II. Aus der Königlichen medizinischen Universitäts-poliklinik in Berlin.

(Direktor: Geh. Med.-Rath Prof. Dr. Senator.)

Ergebnisse vitaler Blutfärbung.

Von Privatdozent Dr. Heinrich Rosin, Assistenten der Poliklinik und cand. med. E. Bibergeil.

Im Laufe des Zeitraumes von ungefähr zwei Dezennien, seitdem Ehrlich die vitale Methode der Methylenblaufärbung angegeben hat, ist diese Färbungsweise von sehr vielen Autoren erfolgreich angewendet worden und hat namentlich auf dem Gebiet der Nervenhistologie gute Resultate ergeben. Ehrlich hat sodann einen zweiten basischen Farbstoff als besonders geeignet für den gleichen Zweck empfohlen, nämlich das Neutralroth. Während das Methylenblau, vom lebenden Gewebe als farblose Leukobase aufgenommen, erst beim Absterben desselben (und zwar nur in einem beschränkten Zeitraum des Absterbens) als blaue Farbe hervortritt, welche dann allerdings in zartester Weise die Strukturbilder wiedergibt, zeichnet sich das Neutralroth dadurch aus, dass es nicht von den Geweben, resp. Gewebssäften zu einer farblosen Verbindung reduziert wird, sondern sie noch intra vitam färbt. So gelingt es mit Leichtigkeit, durch subkutane Injektion oder durch Verfütterung desselben, Thiere vollkommen roth zu färben und roth zu erhalten, was beim Methylenblau in gleicher Weise nicht möglich ist und erst nach dem Tode bei Zutritt von Luft geschieht.

Auch am Blute sind seit einiger Zeit Versuche der vitalen Färbung mit den genannten Farbstoffen im Gange. Für die Beobachtung der Vorgänge hierbei ist das Blut ja besonders geeignet. Die histologischen Elemente dieses hochdifferenzirten Gewebes, zu Zellverbänden nicht zusammengeschlossen, gestatten eine besonders leichte Imbibition der Farben, und der Granulareichthum der weissen Blutzellen, die wir seit Ehrlich dementsprechend in fünf Gruppen theilen, bietet dem Studium der Farbenanalyse ein besonders ergiebiges Feld; so konnten hier von der vitalen Färbung weitere histologische Ergebnisse erhofft und deren Resultate eventuell auf andere Gewebe übertragen werden, auch war die Möglichkeit zur Auffindung von neuen, für die Pathologie der Blutkrankheiten wichtigen Thatsachen gegeben.

Unter denjenigen Forschern, die sich mit vitaler Blutfärbung nach verschiedenen Methoden beschäftigt haben, seien hier angeführt: Arnold¹⁾ (Neutralroth), Michaelis,²⁾ Plato,³⁾ Unna⁴⁾ (Neutralroth),

Nakanishi¹⁾ (Methylenblau), Marcus²⁾ (Neutralroth), Bettmann³⁾ (Neutralroth), Levaditi, A. Wolff⁴⁾ (Methylenblau), welcher letzterer die Deetjen'sche⁵⁾ Methode mit der Färbung verband. In unserer ausführlichen Arbeit, die demnächst erscheinen wird, werden wir noch genauer auf die Ergebnisse dieser Forscher einzugehen haben; im Nächstfolgenden werden wir nur die für unsere Beobachtungen besonders wichtigen Resultate derselben berücksichtigen.

Unsere eigene Untersuchungsmethode ist bereits in der Arbeit von Ito⁶⁾ kurz niedergelegt.

Ihr Prinzip beruht darauf, dass wir, ebenso wie dies Nakanishi mit Methylenblau auf dem Objektträger gethan hat, die Deckgläschen in dünnster Schicht mit den verschiedensten Farbstoffen und Farbstoffverbindungen beschicken. Auf diese wird dann ein Blutstropfen fein ausgebreitet, das so auf der Farbstoffdecke ausgezogene Blut in die Höhlung eines konkav geschliffenen Objektträgers gebracht und mittelst Paraffin luftdicht abgeschlossen. Um eine dünne niederschlagfreie Farbschicht zu erzielen, muss die Farblösung, die wir bald alkoholisch, bald concentrirt wässrig herstellten, mit einem Kunstgriff auf das Deckgläschen gebracht werden, den, wie wir ersehen, auch Jancso und Rosenberger⁷⁾, und nach ihnen Schüffner⁸⁾ behufs Ausbreitung des Blutes bei Malariauntersuchungen angewandt haben. Die eine Kante eines Deckgläschens (24 mm) wird mit der Farblösung benetzt und dann so über die Fläche des zweiten zu färbenden gestrichen, dass die Kante vollkommen auf der Fläche aufsitzt und die Ebenen beider Deckgläschen in einem wenig spitzen, nahezu rechten Winkel zu einander stehen. So aufgesetzt, wird das eine Deckgläschen über die Fläche des andern derart hinweggezogen, dass die Farblösung, die am Scheitel jenes Winkels gelegen ist, der hinübergleitenden Kante nachfolgend, die Fläche des andern Deckgläschens gleichmässig benetzt. Alkoholische Lösungen breiten sich so sehr leicht und gleichmässig aus; bei wässrigen Lösungen ist trotz vorheriger Behandlung der Deckgläschen mit Alkohol und Aether keine gleichmässige Vertheilung zu erzielen; mit einem sauberen Lappchen wird dann noch durch Wischen, das stets in gleicher Richtung zu erfolgen hat, das erwünschte Ziel erreicht.

Lässt man die so behandelten Deckgläschen trocknen, so erscheint die Farbe nur wie ein Hauch auf den Gläschen, und wird deutlich erst auf weissem Untergrunde erkannt. Größere Niederschläge und Krystallbildungen dürfen absolut nicht geduldet werden; nur mag die Anwesenheit einiger weniger Krystallbüschel oder Körnchen gestattet sein.

Die Ausbreitung des Bluttröpfchens selbst auf die so vorbereiteten Deckgläschen erfolgt in derselben Weise, wie die Auftragung der Farbe. Der aus der wohlgereinigten Fingerbeere oder dem Ohrläppchen entnommene Blutstropfen wird wiederum mit der Kante eines Deckgläschens auf die Farbstoffseite eines gefärbten aufgetragen. Dieser Vorgang muss rasch erfolgen, unter grösstmöglicher Schonung des Blutes, und ebenso schnell muss das fertig beschickte Deckgläschen auf den hohl geschliffenen Objektträger gebracht werden, der schon zuvor sorgfältig und in weiter Ausdehnung in der Umgebung der Aushöhlung mit Paraffin bestrichen ist. Das Präparat wird jetzt fest angedrückt, seine Peripherie noch besonders mit Vaseline umrandet, und auf diese Weise das in der Konkavität des Objektträgers eingeschlossene Blut vor Austrocknung bewahrt.

So gelingt es, das Blut längere Zeit frisch, zunächst sogar lebend und beim Absterben in weiterhin näher zu beschreibender Weise gefärbt zu erhalten.

Ueber die Vitalität des gewonnenen Blutstropfens kann man übrigens noch bessere Aufschlüsse am farblosen, als am gefärbten Präparat erhalten; denn die Anwesenheit der Farbe schädigt selbstverständlich die Elemente des Blutes schon durch die Aenderung der molekularen Concentration des Serums, in welchem sie sich auflösen, dann aber auch durch eigene Giftwirkungen, Thatsachen, auf welche wir in unserer ausführlichen Arbeit näher eingehen wollen. Hingegen zeigt sich, dass das auf ungefärbte Deckgläschen in gleicher Weise aufgetragene und luftdicht abgeschlossene Blut ausserordentlich resistent gegen Formenveränderungen ist und viele Tage, bis zu einer Woche hin, mit Ausnahme der Blutplättchen erhalten bleibt, die, wie bereits Deetjen gezeigt hat, verhältnissmässig frühzeitig absterben. Die Leukocyten aber konnten wir auch ohne Erwärmung des Objekttisches noch nach 2 mal 24 Stunden zum Theil in schöner amöboïder Bewegung beobachten. Besonders hervorheben möchten wir, dass wir in solchen frischen Präparaten mit Sicherheit auch an den kleinen und grossen Lymphocyten

¹⁾ Nakanishi, Münchener medizinische Wochenschrift 1900, No. 6.

²⁾ Marcus, Wiener klinische Wochenschrift 1900, No. 39.

³⁾ Bettmann, Münchener medizinische Wochenschrift 1901, No. 24.

⁴⁾ A. Wolff, Berliner klinische Wochenschrift 1901, No. 52.

⁵⁾ Deetjen, Virchow's Archiv Bd. CLXIV, Heft 2.

⁶⁾ Ito, Allgemeine medizinische Centralzeitung 1901.

⁷⁾ Jancso und Rosenberger, Deutsches Archiv für klinische Medizin Bd. CVII, S. 449, referirt nach Centralblatt für Bakteriologie Bd. XXIII.

⁸⁾ Schüffner, Deutsches Archiv für klinische Medizin Bd. LXIV.

¹⁾ Arnold, a) Virchow's Archiv 1899, Bd. CLVII, Heft III; b) Virchow's Archiv 1900, Bd. CLIX, Heft I.

²⁾ Michaelis, Archiv für mikroskopische Anatomie 1900.

³⁾ Plato, Münchener medizinische Wochenschrift 1900, No. 36.

⁴⁾ Unna, Archiv für Dermatologie und Syphilis 1899, letzter Band, 2. Heft.

eine deutliche, wenn auch viel schwächere Bewegung des schmalen Protoplasmasaumes feststellen konnten, wie bei den polynukleären, und stimmen wir darin mit H. Hirschfeld¹⁾ und A. Wolff, besonders auch mit Deetjen überein.

(Ueber die Myelocyten müssen wir uns des Urtheils vorläufig enthalten, weil im farblosen, frischen Blute ihre Feststellung kaum möglich ist). Uebrigens haben wir an gefärbten Präparaten, wie noch später zu erwähnen sein wird, krampfartige amöboide Bewegungen unter gewissen Umständen erzeugen können, die dem Absterben vorangingen, bei denen die Bewegungen an den Lymphocyten zuweilen recht erheblich wurden. Endlich haben wir durch Fixation der Präparate mittels Osmiumdämpfen (cfr. Deetjen), die wir so einwirken liessen, dass wir das ganze Präparat in eine Osmiumkammer brachten, nachdem wir zuvor das Deckgläschen gelüftet hatten, die Lymphocyten ebenso wie die Leukocyten inmitten ihrer amöboiden Bewegungen fixiren und so die Fortsätze besonders deutlich zur Ansicht bringen können.

Was die Blutplättchen anbetrifft, so konnten wir im ungefärbten Präparat eine stärker lichtbrechende Innensubstanz von der schwächer lichtbrechenden spitzig und stachlig aussehenden Aussensubstanz unterscheiden. Ueber unsere Färbergebnisse werden wir weiter unten berichten. Eine deutliche Bewegung, wie bei der Deetjen'schen Methode war nicht wahrzunehmen, wenigstens nicht an unerwärmten Präparaten, auch gingen, wie erwähnt, die Blutplättchen zu rasch zu Grunde, um ihre Beweglichkeit genauer studiren zu können. Die rothen Blutkörperchen halten sich in ihrer Form ausserordentlich lange; während sich die Leukocyten nach drei Tagen bereits in Aufquellung oder Zertrümmerung befinden, sind die rothen oft länger als eine Woche unverändert. In chlorotischem Blute, dessen Blässe übrigens durch die vorliegende Methode recht sinnfällig wird, zeigt sich kein Unterschied gegenüber dem normalen. Auch hier zeigen die Erythrocyten sich ebenfalls sehr resistent. Deutliche Erscheinungen einer Autolyse kann man erst ungefähr vom zehnten Tage an wahrnehmen, auf die wir in diesem kurzen Berichte nicht näher eingehen wollen. Hingegen möchten wir hier schon besonders hervorheben, dass bei schweren Anämien eine bereits am ersten Tage einsetzende und sehr rasch zu einer Zerstörung der rothen Blutkörper führenden Hämolyse auftritt, was für die Diagnostik von Bedeutung sein dürfte. Es wird, wie uns einige wenige Versuche bereits gelehrt haben, sich die Methode auch zur mikroskopischen Darstellung der Hämolyse gut eignen, wenn man zuerst das zu prüfende Serum, dann das Blut in rascher Aufeinanderfolge auf ein Deckglas bringt und dann wie oben verfährt.

Indem wir nunmehr zu den Ergebnissen an den gefärbten Deckgläschen übergehen, wollen wir hier nur diejenigen Farbstoffe erwähnen, die wir bis jetzt unter den überaus zahlreichen, die wir geprüft haben, als besonders geeignet befunden haben, und die damit erzielten Resultate kurz anführen.

Wir beginnen mit dem:

I. Methylenblau.

a) Weisse Blutkörperchen. Anfänglich erscheinen die meisten corpusculären Elemente des Blutes noch ungefärbt, demgemäss auch die weissen Blutkörperchen. Allein nach einer im Verhältniss zu anderen Farbstoffen kurzen Zeit, zuweilen schon nach einigen Minuten, beginnt die Färbung. Dabei lässt sich ein höchst bemerkenswerthes Phänomen beobachten, welches wir nur noch bei Thionin, Methylenazur, sowie bei Combinationen von Methylenblau mit anderen Farbstoffen (Magentaroth, Neutralroth, Eosin und einigen anderen), wenn auch nicht in gleich schönem Maasse, wie bei Methylenblau allein, wahrnehmen konnten. Nachdem anfänglich das Protoplasma der zum Theil noch amöboiden weissen Blutkörperchen sich ganz schwach blau tingirt hat, wobei ein wesentlicher Unterschied zwischen den einzelnen Arten nicht gemacht werden kann — selbst die eosinophilen Leukocyten nehmen den Farbstoff diffus in ihren Leib auf — tritt ziemlich rasch eine intensive Blaufärbung aller derjenigen Erythrocyten ein, welche im nächsten Umkreis um die weissen Blutkörperchen liegen, und zwar gilt dies für alle polynukleären Leukocyten und für die Mastzellen, während dieser Vorgang bei den Lymphocyten in der Regel nicht beobachtet wird. Bei diesen letzteren tritt vielmehr von vornherein eine immer intensivere Färbung des Protoplasmasaumes ein; allmählich tingiren sich auch ihre Kerne, und schliesslich sind die Gebilde fertig gefärbt, wie sie sich dann tagelang erhalten: blauer Kern mit kleinem, excentrisch sitzendem, tropfenförmigem, dunklerem und rundem Kernkörperchen, und dunkelblaue, etwas lamellöse oder gefranzt aussehende Protoplasmaschicht. Während die Färbung der Lymphocyten stetig fortschreitet, bleibt das angegebene, eigenthümliche Verhalten der anderen weissen Blutkörperchen und Mastzellen stundenlang erhalten und das Präparat bietet einen merkwürdigen Anblick: Eine jede weisse Blutzelle,

die inzwischen selbst jenen anfänglich vorhandenen blassblauen Farbenton wieder verloren hat und gänzlich farblos geworden ist, wird umgeben von einem Ring intensiv blau gefärbter rother Blutkörperchen und mit Leichtigkeit gelingt es, die Lage jeder einzelnen polynukleären Zelle oder Mastzelle im Präparate an dem blauen Kranze herauszufinden. Doch bleiben die wieder farblos gewordenen weissen Blutzellen nicht ohne Veränderung, wenigstens viele von ihnen. Sie zeigen Absterbungsvorgänge, verlieren ihre amöboide Bewegung bald vollkommen und werden rund, auch quellen sie nicht selten auf, weniger die eosinophilen, als die neutrophilen, nie die Mastzellen. Bei einzelnen von ihnen macht sich sodann das ebenfalls sehr eigenartige Phänomen der Körnchenbewegung geltend, auf das wir beim Eosin erst näher eingehen werden. Es folgt dann ein weiteres Stadium der Färbung, das oft erst am zweiten Tage nach der Anfertigung des Präparates vollendet ist. Die Erythrocyten, welche die eigenartige Blaufärbung angenommen hatten, entfärben sich. Diese Entfärbung tritt stets im Laufe von Minuten ein, wenn sie erst einmal eingesetzt hat (Wärme beschleunigt sie), und gleichzeitig erfolgt nunmehr in den im Innern des Erythrocytenkranzes gelegenen Leukocyten die definitive Färbung.

Bei den Mastzellen färben sich die Körnchen successive intensiv violett (metachromatisch), während die Kerne schwach blau erscheinen; die Körnchen umgeben dessen helle Zone wie einen Ring (Ehrlich-Westphal).¹⁾ Bei den polynukleären Leukocyten tritt die Färbung oft explosiv ein, indem unter einer unter dem Mikroskop sichtbaren Contraction des Zelleibes der Kern sich plötzlich blau färbt unter Bildung der charakteristischen Chromatinstruktur. Der Leib der eosinophilen und neutrophilen Zellen bleibt farblos, nur ein paar spärliche blaue Körnchen finden sich in vereinzelter neutrophilen Zellen. Eine Gruppe von weissen Blutkörperchen sei noch erwähnt, die ebenfalls mononukleär, nicht zu den Lymphocyten, sondern zu den Uebergangsformen gerechnet werden müssen, welche schon vielfach beschrieben und mit verschiedenen Namen belegt worden sind. Diese Zellen, vor der Färbung ebenfalls von jener Zone farbiger Erythrocyten umgeben, zeigen einen intensiv gefärbten runden Kern und ein verhältnissmässig breites, von fädchenförmigen Granulis durchzogenes Protoplasma. Ueber das Verhalten der Myelocyten an anderer Stelle.

Ueberblicken wir die Färbungsergebnisse an den Leukocyten, so finden wir, dass der lebende Leukocyt sich mit Methylenblau anfangs nicht färbt, sondern erst, nachdem mehr oder minder deutliche Erscheinungen des Absterbens vorhergegangen sind, dass die Färbung meistens plötzlich erfolgt, vielleicht, weil das Absterben ein plötzliches ist, dass aber der Färbung (die Lymphocyten ausgenommen) ein sehr merkwürdiger Akt vorausgeht. Die weissen Blutzellen, anfänglich ein wenig im Protoplasma gefärbt, stossen den Farbstoff zunächst von sich ab, der möglicherweise sie als Leukobase schon imprägnirt hat; dieser selbst dringt ein in die nächstliegenden rothen Blutkörperchen, die irgend eine Schädigung oder abnorme Farbempfindlichkeit zuvor erlitten haben müssen, um sich derartig intensiv zu färben. Diese Zone vermehrter Farbanhäufung in der Umgebung der Leukocyten möchten wir als chromophore Zone bezeichnen.

Wir wollen als ferneres Ergebniss der vitalen Färbung auf das Kernkörperchen der Lymphocyten hinweisen, das nie bei den polynukleären Zellen oder Mastzellen sichtbar ist. Dieses Kernkörperchen hat ausser Ehrlich auch Nakanishi, vielleicht auch Türck²⁾ gesehen. Wir kommen auf dessen Bedeutung bei der Färbung mit dem Pappenheim'schen Pyronin-Methylgrün³⁾ noch zurück. Zu bemerken ist endlich das Vorkommen geringer basophiler Körnelungen in polynukleären Zellen, das in gehärteten Präparaten bei pathologischen Zuständen Hirschfeld⁴⁾ beschrieben hat.

b) Die Blutplättchen. Die Blutplättchen färben sich nach dieser Methode sehr rasch, schon nach wenigen Minuten, erhalten sich auch etwa 24 Stunden, allerdings unter Einbusse des Farbstoffes und vor allem unter Degenerationserscheinungen. So wie Deetjen und A. Wolff, so konnten wir anfänglich ein blau tingirtes Centrum, leicht gekörnt, und ein farbloses zackiges Protoplasma erkennen, aber schon nach kurzer Zeit quoll dasselbe in Gestalt von runden oder ovalen, ganz homogenen schwach lichtbrechenden Ringen, weit über die ursprüngliche Contour der Plättchen hervor, die blauen Massen meist excentrisch lassend. Schliesslich verschwinden diese Ringe und es bleiben allein die gefärbten Massen, längere Zeit sichtbar, zurück.

c) Die rothen Blutkörperchen. Die Erythrocyten werden durch das Methylenblau allmählich geschädigt. Nach zwei Tagen sind sie nahezu vollständig aufgelöst, zu einer Zeit, wo die Leukocyten in ihrer besten Färbung sichtbar sind. Aber auch an den Erythrocyten ist eine bemerkenswerthe Thatsache in jedem normalen Blutpräparate zu beobachten; nach

¹⁾ Ehrlich-Westphal, Inauguraldissertation 1880, Farbenanalytische Untersuchungen zur Histologie und Klinik des Blutes I.

²⁾ Türck, Berliner klinische Wochenschrift 1901, No. 37.

³⁾ Heinz, Münchener medizinische Wochenschrift 1901, No. 15.

⁴⁾ H. Hirschfeld, Berliner klinische Wochenschrift 1901, No. 29.

¹⁾ H. Hirschfeld, Berliner klinische Wochenschrift 1901, No. 40.

sechs Stunden etwa sieht man in einzelnen rothen Blutkörperchen, manchmal kranzförmig angeordnet, manchmal mehr central, zuweilen mehr diffus, ein Häufchen blauer Körnchen oder Fädchen, die in manchen Erythrocyten feiner, in manchen gröber gebildet sind. Etwas dicker und dichter als mit Methylenblau treten sie mit Toluidinblau und Thionin sowie mit Methylenazur hervor; doch kann man sie auch mit allen anderen basischen Faden, selbst mit Neutralroth färben. Bei einem Bleikranken, dessen Blut wir nach derselben Methode untersuchten, traten die Körnchen in besonders zahlreichen Blutzellen, auch wohl etwas gröber hervor.

Die Körnchen sind sehr resistent, während die rothen Blutkörperchen, in denen sie liegen, entschieden früher sich auflösen, als die anderen; nach zwei Tagen findet man sie daher frei im Präparate liegen, in der ursprünglichen Anordnung und den Platz noch bezeichnend, den die Erythrocyten inne hatten, die sie beherbergten. Wir glauben nicht fehlzugehen, wenn wir diese Gebilde identifizieren mit jenen in neuerer Zeit vielfach diskutirten „basophilen Körnelungen“, die zuerst Ehrlich¹⁾ beschrieben hat und die seitdem so oft erörtert worden sind (Askanazy,²⁾ Behrend,³⁾ Bloch,⁴⁾ M. Cohn,⁵⁾ Engel,⁶⁾ Grawitz,⁷⁾ Hamel,⁸⁾ Jawein,⁹⁾ St. Klein,¹⁰⁾ Lazarus,¹¹⁾ Litten,¹²⁾ O. Moritz,¹³⁾ Plehn,¹⁴⁾ Senator,¹⁵⁾ Schumann,¹⁶⁾ Schmauch,¹⁷⁾ Strauss,¹⁸⁾ Ullmann,¹⁹⁾ Zenoni,²⁰⁾ Garbitchewski²¹⁾).

Wir müssen also diese „punktirten Erythrocyten“ (Ehrlich-Lazarus)²²⁾ als in der Norm vorkommend und pathologisch nur vermehrt bezeichnen. (Fortsetzung folgt.)