Aus dem Königl. Zoologischen Institut der Universität Breslau
Direktor: Prof. Dr. Willy Kükenenthal.

Über die färberische Darstellung der Reduktionsorte und Oxydationsorte in Geweben und Zellen

Von
F. W. Oelze.

Hierzu Tafel III.

Inhalt.	Seite
I. Einführung	91
II. Unnas und Golodetz' Färbungen der Reduktionsorte mit Kaliumpermanganat, Eisenchlorid und rotem Blutlaugensalz und Tetranitrochrysophansäure	95
III. Berechtigen die erhaltenen Resultate zu der Annahme, dass nur das Protoplasma, im Gegensatz zum Kern, als Reduktionsort wirkt?	98
IV. Unnas und Golodetz' Färbungen der Sauerstofforte mit Rongalitweiss I und II	103
V. Berechtigen die erhaltenen Färbungen zu der Annahme, dass nur die Kerne, nicht aber auch das Protoplasma im allgemeinen Sauerstofforte sind? Kritik der Methode. Färbungen mit Natrium- hydrosulfit-Leuko-Methylenblau und Leuko-Nigrosin. Primäre und sekundäre Sauerstofffärbung. Oxydasen- und katalasenfreie Stoffe als Sauerstofforte im Sinne Unnas	109
VI. Oxydasereaktionen an Gewebsschnitten nach Schultze. Arbeiten von Golodez und Unna jun. und Leistikow	115
VII. Einschlussfärbung mit Leukobasen und Reagentien	117
VIII. Über spezifische Farbstoffwirkung und die Notwendigkeit ihrer Berücksichtigung bei biochemischen Arbeiten mittels Farbstoffen	118
IX. Zusammenfassung	119
X. Literatur	120

I. Einleitung.

Seitdem wir wissen, dass die Tiere Sauerstoff einatmen und Kohlendioxyd ausatmen, hat man versucht, dem Verlaufe der Atmung im Inneren des Organismus auf die Spur zu kommen. Für das gesamte Verständnis der physiologischen Vorgänge ist eine Aufklärung über das Wesen der Atmung von grösster Be-

deutung, denn die Atmung ist ohne Zweifel einer der wesentlichsten Punkte im Stoffwechsel der Zelle. Der Sauerstoffverbrauch kann, wie bekannt, auf zweierlei Weise, durch Erwerb freien Sauerstoffs oder durch intramolekulare Atmung, erfolgen.

Man hat sich vom Bau der lebenden Substanz, gerade mit Rücksicht auf die Atmung, die verschiedensten Bilder gemacht. Das Protoplasma wird von Pflüger (1), Ehrlich (2), Verworn (3) als ein Riesenmolekül aufgefasst, das an seinen „Aussenposten“ Synthesen mit den Molekülen der Nährstoffe eingeht. Andererseits fasst Pfeffer (4) die Wirkung des Protoplasmas auf als bedingt durch eine besondere physikalische Gliederung, die eine grosse Mannigfaltigkeit und Verschiedenheit der chemisch wirksamen Komponenten ermöglicht. Jacoby (5) vertritt aber in neuerer Zeit, entgegen der von Hofmeister (6) weiter ausgebauten Ansicht Pfeffers, die Auffassung, dass nur relativ wenige verschiedene chemische Komponenten zur Erklärung der Zellwirkung nötig sind, indem er sich besonders auf Arbeiten von Pawlow und Parastschuk (7) stützt.

Zur Erklärung der teils überaus starken Oxydationswirkung der Zellen wies Schönbein (5) auf die Oxydationsfermente hin. Traube (8) baute den Gedanken weiter aus. Er führte die Auffassung in die Biologie ein, dass in der Zelle Oxydationsfermente vorhanden sein müssen, die als Sauerstoffüberträger tätig sind, d. h. den den Zellen zuströmenden Sauerstoff wie ein Peroxyd aufnehmen und an die zu oxydierenden Substanzen weitergeben können. Damit ist dem bereits Ausdruck gegeben, dass die zellulären Oxydationen und Reduktionen im engsten und untrennbaren Zusammenhang stehen müssen. Dieser enge Zusammenhang geht auch aus den Versuchen Ehrlichs hervor. Ich möchte hier die etwa dreissig Jahre nach der Veröffentlichung der Arbeit Ehrlichs geschriebenen Worte von Jacoby (5), dessen Darstellung ich hier gefolgt bin, wiederholen: „Die grossen theoretischen Gesichtspunkte, die Ehrlichs Arbeit neben dem experimentellen Material enthält, dürften wohl erst durch die physiologische Forschung der Zukunft hinreichend ausgebeutet werden.“

In physiologisch-chemischer Beziehung ist das vorliegende Problem für die Pflanzenphysiologie besonders von Bach und Chodat (9) gefördert worden, die auch in neuester Zeit zahlreiche Arbeiten in den Berichten der deutschen chemischen

Gesellschaft u. a. O. veröffentlicht haben. Bach und Chodat unterscheiden drei Arten von Oxydationsfermenten:

1. Oxygenasen, eiweissartige Stoffe, die mit einem Abbau-paroxygen zu einer peroxydartigen Verbindung zusammentreten und ihr Oxygen wieder an andere Stoffe abgeben können, besonders mit Unterstützung:
2. der Peroxydasen, die nur bei Gegenwart von Peroxyd oxydieren können;
3. die Katalasen, welche Hydroperoxyd katalytisch unter Entwicklung molekularen Sauerstoffes zersetzen. Als
4. Gruppe kommen hierzu noch nach Bach (26) die Perhydridasen, die, um den Anforderungen der Oxydation durch den gebundenen Sauerstoff des Wassers zu begegnen, hydrolytische Oxydations-Reduktionsprozesse ebenso beschleunigen, wie es Platinmetalle tun.

„Alles, was vor oder nach den Arbeiten von Bach und Chodat von Oxydasen gegolten hat, ist in gleicher Weise auf trennbare Gemenge von Oxygenasen und Peroxydasen anzuwenden.“

Eine andere Einteilung der Fermente siehe in der während der Korrektur erschienenen Arbeit von Bach (26).

Sehr wichtig sind die Arbeiten von v. Cзылharz und v. Fürth (10), die tierische (und auch zum Vergleich pflanzliche) Peroxydasen qualitativ und quantitativ geprüft haben, und die insbesondere nachweisen, dass die peroxydaseähnliche Wirkung des Hämoglobins von der einer echten Peroxydase ganz verschieden ist.

Batelli und Stern (11) haben die Versuche von v. Cзылharz und v. Fürth mit anderer Methodik weitergeführt und folgende Tabelle über die Intensität der Peroxydasewirkung aufgestellt: Leber, Niere, Milz, Lunge, Pankreas, Lymphdrüse, Rindsmuskel, Gehirn, Hoden, Hundemuskel, Thymus, Nebenniere, Schilddrüse, Kaninchenmuskel, der am schwächsten wirkt.

Sind somit von physiologisch-chemischer Seite aus bereits auf einer sicheren Methodik aufgebaute Untersuchungen gemacht worden, so wird doch eine wirkliche Klärung unseres Problems erst dann erfolgen können, wenn die Vorgänge im mikroskopischen Bilde der Zelle selbst lokalisiert und verfolgt werden können. An solchen Arbeiten fehlte es bis vor kurzem. Die Arbeit Ehrlichs ist

organologischer, nicht mikroskopischer Natur, genießt aber den Vorteil der vitalen Arbeitsweise. Auf eine spezielle Arbeit von Schultze werden wir noch unten zu sprechen kommen.

P. G. Unna war es, der mit Hilfe einer schon seit einigen Jahren aufgestellten Methodik (12—15) eine die ganze Mannigfaltigkeit verschiedenster Organe umfassende Arbeit in diesem Archiv veröffentlichte. Seine Ausführungen gipfeln in dem Satze: „Die Kerne sind die Sauerstofforte, das Protoplasma die Reduktionsorte des Gewebes. Der Muskel ist ein Reduktionsort.“

Die Ansicht Unnas über den fermentativen Charakter der Oxydationsvorgänge stellen Golodetz und Unna jun. (16) folgendermassen dar:

„Über die auf der Basis dieser Hypothese aufgebaute Erklärung des Sauerstoffstroms im tierischen Gewebe äussert sich Unna etwa wie folgt: Die aktiven Sauerstoff als Hydroperoxyd enthaltende Lymphe¹⁾ überschwemmt das nachgewiesenermassen reduzierende Zellprotoplasma, welches einen Teil des zugeführten O zu seiner eigenen Verbrennung gebraucht, einen anderen Teil aber der Wirkung der im Protoplasma sicher vorhandenen Katalase preisgibt. Die Folge ist, dass der das Protoplasma durchwandernde Sauerstoff, seiner Aktivität beraubt, lediglich in molekularer Form in den Kern eintritt. Hier sind aber Kräfte vorhanden, die den molekularen Sauerstoff wieder aktiv machen, indem der molekulare Sauerstoff in Kontakt mit der von Bach angenommenen Oxygenase Peroxyde liefert. Diese Peroxyde mögen alsbald von den in Kernen sicher vorhandenen Peroxydase zer setzt werden, aber als Produkt erscheint hierbei, nicht wie bei der Katalase des Protoplasmas molekularer, sondern aktiver Sauerstoff, welcher als solcher im Kern aufgespeichert wird. So entsteht das Bild von aktiven sauerstoffhaltigen Kernen inmitten eines reduzierenden Protoplasmas. Die Untersuchungen P. G. Unnas gipfeln also in der Gegenüberstellung reduzierender (Reduktionsorte) und sauerstoffhaltiger Gewebelemente (Sauerstofforte), und zwar sollen Reduktionsorte Katalase aber keine Peroxydase, Sauerstofforte Peroxydase aber keine Katalase enthalten.“

Die Anschauungen Unnas weisen denen Ehrlichs gegenüber zahlreiche Widersprüche auf. Ich habe die Methoden Unnas

¹⁾ Der Oxydasengehalt der Lymphe ist mir neu.

selbst angewandt, und bin bereits hierbei zu Bildern gekommen, die ganz andere Schlüsse, wie die Unnaschen, zu ziehen gestatteten. Dann habe ich die Methodik selbst kritisch geprüft und nach meiner Ansicht ihre völlige Haltlosigkeit bewiesen. Da die Methoden Unnas bereits vielfach, auch im akademischen Unterrichte, angewandt werden, und wohl auch noch weiteren Eingang finden würden, halte ich es für meine Pflicht, meine diesbezüglichen Untersuchungen hier zu veröffentlichen. Auch im neuesten Bande von Oppenheimers Handbuch der Biochemie geben Unna und Golodetz (27) in einer Arbeit „Biochemie der Haut“ die auf dieser Methodik beruhende Einteilung in System der Sauerstofforte und System der Reduktionsorte. An gleichem Orte erkennt Bach (26) die Methodik Unnas durchaus an, lehnt aber Unnas theoretische Anschauungen durchaus ab. Auf diese während der Korrektur erschienenen Arbeiten werde ich später eingehen. Anschliessend gebe ich dann noch meine Auffassung über die „Einschlussfärbung mit Leukobasen“, sowie eine theoretische Auseinandersetzung über „spezifische Farbstoffwirkung und die Notwendigkeit ihrer Berücksichtigung bei biochemischen Untersuchungen mittels Farbstoffen“ wieder.

Ich werde im folgenden zunächst jeden der beiden Hauptteile der Unnaschen Arbeit, den Nachweis der Reduktionsorte und den Nachweis der Sauerstofforte, im Sinne Unnas kurz wiedergeben und zu jedem Teile eine Kritik anfügen.

Die betreffenden Versuche wurden zum Teil in meinem Laboratorium in Braunschweig, in der Hauptsache aber im Königl. Zoologischen Institut der Universität Breslau ausgeführt. Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Willy Kükenthal, möchte ich auch an dieser Stelle meinen tiefgefühlten Dank für die bereitwillige Unterstützung, die er meinen Arbeiten hat zu Teil werden lassen, aussprechen.

II. Unnas und Golodetz' Färbungen der Reduktionsorte mit Kaliumpermanganat, Eisenchlorid und rotem Blutlaugensalz u. Tetranitrochrysophansäure.

Unna und Golodetz (12) geben im Jahre 1909 drei verschiedene Reagentien zum Nachweis der Reduktionswirkung der Gefrierschnitte an. Als Vorbedingung für die Brauchbarkeit eines derartigen Färbemittels werden vier Eigenschaften gefordert:

1. Das Färbemittel darf nicht in die Klasse der Farbstoffe gehören, sondern die Farbe muss erst durch den Kontakt mit dem Gewebe erzeugt werden.

2. Dasselbe muss leicht durch das Gewebe reduziert werden,

3. dabei mit dem Gewebe eine gefärbte Verbindung ergeben und

4. dieses gefärbte Produkt muss eine andere Farbe besitzen wie das Färbemittel selbst, so dass der Farbumschlag die Reduktion bestimmt anzeigt.

Indem wir gleich die Hauptarbeit Unnas mit berücksichtigen, finden wir drei solcher Färbemittel:

1. Kaliumpermanganat; welches durch das Gewebe zu Mangansuperoxyd reduziert wird.

2. Ein Gemisch von Eisenchlorid und rotem Blutlaugensalz; hier wird durch die reduzierende Kraft des Gewebes das Ferricyankalium zu Ferrocyankalium umgewandelt, das mit dem Eisenchlorid Berlinerblau ergibt, durch welches die für die Reduktionswirkung des Gewebes bezeichnende Blaufärbung hervorgerufen wird.

3. Tetranitrochrysophansäure, von Liebermann und Seidler dargestellt; dieselbe ist leicht reduzierbar, zeigt dabei einen charakteristischen Farbumschlag und die Eigenschaft, dass das Reduktionsprodukt das Gewebe in charakteristischer Weise anfärbt¹⁾. Es wird in Chloroform gefärbt. Untersucht werden unfixierte, sowie mit Formalin und Alkohol fixierte Gefrierschnitte. Bei Fixierung werden die Bilder eher noch schärfer und besser, als bei Benutzung frischen Gewebes. Als geringe Differenzen, die aber nicht die Hauptpunkte und diametralen Gegensätze betreffen, sind zu nennen das Fehlen der Knäuelkörner im Manganbilde nach Alkoholfixierung und das scharfe Hervortreten der roten Blutkörperchen nach Formalinfixierung.

Es erhebt sich die wichtige Frage, ob die erhaltenen Bilder nur die Reduktionskraft der einzelnen Gewebe und Zellen versinnbildlichen, oder ob etwa auch die Alkaleszenz und Azidität der Stoffe und der Umgebung von Einfluss auf die erhaltene Färbung ist.

Beim Manganbilde ist dies nicht der Fall. Man kann das KMnO_4 mit Essigsäure ansäuern oder mit NH_3 alkalisch machen, ohne dass die Färbung sich wesentlich ändert. Vielleicht sind kleine Intensitätsunterschiede vorhanden, diese beziehen sich aber auf alle Elemente gleichmässig.

Ganz anders liegen die Verhältnisse beim Eisencyanbild. Säuern wir das Gemisch von Eisenchlorid und rotem Blutlaugensalz mit etwas konz. Salzsäure¹⁾ oder Essigsäure an, so erhalten wir beispielsweise in der Oberhaut eine vollkommene Inversion der Färbung. Die normalerweise blass gefärbte basale Hornschicht wird zum am meisten gefärbten Bestandteil des Schnittes.

Wir sehen an der Verschiedenartigkeit des normalen Eisencyanbildes, dass bei diesem ausser der Reduktionskraft ganz wesentlich auch die Alkaleszenz und die Acidität der Gewebe eine Rolle spielen. Die feinen Differenzen, die sich unter anscheinend gleichartigen Hornsubstanzen (basale Hornschicht und Wurzelscheide) ergaben, liessen erkennen, dass schon das

¹⁾ Von mir gesperrt.

blosse Zusammenwirken dieser zwei Faktoren (Reduktionsvermögen einerseits, Alkaleszenz resp. Acidität andererseits) den Gegenstand in vorher ungeahnter Weise kompliziert.

Beim Nitrochrysophanbild tritt ein bedeutsamer Widerspruch dadurch zutage, dass eine Inversion der Wurzelscheide nach Unnas Ansicht durch Ansäuern der Farblösung nicht eintreten darf, es in der Tat aber doch in ganz prägnanter Weise tut. Da ich auf die diesbezügliche Hypothese Unnas nachher nicht zurückzukommen brauche, will ich diesen Widerspruch nicht näher erörtern, sondern verweise nur auf die zitierte Abhandlung.

Da die Eisencyanbilder und Nitrochrysophanbilder, wie wir gleich sehen werden, für die Entscheidung der Frage, ob wir es mit Reduktionsorten zu tun haben, oder nicht, belanglos sind, kann ich hier auf eine Wiedergabe der erhaltenen Befunde verzichten. Hervorheben will ich nur, dass im Eisencyanbilde die Kerne im oberen Drittel der Stachelschicht und in der Niere, wenn auch schwach, gefärbt sind. Wir haben es also im Eisencyanbilde nicht mit einer ausschliesslichen Protoplasmafärbung, sondern wenigstens stellenweise mit einer Protoplasma- und Kernfärbung zu tun.

Das Manganbild der menschlichen Fußsohlenhaut stellt sich folgendermassen dar: Am tiefsten gebräunt ist die gesamte Oberhaut und in dieser wieder am stärksten die basale Hornschicht, etwas weniger die oberen Teile der Stachelschicht, während die an die Cutis grenzende basale Stachelschicht (Keimschicht) nur sehr schwach gebräunt erscheint und wie ein lichter Saum das Deckepithel begrenzt. Innerhalb der gesamten Stachelschicht sind die Kerne wie helle Lücken ausgespart. Die mittlere und obere Hornschicht sind weniger stark gebräunt, als die basale Hornschicht, doch an manchen Präparaten durchsetzt von vertikalen, dunkelbraunen Partien an Stelle der Wellentäler der Hornschicht. Die Gänge der Knäueldrüsen zeigen im Kleinen dasselbe Bild, wie das Deckepithel, d. h. die der Cutis zunächst liegenden basalen Ganglienzellen sind nur gelb gefärbt, die inneren; an die Cuticula angrenzenden dunkler und die Cuticula selbst ist so stark gebräunt wie die basale Hornschicht und daher im Bilde auffallend hervortretend. Die Knäueldrüsen stechen von den Ausführungsgängen durch ihre schwache Färbung ab. Nur finden sich hier und da dunkelbraune Körnchen eingesprengt. Sowohl in den Knäueln wie in den Gängen sind alle Kerne ungefärbt, was natürlich in den Gängen durch den Kontrast auffallender zutage tritt als in den Knäueln. In der Cutis ist das Kollagen nur schwach gelblich gefärbt, ebenso das feine Elastin der oberen Cutispartien; die dickeren elastischen Fasern der tiefen Cutis und Subcutis treten dagegen etwas stärker gefärbt hervor, ebenso die markhaltigen Nerven. Alle Muskelfasern dagegen, sowohl die der Arterien und Venen wie die der Wandungen der Knäueldrüsen, sind stark gebräunt wie das Protoplasma. Das Fett der Fettzellen ist farblos.

Die menschliche Kopfhaut zeigt folgendes Bild: Die Hauptreduktionsorte sind die Stachelschicht und Wurzelscheide der Haare. Alle Kerne stellen sich als farblose Lücken dar. Neben den Knäuelgängen mit ihrer dunkeln Cutikula und den glatten Muskeln sind hier noch die Talgdrüsenepithelien ziemlich stark gebräunt mit Aussparung des ungefärbten Talgfettes. Das subcutane Fett ist farblos.

Unna zieht nun aus den erhaltenen Färbungen folgende Schlüsse: Das wichtigste Resultat in mikrochemischer Beziehung, welches die sämtlichen Reduktionsfärbungen ergeben haben, ist das hervorragende Reduktionsvermögen aller protoplasmatischen Elemente der Haut. Alle Zelleiber, sowohl der Bindegewebszellen wie der Knäuel- und Talgdrüsen, am meisten aber die voluminösen Zelleiber der Stachelschicht, sowohl des Deckepithels wie der Haarbälge, reduzieren in hervorragendem Maße. An dieses Zellprotoplasma schliesst sich als nahezu gleichwertig die Muskelsubstanz an.

Dadurch tritt das Zellprotoplasma einerseits in einen Gegensatz zu den Intercellularsubstanzen, dem Kollagen und Elastin, andererseits in einen noch schärferen Gegensatz zur Kernsubstanz. Besonders die letztere Substanz ist neu und wichtig. Man nannte wohl bisher gewisse saure Färbungen, wie die mit Eosin, van Giesons Gemisch: Protoplasmafärbungen. Doch waren sie es nicht in dem elektiven Sinne, dass die Kerne dabei ganz ungefärbt (als helle Kreise) hervortraten. Das kam daher, weil bestimmte Teile der Kernsubstanz (Kernsaft) auch saure Farben annehmen. Die Reduktionsfärbungen sind aber solche echte, elektiv wirkende Protoplasmafärbungen, da die Kernbestandteile, wie es scheint, alle nicht zu reduzieren vermögen.

Die Reduktionsfärbungen lassen also erkennen, dass — allgemein gesagt — zwei Orte im tierischen Gewebe vorhanden sind, welche das bisher demselben allgemein zugeschriebene Reduktionsvermögen nicht besitzen, die Kerne und das Fett. Diese Tatsache lässt von vornherein zwei verschiedene Deutungen zu, und daher brauchte die Ursache der Reduktionsunfähigkeit bei beiden Gewebeelementen, den Kernen und dem Fett, auch nicht einmal dieselbe zu sein. Man kann entweder annehmen, dass diese Orte mit Sauerstoff nur gesättigt und daher nicht in der Lage sind, den Reaktionsflüssigkeiten Sauerstoff zu entziehen. Man kann aber auch die Hypothese aufstellen, dass diese Orte ausserdem selbst Sauerstoff abgeben; sei es, dass sie aktiven Sauerstoff besitzen (Peroxyde) oder Sauerstoff zu aktivieren vermögen (Peroxydasen).

Hier dürfte ich wohl auch auf den Unterschied zwischen Färbung und Fixierung verweisen.

III. Berechtigen die erhaltenen Färbungen zu der Annahme, dass nur das Protoplasma, im Gegensatz zum Kern, als Reduktionsort wirkt? Kritik der Methoden.

Eine kritische Betrachtung der drei Methoden ist insofern sehr vereinfacht, als zwei derselben selbst von ihrem Urheber

nicht für einwandfrei gehalten werden. Wir haben oben bereits gesehen, dass die Eisencyanfärbung stellenweise nach Unna die Kerne färbt, also gerade das Gegenteil von dem beweist, was zu beweisen von Unna gewünscht wird. Der grosse Einfluss von Basizität und Acidität war auch von Unna selbst schon untersucht worden. Auch bei der Nitrochrysophanfärbung hatten wir Widersprüche kennen gelernt und besonders bemerkenswert ist noch der Einfluss der Alkalität auf die Färbung. L. Golodetz bespricht in dem Abschnitt „Die oxydierenden und reduzierenden Eigenschaften unserer mikroskopischen Reagenzien“, in dem Buche „Die Bedeutung des Sauerstoffs in der Färberei“ (25) diese beiden Färbungen folgendermassen: Ausgeschlossen für die Untersuchung mit der Eisencyanmischung sind stark basische und stark saure Stoffe, die auf das eventuell sich bildende Berlinerblau zersetzend einwirken können (Bildung von Eisenhydroxyd bei Alkali und von ungefärbten Eisensalzen bei Säuren) und die Färbung auch dann verhindern, wenn eine Reduktion stattgefunden hat. Ausgeschlossen von der Prüfung mit Chrysophangelb sind basische Stoffe, weil hierbei auch ohne Reduktion ein Umschlag in Rot stattfindet, indem das Salz der Säure ebenfalls eine rote Farbe besitzt. Die Anwendung des Chrysophangelbs ist also im Gegensatz zu der Eisencyanmischung auf die Untersuchung von neutralen und sauren Stoffen beschränkt. Hierzu möchte ich bemerken, dass auch saure Stoffe im Eisencyanbilde keine reine Reduktionsfärbung ergeben.

Unna selbst bespricht übrigens auch in seiner Hauptarbeit in diesem Archiv die Bedenklichkeit der beiden Färbungen. Wenn wir die Reduktionsfärbungen an frischen Hautschnitten kurz zusammenfassen wollen, sagt Unna, so müssen wir beachten, dass von den drei benutzten Methoden nur das Manganbild ein reines, unbeeinflusstes Reduktionsbild genannt zu werden verdient, da bei ihm die mehr saure oder alkalische Beschaffenheit der Gewebelemente ohne Einfluss auf die Tiefe der Färbung ist. Sowohl das Eisencyanbild wie das Nitrochrysophanbild sind solchen Einflüssen unterworfen und so lehrreich sie im einzelnen sein mögen, für die reine Darstellung der Reduktionsorte kommen nur die allen drei Bildern gemeinsamen Färbungsergebnisse in Betracht und bei einer Divergenz der Bilder haben wir uns bis auf weiteres an das Manganbild zu halten.

Somit gibt Unna selbst zu, dass nur eine seiner drei Färbungen, und zwar die mit Kaliumpermanganat, wirklich einwandfrei ist. Es könnte wohl die Frage aufgeworfen werden, warum denn überhaupt diese beiden Verfahren, die, wie auch aus der Arbeit von Unna und Golodetz aus dem Jahre 1909 ersichtlich ist, den Gegenstand durch Aufzeigung ganz anderer Eigenschaften, als der in Frage kommenden „in vorher ungeahnter Weise komplizieren“, in einer Abhandlung über Reduktionsorte nicht mit Stillschweigen übergangen worden sind?

Wir kommen nun zu der einzigen Methode, die für die Entscheidung der Frage, ob ein Gewebeelement ein Reduktionsort ist oder nicht, von Belang ist, nämlich zu der Färbung mit übermangansaurem Kali.

Kaliumpermanganat wird in der mikroskopischen Technik seit langem angewandt (17). Es ist eins unserer kräftigsten Oxydationsmittel, von ihm wird beispielsweise Oxalsäure zu Kohlendioxyd, die meisten organischen Stoffe zu Kohlensäure und Wasser oxydiert. Setzen wir eine Gefrierschnitte eines Organes der Wirkung dieses starkwirkenden Oxydationsmittels aus, so ist es leicht erklärlich, dass durch diese höchst energische Wirkung alles im Gewebe oxydiert wird, was überhaupt nur zu oxydieren ist. Nun ist aber bei der Entscheidung dieser Unnaschen Methode vor allem der physiologische Gesichtspunkt massgebend.

Ehrlich (2) nimmt für die Sauerstoffaffinität (des Protoplasmas) drei Zonen an. Indem ich mich Ehrlich anschliesse, möchte ich für die Reduktionsorte im Gewebe auch diese drei Zonen oder Phasen annehmen, ausserdem aber noch eine vierte hinzufügen. Indem ich mich für einen Augenblick auf den Standpunkt Unnas begeben, der das Protoplasma als „nur-reduzierende“ Substanz auffasst, liessen sich diese Phasen vielleicht folgendermassen formulieren: Die erste Phase reduziert im normalen Verlaufe der Tätigkeit nicht, erst im Notfall tritt sie in Aktion und vermag so die Zelle auch in diesem Falle, wenigstens eine Zeitlang, noch am Leben zu erhalten; die Zelle wird so in den Stand gesetzt, nicht allzu lange andauernde Störungen zu überwinden, denen sie sonst erliegen müsste. Die zweite Phase stellt denjenigen Reduktionsort dar, welcher im normalen Leben der einzige funktionierende ist. Die dritte Phase hat ein normalerweise nie befriedigtes Reduktionsbedürfnis,

sie übt also eine kontinuierliche Zugkraft aus, und erhält so den ganzen Mechanismus im Gange; ihre Sättigung stellt eine schwere Gefahr für den Organismus dar. Als vierte Phase bezeichne ich diejenige, die zwar auch Reduktionswirkungen auszuüben vermag, oder mit anderen Worten, die auch oxydiert werden kann, die aber mit der Physiologie der reinen Oxydierung und Reduzierung nichts zu tun hat. Man kann hier auf die äusserst mannigfaltigen Vorgänge verweisen, die sich im Organismus abspielen, wie etwa Auf- und Abbau der Zellsubstanzen und Nahrungsstoffe, Produktion von Sekreten und Exkreten usf., die aber mit dem Gaswechsel bei der Gewebeatmung nicht in direktem Zusammenhange stehen.

Für den normalen Verlauf von Oxydation und Reduktion ist diese vierte Phase also ohne Bedeutung, da diese durch jene nicht direkt tangiert wird. Ich schliesse mich also für den normalen Verlauf dieser Reaktionen vollkommen Ehrlich an, welcher schreibt, „dass das funktionierende Protoplasma gleichsam ein Janusgesicht besitzen muss, indem es einerseits durch Vermittlung seiner sauerstoffgesättigten Orte bestimmte Verbindungen oxydieren und andere Verbindungen mit Hilfe der ungesättigten Gruppen reduzieren kann“.

Von Wichtigkeit wird diese vierte Phase aber sofort, wenn wir die vitale Methodik Ehrlichs verlassen, und uns dem mit Wasser ab-, bzw. ausgespülten Gefrierschnitte Unnas zuwenden. Hier liegen die Verhältnisse doch wohl so, dass durch das äusserst energische Kaliumpermanganat alles oxydiert wird, was sich überhaupt oxydieren lässt. Durch diese brutale Oxydation wird zweifellos auch meine vierte Phase oxydiert und damit als Reduktionsort gekennzeichnet, genau wie die anderen drei Phasen auch. Es liegt auf der Hand, dass ein solches Bild uns über den normalen Verlauf der Reduktion im Gewebe keine einwandfreie Vorstellung vermitteln kann. Aus diesem Grunde erscheint mir auch diese letzte der Methoden Unnas schweren prinzipiellen Bedenken zu unterliegen.

Ich brauche aber gar nicht näher auf diese Anschauungen einzugehen, da ich gleich zeigen werde, dass überhaupt die ganze Auffassung Unnas über das Protoplasma als einseitigen und alleinigen Reduktionsort nicht haltbar ist.

Betrachtet man einige nach Unnas Vorschrift hergestellte, mit Kaliumpermanganat gefärbte, unfixierte Gefrierschnitte, so

wird man im allgemeinen eine absolute Nichtgefärbtheit der Kerne nicht feststellen können. Ich habe mich mit Vorliebe Schnitten durch Schnauzen (von Ratten) bedient, einmal, da dieselben sich unfixiert auf dem Gefriermikrotom recht gut schneiden lassen, und andererseits, weil eine solche Schnitte in sich eine reichhaltige Fülle der verschiedensten Gewebe enthält. Da auch Unna dieses Objekt benutzt hat, liessen sich ohne weiteres Vergleiche ziehen. Im Muskelgewebe wie auch im Bindegewebe habe ich nun das Fehlen von Kernen nicht daraus entnehmen können, dass an ihrer Stelle im Gewebe farblose, helle Punkte lagen. Diese Gewebe bieten vielmehr durchaus das Bild einer gleichmässigen, also Kern- und Protoplasmafärbung dar.

Unna selbst legt besonderen Wert darauf, dass in der Stachelschicht (der Haut), „je tiefer dieselbe gefärbt ist, die ungefärbten Kerne darin um so auffallender als runde Lücken erscheinen“. Auf der beigegebenen Farbentafel ist eine solche Schnitte dargestellt. Aus Fig. 5 dieser Tafel (die das fragliche Bild darstellt) ist nun mit grosser Klarheit und völliger Sicherheit zu entnehmen, dass die Kerne schön gelb gefärbt sind. Da nun alles, was sich im Manganbilde gelb färbt, nach Unna als Reduktionsort angesprochen werden muss, so folgt hier aus Unnas eigener Figur mit zwingender Logik, dass die Kerne Reduktionsorte sind!

Ich lege Wert darauf, festzustellen, dass auf derselben Tafel alle anderen Gewebsteile und Gewebe, die nach Unna keine Reduktionsorte sind, in der richtigen weissen Farbe gehalten sind, so, um nur ein Beispiel zu geben, in Fig. 13 die basale Hornschicht.

Ausdrücklich hebe ich hervor, dass ich nicht etwa annehme, dass die Kerne ebenso starke oder gar stärkere Reduktionswirkung erkennen lassen, wie das Protoplasma. Es kommt mir nur darauf an, zu zeigen, dass die die Reduktionswirkung verratende Manganfärbung der Kerne überhaupt vorhanden ist und nicht etwa den Wert Null annimmt.

Die Unnasche Hypothese der Lokalisation der Reduktionsorte und Sauerstofforte ist aber durchaus eine exklusive, sie beruht und steht und fällt auf und mit der Annahme, dass das

Protoplasma nur Reduktionsort und der Kern nur Sauerstoffort sei.

Es könnte vielleicht der Einwand erhoben werden, dass die Kerne doch ungefärbt seien und nur durch das über und unter ihnen liegende Protoplasma, welches ja gefärbt ist, gleichfalls gefärbt erschienen. Dieser Einwand ist aber nicht stichhaltig, einmal spricht Unna ausdrücklich von ungefärbten Kernen und zweitens würde etwa durch die Unmöglichkeit, mit dem Gefriermikrotom genügend dünne Schnitten von unfixiertem Materiale zu erhalten, nur von neuem die Unfähigkeit der Methode, brauchbare Unterlagen für wichtigste Schlussfolgerungen zu geben, in helles Licht gesetzt werden.

IV. Unnas und Golodetz' Färbungen der Sauerstofforte mit Rongalitweiss I und II.

Unna und Golodetz (14) empfahlen im Jahre 1910 als Reagens auf Oxydation der Haut das „Rongalitweiss“. Methylenblau wird zur Leukobase reduziert und zwar mittels „Rongalit“, einem in der technischen Färberei gebräuchlichen Ätzmittel, das aus einer Verbindung von Formaldehyd mit dem Natriumsalz der Formaldehydsulfoxylsäure besteht. Rongalit reduziert zunächst nur in der Wärme, durch Ansäuern der Farblösung geht nach Unna und Golodetz die Reduktion der Farblösung bereits in der Kälte vor sich. Die Darstellung geschieht folgendermassen: 1 g Methylenblau wird in Wasser gelöst, zu der Lösung etwa 2 g Rongalit zugesetzt und das Ganze aufgekocht. Nach kurzer Zeit wird die Flüssigkeit unter Abscheidung von Schwefel entfärbt. Nach dem Filtrieren resultiert eine schwach gelbe Lösung, die sauer reagiert und an der Luft sich nicht bläut. Selbstverständlich hat das Methylenweiss das Bestreben, sich an der Luft zu oxydieren, aber das überschüssige Rongalit verhindert jede Oxydation durch den Luftsauerstoff. Kommt aber ein genügend starkes Oxydationsmittel (H_2O_2 , Eisenchlorid, Ferricyankalium) hinzu, so wird der Einfluss des Rongalits überwunden und es findet eine rasche Oxydation statt.

Alkalien bewirken ebenfalls eine Bläuung, aber (wie es scheint) nicht direkt, sondern indirekt. Wir haben nämlich in der Lösung neben dem Methylenweiss die freie Formaldehydsulfoxylsäure, denn die gebildete Ameisensäure oder H_2OS_4 bindet einen Teil des Natriums des Rongalits und macht etwas Säure frei. Diese stark reduzierende Säure vermag schon in der Kälte der Oxydation seitens der Luft das Gegengewicht zu halten, da, wie gesagt, die Reduktion durch Rongalit bei Gegenwart von Säuren schon in der Kälte vor sich geht. Wenn aber Alkali hinzu kommt und diese Säure bindet, so kann der Luftsauerstoff ungehindert seine oxydierende Wirkung entfalten. In der Tat beginnt die Bläuung durch Alkalizusatz immer von der freien, der Luft ausgesetzten Oberfläche her und verstärkt sich an dieser ganz langsam. Also auch hier hat man darauf zu achten, ob die zu prüfende

Substanz sauer oder alkalisch ist, da in letzterem Fall möglicherweise eine Oxydation seitens der Luft vor sich geht. Ein Zusatz von Säure zum Reagens verhindert auch hier die störende Wirkung des Alkalis.

In seiner Hauptarbeit in diesem Archiv, Festschrift für Wilhelm Waldeyer, bespricht Unna den Einfluss verschiedener Fixierungsmethoden. Da ich Sauerstofffärbungen an fixiertem Materiale wegen unserer zu geringen Kenntnis der hierbei stattgefundenen Vorgänge für nicht diskutabel halte und in ihnen nur eine weitere Komplikation der hier interessierenden Fragen erblicke, habe ich nur an unfixiertem Material gearbeitet, und da ich unten nicht auf Färbungen an fixiertem Material zurückkomme, kann ich mich wohl damit begnügen, darauf hinzuweisen, dass nach Fixierung mit Alkohol, Einbettung mit Gummischleim, Fixierung mit Formalin eine umfassende Verschiebung bzw. Vernichtung der Unnaschen Sauerstofforte stattfindet.

Wichtig ist der Einfluss des Kochens auf die nachherige Rongalitweiss-Färbung. Keinesfalls zerstört dasselbe die Kernfärbung durchweg, aber doch an einzelnen Stellen (Knorpel, Muskel). An anderen Orten machen sich, offenbar durch partielle Abschwächung, regionäre Verschiedenheiten in der Stärke der Kernfärbung geltend (Leber, Niere). In letzteren Organen treten sogar beim Kochen besonders stark sauerstoffhaltige Tröpfchen oder Körnchen durch Kontrast besser hervor. Das Fett zeigt stellenweise eine leichte Färbung.

Wie geht nun nach Unna eine Rongalitweiss-Färbung vor sich? „In der gelblich gefärbten Flüssigkeit findet zunächst noch keine Bläuung der Schnitte statt, da die Anwesenheit von Rongalit dieselbe verhindert. Bringt man aber so behandelte Schnitte in Wasser und sorgt durch rasche Bewegung für eine schnelle Auswaschung des Rongalits, so wird dem Gewebe die Möglichkeit geboten, sein Oxydationsvermögen zu entfalten. Es bläuen sich daher nun alle Gewebs-elemente, welche eine Oxydation bewirken können.“

Auch in einer anderen Arbeit sprechen sich Unna und Golodetz ähnlich aus (21): Man braucht nur Gefrierschnitte von einer in Formalin fixierten Fußsohle anzufertigen und diese auf 2 bis 5 Minuten in ein Schälchen mit Rongalitweiss zu legen. Sie färben sich in demselben nicht,¹⁾ da noch Rongalit zugegen ist, spült man aber die Schnitte mit Wasser ab, so beginnt sofort die Blaufärbung etc.

Auch Leistikow (20) und P. Unna jun. (16) fassen den Vorgang in der gleichen Weise wie P. G. Unna auf.

Auf diesen Umstand, dass die Schnitten nach übereinstimmenden Angaben von P. G. Unna, L. Golodetz,

¹⁾ Von mir gesperrt. Leukomethylenblau ist ein Autoxydator!

P. Unna jun. und L. Leistikow sich im Rongalitweiss nicht färben, möchte ich die besondere Aufmerksamkeit lenken.

Es erhebt sich nun die Frage, ob der zur Regeneration des Methylenblaus nötige Sauerstoff von den Sauerstofforten der Schnitten direkt geliefert wird, oder ob diese etwa nur den Sauerstoff des Wassers, der Luft oder auch von Oxydationsmitteln übertragen. Unna spricht sich hierüber wie folgt aus: „Eine andere Unklarheit, welche der empirisch bewährten Methode¹⁾ anhaftet, betrifft die allmähliche Entwicklung der Blaufärbung in Wasser. Wir haben bisher angenommen, dass im Wasser das Rongalit aus dem Schnitte ausgespült und dadurch allein schon die Oxydation des imbibierten Leukomethylenblaus des Schnittes ermöglicht wird. Eine andere Auffassung der Rolle des Wassers hierbei ist aber von vornherein ebenfalls möglich, nämlich die, dass erst der im Wasser gelöste Sauerstoff die Bläuung verursacht, während nach jener Auffassung die Sauerstofforte des Gewebes sich färben würden, sowie ihnen nur das überschüssige Rongalit entzogen wird, bedürften sie nach dieser Auffassung dazu noch des von aussen an sie herangebrachten molekularen Sauerstoffes. In jenem Falle wären die Sauerstofforte selbst, selbst Quellen der Sauerstoffabgabe, in diesen nur die Überträger des Luftsauerstoffes. Die Unterscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten ist einfach. Man hat nur nötig, den Luftsauerstoff von dem von Rongalit befreiten Schnitte fernzuhalten. Hierbei zeigt sich, dass in diesem Falle der Schnitt ungefärbt bleibt. Hieraus geht mit voller Sicherheit hervor, dass die Bläuung des von Rongalit befreiten Schnittes unter Mitwirkung des Luftsauerstoffes vor sich geht und dass die Bläuung im (schwach kalkhaltigen) Leitungswasser, wie ich sie in der Praxis vornahm, nur deshalb gut ist, weil daselbst der im Wasser gelöste Luftsauerstoff und die schwache Alkaleszenz zusammenwirken. Da bei dieser Entwicklung in Leitungswasser mithin schon zwei unbestimmte Faktoren mitwirken, von denen nur einer notwendig ist, so ziehe ich es vor, die gut von Rongalit befreiten Schnitte einfach auf dem Objektträger feucht der Luft auszusetzen, bis die Bläuung vollendet ist.“

Mit ein paar Worten müssen wir noch auf die Veränderungen der resultierenden Färbung der Unna'schen Sauerstofforte eingehen, welche man erhält, wenn die Zusammensetzung des Rongalitweisses etwas geändert wird.

„Wenn man einen Teil Methylenblau mit zwei Teilen Rongalit und fünfzig Teilen Wasser kocht, so wird das Gemisch entfärbt, während gleichzeitig ein Teil des Leukomethylenblaus noch ungelöst zurückbleibt. Das klare Filtrat dieser trüben Mischung will ich RW nennen.“

Setzt man derselben Mischung einige Tropfen Salzsäure zu (bisherige Mischung), so wird schon bei mässigem Erhitzen das Methylenblau entfärbt und es entsteht direkt eine klare Lösung, die ich RW + HCl nennen will.

Diese saure Lösung gibt natürlich auf Zusatz einer entsprechenden Menge Natronlauge (1%) wiederum eine Fällung. Man kann bei vorsichtigem Zusatz des Alkalis den Punkt erreichen, wo eben eine Fällung beginnt.

¹⁾ Von mir gesperrt.

Wenn man jetzt filtriert, so erhält man eine neutralisierte Lösung, welche ich im folgenden RW neutral nennen will.“

Von den an verschiedenen Organen mit diesen drei Lösungen erhaltenen Färbungen will ich nur zwei hier wiedergeben.

A. Mensch. Haut aus der Umgebung eines Lippencarcinoms. Sofort nach der Exstirpation untersucht. Einige Minuten in Aqua destillata, Gefrierschnitte in:

	R W	R W + H Cl	R W neutral
Kerne { des Deckepithels der Stachelschicht der Lanugohaare	1	2	1
	1	3	1
Protoplasma { des Deckepithels der Stachelschicht der Lanugohaare der Bindegewebsz.	2	1	2
	2	1	2
	1	0	1
Mastzellen { Protoplasma Granula Kerne	3	1	0
	—	—	2
	—	—	0
Knäueldrüsen { Protoplasma Kerne	2	1	2
	2	2	1
Talgdrüsen { Protoplasma Fett	2	1	2
	0	0	Fett blaurot
Haar { Huxleys Scheide Henles Scheide	—	—	2
	—	—	0
Subkutanfett	0	0	dunkelblaue Kristalle
Muskeln	0	0	0

Die Zahlen bedeuten: 0 keine Bläuing. Die Stärke der Bläuing wird durch $\frac{1}{2}$, 1, $1\frac{1}{2}$, 2 und 3 wiedergegeben. Das Zeichen — bedeutet: in den Notizen nicht vermerkt.

Schon aus den ersten beiden horizontalen Rubriken (Kerne, Protoplasma) geht in evidenten Weise hervor, dass die Kerne sich am besten mit RW + HCl, das Protoplasma im Gegensatz hierzu besser mit RW und RW neutral färbt. Bei den Mastzellen tritt ebenfalls ein Unterschied der Lösungen auf, indem die Granula nur mit RW neutral gut gefärbt werden, während das Protoplasma am besten bei RW zur Geltung kommt. Ob in letzteren Fällen die Granula und Kerne gefärbt sind, kann man wegen der verdeckenden Färbung nicht unterscheiden.

B. Katze. Schnauze. Sofort nach dem Tode einige Minuten in Aqua destillata. Gefrierschnitte in:

	RW	RW + HCl	RW neutral
Kerne { Epithel	0	1	1
	Haarbalg	1	0
	Sinus	2	1
Protoplasma des Deckepithels	1	1	1
Mastzellen { Granula	1	0	2
	Protoplasma	2	2
Mastzellen der Sinushaare	—	—	3
Nerven der Sinushaare	1	0	3
Grosse Nerven der Subkutis	1	0	1
Fett	2 einzelne Fettzellen	0	3
Wurzelscheide der Sinushaare	—	—	3

In dieser Tabelle ist die starke Färbung einzelner Bestandteile der Sinushaare bemerkenswert (Mastzellen, Nerven, Wurzelscheide), eine Bevorzugung, die übrigens den ganzen Sinushaaren zukommt und offenbar auf ihren starken Blutgehalt zurückzuführen ist.¹⁾ Die Mastzellen sind mit RW neutral am besten gefärbt.

Ich weise auf diesen von Unna selbst konstatierten Einfluss des Blutgehaltes und auf das Fehlen von Angaben über die Färbung von Muskeln besonders hin.

Die Resultate, die Unna an Gefrierschnitten verschiedener Organe erzielt hat, wollen wir der Kürze wegen nur in zwei Beispielen anführen. Lunge des Kaninchens: Sämtliche Kerne sind gebläut, diejenigen des Alveolargewebes und peribranchialen Bindegewebes nur schwach, die des Bronchialbaumes dagegen bedeutend stärker. Auch die die Bronchien umgebenden Schleimdrüsenzellen und Knorpelinseln zeichnen sich durch tiefe Bläuung aus. In den dunkelblauvioletten Knorpelinseln sind besonders die Kerne und die Knorpelgrundsubstanz gefärbt, das Zellprotoplasma dagegen fast farblos. Bauchmuskel des Kaninchens: Muskelfasern absolut

¹⁾ Von mir gesperrt.

farblos. Kerne schwach gebläut. Von der Leiche eines alten Mannes, Kopfhaut: Vollkommen gleichmässige Kernfärbung aller Epithelien und Bindegewebszellen. Auch das Protoplasma der Stachelzellen, besonders der basalen, sowohl des Deckepithels wie der Haarbälge, Talgdrüsen und Knäueldrüsen ist blau gefärbt. Die älteren Stachelzellen, Hornschicht, Haar und Wurzelscheide, Kollagen und Elastin sowie die Fettzellen sind ungefärbt. Die schrägen Hautmuskeln (Arrektoren) sind ungebläut, die subcutanen Muskeln dagegen schwach gebläut, während die Kerne derselben gut gefärbt sind. Fußsohle: Die Stachelschicht der Oberhaut zeigt eine gute Kernfärbung und eine schwache Protoplasmafärbung der basalen Zellen. An den Knäueldrüsen sind die Kerne nur schwach, das Protoplasma dagegen stärker gefärbt, die Muskelmembran ist ganz ungefärbt. Viel stärker sind die Kerne der Knäuelgänge gebläut und auch ihr Protoplasma zeigt eine gute Blaufärbung. Kollagen, Fett und Hornsubstanz sind farblos. Die stärkste Bläuerung haftet, wie schon eine schwache Vergrößerung zeigt, an den Knäuelgängen.

Bei späteren Wiederholungen der Färbungen an den gleichen Organen stellen sich nur „unbedeutende Differenzen“ heraus. Bei einem Kaninchen war sogar in der Haut des Ohres die Kernfärbung nicht oder nur unwesentlich stärker als die Protoplasmafärbung¹⁾, während sonst in allen Fällen die Kernfärbung weit überwog. Endlich war eine Differenz in der Bläuerung der Muskelsubstanz wahrzunehmen, indem die Körpermuskeln und Arrektoren sich gar nicht, dagegen die subcutanen Muskeln des Kopfes beim Menschen und der Schnauze beim Kaninchen ganz schwach bläuten.

Als Hauptresultat dieser Versuche ist zu bezeichnen, dass wirklich zwischen den beiden im allgemeinen nicht reduzierenden Elementen der Gewebe, den Kernen und dem Fett, der Unterschied besteht, dass die Kerne sich mit RW stets bläuen, das Fett nicht. Hiernach ist das Fett nur sauerstoffgesättigt, die Kerne sind dagegen imstande zu oxydieren. Die Muskeln sind im allgemeinen ungefärbt, nur selten sehr schwach gefärbt. Einige Gewebe sind sowohl Reduktionsorte wie Sauerstofforte, so das Bronchialepithel, das Leberparenchym, einzelne Ganglien u. a. m.

Das Hauptresultat aller vorhergehenden Untersuchungen läuft also schliesslich auf den einfachen Satz hinaus, welchen die in der Einleitung erwähnte Beobachtung bereits ahnen liess: Die Hauptsauerstofforte des tierischen Gewebes sind die Kerne.

¹⁾ Von mir gesperrt.

An die Kerne schliessen sich im allgemeinen als weitere Sauerstofforte an: für das Bindegewebe die Mastzellen, für die Drüsenepithelien gewisse Granula, so die der Leberzellen und der Speichel- und Tränendrüsen, für das Zentralnervensystem das Protoplasma der Ganglienzellen und schliesslich als sekundärer, durch die Kernnähe beeinflusster Sauerstoffort: das Protoplasma aller basalen Epithelien, der Ausführungsgangsepithelien und des gesamten Bronchialepithels. Ferner sind die sauerstoffhaltigen Granula in den Leukozyten des Blutes, der Milz und des Knochenmarks Sauerstofforte.

Jedenfalls werden sowohl von P. G. Unna wie von allen mit seiner Methode Arbeitenden die Kerne als die Hauptsauerstofforte bezeichnet, was ich hiermit besonders hervorgehoben haben möchte.

V. Berechtigen die erhaltenen Färbungen zu der Annahme, dass nur die Kerne, nicht aber auch das Protoplasma im allgemeinen Sauerstofforte sind? Kritik der Methode. Färbungen mit Natriumhydro-sulfit - Leuko - Methylenblau und Leuko - Nigrosin. Primäre und sekundäre Sauerstofffärbung. Oxydasen- und katalasenfreie Stoffe, als Sauerstofforte im Sinne Unnas.

Ehe ich in eine kritische Besprechung der Rongalitweissfärbung als Methode zur Darstellung der Sauerstofforte eintrete, möchte ich erwähnen, dass die Rongalitweissfärbung für allgemeine histologische Zwecke unter Umständen mit Vorteil zu verwenden ist. So habe ich mit ihr in der Mesoglöa der Aktinien eine bisher unbekannte, weitgehende Differenzierung darstellen können, über die ich, zusammen mit dem eigenartigen Verhalten der Mesoglöa im polarisierten Licht, an anderer Stelle berichten werde.

Das Rongalitweiss wird in zwei Modifikationen in den Handel gebracht (von Dr. Grübler). Einmal als Rongalitweiss I als Leukobase des Methylenblauen, und zweitens, wie ich aus einer lebenswürdigen Mitteilung von Herrn Dr. Hollborn in Leipzig erfahren habe, als Rongalitweiss II als Leukobase des „Blau 1900“ von Unna. Beide Leukobasen sind mit Rongalit hergestellt.

Zunächst werden wir untersuchen, ob die Färbung mit Rongalitweiss wirklich nur eine reine Kernfärbung liefert (abgesehen von den von Unna selbst erwähnten Ausnahmen), und ob der Muskel sich durch fehlende Färbung als Reduktionsort dar-

stellt. Eine nach Unnas Vorschrift hergestellte Schnitte durch die Schnauze der Ratte liefert nun Bilder, die beiden Annahmen widersprechen. Ich habe in Fig. 1 eine, mit Hämatein-van Gieson gefärbte und in Fig. 2 eine mit Rongalitweiss II gefärbte Gefrierschnitte abgebildet. Während auf Schnitte 1 Bindegewebe und Muskulatur ungefähr in derselben Intensität gefärbt erscheinen, ist auf der Rongalitweißschnitte ein ausserordentlicher Unterschied zu konstatieren. Das Bindegewebe ist fast farblos, die Muskulatur dagegen tief gefärbt und, wie aus dem Bilde ersichtlich, überhaupt der hervorragendste Sauerstoffort des Gewebes. Nach Unna ist aber die Muskulatur „im allgemeinen ungefärbt, nur selten sehr schwach gefärbt“. Diesen Befund von der starken Färbung der mimischen Muskulatur habe ich gleichmässig an über hundert Präparaten erhalten; irgendein pathologischer Zustand der betreffenden Oberlippen ist ausgeschlossen. Ich habe dann gleich noch die Extremitätenmuskulatur von der Ratte und dem Flusskrebs untersucht. Beidemale mit dem gleichen Erfolge, dass der Muskel auf Grund seiner deutlichen Färbung als Sauerstoffort im Sinne Unnas angesprochen werden muss. In Fig. 3 habe ich einen Querschnitt durch den Scherenmuskel des Flusskrebses abgebildet. Diese Färbung ist in allen Fällen so deutlich, dass ich es mir nicht erklären kann, wie ein unvoreingenommener Beobachter dieselbe hat übersehen können.

Wir kommen nun zu der Frage, ob die Protoplasmafärbung in den Rongalitweißschnitten den Wert Null und die Kernfärbung den maximalen Wert besitzt. Ich hebe ausdrücklich hervor, dass ich hier nur Wert auf den allgemeinen Befund lege, die von Unna selbst gekennzeichneten Abweichungen lasse ich hier ganz beiseite. Schon aus den Schnitten, die in Fig. 1 und 2 bei nur 40 facher Vergrösserung abgebildet sind, lässt sich ersehen, dass die Rongalitschnitte offenbar keine exklusive Kernfärbung zeigt. In Fig. 4 und 5 habe ich zwei Schnitten durch die Haut der Ratte abgebildet, Schnitte 4 ist mit Hämatein-Erythrosin, Schnitte 5 mit Rongalitweiss II gefärbt. Man sieht auf den ersten Blick, dass die Rongalitweissfärbung alles andere eher ist, als eine reine Kernfärbung. Plasmafärbung habe ich auf allen zahlreichen Präparaten erhalten. Besonders erwähne ich Schnitten durch die Lunge. Indem ich alle Eindrücke zusammenfasse, glaube ich mein Urteil dahin zusammenfassen zu können, dass das Protoplasma fast

immer mit Rongalitweiss gefärbt wird und darum im allgemeinen als Sauerstoffort im Sinne Unnas angesprochen werden muss.

Nicht bestreiten will ich, dass sehr häufig die Kerne stärker, oft weit stärker als das Plasma gefärbt sind, es handelt sich jedoch nur um graduelle Unterschiede.

Brauchbare Mikrophotographien von nach Unnascher Methode hergestellten Präparaten anzufertigen, hat recht grosse Schwierigkeiten. Die Methode verlangt Schnitten von unfixiertem, lebendfrischem Gewebe. Diese erhält man nur mit dem Gefriermikrotom. Die Vorteile des Gefrierverfahrens sind aber mit seinen Nachteilen untrennbar verknüpft. Insbesondere ist es wohl ausgeschlossen, Schnitten von wenigen μ Dicke, wie sie für eine gute Mikrophotographie bei starker Vergrösserung Voraussetzung sind, zu erhalten. Auch dürfen die Schnitten nicht aufgeklebt werden, etwa nach dem sonst vortrefflichen Verfahren von Olt; hierdurch liegen die Schnitten natürlich nie plan, was wiederum die Bildschärfe recht unangenehm beeinträchtigt. Trotzdem habe ich die Fig. 4 und 5, die bei 600facher Vergrösserung hergestellt sind, beigegeben, da sie mir wenigstens nach der negativen Seite hin, also insofern, dass es sich nicht um eine reine Kernfärbung handelt, beweisend zu sein scheinen. Um einheitliche Bedingungen zu haben, habe ich alle Bilder bei Licht von der Wellenlänge 500—600 $\mu\mu$ aufgenommen.

Unna verwendet zur Darstellung seiner Sauerstofforte eine Färbung mit einer später regenerierten Leukobase. Dass es sich dabei um Methylenblau oder Blau 1900 und um Rongalit handelt, ist nicht von prinzipieller Bedeutung. Jeder Farbstoff, der irgendwie zu einer Leukobase reduziert wird, muss bei seiner Regeneration die Sauerstofforte im Sinne Unnas aufzeigen. Wohin wir auf diesem Wege kommen, ist leicht einzusehen. Gelingt es uns, einen typischen Plasmafarbstoff in eine labile Leukobase überzuführen, so werden in dem Schnitt, bei eintretender Regeneration des Farbstoffes voraussichtlich die Sauerstofforte — das Protoplasma sein. Wir werden auf die hierdurch ausgedrückte spezifische Wirkung der histologischen Farbstoffe und auf die eminente Wichtigkeit dieses von Unna ausser acht gelassenen Umstandes noch unten weiter eingehen.

Ich habe nun noch ein Reduktionsmittel angewandt, das den Farbstoff bereits bei gewöhnlicher Temperatur und in reiner

wässriger Lösung in die Leukobase überzuführen gestattet; es handelt sich um Natriumhydrosulfit. Versetzt man eine gesättigte oder annähernd gesättigte Lösung von Methylenblau in destilliertem Wasser mit Natriumhydrosulfit, so tritt sehr rasch Entfärbung ein. Ein grosser Teil des Leukomethylenblaus fällt aus, ein Teil bleibt aber gelöst zurück. Durch Filtrieren erhält man eine wasserhelle, fast farblose Flüssigkeit, die weit mehr als das Rongalitgemisch die Bezeichnung „Weiss“ verdient. Färbt man in der Unnaschen Weise, so erhält man Schnitten, die die Kerne in verschiedener Intensität, offenbar abhängig von der Menge des Natriumhydrosulfits in der Lösung, zeigen, stets ist aber das Protoplasma im allgemeinen wohl gefärbt. Bei Schnitten durch die Schnauze der Ratte tritt die Muskulatur sehr stark hervor. Die Ähnlichkeit dieser Färbung mit einer Rongalitweiss I und einer gewöhnlichen Methylenblaufärbung ist sehr gross.

Ich habe dann noch mit Natriumhydrosulfit-Leuko-Nigrosin gefärbt, und wieder das Resultat erhalten, dass das Protoplasma wohlgefärbt erscheint.

Wir wollen nun untersuchen, ob die ganze Auffassung der Färbung der Sauerstofforte von Unna überhaupt mit den Tatsachen in Einklang steht. Nach Unna bleibt eine Schnitte im Rongalitweiss ungefärbt, es wird dann mit Wasser abgespült, um das überschüssige Reduktionsmittel zu entfernen und durch den Sauerstoff der Luft (bezw. des Wassers) tritt unter Vermittelung der Sauerstofforte des Gewebes die Regeneration von Methylenblau und damit die Darstellung der Sauerstofforte ein.

Die Schnitten bleiben also nach Unna im Rongalitweiss ungefärbt. Gerade das Gegenteil habe ich gefunden! Legt man eine Gefrierschnitte in Rongalitweiss, so sieht man klar und deutlich, dass die Schnitte in der typischen Farbe des Farbstoffes gefärbt wird. Diese Färbung ist nicht etwa schwach, sondern auffällig und kräftig, eigentlich gar nicht zu übersehen. Nach einiger Zeit verschwindet sie wieder, und zwar im Rongalitweiss I schneller als im Rongalitweiss II.

Ich erkläre diese Erscheinung folgendermassen: Durch den Sauerstoff, welcher sich in der Schnitte befindet, bezw. welcher durch die in dem Gewebe enthaltenen Fermente aktiviert wird, wird eine ent-

sprechende Quantität der Leukobase in den Farbstoff zurückverwandelt. Bei Leukobasen, die mit einem im Überschuss vorhandenen Reduktionsmittel hergestellt sind, das auch schon bei gewöhnlicher Temperatur rasch und kräftig reduziert wird, wird diese kleine Quantität Farbstoff sofort wieder in die Leukobase übergeführt, eine Färbung ist also für das Auge nicht bemerkbar. Anders bei mit Rongalit hergestellten Leukobasen. Rongalit reduziert bei gewöhnlicher Temperatur nur schwer und langsam. Dieser partiellen Impotenz des Rongalits verdanken wir aber die Darstellung der „primären Sauerstoff-färbung“, wie ich sie bezeichnen will, der Gewebe. Nach wenigen Minuten ist jedoch auch hier die Färbung durch das in grosser Menge vorhandene Rongalit, durch Überführen der Farbe in die Leukobase, vernichtet worden. Aller Sauerstoff ist dann aus der Schnitte entfernt; wenigstens aller Sauerstoff, der unter den in Betracht kommenden Bedingungen überhaupt entfernt werden kann. Diese Färbung bezeichne ich als primäre Sauerstoff-färbung; sie ist von Unna nicht beobachtet worden, und ich unterscheide sie scharf von der von Unna beobachteten, gleich zu besprechenden, sekundären Sauerstoff-färbung.

Wir entfernen nun nach Unna das überschüssige Reduktionsmittel durch Abspülen mit Wasser. Wir können durch Abspülen mit sehr grossen Quantitäten Wasser den letzten Rest von Reduktionsmittel zu entfernen versuchen, es tritt auch nicht die Spur einer Bläuung ein. Erst wenn wir Sauerstoff künstlich zuführen, sei es durch Verwendung sauerstoffhaltigen Wassers, sei es dadurch, dass wir die Schnitte dem Sauerstoff der Luft aussetzen, dann tritt eine Bläuung ein.

Unna glaubt, dass diese Färbung durch Vermittelung der Sauerstofforte des Gewebes, die den molekularen Luftsauerstoff aktivieren sollen, erfolgt. Ich halte diese Annahme für unnötig. Leukobasen werden auch durch den molekularen Sauerstoff der Luft wieder regeneriert. Giesst man etwas Rongalitweiss I in eine Schale, so sieht man, dass nach einiger Zeit sich an der Oberfläche Methylenblau regeneriert, wo ist hier ein aktivierender

Sauerstoffort? Ich halte die ganze Rongalitweissfärbung für eine einfache Färbung durch Methylenblau bezw. Blau 1900. Unna beruft sich darauf, dass seine Färbung von der einer gewöhnlichen Methylenblaufärbung verschieden sei. In der Tat mag sie etwas verschieden sein, es wäre auch wunderbar, wenn das empfindliche Methylenblau in einer Lösung, die alles mögliche enthält, Rongalit, Säure, evtl. Alkali, und sicher noch Zwischenprodukte, genau so färben würde, wie in rein wässriger Lösung. Trotzdem treten etwaige Verschiedenheiten hinter der ausserordentlichen Ähnlichkeit der Färbungen ganz zurück.

Wenn ich somit behaupte, dass die Färbung auf Sauerstofforte von Unna nichts anderes sei als eine ordinäre Färbung, so wird man verlangen müssen, dass Rongalitweiss in der von Unna angegebenen Weise auch Stoffe färbt, die keine Peroxydase enthalten, also keine Sauerstofforte sind. Das ist in der Tat der Fall. Ich habe zu diesem Zwecke einen Stoff gewählt, der einerseits sich überhaupt färben lässt und andererseits eine gewisse gewebeähnliche Struktur besitzt. Es handelt sich um analysenreines Filtrierpapier. Dieses ist mit Salzsäure, Flusssäure, Wasser ausgewaschen und auch entfettet und stellt Cellulose in denkbar reinsten Form dar. Dass wir über die Art, wie Cellulose gefärbt wird, nicht unterrichtet sind, möchte ich hier bemerken (24). Für mich war der Umstand massgebend, dass dieses Filterpapier keine Peroxydasereaktion mit der von Unna jun. und Golodetz verwandten Benzidinreaktion gibt. Sollte sich wirklich für diese reinste Cellulose einmal eine Peroxydase-reaktion finden, so wäre damit zugleich der Arbeit von Unna jun. und Golodetz der Wert genommen. Ich bin aber überzeugt, dass auch andere, noch zu suchende Stoffe, die keine Peroxydase enthalten, sich wie Cellulose verhalten. Für mich genügt es, wie gesagt, vollkommen, dass sich mit der Benzidinreaktion keine Spur Peroxydase nachweisen lässt.

Färben wir nun ein Stück in destilliertem Wasser eingeweichtes Filtrierpapier in Rongalitweiss in der Unnaschen Weise, so dokumentiert sich uns dieses durch die eintretende intensive Färbung als ein Sauerstoffort ersten Ranges. Woraus nach meiner Ansicht die Unhaltbarkeit der Unnaschen Anschauungen und die Übereinstimmung mit den meinigen zur Evidenz hervorgeht.

VI. Oxydasereaktion an Gewebsschnitten nach Schultze. Arbeiten von Golodetz und Unna jun. und Leistikow.

Paul Ehrlich wandte im zweiten Hauptteil seiner klassischen Arbeit (2) das Indophenolblau zur Bestimmung des Sauerstoffbedürfnisses des Organismus an. F. Röhm und W. Spitzer (19) benutzten die Synthese des Indophenolblaus aus α -Naphthol und Paraphenyldiamin zum Nachweis der Oxydasenwirkung von Organbrei. Die Reaktion ist dann in der Folge von einer grossen Zahl von Forschern angewandt worden. Für uns ist besonders eine Arbeit von W. H. Schultze (18) interessant, der an Gefrierschnitten gearbeitet hat. Die Arbeit bietet im besonderen einen wertvollen Beitrag zur Differentialdiagnose der Leukämieen. Nach Schultze ist ein spezifisches Oxydationsferment, die Indophenoloxydase, in den Leukozyten und ihren Abkömmlingen lokalisiert, und zwar gleicherweise beim Menschen, Kaninchen, Meerschweinchen und Frosch. Besonders interessant ist die Frage nach der speziellen Lokalisation des Fermentes in der Zelle. Es zeigt sich, dass es in seinem Vorkommen an die Granula der Zellen gebunden ist. Der Kern ist frei von Ferment. Ein Befund, der sich mit den Ansichten Unnas kaum in Einklang bringen lässt.

Wir haben nun noch kurz zwei Arbeiten zu besprechen, die mit den Arbeiten Unnas im engsten Zusammenhange stehen und sie in vollkommenster Weise zu bestätigen suchen. L. Golodetz und P. Unna jun. (16) suchen an Vogelblut und Eiter mit der Benzidin- und Katalasenreaktion die Ansichten P. G. Unnas zu beweisen. Sie verdauen das Protoplasma des Vogelblutes und erhalten an dem so gewonnenen „reinen Kernmaterial“ eine, wenn auch geschwächte Peroxydasenreaktion, wohingegen die Katalase verschwunden ist. Hieraus glauben sie schliessen zu können, dass die Peroxydase im Kern, die Katalase im Protoplasma lokalisiert sei. Hierzu bemerke ich, dass Blut an sich ein ungeeignetes Versuchsobjekt ist, da ja die Gefahr vorliegt, dass durch die fermentähnliche Wirkung des Hämoglobins (10) ein falsches Resultat vorgetäuscht wird. Ferner können wir mit demselben Recht annehmen, dass auch im Kern Katalase enthalten war, dass sie aber, ebenso wie das Protoplasma, durch die Verdauung zerstört wurde. Die quantitativen Untersuchungen sind äusserst dürftig, sie beschränken sich auf eine Messung der Katalase nach dem

Volumen des aus H_2O_2 entwickelten Sauerstoffes. Aus dem Verhalten von in Alkohol konserviertem Material schliessen Golodetz und Unna jun., dass „bei der Alkoholbehandlung sich eine allmähliche, aber keineswegs starke Herabsetzung des Katalasegehaltes bis zum 3. Tage etwa feststellen lässt. Von da ab bleibt der Katalasegehalt etwa gleich.“ Die betreffenden Zahlen sind:

	nach dem 1. Tag,	2. Tag,	3. Tag,	5. Tag,	6. Tag.
O-Entwicklung	96,5	88	67,5	63	64,5 ccm.

Ich lese aus diesen Zahlen ganz etwas anderes heraus, wie Golodetz und Unna jun., nämlich dass der Katalasegehalt zunächst abnimmt, dann aber wieder zunimmt! Gewiss ein eigenartiges Resultat, das sich auch beim Eiter wiederfindet, hier ist eine Zeitangabe nur durch die römischen Ziffern angedeutet, die Zahlen lauten:

	I.	II.	III.
O in ccm	2,5	1,5	2,3.

Einer derartigen Arbeit messe ich keinerlei Beweiskraft zu.

L. Leistikow (20) behandelt die Sauerstofforte des tierischen Hautgewebes bei Anämie, venöser Hyperämie und Ödem. Leistikow weist nach, dass an Stellen im Gewebe, wo eine Störung in der Sauerstoffzufuhr stattfindet, auch die Rongalitweissfärbung schlecht ausfällt, bezw. veränderte Resultate ergibt. Leistikow glaubt damit die Richtigkeit der Ansichten Unnas bewiesen zu haben. Ich gebe ohne weiteres zu, dass die Färbung tatsächlich variiert oder geschwächt wird, kann aber nicht annehmen, dass diese Erscheinung nun ohne weiteres einen Sauerstoffmangel dokumentiert. Man kann da an alle möglichen Veränderungen im Gewebe denken, die die Methylenblaufärbung verändern, beispielsweise eine Ansäuerung.

Auf einen Punkt möchte ich noch hinweisen. Auf der der Arbeit Leistikows beigegebenen Tafel findet sich ein Schnitt durch die normale Schnauze der Ratte abgebildet. In der Tiefe des Gewebes sind grosse tiefdunkle Stellen sichtbar, die nach der Figurenerklärung Muskulatur darstellen. Hierdurch werden nach meiner Ansicht die Angaben P. G. Unnas widerlegt: „Muskeln im allgemeinen ungefärbt, nur selten sehr schwach gefärbt“, und meine Angaben (siehe oben) bestätigt.

VII. Einschlussfärbung mit Leukobasen und Reagentien.

Wir hatten gesehen, dass sich im Rongalitweiss die Schnitten zunächst färbten, um alsbald wieder entfärbt zu werden. Ich hatte diese, von Unna nicht beobachtete, Erscheinung als „primäre Sauerstofffärbung“ bezeichnet. Um die Färbung an der mikroskopischen Schnitte studieren zu können, gehe ich folgendermassen vor; ein Stück Gewebe wird dem narkotisierten Tier entnommen und ohne jeden Zusatz vereist und geschnitten. Das Gefrierenlassen in irgend einer Salzlösung, möge sie heissen, wie sie will, halte ich aus physikalisch-chemischen Gründen nicht nur für zwecklos, sondern sogar für schädlich. Die Schnitte wird mit dem Objektträger aufgefangen und auf dem Mikroskoptisch mit schwacher Vergrösserung eingestellt. Auf die Unterseite eines Deckgläschens wird ein Tropfen der Leukobase oder des betreffenden Fermentreagenz gebracht und die Schnitte damit bedeckt. Man kann nun vom ersten Augenblick der Einwirkung an die sich abspielenden Vorgänge beobachten. Läuft die Reaktion zu schnell ab, oder wünscht man ein bestimmtes Stadium wenigstens eine Zeitlang zu konservieren, so kann man dieses durch Gefrierenlassen der Schnitte erreichen. Die Anwendung einer sehr geringen Quantität Leukobase hat den Vorteil, dass auch nur eine geringe Menge Reduktionsmittel vorhanden ist. Hierdurch bleibt die primäre Sauerstofffärbung sehr lange bestehen, bzw. wird überhaupt nicht mehr durch Umwandlung in die Leukobase zerstört.

Ich habe eine grosse Anzahl von Geweben mit den verschiedensten Reagentien behandelt und recht interessante Resultate erhalten. Ich halte aber meine Untersuchungen durchaus nicht für abgeschlossen, hauptsächlich auch im Hinblick auf die im nächsten Abschnitt zu entwickelnden Gesichtspunkte. Ich möchte mir daher die Bekanntgabe für eine spätere Arbeit vorbehalten und erwähne hier nur, dass sich in der Lunge ein deutlicher Gegensatz zwischen oxydierendem und nicht oxydierendem Gewebe ergab, und dass sich die Hautmuskulatur mit verschiedenen Reaktionen als kräftig oxydierend erwies, eine Erscheinung, die mit den Arbeiten Unnas im Widerspruch, mit den Arbeiten Ehrlichs aber im Einklang steht.

VIII. Über spezifische Farbstoffwirkung und die Notwendigkeit ihrer Berücksichtigung bei biochemischen Arbeiten mittels Farbstoffen.

Die Histologie braucht Farbstoffe, die bereits auf kleinstem Raume eine grosse Mannigfaltigkeit der Färbungen ermöglichen. Über die Art und Weise, wie die histologischen Färbungen entstehen, ist noch keine einheitliche Auffassung erzielt (24). Wenn wir auch die Konstitution der Farbstoffe kennen, so ist uns doch diejenige der anderen in Betracht kommenden Komponente, des Protoplasmas, noch völlig verborgen. Eine sichere Erklärung der Färbung wird sich daher auch in absehbarer Zeit kaum geben lassen. Für die allgemeine Auffassung einer Färbung sind die Gedanken Ehrlichs massgebend geworden. Ich setze sie als bekannt voraus. Ehrlich betont hauptsächlich die chemische Seite des Vorganges. Dass auch eine Betrachtung vom physikalisch-chemischen und kolloidchemischen Standpunkte aus wesentliche neue Gesichtspunkte bringen kann, zeigen die Arbeiten von Bechhold (22), Evans, Schulemann und Wilborn (23). Die Gesamtheit der Wirkung eines Farbstoffes bezeichne ich als seine „spezifische Wirkung“, wahrscheinlich sind bei dieser spezifischen Wirkung noch viele unbekannte oder so gut wie unbekannte Komponenten wirksam.

Wendet man nun die Leukobase eines Farbstoffes an, um durch die auftretende Farbstoffregeneration Auskunft über Sauerstofforte im Gewebe zu erhalten, so ist ja ohne weiteres klar, dass der zur Regeneration nötige Sauerstoff wirklich dem Gewebe entstammt. Aus welchen Orten des Gewebes er aber stammt, lässt sich nach meiner Ansicht gar nicht ohne weiteres sagen; hier interkurriert die spezifische Farbstoffwirkung. Nehmen wir beispielsweise einen Farbstoff an, der eine ausgesprochene Affinität zum Hautmuskel hat, seine Leukobase wird durch die betreffenden Schnitte in den Farbstoff zurückgeführt. Der Muskel zeigt sich stark gefärbt. Können wir hieraus nun ohne weiteres schliessen, dass der Muskel den Sauerstoff hergegeben hat, das umliegende Bindegewebe aber nicht? Sicher nein. Es ist sehr wohl denkbar, dass der Farbstoff im Bindegewebe regeneriert wird, aber sofort in den Muskel übertritt und erst diesen färbt. Auch die mikroskopische Beobachtung des Vorganges wird hier keine Auskunft geben können. Bei sukzessiver Entstehung des Farbstoffes im

Bindegewebe wird es ganz unmöglich sein, bei der beträchtlichen Vergrösserung, eine Färbung zu sehen, die nur schwach ist. Erst wenn sich die Färbung an einer Stelle akkumuliert, wird sie sichtbar werden. Ganz ähnlich können die Verhältnisse bei dem System Zellkern—Protoplasma liegen.

Somit kommen wir zu dem Resultat, dass die ganze Methodik, gegen die allein sich meine Kritik richtet, der Darstellung von Oxydationsorten und Reduktionsorten mit den grössten Schwierigkeiten und Unklarheiten behaftet ist. Immerhin glaube ich, dass auch dieses negative Resultat und die Kritik der Unna'schen Arbeiten für die Entwicklung der Frage einen gewissen Wert hat. Sind die Schwierigkeiten erst einmal erkannt, so werden die künftigen Resultate um so wertvoller sein.

Zum Schluss darf ich wohl darauf hinweisen, dass durch Einrichtung eines Raumes in zu erbauenden grossen Instituten, der mit einem beliebigen Gasgemisch gefüllt werden kann, wesentlich zur rascheren Klärung des Problems beigetragen werden würde.

IX. Zusammenfassung.

1. Die einzige von Unna selbst für einwandfrei gehaltene Methode zur Darstellung der Reduktionsorte im Gewebe liefert keine Bilder, die das Protoplasma als alleinigen Reduktionsort im Gegensatz zum Kern darstellen.
 2. Unna selbst stellt die Kerne auf der in Betracht kommenden Abbildung seiner Arbeit als Reduktionsorte dar.
 3. Vier Phasen der Reduktionswirkung. Wertlosigkeit der Permanganatfärbung zum Nachweis normaler Reduktionsvorgänge.
 4. Die Rongalitweissfärbung liefert keine Bilder, die die Kerne als alleinigen Sauerstoffort im Gegensatz zum Protoplasma im allgemeinen darstellen.
 5. Erklärung von Unna's Sauerstofffärbung als ordinäre Methylenblau- (bezw. Blau 1900) Färbung. Primäre und sekundäre Sauerstofffärbung.
 6. Oxydasen- und katalasenfreie Stoffe als Sauerstofforte im Sinne Unna's.
 7. Der Muskel und im besonderen der Hautmuskel als Sauerstoffort, entgegen der Annahme Unna's. Einschlussfärbung mit Leukobasen und Reagentien.
-

Literaturverzeichnis.

1. Pflüger, E.: Über die physiologische Verbrennung in den lebenden Organismen. Pflügers Arch., Bd. X, 1875.
2. Ehrlich, P.: Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Eine farben-analytische Studie. Berlin 1885, Hirschwald.
3. Verworn, M.: Die Biogenhypothese. Eine kritisch-experimentelle Studie über die Vorgänge in der lebendigen Substanz. Jena 1903.
4. Pfeffer, W.: Pflanzenphysiologie. II. Auflage, 1897—1904.
- 5i Jacoby, M.: Der Stoffwechsel und der Energiwechsel der Zelle und der Einzelligen. Oppenheimers Handbuch der Biochemie, 2, I, 142, 1910.
6. Hofmeister, F.: Die chemische Organisation der Zelle. Braunschweig.
7. Pawlow, J. P. und Parastschuk, S. W.: Über die ein und demselben Eiweissferment zukommende proteolytische und milchkoagulierende Wirkung verschiedener Verdauungssäfte. Z. phys. Chemie, 42, 415, 1904.
8. Traube, M.: Gesammelte Abhandlungen. Berlin 1899.
9. Bach, A. und Chodat, R.: Über den gegenwärtigen Stand der Lehre von den pflanzlichen Oxydationsfermenten. Biochem. Zentralbl., 1, 416, 1903.
10. von Cзыlharz, E. und von Fürth, O.: Über tierische Peroxydasen. Beitr. z. chem. Phys., 10, 358, 1907.
11. Batelli, F. und Stern, L.: Über die Peroxydasen der Tiergewebe. Biochem. Zentralbl., 13, 44, 1908.
12. Unna, P. G. und Golodetz, L.: Zur Chemie der Haut III. Das Reduktionsvermögen der histologischen Elemente der Haut. Monatsh. f. prakt. Dermat., 48, 149, 1909.
13. Dieselben: Zur Chemie der Haut IV. Über die Eisenreaktion der Haut-elemente und über chemische Differenzen unter den Hornzellen. l. c. 49, 95, 1909.
14. Dieselben: Zur Chemie der Haut VI. Hautreagentien. l. c. 50, 451, 1910.
15. Unna, P. G.: Die Reduktionsorte und Sauerstofforte des tierischen Gewebes. Dieses Archiv, Festschrift für Waldeyer, 78, 1, 1911.
16. Golodetz, L. und Unna, P. jun.: Über Peroxydase und Katalase innerhalb der Zelle. Berl. Klin. Wochenschr., 49, 1134, 1912.
17. Mosse: Kaliumpermanganat. Encyklopädie der mikr. Technik, 1, 622, 1903.
18. Schultze, W. H.: Die Oxydasereaktion an Gewebsschnitten und ihre Bedeutung für die Pathologie. Zugleich ein Beitrag zur Differential-diagnose der Leukämieen. Zieglers Beiträge z. path. Anat. u. Path., 45, 127, 1909.
19. Rühmann, F. und Spitzer, W.: Über Oxydationswirkungen tierischer Gewebe. Ber. d. deutsch. chem. Ges., 28, 567, 1895.
20. Leistikow, L.: Sauerstofforte des tierischen Hautgewebes bei Anämie, venöser Hyperämie und Ödem. Mitt. f. prakt. Dermat., 53, 481, 1911.

21. Unna, P. G. und Golodetz, L.: Zur Chemie der Haut VII. Die Oxydation des Chrysarobins auf der menschlichen Haut. Mitt. f. prakt. Dermat., 51, 1, 1910.
 22. Bechhold, J. H.: Die Kolloide in Biologie und Medizin. Dresden 1912.
 23. Evans, H. M., Schulemann, W. und Wilborn, F.: Die vitale Färbung mit sauren Farbstoffen. Schles. Ges. f. vaterl. Kultur, Breslau 1913.
 24. Michaelis, L.: Die Theorie des Färbeprozesses. Oppenheims Handbuch der Biochemie, 2, I, 193, 1910.
 25. Unna, P. G. und Golodetz, L.: Die Bedeutung des Sauerstoffes in der Färberei. Leipzig und Hamburg 1912. Dermatologische Studien, Bd. 22.
 26. Bach, A.: Oxydationsvorgänge in der lebenden Substanz. Oppenheims Handbuch der Biochemie, Ergänzungsbd., 133, 1913.
 27. Unna, P. G. und Golodetz, L.: Biochemie der Haut. Oppenheims Handbuch der Biochemie, Ergänzungsbd., 327, 1913.
-

1

2

3

4

5