Die Sauerstofforte und Reduktionsorte. Eine histochemische Studie.

Von
P. G. Unna.

Hierzu Tafel VII—XII.

A. Allgemeiner Teil.

Es war eine einfache Tatsache, zunächst nur durch ihre Konstanz auffallend und als seltsame Erscheinung bei der Herstellung von Manganbildern der Haut notiert, welche den Ausgangspunkt der jetzigen Lehre von den Sauerstofforten und Reduktionsorten der Gewebe bildet. Bringt man Alkohol-Zelloidin-Schnitte von der Fußsohlenhaut (siehe Fig. 17) bis 5 Minuten in eine 1proz. Lösung von Kalipermanganat, bis sie braun werden, dann in Wasser, Alkohol, Öl und Balsam, so beobachtet man bedeutende Verschiedenheiten in der Tiefe der Manganfärbung der einzelnen Gewebelemente, d. h. ihrer Verbindung mit dem sich abscheidenden MnO_2 . Während das Kollagen sich nur leicht gelblich färbt, ist die Stachelschicht hellbraun, die Hornschicht dunkelbraun gefärbt. In ähnlicher Weise wie die Stachelschicht des Deckepithels treten die übrigen Epithelien der Knäuelgänge und Knäueldrüsen und auf entsprechenden Schnitten der Kopfhaut auch die der Stachelschicht der Haarbälge und Talgdrüsen, sowie die glatten und quergestreiften Muskeln durch intensive Reduktion des Kalipermanganats und Aufnahme des braunen Mangansuperoxyds stark gebräunt hervor.

Wir sind durch unsere gewöhnlichen Färbungen, z. B. mit Hämatein + Alaun, an derartige tinktorielle Unterschiede des epithelialen Parenchyms und des Kollagens so gewöhnt, dass diese Differenz in den Manganbildern nichts Auffallendes haben konnte. Wohl aber musste es auffallen, dass an ihnen die Kerne und vor allem die bekannten, grossen, runden Kerne der Stachelschicht die Eigenschaft des Kollagens teilen, dass sie das Kalipermanganat nur in äusserst schwachem Grade reduzieren und sich als helle, scharf umrandete Kreise aus der gebräunten Stachelschicht ab-

heben. Denn bei allen bisherigen Färbungen mit basischen Farben (Methylenblau) und sauren Beizenfarben (Hämatein + Alaun) sind die Kerne ja gerade noch stärker gefärbt als das Protoplasma der Zellen. Da nun die Bräunung von Hornschicht, Protoplasma und Muskeln an den Manganbildern gar nicht anders erklärt werden kann als durch eine Reduktion des Kalpermanganats und die Stärke dieses Reduktionsprozesses der Tiefe der Färbung mit MnO_2 parallel geht, so war der Schluss unabweislich, dass ebenso wie das Kollagen auch die Kerne das Mangansalz nur äusserst schwach reduzieren können. Es hatte sogar anfangs den Anschein, als ob die Substanz der Kerne gar nicht am Reduktionsprozesse teilnähme, denn ihre äusserst schwache gelbliche Färbung erklärte sich zur Genüge schon durch den Umstand, dass in den betreffenden Schnitten von $10\ \mu$ die $6-7\ \mu$ dicken Kerne stets über- oder unterlagert waren von einer feinen Schicht stark gebräunten Protoplasmas. Als sich aber später bei der chromolytischen Analyse der Kerne¹⁾ ergab, dass die Kerngrundsubstanz zu den basischen, reduzierenden Eiweisssubstanzen gehört, erklärte sich das Minimum von Manganreduktion in ihnen, das sich in der leicht gelblichen Färbung ausspricht, auf noch befriedigendere Weise. Die basischen Bestandteile des Kerns, die Grundsubstanz (Plastin) und das achromatische Kerngerüst sind eben an Masse unbedeutend gegen die der sauren Einlagerungen in Kern und Kernkörperchen (Nuklein und Globulin) und diese sind im Gegensatz zu jenen befähigt, Sauerstoff zu speichern. Dadurch werden die Kerne zu hervorragenden Sauerstofforten in allen Geweben. Ihre scharfe Begrenzung innerhalb des Manganbildes der Oberhaut bedeutet also noch mehr als die blosse Abwesenheit stärkerer Reduktion; sie bedeutet das Gegenteil: das Vorhandensein oxydierender Substanzen. Jedoch war es das negative Kernbild auf dem Reduktionsbilde bei der Manganfärbung, welches erst indirekt zur Entdeckung der Sauerstofforte führte. Diese (Fig. 22, 24, 25) müssen aber im Gegensatz zu den Reduktionsorten des Gewebes unfixiert, an Gefrierschnitten bearbeitet werden, denn an Alkohol-Zelloidin-Material lassen sich Sauerstofforte nicht mehr nachweisen.

¹⁾ Siehe Unna, Biochemie der Haut, S. 5 und ff. Gust. Fischer, Jena, 1913.

Dieser erste Satz ist von fundamentaler Wichtigkeit für das richtige Verständnis der Sauerstofforte. Es ist durchaus nicht befremdlich, dass diese neue histochemische Lehre auf Widerstand stiess und dass ihre Gegner in der Methodik der Darstellung der Sauerstofforte den schwachen Punkt gefunden zu haben glaubten, der die ganze Lehre hinfällig und überflüssig machte. Aber meistens wurde dabei übersehen, dass die Lehre von dem Gegensatz der Sauerstofforte und Reduktionsorte sich von vornherein nicht auf einer bloss tinktoriellen Grundlage aufbaute, sondern auf einer festen biologischen. Denn das Material für ihre beste Darstellung war ein grundverschiedenes, für die Sauerstofforte ein frisches, lebendes oder überlebendes, für die Reduktionsorte ein totes, künstlich durch Alkoholhärtung seines Sauerstoffs beraubtes. Daher war es möglich, dass die Methode der Darstellung der Sauerstofforte mit den Fortschritten ihrer Erkenntnis sich stetig veränderte und verbesserte, während ihr Prinzip, da es sich auf eine biologische Grundtatsache stützt, dasselbe geblieben ist und durch alle kritischen Bemühungen sich nur geklärt und befestigt hat.

Dieses Prinzip besteht in der Wirkung der Sauerstofforte auf eine leicht reoxydierbare basische Leukofarbe, welcher eine stark reduzierende Substanz als Schutzmittel beigegeben ist. Dieses Schutzmittel (Rongalit, Lävulose, Natronhydrosulfit) genügt, um die Leukofarbe als solche in das im allgemeinen saure Gewebe einzuführen, ohne dass bereits eine Reoxydation zur Farbe eintritt. Alle sauren Gewebsbestandteile — so wollen wir zunächst, der heutigen Färbetheorie folgend, annehmen — speichern die Leukofarbe als solche und bleiben solange ungefärbt, als das Schutzmittel noch in genügender Menge zur Reduktion des Farbstoffes vorhanden ist. Wird nun der Überschuss des Komplexes: Leukofarbe + Schutzmittel aus den betreffenden Gefrierschnitten ausgespült, so kann die aufgenommene Leukofarbe sich durch den vorhandenen Sauerstoff im Gewebe oder den der umgebenden Luft oder des umgebenden Wassers wieder reoxydieren.

Beständen nun im Gewebe keine Orte, an denen normalerweise Sauerstoff lose gespeichert oder wo solche Stoffe vorhanden wären, die automatisch den von aussen hinzutretenden molekularen Sauerstoff aktivieren würden, so wäre auch kein Grund einzu-

sehen, weshalb das indirekt aus der Reoxydation der gespeicherten Leukofarbe hervorgehende Farbenbild sich von dem direkt durch die entsprechende Farbe hervorgerufenen unterscheiden sollte. Beispielsweise sollte man nach der heutigen Färbetheorie erwarten, dass das durch Methylenblau + Rongalit (= Rongalitweiss) indirekt entstehende Farbenbild genau dasselbe wäre, wie das durch Methylenblau direkt erzeugte, dass nämlich beide der Ausdruck der Speicherung einer und derselben basischen Farbe (Methylenblau) an den Säureorten des Gewebes wären.

Die Erfahrung lehrt aber das Gegenteil. Es gibt geradezu kein frisches, überlebendes Gewebe, bei dem die direkte und die indirekte Färbung mit Methylenblau genau dasselbe Bild erzeugt. Stets finden sich Unterschiede zwischen beiden, welche lehren, dass wir im allgemeinen Sauerstofforte von Säureorten unterscheiden müssen, und zwar sind erstere in viel beschränkterer Anzahl vorhanden, halten sich aber an die Säureorte. Oder mit andern Worten: alle Sauerstofforte sind Säureorte, aber lange nicht alle Säureorte sind Sauerstofforte. Man kann den Unterschied zwischen direkter und indirekter Methylenblaufärbung auch so aussprechen: Die Speicherung des basischen Leukofarbstoffs durch frisches überlebendes Gewebe ist eine viel beschränktere als die des entsprechenden oxydierten Farbstoffs.

Der Sauerstoff ist ein rasch diffundierendes Gas, welches von allem Gewebseiweiss physikalisch leicht aufgenommen, aber in verschiedenster Weise und mit sehr verschiedener Festigkeit chemisch gebunden wird. Wo das Gewebseiweiss stark reduziert, dient der Sauerstoff zu seiner Verbrennung; er wird in das Molekül aufgenommen und verliert seine Wirksamkeit nach aussen. Hier haben wir reine Reduktionsorte vor uns (Keratin, Myosin, Neurin). Wo das Gewebseiweiss schwächer reduziert, wird der hinzudiffundierende molekulare Sauerstoff in Peroxydform ($-O-O-$), also nur lose gebunden (Spongioplasma, oxyphile Substanzen). Wo nun der Ort einer solchen Bindung zusammentrifft mit der Durchsetzung des reduzierenden (basischen) Eiweisses mit sauren Eiweissen (z. B. Cytose, Globulin) — und dieses ist gerade an den sogenannten sekundären Sauerstofforten der Fall —, da kann sich der so gebundene Peroxydsauerstoff unzersetzt speichern und wir erhalten umschriebene, labile Sauer-

stoffreservoir im reduzierenden Gewebe (Granoplasma, Kernkörperchen, saure Kerne, Knorpelgrundsubstanz). Wo endlich ausserdem noch Sauerstoffkatalysatoren in dem sauren Eiweiss eingeschlossen und permanent tätig sind (z. B. Eisen im Nuklein), da speichert sich der durch Katalyse aus hinzudiffundierendem Sauerstoff ständig und automatisch aktivierte Peroxydsauerstoff und es entstehen stabile Sauerstofforte (primäre Sauerstofforte).

Die Speicherung des Methylenblaus (und anderer basischer Farbstoffe) geht nun an allen drei Kategorien von Geweben vor sich, soweit sie sauer sind, und zwar mit aufsteigender Intensität, am schwächsten in der Hornschicht, am stärksten in den Kernen. Die Speicherung des Leukomethylenblaus in den Geweben, soweit sie sauer sind, geht aber nicht an allen drei Arten von Geweben, nämlich gar nicht an den Reduktionsorten vor sich, sondern nur an den zwei Kategorien der labilen und stabilen Sauerstofforte. Es ist das nur eine notwendige Konsequenz des Gesetzes der „oxypolaren Affinität“, das ganz allgemein zwischen Eiweissen, Farben und Beizen Geltung hat¹⁾: Der sauerstoffarme Leukofarbstoff hat keine Affinität zum sauerstoffarmen (reduzierenden) Eiweiss, dagegen starke Affinität zum sauerstoffreichen (oxydierenden) Eiweiss. Das ist der Grund, weshalb der Leukofarbstoff vom tierischen Gewebe anders und zwar in beschränkterem Umfange gespeichert wird als der entsprechende (oxydierte) Farbstoff.

Die Sauerstofforte begnügen sich also, im Gegensatz zu den Reduktionsorten, mit einem Leukofarbstoff und es gilt, diesen unoxydiert an Ort und Stelle zu schaffen. Bisher gelingt das nur durch Zusatz eines stark reduzierenden Schutzes, der in seiner Menge so abgestimmt sein muss, dass er die basische Farbe (Methylenblau) gerade in Leukofarm erhält. Es darf nicht zu wenig von ihm vorhanden sein, sonst gewinnt der Luftsauerstoff über die Mischung Einfluss und es entsteht schon vor der indirekten Färbung Methylenblau, womit die Einführung des Leukofarbstoffs vereitelt ist. Es darf aber auch nicht zu viel von dem reduzierenden Schutzmittel da

¹⁾ Unna, Biochemie der Haut, S. 123. Gust. Fischer, Jena, 1913.

sein, sonst greift es die Sauerstoffreservoirs der Gewebe bei längerem Kontakt selbständig an. Ein richtiges Verhältnis von reduzierendem Schutzstoff und Farbstoff ist also die weitere notwendige Vorbedingung.

Als reduzierender Schutzstoff hat sich bisher nur das in der Technik vielgebrauchte Rongalit¹⁾ bewährt, eine Verbindung von Formaldehyd mit dem Natriumsalz der Sulfoxylsäure:

welches bei der Oxydation ein O aufnimmt und in das Formaldehyd-Natrium-Bisulfit übergeht:

Dieses Salz reagiert alkalisch; ausserdem ist das im Handel befindliche Rongalit mit geringen Mengen von neutralem Natronsulfit ($\text{SO}_2 \text{Na}_2$) verunreinigt, welches ebenfalls alkalisch reagiert. Aus diesem Grunde schon muss zum Zwecke der Reduktion des Methylenblaus die Mischung von Rongalit und Methylenblau angesäuert werden. Denn die Reduktion verläuft bei alkalischer Reaktion langsam und erfordert eine stärkere Erhitzung, die wiederum leicht eine Zersetzung des Rongalits und die Bildung von Nebenprodukten zur Folge hat.

Der Säurezusatz hat aber noch einen anderen Grund. Reduziert man nämlich Methylenblau mit Rongalit allein, so bewirkt nach Entfärbung der Lösung die Alkaleszenz des Rongalits eine Fällung der Leukomethylenblaubase. Erfahrungsgemäss genügen zur Verhütung dieser Fällung zwei Tropfen von 25proz. Salzsäure auf 0,2 g Methylenblau. Es ist natürlich praktischer, diesen Säurezusatz zum Methylenblau von vornherein zu machen, weil dann die Reduktion schon bei schwacher Erwärmung eintritt und man sofort eine klare Lösung erhält. Da dieser Säurezusatz so bemessen ist, dass er gerade zur Auflösung der sonst gefällten Farbbase genügt, so ist die entstehende Mischung (Rongalitweiss)²⁾ praktisch als eine neutrale zu bezeichnen.

Meine ältere Vorschrift für RW neutral³⁾ wurde mit einem Überschuss von HCl (vier Tropfen) hergestellt und das entstehende

¹⁾ Von der Badischen Anilin- und Sodafabrik.

²⁾ Rongalitweiss wird im folgenden mit RW bezeichnet.

³⁾ Siehe Unna: Die Reduktionsorte und Sauerstofforte des tierischen Gewebes. Arch. f. mikrosk. Anat. 1911, Bd. 78, Waldeyer-Festschrift.

RW wurde dann mit NaOH soweit neutralisiert, bis es zu einem Ausfall der Base kam, die durch Filtration beseitigt wurde. Die jetzige RW-Lösung ist mit dem damaligen RW neutral so gut wie identisch, hat aber den Vorzug grösserer Einfachheit, da Neutralisieren und Filtrieren wegfällt und in einer Operation eine klare Lösung erhalten wird.

Was das genaue Verhältnis des Rongalits zum Methylenblau betrifft (0,3 auf 0,2 in 10 ccm Wasser), so ist zu beachten, dass nach der Reduktion des Methylenblaus noch ein geringer Überschuss von unverbrauchtem Rongalit in der Mischung vorhanden sein muss. Denn beim praktischen Gebrauche ist es nicht möglich, die zu behandelnden Schnitte in die Mischung zu bringen, ohne gleichzeitig eine unkontrollierbare Menge Luftsauerstoff mit einzuführen. Auch hält sich die genau reduzierte Mischung an der Luft ohne einen solchen Überschuss von Rongalit nicht lange. Da nun für die Umwandlung von 0,2 g Methylenblau bereits etwas über 0,2 g Rongalit erforderlich sind, so gebe ich auf 0,2 Methylenblau, wie oben angegeben, 0,3 Rongalit zu. Es resultiert dann eine Lösung, welche sich 1—2 Tage an der Luft unoxydiert erhält und welche den adhärierenden Sauerstoff der Schnitte unschädlich macht.

Ebenso wie das richtige Verhältnis von Rongalit zum Methylenblau für die Herstellung der Farblösung eine notwendige Vorbedingung bildet, ebenso wichtig ist für den Färbeakt selbst die Fernhaltung von accidentellem Sauerstoff, da ein lokaler Überschuss von Sauerstoff der Luft in der Umgebung des Schnittes jenes eben besprochene richtige Verhältnis von Rongalit zum Methylenblau wieder aufhebt. Man hat zu diesem Zweck nur nötig, den in die RW-Lösung gebrachten Schnitt zu beobachten. Bleibt er in derselben ungefärbt, so kann er ruhig liegen bleiben. Färbt er sich aber in derselben an einer oder mehreren Stellen blau, was stets von mitgerissener Luft herrührt und mit einer kleinen blauen Farbwolke an derselben Stelle in der Lösung zusammentrifft,¹⁾ so muss man den Schnitt sofort mit der Glasnadel etwas hin und her bewegen, wobei die Färbung rasch verschwindet, indem das gebildete Methylenblau vom Rongalitüberschuss der Lösung wieder reduziert wird. Würde man das unter-

¹⁾ Vgl. hierzu den Anhang S. 147.

lassen, so hätte man nachher im Schnitte Teile, die statt mit RW mit Methylenblau gefärbt sind.

Beim Auswaschen der Schnitte ist dieselbe Vorsicht in noch höherem Grade nötig, da bei dieser Prozedur der mit Leukomethylenblau beladene Schnitt vorübergehend von einer unkontrollierbaren Mischung von Wasser, RW und Leukomethylenblau umgeben ist. Würde in dieser Umgebung auch nur einen Augenblick relativ mehr Leukomethylenblau als Rongalit sein, so würde sich sofort Methylenblau bilden und dieses den Schnitt noch beim Auswaschen anfärben. Daher ist die erste und wichtigste Vorschrift beim Auswaschen und eine weitere notwendige Vorbedingung für jede RW-Färbung, dass man die Schnitte, die zum Auswaschen einzeln aus der RW-Lösung in eine grössere Schale mit Wasser gebracht werden, in dieser mittelst einer Glasnadel energisch bewegt, damit sich aus einem zufälligen, lokalen Überschuss an Leukomethylenblau mit dem Sauerstoff des Waschwassers kein Methylenblau bilden kann. Man hält also die Schnitte in der Schale in Bewegung und sowie trotzdem das Waschwasser eine bläuliche Färbung annimmt, bringt man die Schnitte in eine zweite grössere Schale mit Wasser.

Ebenso wichtig wie die rasche Bewegung der auszuwaschenden Schnitte ist die Fernhaltung von Sauerstoff aus dem Waschwasser. Hierzu ist es entweder nötig, dasselbe jedesmal vor dem Gebrauche in einem Kolben gehörig auszukochen und wieder abkühlen zu lassen oder — was ich vorziehe — in einer grossen Liter-Kochflasche für mehrere Tage abgekochtes Wasser vorrätig zu halten, welches mit Paraffinöl überschichtet wird und aus dem man durch Heberwirkung das sauerstofffreie Wasser für das jedesmalige Auswaschen ablässt.

Nachdem die Schnitte gut und rasch ausgespült sind, kann man sie in Wasser sich langsam bläuen lassen. Eine richtige RW-Färbung entsteht immer langsam. Der zunächst grünliche, dann grünblaue Schnitt nimmt im Laufe mehrerer Minuten bis zu einer Viertelstunde eine rein blaue und bei grösserem Reichtum an Sauerstofforten (z. B. Rattenlippe) eine dunkelblaue Färbung an. Tritt die dunkelblaue Färbung dagegen plötzlich am ganzen Schnitt oder an einzelnen Stellen desselben auf, so handelt es sich nicht um eine RW-Färbung, sondern um

eine Methylenblaufärbung, deren Grund in einer fehlerhaften Technik, meistens in ungenügender Bewegung des Schnittes, liegt. Statt im Schälchen kann man ebenso gut den ausgewaschenen und auf dem Objektträger feucht ausgebreiteten Schnitt sich auf diesem bläuen lassen.

Für die Anfertigung von Dauerpräparaten ist eine Hauptbedingung das Vermeiden des Alkohols. So kurz man auch die Entwässerung durch Alkohol gestalten mag, stets schädigt sie die Färbung der Sauerstofforte wenigstens etwas. Ich vermeide den Alkohol ganz, indem ich ihn durch die Antrocknungsmethode¹⁾ ersetze. Entweder überlässt man den auf dem Objektträger ausgebreiteten Schnitt dem spontanen langsamen Antrocknen oder man beschleunigt die Antrocknung durch Anblasen mit einem Gummigebläse oder durch sehr gelindes Erwärmen in einem warmen Luftstrom. Sobald der Schnitt trocken und durchscheinend geworden ist, wird er mit einem Deckgläschen und einem Tropfen Balsam eingedeckt.

Angetrockneten Schnitten schadet die reduzierende Eigenschaft des Balsams nicht mehr, wenigstens nicht merklich. Wohl aber leiden die Sauerstofforte dünn aufgestrichener Sekrete unter der Balsamdecke, was man sehr deutlich sieht, wenn das Deckglas mit dem Balsam nur einen Teil des Ausstrichs bedeckt. Die Sauerstofforte von Ausstrichen sind also ein sehr feines Reagens auf die Reduktionskraft eines Balsams. Ich ziehe es daher für Ausstriche vor, dieselben nur in Zedernöl anzusehen und nach jeder Besichtigung mit Xylol zu reinigen und trocken aufzubewahren.

Ein neutrales RW, gute Gefrierschnitte, stete Beobachtung derselben, sehr rasches und energisches Auswaschen mit sauerstofffreiem Wasser, Vermeiden des Alkohols zur Entwässerung, das sind die Grundbedingungen für die Herstellung guter RW-Präparate.

In der histologischen Praxis wird man sich gewiss noch manchen Fragestellungen gegenübersehen, die in dem bisher allein

¹⁾ Die Antrocknungsmethode für Schnitte wurde von mir 1885 zunächst für Schnitte lepröser Haut eingeführt, unter Anwendung stärkerer Erhitzung (Unna, Zur Färbung der Leprabazillen. Leprastudien 1885, Leop. Voss, S. 59—61). Bei Einschluss von Sauerstofforten muss jede stärkere Erhitzung vermieden werden.

betrachteten, regelrechten Gänge der RW-Färbung nicht berücksichtigt worden sind. Ich will wenigstens zwei derselben hier noch in Kürze beantworten.

Angenommen, man hat frisches Material, welches nicht sofort auf Sauerstofforte untersucht werden kann, so entsteht die Frage, wie man das Gewebe aufzubewahren hat, um die Sauerstofforte zu erhalten. Einige Tage lang genügt ein guter Eisschrank hierzu, aber für längere Zeit, sagen wir 6—7 Tage, ist ausserdem die Anwendung von Konservierungsflüssigkeiten notwendig. Dass hierfür Alkohol und Formalin absolut unbrauchbar sind, versteht sich von selbst, aber auch sauerstoffreiche Säuren, die sonst als gute Konservierungsmittel gelten, wie Salpetersäure, haben sich nicht bewährt. (Für die Haut kommt noch in Betracht, dass sich in HNO_3 das Epithel ablöst).

Was wir für die Erhaltung der Sauerstofforte brauchen, sind zwei Dinge, die zusammenkommen müssen:

1. Überschüssiger Sauerstoff, der die reduzierenden Einflüsse der Gewebe und ihrer Zerfallsprodukte beim Absterben und deren schädigenden Einfluss auf die Sauerstofforte des Gewebes neutralisiert. Dieser Sauerstoff darf nicht in loser Bindung in dem Konservierungsmittel enthalten sein (also nicht als H_2O_2 , Ozon), sondern in fester Bindung, die erst durch die betreffenden reduzierenden Kräfte gelöst wird, also z. B. in Form von Chloriden, chlorsauren Salzen etc.

2. Substanzen, welche die Träger des Sauerstoffs im Gewebe (Cytose, Nuklein, Globulin) fixieren. Hierzu eignen sich vor allem neutrale Salze in gesättigter Lösung. Stoffe, welche dem ersten Postulat Genüge leisten, würden nämlich gar nichts zur Erhaltung des Sauerstoffs beitragen, wenn gleichzeitig die Träger des Sauerstoffs aufgelöst würden.

Von den in Betracht kommenden Salzen liegen Versuchsreihen vor über Kochsalz, Chlorzink, Salpeter und Kalichlorat. Der Salpeter, der technisch in früheren Zeiten zum Konservieren viel gebraucht wurde, erwies sich durchaus ungeeignet für die Erhaltung des Epithels, während das Cutisgewebe nicht merklich geschädigt wurde. Gesättigte Kochsalzlösung konservierte die Eiweißstoffe besser, nicht aber die Sauerstofforte. Chlorzink war in einigermassen konzentrierter Lösung verderblich für die Eiweisse, erhielt aber in verdünnter Lösung, welche nur zur Quellung der

Kerne Anlass gab, die Sauerstofforte sehr gut. Kalichlorat schädigte die Gewebe in konzentrierter Lösung, doch nur bei Vorhandensein von viel Lösungswasser.

Es wurde daher eine weitere Versuchsreihe mit Kombinationen der Salze unternommen, die viel bessere Resultate lieferte. Als geeignetstes, Eiweiss am besten konservierendes Salz diente schliesslich eine gesättigte Lösung von gleichen Teilen Kochsalz und Kalichlorat, resp. Kochsalz und Chlorzink.

Diese Mischungen bei Zusatz von nur wenig Wasser bewährten sich beide mit dem Unterschiede, dass der Zusatz von ZnCl_2 besonders die Kernkörperchen als Sauerstofforte hervorhob (wohl durch Einwirkung auf das Globulin der Kernkörperchen); weniger gut jedoch die Kerne als Sauerstofforte konservierte (die sich leicht gequollen zeigten), während umgekehrt der Zusatz von Kalichlorat gerade die Kerndarstellung des RW-Bildes begünstigte. Ein Vergleich der betreffenden RW-Bilder mit denen des frischen Gewebes fiel zweifellos zugunsten der Kochsalz-Kalichlorat-Mischung aus, welche man, besonders bei Verwendung des Eisschranks, geradezu als ein ideales Konservierungsmittel für Sauerstofforte bezeichnen kann, welches ich deshalb zurzeit allein verwende.

Eine andere Frage betrifft die nachträgliche Verstärkung der fertigen Bilder der Sauerstofforte. Die Erfahrung hat gezeigt, dass an den regelrecht erzeugten RW-Bildern durch nachträgliche Behandlung mit H_2O_2 , Osmiumsäuregas oder Ammonpersulfat nichts Wesentliches mehr geändert werden kann, dass aber eine zu schwach ausgefallene Färbung auf diese Weise erheblich verstärkt wird. Es ist mithin prinzipiell nichts dagegen einzuwenden, wenn z. B. RW-Bilder, die in Balsam konserviert werden sollen, um etwaigen Schädigungen durch die Einbettung vorzubeugen, vorher in eine Lösung von H_2O_2 oder Ammonpersulfat getaucht oder einige Sekunden über eine Flasche mit Osmiumsäure gehalten werden, wodurch die blaue Farbe bedeutend stärker wird.

Es ist jedem zu raten, der sich nach den hier gegebenen Prinzipien mit der Darstellung der Sauerstofforte einer besonderen Tierart oder eines einzelnen Organs beschäftigen will, zuerst sich selbst durch einige leicht anzustellende Experimente über die fundamentalen Unterschiede der Speicherung von

Leukomethylenblau und Methylenblau im Gewebe im allgemeinen klar zu machen. Es kann sonst leicht geschehen, dass irgend welche einzelne, paradox erscheinende Färbung unrichtig gedeutet wird.

Der schon bei flüchtiger Beobachtung sofort in die Augen springende Hauptunterschied ist die viel stärkere und ausgedehntere Speicherung des Methylenblaus. Vergleicht man zwei entsprechende Gefrierschnitte der Fußsohle, so ist der mit Methylenblau gefärbte (siehe Fig. 23) weit intensiver blau als der mit RW behandelte (siehe Fig. 22). Nicht nur ist jedes einzelne Element stärker gebläut, sondern eine ganze Reihe von Elementen, die bei letzterer Färbung farblos sind, zeigen sich bei ersterer mehr oder minder gefärbt, so die Hornschicht und die Interzellularsubstanzen. An diesen haftet als an sauerstoffarmen Elementen der Leukofarbstoff nicht echt, d. h. nicht fest genug, um dem Auswaschen zu widerstehen.

Den krassesten Unterschied zwischen Säure- und Sauerstofforten derselben Gewebelemente findet man jedoch stets in der Haarwurzelscheide. Dieses Objekt eignet sich noch viel besser als die Hornschicht der Fußsohle, die ich in meinem Berliner Vortrag¹⁾ empfohlen hatte, zum raschen und überzeugenden Nachweis der prinzipiellen Verschiedenheit beider Orte und sollte, da es gerade an den Tasthaaren der Ratten- und Mäuseschnauze stets vorhanden ist, von jedem Forscher auf diesem Gebiete beachtet werden. Es ist besonders die als „Henlesche“ Scheide wohlbekannte, durchlöchernte Zellmembran, der äussere Zylinder der Wurzelscheide,²⁾ welcher sich mit sämtlichen basischen Farben mehr oder minder intensiv färbt. Bei Methylenblaufärbung erscheint die durchlöchernte Platte natürlich auch intensiv dunkelblau, bei RW-Färbung dagegen stets ungefärbt,³⁾ sie enthält also keinen locker gebundenen Sauerstoff, wohl aber ist sie intensiv sauer, wie die basischen Färbungen ergeben. Dieser Teil der Wurzelscheide würde mithin nach unserer Einteilung zu

¹⁾ Unna: Tatsachen über die Reduktionsorte und Sauerstofforte des tierischen Gewebes. Berl. Klin. Woch., Nr. 13.

²⁾ Unter Wurzelscheide ist natürlich die sogen. innere Wurzelscheide verstanden; die missbräuchlich sogen. „äussere Wurzelscheide“ ist ja nichts weiter als die Stachelschicht des Haarbalgs.

³⁾ Vgl. Fig. 6a bis 13a mit Fig. 6b bis 13b.

den sauren Reduktionsorten gestellt werden müssen und in der Tat zeigt jede Kalipermanganatfärbung, dass er ein starkes Reduktionsvermögen besitzt¹⁾ und sich dadurch sogar in bemerkenswerter Weise vom Haarschaft unterscheidet. Zum Unterschiede von Cytose, Nuklein und Globulin ist mithin der saure Körper, welcher der Wurzelscheide ihre hohe Basophilie verleiht, nicht auch gleichzeitig imstande, wie sonst viele saure Eiweisse, Sauerstoff zu speichern.

Man könnte nun wohl den Einwand erheben, dass der Gehalt des RW an Salzsäure, welcher zur Reduktion des Methylenblaus notwendig ist, an der eigentümlichen Beschränkung des RW-Bildes schuld sei; denn ein geringer Zusatz von freier Salzsäure zu einer neutralen Methylenblaulösung bewirkt ja, wie jeder Säurezusatz zur Lösung einer basischen Farbe, eine Abschwächung des Farbbildes.

In Verfolgung dieses Gedankenganges habe ich zeitweise auch die Salzsäure durch eine schwächere Säure ersetzt, die gerade noch stark genug war, die Reduktion durch Rongalit zu ermöglichen, aber nicht stark genug, das Methylenblaubild abzuschwächen. Von allen daraufhin untersuchten Säuren genügte allein die Salizylsäure diesen beiden Bedingungen gleichzeitig und so wurde in meinem Laboratorium eine Zeitlang Rongalitweiss mit Salizylsäurezusatz hergestellt und diese Färbung verglichen mit der Färbung einer Methylenblaulösung, der die gleiche Menge Salizylsäure zugesetzt war.²⁾ Die weitere Überlegung jedoch, dass im RW die zugesetzte Salzsäure vollständig neutralisiert wird durch das sich entwickelnde und zur Abscheidung neigende Leukomethylenblau und dass diese neutrale Lösung in bezug auf den Säuregrad nicht in Vergleich zu stellen ist mit einer durch Salzsäure angesäuerten Methylenblaulösung, führte bald von diesem Wege ab und zur alten Rongalitweisslösung zurück, nur mit dem Bestreben, diese möglichst neutral zu machen, wie es bei der oben angegebenen Herstellungsweise auch geschieht. Übrigens hatte die Salizylsäure-Modifikation des RW keine Veränderung der Färberesultate zur Folge, insbesondere keine wesentliche Verbesserung derselben.

¹⁾ Vgl. Fig. 29a und Fig. 31.

²⁾ Eine Lösung von 2‰ Methylenblau in einer gesättigten Salizylsäurelösung gibt fein abgestufte, klare, nie überfärbende Methylenblaufärbungen.

Auch der zeitweilige Ersatz des Rongalits durch andere Reduktionsmittel, welche keines Säurezusatzes bedürfen: Natronhydrosulfit, alkalisierte Lävulose, tat auf die Dauer der bewährten älteren Formel des RW keinen Eintrag.

Die extensiv und intensiv viel bedeutendere Färbung durch Methylenblau erkennt man vielleicht noch besser als durch den Vergleich zweier Schnitte nebeneinander durch einen anderen Versuch, indem man nämlich denselben Schnitt nacheinander mit RW und Methylenblau färbt. Zuerst erscheint im Schnitte die beschränktere Anzahl jener Orte, die zugleich Säureorte und Sauerstofforte sind und die wir kurz „Sauerstofforte“ nennen. Hat man diese genau notiert und färbt den wieder ausgebetteten Schnitt mit Methylenblau nach, so hat man die viel grössere Anzahl von „Säureorten“ vor sich (sauerstoffhaltige, indifferente und reduzierende Säureorte). Auch diese werden genau notiert und der Vergleich beider Reihen ergibt stets die Beschränkung der Sauerstofforte auf nur wenige, ganz bestimmte Elemente mit grosser Evidenz.¹⁾ Dass hierbei die stärkere und ausgedehntere Färbung des mit Methylenblau nachgefärbten Schnittes nicht der zweimaligen Färbung an sich zur Last fällt, erkennt man am besten, wenn ein solcher Gefrierschnitt zweimal nacheinander mit RW gefärbt wird. Dadurch wird nämlich die Färbung durchaus nicht vertieft oder ausgedehnter, sondern sie bleibt beschränkt und wird sogar schwächer. Es erfolgt also gerade das Gegenteil von dem, was eine Nachfärbung des RW-Bildes mit Methylenblau bewirkt. In der Tat gibt es wohl kaum eine schlagendere Demonstration des Unterschiedes zwischen Färbung und Leukofärbung des tierischen Gewebes als diese Nachfärbung. Praktisch verfährt man so, dass zwei Schnitte zugleich in RW gefärbt und ausgespült werden; man bringt dann einen in RW zurück, den anderen in Methylenblau, wo die Schnitte zwei Minuten bleiben. Beide werden zusammen ausgespült, angetrocknet und in Balsam gebracht.

Fig. 1 zeigt einen solchen durch sukzessiv Färbung mit RW und Methylenblau maximal gefärbten Gefrierschnitt der

¹⁾ Diese zweimalige Färbung, erst in RW, dann — nach Abspülung und Bläuung des Schnittes — in Methylenblau, gibt durch Übereinanderlagerung der sich nicht störenden Färbungen der Sauerstofforte und Säureorte so farbstarke Bilder, dass diese Methode anstatt einfacher Methylenblaufärbung zu gelegentlichem Gebrauch empfohlen werden kann.

Rattenlippe. Ein Tasthaar ist schräg durchschnitten; das markhaltige, blaugefärbte Haar ist von der schwarzblauen (Henleschen) Wurzelscheide (he), diese von der dunkelblauen Stachelschicht des Haarbalges umgeben, weiter vom Blutsinus und dem Durchschnitt des Haarbalges. Nach rechts oben folgen Längsschnitte von Muskelbündeln und rechts oben in der Ecke solche von Lanugohaaren.

Fig. 2 gibt das Bild des zweimal mit RW gefärbten Nachbarschnittes, an dem dieselben Organe der Haut nur noch in schwach bläulichen Konturen sichtbar sind. Besonders auffallend ist der Kontrast zwischen der hier ganz ungefärbten (he), dort schwarzblauen Wurzelscheide. Aber auch die Kerne, die an einfachen RW-Präparaten blau gefärbt sind, treten bei der zweimaligen RW-Färbung nicht mehr gefärbt hervor.

Überhaupt hat die RW-Färbung das Besondere, dass sie durch verlängerten Aufenthalt des Schnittes in der Farbflotte durchaus nicht verstärkt wird, wie das bei einer Methylenblaufärbung die Regel ist. Länger als 2 Minuten pflegt man deshalb die Schnitte auch nicht in dem RW zu lassen; dann haben sich die Sauerstofforte mit Leukomethylenblau gesättigt. Anstatt dass bei längerem Aufenthalt auch noch andere, also sauerstoffarme Orte die Leukofarbe aufnehmen, fängt umgekehrt der Rongalitüberschuss des RW allmählich an, die Sauerstofforte selbst zu schädigen, und die Färbung derselben geht rückwärts anstatt vorwärts.

Eins der interessantesten Kapitel in der Lehre von den Sauerstofforten, welche jeder Forscher auf diesem Gebiet experimentell zu bearbeiten hat, ist die notwendige Scheidung derselben in „stabile“ und „labile“ oder in „primäre“ und „sekundäre“. Auch dieses ganze Kapitel existiert in dem bisherigen, auf einfache Methylenblaufärbungen basierten Kapitel von den „Säureorten“ der Gewebe nicht. Seine Existenz allein ist daher wieder ein neuer und durchschlagender Beweis für meine These, dass die RW-Färbung etwas ganz anderes ist und eine prinzipiell andere Bedeutung hat wie eine Methylenblaufärbung.

Nehmen wir Gefrierschnitte durch bestimmte Gewebe (Plasmome, Gehirn, Knorpel), in denen die beiden Arten von Sauerstofforten sich nebeneinander finden, färben sie mit RW und bringen sie nacheinander in drei Reagiergläser mit gut ausgekochtem, sauerstofffreiem Wasser, schütteln sie jedesmal gut durch,

um allen Überschuss von Rongalit und Leukomethylenblau zu entfernen und giessen auf das letzte Gläschen Paraffinum liquidum 3—4 cm hoch auf. Wir können dann vollkommen sicher sein, dass von aussen kein Sauerstoff zu den Schnitten gelangen kann. Haben wir auf diese Weise, ohne die Schnitte sonst (etwa durch Reduktionsmittel) zu schädigen, den Einfluss des Luftsauerstoffs eliminiert, dann offenbart sich an den mit RW behandelten Schnitten noch ein feinerer Unterschied. Es bläuen sich innerhalb des sauerstofffreien Wassers einzelne Orte und zwar nur diejenigen, welche Sauerstoff gespeichert haben, nämlich in den Plasmazellen das Granoplasma (Cytose), in den Ganglien die Nissl-Körper (Cytose), in dem Knorpel die Grundsubstanz, und zwar tun sie das gleichmässig und ausnahmslos. Es ist eben ihre Funktion, vermöge ihrer stark sauren Beschaffenheit Sauerstoff von überall her aufzunehmen und locker zu binden; dazu haben sie den Luftsauerstoff nicht nötig, sie entziehen einfach den Kernen (der Plasmazellen, Ganglien, Knorpelzellen), die sie allseitig umgeben, den Sauerstoff. Ich nenne sie daher „sekundäre“ Sauerstofforte. „Labile Sauerstofforte“ kann man sie auch nennen, da, wenn man ihnen den Sauerstoff künstlich entzogen hat, sie nicht imstande sind, solchen selbständig an der Luft wieder zu speichern; sie bläuen sich dann nicht mehr an der Luft. Sie sind also nur deswegen sauerstoffreich, weil sie die Kerne dicht umlagern und fähig sind, deren Sauerstoff lose an sich zu binden, ohne ihn zu verbrauchen. Die Kerne der Plasmazellen, Ganglien, des Knorpels wiederum, welche so von sekundären Sauerstofforten dicht umgeben sind, unterscheiden sich in ihrer Eiweissqualität durchaus nicht von anderen Kernen und färben sich daher mit Kernfärbemitteln in gewohnter Weise. Aber sie unterscheiden sich grundsätzlich von gewöhnlichen Kernen durch die ihnen von aussen aufgezwungene Sauerstoffarmut und spielen daher auf den RW-Bildern keine Rolle, wo alle anderen Kerne in spezifischer Weise hervortreten. Nirgendwo ist daher der Unterschied zwischen Methylenblaufärbung und RW-Färbung schlagender als an diesen sekundären Sauerstofforten. Wer sich einmal die Mühe genommen hat, frische Schnitte z. B. durch ein Plasmom einerseits mit Methylenblau, andererseits mit RW vergleichend zu färben, wird niemals in den Fehler verfallen können, die Prinzipien beider Färbungsarten für dieselben zu halten.

Natürlich können auch die Kerne Sauerstoff speichern, wie die sekundären Sauerstofforte, da sie sehr saure Eiweisse (Nuklein, Globulin) enthalten. Aber das ist nicht ihre hauptsächliche Funktion. Diese ist vielmehr ganz unabhängig von dem in ihnen angesammelten Reservesauerstoff und besteht in der ihnen eigenen Fähigkeit, auf katalytischem Wege den molekularen Luftsauerstoff für die Bedürfnisse des Gewebes zu aktivieren. Schliessen wir daher von den Kernen auf Gefrierschnitten den Sauerstoff ab, so finden wir sehr verschieden grosse Reservemengen von Sauerstoff in ihnen gespeichert, je nach Art ihrer Umgebung und anderen zufälligen Umständen. In denselben Schnitten, welche Plasmazellen beherbergen (Plasmome), sind ja auch Hunderte von Kernen gewöhnlicher Bindegewebszellen; diese zeigen sich im Gegensatz zu den Kernen der Plasmazellen alle mehr oder minder stark erfüllt von Sauerstoff. Bringen wir aber dieselben Schnitte vorher in warme Borsäurelösung, wo das Granoplasma der Plasmazellen aufgelöst wird, während das Nuklein ihrer Kerne erhalten bleibt, behandeln sie dann mit RW und bringen sie abgespült mit Luftsauerstoff zusammen, so zeigen nun auch die Kerne der Plasmazellen, wie alle übrigen Kerne, Sauerstoff durch ihre Bläunung an.

Die Abbildungen Fig. 3, 4 und 5 mögen das Gesagte erläutern. Es handelt sich um Gefrierschnitte des Randes von einem Ulcus cruris mit zahlreichen Plasmazellen.

Der Schnitt zu Fig. 3 wurde eine Nacht der besseren Färbung wegen in absolutem Alkohol aufbewahrt und dann in gewöhnlicher Weise mit polychromer Methylenblaulösung gefärbt und in verdünnter Glyzerinäther-Mischung entfärbt. Die gewählte Stelle zeigt einen Venenquerschnitt, der von einem dichten Plasmazellenkranz umgeben ist. Granoplasma und Kerne in denselben sind maximal gefärbt. Die Plasmazellen zeigen den Charakter einer jungen Plasmazellenbrut durch ihre vielen Fortsätze und eckigen Formen.

Ein Nachbarschnitt (Fig. 4) wurde frisch mit RW gefärbt. Das Bild zeigt eine Anhäufung von Plasmazellen über einer Kapillare. Der Zellcharakter ist total verändert, da hier nur die Sauerstofforte, nicht die Säureorte gefärbt sind. Daher macht sich nur der Reservesauerstoff im Granoplasma und hier und da im Kernkörperchen durch Blaufärbung geltend. Die in Fig. 3

schwarzblau gefärbten Kerne sind farblos, da sie ihren Sauerstoff dem umliegenden Granoplasma und dem Globulin der Kernkörperchen abgegeben haben; es besteht hier also keine Nukleinfärbung, sondern nur eine Blaufärbung der Cytose und des Globulins (sekundäre Sauerstofforte).

Weiter zeigen die Plasmazellen aber auch keine scharfen Konturen wie im Säurebild, da auch das ihnen von ihrer Entstehung her anhaftende, umgebende Spongioplasma gelöstes Granoplasma aufgenommen hat und zahllose Granoplasmakörnchen die umgebenden Lymphspalten erfüllen. Wo aber Granoplasma, gelöst oder niedergeschlagen, hinkommt, zeigt die RW-Färbung auch Sauerstoff an. Daher scheinen die Plasmazellen in ihrer Umgebung zu zerfließen und das ganze Plasmom macht auf den ersten Blick einen ungewöhnlichen, verschwommenen, unklaren Eindruck. Man ist es eben nicht gewohnt, Sauerstoffbilder zu betrachten, in denen die Zellgrenzen nirgends respektiert werden.

Wieder anders wurde der Schnitt zu Fig. 5 behandelt. Der Gefrierschnitt wurde in eine zweiprozentige Borsäurelösung gelegt und bei Körpertemperatur eine Nacht darin gelassen. Die warme Borsäurelösung löst das Granoplasma auf, nicht aber das Nuklein der Kerne. Die RW-Färbung am nächsten Morgen ergab das Bild 5, welches wiederum eine Plasmazellengruppe darstellt. Im schärfsten Kontrast zu Fig. 4 sind hier die Kerne der Plasmazellen stark gefärbt, ebenso stark wie einige dazwischen liegende Leukozytenkerne. Sie haben ihren Sauerstoff nicht an die Zellenleiber abgegeben, da diese ihr Granoplasma fast ganz verloren haben. Dieselben sind nur noch ganz schwach bläulich gefärbt, zeigen aber scharfe Konturen wie die Plasmazellen in Fig. 3.

Der Sauerstoffvorrat der Kerne ist mithin „primär“: er gibt Sauerstoff an das Granoplasma, an die Knorpelgrundsubstanz und andere sekundäre Sauerstofforte ab und bezieht andererseits selbst von diesen keinen Sauerstoff, obwohl er rings von ihnen umgeben ist. Im Gegensatz zu den unselbständigen Reservoiren der sekundären Sauerstofforte können wir den selbständigen und beständigen Sauerstoffort der Kerne auch „stabil“ nennen, weil an ihm, solange der Sauerstoff der Luft zufließt, beständig aktiver Sauerstoff automatisch produziert wird. Er ist während des Lebens eine permanente, dauerhafte Quelle aktiven Sauerstoffs.

Ja, es haben eigens darauf hinzielende Versuche gezeigt¹⁾, dass die Stabilität dieses Sauerstofforts noch über den Tod hinaus 2, 3, ja 4 Tage andauern kann. So lange aktivieren nämlich die Kerne der Gewebe, die man der Luft exponiert, den Sauerstoff und so lange färben sie sich demgemäss mit RW blau.

Ehrlich hat schon vor langer Zeit gezeigt, dass beim Tode eine plötzliche Sauerstoffnot aller Gewebe eintritt, die sich postmortal durch Kontakt der Organe mit Luftsauerstoff in vielen Fällen wieder ausgleicht. Der Sauerstoffgehalt der Gewebe unmittelbar nach dem Tode gibt die Verhältnisse im Leben in der Tat nicht genau wieder. Meine Versuche haben vielmehr gezeigt, dass mit dem Tode zunächst eine abnorme Sauerstoffverteilung eintritt, indem in den sekundären Sauerstofforten der Zellen (Granoplasma), dann auch in den Interzellularsubstanzen (Kollagen) und sogar in Muskeln und Nerven ein Sauerstoffüberschuss, mit RW durch Bläuung nachweisbar, auftritt, während die Kerne an vielen Stellen sich sauerstoffleer erweisen. Das Bild ändert sich aber bald, schon nach einem Tage, indem einerseits dieser Sauerstoffüberschuss verzehrt wird, den die Kerne in der Agonie und postmortal an ihre Umgebung abgegeben haben, andererseits die Kerne sich alle wieder sauerstoffhaltig zeigen. Es ist dieses aktive Verhalten der Kerne tatsächlich die letzte Lebensäusserung der Zelle. Mit dem Aufhören der Zirkulation empfängt der Kern keinen frischen molekularen Sauerstoff mehr, kann demgemäss auch bald keinen aktiven Sauerstoff mehr liefern und verfällt dann selbst dem Tode.

Der rasche Ausgleich der agonalen Schwankung erlaubt es, die Gewebe mit Vorteil einen Tag nach dem Tode zur Herstellung von Sauerstoffbildern zu verwenden. Während ich in den ersten Jahren dieses Studiums immer bemüht gewesen war, möglichst unmittelbar nach dem Tode zu untersuchen, veranlasste mich die Kenntnis der geschilderten postmortalen Verschiebungen des Sauerstoffgehaltes, gesetzmässig in ihrer Art, aber quantitativ und individuell ungemein verschieden, die Normalaufnahme des Sauerstoffbildes prinzipiell 24 Stunden zu verschieben, nämlich bis nach Ablauf der postagonalen

¹⁾ Unna: Tatsachen über die Reduktionsorte und Sauerstofforte des tierischen Gewebes. Berl. Klin. Woch. 1913, Nr. 13.

Schwankung. Die hier abgebildeten Sauerstoffbilder entstammen solchen 24 Stunden auf Eis aufbewahrten Geweben.

Fassen wir alles bisher Gesagte kurz zusammen: die grundsätzlichen Unterschiede zwischen der Methylenblaufärbung und RW-Färbung der Gewebe, das Vorkommen sehr saurer Gewebe (Wurzelscheide, Kerne der Plasmazellen, Ganglien und Knorpel), die sich mit Methylenblau stark, dagegen mit RW gar nicht färben, die Beschränkung aller Sauerstofforte auf einen bestimmten kleinen Teil der Säureorte des Gewebes, die mangelnde Proportionalität zwischen Stärke und Zeit der RW-Färbung, der paradoxe Rückgang der RW-Färbung bei doppelter Färbung, die durch die Sauerstofforte zum ersten Male und nur durch sie gewonnene Kenntnis von den verschiedenen Arten der Sauerstoffbindung (primären und sekundären Sauerstofforten), die gegenseitige Abhängigkeit dieser beiden Kategorien untereinander, die bemerkenswerte Abhängigkeit der RW-Orte überhaupt von ihrer Umgebung und deren Eiweissgehalt und endlich das rasche Schwanken des Sauerstoffgehaltes derselben Orte nach dem Tode und ihr definitives Verschwinden einige Tage später ohne gleichzeitiges Verschwinden der Säureorte, so sieht wohl jeder ein, dass die von verschiedenen Seiten geäußerte Ansicht, es möge sich bei ihnen nur um die gewöhnlichen und längst bekannten, durch Methylenblau angezeigten Säureorte handeln, schon hiernach absolut unhaltbar ist.

Aber eine besondere Eigenschaft der Sauerstofforte ist im bisherigen noch gar nicht berührt, die sie ebenfalls von den blossen Säureorten sehr weit entfernt, das ist ihre ganz eigentümliche und auffallend grosse Empfindlichkeit gegenüber Giften.

Unter diesen Giften der Sauerstofforte seien die reduzierenden Substanzen wegen ihrer durchsichtigen Wirkung vorangestellt. Denn wenn es richtig ist, dass die durch RW darstellbaren Orte sich durch ihren Mehrgehalt an locker gebundenem, leicht abgebbarem Sauerstoff auszeichnen, so ist es nur eine notwendige Konsequenz, dass sie nach Behandlung mit stark reduzierenden Stoffen weniger oder gar nicht mehr auf RW mit der gewöhnlichen Färbung reagieren. Da andererseits die Behandlung mit reduzierenden Mitteln den Säuregrad der Gewebelemente gewöhnlich nicht beeinflusst, so wird die Wirkung der reduzierenden Mittel auf Gewebsschnitte sich darin äussern,

dass die Methylenblaufärbung normal ausfällt, die RW-Färbung sich dagegen in hohem Grade abgeschwächt zeigt. Dieses ist nun in der Tat der Fall.

Alle folgenden Gefrierschnitte, die sich auf Vergiftung beziehen, sind der Mauslippe entnommen. Sie wurden unmittelbar nach der Anfertigung eine Stunde lang in die Lösungen der verschiedenen Gifte gebracht, dann in Wasser abgespült und teils in Methylenblau (Fig. a, a, a . . .), teils in RW (Fig. b, b, b . . .) gefärbt. Es versteht sich von selbst, dass zu diesem Zwecke die Methylenblaufärbung in allen Einzelheiten der RW-Färbung angepasst werden musste. Da diese Alkohol als Entwässerungsmittel nicht verträgt, die Schnitte mithin durch Antrocknung in Balsam gebracht werden müssen, so durfte der Alkohol auch bei der Methylenblaufärbung nicht zur Anwendung gelangen und musste durch Antrocknung ersetzt werden. Dadurch wurden aber die Schnitte nach Färbung mit der gebräuchlichen 1proz. Methylenblaulösung so farbstark, dass Einzelheiten der Färbbarkeit in ihnen nicht mehr gut zu sehen waren. Es wurde deshalb beiden Färbungen statt einer 1proz. eine $\frac{1}{2}$ proz. Methylenblaulösung zugrunde gelegt; dafür blieben die Schnitte aber 3 Minuten (statt 2 Minuten) in den Farblösungen. Zwischen den beiden Serien a und b besteht also nur noch der einzige Unterschied, dass bei ersterer Methylenblau, bei letzterer Rongalitweiss — von derselben Stärke und unter sonst ganz gleichen Umständen — zur Anwendung gelangt ist.

Als eine allen Bildern a und b gleichmässig zukommende wesentliche Differenz ist in erster Linie die maximal starke Färbung der Haarwurzelscheiden bei Serie a und ihre vollkommene Farblosigkeit bei Serie b hervorzuheben, ein sehr ins Auge fallender Unterschied, der bereits oben erwähnt wurde. In den Einzelbeschreibungen wird daher diese selbstverständlich auch hier überall hervortretende Differenz der Raumersparnis wegen nicht jedesmal wiederholt.

Fig. 6a und b. Behandlung mit gesättigter Lösung von schwefliger Säure (SO_2). Methylenblau gibt eine starke Färbung der Kerne (dunkelblau) und der Mastzellen (blauviolett). Die dicken Nervenstämme (n) der Subkutis sind bis auf die Kerne und Mastzellen nur schwach, die Muskeln (m) etwas stärker blau gefärbt.

Das RW-Bild (Fig. 6 b) zeigt schwächer gefärbte Kerne und Mastzellen. Die Muskeln (m) sind ebenfalls schwächer gefärbt (nur hellblau), die grossen Nervenstämme (n) dagegen samt ihren blauen Kernen und violetten Mastzellen sehr dunkel, man kann sagen maximal gefärbt.

Der starke Sauerstoffgehalt der Nervenstämme auf dem mit SO_2 vergifteten RW-Bild ist um so auffallender, als das entsprechende Säurebild wohl stark gefärbte Kerne und Mastzellen, aber nur eine schwache Färbung der Nervensubstanz zeigt.

Fig. 7 a und b. Behandlung mit frisch gesättigter Lösung von Schwefelwasserstoff (H_2S).

Methylenblau gibt eine maximale Färbung: dunkelblaue Kerne, Nerven (n), Muskeln (m), dunkelviolette Mastzellen.

RW zeigt eine ganz schwache, teilweise minimale Kernfärbung, sehr schwache Blaufärbung der Muskeln (m) und der Nervenstämme (n) und eine abgeschwächte Violettfärbung der Mastzellen im allgemeinen. Nur die Kerne und die grossen Mastzellen der Nervenstämme machen eine Ausnahme, indem sie fast ebenso stark gefärbt sind wie bei Methylenblaufärbung. Es besteht also ein ähnlicher Gegensatz zwischen Sauerstoffgehalt der Kerne der Muskeln und Nerven bei H_2S , wie zwischen Muskeln und Nerven selbst bei SO_2 . Diesen starken Reduktionsmitteln gegenüber hält mithin gerade nur der Inhalt der Nervenstämme den Sauerstoff sehr fest.

Fig. 8 a und b. Die Reduktionswirkung des Pyrogallols darf an den zu färbenden Schnitten nicht in alkalischer Lösung erzielt werden. Denn einerseits würde die gleichzeitige Alkaliwirkung die Beurteilung des RW-Bildes stören; andererseits bildet Pyrogallol in alkalischer Lösung sehr rasch gelbe Oxydationsprodukte, welche die Schnitte selbständig anfärben. Die Schnitte wurden deshalb mit einer neutralen 5proz. Pyrogallollösung 1 Stunde lang behandelt. Methylenblau ergibt eine gleichmässig maximale Färbung der Kerne, Mastzellen, Muskeln (m) und Nerven (n). Letztere sind nicht stärker gefärbt als die Muskeln. Das RW-Bild zeigt schwache Kern-, Mastzellen- und Muskelfärbung (m) und wiederum eine stärkere der Nervenstämme (n), wie die Vergiftung mit SO_2 .

Fig. 9 a und b. Seit den Untersuchungen Trýbs¹⁾ wissen

¹⁾ Trýb, Histologische Veränderungen des Gewebes nach Einspritzungen von Salvarsan. Monatsh. f. Prakt. Derm. 1911. Bd. 52, S. 405.

wir, dass Salvarsan die Sauerstofforte der Haut rasch und in radikalster Weise vernichtet und für die Gewebe geradezu das stärkste aller bekannten Reduktionsmittel ist.

Die vorliegenden Bilder sind so gewonnen, dass die Schnitte in einer halbprozentigen, durch Glyzerin (zu gleichen Teilen) noch weiter verdünnten, nicht neutralisierten Salvarsanlösung eine Stunde verweilten. Längerer Aufenthalt vernichtete auf dem RW-Bild jede Spur von nachträglicher Färbung. Demgemäss verweilte auch das Methylenblaupräparat eine Stunde in einer Salvarsanlösung von derselben Stärke. Dieses zeigt dann eine mässige Kern- und sehr starke Mastzellenfärbung. Die Muskeln (m) sind etwas stärker, die Nerven (n) bedeutend stärker als normale gefärbt. Alle Gewebselemente zeigen ausserdem verschwommene, unscharfe Konturen; sie sind gequollen und mit dem ebenfalls gequollenen Kollagen zu einer ziemlich homogenen Masse verschmolzen. Das RW-Bild andererseits zeigt eine allgemeine, sehr bedeutende Abschwächung. Jedoch machen die Muskeln (m) eine Ausnahme, indem sie schwach und ihre Kerne durchweg stärker blaugrün gefärbt sind. Das Präparat macht daher den Eindruck einer spezifischen Muskelfärbung. Um so mehr muss betont werden, dass die Kerne der Nervenstämme und diese selbst vollkommen farblos sind und ebenso von Mastzellenfärbung keine Andeutung vorhanden ist. Wir finden hier einen auch sonst hervortretenden Parallelismus zwischen Nerven- und Mastzellenfärbung und einen ganz besonders starken Einfluss des Salvarsans auf die Sauerstoffversorgung von Mastzellen und Nerven. Bei anderen Konzentrationen und Zeiten der Salvarsaneinwirkung tritt dieser scharfe Gegensatz zwischen dem Sauerstoffvorrat von Muskeln und Nerven nicht so scharf hervor.

Fig. 10 a und b. Den Übergang zu den Giften, die man in chemischem Sinne nicht eigentlich Reduktionsmittel nennen kann, macht das Formalin. Bekanntlich reduziert auch Formalin, z. B. ammoniakalische Silberlösung; aber bei ihm treten andere chemische Eigenschaften in den Vordergrund, besonders sein Verbindungsvermögen mit allen Arten von Eiweiss (Blum). Ich benutzte eine 5proz. Lösung, die eine Stunde einwirkte. Die Methylenblaufärbung eines solchen Schnittes ist ungemein stark und gleichmässig und erstreckt sich auch auf das Kollagen. Die Nervenstämme (n) sind nicht stärker gefärbt als die Muskeln (m).

Das RW-Bild dagegen ist sehr schwach gefärbt bis auf die Mastzellen, die fast dieselbe starke Färbung zeigen wie auf dem Methylenblaubild und daher zu den farbschwachen Kernen einen auffälligen Kontrast bilden. Etwas weniger stark gefärbt (blauviolett), aber doch stärker als die Muskeln sind auch hier die grossen Nervenstämme (n).

Fig. 11 a und b. Der absolute Alkohol, der für alle basischen Farben als bestes Fixativ gilt, vernichtet die RW-Färbung in ganz auffallender Weise. Jedenfalls ist die ja sicher auch hier bestehende Reduktionskraft — man denke an die rasche Reduktion einer Permanganatlösung durch Alkohol — viel zu schwach, um allein die starke Wirkung auf das RW-Bild zu erklären. Die Methylenblaufärbung zeigt maximal gefärbte Kerne und Mastzellen und gleichmässig blaugefärbte Muskeln (m) und Nerven (n), ohne Bevorzugung der letzteren. Im RW-Bild ist alles nur noch minimal grünlichblau gefärbt. Nur die Mastzellen treten in violetter Farbe noch einigermaßen gut gefärbt hervor und die Nerven (n) sind ein ganz wenig mehr gefärbt als die kaum als solche erkennbaren Muskeln (m).

Fig. 12 a und b. Kommt beim Alkohol ausser der Reduktionswirkung jedenfalls noch ein anderes Moment in höherem Grade in Betracht, so kann beim Azeton von einer Reduktionswirkung nun gar nicht die Rede sein. Und doch vernichtet Azeton das RW-Bild noch stärker als Alkohol. Die Gegensätze zwischen ihm und dem Methylenblaubild sind nach einem Aufenthalt in reinem Azeton von 1 Stunde Dauer die denkbar grössten; dort Kerne, Mastzellen, Muskeln und Nerven dunkelblau gefärbt, hier ganz schwach grünlichblau bis auf die Mastzellen, die in schwachem Violett sich noch etwas abheben.

Der gleichsinnige, schädigende und vernichtende Einfluss des Alkohols und Azetons auf das RW-Bild lässt daran denken, dass durch diese Mittel vielleicht ein noch unbekannter Träger des Sauerstoffs gelöst wird. Ausserdem haben beide Vergiftungen das gemein, dass die Abschwächung gleichmässig alle Sauerstofforte trifft und speziell die Nerven ebenso stark wie die Muskeln, während die reduzierenden Gifte (SO_2 , H_2S , Pyrogallol), ausgenommen Salvarsan, die Muskeln stärker angreifen als die Nerven. Endlich gleichen sich die Alkohol- und Azeton-RW-Bilder noch darin, dass die (hier nicht abgebildeten) Talgzellen im Haarbalg-

trichter bei ihnen dunkelblau hervortreten (Freiwerden von Ölsäure?).

Fig. 13 a und b. Schliesslich sei noch die Zyankaliumwirkung vorgeführt, die man von jeher als die stärkste Protoplasmavergiftung angesehen hat. Auch hier handelt es sich in noch höherem Grade als beim Formalin um eine starke Affinität zur Zellsubstanz, bei der die Sauerstoffaktivität aufgehoben wird, ohne dass von einer eigentlichen Reduktionswirkung die Rede sein kann. Um die besondere Wirkung des Alkalis auf das RW-Bild auszuschliessen, muss die Zyankaliumlösung mit Essigsäure abgestumpft werden. Ich bediene mich einer Lösung von 1:10 000, in der die Schnitte 1 Stunde verweilen. (Wählt man stärkere Lösungen und längere Zeiten, so gelingt auch keine Methylenblaufärbung mehr.) Das Methylenblaubild ist durchweg dunkelblau bis blauschwarz gefärbt, stärker als normal. Das RW-Bild ist erheblich abgeschwächt, wenn auch noch hellblau gefärbt. Die Nerven (n) haben keinen Vorzug vor den schwach gebläuten Muskeln (m).

Im folgenden stelle ich nun noch einmal die Technik der RW-Methode kurz zusammen, deren Begründung in den bisherigen Erörterungen ausführlich gegeben ist.

Technik.

I. Vorbereitung.

Die Gewebe können frisch, in überlebendem Zustande untersucht werden; besser aber wartet man die agonale Schwankung ab und untersucht 24 Stunden später die trocken auf Eis gelegten Gewebsstücke. In jedem Falle muss das Gewebsstück unter der Wasserleitung von Blut befreit werden. Muss die Untersuchung einige Tage hinausgeschoben werden, so bringt man die Stücke in einer Petrischale auf eine 5 mm hohe Salzschrift von gleichen Teilen Kochsalz und Kalichlorat, die man mit so wenig Wasser bedeckt, dass die Stücke feucht in konzentrierter Salzlösung liegen und stellt die Petrischale auf Eis.

Die frischen Gewebsstücke werden direkt mit dem Gefriermikrotom geschnitten; die auf Salz konservierten müssen vorher durch Auswaschung gut und möglichst rasch vom Salz befreit werden, da bei längerem Aufenthalt in der sich verdünnenden Salzlösung die Sauerstofforte leiden würden. Zu diesem Zweck

drückt man von oben in den Hals eines grossen Glastrichters etwas Watte so tief ein, dass darauf gegossenes Wasser ziemlich rasch hindurchtropft. Auf den Wattebausch kommen die in Salz konservierten Gewebsstücke. Man sorgt durch Nachgiessen für einen beständigen Wasserstrom und hält letzteren ca. eine halbe Stunde in Gang.

II. Schneiden.

Die Dicke der Gefrierschnitte soll nicht unter $25\ \mu$ gehen, da sie durchsichtig genug sind und sonst zu leicht zerreißen.¹⁾

III. Färbung.

Man hält sich 100 g einer $\frac{1}{2}$ proz. Lösung von Methylenblau vorrätig, die man mit ca. 7 Tropfen einer 25proz. Salzsäurelösung angesäuert hat. Von dieser werden 10 ccm in einem Reagierglas mit 0,3 Rongalit²⁾ gelinde erwärmt, bis Entfärbung auftritt. Zu starkes Erhitzen muss wegen möglicher Zersetzung des Rongalits vermieden werden. Es resultiert eine nahezu wasserhelle Lösung; sollte dieselbe nach dem Erkalten etwas trübe werden, so ist sie vor dem Gebrauch zu filtrieren.

Diese Lösung von RW hält sich mehrere Tage, muss aber vor jedesmaligem Gebrauche zur Vermeidung von Niederschlägen wieder filtriert werden.

Die Färbung in dieser Lösung geschieht in einem Glaschälchen und ist in 2 Minuten vollendet.

Man überträgt die Schnitte einzeln mit stumpfer Glasnadel unter beständiger Bewegung in eine grössere Schale mit abgekochtem Wasser. Die starke Bewegung hat den Zweck, die Schnitte möglichst rasch und vollständig vom Überschuss an RW zu befreien; oft ist hierzu die Übertragung in eine zweite Schale mit abgekochtem Wasser notwendig. Ein Nebenzweck der raschen Bewegung ist es, die Schnitte vor dem Ankleben an die Glasnadel und Glaswand zu bewahren, dem sie sonst leicht anheimfallen.

Hat man es mit Ausstrichen von Eiter, Blut etc. zu tun, so bringt man dieselben ohne vorherige Erhitzung, aber

¹⁾ Da eine Härtung mittelst Formalin durchaus vermieden werden muss, kommt die übliche Schnittdicke von $10\ \mu$ hier nicht in Betracht.

²⁾ Erzeugnis der Badischen Anilin- und Sodafabrik oder das gleichwertige Produkt: Heraldit von Casella.

lufttrocken in ein Standgefäß mit Rongalitweiss, wo sie etwa 2 Minuten verweilen. Zur Auswaschung lässt man sauerstoff-freies Wasser über den Objektträger laufen.

Die Bläuung des aufgenommenen Leukomethylenblaus geschieht erst nach einigen (bis 10) Minuten. Um den Schnitt darf sich während des Auswaschens keine bläuliche Wolke bilden, die ein Zeichen ungenügender Bewegung des Schnittes und Bildung von Methylenblau im Waschwasser ist.

IV. Einbettung.

Ist der Schnitt deutlich gebläut, so fängt man ihn direkt mit der Mitte eines Objektträgers auf, befreit seine Umgebung durch Löschpapier von Wasser und lässt ihn an der Luft langsam antrocknen. Man kann die Antrocknung durch einen warmen Luftstrom beschleunigen, aber nicht durch Erhitzung über der Flamme.

Nach vollständiger Antrocknung bedeckt man den Schnitt mit einem Deckglase, welches mit einem Tropfen neutralen Balsams (Grübler) versehen ist.

Ausstriche von Eiter, Blut etc., nachdem sie lufttrocken geworden, werden in Zedernöl betrachtet. Soll das Präparat erhalten bleiben, so wird es mit Xylol gereinigt und trocken aufbewahrt.

B. Spezieller Teil.

Im folgenden möchte ich nun meine Erfahrungen kurz mitteilen und durch Abbildungen demonstrieren, welche an einigen bevorzugten Geweben, nämlich an solchen gewonnen sind, die mir zur Bearbeitung zufälligerweise am leichtesten zugänglich waren. Es sind: menschliche Fußsohle und Kopfhaut, Schnauzen von Mäusen und Ratten, Nieren von Mäusen und Kaninchen, Lunge von Kaninchen, Kleinhirn und verlängertes Mark vom Kalb, Hühnerblut, Haut von Ulcus cruris und gonorrhöischer Eiter. Die Verschiedenartigkeit dieses Materials ermöglichte einerseits einen raschen Überblick über fast alle hauptsächlich in Betracht kommenden Gewebelemente und schloss andererseits wohl mit Sicherheit eine zu grosse Einseitigkeit der Betrachtung von vornherein aus. Ich

denke, dass sie in der Hand von Anatomen, Pathologen und Zoologen als Vorlagen für weitere Studien an diesen und anderen Organen nützlich sein werden.

I. Fußsohle vom Menschen.

Das Säurebild der Fußsohlenhaut (Fig. 14), wie es eine einfache Färbung des Alkohol-Zelloidinschnittes mit 1proz. Methylenblaulösung ergibt, ist bekannt. Es verdient nur hervorgehoben zu werden, dass es, falls man mit Alkohol und nicht etwa mit saurem Alkohol entwässert hat, durchaus kein reines Kernbild genannt werden kann. Einerseits färbt sich das Protoplasma sämtlicher Epithelien ebenfalls in mattblauem Tone, vor allem das des Deckepithels und zwar von der Keimschicht bis zur Hornschicht in gleichmässiger Weise, dann das der Knäuelgänge und Knäueldrüsen sowie das der Endothelien sämtlicher Blutgefässe. Ferner sind die Nerven blass mitgefärbt. Überall heben sich in diesen Teilen die Kerne durch ihre dunklere Färbung ab und in den grossen bläschenförmigen Kernen der Stachelschicht die noch dunkleren Kernkörperchen wieder von dem Blau der Kerne.

Andererseits nehmen in unregelmässiger Weise einzelne Bezirke der Hornschicht und der Cutis, erstere öfter in den oberen, letztere in den unteren Partien, Methylenblau auf und halten es dem Alkohol gegenüber fest.

Es ist für die Darstellung dieses Bildes ziemlich einerlei, ob man statt Gefrierschnitte von der frischen Fußsohle anzufertigen, letztere in Alkohol fixiert und in Zelloidin einbettet; in letzterem Falle resultieren allerdings feinere und bessere Schnitte. Die Säureorte leiden unter der Alkoholbehandlung nicht, aber vollständig verändert sich das Bild, wenn man die Schnitte vor der Methylenblaufärbung mit 5proz. Salzsäure 12 Stunden lang behandelt (Fig. 15). Sie nehmen dann nur noch in der Hornschicht Methylenblau auf, die sauren Eiweisse der Stachelschicht (sta), welche sonst das Methylenblau speichern (hauptsächlich Nuklein, Globulin, Cytose), sind ausgezogen worden, in der Hornschicht dagegen ist ein noch nicht näher bekanntes Eiweiss von saurem Charakter verblieben.

Stellen wir nun nach derselben Vorbehandlung eines Schnittes mit 5proz. HCl das Manganbild der Fußsohle dar (Fig. 16),

so ergibt sich ein Reduktionsbild, welches mit dem normalen Reduktionsbild (Fig. 17) nahezu vollständig übereinstimmt. Hier wie dort ist die Hornschicht am dunkelsten braun, dann folgt die Stachelschicht (sta) des Deckepithels und der Knäuelgänge. Noch schwächer reduzierend, d. h. nur hellgelb gefärbt ist die Keimschicht (kei) und ebenso hellgelb erscheinen die Kerne (ke) der Stachelschicht, ganz hell das Kollagen der Cutis. Bemerkenswert ist die scharfe Abgrenzung dieser Reduktionsstufen und, wie ich hinzufügen kann, ihre Konstanz. Mögen noch so viele individuelle Unterschiede in der Architektur des Deckepithels vorhanden sein, die Reihenfolge und Abstufung in der Stärke der Reduktion bleibt stets dieselbe. Immer ist die Reihenfolge im Epithel diese:

Hornschicht

Protoplasma der Stachelschicht

Protoplasma der Keimschicht und Kerne der Keim-
und Stachelschicht

Cutis.

Im allgemeinen kann man vom Reduktionsbild des mit 5proz. HCl extrahierten Fußsohlenschnittes (Fig. 16) sagen, dass es meistens noch dunkler ausfällt als das des einfachen Alkohol-Zelloidinschnittes (Fig. 17), wenn man beide gleich und gemeinsam mit Kalihypermanganat behandelt.¹⁾ Hier hat die Salzsäurebehandlung also offenbar ein Reduktionshindernis weggenommen. Das Verhalten der Stachelschicht lehrt aber, dass hier die Fortnahme der in ihr vorhandenen, bekannten, sauren Eiweisse (Nuklein, Zytose, Globulin) an der Reduktionskraft nichts verändert hat, oder mit anderen Worten, dass diese Eiweisse an dem Reduktionsbild der Stachelschicht nicht beteiligt sind.

Das Reduktionsbild kann also nur durch solche Eiweisse hervorgerufen sein, welche durch 5proz. Salzsäure nicht gelöst werden und sich nach dieser Behandlung noch färberisch nachweisen lassen. Das sind zunächst sicher die von mir sog. oxyphilen Substanzen des Protoplasmas und Kerns, die

¹⁾ Die absolute Dunkelheit (Bräunung) der Manganatschnitte hängt von der Konzentration der Permanganatlösung und der Zeitdauer ihrer Einwirkung ab; die relative Bräunung der einzelnen Gewebsteile bleibt jedoch bei nicht allzu starker, resp. langer Manganeinwirkung stets die gleiche.

sich spezifisch mit Hämatein + Alaun färben, basische Eiweisse, welche in 5proz. HCl nicht löslich sind. Vergleicht man nämlich mit einem Schnitte (Fig. 18), der direkt mit Hämatein + Alaun gefärbt ist, einen anderen, der ebenso, aber erst nach Behandlung mit 5proz. HCl gefärbt wurde (Fig. 19), so sieht es fast aus, als ob mit letzterem gar nichts geschehen wäre. Kerne, Kernkörperchen und besonders die Körnerschicht treten aus dem ebenfalls gebläuten Protoplasma stark gefärbt hervor, obwohl, wie wir wissen, die das Methylenblaubild erzeugenden Eiweisse in dem mit Säure extrahierten Schnitt gar nicht mehr vorhanden sind (vgl. Fig. 15). Hier haben wir also sicher Substanzen vor uns, die sich an der Entstehung des Reduktionsbildes beteiligen. Aber dass es nicht die einzigen sind, lehrt der weitere Vergleich zweier Schnitte, die beide 1—2 Stunden in 25proz. (konzentrierter) Salzsäure gelegen haben.

Färben wir einen solchen mit Hämatein + Alaun (Fig. 20), so kommt es nicht mehr zu einer typischen Hämateinfärbung, sondern es entsteht ein ganz schwaches diffuses Bild, als hätten wir es mit einer einfachen sauren Farbe gefärbt. Die löslicheren oxyphilen Eiweisse, die das typische Hämatein + Alaun-Bild erzeugen, sind mithin nun auch aus Protoplasma und Kern verschwunden und es liegt die letzte Zellgrundlage nackt vor uns: Spongioplasma im Zelleib, Plastin (Reinke-Zacharias) im Kern. Dieselbe ist mit allen sauren Farben diffus färbbar, also basischer Natur und überhaupt der Grund, weswegen und das Objekt, welches sich mit allen sauren Farben in diffuser Weise färben lässt.

Die Reduktionsfärbung eines solchen mit 25proz. Salzsäure behandelten und seiner löslicheren oxyphilen Substanzen beraubten Schnittes (Fig. 21) beweist nun, dass auch die letzte Grundlage der Stachelzellen und ihrer Kerne sich am Manganbild beteiligt, dass das Spongioplasma (und Plastin) Kalpermanganat reduziert. Entsprechend dem starken Substanzverlust des Schnittes färbt er sich etwas weniger stark braun und es treten einzelne histologisch blossgelegte Teile dadurch relativ gut gefärbt hervor, so die Membranen der Stachelzellen und die aus Keratin A bestehenden Hornmäntel der hohl gewordenen (partiell verdauten) Hornzellen. Aber es ist wichtig zu konstatieren, dass die Stachelzellen nicht hohl sind und nicht Löcher aufweisen, wie die Horn-

zellen,¹⁾ und dass auch an Stelle der Kerne keine Höhlen aufgetreten sind. Die Stachelschicht stellt mithin auch noch nach dieser eingreifenden Behandlung ein lückenloses Kontinuum dar, an dessen abgeschwächtem Reduktionsbilde wir noch einen Rest der typischen Stufenfolge der Reduktionskraft

Hornschicht
Stachelschicht
Kerne
Cutis

erkennen können. Auch hier besteht also noch eine Differenz in der Reduktion zwischen Zelleib und Kern derart, dass die Kerne hell und scharf konturiert aus der homogenen Färbung der Stachelschicht sich abheben. Diese gelbliche homogene Färbung der Grundsubstanz der Kerne schliesslich ist es also, die wir auch an den Kernen am Manganbild der unbehandelten Schnitte wahrnehmen (Fig. 17) und die dort durch den stärkeren Kontrast gegen die braunere Stachelschicht sogar den Eindruck ausgasparter, nahezu farbloser Lücken hervorruft.

Zu diesem Reduktionsbild Fig. 17 bietet nun das Sauerstoffbild der Fußsohle (Fig. 22) im Bereiche des Deckepithels den denkbar grössten Kontrast dar. In diesem hatten wir folgende Stufenfolge:

Hornschicht
Protoplasma der Stachelschicht
Protoplasma der Keimschicht und Kerne.

Hier finden wir die umgekehrte Reihenfolge. Am dunkelsten blau färben sich die Kerne und das Protoplasma der Keimschicht, dann das Protoplasma der übrigen Stachelschicht und ganz ungefärbt ist die Hornschicht.

Auch die feineren Verhältnisse der Sauerstofforte der Fußsohle, wie sie in den Fig. 22—25 dargestellt sind, bieten manches Interesse.

Gefrierschnitte von der Fußsohle (24 Stunden alte Leiche). Färbung: Rongalitweiss 4 Minuten.²⁾ Antrocknen. Balsam (Fig. 22—25).

¹⁾ Um die Präparate besser montieren zu können, wurde die Verdauung des Inhaltes der Hornzellen hier nicht bis zur Vollendung getrieben, d. h. bis von der Hornschicht nur noch ein ganz zartes Netz von Hornbalken übrig blieb. Auf dem Bilde sind daher die Hornzellen nicht ausgehöhlt.

²⁾ Gefrierschnitte der relativ sauerstoffarmen Fußsohle kann man mit Vorteil 4 Minuten (statt 2) in der RW-Lösung lassen.

Fig. 22. Hornschicht vollständig ungefärbt. Die Stachelschicht zeigt ganz schwach bläulich gefärbte Zelleiber und etwas dunkler gefärbte Kerne, deren Färbung an Stärke von der Keimschicht (kei) an nach der Hornschicht zu beständig abnimmt. Die Kernkörperchen sind überall dunkler gefärbt als die Kerne und treten um so mehr hervor, je schwächer im oberen Teil der Stachelschicht (sta) die Färbung der Kerne wird. In der Körnerschicht, wo das Keratohyalin ganz unsichtbar ist und Kerne nur noch hier und da andeutungsweise zu sehen sind, beherrschen die Kernkörperchen als dunkelblau gefärbte Körper das Bild. Sie sind hier nicht mehr punktförmig rund, sondern vergrößert, entweder regelmässig oval oder von eigentümlicher, längerer, ganz unregelmässiger Gestalt, stab- oder spiessförmig in die Länge gezogen oder sichelförmig gebogen oder wie Kristalle vielzackig, sternförmig oder mit Ausläufern versehen, spiralg gedreht, genug, in jeder Weise verzerrt und verlagert.

Vergleicht man diese Kernkörperchen der Körnerschicht des RW-Bildes mit denen des einfachen Methylenblaubildes (siehe Fig. 23), so sieht man, dass auch dort dieselbe Veränderung der Kernkörperchen vorhanden ist, dass dieselbe aber nicht so deutlich hervortritt, weil daselbst die Keratohyalinkörner und die ganzen Zelleiber blau gefärbt sind. Diese ganze Veränderung der Kernkörperchen auf den RW-Bildern der Fußsohle mit ihrer einseitigen Verlängerung und Verzerrung der Kernkörperchen macht den Eindruck einer Art Explosion des Inhalts nach Beseitigung einer Membran, die den Inhalt des Kernkörperchens vorher kugelförmig zusammengehalten hat. Es ist das eine bisher, wie mir scheint, unbekannte Begleiterscheinung der Verhornung, und das sich ausdehnende und formlos werdende Kernkörperchen vertritt in der verhornenden Stachelzelle das letzte sauerstoffhaltige, mit RW sich blau färbende Element, während die übrigen Bestandteile der Körnerzelle, Spongioplasma, Membran und Keratohyalin alle lediglich Reduktionsorte und deshalb hier ungefärbt sind.

Die Cutis ist im RW-Bilde völlig ungefärbt wie die Hornschicht, und in ihr färben sich die Bindegewebszellen und Endothelien der Blutkapillaren sehr schwach, die Kerne etwas stärker.

Fassen wir die Hauptunterschiede der RW-Färbung (Fig. 22) und der Methylenblaufärbung (Fig. 23) kurz zu-

sammen.¹⁾ Bei ersterer haben wir eine vollständig farblose, bei letzterer eine bläuliche, streifenweise dunkler blau gefärbte Hornschicht. Bei ersterer ist die Cutis ungefärbt, bei letzterer stark und diffus blau gefärbt. Bei ersterer ist der epitheliale Zellenleib in der Stachelschicht, von der Keimschicht anfangend bis gegen die Hornschicht, immer schwächer gefärbt, bei letzterer oberhalb der schwarzblauen Keimschicht ziemlich gleichmässig dunkelblau. Bei ersterer fehlt die Keratohyalinfärbung vollständig, bei letzterer ist sie vorhanden, wenn auch zarter und schwächer als bei Hämäteine + Alaun-Färbung. Bei ersterer sind die Kerne des Bindegewebes schwach, bei letzterer stark gefärbt.

Hornschicht, Kollagen, Keratohyalin sind also Säureorte, aber keine Sauerstofforte. Die Kernkörperchen als hervorragende Sauerstofforte treten dagegen auf dem RW-Bilde besonders hervor. Die stärkste Färbung des Methylenblaubildes ist dort, wo Säureorte und (sekundäre) Sauerstofforte zusammenfallen, wie im Granoplasma der Epithelien der Stachelschicht und in deren Kernkörperchen.

Fig. 24. Derselbe Schnitt. Subcutis.

Das folgende Bild zeigt die Organe der Subcutis bei RW-Färbung.

Die Knäueldrüsenepithelien sind weniger stark gebläut als diejenigen des Knäuelganges (gg), aber dunkler blau gefärbt als die Epithelien der Stachelschicht, wie sie sich auch regelmässig stets zu allererst im Hautschnitt bei RW-Behandlung bläuen. Die Färbung haftet in den Knäueln gleichmässig an den Kernen und dem Granoplasma der Epithelien; auch hier treten die Kernkörperchen etwas tiefer blau gefärbt hervor. Als besonders kräftige Sauerstofforte kennzeichnen sich aber die in den Knäueln so häufigen, sauren Kerne (sk), nämlich durch ihre gleichmässig starke Blaufärbung. Auch das gefäss- und nervenführende Bindegewebe zwischen den Schlingen des Knäuels ist stets bläulich gefärbt, also reicher an lose gebundenem Sauerstoff als das

¹⁾ In der Herstellung dieser beiden Bilder ist der einzige Unterschied der Ersatz des Methylenblaus durch RW. Da die Fußsohlenschnitte ausnahmsweise einen Aufenthalt von 4 Minuten (statt 2) in der RW-Lösung vertrugen, wurde zur Herstellung des Präparates von Fig. 23 auch 4 Minuten in der Methylenblaulösung gefärbt, dann ebenfalls angetrocknet (ohne Alkoholpassage) und in Balsam eingeschlossen, wie bei dem RW-Präparate.

übrige Cutisgewebe und enthält eine Anzahl sehr stark blauviolett gefärbter Mastzellen (ma) mit hellen Kernen.

Ein ganz eigenartiges Bild gewährt das Fettgewebe mit seinen ungemein stark gefärbten Blutkapillaren, sauren Kernen und Lochkernen (lo). Die Fettläppchen fallen dadurch sehr in die Augen, ganz im Gegensatz zu den entsprechenden Stellen bei Methylenblaufärbung. Da diese ungemein starke Bläuung sich nur an mit RW gefärbten Gefrierschnitten findet, hängt sie vielleicht mit der Vereisung und Sprengung der Fettzellen zusammen, denn man findet an denselben Stellen nicht nur hohle, fettlose Räume, sondern darin auch immer stellenweise rot gefärbte, ätherlösliche Fettnadeln und -tropfen. Also kommt möglicherweise für die starke Bläuung die dabei frei werdende Ölsäure in Betracht, die auch sonst bei der Aktivierung und Übertragung von Luftsauerstoff eine Rolle spielt. Durch die starke Färbung der Endothelien und ihrer Kerne treten die Blutkapillaren (blc) der Fettläppchen strangartig hervor, und zwischen ihnen verteilt sind ovale und tetraëdrische Kerne des Fettgewebes und unter diesen eine grosse Anzahl von Lochkernen, alle von maximaler Blaufärbung.

Neben diesen Fettläppchen liegen weiter nach links eine Anzahl grosser Mastzellen zwischen Blutkapillaren, dann eine seitlich angeschnittene grössere Hautarterie, deren quergestreifte Muskelfasern (m) bis auf den stäbchenförmigen Kern ungefärbt sind, ebenso wie zwei kleine Nervenäste (n), die von oben und unten in die Muskelwandung einstrahlen. Der untere Ast ist von mehreren Mastzellen begleitet.

Ein etwas grösserer Nervenast (n) folgt im Bilde unten. Er ist ungefärbt und an seiner Schlängelung sofort zu erkennen, obwohl er farblos ist. Das ihn einhüllende Bindegewebe ist reich an blauviolett gefärbten Mastzellen. Den Abschluss des Bildes nach unten macht ein Venenquerschnitt (v), an dem wiederum die muskulösen Elemente farblos, die stäbchenförmigen Kerne leicht gebläut sind.

Vergleicht man mit diesem Bilde der Sauerstofforte der Subcutis dasjenige der Säureorte eines entsprechenden Methylenblaubildes,¹⁾ so finden wir hier statt der beschriebenen inter-

¹⁾ Dasselbe ist, als allgemein bekannt, hier fortgelassen.

essanten Einzelheiten eine vollständig gleichmässig starke Färbung der Kerne der Knäuel und Knäuelgänge, des intraglandulären und übrigen Cutisgewebes. Die Nerven, im Sauerstoffbild als helle, von blaufärbtem Bindegewebe und violetten Mastzellen begleitete Stränge hervortretend, sind im Methylenblaubilde gar nicht zu erkennen. Ebenso treten die Fettläppchen in diesen durch ihre Färbung nicht hervor, sondern vielmehr gegen das übrige Bindegewebe zurück. Also bestehen in der Subcutis ebensoviele charakteristische Unterschiede zwischen den blossen Sauerstofforten und den Säureorten wie im Epithel und Papillarkörper.

Fig. 25. Überblickt man, um eine Übersicht vom Sauerstoffstrom der ganzen Haut zu gewinnen, an der Hand der RW-Färbung das Übersichtsbild Fig. 25, so gewahrt man die Quellen des Sauerstoffs, an denen er in die Haut eintritt, an sämtlichen Blutkapillaren und daselbst auch die Zellelemente, welche ihn brauchbar zu machen, d. h. in aktivem Zustand abzuspalten imstande sind, die Mastzellen. Von hier diffundiert er in der Tiefe der Haut hauptsächlich zu den Knäueldrüsen (kn) und Knäuelgängen (gg), an der Oberfläche vor allem zum Deckepithel, wo er in den Keimzellen (kei) des Epithels durch deren Kerne wieder reaktiviert und weitergegeben wird, um einerseits in der Hornschicht (Hsch), andererseits im Kollagen der Cutis und im Fettgewebe (fe) ganz zu verschwinden, d. h. für RW nicht mehr nachweisbar zu sein. Hier wird er also nicht locker gespeichert, wie an den gebläuten Stellen, sondern an das reduzierende Eiweiss fest gebunden, d. i. verbrannt.

II. Kopfhaut.

Kopfhaut von der Leiche eines jungen Mannes. Fixierung der Sauerstofforte in $\text{NaCl} + \text{KClO}_3$. Nach 4 Tagen Gefrierschnitte. RW-Färbung.

Fig. 26 stellt eine mit RW gefärbte Talgdrüse der Kopfhaut dar, um zu zeigen, dass die pyknotischen, kleinen, geschrumpften und vom Talg komprimierten Kerne der Talgdrüsenmitte auffallenderweise stark blau werden, mithin noch viel Sauerstoff enthalten. Da an dieser Stelle von Kernteilung und Mitosenbildung keine Rede mehr ist, so geht aus diesem Bilde unzweifelhaft hervor, dass Sauerstoffaktivierung und Mitosen-

bildung zwei vollkommen unabhängige Kernfunktionen sind, die nur in den Keimschichten der Gewebe zusammenfallen. Die Sauerstoffaktivierung ist die allgemeinere, die Mitosenbildung die speziellere Funktion. Erstere bedingt letztere, besteht aber weiter auch dort, wo die übrigen Bedingungen für letztere aufgehoben sind, wie in der Talgdrüsenmitte. Sie knüpft sich offenbar noch an jeden Rest von Nuklein an.

Fig. 27 gibt eine Übersicht über die Sauerstoffverteilung im Papillenhaar. An der intensiven Färbung des ganzen epithelialen Bulbus (bu) sieht man, dass hier die bei weitem grösste Sauerstoffmenge angehäuft ist; am Halse des Bulbus nimmt die Färbung rasch ab, um im mittleren Teile der Haarwurzel auf einem Minimum zu verharren. Der hier stark pigmentierte Haarschaft selbst ist sauerstofffrei. Der Haarbalg ist nur schwach gebläut bis auf die Kernansammlung am Grunde des Haarbalges (ke). Diese geht in die ebenfalls äusserst kernreiche und stark gebläute Papille (pa) über, von der ein seitlicher Abschnitt im Bilde zu sehen ist.

Fig. 28. Dieser Schnitt ist durch 12stündige Behandlung mit 5proz. Salzsäure des grössten Teils seiner sauren Eiweisse beraubt und dann mit Methylenblau gefärbt, entspricht also dem ebenso behandelten Bilde 15 von der Fußsohlenhaut. Auch hier ist der ganze Schnitt nahezu farblos. Nur die Hornschicht und die Wurzelscheide sind tiefblau gefärbt. Die Stachelschicht der Haarbalge ist ebenso farblos wie in Fig. 15 die Stachelschicht des Deckepithels. Die Henlesche Wurzelscheide enthält mithin ebenso wie die Hornschicht einen in 5proz. Salzsäure unlöslichen, sauren Eiweisskörper. Sie ist auch, wie das nächste Manganbild zeigt, ein stark reduzierendes Gewebeelement und färbt sich auf RW-Bildern (Fig. 6 b bis 13 b) überhaupt nicht. Sie teilt mithin auch diese beiden Eigenschaften mit der Hornschicht der Oberfläche.

Durch diese spezifische Blaufärbung der mit 5proz. Salzsäure behandelten Hornschicht und Wurzelscheide zerfällt der Schnitt der Kopfhaut regelmässig in vier Zonen. Die oberflächlichste zeigt die Hornschicht als blaues Band und ihre Fortsetzungen nach unten in die Haarbalgtrichter. Darauf folgt eine farblose Zone mit den Quer- und Schrägschnitten der Haare in der Talgdrüsenregion ohne Hornschicht und Wurzelscheide.

Als dritte kommt dann die Region der ausgebildeten Wurzelscheide, die durch blaue Ringe um die Haarschnitte ausgezeichnet ist. Interessant ist dazwischen das Bild eines durchschnittenen Haarbeetes (hb). Hier färbt sich die Übergangsschicht zwischen Haarbeet und Beethaar blau, dieselbe Schicht, welche Kalpermanganat stark reduziert (Fig. 30). Sie tritt mithin an die Seite der Hornschicht und Wurzelscheide; allen drei Gebilden sind folgende drei Eigenschaften gemeinsam: sie reduzieren Kalpermanganat, färben sich nicht mit RW und färben sich nach Behandlung mit 5proz. Salzsäure mit Methylenblau in isolierter Weise blau.

Als vierte und unterste Schicht der Kopfhaut folgt dann schliesslich die Zone der Haarpapillen, in welcher wegen der Vorbehandlung mit 5proz. HCl natürlich auch keine Blaufärbung mehr vorhanden ist.

Fig. 29 a (Taf. X). Verschiedene Gewebelemente aus demselben Gefrierschnitt. 1proz. Kalpermanganat 2 Minuten, Alkohol, Öl, Balsam.

a) Querschnitt eines Papillenhaares in mittlerer Höhe. In der Mitte der schwach gelblich gefärbte Haarschaft mit etwas stärker reduzierendem Zentralteil. Davon durch eine Spalte getrennt die viel stärker reduzierende Wurzelscheide, deren innere Lage hier schwarzbraun ist, also am stärksten reduziert. Sie wird umgeben von der Stachelschicht des Haarbalges, etwa in der Höhe des Haarbeetes. Ebenso wie in der Stachelschicht der Oberfläche sind die Kerne (ke) als hellere Lücken ausgespart.

b) Ein Stück der anliegenden Talgdrüse mit dem dazu gehörigen Ansatz glatter Muskeln (m) (Arrector), die sehr viel stärker reduzieren als das umgebende, nur leicht gelblich gefärbte Bindegewebe. In den Talgdrüsenzellen ist nur das Spongio-plasma des Zelleibes gebräunt und tritt daher sehr gut hervor. von den Kernen ist die reduzierende Kerngrundlage als schwachbrauner Punkt sichtbar. Die Fettröpfchen der Talgdrüsenzellen (Gefrierschnitt!) reduzieren nicht. Durch die Verdünnung und den Schwund der spongioplastischen Septen werden die Talgdrüsenzellen nach dem Ausführungsgange zu immer heller.

c) Eine grosse subkutane Vene, deren braun gefärbte, gefaltete elastische Membran (el) viel stärker reduziert als die übrigen Gefässhäute.

d) Eine Knäueldrüse (kn) nebst Quer- und Schrägschnitten des dazu gehörigen Knäuelganges (gg). In letzterem färbt sich die Cuticula, welche das Lumen des Kanals auskleidet, stark braun, während die Gänge sonst, ebenso wie die Knäuel, nur in minimaler Weise reduzieren. Die Cuticula reduziert mithin Kalipermanganat genau so stark wie Osmiumsäure (Heynold). Die überaus schwache Färbung der Knäuel im Reduktionsbild steht wieder im schärfsten Kontrast zu der starken Färbung im RW-Bilde (Fig. 24 und 25).

e) Zum Vergleiche mit diesem gewöhnlichen Anblick der Knäueldrüsen in manganisierten Alkohol-Zelloidin-Schnitten folgt noch eine Knäueldrüse von der Fußsohle der Leiche eines jugendlichen Sudanesen. Die hier befindlichen Bilder der grossen Knäueldrüsen sind im Gegensatz zu jenen erhalten durch längere Behandlung der frisch hergestellten Gefrierschnitte mit 1proz. Kalipermanganat ($\frac{1}{2}$ —1 Stunde). Sie zeigen eine grobe, unregelmässige Körnung (kö), die der schwarzen Körnung der Knäuel entspricht, wie sie an Stücken von mit Flemmingscher Mischung fixierter Fußsohle auftritt. Sie ist wie jene an eine Fettsubstanz gebunden, die schon durch Alkohol ausgezogen wird. Die Beschreibung derselben wurde von mir schon vor einigen Jahren gegeben.¹⁾

Bei der hierzu notwendigen starken Manganisierung treten in den tief gebräunten Gängen (gg) die Kerne als helle Kreise sehr schön hervor. Dieses Bild der Knäuelgänge ist der beste Beweis, dass der Kontrast zwischen der starken Reduktionswirkung des Zellprotoplasmas und der minimalen der Zellkerne durchaus nicht etwa einer ungenügenden Manganwirkung zuzuschreiben ist, sondern auch bei stärkster Manganwirkung unverändert bestehen bleibt.

Fig. 30. Gefrierschnitt durch die Kopfhaut der Leiche eines älteren Mannes. 1proz. Kalipermanganat 2 Minuten, Alkohol, Öl, Balsam. Dieser Längsschnitt durch das proliferierende untere Ende eines Beethaares der Kopfhaut zeigt, dass in diesem Epithelgebilde die Übergangsschicht (ue) zwischen der Stachelschicht des Haarbeetes und dem Beethaare

¹⁾ Siehe Golodetz und Unna: Zur Chemie der Haut. III. Das Reduktionsvermögen der histologischen Elemente der Haut. Monatshefte f. Prakt. Derm. 1909, Bd. 48, S. 165.

ausserordentlich stark reduziert. Es ist das der Grund, weshalb bei den meisten Färbungen des Beethaars diese Zone so schwach gefärbt und oft kaum erkennbar ist und einer der Gründe für die Annahme, dass dem Beethaar kein selbständiges Wachstum aus der Stachelschicht des Haares heraus zukomme. Das Manganbild gibt nun besser als die meisten Färbungen den Strahlenkranz verhornter Einzelzellen wieder, durch den das Beethaar mit dem Haarbeet aufs innigste verwachsen ist. Das Haarbeet hat auch nach unten einige Zellfortsätze abgesandt und ist durchsetzt mit hellen Kernen (ke), wie die Stachelschicht des Deckepithels (Fig. 17). Rechts ist ein grösserer, links ein kleiner Abschnitt der Talgdrüse (ta) zu sehen. Das feine Spongioplasma der Talgdrüsen reduziert ebenso wie das Plastrin des zentralen Kernrestes; während das eingeschlossene Fett (es handelt sich um einen Gefrierschnitt) Kalipermanganat nicht reduziert.

III. Schnauzen von Ratten und Mäusen.

Die grossen Tasthaare der Ratten sind gute Objekte für das Studium der Reduktions- und Sauerstofforte des Haares.

Fig. 31 gibt das Manganbild eines mittleren Haarabschnittes wieder. Hier ist der stärkst reduzierende Teil die Wurzelscheide(wu): sie reduziert mehr als die Stachelschicht des Haarbalges und als das Haar selbst. In dem nur schwach gelb gefärbten Blutsinus (si) rechts erkennt man, dass das Stroma der roten Blutkörperchen (blu), wo sie in grösserer Menge angehäuft sind, sich deutlich braun färbt. Bekanntlich ist das Stroma der Erythrozyten sehr zart und auf dünnen Blutaussstrichen tritt seine Reduktionskraft nur undeutlich hervor. Anders auf dicken Schnitten oder nach stärkerer Antrocknung oder nach vorheriger Formalinfixierung, bei der das zarte Stroma gehärtet, wasserärmer wird und deswegen das MnO_2 besser speichert. Dabei ist zu bemerken, dass die Formalinfixierung wohl die Sauerstofforte schädigt, aber die Reduktionskraft des Gewebes im allgemeinen nicht erhöht, z. B. weder eine stärkere Reduktion des Kollagens noch der Kerne bedingt.

Fig. 32 zeigt den Schrägschnitt eines solchen Haares als Manganbild in der Höhe der Papille (pa). Diese hat sich durch den Schnitt etwas aus der Umhüllung der leicht pigmentierten Keimschicht (kei) des Haares gelöst, letztere ist braun gefärbt mit helleren Kernen; die sonst immer so stark gefärbte Papille

dagegen ist hier ganz blass, von vielen hellen Kernen durchsetzt. Sie besitzt nur ein Minimum von Reduktionskraft. Das Maximum derselben finden wir teils in der Wurzelscheide (wu), von der oben ein Halbring in schrägem Abschnitt erscheint, teils in den aussen der Haarbalgscheide anliegenden Muskelquerschnitten (m). Das Kollagen der Cutis und der Haarbalgscheide ist nur leicht bräunlich gefärbt.

Fig. 33 bestätigt das Gesagte. Die stärksten Reduktionsorte sind einerseits die kleinen glatten Muskeln (m), die nahe der Oberhaut der Rattenlippe verlaufen, andererseits eine kompakte Ansammlung roter Blutkörperchen (blu) im Blutsinus am oberen Ende eines Tasthaares.

Fig. 34 endlich gibt eine Übersicht über das Reduktionsvermögen des gesamten Tasthaares und seiner Umgebung an einem wohlge gelungenen mittleren Längsschnitt. Die stärkste Braunfärbung herrscht in der Stachelschicht (sta) des Haarbalges und den seitlich rechts am Haarbalg quer- und längsgetroffenen Muskeln (m). Etwas schwächer, aber immer noch sehr erheblich reduziert der Hauptnervenzweig (n) des Tasthaares, welcher als dickes Kabel unten in dasselbe eintritt und sich alsbald gabelförmig in mehrere Äste spaltet, die das Haar umfassend aufwärts steigen. Etwas schwächer gebräunt erscheinen die feineren Nervenfasern, welche im obersten Abschnitt des Blutsinus den Hals des Haares halsbandartig (h) umfassen. Von etwa gleicher Reduktionskraft ist das kompakte kollagene Gewebe des Haarbalges (ha). Das Bild ist eine gute Illustration der alles überragenden Reduktionskraft von epithelialer Stachelschicht und Muskulatur sowie des auch noch beträchtlichen, aber schwächeren Reduktionsvermögens der nervösen Achsenzylinder.

Fig. 35 und 36. Während zwischen Muskel und Nerv nur ein gradweiser Unterschied des Sauerstoffbedürfnisses besteht, bilden Muskel und Knorpel in dieser Beziehung geradezu reinste Gegensätze. Die folgenden beiden Bilder sind Nachbarschnitte durch das Nasendach der Mäuseschnauze.

Fig. 35, Taf. IX. Auf einen blauen Epithelsaum (ep) und den mit blauen Kernen durchsetzten Bindegewebsstreifen folgt im RW-Bild die geradezu schwarzblaue Knorpellamelle. Am Rande der Knorpelschwarte (kn), wo einzelne Knorpelzellen sichtbar werden, zeigt sich bei stärkerer Vergrößerung, dass die helleren Kreise, die

beim Auf- und Abstellen der Schraube aufleuchten, dem Protoplasma der Knorpelzellen angehören, während die Knorpelgrundsubstanz überall dunkelblau, die Kerne meistens nur schwachblau, oft gar nicht gefärbt sind. Die Grundsubstanz ist also im Bereich des Knorpels ein konstanter und maximaler sekundärer Sauerstoffort, während der Sauerstoffgehalt der Kerne und des Protoplasmas gering und variabel ist. Wie das saure Granoplasma in den Plasmazellen (siehe Fig. 4) den Kernen permanent Sauerstoff entzieht, so ebenfalls die sehr saure Grundsubstanz des Knorpels den Knorpelkernen und -zellen. Auf die Knorpelspange folgen nun in farblosem Bindegewebe die hellblauen Quer- und Längsschnitte der Muskeln (m) und tief dunkelviolette Mastzellen (ma). Letztere sind auf dem folgenden Manganschnitte (Fig. 36, Taf. X) überhaupt unsichtbar. Die Kerne der Muskeln sind dunkelblau gefärbt und ihre Anzahl in den hier vorkommenden Muskeln ist sehr bedeutend; Kernreichtum und bläuliche Färbung der Muskeln pflegen Hand in Hand zu gehen. Das Deckepithel (dp) ist hellblau gefärbt. Die Nerven (n), die auf dem Manganbild (Fig. 36) deutlich als hellbraune Kabel hervortreten, sind auf dem RW-Bild gar nicht zu sehen. Man gewahrt sie höchstens bei stärkerer Abblendung, wenn man den Hauptzügen der tiefgefärbten Mastzellen nachgeht, da diese die Nervenstämmе regelmässig begleiten.

Fig. 36, Taf. X. Die Nasenhöhle wird hier auf dem Manganbild von einem hellbräunlichen Epithelsaum (ep) begrenzt, an den zunächst ein hellerer Bindegewebsstreifen grenzt, der zugleich das Perichondrium der nun folgenden schmalen Knorpellamelle (kno) bildet. Diese ist nahezu ungefärbt, man sieht nur die Konturen der Knorpelkapseln hellbräunlich angedeutet. Wiederum durch ein gelblich gefärbtes Perichondrium getrennt, folgt darauf in krassem Gegensatz eine Schicht dunkelbraun gefärbter glatter Muskelfasern (m), an die sich Quer- und Längsschnitte von kleineren Muskelbündeln, Nervenstämmen (n), kleineren Tasthaaren (t) und Lanugohärchen in buntem Durcheinander bis zur Grenze des Deckepithels (dp) anschliessen, die die Cutis dicht mit mehr gelblichem oder mehr bräunlichem Inhalt erfüllen. Innerhalb dieses stark reduzierenden Inhaltes der Nasenhaut bildet die nahezu farblose Knorpelspange die einzige Ausnahme; sie zeigt nahezu kein Sauerstoffbedürfnis.

Alles in allem; im RW-Bild schwach gefärbte Muskeln und maximal gefärbter Knorpel, im Manganbild kaum gefärbter Knorpel und maximal gefärbte Muskeln; hier wie dort Muskeln starke Reduktionsorte, Knorpel starker Sauerstoffort.

Sehr häufig sind es die Sauerstofforte, welche zugleich an Methylenblaupräparaten als Säureorte ersten Ranges die stärkste Blaufärbung aufweisen; so die Sauerstofforte der Mastzellen und des Knorpels (vergl. vorige Abbildung Fig. 35). Diese Regel bildet aber kein Gesetz. Wie wir oben bereits bei der Hornschicht der Fußsohle sahen (Fig. 22 und 25), kommt es vor, dass Methylenblau aufnehmende saure Gewebe die RW-Färbung vollkommen abweisen. Auch von der (Henleschen) Wurzelscheide sahen wir (Fig. 6b bis 13b), dass dieselbe sich mit RW als ganz oder nahezu unfärbbar erweist. Da es sich in jenen Bildern aber um Vergiftungen der Haut handelt, so erscheint es nicht überflüssig, an dieser Stelle noch einmal bei stärkerer Vergrößerung die vollständig normale und frische Wurzelscheide auf Gefrierschnitten sowohl mit Methylenblau als auch mit RW gefärbt zu zeigen, um den krassen Unterschied beider Färbungen an einem leicht zugänglichen Material zu demonstrieren.

Fig. 37, Taf. IX. Gefrierschnitt. Methylenblau. Antrocknen. Balsam. Die tief dunkelblauen Henleschen Zellen (he) umgeben den schwach gefärbten Haarschaft mit zwei längsovalen, sich in der Mitte kreuzenden, ringförmigen Schrägschnitten. Der vor dem Haarabschnitt liegende ist schwarzblau, der dahinter liegende Ring ist schwächer blau gefärbt. Im oberen Teil des Bildes decken sich beide, im unteren fallen sie soweit auseinander, dass man die einzelnen Hornplättchen der Henleschen Scheide gut unterscheiden kann, die bekanntlich nur teilweise zusammenhängen und Lücken zwischen sich lassen. Die Wurzelscheidenringe grenzen innen an Oberhäutchenzellen, aussen an die Stachelschicht des Haarbalges (früher sog. „äussere Wurzelscheide“), und diese ist wiederum umgeben von einem Teil des Haarbalges, dessen Kerne sämtlich gebläut sind.

Fig. 38, Taf. XI. Ein ähnlicher Schrägschnitt eines Tasthaares aus einem benachbarten Schnitt der Rattenlippe, mit RW gefärbt. Der Haarschaft im Zentrum ist hier ganz ungefärbt; die Stachelschicht (sta), von der oben und unten ein Teil gezeichnet ist, hat eine hellblaue Färbung mit dunkleren Kernen und zwischen beide

schiebt sich eine ganz blassbläuliche Schicht von palisadenartigen, nahezu ungefärbten Henleschen Zellen (he), deren Kerne nur etwas stärker gebläut sind. Der tinktorielle Gegensatz zu der schwarzblauen Henleschen Scheide des Methylenblaubildes ist frappant. Sehr häufig ist die Henlesche Lage durch absolute Farblosigkeit ganz unsichtbar und nur bei Abblendung aufzufinden.

Es ergibt sich aus diesem Kontrast, dass die starke Färbung, welche die Henlesche Scheide mit vielen basischen Farben gibt, nicht auf einen Sauerstoffgehalt, sondern nur auf einen Säuregehalt zurückzuführen ist. Sie enthält stark saure Eiweisse, die zugleich stark reduzierend sind (vgl. ihre dunkelbraune Färbung auf dem Manganbilde (Fig. 29 a und Fig. 31. Taf. X).

Die nächsten zwei Ausschnitte aus den Tasthaaren der Ratte bei stärkerer Vergrößerung sollen zeigen, wie verschieden das Absterben der Gewebe einerseits auf die Säureorte, andererseits auf die Sauerstofforte wirkt.

Fig. 39, Taf. XI, stellt einen mittleren Teil des Schnittes einer Rattenlippe dar, welcher 4 Tage in der feuchten Kammer verweilte und dann mit Methylenblau gefärbt wurde. Er geht quer durch das Tasthaar und zeigt im allgemeinen eine abnorm diffuse, starke Färbung. Das Haarmark (hm) im ungefärbten Haarschaft ist blau, ein kleines Stück der Henleschen Wurzelscheide (he) am unteren Rande schwarzblau gefärbt. Die Stachel-schicht (sta) des Haarbalges zeigt eine diffuse dunkelblaue Färbung mit noch dunklerblauen Kernen. Das Bindegewebe, welches die Blutsinus (si) durchsetzt, erscheint grünlichblau mit dunkelblauen Kernen und enthält einzelne dunkelviolette Mastzellen (ma). Es folgt nach aussen die auffallend dunkelblau gefärbte Haarbalgscheide (Ha) und links anliegend ein paar grünblaue Muskeln (m) mit blauen Kernen und violetten Mastzellen.

Das Absterben in der feuchten Kammer schwächt also im Laufe von 4 Tagen die Methylenblaufärbung durchaus nicht ab; im Gegenteil, der Schnitt färbt sich — offenbar durch postmortale Säuerung — dunkler und nebenbei diffuser als normal.

Fig. 40. Ganz im Gegensatz dazu sind nach 4 tägigem Aufenthalt in der feuchten Kammer, wie die Färbung mit RW zeigt, alle Sauerstofforte des Haarbalges, die primären der Kerne des Epithels und Bindegewebes sowie die der Mastzellen im Haar-

balge und die sekundären des Zellprotoplasmas, des Bindegewebes und der Muskelsubstanz vollständig ausgelöscht. Nur in einigen Mastzellen (ma) aussen am Haarbalge hat sich noch etwas Sauerstoff und damit etwas RW-Bläuung inmitten der übermächtigen postmortalen Reduktion erhalten.

IV. Kaninchenlunge und -niere, Menschenniere.

Die Lunge des Kaninchens eignet sich besser als die der Ratten, Mäuse und Hunde dazu, den lehrreichen Gegensatz zwischen Bronchial- und Alveolarsystem einerseits, zwischen diesem und dem Pulmonalvenensystem andererseits hervortreten zu lassen, der naturgemäss in der Sauerstoffbindung dieser Systeme besteht. Ein Vergleich der folgenden beiden Gefrierschnitte von der frischen Lunge des Kaninchens, von denen der erste mit RW, der zweite mit Kalipermanganat behandelt wurde, zeigt diese Gegensätze in frappanter Weise.

Fig. 41. Auf dem RW-Bilde tritt die Hälfte eines querdurchschnittenen Bronchiolus (br) durch seine dunkelblaue Färbung auffallend hervor. Nicht nur sind alle Kerne der Epithelien dunkelblau, sondern auch ihr Protoplasma. Der untere Rand des Bronchiolus ist emporgehoben durch einen tiefblau gefärbten, von Kernen strotzenden Lymphfollikel (fo), der im Zentrum etwas Kohlepigment birgt. Zu diesen Sauerstofforten des Bronchialsystems gesellen sich noch, wie andere Schnitte zeigen, in der Schleimhaut der kleineren und grösseren Bronchien tief blau gefärbte Schleimdrüsen und Knorpelplatten. Die Atemluft befindet sich also im Bronchialsystem noch wie zu Hause, wie in der freien Natur mitten in einem Überfluss von Sauerstoff, und verliert daher ihren Sauerstoff nicht früher als bis sie in das Alveolargebiet gelangt. Ich vermute, dass auf diesem ausnahmsweise grossen Sauerstoffreichtum der gesamten Bronchialschleimhaut die bisher noch unerklärte Lebensfähigkeit der überlebenden Flimmerzellen dieses Tractus beruht.

Das Alveolargewebe (alv) birgt im Gegensatz hierzu nur in den Kernen der Alveolarepithelien und Kapillarendothelien einen beschränkten Vorrat von locker gebundenem Sauerstoff. Das kollagene und elastische Gewebe der Septen und Alveolenwände und das Zellprotoplasma sämtlicher Zellen ist ungefärbt.

Noch blasser, d. h. sauerstoffärmer als das eigentliche Lungengewebe ist die Wandung der durch den Schnitt getroffenen grossen

Pulmonalvene (pul); hier sind nur die Kerne der Endothelien und glatten Muskeln der Media ganz schwach blau gefärbt, dagegen alles Kollagen, Elastin und die Muskulatur ungefärbt.

Fig. 42 stellt einen Nachbarschnitt durch dieselbe Kaninchenvene dar, mit Kalipermanganat gefärbt. Man übersieht mit einem Blicke, dass hier dieselbe gegensätzliche Reihenfolge: Bronchial-, Alveolar- und Pulmonalvenengewebe besteht, aber in umgekehrter Richtung. Den stärksten Reduktionsort bildet der Venenquerschnitt, besonders dessen Muskulatur und elastische Lamelle. Schwächer reduzierend und demgemäss schwächer gebräunt ist das Alveolargewebe (alv.); auch hier bildet das Elastin den Hauptreduktionsort; Kerne sind natürlich gar nicht sichtbar. Den schwächsten Reduktionsort stellt die ganz zart gebräunte Bronchialschleimhaut (br) dar mit dem ebenfalls ganz blassen Lymphfollikel (fo). Überall sind auch hier die Kerne ungefärbt und daher unsichtbar.

Spricht man in Ehrlichschem Sinne von einem Sauerstoffbedürfnis der Gewebe, so lehrt ein Blick auf diese beiden Schnitte, dass in der Lunge das Sauerstoffbedürfnis im Bronchialbaum noch nicht existiert, sondern erst im Alveolargewebe beginnt und in der Pulmonalvene gipfelt. Die physiologische Richtung des Sauerstoffstroms in der Lunge von der Luftröhre über die Lungenalveole bis zum Lungenvenenblut hat also als bleibende physiologische Grundlage: das wachsende Reduktionsvermögen der betreffenden drei Gewebsabschnitte.

Ein ebenso interessanter physiologischer Gegensatz in der Verteilung des locker gebundenen Sauerstoffs wie in der Lunge findet sich auch in der Niere. Auch hier treten die Erscheinungen am übersichtlichsten und deutlichsten an der Niere des Kaninchens hervor, dessen Gewebe — im Vergleich mit den Nagetieren und Fleischfressern — einen geringeren Reichtum und Überfluss an Kernsauerstoff besitzen.

Die folgenden beiden Schnitte stammen von einer 24 Stunden im Kochsalz + Kalichlorat-Gemisch aufbewahrten Kaninchenniere.

Fig. 43. Ein mit RW gefärbtes Übersichtsbild. Blau treten nur die Glomeruli (gl), die geraden Harnkanäle (gr) (Schleifen) und einige Gefässästchen hervor und zwar sind in allen diesen Teilen nur die Kerne gefärbt. Ungebläut und daher nur ganz

schwach gelblich gefärbt sind die alle Zwischenräume ausfüllenden Quer- und Schrägschnitte der gewundenen Harnkanälchen (gw). Nicht in allen Nierenschnitten von Kaninchen stellen sich die gewundenen Kanäle so absolut frei von lockerem Sauerstoff dar. Meistens sind die äusseren Abschnitte der Nierenepithelien wenigstens bläulich und deren Kerne etwas dunkler gefärbt, so dass nur die inneren Abschnitte der Epithelien, welche das Lumen begrenzen, eine farblose oder leicht gelbliche, glitzernde, zuweilen zu grösseren Schollen zusammenfliessende Masse ausmachen. Bei Nagetieren und Fleischfressern sind sogar häufig die gewundenen und geraden Harnkanälchen unterschiedslos so gefärbt wie hier die Henleschen Schleifen, mit dem einzigen Unterschiede, dass auch dann noch die Kerne der gewundenen Harnkanäle blasser blau sind als die der geraden. Wo aber bei der RW-Färbung der Nierenschnitte ein Unterschied zwischen Sauerstofforten und Reduktionsorten hervortritt, sind stets die gewundenen Harnkanälchen der Sitz eines mehr oder minder ausgedehnten Reduktionsbildes, die geraden Harnkanäle, die Henleschen Schleifen und die Nierenpapille dagegen der Sitz eines Sauerstoffortes von grossem Umfang und grosser Konstanz. Anatomisch ist diese Differenz begründet in dem Vorwiegen grosser, stark reduzierender Protoplasamassen in den gewundenen Harnkanälchen (vgl. Fig. 44, 45, 46) einerseits und dem Zurücktreten der Protoplasamassen hinter einem grossen Kernreichtum in den geraden Harnkanälen und der Nierenpapille andererseits. Eine weitere physiologische Folge ist das Vorkommen von freiem Sauerstoff in dem aus der Nierenpapille austretenden Harn, der bei Tieren von P. Ehrlich, beim Menschen von Stammler nachgewiesen wurde.

Fig. 44. Ein Stück eines benachbarten Nierenschnittes derselben Kaninchenniere mit Kalipermanganat behandelt. Wie dort die Glomeruli (gl) den dunkelsten Teil des Bildes darstellen, so hier den hellsten; den hellen gewundenen Harnkanälen (gw) dort entsprechen hier dunkelbraune, deren starke Reduktionskraft nur an den hier und da als hellere Kreise durchschimmernden Kernen eine Grenze findet. Die an der linken Seite der Figur vertikal herabziehenden, parallelen, geraden Harnkanäle (Schleifen) (gr) sind etwas weniger stark gebräunt und nur ganz schwach gelblich sind die vier Glomeruli, in denen die Kerne als noch hellere

Flecken sichtbar sind. Sie sitzen wie die Früchte auf dem Stiel auf den kelchartig sich verbreiternden Enden je eines gewundenen Harnkanälchens, die im Gegensatz zum Glomerulus die dunkelbraune Farbe der Reduktion tragen.

Es war eigentlich nicht meine Absicht, die Sauerstofforte der Niere vom Menschen zu beschreiben, da man nur selten in der Lage ist, von menschlichen Leichen ganz frische und normale Nieren zu erhalten. Auch die hier abgebildeten Teile der menschlichen Niere sind möglicherweise nicht ganz normal. Aber sie sind sehr instruktiv zur Veranschaulichung des histologischen Baues des Glomerulus und zwar sowohl die Sauerstoff- wie die Reduktionsbilder. Ein jeder weiss, dass in den Hohlraum des Glomerulus der Fundus eines gewundenen Harnkanälchens hineinreicht und hier von dem arteriellen Wunderknäuel des Glomerulus zu einer flachen Haube eingestülpt wird, etwa wie wir einen Gummiballon mit der Faust zu einer halben Hohlkugel eindrücken können. Aber von diesen mechanisch hochinteressanten Bildern bekommt man bekanntlich an den in gewöhnlicher Weise gefärbten Präparaten, besonders an den mit einfachen Kernfärbungen versehenen, nur selten etwas Befriedigendes zu sehen; meist scheint der Glomerulus isoliert in seiner Höhle zu liegen. Der Grund ist klar, die flachgedrückten Epithelien des Harnkanälchens unterscheiden sich bei blossen Kernfärbungen tinktoriell zu wenig von den platten Endothelien der Glomeruluskapillaren. Das Manganbild ist aber eine Plasmafärbung, genauer gesagt erstens eine Spongioplasmafärbung und sodann eine Färbung aller hinzutretenden reduzierenden Eiweisse. Daher fällt beim Glomerulus nicht bloss, wie Fig. 44 zeigt, die störende, alles gleichmachende Kernfärbung fort, sondern es schliesst sich an die helle, schwach gelbliche Spongioplasmafärbung der Glomeruluskapillaren in voller Kontiguität, scharf abgesetzt die tiefbraune Färbung des stark reduzierenden gewundenen Harnkanälchens. Man kann die Verlötung dieser, verschiedenen Keimblättern angehörenden, Plasmastrukturen mithin sehr deutlich demonstrieren, wenn man nur von den üblichen Kernfärbungen absieht. Diese Verdeutlichung der Glomerulusstruktur ist der Grund, weshalb ich den Bildern der Kaninchenniere noch solche aus der Menscheniere folgen lasse. Das bei menschlichem Leichenmaterial fast unvermeidliche postmortale Oedem hat zur Folge, dass die ge-

nannten Zusammenhänge noch besser isoliert hervortreten, wenn man nur für eine starke Manganfärbung sorgt.

Fig. 45. Gefrierschnitt aus der Nierenrinde einer menschlichen Leiche. 1 proz. Kalipermanganat, 5 Minuten.

Die gewundenen Harnkanäle (gw) treten als tiefbraune Abschnitte, die Glomeruli (gl) als helle Körper hervor; doch nicht völlig hell, denn punkt- und streifenweise sind braune Stellen eingesprengt. Stärkere Vergrößerung zeigt, dass es sich dabei überall und nur um rote Blutkörperchen (blu) in den Kapillaren handelt. Ausserdem tritt in äusserst schwacher Gelbfärbung an diesen Glomeruli eine äussere homogene Grenzmembran (gm) hervor. Während Glomerulus a und b sehr schön die Verlötung des Glomerulus mit einem gewundenen Harnkanälchen zeigen, lässt sich an Glomerulus c der Übergang des anderen Glomerulus-Poles in zwei Blutkapillaren demonstrieren. Hier wird der Übergang wiederum durch reduzierende Elemente vermittelt, nämlich durch die in beiden Teilen enthaltenen roten Blutkörperchen; ohne den Gehalt an solchen würde der direkte Übergang minder klar sein.

Fig. 46, Taf. XII. Wie die Fig. 43 von der Kaninchenniere zeigt, gibt die RW-Färbung der Niere eine schöne und auffallende Kontrastfärbung zwischen Glomerulus und gewundenen Harnkanälchen. Besonders wenn in letzterem die Kernfärbung ganz fehlt, zeigen die Epithelien eine hell waschledergelbe Färbung, welche sehr scharf von den stets blau gefärbten Kernen der Glomeruluskapillaren absticht. Stellt man nun an einem solchen mit RW gefärbten Schnitt der menschlichen Niere diejenigen (blauen) Glomeruli ein, welche an einer Seite der inneren Wand eine gelbliche Masse aufweisen und untersucht mit stärkerer Vergrößerung, so erblickt man ebenfalls das erwünschte Bild der Einstülpung der zwei Keimblätter in grösster Deutlichkeit, dieses Mal trotz der blauen Kernfärbung deswegen, weil dieselbe gerade an der Lötstelle der Keimblätter, nämlich in den gewundenen Harnkanälchen, in diesen Fällen fehlt; während in Fig. 44 und 45 daselbst ein Kontrast zwischen hellgelbem Glomerulus und dunkelbraunem Harnkanälchen besteht, so hier zwischen blauem Glomerulus und hellgelbem Harnkanälchen. Bei diesen RW-Präparaten erscheint daher der Glomerulus an zwei sich ganz oder annähernd diametral gegenüberstehenden

Polen angeheftet; an einer Seite an einem zwei Blutkapillaren bergenden, blau gefärbten Stiel (st) (Fig. 46 a, b, c, d), an der anderen an eine gelbgefärbte Platte (pl), welche die Gestalt eines Trichters (Fig. 46 c, e), eines flachen Hügels oder eines dicken kurzen Zylinders (Fig. 46 a, b, f) besitzt, der manchmal spiralig etwas gedreht ist (Fig. 46 a, f). Man sieht, dass dieselbe aus einzelnen epithelartig angeordneten Zellen besteht, deren Kerne schlecht oder gar nicht gefärbt sind. Diese Epithelien lassen sich an der Wand der Glomerulushöhle oder auf der Oberfläche der Glomeruluskapillaren in einzelnen Exemplaren vermöge ihrer gelblichen Farbe noch weiter verfolgen (Fig. 46 e).

Dieser lehrreiche Kontrast von gelbgefärbten Epithelien einerseits und Endothelien mit blauem Kern andererseits in einer Glomerulushöhle fehlt natürlich dort, wo die gewundenen Harnkanäle etwas mehr Sauerstoff enthalten und demgemäss aus blassblauem Zelleib und blauen Kernen bestehen; er ist mithin auch nicht überall im Schnitte vorhanden. Die hier gezeichneten sechs Glomeruli fanden sich jedoch in einem einzigen Schnitte und es wäre eine leichte Mühe gewesen, in ihm die doppelte Anzahl aufzufinden.

Es wird sich empfehlen, in der Histologie des Menschen und der Tiere überall dort, wo Gewebzusammenhänge bei blossen Kernfärbungen nicht sofort deutlich hervortreten, eine Kalpermanganat- und RW-Färbung versuchsweise zu Hilfe zu nehmen.

V. Kleinhirn und Rückenmark des Kalbes.

Fig. 47. Zwei quergeschnittene Falten von einem Kleinhirn, welches frisch vereist, geschnitten und mit RW gefärbt wurde. In beiden ist die zentrale Zone des aus markhaltigen Nerven bestehenden Markes (mrk) nahezu ungefärbt. Sie wird zunächst umgeben von der dunkelblauen, aus kleinen Ganglien bestehenden Körnerschicht (Kör). Zwischen dieser und der äusseren hellblauen Schicht des Rindengraus (rg) schiebt sich eine ununterbrochene Reihe dunkelblau gefärbter grosser Ganglien ein. Es sind die Purkinjeschen Zellen (pu). Die Zonen der markhaltigen Nerven (mrk) und Ganglien kontrastieren also bei der RW-Färbung lebhaft, es sind die Reduktionsorte und Sauerstofforte des Zentralnervensystems.

Fig. 48. Ein Stück von der Grenze der grauen Rinde und der Körnerschicht von demselben Präparate bei stärkerer Ver-

grösserung. Die Purkinjeschen Ganglien (pu) zeigen ein schwarzblaues, viel Sauerstoff enthaltendes Kernkörperchen, einen relativ wenig Sauerstoff enthaltenden, heller blau gefärbten Kern und eine dichte Erfüllung des Zelleibes mit sauerstoffreichem Granoplasma, den Nissl-Körpern dieser Ganglien. Hingegen sind die angrenzenden Kerne (ke) der gangliösen Körnerzone blau gefärbt ohne Hervortreten eines noch dunkler gefärbten Kernkörperchens und Zelleibes, ebenso etwa wie die Kerne der rechts liegenden Blutkapillaren (blu). Die primären Sauerstofforte dieser Kerne sind eben nicht durch anliegende sekundäre Sauerstoffreservoirs (grosse Kernkörperchen, Granoplasma) desoxydiert. Die wenigen mittelgrossen Ganglien (mg) zeigen wiederum einen hellblauen Kern zwischen dunkelblauem Kernkörperchen und einem Saum von dunkelblauem Granoplasma.

Fig. 49. Bei noch stärkerer Vergrösserung: eine Purkinjesche Zelle, zwei mittelgrosse Ganglien, mehrere kleine Ganglien aus der Körnerschicht und ein Endothelkern an demselben Präparat. Die Ganglien der Körnerschicht (ke) zeigen bei dieser hohen Vergrösserung einen ganz feinen peripheren Saum von sauerstoffhaltigem Granoplasma, das grosse Kernkörperchen der Purkinjeschen Zelle eine Teilung in eine dunkelblaue Randpartie (Nuklein), eine hellere Grundsubstanz und ein schwarzblaues Zentrum (Globulin).

Fig. 50. Ganglien aus dem Vorderhorn des Kalbsrückemarks. 24 Stunden auf Eis. Gefrierschnitt, RW-Färbung. Die Ganglien und ihre Ausläufer zeigen ein tiefblau gefärbtes Granoplasma in Streifenform eingelagert (Nisslkörper), einen helleren Kern und schwarzblau gefärbtes Kernkörperchen. Wo das Granoplasma in ihnen aufhört, entziehen sich die an und für sich stark reduzierenden Ausläufer dem Nachweis durch die RW-Färbung. Die Glia ist hell oder leicht bläulich gefärbt. Ihre Kerne sind blau, ebenso die der Blutkapillaren (blu).

VI. Hühnerblut.

Fig. 51. Ein gutes Paradigma für den Gegensatz von Plasma und Kern in bezug auf Speicherung des lose gebundenen Sauerstoffs bildet das kernhaltige Vogelblut. Bei dem mit RW behandelten Hühnerblut tritt allein der ovale Kern blau gefärbt hervor. Das Plasma bleibt völlig ungefärbt bis auf einen äusserst

feinen Randsaum, der sich, mehr oder weniger deutlich, etwas blau gefärbt zeigt.

Fig. 52. Dasselbe Hühnerblut, mit Kali hypermanganicum behandelt. Das Plasma ist mässig stark gebräunt im Gegensatz zu dem wesentlich helleren, nur leicht gelblich gefärbten Kern. In demselben ist die reduzierende Grundlage des Kernkörperchens manchmal als stärker gefärbter Punkt angedeutet.

VII. Gonokokken.

Fig. 53. Der gonorrhoeische Eiter möge schliesslich als einfachstes Beispiel dienen, um zu erläutern, wie wichtig sich die RW-Methode auch für das Verständnis pathologischer Vorgänge erweist. Fig. 53 zeigt das allbekannte Bild des Trippereiters bei der Methylenblaufärbung. Die Kerne der polymorphkernigen Leukozyten sind dunkelblau gefärbt, dunkler als die Kerne der Lymphozyten. Noch dunkler, geradezu schwarzblau erscheinen die Gonokokken (gon), sowohl die intra- wie extrazellulären. Dieses bekannte Säurebild des gonorrhoeischen Eiters lehrt, dass die Gonokokken stark sauer sind und dass sie nicht im mindesten unter dem Einflusse der Leukozyten leiden, wie es häufig dargestellt worden, sondern dass im Gegenteil die Leukozytenleiber allmählich zerfallen, während die Gonokokken ihre Tingibilität behalten. Man sieht also keine „Phagozytose“, sondern Phagokokken, welche die Leukozyten erst chemotaktisch anlocken und dann zerstören.

Fig. 54. Wie sehr die Gonokokken in diesem Kampfe Sieger sind, zeigt jedes RW-Bild des gonorrhoeischen Eiters. Während auf diesem die Gonokokken sich ebenso schwarzblau färben wie auf dem Methylenblaubild, sind die Kerne hier ganz blassblau und die Leukozytenleiber nahezu ungefärbt. Zwischen Leukozyten und Gonokokken besteht mithin der fundamentale Unterschied, dass erstere wohl ihr saures Eiweiss behalten, bis sie auseinanderfallen, ihren Sauerstoff aber völlig verloren haben, während die Gonokokken sowohl ihr saures Eiweiss wie ihren Sauerstoff bewahren. Nur das RW-Bild, nicht das Methylenblaubild, gibt daher ein richtiges biologisches Bild des gonorrhoeischen Eiters und lässt niemand darüber in Zweifel, dass die Gonokokken ihrer Umgebung nicht bloss Eiweiss, sondern vor allem Sauerstoff entziehen. Das Sauerstoffbild der Gonokokken ergänzt

daher in lehrreicher Weise die Anschauung, die man sich bereits nach den Méthylenblaubildern gebildet hatte, dass bei der Gonorrhoe die Phagozytose keine Rolle spielt.

Anhang.¹⁾

F. W. Oelze²⁾ denkt über diesen Punkt anders. Er glaubt, dass seine „primäre Sauerstoffärbung“ oder „Einschlussfärbung“ von mir nicht beobachtet sei. Unter einer solchen versteht er die rasch auftauchende und allmählich wieder verschwindende Bläuung eines Schnittes, den man in unverdünnte RW-Lösung gebracht hat, in dieser selbst. Dieses Phänomen sieht natürlich ein jeder, der einige Schnitte in RW genau beobachtet, und wohl jeder wird bei einigem Nachdenken auch die Bedeutungslosigkeit dieser ephemeren und gänzlich belanglosen Erscheinung richtig erkennen.

Sowie der Chemiker vom Ende einer Titration nicht dann spricht, wenn der einfallende Tropfen sich färbt, sondern erst, wenn die ganze Flüssigkeit nach gehörigem Ausgleich den gewünschten Farbumschlag zeigt, so wird hier kein erfahrener Histologe sich mit dem Färbungsergebnis der zufälligen ersten Kontaktwirkung zwischen Schnitt und Flüssigkeit begnügen, sondern warten, bis sich das erstrebte Gleichgewicht zwischen Oxydations- und Reduktionsbestreben hergestellt hat, d. h. in vorliegendem Falle, bis der Überschuss des Rongalits im RW den Einfluss des mit dem Schnitt in die Lösung gebrachten Luftsauerstoffs überwunden hat.

Der Leser wird das Phänomen, auf welches Oelze Gewicht legt, sehr einfach aus der Beschreibung eines Schnittes von unserem Paradigma, nämlich dem Gefrierschnitt der Mäuseschnauze, beurteilen lernen. Lässt man einen solchen auf dem Objektträger antrocknen, bedeckt ihn mit einem Tropfen Rongalitweiss und bringt ihn unter das Mikroskop, so bleibt er grösstenteils ungefärbt, nur treten hier und da ganz unregelmässige leichte, diffuse Bläuungen auf, und innerhalb dieser Bezirke färbt sich

¹⁾ Zu Seite 102, Zeile 4 von unten.

²⁾ F. W. Oelze: Über die färberische Darstellung der Reduktionsorte und Oxydationsorte in Geweben und Zellen. Arch. f. mikrosk. Anat. 1914, Bd. 84, Abt. I, S. 113.

auch die Lösung bläulich. Bald darauf färben sich in demselben Bezirk die Mastzellen dunkler. Diese Färbungen haben einen ganz unregelmässigen und zufälligen Charakter und hängen offensichtlich von vielerlei physikalischen Bedingungen, wie Lücken im Gewebe, Zutritt der Luft, ab. Klarer wird die Art der Färbung, sowie wir ein Deckglas auflegen. Denn dann werden an mit eingeschlossenen grösseren Luftblasen regelmässig folgende Erscheinungen sichtbar. An dem Rande jeder Luftblase bildet sich ein Ring von Methylenblaulösung, und dieser färbt den anliegenden Gewebsteil, wo es auch sei, sofort dunkelblau und die Mastzellen darin dunkelviolett. Liegt die Luftblase z. B. der Hornschicht an, so färbt sich die angrenzende Epithel- und Cutischicht diffus blau mit dunkleren Kernen und Mastzellen. An der Oberfläche jeder Luftblase ist nämlich das Gleichgewicht gestört, der Sauerstoff hat die Oberhand über das Rongalit gewonnen, es entsteht an dieser Stelle Methylenblau, und der Schnitt wird im Ganzen scheckig blau gefärbt durch den Wechsel von RW- und Methylenblaupartien.

Wieder anders ist das Phänomen, wenn wir die RW-Lösung stark mit Wasser verdünnen und dadurch das Gleichgewicht zuungunsten des Rongalits verändern, da eine höhere Konzentration des Rongalits für die RW-Färbung sehr viel notwendiger ist als eine solche des Methylenblaus. Dann können wir, bei einer Verdünnung von etwa 1 : 20, auch ohne dass Luftblasen eingeschlossen sind, in dem ungefärbten Schnitte allmählich die stärksten Sauerstofforte, nämlich die Mastzellen, allerdings nur grünlichblau, hervortreten sehen, aber die schwächeren Sauerstofforte nicht, da deren Bläuung durch den Überschuss von Rongalit verhindert wird. So entgeht uns z. B. die Färbung der meisten Kerne.

Zwischen diesen Extremen schwanken nun die Bilder je nach dem Grade der Verdünnung der RW-Lösung; einerseits sind es ganz unzuverlässige, lokalisierte starke Bläuungen unter Mitwirkung von sich bildender Methylenblaulösung, andererseits allgemeine, aber abgeschwächte und beschränkte Färbungen mit RW. Die letzteren lassen sich noch nachträglich meistens in gute RW-Färbungen verwandeln, wenn die Schnitte gut ausgespült und der Luft exponiert werden.

Zwei Fehlerquellen also sind es, welche der Oelzeschen Methode anhaften, erstens die Unmöglichkeit, eine Mitwirkung von

Methylenblaufärbung sicher auszuschliessen, da der Schnitt — auch ohne sichtbare Luftblasen — immer viel Luft in den kleinen RW-Tropfen hineinbringt, und sodann die sichere und bleibende Verschleierung aller schwächeren Sauerstofforte. Nur die letztere Fehlerquelle lässt sich einigermaßen vermeiden durch genügend starke Verdünnung der RW-Lösung mit Wasser, und so haben wir, wo es nicht anders ging, auch von dieser „modifizierten Oelzeschen“ Methode bereits lange vor ihm einen ausgedehnten Gebrauch gemacht.

Golodetz¹⁾ sagte schon vor 2 Jahren hierüber: „Neben dieser konzentrierten RW-Lösung wird in gewissen Fällen eine auf das zwanzigfache verdünnte Lösung gebraucht. Letztere wird dann gebraucht, wenn die Verhältnisse ein nachträgliches Auswaschen des Objektes zur Entfernung des Rongalits nicht gestatten. Man verlässt sich darauf, dass bei dieser Verdünnung des RW die Oxydation des Leukomethylenblaus schon durch sehr geringe Mengen Substanz bewirkt werden kann.“ So bei der Untersuchung von unlöslichen Mitteln, Fetten, Harzen etc.

Da wir nicht annehmen konnten, dass jemand aus einer für uns fehlerhaften Technik eine eigene Methode machen würde, begnügten wir uns mit dem mehrfach stark betonten Hinweis, dass die Schnitte unter ausgiebiger Bewegung rasch und gut ausgespült werden müssten.²⁾ Denn mit einer solchen Ausspülung sind ja auf einmal beide Fehlerquellen des Oelzeschen Verfahrens beseitigt.

Diese Idee von Oelze, man könne die Sauerstofforte bereits in meiner unverdünnten RW-Lösung studieren, ist nur

¹⁾ Unna und Golodetz: Die Bedeutung des Sauerstoffs in der Färberei. Derm. Stud. Bd. 22, 1912, S. 34. Leop. Voss, Hamburg und Leipzig.

²⁾ Z. B. in meiner ersten Arbeit S. 11: „Bringt man 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 Gewebelemente, welche eine Oxydation bewirken können.“ S. 39: „Die Schnitte kommen dann in ein Schälchen mit Wasser, wo sie vorsichtig, aber ziemlich schnell hin und her bewegt werden müssen, um das Rongalitweiss rasch abzuspülen und die Bläuung zu ermöglichen. Am zweckmässigsten bringt man sie dabei durch mehrere Schälchen mit Wasser.“ (Unna: „Die Reduktionsorte und Sauerstofforte des tierischen Gewebes.“ Arch. f. mikrosk. Anat. 1911, Bd. 78, Waldeyer-Festschr.).

eine unter vielen unhaltbaren Annahmen, welche er in obiger Arbeit und einem weiteren Artikel („Die Histologie der Oxydations- und Reduktionsorte“) in der Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technik (Bd. 31, S. 43—50) niedergelegt hat. Ein detailliertes Eingehen auf diese Arbeiten kann ich mir ersparen, da Oelze fast alle Punkte, welche er bemängelt oder missversteht, bei einem vorurteilslosen Studium der unten aufgeführten Arbeiten, die alle schon 1911, 1912 und 1913, also vor Oelzes erster Arbeit (1914) erschienen sind, richtiger aufzufassen hätte lernen können.

Eine Reihe solcher, zum Teil unbegreiflicher Fehlschlüsse und Missdeutungen werden übrigens von Golodetz in der Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie richtiggestellt.

Literaturverzeichnis.

- Unna: Die Reduktionsorte und Sauerstofforte des tierischen Gewebes. Arch. f. mikrosk. Anat. 1911, Bd. 78, Festschr. Waldeyer.
- Unna und Golodetz: Zur Chemie der Haut. IX. Die Verteilung des Sauerstoffs und der Sauerstoff-Fermente in der Haut. Derm. Wochenschr. 1912, Nr. 1 und 2.
- Unna: Die Darstellung der Sauerstofforte im tierischen Gewebe. Mediz. Klin. 1912, Nr. 23.
- Derselbe: Tatsachen über die Reduktionsorte und Sauerstofforte des tierischen Gewebes. Berl. klin. Wochenschr. 1913, Nr. 13. (Vortrag Berl. physiol. Ges., 24. Jan. 1913.)
- Derselbe: Chemiker und Biologe. Berl. klin. Wochenschr. 1913, Nr. 17. (Nach einem Dialog der Diskuss. zum vorigen 24. Jan. 1913.)
- Derselbe: Zur Chemie der Zelle. I. Granoplasma. II. Kernkörperchen. III. Die sauren Kerne. Berl. klin. Wochenschr. 1913, Nr. 18—20.
- Derselbe: Chemie der Zelle. Akademischer Vortrag 1913, Festschr. Eppendorf. Leop. Voss, Hamburg und Leipzig 1914.
- Derselbe: Brief an den Herausgeber. Zeitschr. f. wiss. Mikrosk. 1915.
- Oelze, F. W.: Über die färberische Darstellung der Reduktionsorte und Oxydationsorte in Geweben und Zellen. Arch. f. mikrosk. Anat. 1914, Bd. 84, Abt. I, S. 91.
- Derselbe: Die Histologie der Oxydations- und Reduktionsorte. Zeitschr. f. wissensch. Mikroskopie 1914, Bd. 31, S. 43—50.
- Schneider, H.: Über die Unnaschen Methoden zur Feststellung von Sauerstoff- und Reduktionsorten und ihre Anwendung auf pflanzliche Objekte. Benzidin als Reagens auf Verholzung. Zeitschr. f. wiss. Mikrosk. und mikr. Techn. 1914, Bd. 31, Heft 1, S. 51.
- Golodetz: Die Darstellung der Reduktionsorte und Sauerstofforte der Gewebe. Eine Antwort an F. W. Oelze. Zeitschr. f. wissensch. Mikrosk. 1915.

Fußsohlenhaut

Fig. 14

Methylenblaubild

Fig. 15

5% HCl, Methylenblau

Fig. 18

Haemateinbild

Fig. 19

5% HCl, Haematein

Fig. 16

5% HCl, Manganbild

Fig. 17

Manganbild

Fig. 20

25% HCl, Haematein

Fig. 21

25% HCl, Manganbild

Fig. 29

Kopfhaut, Manganbild

Fig. 30

Kopfhaut, Manganbild

Fig. 33

Rattenlippe, Manganbild

Fig. 34

100

Fig. 36

Mausnase, Manganbild

Fig. 31

Rattenlippe, Manganbild

Fig. 32

Fig. 48

Fig. 49

Rote Blutkörperchen, Huhn

Fig. 51

Fig. 50

Kleinhirn, Kalb, RW

Gonokokken, Mensch

Fig. 47