

Histologisch-färbetechnische Erfahrungen im allgemeinen,  
und speziell über die Möglichkeit einer morphologischen  
Darstellung der Zell-Narkose (vitale Färbung).

Von

**Heinrich Zangger.**

---

Wenn unserm Auge in irgend einem unserer Arbeitsgebiete etwas auffällt, fühlen wir in uns das Bedürfnis, es zu deuten: Mit dem Auge entdecken wir die meisten Differenzen in der Aussenwelt, und das Auge ist es immer, das uns vieles wieder identifizieren hilft. (Wenn das mit einem andern Sinn geschieht, so fällt das der Seltenheit wegen geradezu auf.)

Auch in unserer Wissenschaft gab das Gesehene vor allem immer den Anstoss, die betr. Erscheinung zu fassen und in anderer Richtung zu deuten, Parallelen aufzufinden, kurz, sie zu definieren.

Es war also naheliegend, die Möglichkeiten zu sehen und damit die Erscheinungen zu zergliedern, zu vermehren, und wo sich ein Mittel bot, ist es für diese Zwecke angewandt worden.

Seit der Erfindung des zusammengesetzten Mikroskopes (Hans & Zach. Jansen, 1608) und dessen Verbesserungen (Beobachtungen bei durchfallendem Licht nach Tortona 1685 mit dem Beleuchtungsspiegel: Hertel 1715, mit achromatischen Linsen: Chester Moor Hall 1732, theoretisch erklärt durch Euler 1771 und Einführung der Immersion-Systeme durch Amici 1827) ist das mikroskopische Bild, die äusserliche morphologische Identifizierung,

---

Aeussere Umstände verlangten eine sehr schnelle Drucklegung dieser Arbeit. So habe ich die wichtigen Beziehungen, die das hier gesammelte That-sachenmaterial zusammen mit noch vorliegendem über Farben, zu den Untersuchungen über Lösungen (van t'Hoff, Werner, Nernst) und speziell über die Suspensionen und Colloide (Hardy, van Bemelen, Posternak) hat, nicht mehr berücksichtigen können.

Hauptthema der Naturwissenschaften geworden. Der architektonische Aufbau aus den mikroskopischen Bildern wurde lange nur in der Vorstellung vorgenommen; erst durch die Injektion der Gefässe wurde eine Methode gegeben, die einen klaren Einblick in den gröbern und feinern Aufbau der Gewebe erlaubte, besonders durch die Verfeinerungen der Methode durch Gerlach; denn erst später wurde die Rekonstruktion durch das Modellierverfahren allgemein eingeführt.

Die seit langem bekannten Hilfsmittel zur Verdeutlichung des histologischen Bildes sind die Säuren (Essigsäure), die Laugen, und auch früh wurde das Glycerin eingeführt. Alle diese Medien bedingen klarere Bilder, indem sie die Brechung verändern und weniger durch die Lösung einzelner opaker Zellbestandteile. Die optische Seite der Beobachtungstechnik wurde ausser der Verfeinerung der Linsen vervollkommenet durch Veränderung der Lichtkonzentration (Blenden & Abbe-Apparat) und durch Modifikation der Lichtarten, durch Nicol-Systeme und Verwendung von monochromatischem und spektralem Licht, und ausserdem durch das sicherere Sehen mit der photographischen Platte.

Alle die erwähnten neuen Methoden und Verbesserungen haben ihren grössten Wert für die Beobachtung vollständig unveränderter speziell lebender Teile, und die zu beobachten ist ja das Hauptproblem.

Nun hat man aber (seit 1865, Gerlach) chemische Differenzen der einzelnen Bestandteile der toten Zelle zur Verdeutlichung der Struktur zu Hilfe genommen, indem man gefärbte und färbende Substanzen einwirken liess und nachher erst beobachtete. Mit diesen Methoden sah man, wie eigentlich früher schon, in der Zelle Protoplasma und Kern, nur etwas deutlicher als ohne die Färbung, aber die Färbung deutete darauf hin, dass diese beiden auch verschiedene Elemente seien in chemischer Hinsicht, ohne dass man jedoch besonderes Gewicht darauf legte. Was uns die Färbungen erst aufdeckten, sind besonders die Karyokinese (Flemming), und zum Teil die Bakterien.

Zellunterschiede typischer Art zeigte die Färbung nicht; was wir der Färbung verdanken, sind die Vorstellungen der Zellstruktur, die wir heute haben, und einige noch sehr dürftige Anhaltspunkte für chemische Unterschiede. Um die Stellung und

den Wert der Färbemethoden zu charakterisieren, muss man übersehen, was in den einzelnen Punkten geschieht, daraus werden sich die verschiedenen Möglichkeiten zweckmässiger Verwendung ergeben, sowie die Grenzen ihrer Leistungsfähigkeit.

Wir untersuchten abgetötete, gebeizte und gefärbte Zellen:

1. Die abgetötete Zelle, d. h. etwas anderes als was lebt (die Unterschiede zwischen der lebenden und abgetöteten Zelle und die dadurch sich zeigenden Gesichtspunkte am Schlusse der Arbeit).

2. Wir färben die tote Zelle

a) direkt mit dem Farbstoff (substantiv),

b) oder mit Vermittlung von Beizen (adjektiv).

Bei beiden Methoden verwenden wir als Farben solche Stoffe, die neben dem gefärbten Kern (Chromogen) andere, aggressive Gruppen haben (Auxochrome), die das Chromogen auf den Zellen und Fasern binden. Der färbende Kern kann deshalb je nach dem Charakter der Seitengruppen ganz verschiedene Funktionen bekommen für die histologische Färbetechnik.

Mit und ohne Beize bedingt bei den bis heute in der histologischen Färbetechnik angewandten Farbstoffe meist die Basicität, resp. Acidität des sich färbenden Teiles die Grundlage der Bindung, zum Teil allerdings auch die physikalische Dichtigkeit etc. Das Zustandekommen dieser Bindung und zum Teil auch deren Echtheit ist abhängig von den relativen Löslichkeiten der färbenden Stoffe, deren Diffusions- und Filtrationsvermögen, und der Wechselwirkungen der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Farbstoffe und des zu färbenden Gewebes.

Inwiefern diese Vorgänge von in unsern Händen liegenden Umständen abhängen, möchte ich in dieser Arbeit zeigen. Ich gebe also nicht viel morphologische Untersuchungsergebnisse und theoretische Erörterungen noch Vergleiche mit der Färbetechnik im allgemeinen (das alles soll in einer späteren Arbeit folgen), sondern ich suche die komplizierten Vorgänge in ihre Komponenten zu zerlegen und weise darauf hin, worin diese bedingt sind und wie sie modifiziert werden können, und wie neue Modifikationen aufgebaut werden können. Es liegt in der Natur der Sache, dass ich längst bekannte Momente gebe neben solchen, die bis heute nicht beachtet wurden, oder die doch nicht prinzipiell beachtet

wurden, alles was ich gebe, hat sich mir bei den Versuchen in der verschiedensten Weise aufgedrängt. Als Beispiele nehme ich gewöhnlich die Belege aus bekannten Methoden neben solchen, die mir nach meinen Versuchen besonders sicher praktische Resultate versprochen. Der praktische Gesichtspunkt, d. h. die Darstellung morphologischer Differenzen trat in den Vordergrund gegenüber den rein chemischen Zielen, die mich anfangs leiteten.

Seit Frühjahr 1896 beschäftigte ich mich fast ununterbrochen mit dem Problem der Verdeutlichung der Struktur der lebenden und toten Zelle. Die Hauptzeit wurde verwandt auf die differentielle Darstellung durch Färbung verschiedener Teile der abgetöteten, resp. fixierten Zelle. In verschiedenen Zeiten ging ich nach verschiedenen Plänen vor, je nach der früheren Erfahrung und nach dem Zweck.

### Die substantive Färbung.

Im allgemeinen fragt man in der Histologie wie in der Technik wenig nach dem chemischen Vorgang, sondern man fragt nur, ob die Methode klar elektiv und echt färbt. Mit diesem Masstab gemessen konnten substantive, differentielle Färbungen im Vergleich zu den angewandten nur schlechtere Resultate geben, denn die substantive Färbung beruht auf der vorhandenen schwachen chemischen Differenz der Farbe und der verschiedenen Teile des Zelleibes, während fast bei allen gebräuchlichen Methoden Verstärkung dieser Differenzen in Anwendung kommt, z. B. bei allen Hämatoxylinen durch sog. Beizen. Die Folgen sind:

1. Die substantiven Färbungen sind fast alle wenig echt infolge der relativ schwachen chemischen Bindung.

2. Sind die Reaktionen mit substantiven Färbungen nicht so leicht zu erhalten wie mit Beizen; sie sind, bis man die Methode sicher beherrscht, in jeder Beziehung bei der abgetöteten Zelle auffällig unzuverlässig und inkonstant bei differentiellem Färben.

Die Gründe liegen in der Kompliziertheit der vorhergehenden Vorgänge wie der Färbung:

1. In der Abtötung und Fixierung. Um die chemische Konstitution des Plasmas nicht zu verändern, dürfen wir nur mit wasserentziehenden und eiweissausfällenden Mitteln fixieren, die keine aktiven Gruppen haben, z. B. Alkohol; neben Alkohol genügt die

Fixierung durch Hitze diesen Forderungen, aber nicht die Wirkung von Säuren und Salzen. Nun ist aber allgemein bekannt, dass je nach der Schnelligkeit des Wasserentzuges und damit der Koagulation der Eiweisstoffe das Endresultat ein sehr verschiedenes ist, weil dadurch die Dichtigkeit des zu färbenden Substrates verändert wird, und zwar gehen Ausfällung und Wasserentziehung nicht parallel, da die Ausfällung sehr früh eintritt. Ist das Eiweiss sehr fein ausgefallen und entziehen wir nachher sehr stark und lange das Wasser, so wird alles so dicht — und zwar alle Zellteile fast gleichmässig dicht, — dass die Farbstoffe schwer darin überall hin diffundieren, vor allem aber schwer wieder zu entfernen sind aus den Teilen, wo sie nicht chemisch gebunden sind. Differenziert man mit einem Mittel, zu dem der Farbstoff hohe Löslichkeitstension hat, so reisst das auch den leicht chemisch gebundenen Farbstoff wieder heraus: wir können also nicht differenzieren. Diese rein physikalischen Verhältnisse werden im allgemeinen viel zu wenig betont, resp. man glaubt nicht daran, von der Vorstellung beherrscht, dass chem. Bindungen im allgemeinen gegen physikalische Einwirkungen resistent seien; nur gerade bei den Eiweisskörpern kann man leicht auf andere Möglichkeiten aufmerksam werden; z. B. erhitzt man ein Blutpräparat auf 120—130°, so bekommen wir mit Triazidlösung die verschiedenen eosino-, neutro- und basophilen-Körner. Erhitzt man höher, auf 150—200°, so hat man plötzlich viel mehr Körner mit rotem Ton; chemische Veränderungen des Eiweisses sind ja denkbar, aber sehr unwahrscheinlich, weil die Veränderung nicht mit einem bestimmten Wärmegrad stärker zunimmt, sondern das geht alles successive, eben wie die Entfernung von Wasser, allerdings event. durch Abspaltung aus dem Molekül. Ein anderes ähnliches Beispiel ist das Methylgrün; es gilt als ein spezifischer Nukleinfarbstoff, d. h. mit chemischer Affinität, und doch reisst Alkohol alles heraus. Aehnliche Erfahrungen macht man sehr oft und machen alle Histologen, aber statt sie zu registrieren und zu erklären, nannte man die Farben unecht und vergass den Misserfolg. Dass die physikalischen Einwirkungen auch die morphologischen Resultate verändern können, zeigt sich auch bei der Darstellung der Nissl-Körper. Nimmt man zuerst ganz dünnen Alkohol, so bekommt man anders geformte, kleinere Schollen, als wenn man direkt 96 % Alkohol nimmt.

2. Sind die unter einem bestimmten Namen im Handel zu findenden Farbstoffe oft nicht identisch, manchmal verunreinigt und sehr oft absichtlich mit andern Substanzen gemischt, besonders mit Anilin- oder Metallsalzen, Dextrin und Stärke. Nun machte man aber gerade die Erfahrung, dass diese unreinen Farbstoffe konstantere und echtere Resultate gaben als die reinen Farbstoffe. So wurden die meisten chemisch reinen Farbstoffe in der histologischen Technik nach und nach verdrängt, ohne dass man sich dieses Faktum merkte, und zum Teil auch, ohne dass es zur allgemeinen Kenntnis kam und ohne dass man auch danach gefragt hätte. Die Hauptsache war eben nicht der Vorgang, sondern ein zweckentsprechendes Resultat, d. h. eine dauerhafte, klare Färbung mit einfachster Methode.

Auf diese Art wurde für die Klärung des chemischen Prozesses immer weniger Aussicht; es wurde auch kein Material gesammelt, mir selbst wurde noch von wohlmeinender Seite abgeraten: man erreiche auf diesem Gebiete nichts, es sei zu kompliziert, habe keine Zukunft, weil die Resultate mit reinen Farben nicht so gut wie bei den Beizfärbungen und die Methoden unsicherer seien. Das war ein Grund warum ich mich speziell mit den Beizfarbstoffen beschäftigte.

Die Resultate meiner substantiven Färbung lassen sich zusammenfassen:

1. Die Härtung ist nur mit Alkohol und Hitze möglich. Man muss auf die verschiedensten Arten härten; die einzelnen Organe sind nicht gleich empfindlich. Formol- und Salzlösungen sind den indifferenten Härtungsmitteln am nächsten, aber doch nicht vollständig (chemisch) indifferent.

2. Absolut gute Resultate mit einfachen Methoden geben Farbgemische von einem sauren und einem basischen Farbstoff, z. B. Methylenblau und Eosin (Laurent und Rosin). Man bringt die beiden Farben im allgemeinen in dem Verhältnis ihrer Molekulargewichte oder ihrer Vielfachen zusammen, je nachdem bei der betr. Kombination eine ein- resp. zweibasige oder ein- oder zweisäurige Verbindung entstehen soll (Methylenblau-Eosin durch Grübler zu bekommen). Die chemische Verbindung der Farbstoffe lässt man am besten in erwärmter Lösung vor sich gehen, und wo diese Temperatur nicht genügt, kann man die Farben zusammenschmelzen.

Nach diesen Grundsätzen kann man ausser diesen Verbindungen blosse Gemische darstellen von einem sauren und einem basischen Farbstoff, aber auch Kombinationen mit sauren und sauren, und basischen und basischen Farbstoffen geben different gefärbte Bilder. Es ist nun sehr auffällig, dass durch Gemische von Farben gleichen chemischen Charakters, wenn sie nur verschieden gefärbt und verschiedene chemische Konstitution haben und in der Stärke des chemischen Charakters sich nicht zu nahe stehen, differente Färbungen von Kern und Protoplasma zu bekommen sind, d. h. also bei dem wenig ausgesprochenen Charakter der Eiweisskörper kann das saure Kerngerüst ganz wohl auch als Base wirken, wie auch das im allgemeinen saure Farbstoffe aufnehmende Plasma basophil erscheinen kann; aber das sind relative Begriffe. Im allgemeinen nehmen bei diesen Gemischen die Kerne den dunkeln, das Plasma den hellen Farbstoff auf; nur bei Farbgemischen, wo der hellere Farbstoff basisch und der dunkle sauer, färben sich die Kerne mit dem hellern Farbstoff, z. B. Anilingelb im Ueberschuss mit wenig dunkeln Sulfofarbstoff (Pappenheim). Bei Färbungen mit Gemischen von Farbstoffen gleichen chemischen Charakters sind ausser der Verschiedenheit der Farbe und der chemischen Konstitution noch folgende Momente zu beachten: Konzentration und Lösungsmittel, d. h. die relative Konzentration der einzelnen Farben, ferner die Zeit und die Temperatur der Einwirkung, eventuell bei successivem Färben noch die Reihenfolge. Diese Variablen müssen für jeden Härtingsgrad und jedes Organ durch kurze Interpolationsversuche festgestellt werden. Die Methode ist am einfachsten folgende: Man wählt sich erstens Farben, die ziemlich schnell ziehen, zweitens stellt man das Gemisch dar aus zwei Stammlösungen, indem man in die erfahrungsgemäss weniger stark färbende Farbe die andere successive zugiesst und versuchsweise färbt, bei diesen Versuchen ergibt sich zugleich auch die beste Dauer der Einwirkung. Die Temperatur ist bei kurzer Einwirkungszeit, wenn der Unterschied nicht über 15° ist, fast ohne Einfluss. Diese Art der Farbgemischdarstellung ist nach der van Giesonschen Methode zum Teil bekannt, nur muss man im allgemeinen noch berücksichtigen, dass, wenn man die Stammlösung in verschiedenen Lösungsmitteln hat, eventuell eine sehr starke Veränderung der relativen Konzentration eines Farbstoffes eintreten kann.

Je geringer die Unterschiede in den Farben, desto schwieriger und subtiler ist die Behandlung. Bei den sulfosauren Farbstoffen ist eine Färbung von Kern und Plasma mit differenten Farben im allgemeinen nicht möglich (nur noch etwa mit Isodiphenyl-Schwarz R. [Geigy Basel] und Säurerubin oder Setopalin). Hingegen sind bei andern Kernfärbungen diese Gemische sehr gut zu verwenden, für Differentfärbung von Plasma und Fibrillen. Bei Sulfofarben scheint die Elektion abhängig von der Farbe und der Molekulargrösse. Der hellere Farbstoff bleibt in dem Protoplasma, der dunklere (meist grossmolekulare) im Kern. So geht ferner beim schnellen 10—15 Minuten langen Färben in einer Mischung von Wasserblau oder Wasserviolett und Säurerubin das Säurerubin in die dichtere membrana propria, während alles Andere blau gefärbt ist. Bei epithelialen Teilen geht das Blau etwas mehr auf die Epithelien, das Rubin auf das faserige Bindegewebe. Giebt man diesem Gemische noch Pikrinsäure hinzu, so kann man bei Hämatoxylin-Vorfärbung zugleich differenzieren, analog van Gieson. Aber alle diese Färbungen sind, wie auch van Gieson, unecht, wenig haltbar, auch bei Einschluss in indifferente Mittel, wie Cedernöl<sup>1)</sup>. Bei successivem Färben ist im allgemeinen besser, die dunkle Farbe zuerst einwirken zu lassen. Neben den Beziehungen des freien Farbstoffes zu den verschiedenen Zellteilen, die durch ihren chemischen Charakter, ihre Nüance, resp. die sie begründende Konstitution bedingt sind, ist zu beachten, dass wir es fast ausnahmslos mit Farbsalzen zu thun haben, die gespalten werden müssen, sei es durch die Gruppen der Zellbestandteile, sei es durch besondere Zusätze (in der Färbetechnik findet sich diese Notwendigkeit jeweils angegeben: im sauren Bade, im Seifenbade etc.). Wir haben es oft also in den Händen, den Farbstoff auch in der Lösung noch zu beeinflussen:

1. Indem wir durch Zusatz von Säuren oder Alkalien das freie färbende Prinzip aus den Salzen frei machen; in den meisten Fällen ist diese Farbe viel schwerer löslich im Lösungsmittel und erreicht also bald die Sättigungs-Konzentration, d. h. eine grössere

---

<sup>1)</sup> Diese Methoden können auch auf mit Formalin fixierte Schnitte angewandt werden. Die Farbenkonzentrationen dürfen hier etwas höher sein als bei Alkoholfixierung. Man kann so die Reaktionszeit abkürzen.



physikalisch-chemische Löslichkeitstension gegen alle andern sie physikalisch aufnehmenden Elemente, z. B. also das fixierte Plasma, die Faser (vergl. die Methode von Willebrand). Es giebt aber auch Farbstoffe, die als Salze direkt aufgenommen werden; besonders wichtig sind für die histologische Färbetechnik die Farbstoffe, wo der saure und der basische Anteil der Verbindung verschiedenartige Farbstoffe sind (sog. Neutral-Farbstoffe). Schon um nicht nutzlose Farbniederschläge zu erzeugen, setzt man nur kleine Quantitäten Säuren, resp. Alkalien, zu, besonders in der histologischen Technik, wo man so minimale Farbstoffmengen braucht. (Eine Aenderung der Reaktion genügt zur Aenderung der färbenden Eigenschaften.) Auf alle Fälle darf man nie mehr zusetzen als was das salzbildende Element in den Farbsalzen zu binden vermag, denn der Zusatz hat ja die chemische Eigenschaft des Farbstoffes, nur stärker ausgeprägt, darum entzieht er ihm den salzbildenden Teil; ist er im Ueberschuss, so wird er dem Farbstoff zum Teil gleichartig wirken und keine vollständige Färbung zu stande kommen lassen, weil er zu denselben Gruppen wie der Farbstoff Affinität hat (analog den freien Beizen, wie Fischer feststellte). Bei kleinem Zusatz kommt diese Wirkung nicht zur Geltung, da das stärkere Element ihn sättigt. Die meisten bis heute in der Histologie eingeführten Farbstoffe sind so beschaffen, dass auch ohne freimachende Zusätze die chemische Eigenschaft des Gewebes allein genügt, den Farbstoff frei zu machen und zu binden.

2. Wir können die Sättigungskonzentration steigern durch Zusatz von neutralen Salzen, und damit die Löslichkeitstension gegen die Substrate erhöhen.

(Schwebefällung, Zusatz der Seife bei der Nissl-Methode hat auch besonders diese Funktion, denn weiterer Zusatz bedingt Ausfällung.)

3. Die Löslichkeit des freien Farbstoffes können wir natürlich auch beeinflussen durch Zusatz von Lösungsmitteln. Nehmen wir als bekanntes Beispiel das Nigrosin (spirituslöslich). Würden wir aus irgend einer wasserlöslichen Nigrosinverbindung das Nigrosin frei machen, so würde es direkt ausfallen und höchstens spurweise färben; geben wir aber nur einige Tropfen Alkohol zu, so löst es sich, und die färbenden Eigenschaften können erst wirken, oder umgekehrt kann man durch Spuren Zusatz von Wasser zu

einem Farbstoff, der z. B. in gesättigter Lösung von 50% Alkohol verwendet wird und nur spirituslöslich ist, die Schnelligkeit der Färbung beschleunigen. Ebenso wirkt das Nachspülen mit Wasser bei Bakterienfärbung mit alkohollöslichen Farben.

4. Wenig systematisch verwendet ist die Eigenschaft der Farbstoffe, ihre Löslichkeitstension bei verschiedenen Temperaturen sehr zu verändern. Die Mehrzahl der Farbstoffe sind im warmen Wasser viel mehr löslich als im kalten; die Sättigungskonzentration würde also durch Abkühlen erreicht; nun steigt aber in sehr vielen Fällen beim Erwärmen die Löslichkeit, resp. Diffusions-schnelligkeit (auch die Schnelligkeit der chemischen Bindung) in dem Gewebe und der Faser schneller als in der wässrigen Lösung. Wir haben also eine Differenz aus verschiedenen Momenten, die beste Schnelligkeit des Prozesses wird doch in den meisten Fällen beim leichten Erwärmen erreicht, natürlich besonders bei Farbstoffen, die in der Wärme im Wasser sogar weniger löslich sind.

Der Färbeprozess wird also neben den geforderten Eigenschaften des Gewebes und des Farbstoffes oft noch bedingt, in den meisten Fällen mindestens noch beschleunigt, durch ein, resp. mehrere der folgenden Momente:

I. durch künstliches Freimachen des Farbstoffes aus seiner Salzverbindung;

II. durch Näherrücken der Grenzen der Sättigung durch:

a) Zusatz anderer Lösungsmittel, die entweder den freien Farbstoff erst lösen oder seine Lösung der Ausfällungsgrenze nahe bringen;

b) Zusatz von Salzen;

c) Variation der Temperatur (relative Steigerung der Sättigung).

Die auffällige Erfahrung, die jeder macht, der mit Farbungemischen nach spezifischen Affinitäten der Zellteile sucht, dass nämlich bei einem Farbungemisch von konzentrierter saurer Farbe mit ganz wenig dünner basischer Farbe (oder umgekehrt) die wenig konzentrierte gar nicht die ihr chemisch entsprechenden Teile anfärbt, lässt sich durch diese Momente erklären. Eine Funktion des Zusammenwirkens dieser Momente ist auch, dass beim simultanen Färben mit verschiedenen Farben gleicher Sättigungskonzentration auf dickere Gewebstücke, die hellen Farben

tiefer hinein anfärben als die dunkeln. Am oberflächlichsten färben die dunkel nüancierten, gross molekularen sulfosauren Farbstoffe. Ebenso erklärt sich die Möglichkeit, dass man Konzentrationen von zwei verschieden gefärbten Farbstoffen — zwei saurer oder zwei basischer Art — finden kann, die Färbungsergebnisse geben ähnlich Gemischen von sauren und basischen Farbstoffen (wenn auch nicht so scharf und meist in Mischttönen), weil diese zwar chemisch differenten Zellbestandteile durch differente Dichtigkeit und Durchlässigkeit sich verschieden färben können (vielleicht auch durch verschiedenes elektrochemisches Verhalten).

Parallel der Farbenintensität und der Molekulargrösse bedingen die Stärke des Eindringens die fassenden Gruppen der Farbstoffe; speziell bei Formol-Gefrierschnitten bedingt bei gleicher Molekulargrösse die Hydroxylgruppe eine grössere Durchdringungsfähigkeit als die Carboxylgruppe, und diese hindert das Durchdringen weniger als die Sulfogruppe.

Rezepte für diese Methoden substantiver Färbung mit Gemischen (die nicht eine basische und eine saure Komponente haben) lassen sich nicht allgemein angeben, da sie nach Organ, Härtegrad vor allem modifiziert werden müssen; so ist Triacid Ehrlichs zu nichts anderem zu verwenden als zu Blut- und Knochenmarkfärbung bei bestimmten Härtegraden und Härtearten.

Rezepte für eine bestimmte Art der Verwendung werde ich, wenn sie von Dritten mehrfach nachgeprüft sind, als Paradigmen publizieren.

Was haben wir für Resultate von der substantiven Färbung in rein chemischer Hinsicht, d. h. in der Richtung, wo man suchte, wenn man auch die Litteratur berücksichtigt?

In rein chemischer Hinsicht sind die Resultate bis heute sehr spärlich. Wir wissen, dass das Chromatingerüst des Kernes saure Gruppen hat (man nimmt an, bedingt durch die enthaltene Phosphorsäure), und dass das Plasma vorwiegend basische Gruppen enthält, ferner, dass die sogenannten absolut eosinophilen Körner nur basische Gruppen enthalten, die Körner der Mastzellen rein saure Gruppen. Dass Methylgrün von den sauren Substanzen nur die nucleinhaltigen und Bordeaux-R. keine Linienfäden und Centrosomen färbt, kann ebenso gut in physikalischen Momenten bedingt sein. Wichtiger als diese chemischen Thatsachen ist, dass

durch diese Versuche die Vorstellungen auf den Einfluss physikalisch-chemischer Komponenten der Löslichkeit und der Diffusionsfähigkeit, den Einfluss der verschiedenen Quellungsstände gelenkt wurden. Denn dadurch kommt man auch nach und nach dazu, rein aus dem physikalischen Verhalten chemische Gruppen zu lokalisieren, z. B. Fette und fettähnliche Körper.

An einigen Beispielen möchte ich zeigen, dass ein Uebertragen der Anschauungen der technischen Färberei auf die Histologie fast nirgends a priori richtig ist, und dass die einzelnen wahrscheinlichen Parallelen erst durch lange Versuchsreihen in der Histologie gefunden wurden. Aber auch hier ist von den theoretischen Möglichkeiten über das Wesen des Färbeaktes nichts Abschliessendes bekannt. Wir haben in der Färberei wenig variable Verhältnisse, währenddem in der Histologie gerade die Varietät und die Möglichkeit, diese Varietäten färberisch darzustellen, vorläufig das Hauptproblem ist, und erst sekundär kommt da die Frage der bedingenden Ursachen. Manche Frage der Technik wird sogar wahrscheinlich in den histologischen Versuchen gelöst werden können; bis jetzt sind schon eine Reihe von Thatsachen bekannt, die in der Textil-Färbetechnik kaum hätten gefunden werden können: die absolute Acidophilie und Basophilie, die mit grösster Wahrscheinlichkeit zeigen, dass die chemische Komponente in einzelnen Fällen eine ausschlaggebende Rolle spielt. Auch ist jetzt aus der Wolle eine Gruppe isoliert worden, deren saure Eigenschaft die Grundlage der substantiven Färbung sein dürfte.

### **Die Beizfärbung.**

Da die substantive Färbung inkonstanter, resp. schwieriger ist und unechtere Färbungen giebt, und ausser bei Granula keine chemischen Anhaltspunkte zeigt, sondern auch nur morphologische Zellbilder, so ist man gezwungen, da Resultate zu suchen, wo sie zu erwarten, d. h. in der morphologischen Darstellung von Zellbestandteilen bei normalen und pathologischen Zellen. Sollen aber rein morphologische Resultate verwertbar sein, so muss ihre Darstellung absolut sicher, mit nicht zu subtilen Methoden erreicht werden, und dieses Resultat soll möglichst dauerhaft sein. Konstante Resultate in Bezug auf Färbung und Differenzierung

höchst einfach und echt geben eine ganze Reihe der alten Methoden. Wenn wir sie analysieren, sind es aber fast ausnahmslos Beizmethoden, z. B. die Hämatoxyline.

Wenn wir für die substantive Färbung nicht sehr viel von den Errungenschaften der Färbetechnik übertragen konnten, so sind wir bei der Beizfärbetechnik anfangs durchaus darauf angewiesen, nach den technischen Erfahrungen Versuche zu machen. Aber wieder ist der Hauptsache, dem Differenzieren, nirgends vorgearbeitet. Färbungen mit Brechweinstein und Hämatoxylin oder Zinkchlorid und Alizarin etc. färben die ganze Zelle stark und echt; aber wir haben keine Heraushebungen spezieller Teile, weil die kleine Differenz der Gewebsteile gegen die stark ausgeprägten Eigenschaften der Beize nicht in Betracht kommt.

Die bekanntesten Beizfärbungen der Histologie, die in der Technik zum Teil ihre Analoga haben, sind: die Hämatoxyline, die Weigert'sche Färbung auf Markscheiden, Glia, Bakterien, Elastin, die Löffler'sche Geisselfärbung mit Eisenbeize, die Nicol'sche Bakterienfärbung mit Tannin; alle andern sind mehr oder weniger modifizierte mit spezifischen Affinitäten. Eine eigene Art der Beizung ist in der Histologie die Imprägnationsmethode mit dem Typus der Golgi'schen Silbermethode. Die Beizfärbungsprozesse in der histologischen Technik sind also im allgemeinen die der Färbetechnik, von der sie entlehnt sind, und sind nur nach dem Zweck empirisch modifiziert. Hier stehen die Erklärungen auf demselben Boden wie in der allgemeinen Technik. Aufschluss über rein chemische Differenzen ist hier nicht zu erwarten, hingegen sind Differenzierungen weitergehend möglich als bei den substantiven Färbungen, weil die Fixierung stärker ist. Ferner können wir:

1. die Beizung mit der Härtung kombinieren, wo das Beizmittel sich mit dem ungefällten Eiweiss verbindet und erst so ausfällt, also prinzipiell anders sich bindet als die Farben bei den bekannten substantiven Färbungen;

2. den chemischen Charakter eines Farbstoffes viel stärker ausprägen in irgend einer Richtung, wenn wir die Farbe und die Beize zugleich einwirken lassen, d. h. das mit der Beize gebundene Farbmolekül (die direkt färbenden Hämatoxyline).

3. nach der Färbung und Differenzierung den Farbstoff

fixieren, d. h. die unechte Färbung in eine echte verwandeln durch die Beize (z. B. nach der Färbung der Spermatozoenköpfe mit Methylgrün und Differenzierung in Alkohol, bis nur noch die Köpfe gefärbt, kann man als leichte Fixierungs-Beize Borax-Lösung und Pikrinsaures Ammon anwenden). Die Jodeinwirkung bei der Weigert'schen, resp. Gram'schen Färbung der Bakterien vor dem Differenzieren scheint mir am ehesten als eine Gerbung der Bakterien-Oberflächen oder -Hüllen zu sein, indem diese so für die Lösungs-, resp. Extraktionsmittel wie Alkohol und Anilin physikalisch unzugänglich gemacht werden. Sonst ist die Färbung wie die Entfärbung der Bakterien nach der Gram'schen Methode schwer zu erklären (andere Erklärung vgl. Pappenheim).

Eine Einteilung der Beizen nach rein chemischem System geht zwar nicht durchaus parallel den färberischen Potenzen; aber eine bessere scheint mir heute noch unmöglich (auch diejenige von Fischer weicht wenig von der chemischen Einteilung ab).

### I. Die metallfreien Beizen.

Sie sind keine eigentlichen Beizen, weil sie den chemischen Charakter des Substrates wenig beeinflussen, wenn auch nicht so intakt lassen wie Alkohol und Hitze; dagegen verändern viele die Struktur weniger als Alkohol und Hitze.

Die Eigenschaft, die alle guten Fixationsbeizen haben müssen, ist gute Diffusionsfähigkeit in die noch lebende Zelle (vergl. Schluss), oder sie müssen mit einem zelltötenden Mittel kombiniert werden.

Diese Gruppe besteht:

1. aus Aldehyden und organischen Säuren, Formaldehyd und Essigsäure als Hauptrepräsentanten;
2. anorganische Säuren (Mineralsäuren);
3. Metallsäuren und alle Salze, die aber nur kombiniert mit zelltötenden Substanzen verwendet werden können;
4. die Oxybenzole und deren Nitrokörper (besonders Phenol, Pyrogallol und Pikrinsäure).

Alle diejenigen Körper, die in wässrigen Lösungen ohne Zusatz in die lebende Zelle sehr schnell eindringen, sie abtöten und fixieren, sind mit wenig Ausnahmen schlechte Beizen, d. h. fast alle Beizen dringen erst in die abgetötete Zelle ein; Zwischen-

stufen nehmen ein: die Pikrinsäure, das Jod, das Sublimat und die Osmiumsäure. Bei der Pikrinsäure ist neben dem Eindringen die Fähigkeit zu beizen eine Ausnahme, bei dem Metalloid Jod und dem Schwermetallsalz Sublimat ist die Fähigkeit, in die lebende Zelle einzudringen, eine Ausnahme, indem alle Körper ihrer Klassen diese Eigenschaft nicht haben.

## II. Die metallhaltigen Beizen.

a) Die Metalloxyde und ihre Verbindungen.

b) Die Metallechloride (Altmann, Hermann, Galleotti und Pianese).

c) Die Metallsäuren und ihre Salze.

Gemeinsam ist allen, dass sie nicht in die lebende Zelle eindringen, dass sie aber, einmal eingedrungen, feste Verbindungen geben mit bestimmten Zellbestandteilen, und fast alle haben andererseits auf bestimmte Farben Beizwirkung. Im allgemeinen wird gar nicht betont, dass die Alkalescenzen, resp. die saure Reaktion des Beizgemisches, von sehr grosser Bedeutung ist, ebenso, dass bei verschiedenen Kombinationen verschiedener Beizen eine Veränderung der Beizwirkung der einzelnen eintritt, so dass das Resultat eine Gleichgewichtswirkung der verschiedenen Beizen ist. Gerade diese Erfahrungen, dass man mit verschiedenen Beizen von gleichem oder auch verschiedenem Löslichkeitscharakter verschiedene Bilder bekommt, veranlassten mich, systematisch mit Kombinationen von Beizen Versuche zu machen, um so die Zellteile vor der endgültigen Fixierung zu beizen, d. h. die Grundlage der Färbung zu machen, und um eventuell durch Reduktionsprozesse die Metalle fraktioniert auszuschneiden und so direkte Bilder der Metallsalz-Affinitäten zu bekommen.

Ein Unterschied zwischen der Färbetechnik und der histologischen Technik ist in der Wahl der Beizen und deren Verwendung zum Teil ein prinzipieller. Die Technik braucht im allgemeinen nur Beizen von sehr ausgesprochenem Charakter, wo die kleinen Differenzen der verschiedenen Teile des zu färbenden Substrates für die chemische Reaktion gar keinen Unterschied machen, d. h. alles wird gleichmässig gefärbt, eine Differenzierung ist also so kaum zu erreichen. Wir können die technischen Beizen als nachträgliche Beizen sehr gut verwenden, wo wir nach dem

Differenzieren die noch gefärbten Teile sehr fest fixieren oder anders nüancieren wollen, oder da, wo nur die schwer färbbaren Elemente vorhanden sind (Geisseln der Bacillen). Die ganze Reihe der zufällig gefundenen Beizen sind in der histologischen Technik im allgemeinen viel weniger reaktionsfähige Substanzen, so finden Tannin, Brechweinstein nur sekundäre Verwendung. Verwendet werden heute vor allem die Alaune, die chromsauren Salze, und neuerdings auch die Chloride von Platin, Palladium, Gold und Cobalt. Die Elektionsstellen werden wahrscheinlich wie bei den Farben zum Teil bedingt von sauren oder basischen Eigenschaften, resp. elektropositiv und elektronegativ; aber dabei spielen eine ganze Reihe weiterer Momente physikalischer Natur eine grosse Rolle.

Will man nun beizen, so muss man die Beizlösung in saurer Reaktion einwirken lassen. Nimmt man Essigsäure, so dient sie zugleich als Vehikel für die Verbindungen, die in die lebende Zelle nicht eindringen. Ich machte allgemein die Erfahrung, dass die Beizstoffe auch am tiefsten in abgetötete Massen eindringen, wenn Essigsäure verwendet wurde, mehr als bei Ameisensäure oder Weinsäure oder Zitronensäure. Oxalsäure giebt leicht Reduktionen und bei Cobalt-Chlorid entstehen direkt Cobaltoxalat-Niederschläge.

In alkalischer Reaktion dringen die Beizen fast gar nicht ein; bei den Metalloxyden reduzieren dann die Oberflächen, und die oberste Schicht wird mit reduziertem Metall imprägniert in einer so dichten Schicht, dass die Beize nicht tiefer geht, und dass ferner bei Schnitten über 3—4  $\mu$ . gar nichts zu sehen ist. Man thut am besten, die Säuerung weiter zu führen, da durch die Alkalien des animalen Gewebes ein Teil der Säure gesättigt wird. Nach 50 bis 100 Stunden ist die Reaktion bei kleinen Stücken im Gleichgewicht. Will man nun eine Metall-Imprägnation, so wässert man im liegenden Wasser 1—2 Stunden aus und bringt die Teile in eine dünne Ammoniak-Lösung, oder zu einer stärkeren Reduktion in eine alkoholische Pyrogallussäure-Lösung, oder nach Odernheimer reduziert man mit Wasserstoff, dem etwas  $\text{AsH}_3$  oder  $\text{PH}_3$  zugegeben ist. Bei Osmiumsäure geht dieser Vorgang auch in saurer Lösung vor sich nach längerer Zeit, und besonders am Licht. Die Chloride werden im allgemeinen nicht so leicht verändert, wenn kein Licht einwirkt, am wenigsten das Platin-Chlorür, am stärksten noch Sublimat und Goldchlorid.



Was für Ueberlegungen das Platinchlorid in die histologische Technik brachte, weiss ich nicht; auffällig ist hier, dass nach der Beizung basische Farbstoffe mit  $\text{NH}_2$  Gruppen auf die Kerne gehen und relativ sehr gut haften (Saffranin). Mindestens zieht Alkohol bei guter Beizung auch nach vielen Stunden das Saffranin nicht aus dem Kern.

Es ist möglich, dass es sich da um eine Verbindung handelt, die analog ist den Platinammoniakaten, denn das Platin-Chlorid ist un-reduziert mit den Geweben verankert und kann nachher noch zu Metall reduziert werden, doch hat Cobalt-Chlorid keine so starke Beizwirkungen wie aus Analogie mit dem Platin erwartet werden dürfte.

Nach diesen allgemeinen Erfahrungen ist es also angezeigt, als Grundstock für die histologischen Beizflüssigkeiten zu mischen:

I. Ein zelltötendes Mittel, das in sehr geringer Konzentration genügt und nicht zu stark chemisch wirkt, die Beizen nicht angreift. (Die Zelle muss schnell getötet werden, weil sonst die hypertonen Lösungen der lebenden Zelle Wasser entziehen, in die tote Zelle aber eindringen können. Ich habe Versuche gemacht mit isotonischen tödenden Lösungen und nachher erst die Beize zugesetzt; aber einen wesentlichen Unterschied fand ich nicht gegenüber den Zellen, bei deren Fixierung ein gutes zelltötendes Element zu der Beizflüssigkeit gesetzt wurde).

II. Eine Säure (die nicht zu stark sein darf, weil sie sonst die Beize stört); organische Säuren wirken auch schnell zelltötend, weil sie eindringen in die lebende Zelle (Essigsäure, Weinsäure, Zitronensäure).

III. Die Beizen, die zugleich eiweissfällend wirken, indem sie sich damit verbinden.

1. In die lebende Zelle eindringende: Pikrinsäure, Pyrogallol, Jod, Sublimat. (Keine guten Beizen im allgemeinen.)
2. In die absterbende Zelle eindringende; Alle übrigen erwähnten Salze, Metallsäuren, Metalloide und ihre Verbindungen.

Alle diese Verbindungen können natürlich auch auf schon fixierte Gewebe angewandt werden, aber da ist zu bedenken, dass das Plasma als dichte Schollen ausgefällt und weniger zugänglich wird, und dass eine Reihe labiler Gruppen sich wohl verändert

haben. Macht man eine Reaktion auf sich wenig verändernde Substanzen, und die durch die gemachten Prozeduren nicht ausgezogen werden, so kann man auch erst die Schnitte beizen (Nervenscheidenfärbung Weigerts auf Formalingefrierschnitte z. B.). Da alle diese Beizen schwer diffundieren und die Oberflächen der Stücke dichten, darf man nur sehr kleine Stücke verwenden.

Da man Differenzierungen will, wird man am besten ein Beizgemisch einwirken lassen. Mit der Wahl der Beize geht man am besten so vor, dass man sich die zur Verfügung stehenden Farbstoffe nach der Farbe z. B. in zwei Gruppen einteilt und dann zwei nach ihrem chemischen Charakter möglichst verschiedene zu zwei Farben gehörige Beizen wählt, z. B. eine saure und eine basische oder Oxyd und Chlorid (Oxyde und Chloride von Al und Fe; Zn und Fe; Zn und Cr; Sn + Mo + Zn; Al + Mo + Fe etc.); aber wohl zu berücksichtigen sind hier die Reaktionsfähigkeiten der einzelnen Beizen (Anhaltspunkte dafür haben wir für viele in der Technik), und da macht man dann die Mischung analog den Grundsätzen für die Gemische substantiver Färbung: man sucht das chemische Uebergewicht durch Massenwirkung etwas zu heben, indem man die starke Beize in viel dünnerer Lösung anwendet als die andere. Die Verhältnisse lassen sich nicht genau voraussagen; aber es garantiert bessere Resultate, wenn man sehr dünne Anfangslösung der starken Beize nimmt und eventuell nach einigen Stunden noch etwas zusetzt.

Beide Beizen haben gleiche Einwirkungszeit, und das Endresultat ist abhängig von der verschiedenen chemischen Affinität der Beizen, der prozentualen Sättigung der Lösung und der Lösungstension gegen das Gewebe, zusammen mit der Diffusionsfähigkeit im Gewebe.

Die Färbung kann dann mit den gewählten Farben als Gemisch, oder besser successive gemacht werden. Die Grundsätze sind dieselben wie bei der substantiven Färbung; auch hier muss jede Methode ausprobiert werden, für jedes Organ speziell (aber nicht so peinlich); dann bekommt man (bei Schnitten von 1,5-4  $\mu$ .) bei starker Vergrößerung Bilder und Zellstrukturen, die man allerdings nicht immer deuten kann, die aber sicher ebenso berechnete Kunstprodukte sind, wie sehr viel mit den konventionellen Methoden Gefundenes.

Die Vorteile der Beizmethoden für die eben absterbende Zelle sind konstantere, besser differenzierte Resultate als bei der substantiven Färbung und jede Methode zeigt wieder andere Gegensätze. Das sind die Vorteile bei Untersuchungen; aber es lassen sich auch Methoden ausarbeiten, die an Sicherheit und Einfachheit den heutigen gleichstehen, und die wegen anderer, oft spezifischer Elektion mindestens demonstrativen Wert haben.

Man kann natürlich, wie oben angedeutet, auch drei Beizen einwirken lassen, z. B. Eisessig, 2 Teile,

	Osmiumsäure 1%ig, 1 Teil,
{	Al. Acet (gesätt.) 10 Teile,
	Eisenoxychlorid (off.) 10 Teile,
	Molybdänsäure, 1%ig, 10 Teile

(50—100 Stunden).

Im Laufe der vier Jahre, seit diese Versuche gemacht wurden, ist die Färbung durch Nachdunkeln der Schnitte infolge der Reduktion der Metalloxyde etwas zurückgetreten, aber die Bilder sind jetzt noch sehr klar. Man kann auch von vorne herein darauf ausgehen, die Teile durch reduziertes Metall sichtbar zu machen bei Schnitten von 2—4  $\mu$ ., indem man z. B. wenig oder gar nicht säuert und nachher die Reduktion durch die Gewebe begünstigt durch Alkalisierung. Beispiel einer Imprägnationsbeize: Eisessig 1 Teil, Osmiumsäure 1%ig, 4 Teile, Al. Acet (gesätt.) 10 Teile, Eisenoxychlorid 10 Teile, Zinkchlorid 10%ig, 5 Teile; drei Tage im Dunkeln; dann legt man die Stücke für zwei Tage in mit wenig Ammoniak alkalisiertes Aqua destilata oder eventuell in eine ganz dünne alkoholische Pyrogallol-Lösung. Resultat: Schnitte des Magens (fundus) zeigen die Belegzellen auch bei sehr dünnen Schnitten dunkel gekörnt (bei schwacher Vergrößerung vollständig schwarz) die Kerne hell mit dunkeln Chromatingerüst, die andern Zellen hell mit deutlichen Zellgrenzen. (Die bekannten Beziehungen der Beizen zu den Farben geben alle Bücher über Farbenchemie: Georgiewicz, Schultze und Julius: Tabellen; Pappenheim: Farbenchemie.) Dass weiter noch viele speziell für die histologische Farbentechnik wichtige Beziehungen existieren zwischen Farben und Metallsalzen, die bis heute noch gar nicht bekannt, ist sehr wahrscheinlich; jedoch sind eine ganze Reihe von Metall- und Metalloidverbindungen von mir (und wohl auch von andern, ohne

dass daraus weitergehende Schlüsse gezogen worden wären) durchprobiert worden, ohne Farben zu finden, die spezifisch darauf ziehen, so die Verbindungen von As, Cd, Mn, Bi, Hg, nur wenig auch Vd. Die Silikate geben allerdings lackartige Verbindungen, aber ohne spezifische Affinität zu besondern Teilen; es giebt nur einen Niederschlag. Arsengehalt scheint einen gewissen Beizeffekt zu haben bei Methylenblau, Magdalarot, auf ungebeizte Gewebe, wie z. B. bei der Nissl-Methode.

Aehnlich wie P. Molybdänsäure, Alaun beim Hämatoxylin die Bindung und die Löslichkeit bedingt, so übernimmt bei den Farbstoffen die sulfosaure Gruppe ebenfalls die Löslichkeit und Bindung mit der Faser. Diese Gruppe herrscht aber so vor, dass die Sulfosäuren (und ihre Salze) in der Histologie ganz gleich<sup>1)</sup> verwendet werden müssen; eine Elektion findet nur noch nach den physikalischen Verhältnissen statt.

Beizfarben lassen sich ziemlich leicht herstellen mit sehr vielen Doppelsalzen, wenn diese mit den betr. Farbstoffen sich verbinden; aber das bedeutet bloss eine Farbverstärkung durch die Beize und entspricht nicht dem eigentlichen Zweck der Beiz-Methoden, denn die morphologischen Resultate mit Farbbeizgemischen sind dieselben wie bei jeder substantiven Methode, weil man nach der gewöhnlichen Manier fixierte Gewebe färbt. Auch sind die Reaktionen nicht so durchsichtig, dass daraus Schlüsse auf chemische Vorgänge gezogen werden dürften. Noch einige Parallelen mit den Fischer'schen Untersuchungen, die sich nachträglich zeigten, möchte ich hier anführen: Fischer teilt die allgemein gebräuchlichen Fixierungsmittel nach dem Grad wie ihr Vorhandensein die Färbung hindert, ein in solche: die die Färbung nicht hindern (Alkohol, Formaldehyd, Essigsäure); nach meinen Erfahrungen haben nun diese auch fast gar keine beizenden Eigenschaften. Wenig hindert die Färbung das Sublimat, und es ist auch eine sehr wenig ausgesprochene Beize, und alle die Färbung stark hindernden (Platin-Chlorid, Tannin etc.) sind kräftige Beizen. Ferner hat die Fischer'sche Gruppe, die auch in geringen

<sup>1)</sup> Ausnahmen fand ich nur in einigen neuern Handelsfarben, deren Konstitution ich weiter nicht erfahren konnte, die trotzdem sie Sulfosäuren, sich doch ganz anders verhalten als alle andern. Iso-diphenylschwarz. Geigy. Setopalin Geigy.

Konzentrationen die Serumglobuline wasserunlöslich, Deuteroalbumose und Nucleinsäure wasserlöslich fällen, das Vermögen, in die lebende Zelle einzudringen. Von den alle Eiweissarten fällenden Mitteln haben nur Formalin, Sublimat und Osmiumsäure in saurer Lösung diese Eigenschaft, alle andern, alle Eiweissarten fällenden gebräuchlichen Fixationsmittel dringen nicht in die lebende Zelle ein, gehören aber zu den stärksten Beizen.

Eine besondere Art von Beizen muss ich noch kurz charakterisieren, deren Wert mehr in physikalischen Eigenschaften zu liegen scheint als in chemischen. Schon bei der Essigsäure als Zusatz zu den Beizflüssigkeiten habe ich erwähnt, dass die Beize durch ihre Wirkung tiefer zu dringen scheint, dass sie also gewissermassen ein Vehikel für die Beize sei. Ehrlich hat nun (1886) gefunden, dass die schwer färbbaren Bacillen sich viel leichter färben, wenn man mit dem Farbstoff eine derartige Substanz verbindet, dass die Verbindung in Wasser nur in tropfenartiger Suspension oder Emulsion (wie Oel) aufgeschwemmt werden könne. Er gab als Paradigmen Anilin-, Phenol-, Salicylaldehyd-Zusatz zu Fuchsin, Methylviolett etc. und deutete die Beobachtung so, dass diese Bacillen eine Hülle hätten, die schwer permeabel; diese Substanzen Anilin und Phenol würden die Farbstoffe durch die Hülle durchgleiten lassen, gewissermassen die Hüllporen schlüpfrig machen<sup>1)</sup>.

Aehnlich wirkt nun das Pyrogallol (d'Arrigo, Stampachia), aber da ist zugleich eine chemische Wirkung nachzuweisen; denn die mit Pyrogallol vorbehandelten Bacillen, die anfangs nach Fuchsinfärbung leuchtend rot sind, werden nach kurzer Zeit violett<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> Giebt man zu Farbstoffen, die abgetötete Kerne langsam aber echt färben (Farbstoffe, die meist auch nicht oder schwer in die lebende Zelle gehen) z. B. Anilin zur Lösung, so folgt die Tinktion viel schneller (Saffranin, Babes).

<sup>2)</sup> Die Pyrogallol-Methode scheint mir in folgender Modifikation zu Tuberkelbacillen-Färbung in Schnitten empfehlenswert, weil die Tuberkelbacillen sich nach Pyrogallolbehandlung leichter färben und etwas säureresistenter sind. Ich verfare so, dass ich die Schnitte statt in blossem Alkohol, vor der Färbung, für  $\frac{1}{2}$  bis 1 Stunde in eine 5—10%ige frische alkoholische Pyrogallol-Lösung bringe und nachher nach den gebräuchlichen Methoden färbe, am besten mit möglichst gesättigten Farblösungen (etwas weniger Alkohol als nach den Angaben von Ziehl-Neelson).

Ueber die Hypothese der Hüllen und über die wichtigen Unterschiede der lebenden und toten Zelle in färberischer Hinsicht folgt Näheres im folgenden Kapitel.

### Ueber die Darstellung der Zell-Narkose.

(Beziehungen zur sog. vitalen Färbung.)

Von den beiden Arten, uns eine Vorstellung über die Struktur der Zelle zu machen, haben wir die Darstellung des abgetöteten Gewebes in den Grundsätzen durchgegangen; das Problem, die lebende Zelle zu färben, war schon lange gestellt, aber man fand nur ganz wenige Farben, die überhaupt in die lebende Zelle eindringen und färben.

Bei den frühesten Versuchen sog. vitaler Färbung hatte man als ideales Ziel im Auge, was ich von der primären Beizung erwartete, nämlich die Farben sollten in die lebende Zelle eingeführt werden, dort ihrer chemischen Affinität gemäss sich festsetzen, und nachher sollte das Gewebe fixiert werden und damit auch der Farbstoff. Das nannte man vitale Färbung; bei mikroskopisch kleinen Lebewesen beobachtete man den Vorgang der Färbung unter dem Mikroskop und nannte das vitale Färbung. Allen, die in diesen Gebieten Versuche machten, ist aufgefallen, dass die spirituslöslichen Farben eindringen in die lebenden Zellen, dagegen gar nicht die wasserlöslichen Sulfosäuren, die man fast nur noch im Handel bekam. Die Erkennung eines Prinzips war aber erst durch fundamentale Untersuchungen anderer Art möglich.

Hermann hat es wahrscheinlich gemacht, dass die sog. Narcotica Beziehungen hätten zu Cholestearin und Lecithin, weil er in den diese Körper enthaltenden Organen bei in Narkose getöteten Tieren relativ viel mehr Narcoticum fand als in den andern Organen (1869—1874). Cl. Bernard bewies, dass alle Zellarten durch die Narcotica narkotisierbar seien, d. h. sie stellen alle Bewegungen und Reaktionen ein, bekommen aber, wenn sie vom Narcoticum befreit sind, alle ihre vitalen Eigenschaften wieder. Das wurde fast vergessen. Seit 1895 machte Hans Meyer in Dissertationen (Pohl, Juckuff) darauf aufmerksam, dass die nar-

kotische Wirkung in enger Beziehung stehe zu der Fettlöslichkeit der Narcotica. 1898 sprach Meyer den Satz aus: Alle chemisch zunächst indifferenten Stoffe, die für Fette und fettähnliche Körper löslich, müssen auf lebendes Protoplasma, sofern sie sich darin verbreiten können, narkotisch wirken. 1901 publizierte Overton eine grosse Abhandlung über Zell-Narkose, nachdem er unabhängig von Meyer eine grosse Zahl von Körpern auf ihre narkotische Wirkung untersuchte. Overton kommt zu demselben Resultate wie Meyer. Im Laufe seiner Untersuchung machte nun Overton darauf aufmerksam, dass die in die lebenden Zellen eindringenden Farbstoffe ähnliche physikalische Eigenschaften haben müssen, worauf besonders ihre Spritlöslichkeit deute, und er teilt die Farben ein in cholesterinlösliche und cholesterinunlösliche. Mir schien es nun sehr naheliegend, die Erfahrungen in der vitalen Färbung und in der Narkose zu vereinigen, um die Narkose darstellen zu können, wie auch das Absterben der Zelle.

Die Idee war: Habe ich ein Narcoticum, das gefärbt ist, so muss ich in der dadurch narkotisierten Zelle einen Ausdruck der Narkose finden. Nun sagt Meyer und Overton, dass die Fettlöslichkeit ausschlaggebendes Moment für die Stärke eines Narcoticums sei, dass z. B. Azobenzol und Phenanthren gute Narcotica, dass aber die rein narkotisch wirkenden Körper chemisch indifferent sein müssten. Die zu vitaler Färbung verwandten Farbstoffe sind aber, wie alle im Handel zu findenden, mit ausgesprochenen aktiven Gruppen versehen, die sie erst zum Farbstoff machen. Wenn diese in die Zelle eindringen, so haben wir also eine gemischte Reaktion: die physikalisch-chemische, bedingt durch die Löslichkeit und die rein chemische durch die sog. auxochromen Gruppen, die feste, nicht leicht reversible Verbindungen geben, deren Wirkungsstärke also nicht allein von der intrazellularen Konzentration, sondern noch mehr von der Einwirkungszeit abhängt. Die Färbeprobleme liessen sich also auf folgende Schlüsse konzentrieren: Mit indifferenten Fixationsmitteln wie mit Beizen erhalten wir Kunstprodukte, die zum Funktionszustand der Zelle zur Zeit der Fixation in bestimmten Beziehungen stehen, wie ein Niederschlag oder eine Färbung bei einer chemischen Reaktion auf die Anwesenheit eines bestimmten Körpers weist, den wir aber dort durch andere Untersuchungen meist besser kennen.

Für die klinischen Untersuchungen sind dies vorläufig die einzigen möglichen Methoden. Wollen wir uns aber über die Struktur der lebenden Zelle eine Vorstellung machen, so müssen wir die lebende Zelle in ihren Bestandteilen zu verdeutlichen suchen. Ueberall machte man nun die Erfahrung, dass das Verhalten der lebenden und abgetöteten Zelle ein ganz unerklärbar (Overton, 1895) verschiedenes sei, und jetzt wissen wir durch Overton, dass die Löslichkeit die Aufnahme in die lebende Zelle bedingt, ohne indessen durchgreifende Kriterien in der chemischen Konstitution der Verbindungen zu haben. Bei der vitalen Färbung können wir die Funktion der Löslichkeit nicht vermeiden; vermeiden wir daher die chemische Reaktion, so haben wir ein reines Bild der physikalisch-chemischen Beeinflussung, das bei einer bestimmten Konzentration der Zell-Narkose entsprechen muss.

Was ich brauche, sind also: Intensiv gefärbte indifferente Stoffe, keine eigentlichen Farbstoffe, die öllöslich und etwas wasserlöslich (1 : 100,000 genügt) sein müssen, und die sich im Tierkörper nicht schnell zersetzen sollten, mit möglichst hohem Teilungskoeffizienten zwischen Wasser und Oel (Nernst und Overton).

Oellösliche	}	aktive	{	ungefärbte = basische Narcotica und Alkaloide  gefärbte = Farbstoffe zur vitalen Färbung (Methylenblau, Neutralrot)
Stoffe	}	indifferente	{	ungefärbte = alle indifferenten Narcotica  gefärbte = <u>die gewünschten Stoffe</u> (intensiv)    eine Andeutung der Möglichkeit lag im Azobenzol vor.

Diese eigenartige physikalisch-chemische Thatsache, dass sich die lebende Zelle gegen alle fremdartigen Stoffe zu verteidigen vermag, die nicht öllöslich sind, zwang Overton, die Annahme zu



machen, dass die lebende Zelle eine sehr dünne aber vollständige Hülle aus Cholestearin-Lecithingemischen besitze, die physikalisch-chemisch sich Fetten sehr ähnlich verhalten, die als Substanzenfilter wirke. Rechnet man mit dieser Annahme und ferner mit den Erfahrungen der Bacillenfärbung (Annahme von Hüllen durch Ehrlich), ferner damit, dass der Zellinhalt im Leben leicht alkalisch und die Eiweisssubstanzen stark gequollen sind, und ferner mit dem Umstand, dass man bis heute nur basische spritlösliche Farbstoffe kannte, die in die lebenden Zellen eindringen, so lässt sich die rätselhafte färberische Differenz zwischen der lebenden und toten Zelle mit grosser Wahrscheinlichkeit erklären: Beim Absterben der Zelle und besonders beim Fixieren, d. h. Ausfällen der Eiweisskörper durch die in die lebende Zelle eindringenden Substanzen, wird die unsichtbar-dünne Cholestearinmembran einreissen (Overton), z. B. auch beim Gefrieren- und Auftauenlassen, und jede wasserlösliche Substanz kann nun eindringen (die derberen Hüllen vieler Bakterien würden bei diesem Prozesse kompakt bleiben und auch nach dem Abtöten nur öllösliche Substanzen durchtreten lassen, resp. aufnehmen). Der Zellinhalt wird sich nach der Abtötung nun nach der chemischen Art und physikalischen Dichtigkeit den jetzt eindringenden Farbstoffen gegenüber verschieden verhalten, d. h. eventuell eine differentielle Färbung geben.

Auf dieser Grundlage ist natürlich auch die vitale Färbung im alten Sinne rationeller Ausbeutung fähig; nur muss man auch hier im Auge behalten, dass die Mittel, mit denen man den eingedrungenen Farbstoff an Ort und Stelle fixieren will, auch eine öllösliche Substanz sein muss, weil sie sonst nur in die abgetötete Zelle eindringt, resp. aus der lebenden Zelle durch Herabsetzung der Aussenkonzentration den Farbstoff nur herausreissen würde<sup>1)</sup>, wie z. B. Vitalfärbung durch Methylenblau nicht sofort mit Molybdänsäure fixiert werden kann, die nicht in die lebende Zelle eindringt, dagegen z. B. mit Sublimat und Pikrinsäure, was wieder etwas für die Hüllentheorie spricht. Uebrigens ist dasselbe der Fall bei langsam abgetöteten und sorgfältig behandelten Zellen, z. B. bei der Nissl-Methode reisst ebenfalls Molybdänsäure das Methylenblau heraus.

<sup>1)</sup> Höber machte bei Resorptionsversuchen an den Darmepithelien dieselbe Erfahrung.

Da wir mit sehr starken Vergrößerungen arbeiten müssen, müssen wir möglichst intensiv gefärbte Substanzen haben und Zellen deren Narkose, resp. Absterbungsgrenze bei möglich hohen Konzentrationen liegt, nach diesem also Pflanzenzellen, die nach Overton die sechsfache Konzentration ertragen gegenüber der Tierzelle (Staubfäden, Algen etc.).

Theoretische Untersuchungen über die Elektivität der lebenden Zelle sind bis heute wenige gemacht. Fischel (1901) sagt über die Elektivität der lebenden Zelle: „Welche Verhältnisse hier eine Rolle spielen, ist meines Wissens bisher nicht näher erörtert worden“. Fischel gibt eine Uebersicht der verwandten Farbstoffe, die von Prof. Huppert in Bezug auf ihre chemischen Eigentümlichkeiten zusammengestellt wurden. Die Resultate sind: „Das lebende Gewebe nimmt nur basische Farbstoffe auf, saure dagegen nicht<sup>1)</sup>, und zwar solche basische Farbstoffe, welche entweder einen einfachen Ammoniakrest  $\text{NH}_2$  oder einen solchen, in welchem der Wasserstoff durch ein der fetten Reihe angehöriges Alkoholradikal vertreten ist, während der Eintritt von einem Phenylrest in schwer eindringende Farbstoffe die Eindringungsfähigkeit vollständig herabsetzt (Saffranin, Janusgrün, Baslerblau)“. „Ersetzt man die Wasserstoffe der Amingruppe durch Alkyle, so wird das Färbungsvermögen verstärkt.“ Methyl- und mehr noch Aethylreste vergrößern nun auch den Teilungskoeffizienten zwischen Wasser und Fetten und erhöhen damit nach Overton die Eindringungsfähigkeit in die lebende Zelle, analog Sulfonal gegenüber Trional. Nun haben wir es aber in den Händen, hienach den Teilungskoeffizienten beliebig zu erhöhen, da Alkylreste die Wasserlöslichkeit im allgemeinen herabsetzen.

Die übereinstimmenden Resultate der meisten Untersucher über vitale Färbung (Ehrlich, O. Schultze, Arnold, Fischel, Galeotti, Ernst, Maragliano) sind: das Plasma der lebenden Zelle nimmt diffus höchstens einen schwachen Farbenton an in wässrigen Farblösungen; dagegen werden cirkumscribte Stellen (Granula) durch die gebräuchlichen Vitalfarben intensiv gefärbt. Der Kern bleibt im allgemeinen lange ungefärbt; sobald der Kern

<sup>1)</sup> Leicht saure Hydroxylgruppen hindern den Eintritt nicht (Azonaphthol, monoäthylirtes Eosin).

basische Farbstoffe aufnimmt, scheint die Grenze der Einwirkung, die noch rückgängig gemacht werden kann, überschritten zu sein; also die Kernfärbung gilt als Absterbeerscheinung. Schon Schultze beobachtete bei Epithelien, dass sie sich wieder entfärben und weiter leben. Hier und da findet man auch die Angabe, dass die Bewegungen der Tiere langsamer werden, auch aufhören, aber eventuell wiederkehren, wenn man sie in reines Wasser bringe. Eine weitere oft wiederkehrende Beobachtung ist, dass die Körnchen durch längeres Verbleiben in der Farbe an Volumen um das Vielfache zunehmen können (Ernst). Das Haupt-Augenmerk wurde aber überall auf die für die Zellart charakteristische Anordnung der Granula gelegt. Vergleichen wir diese Beobachtungen mit den oben angestellten theoretischen Folgerungen, so finden wir, dass zufällig Beobachtungen gemacht wurden, die darauf hindeuten, dass bestimmte gefärbte Stoffe in bestimmter Konzentration eine Narkose bedingen, die wieder rückgängig gemacht werden kann, und dass beim Einwirken derselben Farbe die Granula in den Zellen sich vergrößern, wenn auch nicht alle gleich, und beim Uebertragen in reines Wasser kleiner werden und sich entfärben. Da diese Vergrößerung der Granula parallel geht dem Unbeweglichwerden der Tiere, also der Narkose, und die Bewegung bei Verkleinerung der Körner wieder eintritt, ist es naheliegend anzunehmen, dass dies ein Ausdruck der Narkose sei; aber man muss vor allem noch bedenken, dass wir nicht allen in die Zelle dringenden Farbstoff zu sehen brauchen weil ein Teil der Farbe als Leukoverbindung in der Zelle vorhanden sein kann (Ehrlich, Plato).

Versuche aber mit vollständig indifferenten gefärbten öllöslichen Körpern sind bis heute nicht angestellt worden.

Bisherige Versuche: Nehmen wir eine Lösung von 1 : 600 Chloroform und bringen kleine Tiere hinein, so bekommen wir (bei allen Wirbeltieren und den meisten wirbellosen) eine komplette Narkose, d. h. Schwinden der spontanen Bewegung wie der Reflexe, die wieder auftreten, sowie die Konzentration auf 1 : 800 — 1 : 1000 gesunken (Overton). Dieselbe Wirkung haben nun fast alle Produkte der Fettreihe und besonders ihre Halogen-Derivate (Schmiedeberg, Binz), ja überhaupt alle fettlöslichen Substanzen, wenn sie indifferent sind (Meyer, Overton), für Stunden bis Tage. Haben sie aber saure oder stark ausgesprochene basische Gruppen,

so töten sie schneller. Zu den öllöslichen Substanzen gehören nun auch die Farben, die durch Empirie für die vitale Färbung als brauchbar festgestellt wurden; aber das sind eigentliche Farbstoffe, d. h. Chromogene mit chemisch-aktiven Gruppen, die, wenn in der Zelle, nicht bloss physikalisch nach ihren Löslichkeitstensionen wirken, sondern die mehr oder weniger feste Verbindungen geben, wenn auch oft das Leben noch teilweise fort-dauern kann.

Die postulierten chemischen Körper sind nur schwer zugänglich und im Handel nicht zu erhalten. Azobenzol hat alle chemischen Eigenschaften, d. h. es wirkt narkotisch, die Zelle lebt nach der Narkose weiter, aber die Farbe ist so wenig intensiv, dass sie bei starker Vergrößerung nicht deutlich genug ist. Auch Azonaphtol bedingt eine unschädliche Narkose, aber es ist zu wenig farbenstark. Der einzige mir zugängliche Körper war ein diaethyliertes Eosin <sup>1)</sup>, das mir von Hrn. Dr. Demuth, Assistent am Polytechnikum, in reiner Form dargestellt wurde (das Handelsprodukt ist nicht vollständig äthyliert und nicht rein, wie sich aus der Löslichkeit ergibt). Die Untersuchungsergebnisse mit dem diäthylirten Eosin sind nun sehr ähnlich den Resultaten mit Neutralrot, besonders an den Bakterien, wie ich mich an den Wasserbakterien, die Hr. Prof. Ernst zu Vitalfärbung verwandte, überzeugen konnte. Nachdem die vollständige Bewegungslosigkeit der Bakterien eine Stunde gedauert, leben sie, in Wasser gebracht, weiter und halten verschiedene Narkosen durch diese Farbe in kurzer Zeit aus (vier in zwei Tagen). Bei dem Handelsprodukt ist die stärkere Wasserlöslichkeit auffällig und, nachdem eine ähnliche Färbung wie bei der reinen Farbe eingetreten ist, treten diffuse Plasmafärbungen ein, und auch der Kern widersteht nicht sehr lange. Ob da in der Zelle wieder Hydroxyle frei werden und die diffuse Färbung bedingen, oder ob nicht äthyliertes Eosin eindringt, kann ich nicht entscheiden, immerhin scheint mir die Beobachtung sehr wichtig, weil dies ein saurer Farbstoff wäre in der lebenden Zelle (mit dem reinen Produkt beobachtete ich eine diffuse Färbung nie so schnell).

Anmerkung: Da methylierte Farbstoffe, wenn sie keine stark sauren Gruppen haben, nach diesen Erfahrungen in die lebende Zelle eindringen sollten,

---

<sup>1)</sup> Die Eosine des Handels gehen nach Overton nicht in die lebende Zelle.

habe ich die verschiedenen Rhodamin-Marken der badischen Anilin-Soda-Fabrik versucht, wo die CO . OH-Gruppe sicher intramolekular gebunden ist, und wo bei der Marke Rhodamin 3 B, die CO . OH-Gruppe äthylirt ist; aber bei keinem von diesen Farbstoffen konnte ich ein schnelles Eindringen beobachten, weil die CO . OH-Gruppe bei den einen frei wird, oder eventuell durch den Benzolkern das Eintreten verlangsamt wird, an dem die CO . OH-Gruppe sitzt.

Die morphologischen Resultate, im speziellen der Vergleich dieser mit den Angaben in der Litteratur, muss ich auf später verschieben, weil ich zuerst feststellen möchte, wodurch die teilweise Verschiedenheit der Resultate begründet ist, ferner warum sich z. B. nach Arnold die Granula in der abgetöteten Zelle, in den durch Müller, Osmiumsäure, Formol fixierten Zellen nicht sollen nachweisen lassen, und inwiefern mit diesen Färbungen Schlüsse auf die Struktur des lebenden Plasmas gezogen werden können. Denn aus den Vorversuchen ergeben sich Aussichten, dass von physikalisch-chemischen Gesichtspunkten aus hier klärende Versuche möglich sind. Fragt man kurz nach dem heutigen Stand der Vitalfärbung, nach den durch sie gelösten Problemen, nach den durch sie gestellten Rätseln, so muss man sagen, dass die Resultate in chemischer Hinsicht fast ganz negative waren. Die meisten Forscher suchten mit den zwei bekannten vitalen Farbstoffen: Methylenblau und Neutralrot in den verschiedenen Zellarten nach der Verschiedenheit der durch diese Farbstoffe darstellbaren Granula. Die Serienversuche mit andern Farben bleiben fast allé eine Art Autodidakten-Versuche, bei denen eine ganze Reihe wichtiger Praemissen vergessen wurden, so dass eine Kontrolle und Vergleich fast unmöglich ist, und zwar deshalb, weil die verwendeten Handelsfarben unter den gleichen Marken chemisch verschiedene Individuen sein können, und vor allem je nach der Fabrik verschiedene Zusätze enthalten können. In den meisten Fällen ist gar nicht mehr anders zu eruieren, was für Farben verwandt wurden, als dadurch, dass man mit den verschiedensten Marken Versuche anstellt, und diese so zufällig wieder herausfindet. Aussichten für eine prinzipielle Erklärung dieser Fragen, wie fremde Körper in das lebende Protoplasma zu bringen seien, eröffnet uns vor allem die Untersuchung über die Narkose.

Die Rätsel in der Vitalfärbung sind sehr komplizierter Art. Für die Lösung einiger geben diese Untersuchungen Anhalts-

punkte; für andere sind noch gar keine Aussichten der Lösung da, weil jede Parallele fehlt. Da nur basische Stoffe eindringen sollten in die lebende Zelle, nahm man oft an, dass die sich färbenden Teile saurer Natur seien; da ich aber nachgewiesen habe, dass vollständig äthylirtes Eosin auch dieselben Teile färbt, das doch mit den verschiedenen färbenden Substanzen nur die leichte Fettlöslichkeit gemein hat, ist bewiesen, dass die sog. Granula eine Löslichkeitstension gegen die Farbstoffe an den Tag legen, die physikalisch-chemisch eine Eigenschaft der flüssigen Fette ist und der Cholesterin-Lecithinsuspensionen, ohne dass ich jedoch in irgend einer chemischen Hinsicht darüber etwas aussagen könnte. Overton fand, dass auch Körper mit Hydroxyl- und sogar Carboxylgruppen Narkose erzeugen, also in die lebende Zelle eindringen und ihre Lebensfunktionen erst sekundär schädigen. Saure Farbstoffe, sagt Fischel, gehen nicht in die lebende Zelle. Auch ich konnte bei ausgesprochenen sauren Farbstoffen kein Eindringen beobachten; hingegen bei schwach sauren (OH-Gruppen), und halte es auch für möglich, dass z. B. verätherte Farbstoffe im lebenden Plasma zu sauren Farbstoffen gespalten werden könnten. Es ist auffallend, dass der Kern sich so lange vom Farbstoff frei hält, das legt die Vermutung nahe, dass er nur Substanzen aufnimmt im Leben, die durch das Plasma verändert worden sind, und es ist sehr wohl möglich, Substanzen der Art zu finden, die sich im Plasma schnell in der Weise verändern, dass sie auch der Kern aufnimmt. Ob die Beobachtungen, dass während des Absterbens der Zelle in sehr vielen Fällen eine Entfärbung eintritt, nur auf Reduktionsprozessen beruht, ist wohl noch nicht entschieden. Vollständig rätselhaft ist die toxische Wirkung der verschiedenen auch gesättigten Farben mit methylierten auxochromen Gruppen, besonders die Fälle, wo die Toxizität durch Methylierung sogar zunimmt. Um Vergleiche mit den stark giftigen Alkaloiden ziehen zu können, die in der Wirkung sich eventuell ähnlich verhalten, sind deren chemische Konstitutionen zu wenig erforscht.

---