leberparenchymzellen blieb ungefärbt. Es waren aber regelmäßig die Körper der (kernhaltigen) Erythrocyten stark violett mit einem Stich ins Rotbraune gefärbt. Die Stelle des Kernes blieb hell. Besonders tief blauviolett gefärbt waren die groben Granula der eosinophilen Leukocyten, die sich in und an den Blutgefäßen und in der lymphoiden Randschicht der Salamanderleber ziemlich zahlreich finden. In dickeren Schnitten zeigt das Lumen der Gefäße außerhalb der Blutkörperchen einen blauen Hauch.

In entsprechenden Schnitten von Hungertieren, deren Parenchymzellen weder homogene Eiweißtropfen noch deren Umwandlungsprodukte enthielten, ergab sich in den Parenchymzellen keine Färbung.

¹⁾ Siehe Berg d), i), k).

Dagegen verhielten sich die Erythrocyten und eosinophilen Leukocyten wie bei den gut genährten Tieren.

Färbte man nun mit Ninhydrinfarbstoff (er wurde für diese Zwecke immer durch Kochen von 10 cem 2proz. Ereptonlösung plus 0,5 cem 1proz. Ninhydrinlösung für eine Minute, Abkühlen der tief violetten Flüssigkeit hergestellt), bei Zimmertemperatur für 10 Minuten, so wurden die Schnitte makroskopisch violett gefärbt, mikroskopisch zeigte sich eine violette Färbung des Protoplasmas der Parenchym- und lymphoiden Zellen. Eine Färbung der homogenen Eiweißtropfen bei gut genährten Tieren trat nicht auf, wohl aber ab und zu eine solche der vacuolisierten Umwandlungsprodukte derselben. Die Färbung der Blutzellen war unabhängig vom Ernährungszustand deutlich und schien mit der beim Anstellen der Reaktion an ihnen auftretenden übereinstimmend zu sein. Die Gewebefärbung mit Ninhydrinfarbstoff ähnelt — und hierin kann ich *Laserstein* beistimmen — durchaus einer Färbung durch einen sauren Farbstoff wie das Eosin: Färbung des Protoplasmas, besonders Färbung der Erythrocytenleiber und der Granula der eosinophilen Leukocyten.

Wie ist das Färbungsergebnis nach Anstellung der Ninhydrinreaktion an den Schnitten zu beurteilen?

Was die homogenen Eiweißtropfen betrifft, so färben sie sich, wie ich schon in meiner ersten Mitteilung feststellte¹⁾, an fixierten Präparaten mit basischen Farbstoffen. Bei Färbung mit Methylgrün-Pyronin werden sie leuchtend rot, bei Eisen-Hämatoxylin-Färbung geben sie den Eisenlack etwas früher ab, als das Chromatin; nach Biondi gefärbt, werden sie rot mit einem Stich ins violette, wie der Nucleolus; Nach Saffraninfärbung gehen sie bei der Differenzierung in absolutem Alkohol die Farbe etwas früher ab, als das Chromatin. Nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung nehmen sie einen blaßvioletten Farbton an. Wenn diese homogenen Tropfen sich nach einiger Zeit des Hungerns in vacuolisierte umwandeln, so verlieren sie allmählich, wie ich beschrieben und abgebildet²⁾ habe, ihre Färbbarkeit durch Pyronin. Da die homogenen Tropfen basophil sind, sich beim Anstellen der Ninhydrinreaktion färbten, durch Ninhydrinfarbstoff sekundär nicht gefärbt wurden, so glaube ich das Resultat für die Tropfen des in Leberzellen gespeicherten Eiweißes so deuten zu sollen, daß unter Bedingungen, welche den oben aufgestellten Kautelen entsprechen — Reaktionsunfähigkeit der höheren Eiweißkörper, Ausschluß der sekundären Färbung — sie beim Salamander die Ninhydrinreaktion wirklich geben, also aus niederen Aufbauzuständen des Eiweißes bestehen oder wenigstens einen starken Gehalt an solchen Stoffen aufweisen.

Zu bemerken ist, daß nach Fixation mit 5proz. Sublimatlösung die sonst eintretende Reaktion nicht zu erzielen war, ebenso, daß die zur

¹⁾ *Berg*, d.

²⁾ *Berg*, i.

Vorbereitung der Einbettung in Celloidin oder Paraffin üblichen Behandlung für einige Tage mit Alkohol von steigender Konzentration das Material für die Reaktion untauglich machte.

Was nun den Befund an den Blutelementen betrifft, so ist durch *Abderhalden*¹⁾ in seiner Anweisung zur Herstellung der Substrate für das Dialysierverfahren mit aller Schärfe darauf hingewiesen worden, daß die Substrate absolut blut- und lymphfrei sein müssen, um nicht auch ohne Fermentwirkung im Dialysat einen positiven Ausfall der Ninhydrinreaktion zu veranlassen. Bei der großen Wichtigkeit der Frage für die morphologische Hämatologie, welcher von den Bestandteilen des Blutes die Ursache der Blaufärbung ist, bzw. wo im Blut niedrig aufgebaute Eiweißkörper usw. nachzuweisen sind, ob speziell die eosinophilen Granula aus solchen bestehen oder solche enthalten, habe ich den Befund der Färbung der Erythrocytenleiber und der eosinophilen Granula an Blutpräparaten selbst untersucht, da an den Schnittpräparaten von der Leber in Anbetracht des Ausfalles der Färbung mit dem Ninhydrinfarbstoff nicht festzustellen war, ob eine Reaktion auf niedrigere Eiweißkörper oder eine sekundäre Färbung vorläge.

Befunde an Blutpräparaten.

Ich habe daher von menschlichem Blut in der üblichen Weise Ausstrichpräparate auf Deckgläsern hergestellt, die ich

- a) auf trocknen ließ und durch die Flamme zog;
- b) in feuchtem Zustand sofort für 10 Minuten auf 5proz. Sublimatlösung oder 10proz. Formollösung;
- c) in der von *Weidenreich*²⁾ empfohlenen Weise durch Osmiumsäure-Dämpfe (nach Räucherung der Deckgläser) fixierte.

Wurden diese Deckgläser in Ninhydrinlösung 0,1 : 50 Wasser eine Minute lang gekocht, so war das Resultat nach Sublimatfixation negativ; nach Osmiumräucherung von 15–20 Sekunden Dauer waren die Erythrocyten violettbraun getönt und ebenso die bisweilen entstehenden blutkörperchenfreien Plasmazonen am Rand der Präparate. Eine deutliche Färbung trat ein nach Formalinfixation, nach kurzer Osmiumräucherung (5 Sekunden), besonders aber bei den bloß getrockneten Präparaten: Die Erythrocyten waren violett mit einem Stich ins Rotbraune, die Granula der eosinophilen Leukocyten tief blauviolett, die Körper der Leukocyten erhielten oft einen bläulichvioletten Ton. Die Färbung, auch diejenige der eosinophilen Granula, war deutlich stärker dort, wo die Blutkörperchen dichter angehäuft waren. Zu bemerken ist, daß die Präparate, am meisten die Trockenpräparate zu a) durch das Kochen litten, ein Teil der Schicht abgelöst wurde und die Form der Erythrocyten (am

¹⁾ *Abderhalden*, I. c.

²⁾ *Weidenreich*, Die Leukocyten und verwandte Zellformen. Wiesbaden 1911.

wenigsten die 20 Sekunden lang in Osmiumsäure geräucherten) verzerrt wurde. Durch Behandlung mit Formol quollen die Erythrocyten vielfach auf und wurden zum Teil in Blutschatten verwandelt.

Es kam also bei vollständiger Fixation wie bei der Leber zu einem negativen oder fast negativen Ausfall der Reaktion, bei entsprechend abgestufter Fixation trat eine Färbung ein.

Färbte man nun Blutausschlagpräparate mit Ninhydrinfarbstoff, so erhielt man nach beliebiger Fixation eine Färbung, welche derjenigen glich, die man in optimalen Fällen durch Kochen mit Ninhydrin erhalten hatte (Erythrocyten und eosinophile Granula waren entsprechend gefärbt, die Leukocytenleiber rötlichviolett getönt). In den Sublimatpräparaten waren auch die bisweilen vorhandenen Plasmagerinnsel rotviolett gefärbt — also eine Färbung wie durch einen sauren Farbstoff.

Unter diesen Umständen war die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß bei der „Reaktion“ eine sekundäre Färbung der Körperelemente vorläge. Es konnten die mit Ninhydrin reagierenden Stoffe aus dem Plasma stammen und rote Blutkörperchen plus eosinophile Granula färben, aber auch Stoffe, welche aus den Erythrocyten stammten, die Färbung der eosinophilen Granula sekundär bewirken. Ich habe daher den Versuch gemacht, Blutplasma und Blutkörperchen einerseits, Erythrocyten und Leukocyten getrennt vom Plasma andererseits, zu isolieren und für sich zu untersuchen. Es wurde Blut von Katzen, Hunden, Kaninchen aus der Carotis in Lösung von Ammoncitrat in Reagensgläsern aufgefangen und im Eisschrank sedimentiert. Nach 20 Stunden wurden von der überstehenden hellen Flüssigkeit und von den Erythrocytenbrei Proben entnommen, in 5proz. Formollösung, sowie in 5proz. Kaliumbichromatlösung plus 10proz. Formol eingetragen, das ausgeflockte sedimentiert, die überstehenden Flüssigkeiten abgossen. Dann wurde mit Wasser aufgeschüttelt, zentrifugiert und dies so lange (5—6 mal) wiederholt, bis die überstehende Flüssigkeit keine Ninhydrinreaktion mehr gab. Vom schließlich erhaltenen Bodensatz wurden Deckglaspräparate hergestellt und an diesen, wie oben, die Ninhydrinreaktion angestellt. Das Resultat war, daß die so isoliert fixierten und gewaschenen Erythrocyten ähnlich wie die nicht vom Plasma getrennten gefärbt wurden. Die Reaktion war schwächer, was aber bei der vorausgegangenen Behandlung kaum auffallen kann.

Die Leukocyten und Erythrocyten voneinander vollständig zu trennen, gelang nicht. Entnahm man vom gekühlten sedimentierten Blut aus dem unteren Teil der hellen, an Leukocyten sehr reichen Flüssigkeit Proben, fixierte sie, und wusch das Ausgeflockte wie den Erythrocytenbrei, so zeigte sich, daß die Anzahl der Erythrocyten zwar stark vermindert, daß sie aber nicht verschwunden waren — es fanden sich etwa

ebensoviel Erythrocyten wie Leukocyten im Präparat —. Es ist dies um so auffallender, als Formollösungen, namentlich schwach konzentrierte, hämolytisch auf die Erythrocyten wirken und ein großer Teil von diesen in Blutschatten verwandelt wird. Beim Anstellen der Ninhydrinreaktion wurden die eosinophilen Granula gefärbt, aber schwächer als in Präparaten von totalem Blut.

Danach glaube ich schließen zu sollen, daß bei der Färbung der Erythrocyten durch Ninhydrinreaktion keine sekundäre Färbung, sondern eine wirkliche Reaktion auf nicht koagulierte niedrige Eiweißkörper vorliegt, während die Entscheidung hierüber für die eosinophilen Granula noch nicht getroffen werden kann.

Zusammenfassung.

Es ist möglich, die Ninhydrinreaktion auch an histologischen Präparaten zum mikrochemischen Nachweis von niederen Eiweißkörpern bzw. Abbauprodukten in animalischem Gewebe zu verwenden. Es ist dabei notwendig, die höheren Eiweißkörper, und nur diese, reaktionsunfähig zu machen. Dies gelingt durch passende Behandlung der zu untersuchenden Organstücke bei der vorzunehmenden histologischen Fixation. Ungeeignet ist demnach frisches und nicht entsprechend fixiertes Gewebe, aber auch solches, welches nachträglich eine längere Alkoholbehandlung mit oder ohne Einbettung in Celloidin oder Paraffin erfahren hat. Es erwies sich demnach als notwendig, die Reaktion an Gefrierschnitten von entsprechend fixiertem und kurz ausgewaschenem Gewebe bzw. an Ausstrichpräparaten vorzunehmen.

Der bei der Ninhydrinreaktion entstandene Farbstoff kann, wenn er sich aus diffusiblen Körpern im animalischen Gewebe bildet, auch auf andere beliebige Strukturen färbend wirken, wenn er die genügende Konzentration hat und genügend lange Zeit einwirken kann. Er verhält sich dann wie ein histologischer saurer Farbstoff. Bei Beurteilung der Färbungseffekte in mikroskopischen Präparaten muß daher zwischen der eigentlichen Reaktion in situ und dieser sekundären Färbung unterschieden werden.

Unter Einhaltung dieser Voraussetzungen konnte gezeigt werden, daß die Tropfen des in Leberzellen gespeicherten Eiweißes bei *Salamandra maculata* die Ninhydrinreaktion wirklich geben, ebenso die Erythrocyten von *Salamandra*, Katzen, Hunden, Kaninchen und Menschen, während für die Granula der eosinophilen Leukocyten nicht entschieden werden konnte, ob eine Reaktion auf niedere Eiweißkörper bzw. Abbauprodukte in situ oder eine sekundäre Färbung vorliegt.