(Aus dem Physiologischen Institut Hamburg. Allgemeines Krankenhaus
Eppendorf.)

Zur Chemie mikroskopischer Färbungen.

Von
Otto Kestner.

Die mikroskopische Färbung hat sich im ganzen empirisch entwickelt, ohne daß sich die Forscher, die sie schufen, für das, was bei den Härtungen, Fixierungen und Färbungen chemisch geschah, groß interessiert hätten. Erst relativ spät erwachte das Bedürfnis, die Färbungen auch chemisch und physikalisch-chemisch zu verstehen. Ein zusammenhängender Versuch stammt von Mann¹⁾. Dann hat vor allem Martin Heidenhain²⁾ die Salzbildung zwischen den amphoteren Eiweißkörpern und den Farbsäuren und Farbbasen studiert. Auch Ehrlich hat die Färbungen immer im wesentlichen als mikrochemische Reaktionen aufgefaßt, während Hardy³⁾, Michaelis⁴⁾ und andere zum Teil abweichende Vorstellungen hatten. Ganz konsequent hat einer der Meister der Färbetechnik, Unna, alle Färbungen als chemische Reaktionen aufgefaßt, und er hat auch nie daran gezweifelt, daß die Färbung in einem Präparate trotz der ganz anderen Größenanordnung nach demselben Gesetz verlaufen müsse wie ein makroskopischer Versuch in einem Reagensglas. Gerade die konsequente Durchführung dieses Gedankens hat ihm zu seinen Erfolgen verholfen.

Unna ging von zwei Prinzipien aus. Erstens geht er dem Verbrauch des Sauerstoffs im Gewebe nach. Er verfolgt seine Ansammlung durch Rongalitweiß, seinen Verbrauch durch die Reduktion des Permanganats und ist dabei auf die wichtigsten allgemeinphysiologischen Probleme gestoßen und hat ihre Lösung gefördert. Am eindeutigsten sind die Versuche mit Permanganat. Für den Physiologen, der weiß, welche Mengen Sauerstoff von dem Hämoglobin gebunden werden, bietet Unnas Färbung der Vogelblutkörperchen einen der überraschendsten Anblicke. Es zeigt sich sofort, daß der Sauerstoff im Hämoglobin

¹⁾ G. Mann, *Physiological Histology*, Oxford 1902.

²⁾ M. Heidenhain, *Arch. f. d. ges. Physiol.* **90**, 115. 1902; **96**, 440. 1903; **100**, 217. 1903; *Zeitschr. f. wissenschaftl. Mikroskopie* **19**, 431. 1902.

³⁾ Hardy, *Journ. of physiol.* **24**, 158. 1899.

⁴⁾ Michaelis, *Arch. f. d. ges. Physiol.* **97**, 634. 1903.

auch nicht anders vorhanden ist als in der Luft, daß also die eigentliche Oxydation erst außerhalb des Blutes vor sich geht. Die Permanganatmethode ordnet die Gewebe in eine Reihe, und diese Reihe hat sich in den letzten Jahren, z. B. bei dem Wachstum der anaeroben Bakterien im lebenden Körper, als sehr bedeutungsvoll gezeigt. Das Gewebe ist ja im allgemeinen mit Sauerstoff durchtränkt, und es ist daher immer unverständlich gewesen, wie es hat kommen können, daß anaerobe Bakterien im Gewebe wachsen und sich vermehren. Unnas Methode zeigt, daß sofort nach Aufhören des Blutkreislaufs in manchen Geweben der Sauerstoff verschwindet, daß also diese Gewebe ein guter Nährboden für anaerobe Bakterien sind. An der Spitze der Reihe steht der Muskel, und die Kriegserfahrungen haben gelehrt, daß zirkulationslose Muskeln den Hauptnährboden für den Gasbranderreger darstellen. Längs der Muskeln finden die Gasbranderreger einen vor Sauerstoff geschützten Weg.

Unnas zweites Arbeitsprinzip besteht darin, daß er durch die verschiedene Färbung alle Zellbestandteile in saure und in basische teilt und unter ihnen wieder durch Löslichkeit und verschiedene Affinität einzelne Individuen isoliert. So gelang es ihm, nicht nur verschiedene Zellarten zu charakterisieren, sondern auch aus dem komplizierten Protoplasma einzelne Bausteine rein herauszuarbeiten. Die große Schwierigkeit, die sich dabei erhebt, ist die Doppelnatur der Eiweißkörper, von denen jeder einzelne sowohl Base wie Säure sein und deshalb mit Säuren wie Basen Verbindungen eingehen kann. Bei der grundlegenden Bedeutung der Frage für die Lehre von der Zusammensetzung und dem Bau des Protoplasmas habe ich einige Reagensglasversuche hierüber angestellt, zunächst lediglich, um in der Vorlesung meinen Zuhörern diese Dinge zu demonstrieren. Ein Teil der Versuche wurde schon 1902 ausgeführt, ein anderer erst in neuester Zeit, als mich Unnas Einfluß wieder auf diese Fragen brachte. Es ergaben sich dabei unerwartete Schwierigkeiten, und die Verhältnisse sind doch verwickelter, als es zunächst scheint.

Ich habe Fibrinflocken aus Rinderblut, die mit Wasser und Kochsalzlösung so gründlich wie möglich gewaschen waren und daher ein wenigstens einigermaßen einheitliches Material darstellen, im Reagensglas mit Farblösung angefärbt. Das ist schon früher oft geschehen, ich wollte aber vor allem den Unterschied sehen, der sich ergibt, wenn man ein und dasselbe Eiweiß einmal zur Säure macht und einmal zur Base. Ich habe daher die Fibrinflocken immer nach dreifacher Vorbehandlung jeder Farbe ausgesetzt:

1. in neutralem Wasser;
2. in stärkerer und verdünnter (normaler und $\frac{1}{10}$ -normaler) Salzsäure;
3. in normaler und $\frac{1}{10}$ -normaler Natronlauge.

Dann wurden die Flocken aus der Säure bzw. Lauge herausgenommen und gut abgespült. Es ist längst bekannt, daß die Flocke dabei Säure oder Lauge auf sich fixiert. Dann wurde die Flocke in die Farblösung gelegt. Es erwies sich als zweckmäßig, ganz verdünnte Farblösungen zu nehmen. Die Flocken reißen die Farblösung begierig an sich. Je verdünnter die Lösung ist, desto anschaulicher wird der Versuch.

Ich habe zunächst basische Farben benutzt. Außerordentlich deutlich erweisen sich die Unterschiede der Vorbehandlung beim Methylenblau. Fibrinflocken ohne Vorbehandlung färben sich in dünnerer oder stärkerer Methylenblaulösung nur ganz schwach bläulich, wobei diese schwächste Anfärbung freilich haftet und sich durch Wasser kaum ausziehen läßt. Auch wird die Flocke nicht etwa oberflächlich gefärbt, sondern die allerdings nur sehr unbedeutende bläuliche Färbung durchsetzt, wenn man auch nur 1 Stunde wartet, die ganze Flocke. Genau so verhält sich die Flocke, die vorher in Salzsäure gelegen hat, wobei es keinen Unterschied macht, ob die Salzsäure verdünnt oder stärker ist. Die Fibrinflocken quellen bekanntlich in Salzsäure, und man sollte denken, daß sie sich in gequollenem Zustande leichter färben, sie bleiben aber nur eben ganz schwach bläulich, und die Färbung nimmt auch nicht merklich zu, wenn man die Flocke 24 Stunden und länger liegen läßt.

Völlig anders ist das Ergebnis, wenn man die Flocke erst in Natronlauge legt, dann abspült und sie dann erst in Methylenblau wirft. Dann färbt sich die Flocke in kürzester Frist tiefblau. Nimmt man die Lösung genügend verdünnt, so kann ihr der größte Teil des Farbstoffes entzogen werden. Die Flocke ist durch und durch blau und gibt auch von der Farbe nichts Wesentliches ab, wenn man sie in Wasser legt. Dabei macht die Stärke der Natronlauge keinen Unterschied.

Dieses Ergebnis entspricht der Erwartung. Natronlauge macht das Eiweiß zur Säure, und nur wenn das der Fall ist, reagiert es wirklich gut mit der Basis Methylenblau.

Eine weitere basische Farbe, die ich benutzte, war Neutralrot. Hierbei ließ sich aber diese Gesetzmäßigkeit nicht erhalten. Zwar wird auch hier das nicht vorbehandelte Fibrin nur schwach gefärbt, doch ist der Unterschied lange nicht so ausgesprochen wie bei Methylenblau, und vor allem verhielt sich bei der Vorbehandlung das Fibrin gerade umgekehrt. Die aus Salzsäure stammende Flocke färbte sich schön rot, die aus Natronlauge stammende war nicht nur gelb — das entspricht dem Indicatorcharakter des Neutralrots —, sondern auch kaum gefärbt.

Umgekehrt müssen sich der Theorie nach die sauren Farben verhalten, aber von den von mir geprüften zeigt nur das Eosin die zu er-

wartende Gesetzmäßigkeit und auch dies lange nicht so ausgeprägt wie das Methylenblau. Ohne Vorbehandlung färbt das Eosin das Fibrin nur oberflächlich an. Das Fibrin, das vorher in Natronlauge gelegen hatte, färbt sich schwach, das aus Salzsäure stammende intensiv und schön rot. Auch hier machte es keinen Unterschied, ob das Fibrin vorher in den verdünnten oder in den stärkeren Lösungen gelegen hatte. Mit Säure vorbehandeltes, d. h. zur Base gewordenes Fibrin kann der Eosinlösung den Farbstoff vollständig entziehen. Am besten gelingen die Versuche mit einem Eosin, das sich in Wasser verhältnismäßig leicht und ziemlich rot löst. Schwerer lösliche, in destilliertem Wasser mehr gelbe Präparate geben weniger klare Unterschiede.

Zwei andere saure Farben, Kongorot und Alizarin, aber zeigten nun wie Neutralrot das gerade Gegenteil. Beide sind ja in saurer und alkalischer Lösung verschieden gefärbt und färbten je nachdem die Flocken rot oder blau, violett oder gelb, doch ließ sich die Intensität der Färbung unabhängig von der Farbe deutlich erkennen. Das unbehandelte und das aus der Säure stammende Fibrin färbten sich schwach, das aus der Lauge stammende, also in Säure verwandelte Fibrin dagegen sehr intensiv und durch und durch.

Ehe ich die Erklärung dieser Unterschiede gebe, seien noch einige Versuche mit gekochtem gehärtetem Fibrin angeführt. Es verhielt sich in keinem Falle anders als das frische ungekochte Fibrin, nur daß es sich bei Alizarin und Kongorot nur an der Außenseite färbte und das Innere der Flocke lange ungefärbt oder schwach gefärbt blieb. Bei Methylenblau war gar kein Unterschied zwischen frischem und gekochtem Fibrin, bei Eosin ein unbedeutender.

Dann habe ich die Fibrinflocken erst in Formol, in Flemmingscher Lösung, in Sublimat und in Bichromat gehärtet und dann erst teils direkt, teils nach Vorbehandlung mit Natronlauge oder Salzsäure gefärbt. Auch hierbei erwiesen sich die Gesetzmäßigkeiten nicht geändert, die sich bei dem frischen Fibrin fanden. Methylenblau färbte die Stücke, die in Säure gelegen hatten, und die nur fixierten Stücke kaum bläulich, die aus der Natronlauge stammenden, vorher fixierten Stücke stark blau. Eosin verhielt sich umgekehrt, Alizarin färbte die gesäuerten Stücke besser, Kongo färbte überhaupt schlecht, die gesäuerten Flocken aber immer noch besser. Diese Fixierungsversuche zeigen also, daß die Fixierungsflüssigkeiten dem Eiweiß seinen Charakter nicht rauben, daß fixiertes Eiweiß sich vielmehr zu Farben genau so verhält wie das frische nicht koagulierte Eiweiß. Für die oft erörterte Frage nach der „Wahrheit“ der Äquivalentbilder ist das natürlich wichtig.

Von anderen Eiweißkörpern habe ich Serumeiweiß und ein gereinigtes Globulin, also einen überwiegend sauren Eiweißkörper, untersucht, doch verhielten sie sich nicht anders wie das Fibrin.

Vor allem muß eine Erklärung dafür gesucht werden, weshalb sich Methylenblau wirklich so verhält, wie nach der Theorie der amphoteren Elektrolyte zu erwarten steht, Eosin auch noch einigermaßen, Neutralrot, Kongorot und Alizarin aber gerade umgekehrt. Man könnte an den chemischen Bau denken, doch kann ich dabei keinen entscheidenden Unterschied sehen. Vielmehr scheint mir entscheidend zu sein, daß die drei letzten Farben Kolloide im strengsten Sinne sind, während Methylenblau und Eosin ein gewisses Diffusionsvermögen besitzen. Durch Pergamentschlauch und durch die Pergamenthülsen, die zu der Abderhaldenschen Reaktion benutzt werden, diffundieren die drei anderen Farben so wenig wie etwa Hämoglobin oder Serumeiweiß, Methylenblau dagegen recht rasch und Eosin wenigstens langsam. Die meisten der gebräuchlichsten, mikroskopischen und Gespinstfarben werden auch, wie ich aus früheren Versuchen weiß, nicht resorbiert. Ich habe seinerzeit bei durchsichtigen Meeresschnecken viele Farben verfüttert¹⁾, der im Leben ohne weiteres sichtbare Darm färbte sich an, ließ aber niemals eine Spur von Farbe in das Blut übertreten, nur Methylenblau passierte ihn.

Methylenblau ist also kein Kolloid im strengen Sinne, Eosin ist kolloidaler, diffundiert aber auch noch. Diese zwei Farben bilden daher mit dem Eiweiß wirkliche Salze, so gut wie das Salzsäure oder Metalle tun²⁾. Hier gelten alle Gesetzmäßigkeiten, die bei solchen Salzen zu erwarten sind. Die rein kolloidalen Farben hingegen vermögen mit Natronlauge, Salzsäure usw. Salze zu bilden (Indikatoren), aber nicht mit dem Eiweiß, das selbst ein Kolloid ist. Für die Reaktion zweier Kolloide miteinander gelten ganz andere Gesetzmäßigkeiten.

Endlich muß noch darauf hingewiesen werden, daß das Fibrin sich zwar gut mit Methylenblau nur dann färbt, wenn es vorher durch Alkali zur Säure geworden ist, daß es sich aber auch mit entgegengesetzter Vorbehandlung wenigstens etwas färbt, und daß diese Spur von Farbe festhaftet; ebenso färben sich Baumwollfäden, zumal wenn sie rauh, d. h. mit feinsten Fäserchen besetzt sind, oberflächlich mit Methylenblau, und auch diese oberflächliche, niemals in die Tiefe gehende Färbung haftet recht fest. Hier ist gar kein Stoff vorhanden, der chemisch reagieren könnte. Man muß hier, wie bei der ganz schwachen Anfärbung der falsch oder nicht behandelten Flocke, von „Adsorptionen“ reden, die ja bei großer Oberfläche, wie in der Zelle, eine erhebliche Rolle spielen³⁾.

Man wird also gut tun, bei mikroskopischen Färbungen drei verschiedene Möglichkeiten zu unterscheiden:

¹⁾ O. Cohnheim, Zeitschr. f. physiol. Chemie **80**, 95. 1912.

²⁾ J. Sjöqvist, Skand. Arch. f. Physiol. **5**, 1894.

³⁾ O. Warburg, Arch. f. d. ges. Physiol. **155**, 547. 1914. *Ergebn. d. Physiol.* **14**, 254. 1914.

1. Adsorption. Auf diese Weise kommt nur eine schwache Färbung zustande, wie wir sie z. B. bei Nachfärbungen bei Eosin sehen, mit dem sich eigentlich alles färbt, was nicht durch andere Farben besetzt ist.

2. Chemische Reaktion. Farben, die keine Kolloide sind, bilden mit dem Eiweiß der Zellen gefärbte Salze, die infolgedessen, wenn man die erforderliche Einschränkung für den Doppelcharakter der Eiweißkörper macht, zur mikrochemischen Reaktion benutzt werden können.

3. Reaktion zwischen Kolloiden. Kolloidale Farben reagieren mit den kolloidalen Zellbestandteilen nach besonderen Gesetzen, die von denen der Salzbildung abweichen.

Nur die Färbungen der zweiten Gruppe sind für Lokalisationsstudien und für die chemische Charakterisierung der gefärbten Substanz brauchbar, die Mehrzahl der mikroskopischen Farben aber gehört zur 3. Gruppe.