Aus der Kgl. chirurgischen Universitätsklinik Breslau (Director: Geh.-Rat Prof. Dr. Küttner) und dem Kgl. pharmazeutischen Institut der Universität Breslau (Director: Prof. Dr. Gadamer).

Ueber Metachromasie bei Vitalfarbstoffen.

Von

Dr. phil. et med. **Werner Schulemann.**

Während in früheren Zeiten meist compliciert zusammengesetzte Naturproducte in der ärztlichen Praxis Verwendung fanden, hat man später die wirksamen Stoffe daraus isoliert, den chemischen Bau dieser einheitlichen Körper ermittelt, sie synthetisiert und endlich zu verbessern gesucht. Anfangs begnügte sich der Arzt damit, die vom Chemiker dargestellten Stoffe wahllos auf ihre pharmakologische Wirkung zu prüfen, bald aber stellte er Theorien über die Arzneimittelwirkung und ihre Beziehungen zur chemischen Constitution auf und konnte nun seinerseits dem Chemiker Richtlinien für seine synthetische Arbeit geben.

Die Anschauungen über die Wirkungsweise von Arzneimitteln haben im Laufe der Zeit viele Wandlungen durchgemacht und sind auch heute noch keineswegs abgeschlossen. Unter dem Einfluss Ehrlichs und seiner Schule hat die Theorie, dass Verteilung und Wirkung der Arzneimittel, Toxine usw. im tierischen Körper auf Grund chemischer Gesetzmässigkeiten geschehe — die sogen. „Seitenkettentheorie“ — in weiten Kreisen rückhaltlose Anerkennung gefunden. „Seitenketten“, d. h. reactionsfähige Atomgruppen der Arzneistoffe, der Toxine usw. sollen mit entsprechenden „Seitenketten“ des Zellprotoplasmas oder Zellkernes chemisch reagieren. Es sollen auf diese Weise Verbindungen entstehen und diese primäre Verankerung sowie weitere secundäre Reactionen zwischen „Receptoren“ sollen Ursache der Verteilung und Wirkung der Arzneimittel sein.

Im Anfang seiner wissenschaftlichen Tätigkeit hat Ehrlich die Möglichkeit, dass auch „physikalische“ Reactionen das Geschehen im Organismus ebenso wie chemische Reactionen beeinflussen könnten, vielfach in Erwägung gezogen¹⁾; in seinen späteren Arbeiten aber zeigt sich immer mehr die Tendenz, das biologische Verhalten von Arzneistoffen, Toxinen, Nährstoffen usw. auf rein chemischem Wege zu erklären²⁾ und nur selten erinnern uns Worte wie „Zellspringer“, „Zellhafter“³⁾ an ver-

1) P. Ehrlich, Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Berlin 1885.

2) Das findet z. B. klar seinen Ausdruck, wenn Ehrlich die „Reactionen“ der „Receptoren“ vergleicht mit der Reactionsart der Derivate des Benzylcyanides mit p-Nitrosodimethylanilin (P. Ehrlich, Beitr. z. exp. Path. u. Chemother.).

3) P. Ehrlich, Aus Theorie und Praxis der Chemotherapie. Leipzig 1911.

gangene Zeiten. Das von Ehrlich für seine „neue“ Forschungsrichtung geprägte Schlagwort „Chemotherapie“ bezeichnet zwar treffend die Grundideen seiner Theorien, bringt aber in ebenso prägnanter Weise deren Einseitigkeit zum Ausdruck.

Einen scheinbar glänzenden Beweis für seine Theorien schien Ehrlich durch die Synthese des Salvarsans beigebracht zu haben, das er auf Grundlage seiner Seitenkettentheorie aufgebaut und das sich von hervorragend praktischer Bedeutung gezeigt hat. Trotzdem musste ich bei der experimentellen Bearbeitung des Themas „Die Beziehungen zwischen chemischer Constitution und Vitalfärbungsvermögen bei sauren Farbstoffen“¹⁾ erfahren, dass die Ehrlichsche Chemoceptorentheorie zur Erklärung der beobachteten Tatsachen völlig versagte.

Das mit dem Salvarsan verwandte Trypanblau (die Verwandtschaft dieser beiden Substanzen habe ich a. O. näher definiert), das Ehrlich²⁾, Nicolle und Mesnil³⁾, Bouffard⁴⁾, Goldmann⁵⁾, und in neuerer Zeit eine grosse Zahl von Forschern zu Vitalfärbungszwecken benützt hatten, bildete den Ausgangspunkt für meine Versuche. Die grosse Anzahl dem Trypanblau nahe verwandter Farbstoffe ermöglichte es die „Chemoceptoren“ in der mannigfaltigsten Weise zu variieren, und hierdurch auf ihre biologische Reaction zu prüfen. Anfangs allein, später in gemeinsamer Arbeit mit Herbert M. Evans stellte ich nun experimentell fest, dass viele Farbstoffe mit scheinbar geeigneten „Chemoceptoren“ garnicht vital färbten, und dass Substanzen mit ungeeigneten „Chemoceptoren“, ja sogar solche, bei denen man von „Chemoceptoren“ überhaupt nicht mehr reden konnte (Metallcolloide, Farbstoffe ohne „Seitenketten“ usw.), oft die prachtvollste Vitalfärbung gaben.

Dieser negativen Feststellung konnten wir aber bald positive Resultate entgegenstellen, durch die wir das „Wesen der Vitalfärbung mit sauren Farbstoffen“ zwanglos erklären konnten. Wir hatten nämlich bei unseren Tierversuchen die auffallende Beobachtung gemacht, dass Lösungen ein und desselben Farbstoffes sich je nach der Bereitungsweise, der Concentration, des Elektrolytgehaltes, des Alters usw. biologisch verschieden verhielten.

Der physikalische Lösungszustand schien also von grösserer Wichtigkeit für das Vitalfärbungsvermögen als die Anwesenheit passender „Chemoceptoren“.

Um einen Einblick in den physikalischen Zustand der Farbstofflösungen zu gewinnen, stellten wir nun gemeinsam mit F. Wilborn

1) W. Schulemann, Arch. mikr. Anat. 1912. Bd. 79. S. 223. Arch. d. Pharmaz. 1912. Bd. 250. S. 252, 389. Diese Zeitschr. 1912. Bd. 11. S. 1. — H. M. Evans, W. Schulemann, F. Wilborn, Jahrb. d. Schles. Ges. f. vaterl. Cult. Breslau 1913. Deutsche med. Wochenschr. 1914.

2) P. Ehrlich, Berliner klin. Wochenschr. 1907. Nr. 9—12.

3) Nicolle et Mesnil, Ann. d. l'Institut. Pasteur. 1906. T. XX. Nr. 6 u. 7.

4) Bouffard, Ibid. 1906. T. XX. No. 6.

5) E. Goldmann, Bruns' Beitr. z. klin. Chir. 1909 u. 1912. — Verhandl. d. deutschen pathol. Ges. Erlangen 1910.

Kurven für die Diffusionsgeschwindigkeit in einem Gelatinegel auf¹⁾. Dabei zeigte sich eine überraschende Uebereinstimmung zwischen dem physikalischen und dem Tierversuch: Stoffe ohne bzw. mit geringer Diffusionsgeschwindigkeit färbten nur local vital; zeigten die Lösungen eine mittlere Diffusionsgeschwindigkeit, so erhielten wir schöne allgemeine Vitalfärbung, deren Eintritt und Dauer in völliger Parallele zum Verlauf der Kurve stand; Substanzen endlich, die sehr schnell diffundierten, wurden garnicht in den Zellen des Tierkörpers deponiert, sondern schnell durch Harn und Kot wieder ausgeschieden.

Weitere Beweise für unsere Anschauungen konnte ich dann gemeinsam mit Evans erbringen. Durch Aenderung des Lösungszustandes konnten wir Nichtvitalfarbstoffe zu den schönsten Vitalfarbstoffen machen und umgekehrt. Wir konnten ferner zeigen, dass Farbstoffe ganz anderer Klassen, als die, welcher das Trypanblau angehört, denselben Gesetzen gehorchen, z. B. Anthrachinonderivate, Fluoresceinfarbstoffe, Rhodamine, Oxyazofarbstoffe u. a. m. Ebenso beweisend für unsere Theorie war auch die Tatsache, dass colloidale Lösungen von Metallen (Silber, Gold, Platin, Palladium) Vitalfärbung gaben²⁾.

An diese Kette von Beweisen möchte ich nun einen neuen anschliessen, der auf eine Beobachtung von Evans zurückgeht. Evans hatte gesehen, dass nach der Injection der rein rubinroten Lösung von Congorubin in den vitalfärbbaren Zellen rote Flüssigkeitsbläschen auftraten, die mitunter tiefblaue Körnchen in lebhaft tanzender Bewegung einschlossen (Brownsche Molek.-Bew.); daneben fanden sich noch ebenso tiefblaue Concremente frei im Zellprotoplasma. Anfangs glaubten wir, dass der rote Farbstoff durch einen blauen verunreinigt sei und diese Verunreinigung durch die isolierte Ablagerung der Componenten im Protoplasma sichtbar würde (es wäre dies zur „scheinbaren Metachromasie“ der Histologen in Parallele zu stellen gewesen). Die Prüfung des Farbstoffes auf Verunreinigungen nach den von mir zusammengestellten Methoden³⁾ zeigte jedoch, dass der Farbstoff einheitlich war — dass also „echte Metachromasie“ vorlag. Dieselben Erscheinungen erhielten wir auch bei Verwendung eines noch besonders gereinigten Farbstoffes, und konnten sie in der Folge noch bei einer grossen Reihe anderer Farbstoffe in mehr oder weniger ausgesprochenem Masse beobachten.

Die Erklärung der beschriebenen Tatsachen stiess anfangs auf Schwierigkeiten, da ich bei der Prüfung der Congorubinslösung fand, dass die rote Farbe in Blau übergang

1. durch Säurezusatz — Indicatorreaction,
2. durch Elektrolyt- (NaCl , Na_2SO_4) Zusatz — Elektrolytfällung einer colloidalen Lösung.

Die Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten war von principieller Bedeutung.

1) Die ausführliche Arbeit wird noch erscheinen. Im übrigen vergleiche Evans, Schulemann, Wilborn l. c.

2) Ausführlich werde ich hierüber später berichten.

3) W. Schulemann, Arch. d. Pharm. Bd. 250. 389.

Der Eintritt einer Indicatorreaction — einer chemischen Reaction — hätte für Ehrlichs Theorien sprechen können. Elektroytfällung der colloidalen (besser semicolloidalen) Farbstofflösung als Ursache der Metachromasie musste für die von Evans und mir aufgestellten Theorien sprechen.

Die erste Frage war daher: Geben auch Nichtindicators meta-chromatische Vitalfärbungen? Im „Bordeaux extra“ gelang es bald den metachromatisch färbenden Nichtindicator aufzufinden und diesem Farbstoff schlossen sich noch mehrere andere an. Aber auch vom Congorubin liess sich beweisen, dass der Farbumschlag nicht auf einer Indicatorreaction beruht. Congorubin ist vermöge seiner α -Amino- β -azo-Gruppe ein Indicator und bei Zusatz der Ionen-Lösungen von Salm¹⁾ zur wässrigen Farbstofflösung konnte ich feststellen, dass die Umschlagsgrenze bei einer Wasserstoffionenconcentration von 10^{-4} H-Ionen lag. Diese Umschlagsgrenze entspricht genau der des vielverwendeten Indicators Congorot, mit dem Congorubin nahe verwandt ist. Ich prüfte weiterhin die Verschiebung der Umschlagsgrenze bei beiden Farbstoffen in eiweisshaltigen Medien, da ich den Verhältnissen im Tierkörper möglichst nahe zu kommen wünschte und Sörensen²⁾ nachgewiesen hat, dass ein Eiweissgehalt der Lösungen die Indicatorreaction beeinflusst. Für Congorubin und Congorot fand sich eine parallele Verschiebung der Umschlagsgrenze von der niederen zur höheren Wasserstoffionenconcentration. Die vergleichende Untersuchung der beiden Farbstoffe erscheint also einwandfrei.

Zu den Tierversuchen verwendeten wir ein schön vitalfärbendes Congorot und stellten fest, dass keine Metachromasie eintrat. Trotzdem hatte das Congorot seine Indicatoreigenschaften durch die „Verankerung“ in der Zelle nicht verloren. Ein isoliertes Gewebestückchen zeigt unter dem Mikroskop rote „Granula“; lässt man nun von aussen Salzsäure zufließen, so erfolgt prompt Blaufärbung. Die physikalische Untersuchung der Congorotlösung zeigte, dass bei Elektrolitzusatz der Farbstoff in roten Flöckchen abgeschieden wird, so dass Tierversuch und Untersuchung im Reagenzglas wiederum völlig übereinstimmten. Ich stelle die Resultate kurz zusammen:

„Congorubin“ ändert als Indicator und bei der Elektrolitytfällung seine Farbe von rot nach blau; es färbt metachromatisch.

„Bordeaux extra“ ist kein Indicator, ändert aber bei Elektrolitytfällung seine Farbennuance; es färbt metachromatisch.

„Congorot“ ändert als Indicator seine Farbe, bleibt aber bei der Elektrolitytfällung unverändert, es färbt nicht metachromatisch.

Eine Indicatorreaction hat demnach die Farbänderung im Organismus nicht bedingt und die Erfüllung des Wunsches von Hoeber³⁾ „es möge einmal ein Indicator in eine Zelle gebracht werden“, lässt nur den negativen Schluss zu, dass eine nennenswerte Wasserstoffionenconcentration

1) Salm, Z. phys. Ch. 1906. Bd. 57. S. 471; 1908. Bd. 63. S. 83.

2) Sörensen, Bioch. Zeitschr. 1909. Bd. 21. S. 131; 1909. S. 253; 1909. Bd. 22. S. 352; 1910. Bd. 24. S. 381.

3) Hoeber, Physik. Chemie der Zelle. III. Aufl. Leipzig 1911. S. 162.

in den Vacuolen — den „Zellmägen“ — der färbbaren Phagocyten nicht besteht.

Aus der oben gegebenen Zusammenstellung aber können wir entnehmen, dass die Metachromasie unserer Farbstoffe bedingt ist durch Aenderungen des Lösungszustandes der Farbstoffe, und hiermit werde ich mich noch näher zu befassen haben. Ich habe bisher ganz allgemein von einer „Aenderung des Lösungszustandes“ gesprochen und muss diesen Begriff definieren. Graham¹⁾ hat die Lösungen eingeteilt in krystalloide und colloide Lösungen, doch hat die weitere Entwicklung der physikalischen Chemie gezeigt²⁾, dass diese Begriffe Grenzzustände bezeichnen, zwischen denen die mannigfaltigsten Uebergänge existieren. Manche Körper können sich in gleichem Lösungsmittel bald als Colloide, bald als Kristalloide lösen, ja in einer Lösung können sich beide Zustände im Gleichgewicht befinden. Man hat diese Gruppe von Stoffen als „Semicolloide“ bezeichnet und zu ihr gehören auch unsere hochmolecularen Farbsäuren. Biltz³⁾ hat die Lösungen dieser Farbstoffe physikalisch untersucht und fasst seine — uns hier interessierenden — Ergebnisse in folgenden Sätzen zusammen:

Die Farbstoffe sind Elektrolyte, die sich in einem Associations-, Dissociations- und Hydrolysegleichgewicht befinden, so dass polymere Farbstoffmoleküle, Farbstoffionen, Natriumionen und die Producte der Hydrolyse nebeneinander bestehen. „Bei sämtlichen Farbstoffen wird durch Natriumsulfat das Nebeneinander von Einzelmolekülen bzw. deren Ionen und polymeren Molekülen zugunsten der letzteren verschoben . . .“

„Die Wirkung des Natriumsulfates kann sich zusammensetzen aus der elektrolytisch dissociationshemmenden Function des gleichionigen Zusatzes und der colloidchemisch ausfällenden Wirkung des Salzes.“

Hieraus ist nun klar ersichtlich, in welcher Weise der Elektrolytzusatz zu den Lösungen von Congorot, Congorubin usw. wirkt. Die ursprünglich roten Lösungen dieser Farbstoffe werden durch den Elektrolytzusatz mehr und mehr nach dem colloiden Grenzzustand hin verschoben, durch Zurückdrängung der elektrolytischen Dissociation und durch Bildung immer grösserer Farbstoffmolekülaggregate. Sind diese Aggregate endlich gross genug geworden, so bleiben sie nicht mehr in Lösung — der Farbstoff flockt aus.

Während nun viele Stoffe bei der Bildung solcher Aggregate und beim Ausflocken keine Farbänderung zeigten (z. B. Congorot), findet bei anderen ein Farbenwechsel statt (z. B. Congorubin, Bordeaux extra).

Ein solcher Farbenwechsel ist aber schon lange bekannt bei der Coagulation von Goldhydrosolen und ist das Analogon zu meinen Beobachtungen bei Farbstoffen. Goldhydrosole, dargestellt nach den Vorschriften von Zsigmondy, sind meist rein rubinrot und ändern bei der

1) Graham, Philos. Transact. 1861. Bd. 183. Lieb. Annal. Bd. 121. S. 1—77 (1862).

2) Zsigmondy, Colloidchemie. Leipzig 1912.

3) W. Biltz u. H. Steiner, Z. f. Chem. u. Industr. d. Colloide. 1910. Bd. 7. S. 113. — W. Biltz u. E. Pfenning, Gedenkboek-Van Bemmelen. 1910. — W. Biltz u. A. v. Vegesack, Zeitschr. Physik. Chem. 1910. Bd. 73. S. 481. — W. Biltz u. F. Pfenning, ibid. (1911). Bd. 77. S. 91.

Coagulation ihre Farbe von rot in violett und blau. Vollständig aufgeklärt ist die letzte Ursache für diesen Farbwechsel noch nicht (vgl. hierzu Zsigmondy¹). Festgestellt aber ist, dass die Ultramikronen der roten Lösungen grün sind und dass in blauen Lösungen gelbe bis rotbraune Ultramikronen vorhanden sind, die Aggregate der grünen Ultramikronen vorstellen. Violette Lösungen enthalten beide Arten neben einander. (Die Farben der Lösungen sind für durchfallendes Licht, die der Ultramikronen für abgebeugtes angegeben.) „Man kann kaum einen besseren Beweis als gerade diesen Farbumschlag dafür finden, dass die Goldteilchen sich flockenartig (d. h. durch Zusammenlagerung) und nicht nach Art der Flüssigkeitströpfchen durch Teilchenverschmelzung zu grösseren Tröpfchen vereinigen. Würde letzteres der Fall sein, so müssten die Ultramikronen von coaguliertem Golde (der blau durchsichtigen Goldzertheilungen) mit den durch Wachstum entstandenen (der roten Lösungen) identisch sein, wofern sie die gleiche Masse besitzen wie diese.“ (Vgl. Zsigmondy l. c. S. 107.)

Diese auffälligen Uebereinstimmungen zwischen dem Farbwechsel coagulierender Farbstofflösungen und Goldhydrosole hat schon Michaelis²) erkannt. Er hatte gefunden, dass Fuchsin in wässriger Lösung durch Kochsalz ausgesalzen wird. Durch Erhitzen kann man das Fuchsin in der Kochsalzlösung wieder in Lösung bringen. Kühlt man nun ab, so erhält man je nach Umständen Flüssigkeiten, welche das Licht rotviolett, intensiv blauviolett oder cyanblau durchlassen, während im auffallenden Licht die rote Farbe des Fuchsins auftritt. Ultramikroskopisch waren solche „blaue Lösungen“ optisch völlig auflösbar, während rein wässrige Lösungen des Farbstoffes optisch nicht völlig aufgelöst werden konnten. Das Fuchsin ist in den blauen Lösungen in ultramikroskopischen Teilchen suspendiert, welche das Licht blau durchlassen. Nach 24 Stunden sind solche Lösungen vollständig ausgeflockt (Michaelis).

Wenngleich diese Analogieschlüsse zwischen dem Farbenwechsel coagulierender Goldhydrosole und dem coagulierender Farbstofflösungen eine Erklärung der Metachromasie bei Vitalfarbstoffen möglich erscheinen lassen, so habe ich dennoch versucht, der Frage experimentell noch weiter nachzugehen. Beruhte die Metachromasie auf Coagulation der Farbstofflösungen, so mussten auch injizierte rote Goldhydrosole metachromatisch vitalfärben. Ich verwendete zu den Versuchen eine Lösung colloiden Goldes (v. Heyden, Dresden-Radebeul) und injizierte sie Mäusen und Kaninchen subcutan, intraperitoneal und intravenös. Die mit Schutzcolloid versehenen Lösungen waren schön rubinrot. Bei der mikroskopischen Untersuchung aber zeigten alle vitalfärbbaren Zellen intensiv schwarzblaue Granula. Es war also auch beim colloiden Gold zu constatieren, dass die Vitalfärbung metachromatisch war.

Die vergleichende Untersuchung von Farbstoffen und Goldhydrosolen hat also ergeben, dass die bei der Vitalfärbung mit den genannten Substanzen auftretenden metachromatischen Erscheinungen zurückzuführen

1) Zsigmondy, Colloidchemie. Leipzig 1912. S. 99 ff.

2) Michaelis, Virch. Arch. Bd. 179. S. 195. (1905).

sind auf eine partielle (Farbstoffe) oder vollständige (Farbstoffe und Goldhydrosol) Coagulation der colloiden Lösungen. Wir haben es hier also mit einem rein physikalischen Vorgang zu tun.

Ein Vergleich zwischen den Eigenschaften von Congorubin-, Bordeaux extra- und anderen Farbstofflösungen mit denen von Goldhydrosolen aber gestattet noch weitere Schlüsse auf die Natur der „Granula“ selbst, welche bei der Vitalfärbung in den Zellen entstehen. Es ist vielfach die Frage discutiert worden (Ehrlich, Goldmann u. a. m.), ob die Granula aufzufassen seien als Adsorptionsverbindungen oder als starre colloide Lösungen, ob sie durch Lackbildung entstanden seien oder durch eine Reaction gebildet würden, wie sie ein Schutzcolloid mit einem irreversiblen Colloid eingeht (letzteres wäre wohl zu den Adsorptionsverbindungen zu zählen). Nun sehen wir aber beim colloiden rot gelösten Gold, dass Schutzcolloide die Farbe nicht ändern, Adsorption an Baumwolle eine rote Goldfärbung gibt, dass Tonerdehydrogel rote Goldlacke liefert und dass starre colloide Lösungen von Gold gleichfalls rot sind (Rubinglas). Blaue Färbung tritt nur bei der Coagulation ein und — bei der Granulabildung bei der Vitalfärbung.

Es war also möglich, gegenüber den Hypothesen anderer Autoren direct experimentell zu erweisen, dass die Farbgranula in den lebenden Zellen reine Farbstoff- bzw. Metallkörnchen sind, die als Fremdkörper im Protoplasma liegen. Irgendwelche präformierte Grundlagen (ein alter Streitpunkt der Histologen!) haben diese Granula nicht, ebensowenig werden uns solche Stoffwechselprocesse, wie etwa die Producte der inneren Secretion (Goldmann), dargestellt. Auch Reactionen chemischer Natur vermag uns diese Art von Vitalfärbung nicht kenntlich zu machen. Hierauf habe ich bereits in einem Vortrage¹⁾ aufmerksam gemacht. Ich wies damals darauf hin, dass eine chemische Reaction der „Chemoceptoren“, die sämtlich Auxochrome sind, eine Aenderung der Farbnuance bei der Vitalfärbung zur Folge haben müsste. Bei vielen Farbstoffen ist eine solche Farbänderung garnicht zu beobachten, wo aber Metachromasie auftritt, ist sie auf physikalische Grundlagen zurückzuführen. (Auf das Sulforhodamin komme ich weiter unten zurück.)

Die vitale Färbbarkeit einer Zelle ist also allein das Zeichen für einen gewissen biophysikalischen Charakter des Protoplasmas einer bestimmten Gattung von Zellen. Die Farbstoffe gelangen durch Phagocytose der Ultramikronen oder deren Aggregate in das colloide System des Protoplasmas. Durch Coagulation der Ultramikronen entstehen nun kleine Concremente, die verstreut als Fremdkörper im Protoplasma liegen²⁾.

Aber das Studium der Literatur zeigt, dass meine hier ausgesprochenen Ideen schon früher einmal da waren — von Einfluss auf meine

1) Evans, Schulemann und Wiborn l. c.

2) Es wäre auch denkbar, dass bei einigen Farbstoffen die Coagulation im Blutstrom eintritt, dass nun Aggregate von Ultramikronen phagocytiert werden und es nun intracellulär zu einer partiellen Peptisation der reversiblen Colloide käme. Die Frage soll noch näher geprüft werden, ihre Entscheidung ist jedoch ohne principielle Bedeutung für das Vitalfärbungsproblem.

Arbeit waren sie nicht, da sie an einem ganz anderen Material gewonnen worden sind. Sie stammen von — Ehrlich und finden sich in seinem Buche „Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus“ (Berlin 1885), S. 54. „Ueber die Verteilungsgesetze des Alizarinblaus.“ Ehrlich behauptet, dass das Alizarinblau im Blutstrom (nach Injection als Sulfidverbindung) in colloider Lösung kreise. Da eine solche Lösung nicht diffusibel sei, könne die in dieser „Pseudosolution“ befindliche Farbe nicht in die Zellen gelangen. Es sollen sich vielmehr im Blutstrom feine Concremente bilden (S. 61), und diese werden mechanisch von Zellfortsätzen aufgenommen (also phagocytiert). S. 62 kommt Ehrlich zu dem Schlusse:

„Schliesst man sich dieser Auffassung an, so wird man die Bläuung der Organe auf einen physikalischen Act zurückführen und die Dinge sich mechanisch zurechtlegen müssen . . . Das Alizarinblau verharret zunächst, wie wir gesehen, in der Mehrzahl der Organzellen als unlösliches Korn und kann es daher auf seine Umgebung einen chemischen nutritiven Reiz ebensowenig ausüben als etwa ein Glasstäubchen, ein Kohlepartikelchen. Wir glauben somit von einer specifisch erregten Zellthätigkeit absehen zu dürfen und vielmehr annehmen zu müssen, dass der Zelleib hier eine passive Rolle spielt und es sich im wesentlichen um ein grobmechanisches Eindringen oder Einpressen feinsten Partikelchen handelt. Unterschiede in der Verbreitung der Färbung seien einmal bedingt durch die Grösse der Farbkörnchen, dann aber von der „Porengrösse“ bzw. „Maschenweite“ des Protoplasmas.“

Soweit Ehrlichs Anschauungen im Jahre 1885.

Ich habe, da diese Resultate von Ehrlich an einem anderen Material als dem von mir verwendeten gewonnen sind, die Versuche mit Alizarinblau wiederholt. Dabei aber zeigte sich, dass Alizarinblau vor allem Drüsenepithelien färbt, nicht dagegen unser phagocytierendes vital-färbbares Gewebe. Obgleich ich also bezüglich Ehrlichs damals ausgesprochener Theorie¹⁾ gerade für Alizarinblau und die von diesem gefärbten Zellen viele Zweifel hege, glaube ich doch von einem näheren Eingehen auf dieselbe absehen zu sollen, da in den letzten 30 Jahren viele neue Tatsachen bekannt geworden sind, deren Kenntnis und Anwendung damals natürlich unmöglich war (z. B. Diffusion der Colloide in colloiden Systemen [freie Diffusion] und die Theorie von den Semi-colloiden). Zudem steht Ehrlich heute auf einem ganz anderen Standpunkt als früher. Nur bei der Färbung mit Benzopurpurin denkt er noch einmal seiner früheren Theorie, ohne dieselbe aber auch bei anderen Farbstoffen²⁾ zu berücksichtigen.

Dass Ehrlich diesen Gedanken nicht weiter verfolgt hat, lag wohl vor allem daran, dass die Colloidchemie damals noch in den Anfängen ihrer Entwicklung stand. Unter diesen Umständen war natürlich gar nicht daran zu denken, derartige biophysikalische Fragen zu lösen, da

1) Diese Theorie für Alizarinblau lässt sich weder mit den Befunden im Tierversuch in Einklang bringen, noch stimmt sie mit dem überein, was man jetzt von der Diffusion der Colloide in colloiden Lösungen weiss.

2) P. Ehrlich, Beiträge zur exp. Path. u. Chemotherapie.

selbst einfache colloidchemische Vorgänge noch nicht erklärt, ja nicht einmal bearbeitet waren. Ich befand mich darin in einer weit glücklicheren Lage, da die Colloidchemie jetzt schon gegen früher weit entwickelt ist. Aber Grenzen sind auch jetzt noch vorhanden und die Frage, was Phagocytose, d. h. Adsorption, letzten Endes sei, muss auch ich offen lassen. Sobald der Begriff Adsorption von der physikalischen Chemie erklärt sein wird, wird auch die Vitalfärbung mit sauren Farbstoffen von neuem erfolgreich zu bearbeiten sein.

Ich habe nun noch auf die Metachromasie bei der Vitalfärbung mit Sulförhodamin einzugehen, welche von Andreew¹⁾ in Ehrlichs Institut ausgeführt worden ist. Seine Resultate sind spärlich (obwohl er einige hundert [719] Mäuse zu den Versuchen brauchte!!). Aber sie sind interessant. Andreew berichtet ausführlich, welche Dosen von Sulförhodamin von Mäusen vertragen werden, auch beschreibt er den zeitlichen Ablauf der Färbung und Entfärbung sehr genau. Er schildert dann die Intensität der Färbung der einzelnen Organe und gibt endlich einige mikroskopische Befunde. Weitverbreitet findet sich eine diffuse Rosafärbung im Tier, aus der sich auffallend blauviolette Stellen hervorheben. Blauviolett seien viele Leberzellkerne sowie Kerne des Epithels der Harnröhre, der Blutgefäße, der Nierenglomeruli, der glatten Muskelfasern der Arterien, des Bindegewebes. Endlich sei die blaue Farbe in den Gallengängen der Leber, in den Henleschen Schleifen sowie den Enden der Sammelröhrchen des Nierenparenchyms zu finden. Neben roter Lösung ist der blaue Farbstoff noch in Gallenblasen- und Darminhalt zu finden. Mit Zenker-Lösung sei das alles fixierbar, schlechter allerdings die blaue Färbung als das diffuse Rosa. Obwohl dem Autor die chemische Formel des Farbstoffes unbekannt ist, zieht er aus diesen Versuchen den Schluss, dass die vitale Färbung wieder einmal ihren Wert für das Studium chemischer Vorgänge im Tierkörper gezeigt habe²⁾.

Wesentlich sorgfältiger hat später Goldmann³⁾ die Vorgänge bei der Sulförhodaminfärbung studiert. Leider hat sein früher Tod ihn verhindert, seine Resultate ausführlich zu publicieren, und wir erfahren von Goldmanns Versuchen nur, dass der Farbstoff in den Kernen der Leberzellen in blauen Krystallen ausgeschieden wird.

Da es mir nach den bei der Vitalfärbung gemachten Erfahrungen durchaus unwahrscheinlich erschien, dass dieser Metachromasie ein chemischer Vorgang zugrunde liege, da es ferner von principieller Bedeutung war, die wahre Ursache hierfür festzustellen, untersuchte ich den Farbstoff mit physikalischen Methoden.

Sulförhodamin lag, der Farbwerke vorm. Meister, Lucius und Brüning, Höchst a. M., stellt ein dunkelrotes Pulver dar, das in Wasser mit eosinroter Farbe löslich ist. Ein Muster wurde mir lebenswürdiger Weise von der genannten Firma überlassen. Ebenso wurde mir die Formel angegeben, deren Veröffentlichung jedoch das Handelsinteresse

1) Andreew, Virchows Arch. 1911. Bd. 204. S. 447.

2) Goldmann, Berliner klin. Wochenschr. 1912. No. 36.

3) Andreew, l. c. S. 452.

der Firma verbietet. Ihre Kenntnis ist für unsere Zwecke auch vollständig belanglos¹⁾.

Beim Versetzen der roten wässrigen Lösung mit einer Elektrolytlösung (NaCl) erhält man eine Fällung des Farbstoffes in orangeroten Concrementen. Beim Erhitzen geht der Farbstoff wieder in Lösung und fällt beim Abkühlen wiederum aus. Die Flüssigkeit zeigt in der Aufsicht die bekannte rote Farbe des festen Sulforhodamins, in der Durchsicht aber weist sie einen blauen Ton auf. Bei der mikroskopischen Untersuchung des Niederschlages finden sich den orangefarbenen Concrementen nunmehr feine rote bis blauviolette Nadeln beigemengt. In weit schönerer Form waren diese Nadeln zu erhalten beim Fällen einer Lösung des Farbstoffes in verdünntem Alkohol durch Aetherzusatz, oder beim langsamen Abkühlen einer concentrirten, heissen, wässrigen oder wässrig-alkoholischen Lösung des Sulforhodamins. Isoliert man die in der Durchsicht blauen Nadeln, so erhält man ein in der Aufsicht rotes Pulver, das in Wasser wieder mit roter Farbe löslich ist. Bei weiterer Ausbildung der Nadeln entstehen kleine Platten, die von der Fläche rot bis rotgelb, von der Kante blauviolett erscheinen.

Wir haben hierbei also gesehen, dass aus der Farbstofflösung erhalten werden können:

- a) Orangerote amorphe Concremente;
- b) Nadeln und Platten, die je nach ihrer Lage rotgelb bis blauviolett erscheinen können.

Alle diese „Modificationen“ sind ineinander überführbar. Das Auftreten der blauvioletten Farbe ist also ein rein optisches Phänomen an Kristallen und hat mit chemischen Vorgängen nicht das Geringste zu tun. In der Tat erweist sich auch der Originalfarbstoff selbst schon kristallinisch und ist in der Durchsicht (mit Canadabalsam auf dem Objectträger verrieben oder in Benzol, Aether usw. aufgeschwemmt) blauviolett.

Leider gelang es nicht, genügend grosse Kristalle des Farbstoffes zu züchten, um die Kristallform exact bestimmen zu können. Herr Geh.-Rat Prof. Dr. Hintze hatte jedoch die Liebenswürdigkeit, durch Herrn S. Riedel am Mineralogischen Institut der Universität Breslau die Kristallnadeln optisch untersuchen zu lassen, der über den Befund, wie folgt, berichtet:

„Das Sulforhodamin krystallisiert in langen dünnen Nadelchen, die im durchscheinenden Lichte rot, in auffallendem Lichte gelb erscheinen und oft fächerartig gruppiert sind. Eine optische Hauptschwingungsrichtung bildet mit der Längsachse des Kristalls einen Winkel von etwa 32°. Die Nadeln zeigen starken Pleochroismus von rotviolett bis gelb.“

Damit ist also festgestellt, dass die Kristalle des Sulforhodamins Dichroismus zeigen, dass sie je nach der Schwingungsrichtung eine verschiedene Farbenabsorption haben^{2) 3)}.

1) Andreew (l. c. S. 452) ist hierüber anderer Ansicht.

2) Naumann-Zirkel, Elemente der Mineralogie. 1907. Pleochroismus S. 260.

3) F. Rinne, Element. Anleitung zu kristallograph. optischen Untersuchungen vornehmlich mit Hilfe des Polarisationsmikroskops. Leipzig 1912. S. 122.

Dass auch die „Metachromasie“ im Tierkörper keine anderen Ursachen hat, lässt sich klar erweisen, ebenso lässt sich wohl auch die so wunderbare Kernfärbung auf einfache Vorgänge zurückführen. Verfolgen wir den Weg des Farbstoffes durch den Tierkörper. Bald nach der intraperitonealen Injection der klaren roten Lösung findet eine Eindickung derselben statt, wobei gleichzeitig ein Hineindiffundieren der Farblösung in das umliegende Gewebe zustande kommt. Im Gewebe aber sind die Lösungsbedingungen für den Farbstoff ungünstiger. Bei einer gewissen Concentration¹⁾ erfolgt ein Ausfallen in amorpher Form (z. B. in Vacuolen von Makrophagen) oder in Kristallen (die Kerne und das Protoplasma der angrenzenden Zellen). In den Kernen wird die Concentration eine besonders hohe oder es sind hier die ungünstigsten Lösungsbedingungen²⁾ für den Farbstoff, so dass hier besonders reichliche Kristallisation stattfindet. Mit fortschreitender Concentration der noch freien Farbstofflösung kommt es schliesslich zur Abscheidung von Concrementen und Kristallen in der freien Bauchhöhle. Die Farbstofflösung diffundiert nun weiter und gelangt schliesslich in die Lymph- und Blutbahn und wird von dem Flüssigkeitsstrom im ganzen Körper verbreitet. Da die Lösungsbedingungen im Blutstrome bessere sind, diffundiert der Farbstoff aus der Bauchhöhle rasch in ihn hinein. Das Blut entledigt sich nun des Farbstoffes durch die natürlichen Ausscheidungswege: Leber und Niere. Infolgedessen steigt in diesen Organen die Farbstoffconcentration rapide an, und es kommt von neuem zur Abscheidung von Sulforhodamin sowohl in den Kernen vieler Drüsenepithelien wie auch in ihrem Protoplasma; aber auch in den Ausführungsgängen ist die Farbstoffconcentration eine so hohe, dass in den Tubuli contorti, den Sammelkanälchen der Niere, im Nierenbecken, Ureter und Blase sowie in den Gallengängen, der Gallenblase und im Darmlumen unsere wohlbekannten Nadelchen und Platten in allen Uebergängen und Farbennuancen (von gelbrot bis blauviolett) abgeschieden werden. Mit zunehmender Abscheidung verschwindet zunächst die blaue Kernfärbung in den zuerst gefärbten Zellen, dann nimmt die Färbung weiter schnell ab. Wenige Stunden später findet man blaue Kerne nur noch in Leber und Niere, dann verschwindet auch ihre Färbung.

Bei diesem Weg durch den tierischen Körper wird also der Farbstoff vorübergehend in amorpher und in Kristallform abgeschieden und es kommen dabei alle die Formen und Farbennuancen zur Beobachtung, welche wir bereits früher kennen gelernt haben.

Weniger gut aber gelingt bei einfacher mikroskopischer Betrachtung zu sagen, in welcher Form der Farbstoff in den blaugefärbten Zellkernen abgelagert ist. Goldmann hat ja mit den stärksten Objectiven Kristalle mit genügender Sicherheit wahrnehmen können, doch gelingt dies nicht immer.

1) Auch Aenderungen der Concentration der einzuspritzenden Farbstofflösungen beeinflussen die Intensität und den zeitlichen Verlauf der erhaltenen Vitalfärbung sehr wesentlich.

2) Das erscheint am wahrscheinlichsten, denn schon optisch erscheint der Zellkern dichter als das Protoplasma.

Ich konnte jedoch durch Untersuchung der gefärbten Organe mit dem Polarisationsmikroskop sowohl als mit Hilfe der Dunkelfeldbeleuchtung feststellen, dass die blaugefärbten Zellkerne stets Aggregate von Sulforhodaminkristallen enthalten. Ebenso liess sich zeigen, dass die optischen Erscheinungen der Kristalle in den Zellkernen mit denen völlig übereinstimmen, welche unter denselben Verhältnissen die künstlich dargestellten Kristalle zeigten.

Wir haben es also auch bei der metachromatischen Sulforhodaminfärbung mit einer rein physikalischen Erscheinung zu tun.

Interessant ist es nun, noch die beiden hier beschriebenen Arten von Metachromasie zu vergleichen. Im ersten Falle (Congorubin usw.) war sie bedingt durch einen Coagulationsprocess einer colloiden Lösung, im anderen Falle (Sulforhodamin) war Kristallisation die Ursache der Metachromasie. Das Sulforhodamin haben wir bisher als ein Kristalloid kennen gelernt, das aber gelegentlich auch Kolloideigenschaften zeigen kann¹⁾, denn wir sahen (wie bei der Vitalfärbung mit Colloiden) amorphe „Granula“ in den Makrophagen auftreten. In der Tat gelingt es nun auch typische Gele von Sulforhodamin beim freiwilligen Verdunsten seiner wässrigen Lösung zu erhalten. Damit aber ist ein Zusammenhang zwischen beiden Arten der Färbung gegeben, denn das Sulforhodamin ist ein kristallisierbares Colloid, das den Kristalloiden allerdings sehr nahe steht; in seinen Colloideigenschaften aber folgt es wieder den von uns aufgestellten Theorien.

Diese Beobachtungen glaube ich als einen directen Beweis für die Richtigkeit meiner Anschauungen vom Wesen der vitalen Färbung mit sauren Farbstoffen ansehen zu können, denn es gelingt auf diese Weise, Vorgänge in lebenden Zellen zu beobachten, die sich mit Sicherheit auf physikalische Grundlagen zurückführen lassen. Es lässt sich daraus aber der Schluss ziehen, dass physikalische bzw. physikalisch-chemische Prozesse im Tierkörper eine ebenso wichtige Rolle spielen wie chemische Vorgänge, und dass sie bei pharmakologischen Arbeiten eingehend zu berücksichtigen sind — ein Punkt, auf den Heffter²⁾ erst neuerdings wieder nachdrücklich hingewiesen hat.

1) Aluminium, colloides Silber usw. sind Stoffe, die trotz ihrer Colloidnatur kristallisieren können (vgl. Zsigmondy, l. c. S. 7).

2) A. Heffter, Die Auffindung von Arzneimitteln. Berlin 1914. A. Hirschwald.