

(Aus der Königl. dermatologischen Universitätsklinik zu Breslau.  
Director: Geh.-Rath Neisser.)

## Ueber die „vitale“ Färbbarkeit der Phagocyten des Menschen und einiger Säugethiere mit Neutralroth.

Eine experimentelle Studie

von

Dr. **J. Plato**, Assistent der Klinik.

Hierzu Tafel XXXV.

Der erste, der auf den Werth des 1879 von Witt entdeckten Neutralroths — eines Anilinfarbstoffes aus der Gruppe der Azine — für biologische Untersuchungen und „vitale“ Färbungen hinwies, war Ehrlich (10). E. stellte zunächst fest, dass Kaulquappen in dünnen wässerigen Neutralrothlösungen (1.0:10 000 bis 1.0:100 000) lange Zeit ohne nachweisbare Schädigung zu leben vermögen und im Laufe des ersten und zweiten Tages so viel vom Farbstoff aufnehmen, dass alle Gewebe dunkelroth erscheinen. Der Farbstoff soll in solchen Thieren unter anderem an intracelluläre Körnchen gebunden sein, die zum grossen Theile wenigstens präformirt seien. Besonders geeignet für vitale Färbungen erscheint E. das Neutralroth auch deshalb, weil der Diffusionswiderstand der lebenden Körperoberfläche gegen den Farbstoff ein geringer sei und im Körper und in den Zellen des Organismus Substanzen enthalten seien, die das Neutralroth mit der grössten Energie binden.

In Nothnagel's „Specieller Pathologie und Therapie“ kommen die Verfasser der „Aemie“, Ehrlich und Lazarus, auf das Neutralroth und seine Bedeutung für vitale Granulafärbung zurück. Es wird dort angeführt, dass sich der Farbstoff in reinem Wasser mit fuchsinrother Farbe löst, die aber auch in ganz schwach alkalischen Lösungen gelborange wird. Es wird ferner betont, dass das Neutralroth „eine geradezu maximale Verwandtschaft zu der Mehrzahl der Granula besitzt“ (S. 85), und weiter unten heisst es: „Zu erstreben sind Bilder, in denen

von der Zelle ausschliesslich die Granula gefärbt sich darbieten, während Protoplasma und Kern ganz ungefärbt geblieben sind. Kunstprodukte sind auch bei dieser Methode nicht ganz auszuschliessen und sind z. B. bei gerbstoffhaltigen Pflanzenzellen durch die Bildung und den Niederschlag von gerbstoffsaurem Farbsalz zu erklären. Jedoch ist es für den Geübten im Einzelfalle nicht schwer, die Kunstprodukte als solche zu erkennen. Die Art der Körnelung, ihre typische Vertheilung, die Vergleichung mit benachbarten Zellen, die Combination verschiedener Methoden, die Vergleichung desselben Objectes bei rein vitaler und bei „überlebender“ Färbung erleichtern das Urtheil hierüber und sichern vor Missverständnissen“.

„Die Mehrzahl der Granula der Wirbelthiere wird durch das Neutralroth orangeroth gefärbt, wie es dem schwach alkalischen Zustande dieser Gebilde entspricht. Viel seltener finden sich Körner, die sich im reinen Fuchsinton färben, und die mithin wohl eine schwach saure Reaktion besitzen müssen“.

Bald nach der ersten Publikation Ehrlichs erschien eine viele bemerkenswerthe Einzelheiten enthaltende Arbeit Galeotti's (12) über die Färbbarkeit lebender Zellen. Galeotti injicirte eine sehr grosse Anzahl von Farbstoffen — unter anderem auch Neutralrothlösungen — in die Bauchhöhle oder unter die Haut von Salamandern und Tritonen und untersuchte in der Regel nach 1—2 Tagen den Inhalt der Bauchhöhle und die Elemente der verschiedensten Organe. Leider behandelt er die Neutralrothversuche nur sehr kurz, da sie ungefähr dieselben Resultate ergaben, wie die Versuche mit den übrigen basischen Anilinfarben.

Galeotti zieht aus seinen Untersuchungen den Schluss, dass sich lebende Zellen niemals ganz färben, dass dagegen gewisse Elemente in den Zellen einen Farbstoff aufnehmen und festhalten können, und zwar solche Elemente, die keinen aktiven Antheil an der cellulären Funktion haben, sondern als Nährstoffe oder Produkte der Secretion im Zellleibe vorhanden sind.

Zu ganz entgegengesetzten Ergebnissen gelangt Przesmycki (35), der zu seinen hauptsächlich an Protozoen vorgenommenen Untersuchungen über vitale Kern- und Protoplasmafärbungen auch Neutralroth verwandte. Er hält es für eine vollständig bewiesene

Thatsache, dass der Kern sich nicht nur „während des Lebens der Zelle“, sondern auch „während seines eigenen Lebens“ mit Neutralroth färben kann.

Den färbbaren „Granulationen“ der Protozoen ist nur ein kleiner Abschnitt gewidmet, das Actinosphärium Eichh. betreffend. P. findet Unterschiede in der Grösse, Form und Färbbarkeit der strömenden Granula und vermuthet, dass eine bestimmte rundliche Art derselben, die bei Behandlung mit einem „modificirten“ Neutralroth sich dunkelviolettfärben, nichts anderes als Bacterien seien, die sich übrigens massenhaft in dem Glase, das die Actinosphären enthielt, entwickelt hatten. P. hält aber noch weitere Untersuchungen über diesen Punkt für nothwendig.

Prowaczek (34) verwandte nur Neutralroth und untersuchte hauptsächlich Paramäcien. Er fand, dass sich nach kurzer Zeit am äusseren Rande der sich eben bildenden Nahrungsvacuole eine schwach gefärbte Zone bildet, die „aus sehr feinen Körnchen zu bestehen scheint“. Er glaubt, dass diese Körnchen zur Verdauung und Assimilation in Beziehung stehen oder Träger von Fermenten seien. In krankhaft aussehenden Paramäcien fand er die Färbung nicht, oder nur schwach und diffus. „Beim Absterben der Protozoen machte sich vielfach eine Entfärbung bemerkbar, die man sich in der Weise erklären könnte, dass entweder die sich färbenden Substanzen heraustreten, oder weitgehenden chemischen Veränderungen unterlagen“. P. untersuchte auch Vorticellen, erwähnt aber nichts von gefärbten Nahrungsvacuolen.

Arnold (1) brachte möglichst dünne Hollunderplättchen in den Rückenlymphsack von Fröschen, entfernte dieselben nach 6, 12—18 Stunden wieder, beschickte sie mit Farbstoff in Lösung oder in Substanz, heftete sie an ein Deckgläschen an und untersuchte in der feuchten Kammer. Auch er verwandte u. A. das Neutralroth. Arnold sah in den Leucocyten sehr bald zahlreiche rothe Granula und „tropfenartige Gebilde“ auftreten, an denen er manche interessante Beobachtungen machen konnte, auf die ich später noch zurückkommen werde. Hier sei nur noch erwähnt, dass Arnold durchaus nicht auf dem Standpunkte Galeotti's zu stehen scheint, vielmehr der Ansicht ist, dass es sich in vielen Fällen wenigstens

um gefärbte Strukturbestandtheile der Zelle handelt.

Diese Arbeit Arnold's gab den Anstoss zu den vorliegenden Untersuchungen. Ich folgte der Anregung meines hochverehrten Chefs, des Herrn Geheimrath Neisser, die dort niedergelegten Beobachtungen an den Lymphkörperchen des Frosches mit den Befunden an den Elementen des gonorrhoeischen Urethralsecrets zu vergleichen, um so bereitwilliger, als ich mich bereits vor mehreren Jahren mit vitalen Zellfärbungen beschäftigt hatte. Ich konnte mich damals überzeugen, dass das Neutralroth wegen seiner geringen Giftwirkung, seines leichten Eindringens in den Zelleib, sowie wegen der Intensität der erzielten Färbung allen anderen gebräuchlichen Farbstoffen, auch dem Methylenblau, bei weitem vorzuziehen ist<sup>1)</sup>.

Es seien hier nur kurz meine damaligen Befunde über

**die vitale Färbbarkeit der Vorticellen<sup>2)</sup> mit Neutralroth mitgetheilt. (Siehe Fig. 1.)**

Diese häufig zu vielen Hunderten an den Blättern und Stengeln unserer Aquariumpflanzen (z. B. der *Vallisneria spiralis*) sitzenden äusserst zierlichen einzelligen Organismen sind für das Studium der vitalen Färbungen ganz besonders geeignet, da sie wegen ihrer Fixation am Pflanzentheile ihren Ort im mikroskopischen Gesichtsfelde nicht wesentlich verändern können. Ihr grosser hufeisenförmig gekrümmter Kern geht bei einer Schädigung desselben ganz charakteristische Veränderungen ein, die im wesentlichen in einer unregelmässigen Quellung bestehen. Einen Indicator für die Intensität der Lebensfunktionen des Zellprotoplasmas geben die continuirlichen Schwingungen des Wimperkranzes, die beim Absterben der Zelle immer langsamer werden, sowie die periodischen spiraligen Contractionen des Muskelstiels, die immer seltener werden. Bringt man solche Vorticellen mit einem schmalen Saume des Pflanzenblattes auf einen Objektträger in eine ganz dünne Neutralrothlösung, legt ein Deckgläschen auf und untersucht mit einem stärkeren Trockensystem, so sieht man fast

---

1) Beim Methylenblau tritt die Färbung der Einschlüsse später, eine diffuse Färbung des Zelleibes aber früher auf, als beim Neutralroth. (Vgl. auch Arnold, l. c. pg. 430.)

2) *Carchesium polypinum*.

in jeder Zelle mehrere deutlich roth gefärbte Kugeln, die sich bei näherer Betrachtung als aus zahlreichen kleinsten gefärbten Elementen von gleichmässiger Grösse zusammengesetzt erweisen (Fig. 1, N. V). Die Natur dieser gefärbten Kugeln war mir lange unklar, bis ich eines Tages zufällig beobachtete, wie eine solche an den Rand der Zelle rückte und ihren Inhalt — zahlreiche kleine Algenzellen — nach Aussen entleerte. Im Momente der Entleerung entfärbten sich die kleinen Algen. An Stelle der leuchtend roth gefärbten Kugel war im Protoplasma der Vorticelle nur eine kleine völlig ungefärbte Vacuole zu sehen (Fig. 1, N. V. 1). Es unterlag für mich keinem Zweifel mehr, dass die rothen Kugeln nichts anderes darstellten als den mit Neutralroth gefärbten Inhalt der Nahrungsvacuolen. Andere gefärbte Elemente waren in den ungeschädigten Vorticellen nicht nachzuweisen. Wenn diese aber nach kürzerer oder längerer Zeit abstarben, so trat zunächst eine Färbung des nunmehr im oben genannten Sinne veränderten Kernes, zuweilen auch des Nebenkernes, auf, bald hörten die Wimperbewegungen und die Contractionen des Muskelstieles auf, der Inhalt der Nahrungsvacuolen entfärbte sich und das Protoplasma nahm eine diffus rothe Färbung an. (Vgl. die analogen Beobachtungen Prowaczek's an Paramaecien l. c.)

#### Gewinnung des Materials und Technik der Leucocyten-Färbung.

Ich hatte mich bereits bei den ersten Untersuchungen davon überzeugt, dass sich auch in den Leucocyten mit Vorliebe solche Elemente färben, die durch Phagocytose in dieselben aufgenommen sind<sup>1)</sup>. Zur Feststellung der principiell wichtigen Frage, ob sich auch integrire Bestandtheile der Zellen färben, war es nothwendig, ein Ausgangsmaterial stets zur Verfügung zu haben, bei dem man mit einiger Wahrscheinlichkeit wenigstens abgelaufene phagocytäre Vorgänge ausschliessen konnte, mit anderen Worten, es mussten stets frisch aus der Blutbahn ausgewanderte Zellen verwandt werden. Bei dem Eiter der acuten Gonorrhoe ist dieses Postulat bis zu einem gewissen Grade erfüllt. Abgesehen von den Gonococcen finden wir dort nur selten

1) S. Berl. Klin. Woch. 1899. No. 49.

durch Phagocytose aufgenommene Gebilde. Dagegen ist stagnirender Eiter durchaus unbrauchbar, theils deshalb, weil ein Theil der Eiterzellen, und häufig weitaus der grösste, bereits abgestorben ist, theils, weil der andere lebende Theil reichlich Gelegenheit hatte, sich durch Phagocytose mit ihm fremden Gebilden zu beladen. Hierbei fällt noch erschwerend ins Gewicht, dass die Endprodukte der intracellulären Verdauung vielfach Körnchenform haben. Milzbrandbacillen, Schwänze von Spermatozoen, rothe Blutkörperchen und viele andere Gebilde zerfallen in den Phagocyten schliesslich zu feinsten Körnchen, die sich im frischen ungefärbten Präparat vielfach nicht von den präformirten Granulis unterscheiden lassen.

Am einfachsten war die Gewinnung des gonorrhöischen Urethralsecretes. Es kamen möglichst acute Fälle mit möglichst reichlichem Ausfluss zur Verwendung. Das Secret wurde mittelst nicht besonders fein ausgezogener Glascapillaren direkt vom Orificium urethrae entnommen und entweder gleich untersucht, oder in dem Ausschliff eines Objektträgers mit einer ungefähr gleich grossen Menge einer dünnen Kochsalz-Neutralrothlösung vermengt und für spätere Untersuchung in einer Petrischale, deren Boden mit einer mehrfachen Lage feuchten Fliesspapiers bedeckt wurde, aufbewahrt. Die Neutralrothlösung stellte ich mir von Zeit zu Zeit frisch her, indem ich 1 ccm einer kalt gesättigten wässerigen Lösung mit ca. 100 ccm physiologischer Kochsalzlösung mischte. (Wichtig ist, dass nur destillirtes Wasser verwandt wird.)

Da man frischen Gonorrhoeeiter sich nicht immer beschaffen kann und ausserdem die intracellulären Gonococcen vielfach stören, half ich mir auch zuweilen auf folgende Weise. Ich gab auf einen Objektträger einen Tropfen der Neutralrothlösung und brachte in denselben einige feinste Fäserchen von dem gewöhnlichen Fliesspapier. Dann entnahm ich mir einen Tropfen Blut aus der Fingerkuppe, setzte ihn dem Neutralrothtröpfchen zu und blies nun durch ein fein ausgezogenes Glasröhrchen einige Sekunden gegen das Tröpfchen, so dass eine lebhaftere Wirbelbewegung desselben entstand. Legt man nun ein Deckgläschen auf und untersucht bei stärkerer Vergrösserung, so kann man fast stets bemerken, dass eine gewisse Concentration der Leucocyten an den Fäserchen stattgefunden hat. Legt man nun an die eine Seite

des Deckglases ein Stückchen Fliesspapier und lässt von der anderen Seite des Deckglases langsam Neutralrothlösung aus einer Capillare zufließen, so gelingt es leicht durch die entstehende Strömung das Gesichtsfeld von rothen Blutkörperchen fast frei zu machen, während die weissen mit Vorliebe an den feinen Fasern hängen bleiben. Dieses Verfahren hat mir sehr gute Dienste geleistet, es erfordert aber einen gewissen Grad von Uebung, und misslingt im Anfange leicht. Das Gelingen ist im wesentlichen abhängig von der Stärke der Strömung und von der Dicke der zwischen Deckglas und Objektträger befindlichen Flüssigkeitsschicht. Ist die Strömung zu stark so wird einfach alles fortgeschwemmt. Dasselbe tritt ein, wenn das Deckgläschen durch die Flüssigkeit gehoben wird. Die Fäserchen liegen dann nicht flach auf und lassen auch die Leucocyten durch. Es empfiehlt sich daher, zuweilen während der Durchströmung einen leisen Druck auf das Deckglas auszuüben.

Ist das Verfahren gelungen, so findet man namentlich an der Fliesspapierseite des Deckglases leicht Fäserchen, denen Reihen und Gruppen von Leucocyten anliegen. Etwas Fibrin mit Blutplättchen vermengt, stört die Beobachtung wenig. Dieses Verfahren ist für das Studium der vitalen Leucocytenfärbung — soweit menschliche Leucocyten in Betracht kommen — ganz besonders geeignet, da die Zellen durch die Papierfasern arretirt sind. Wenn man nun eine dünne Aufschwemmung irgendwelcher Microorganismen in Neutralrothlösung unter dem Deckglase durchfließen lässt, so bleibt ein Theil der Microorganismen an den Leucocyten hängen und man hat nun die beste Gelegenheit, diejenigen Erscheinungen der vitalen Färbung zu beobachten, welche die Phagocytose begleiten. Man kann auch den Blutropfen unmittelbar nach der Entnahme mit der Aufschwemmung von Microorganismen in Neutralrothlösung vermengen und später erst in der angegebenen Weise rothe und weisse Blutkörperchen trennen, doch bietet die Methode im allgemeinen keine besonderen Vortheile dar.

Im folgenden bezeichne ich dieses Verfahren der Leucocytenisolirung aus einem Blutropfen kurz als „Isolirverfahren“.

Dieses Isolirverfahren ist natürlich auch für Thierblut verwendbar, jedoch zog ich es stets vor, reichlicheres Leuco-

cyten-Material durch Injektion steriler Bouillon in die Bauchhöhle zu gewinnen.

Man entfernt zu diesem Zwecke am besten in einem kleinen Bezirke zwischen Nabel und Symphyse mit einer Scheere die Haare, hebt mit einer Pincette eine Hautfalte auf und injicirt mit einer kleinen Spritze an der Basis der Falte bis zu 5 ccm Bouillon. Man darf die Nadel nicht zu tief einstechen, um eine Verletzung des Darmes zu vermeiden. Nach einer bestimmten Zeit (z. B.  $\frac{1}{4}$  h.) entnimmt man mit der Capillare auf folgende Weise: Man hebt in der Nähe der Einstichstelle wiederum eine kleine Hautfalte auf und macht mit einer scharfen Scheere in dieselbe einen kleinen Schnitt, bis die Fascie frei liegt. Alsdann führt man vorsichtig ein Glascapillare durch die Muskulatur in die Bauchhöhle ein. Man muss jegliche Blutung vermeiden. Vielfach steigt erst beim Herausziehen der Capillare das Exsudat in derselben auf.

Hat man das Leucocytenmaterial in das auf dem Objektträger befindliche Tröpfchen der Neutralrothlösung gebracht, so empfiehlt es sich, durch ein ausgezogenes Glasröhrchen ein paar Sekunden lang gegen den Tropfen zu blasen, um eine gleichmässige Vertheilung der Farblösung und nach Möglichkeit eine Trennung der häufig zusammengeballten Leucocyten zu erzielen. (Man legt dann ein Deckgläschen auf, drückt dieses leicht an und saugt etwa seitlich austretende Flüssigkeit mit Fliesspapier ab. Es entstehen dann bei der Untersuchung mit der Oelimmersion und bei Verschiebungen des Objektträgers keine so starken Strömungen.)

Dieses Blasen gegen den Tropfen hat auch noch einen anderen Vorzug. Man kann nämlich häufig genug beobachten, dass die fuchsinrothe Neutralrothlösung in den Glascapillaren gelb-orange wird, und zwar tritt dieser Umschlag häufig sehr schnell ein. Er ist darauf zurückzuführen, dass die Capillarwand Alkali an die Farblösung abgibt. Bläst man nun gegen den Tropfen, so neutralisirt die Kohlensäure der Expirationsluft zuweilen denselben wieder und die fuxinrothe Farbe tritt wieder auf.

### Befunde am Gonorrhoeiter.

An einem Präparat vom gonorrhoeischen Urethralsecrete, das nach obiger Vorschrift angefertigt ist, sieht man bei Anwen-

dung der Oelimmersion folgendes <sup>1)</sup>: Das Gesichtsfeld erscheint im allgemeinen ungefärbt, da die an sich schwache, durch das Serum des Eiters noch mehr verdünnte Neutralrothlösung in so dünner Schicht von unserem Auge nicht mehr als Farbe wahrgenommen wird. Die Eiterkörperchen selbst sind ebenfalls im allgemeinen farblos, dagegen sind in einem Theile derselben tief fuchsinrothe Gonococcen zu sehen, deren charakteristische Form ausserordentlich scharf hervortritt (cf. Fig. 5). Die Gonococcen heben sich theilweise so scharf vom ungefärbten Untergrunde ab, dass man sie auch bei schwacher Vergrösserung (Zeiss Oc. 2 Obj. BB.) als feinste tiefrothe Pünktchen erkennen kann. (Neben den Gonococcen kommen noch andere intracellulär gefärbte Gebilde vor, worüber später).

Andere Gonococcen, sogar in derselben Zelle, sind aber ungefärbt und auch der Farbenton zeigt alle Uebergänge vom Fuchsinroth zum Orange-, Braun- und Gelbroth und auch fast rein gelbe Farbtöne kommen vor. Dabei ist noch besonders zu bemerken, dass Gonococcen, die bei scharfer Einstellung tief fuchsinroth erscheinen, bei leichten Bewegungen der Mikrometerschraube gelbe Reflexe erkennen lassen. (Im folgenden ist deshalb immer nur von der Farbe die Rede, die bei schärfster Einstellung des gefärbten Objectes zu Tage tritt.)

Ich konnte ferner beobachten, wie gefärbt im Granuloplasma liegende Gonococcen sich entfärbten, wenn sie bei amöboiden Bewegungen der Zelle ins Hyaloplasma gelangten.

Extracelluläre Gonococcen färbten sich auch nach langem Verweilen in ganz dünnen Neutralrothlösungen nicht. Tötet man aber Gonococcen z. B. durch Erhitzen ab, so nehmen sie in etwas stärkeren Neutralrothlösungen einen ganz schwach rothen Farbenton an, der sich aber durchaus nicht mit der tiefrothen Färbung intracellulärer Gonococcen vergleichen lässt.

Um die Bedingungen dieser intracellulären Färbung kennen zu lernen, stellte ich eine Reihe von Untersuchungen an.

---

1) Vgl. U h m a, Archiv f. Derm. u. Syph. Bd. L, Heft II.

### I. Ueber die Abhängigkeit der Färbung der Leucocyten- einschlüsse von dem Leben der Zelle.

Ich habe in der Einleitung hervorgehoben, dass beim Absterben der Vorticellen der Färbung des Protoplasmas eine Entfärbung des Inhaltes der Nahrungsvacuolen vorangeht. Bei den Leucocyten liegen die Verhältnisse genau so. Man kann sich hiervon leicht überzeugen, wenn man ein Präparat, welches gefärbte Zelleinschlüsse enthält, auf einem heizbaren Objektische untersucht und die Temperatur langsam ansteigen lässt. Nach anfänglicher Zunahme der amöboiden Bewegungen treten, wenn das Thermometer einige 40° zeigt, ganz eigenartige Veränderungen im Aussehen der Zellen ein. Sie quellen auf und es erscheint ein mehr oder weniger breiter hyaliner peripherer Protoplasmasaum, der zahlreiche Ausläufer aussendet und wieder einzieht. Gleichzeitig beginnen eigenthümliche Strömungen auch im centralen körnigen Protoplasma, welches die gefärbten Einschlüsse — z. B. Gonococcen — enthält, die natürlich an diesen Strömungen passiv theilnehmen. Zunächst scheint bei diesen Vorgängen die Färbung der Gonococcen deutlicher zu werden. Es beruht dies aber sicher nur darauf, dass der Zelleib durch die Quellung für das durchfallende Licht durchlässiger geworden ist und die gefärbten Gebilde deutlicher hervortreten lässt.

Nach einiger Zeit verschwindet nun der periphere hyaline Protoplasma-Saum, es werden keine Ausläufer mehr ausgesandt und die Zelle nimmt Kugelform an. Die eigenthümlichen tanzenden und strömenden Bewegungen der Körnchen des Granuloplasmas dauern jedoch fort.

Obwohl nun doch durch die Verdunstung der Flüssigkeit während der Beobachtung eine gewisse Concentration der Farbstofflösung stattgefunden hat, tritt spätestens zu diesem Zeitpunkte eine deutliche Entfärbung der vorher gefärbten Zelleinschlüsse ein<sup>1)</sup>. Diese Entfärbung — z. B. bei den Gonococcen —

---

1) An überlebenden Gewebszellen hat Teichmann (pag. 35) ähnliche Beobachtungen mit Methylenblau gemacht. Er hatte einem Frosche 1 ccm einer 2 $\frac{1}{2}$ /<sub>10</sub>igen Methylenblaulösung in den Magen injicirt; nach 3 Stunden fand er in einem bestimmten Darmabschnitt die Epithelien vollkommen erfüllt mit stark blau gefärbten Körnern. „Liess man die Präparate einfach, vor Vertrocknung geschützt, an der

geht manchmal schnell innerhalb weniger Secunden vor sich, manchmal jedoch lässt sie sich längere Zeit verfolgen, wobei es auffallend ist, dass Hand in Hand mit ihr eine Veränderung des Farbentons eintritt. Ein vorher fuchsinrother Gonococcus wird orangebis braunroth und kurz vor der völligen Entfärbung zeigt er häufig einen leichten rein gelben Farbenton. Diese Entfärbung beruht wohl nicht auf einer Zerstörung des Farbstoffes, denn, lässt man nach der Entfärbung neuen Farbstoff zufließen, so tritt eventuell eine Färbung des Kerns und des Protoplasmas, aber niemals mehr eine distincte Gonococcenfärbung auf. Es unterliegt keinem Zweifel, dass die beschriebenen, die Entfärbung begleitenden Erscheinungen an den Zellen als Absterbeerscheinungen zu deuten sind, wie sie z. B. M a u r e l in seinem umfangreichen Buche: *Les Leucocytes du Sang* ausführlich beschrieben hat, und wir gehen wohl nicht fehl, wenn wir die Entfärbung der Einschlüsse in ihrer Ursache eben auf diese Zellschädigung zurückführen<sup>1)</sup>. Ich sage ausdrücklich Zellschädigung, denn es ist mir im höchsten Grade unwahrscheinlich, dass gleichzeitig mit der Entfärbung auch der Zelltod eintritt. Vielleicht ist die Schädigung dann stets eine so schwere, dass der Tod unvermeidlich eintreten muss. Setzen wir t o t e n oder künstlich a b g e t ö t e t e n Leucocyten Neutralrothlösung zu, so tritt stets eine deutliche Färbung des Kerns und eine leichte Färbung des Protoplasmas ein. Etwa vorhandene Einschlüsse färben sich dann aber niemals stärker als das übrige Protoplasma und auch absolut genommen ist die Intensität der Färbung dieser Einschlüsse eine auffallend geringe.

Die Thatsache, dass der Entfärbung der Einschlüsse sich in weitaus den meisten Fällen eine Färbung des Kerns oder des

---

Luft liegen, so ging der blaue Farbstoff allmählich in sein farbloses Leucoprodukt über“.

Mit der von mir beschriebenen Entfärbung im Hyaloplasma ist dieser Vorgang nicht ohne weiteres zu vergleichen. (S. R i c h t e r l. c. pag. 180.)

1) Arnold hat dieselbe Beobachtung mit Methylenblau an den Kaninchen-Leucocyten gemacht. Er sagt (l. c. pag. 431): „Später tritt eine Färbung der Kerne und eine diffus blaue Tinction des Zelleibes auf, während die Granula bei eintretendem Absterben (der Zelle. Verf.) sich zu entfärben scheinen.“

Protoplasmas nicht unmittelbar anschliesst, führt mich eben zu der Annahme, dass eine Schädigung der Zelle ausreicht, eine bestehende Färbung der Einschlüsse aufzuheben.

Aber eine Schädigung, ja eine Abtötung der Zelle führt nicht unbedingt und unter allen Umständen zur Entfärbung der „vital“ gefärbten Einschlüsse. Bereits Arnold hat hervorgehoben, dass die beste Methode, vital gefärbte Zellen zu conserviren, darin besteht, dieselben einfach auf dem Objectträger eintrocknen zu lassen, und dann in Canadabalsam einzuschliessen. Ich kann diese Thatsache nur bestätigen. Man kann solche eingetrocknete Zellen ruhig über der Flamme fixiren, ohne dass eine wesentliche Aenderung des Bildes eintritt. Trotzdem aber zeigen derartige „Dauerpräparate“ nicht entfernt das, was an den lebenden Zellen zu sehen ist. Ich hatte z. B. versucht, die in der Fig. 3 abgebildeten, abgetötete Milzbrandbacillen enthaltenden Meer-schweinchenleucocyten zu conserviren. Im Dauerpräparate waren in den sonst ungefärbten Zellen die grossen und intensiv gefärbten Milzbrandstäbchen der Zellen *a* und *d* recht gut zu sehen, die kleineren und relativ schwach gefärbten Körnchen waren aber nicht wiederzufinden. Dies ist eine Thatsache, von der ich mich immer wieder überzeugen konnte, dass bei dem Eintrocknungsverfahren stets zahlreiche Einzelheiten der vitalen Färbung verloren gehen. Immerhin bleibt es bis jetzt das beste Verfahren. Ich habe mich lange bemüht, es durch ein besseres zu ersetzen, aber mit durchaus negativem Erfolge. Alle Mittel, welche einen schnellen Zelltod bewirken, fixiren bis zu einem gewissen Grade und für relativ kurze Zeit den Zustand im Momente des eintretenden Todes. Erhitzt man z. B. ein frisches Präparat, wie Fig. 3 es zeigt, in der dünnen Neutralrothlösung stark, ohne dass jedoch eine völlige Verdunstung der Flüssigkeit stattfindet, und untersucht schnell, so findet man die Zellen viel kleiner, gleichsam geschrumpft, rund und eventuell im ganzen leicht gefärbt. Aber es besteht zunächst doch noch eine elective Färbung der Zelleinschlüsse. Dies ändert sich aber schnell. Die gefärbten Milzbrandbacillen blassen ab, der Zelleib färbt sich stärker und bald tritt auch eine Färbung des Zellkernes ein.

Aehnliche Erscheinungen beobachtet man, wenn man

frische Präparate Osmiumdämpfen aussetzt, während Formalindämpfe mehr diejenigen Erscheinungen erzeugen, welche wir bei der Einwirkung langsam ansteigender Hitze beobachten konnten, nämlich erst Entfärbung der Zelleinschlüsse und später erst Färbung des Protoplasmas und des Kerns. Durch diese und ähnliche Versuche mit Gasen und Zellgiften gewann ich die Ueberzeugung, dass die distincte Färbung der Zelleinschlüsse, wie wir sie z. B. bei Gonococcen und Milzbrandbacillen kennen gelernt haben, in hervorragendem Maasse abhängig ist von den Lebensfunctionen der einschliessenden Zelle, dass aber auch die Entfärbung nicht immer ein rein passiver, auf Diffusion des Farbstoffes beruhender Vorgang sei, dass dieser vielmehr begünstigt würde durch die Functionen des geschädigten Protoplasmas. Ein Einwurf ist aber bei diesen Versuchen möglich, nämlich der, dass es sich in vielen Fällen gar nicht um einen mittelbaren Einfluss der zellschädigenden Ursache durch die geschädigte Zelle auf die Färbung des Einschlusses gehandelt habe, sondern um eine unmittelbare Einwirkung derselben auf den Farbstoff. Dieser Einwurf ist a priori nicht von der Hand zu weisen. Er hat zunächst um so mehr Berechtigung, als die vitale Färbung der Zelleinschlüsse mit Neutralroth ein durcheus labiles, keineswegs auf starken chemischen Affinitäten beruhendes Phänomen ist. Der Beweis für diese Thatsache ist nicht schwer. Lässt man unter dem Deckglase eines Präparates, wie Fig. 3 es zeigt, einige Secunden physiologische Kochsalzlösung durchfliessen und entfernt dadurch den pericellulären Farbstoff, sicherlich ohne die Zelle irgendwie zu schädigen, so tritt prompt eine Entfärbung der Milzbrandbacillen etc. ein. Dies wäre unmöglich, wenn eine irgendwie nennenswerthe Bindung zwischen Milzbrandbacillus und Farbstoff stattgefunden hätte. Ausserdem hat bereits Arnold darauf hingewiesen, dass eine nachträgliche Färbung der vital gefärbten Gebilde im fixirten Präparat auch mit demselben Farbstoff nicht möglich ist. Ich kann dies im allgemeinen nur bestätigen. (Obwohl Ausnahmen vorkommen.)

Lässt man z. B. das oben erwähnte Milzbrandpräparat nach vorhergegangener Entfärbung mit physiologischer Kochsalzlösung, eintrocknen und färbt es mit stärkerer Neutralrothlösung nach, so ergiebt sich gleichsam das photographische Negativ der „vitalen“ Färbung. In den so gewonnenen Präparaten sind die

Zellkerne und das Protoplasma gefärbt, die Milzbrandbacillen aber mit Ausnahme weniger Körnchen ungefärbt. Sie durchziehen die Zellen als weisse Streifen. Ja es ist nicht einmal nöthig, die Zelleinschlüsse vorher mit physiologischer Kochsalzlösung zu entfärben, um das gleiche Bild im fixirten Präparat zu erhalten. Ich erwähnte oben, dass ich zur „vitalen“ Färbung eine phys. Kochsalz-Lösung verwandte, die in 100 cem 1 cem kalt gesättigter Neutralrothlösung enthält, und dass ich immer ungefähr gleich grosse Tröpfchen leucocythenhaltiges Exsudat und Farblösung verwandte, so dass die schliesslich färbende Concentration gleich 0,5 NR-Lösung zu 100 phys. Kochsalzlösung betrug. Ich erwähnte ferner, dass man das Bild der vitalen Färbung am besten fixiren kann, wenn man, wie Arnold dies gethan hat, Exsudat und Farblösung einfach eintrocknen lässt. Färbt man nun ein derartiges Trockenpräparat mit einer 40 mal stärkeren Neutralrothlösung, so tritt trotzdem eine Entfärbung der Milzbrandbacillen und nur eine Färbung des Kerns und des Protoplasmas ein.

Eine bestehende chemische Affinität zwischen Milzbrandbacillus und Farbstoff wäre durch den doch wenig eingreifenden Eintrocknungsprocess wohl nicht zerstört worden. Ich komme auf diese Verhältnisse später noch zurück und will hier nur noch einige Versuche erwähnen, die, wie mir scheint, einwandfrei beweisen, dass in der That eine Schädigung der Zelle die Färbung ihrer Einschlüsse beeinträchtigt resp. aufhebt, selbst wenn jede directe Einwirkung der zellschädigenden Ursache auf den Farbstoff oder das gefärbte Gebilde auszuschliessen ist.

Ich ging bei der Anordnung dieser Versuche von der That- sache aus, dass das Blutserum eines Thieres von der Species *A* für die Leucocyten eines Thieres von der Species *B* giftig ist. Man kann sich hiervon überzeugen, wenn man z. B. Meer- schweinchenleucocyten Kaninchenblutserum zusetzt oder umgekehrt. Nach kürzerer oder längerer Zeit treten dann an den Leucocyten Veränderungen auf, die im wesentlichen die gleichen sind, wie bei der langsamen Uebererwärmung. Waren in den Leucocyten vital gefärbte Gebilde, so entfärben sie sich.

Ich überzeugte mich aber bald, dass es sich nicht empfiehlt, bei diesen Versuchen Blutserum zu verwenden, welches in der üblichen Weise durch Aderlass oder Entbluten und nachheriges

Gerinnenlassen des Blutkuchens im Eisschrank gewonnen ist. Die secundären Veränderungen solcher Sera sind selbst bei vorsichtigstem Vorgehen zuweilen so bedeutend, dass eine geringe Menge Serum häufig genügt, die Leucocyten desselben Individuums schwer zu schädigen. Ich überzeugte mich hiervon z. B. bei einem Gonorrhöiker, dem aus bestimmten Gründen ein Aderlass gemacht worden war. Am anderen Tage fertigte ich von seinem Urethralsecrete, welches reichlich intracelluläre Gonococcen enthielt, ein vital gefärbtes Präparat an und setzte demselben eine Spur dieses seines eigenen Serums zu, welches ich einige Stunden vorher mittelst einer Pipette möglichst klar vom Blutkuchen abgehoben und in ein Reagensglas gefüllt hatte. Nach 10 Minuten war von einer Färbung der Gonococcen überhaupt nichts mehr zu sehen und die Zellen zeigten die für eine schwere Schädigung charakteristische Quellung und Körnchenströmung. (Ich vermute, dass die hohe zellschädigende Wirkung dieses Serums auf eine abnorm starke Alkalescenz desselben zurückzuführen war.) Ich verfuhr deshalb später folgendermassen: Ich injicirte einem Kaninchen und einem Meerschweinchen je einen ccm sterile Bouillon intraperitoneal. Nach einer Stunde injicirte ich denselben Tieren auch intraperitoneal je  $\frac{1}{2}$  ccm einer Aufschwellung von abgetöteten (durch Erhitzen) Milzbrandbacillen in Bouillon. Nach einer weiteren halben Stunde entnahm ich beiden Thieren mittelst einer graduirten Glascapillare je  $\frac{1}{100}$  ccm Exsudat, mischte dasselbe auf hohl geschliffenen Objektträgern mit der gleichen Menge Neutralrothlösung und schützte die Präparate vor Verdunstung durch Einlegen in Petrischalen, deren Boden mit feuchtem Fliesspapier bedeckt wurde.

Alsdann entnahm ich sowohl dem Kaninchen als dem Meerschweinchen aus irgend einer gesetzten Wunde je  $\frac{1}{100}$  ccm Blut (ebenfalls mittelst graduirter Glascapillaren) und vermischte dasselbe mit je  $\frac{9}{100}$  ccm Neutralrothlösung, die ich vorher in kleine an einer Seite ausgezogene und zugeschmolzene Glasröhrchen gefüllt hatte. Die Blut-Neutralrothmischungen schüttelte ich ordentlich durch und centrifugirte sie dann sofort. Die zelligen Elemente sammeln sich dann in dem ausgezogenen Theile des Röhrchens, während oben eine klare Flüssigkeit zurückbleibt, bestehend aus Neutralroth-Kochsalzlösung + Blutplasma. Die Concentration dieser Flüssigkeit wird bei gleichem Verfahren

wohl auch immer annähernd gleich gesetzt werden dürfen. Die Plasmalösung hob ich dann mittelst kleiner Pipetten ab und brachte sie in andere sterile kleine Röhrchen. Ich überzeugte mich nun, dass in den Exsudat-Leucocyten des Kaninchens und Meerschweinchens eine vitale Färbung, wie in der Fig. 3, eingetreten war und stellte nun folgende Mischungen — alles zu gleichen Theilen — auf planen Objectträgern her.

- I. Meerschweinchen-Leucocyten + Kaninchenplasma;
- II. Meerschweinchen-Leucocyten + Meerschweinchenplasma;
- III. Kaninchen-Leucocyten + Meerschweinchen-Plasma:
- IV. Kaninchen-Leucocyten + Kaninchen-Plasma.
- V. Ein Controllpräparat:  
Meerschweinchen-Leucocyten + Neutralrothlösung.
- VI. Ein Controllpräparat:  
Kaninchen-Leucocyten + Neutralrothlösung.

Mittelst kleiner Glasröhrchen blies ich dann gegen die Tropfen, um eine innige Vermischung zu erzielen, legte Deckgläschen auf, und brachte die Präparate in vorher bezeichnete Petrischalen, deren Böden mit feuchtem Fliesspapier bedeckt war.

Ueber die nun beobachteten Einzelheiten und über die Brauchbarkeit der Methode zum Nachweis zellschädigender Substanzen im Blute und anderen Flüssigkeiten hoffe ich demnächst eingehender berichten zu können. Hier will ich nur erwähnen, dass in meinen 5 in der eben beschriebenen Weise angestellten Versuchen stets zuerst ein Nachlassen resp. ein Verschwinden der Färbung in den mit dem fremdartigen Plasma zusammengebrachten Leucocyten eintrat. Und zwar blassten stets erst die kleineren gefärbten Partikel ab. Die Beobachtung erstreckte sich stets auf mehrere Stunden. In zwei von den 5 Versuchen war am Ende der Beobachtung in den Präparaten I und III die Färbung völlig verschwunden, während sie in den Präparaten II und IV noch deutlich erhalten war. In den übrigen 3 Versuchen waren so deutliche graduelle Unterschiede zu constatiren, dass ich aus dem Ausfall dieser Versuche die einwandfreie Ueberzeugung gewann, dass die Färbung der Zelleinschlüsse in hervorragendem Maasse abhängig ist von der Function und dem Lebenszustande der Zelle.

Zum Nachweis gradueller Unterschiede in der Färbung zweier Präparate empfiehlt es sich, nicht die Immersion, sondern ein schwächeres Trockensystem zu benutzen (z. B. Zeiss B. B) und die beiden zu vergleichenden Objecte auf einen Objectträger zu bringen, damit eine durchaus gleichmässige Einwirkung zufälliger Umstände (Verdunstung, Temperatur) gewährleistet ist. Bei Immersionsbetrachtung ist die Beurtheilung schwierig, da immer nur wenige Zellen in Betracht gezogen werden können und sich schliesslich in jedem Präparat Zellen finden lassen, deren Einschlüsse nur schwach gefärbt sind. Bei Anwendung schwächerer Linsen kann man die beiden Präparate leichter und schneller abwechselnd betrachten, und etwaige Unterschiede treten auch deutlicher hervor. Lichtquelle und Blendenstellung müssen natürlich durchaus die gleichen sein.

Es muss ferner stets berücksichtigt werden, dass die Entfärbung immer in den mittleren Partien des Präparates zuerst auftritt, während die Färbung an den Randpartien länger bestehen bleibt. Es empfiehlt sich deshalb in allen Präparaten stets nur die mittleren Partien in Betracht zu ziehen. Es ergab sich ferner bei diesen Untersuchungen die wichtige Thatsache, dass die Kernfärbung innerer, durch Phagocytose aufgenommener Leucocyten nicht anders zu deuten ist, als die Kernfärbung toter Leucocyten überhaupt, dass sie mit dem Lebenszustande des einschliessenden Leucocyten nichts zu thun hat. Dasselbe ergab sich vielfach für den gefärbten Bestandtheil der intracellulären rothen Blutkörperchen, der wahrscheinlich identisch ist mit dem Haemoglobin. (Vgl. Fig. 4, Zellen *a* und *c*). Wenn man defibrirtes Blut längere Zeit stehen lässt und dann mit Neutralroth untersucht, so findet man die Leucocyten häufig vollständig angefüllt mit ganz unregelmässig gestalteten rothen Elementen, zwischen welchen dann oft 4 bis 5 runde ungefärbte „Blutschatten“ liegen. Die rothen Elemente — das Haemoglobin — sind äusserst polymorph. Bei amöboiden Bewegungen der Zellen nehmen sie alle möglichen Formen an. Bei langsamer Ueberwärmung der Zellen behalten sie häufig ihre Farbe ebenso wie die Kerne innerer Leucocyten. Für das Studium der „Haemolysine“ dürften diese Verhältnisse von Bedeutung sein.

## II. Ueber die Natur der sich färbenden Gebilde.

Aus den Literaturangaben geht bereits hervor, dass bezüglich der Auffassung von der Natur der sich vital in den Zellen färbenden Gebilde die grössten Differenzen herrschen. Ganz isolirt mit seiner Ansicht steht Przesmycki, der fest überzeugt ist, dass ein lebender Kern sich färben kann, während die Mehrzahl der Autoren sich doch dem am schärfsten von Galeotti präcisirten Standpunkt nähert, dass sich nur solche Gebilde färben, die mit den eigentlichen Lebensfunctionen der Zelle nichts

zu thun haben, mögen sie nun durch Phagocytose aufgenommen oder secretartiger Natur sein.

Eine ganz besondere Berücksichtigung verdient an dieser Stelle der Standpunkt Ehrlich's, der einerseits die specifischen Granulationen als Stoffwechselprodukte der Zellen bezeichnet und andererseits dem Neutralroth „eine geradezu maximale Verwandtschaft zu der Mehrzahl der Granula“ vindicirt. Es ist mir bei meinen Untersuchungen aufgefallen, wie selten ich vital gefärbte specifische Granulationen zu Gesicht bekam. Betrachten wir z. B. den Gonorrhoeiter, so finden wir, abgesehen von den Gonococcen, in den meisten Zellen keinerlei gefärbte Gebilde. Die Granulationen der spärlichen eosinophilen Zellen zeigen einen leicht orangerothern Farbenton, der übrigens sehr wechselt, und ausserdem finden sich vereinzelt in den Zellen leuchtend orangeroth gefärbte Kugeln, die, wie ich später zeigen werde, vielfach nichts anderes sind, als durch Phagocytose aufgenommene und intracellulär leicht aufgequollene Spermatozoenköpfe. In den übrigen Zellen sieht man bei enger Blende deutlich Granulationen; ich will auch nicht leugnen, dass sie alsdann zuweilen einen ganz leichten gelblichen Farbenton besitzen, der aber bei offener Blende nicht erkennbar ist, während doch die Gonococcen alsdann als tiefrothe Gebilde hervortreten. Obwohl also doch der Farbstoff genügend lange eingewirkt haben muss, ist es nicht zu einer vitalen Färbung der in allen Zellen vorhandenen und durch Triacidfärbung des fixirten Präparates leicht nachweisbaren neutrophilen Körnelung gekommen. Auch in den nach dem „Isolirverfahren“ hergestellten Präparaten vom Menschen habe ich nur äusserst selten mit Neutralroth gefärbte specifische Granulationen gefunden, obwohl auch dort der Farbstoff in die Zelle eingebracht war<sup>1)</sup>.

Es bleiben in diesen Präparaten an den Fasern nicht nur die Leucocyten, sondern auch etwas Fibrin und zahlreiche Blutplättchen haften, welche vielfach 3 bis 4 mit Neutralroth fuchsroth gefärbte, äusserst feine Körnchen enthalten. Diese Blutplättchen werden von

---

1) Beim Methylenblau liegen die Verhältnisse wohl ähnlich. Teichmann (l. c. pag. 33) hat die Einwirkung von Pilocarpinjectionen auf die rothen Blutkörperchen des Frosches studirt. Er fand bei vitaler Methylenblaufärbung in diesen zahlreiche hellblaue bis schwarzblaue Körnchen und führt ausdrücklich an: „Bemerkenswerth ist, dass die Granula der Leucocyten nicht blau gefärbt sind.“

benachbarten Phagocyten aufgenommen und färben sich, sobald sie ins Innere der Zelle gelangt sind.

Auffällig war mir auch das häufige Ausbleiben jeglicher Granulafärbung bei meinen Versuchen an Meerschweinchen.

Die Granulationen der Meerschweinchen-Leucocyten sind in neuester Zeit von Kurloff im Ehrlich'schen Laboratorium eingehend studirt worden, wobei sich bemerkenswerthe Resultate ergaben, die vorläufig in der „Anämie“ (l. c.) niedergelegt sind.

Trotz des besonderen Reichthums der Meerschweinchen-Leucocyten an verschiedenen Granulationen fand ich die letzteren doch fast nie vital gefärbt, obwohl die Einschlüsse intensiv tingirt waren und die Triacid-Trockenpräparate die Granulationen mit Sicherheit nachwiesen.

Nur die eosinophilen (resp. nigrosinophilen) Granulationen zeigten in der Regel eine ausserdem wenig intensive und wenig beständige Färbung<sup>1)</sup>. In den übrigen Zellen kamen zwar auch zuweilen gefärbte Körnchen vor, die aber sicher nicht identisch waren mit den specifischen Granulis, da sie nach Zahl und Anordnung stets sehr differirten. Wie derartige vital färbbare, den specifischen nicht unähnliche „Granula“ in den Zellen entstehen können, zeigt am besten folgender Versuch. Wenn man bei einem Meerschweinchen durch intraperitoneale Injection von steriler Bouillon und bei einem anderen durch intraperitoneale Injection von Zelldetritus (aus Abscessen oder Bubonen) eine Leucocytose in der Bauchhöhle erzeugt und die Exsudat-Leucocyten bei vitaler und „überlebender“ Färbung mit einander vergleicht, so kann man Folgendes feststellen: Bei vitaler Färbung zeigen die Leucocyten des Bouillon-Thieres spärliche gefärbte Körnchen, die Leucocyten des Detritus-Thieres sind vollgepfropft mit rothen „Granulis“, den durch Phagocytose aufgenommenen Partikeln des injicirten Zelldetritus. Bei überlebender Färbung sind alle krassen Unterschiede verschwunden, in allen Leucocyten sind die specifischen Granulationen gefärbt, aber bei genauer Betrachtung erkennt man, dass die gefärbten

---

1) Arnold machte dieselbe Wahrnehmung; er sagt (l. c. pg. 425): „Die eosinophilen Granula färben sich bei der vitalen Fütterung mit Neutralroth sehr frühzeitig, aber verschieden intensiv, manchmal verschwindet die rothe Färbung wieder; eine solche Entfärbung kommt übrigens auch bei anderen Granula vor.“

Granula in den Leucocyten des Detritus-Thieres auseinander gedrängt sind und dass zwischen ihnen zahlreiche ungefärbte Körnchen liegen, die zweifellos identisch sind mit den bei vitaler Färbung so deutlich hervortretenden Gebilden<sup>1)</sup>).

Eine vitale „Granula“-Färbung, die sich in ihrer Intensität mit der Färbung der Zelleinschlüsse, z. B. der Milzbrandbacillen, messen kann, fand ich bei den Exsudat-Leucocyten der weissen Maus. Fast in jedem durch Bouillon-Injektion erzeugten Exsudat waren sie relativ zahlreich vertreten und fielen schon bei schwacher Vergrösserung durch ihre intensive fuchsinrothe Färbung auf. Bei Immersion-Betrachtung ergab sich, dass diese Zellen vollgepfropft waren von relativ grossen runden Körnern, die an einer Stelle zuweilen einen kleinen knopfförmigen Ansatz hatten. Auffallend war mir, dass dieselben Gebilde, allerdings ungefärbt, auch extracellulär vorkamen. Ich behandelte deshalb solche Präparate nach dem „Isolirverfahren“, wodurch ich erreichte, dass an den Fasern eine innige Berührung der Leucocyten mit den freien „Granulis“ zu stande kam. Ich konnte dann stets beobachten, dass die freien Granula von benachbarten Leucocyten aufgenommen wurden, worauf sie sich intracellulär genau so färbten wie die Körnchen der beschriebenen Zellen.

Ich kann zwar nicht beweisen, dass diese Zellen ihre Granulationen stets durch Phagocytose erwerben, aber die Möglichkeit dieser Thatsache muss ohne weiteres zugegeben werden. Auch bezüglich der sich häufig vital färbenden eosinophilen Granula neigen neuere Bearbeiter unter Angabe triftiger Gründe der Ansicht zu, dass dieselben durch Phagocytose entstehen und auf die Aufnahme von Bestandtheilen der rothen Blutkörperchen zurückzuführen sind; nach Barker (3) enthalten die eosinophilen Körnelungen sogar Eisen. Ich konnte also bei meinen Untersuchungen im allgemeinen die Angabe Ehrlich's von der maximalen Verwandtschaft des Neutralroths zu der Mehrzahl der Granula nicht bestätigen, namentlich was diejenigen Granulationen

---

1) Arnold (l. c. pg. 437) hat ähnliche Bedenken. Er sagt: Die Existenz zahlreicher nicht gefärbter Körner zwischen den gefärbten beweist, dass die gefärbten Granula nur einen Theil der körnigen Structurelemente der Zellen — der Plasmosomen — darstellen und zwar wahrscheinlich solche, welche bereits eine Umwandlung erfahren haben.“

anbetrifft, deren intracelluläre Entstehung und „Secretnatur“ am wenigsten angezweifelt werden kann, z. B. die neutrophile Körnelung der menschlichen und die pseudoeosinophile der Leucocyten des Meerschweinchens. Trotzdem mag diese maximale Verwandtschaft vielleicht zu Recht bestehen und in meinen Versuchen vielleicht nur deshalb nicht zum deutlichen Ausdruck gekommen sein, weil die Concentration der angewandten Farblösung eine geringe und die Zeit ihrer Einwirkung eine kurze war. Allerdings genügte Concentration und Zeit stets zur Färbung der durch Phagocytose aufgenommenen Gebilde sowie derjenigen „Granula“, deren ectogene Entstehung eine gewisse Wahrscheinlichkeit hat. Man könnte von einer maximalen Verwandtschaft des Neutralroths zu den durch Phagocytose entstandenen Zeileinschlüssen sprechen, wenn dem Zustandekommen dieser Färbung in der Regel nicht ganz andere Momente zu Grunde lägen, als eine „Verwandtschaft“ des Farbstoffes zum gefärbten Gebilde.

Ich konnte mich im übrigen mit Sicherheit überzeugen, dass frische Leucocyten in der überwiegenden Mehrzahl auf dem Höhepunkte ihrer Funktion, bei der Phagocytose, keinerlei vital gefärbte Structurelemente besitzen, wenigstens nicht bei dem von mir angewandten Verfahren, welches zur Darstellung der Zeileinschlüsse so vorzüglich geeignet ist. Ich injicirte nun Thieren, bei denen ich vorher durch Bouillon ein intraperitoneales Exsudat erzeugt hatte, Aufschwemmungen zahlreicher mir zur Verfügung stehender Bakterienkulturen in die Bauchhöhle und untersuchte dann das Verhalten der mit den injicirten Bakterien beladenen Phagocyten bei vitaler Färbung. Zur Verwendung gelangten Typhus- und Colibacillen, Vibrio Finkler, Vibrio Metschnikoff, Staphylococcen, Streptococcen und Gonococcen, Diplococcus flavus und subflavus, Diphtherie-, Tuberkel- und Milzbrandbacillen. Es ist mir nicht möglich hier auch nur auf einen geringen Theil der beobachteten Einzelheiten einzugehen, die auch bei ein und demselben Mikroorganismus und demselben Versuchsthier verschieden waren nach Intensität, Nüance und Dauer der Färbung, je nachdem frische oder alte, lebende oder abgetödtete Kulturen zur Verwendung kamen. Dagegen möchte ich etwas länger verweilen bei den Versuchen mit Milzbrandbacillen an Meerschweinchchen, da sie den derartigen Untersuchungen ferner stehenden am

besten in den Gegenstand einführen und auch aus technischen Gründen für den Anfang am meisten zu empfehlen sind.

Ich verwandte hochvirulente Agarkulturen, die Meerschweinchen bei subcutaner Impfung innerhalb 48 h. tödteten. Die Kulturen waren in der Regel nicht älter als 18 Stunden. Die Bacillen einer solchen Kultur wurden in 1 ccm steriler Bouillon aufgeschwemmt und  $\frac{1}{4}$  ccm dieser Aufschwemmung einem Meerschweinchen, bei dem vorher ein intraperitoneales Exsudat erzeugt worden war, mittelst einer Pravazspitze in die Bauchhöhle injicirt. (Bei den Versuchen mit abgetödteten Milzbrandbacillen wurde die Bouillonaufschwemmung ca. 5 Minuten lang im Wasserbade auf 80° erhitzt.) Von Zeit zu Zeit wurde dann mit einer Glas-capillare Exsudat aus der Bauchhöhle entnommen. In der Regel waren nach ca. 15 Minuten die meisten Bacillen von den Leucocyten aufgenommen. Ein Theil der Milzbrandbacillen befindet sich in der Regel noch extracellulär. Auch das Studium dieser in ihrem Verhalten zum Neutralroth ist sehr interessant. Da hierüber aber im Buchner'schen Laboratorium eingehendere Untersuchungen von Nakanishi<sup>1)</sup> angestellt worden sind, so kann ich mich hier mit einem Hinweis auf dieselben und eine Bestätigung ihrer Angaben begnügen.

Die Zellen der Fig. 3 entstammen dem Exsudate eines Meerschweinchens, welches,  $\frac{1}{4}$  h. vor der Entnahme, abgetödtete Milzbrandbacillen injicirt erhalten hatte. Die Zeichnung wurde unmittelbar nach der Fertigstellung und Einstellung des Präparates mit der Zeiss'schen Oelimmersion begonnen. Wir sehen in den Zellen *a*, *b*, *c*, *d* und *e* mehr oder minder lange und veränderte, mit Neutralroth intensiv gefärbte Milzbrandstäbchen. (Die extracellulären Stäbchen hatten kaum eine Spur der Farbe angenommen.) Die wesentlichste Veränderung der Bacillen besteht in einer unregelmässigen, namentlich an den Enden deutlichen Aufquellung, sowie in einem Zerfall zu reihenweise angeordneten Körnchen. Der Vorgang der Aufquellung und des Zerfalls konnte unter dem Mikroskope beobachtet werden<sup>2)</sup>. Die

1) Münch. med. Woch. 1900, No. 6.

2) Arnold spricht zuweilen von einer Confluenz mehrerer Granula zu tropfenförmigen Gebilden. Ich habe etwas derartiges nur beim Haemoglobin gesehen, sonst analoge Bilder umgekehrt so deuten müssen, dass ein beginnender Zerfall aufgequollener „tropfenförmiger“ Gebilde in einzelne Körnchen vorlag.

Zelle *a* wurde zuletzt gezeichnet. Bei Beginn der Beobachtung war in der Zelle ein grosses Stäbchen ungefähr wie in der Zelle *d* zu sehen, und rechts davon ein kleines in Grösse und Form am ähnlichsten dem in der Zelle *c* am meisten links liegenden. Während der ca. 15 Minuten dauernden Beobachtung streckte sich das grosse Stäbchen der Zelle *a* und zerfiel theilweise in Körnchen, welche den Bacillenleib — soweit man von einem solchen noch reden darf — verliessen und rechts und links davon ins Protoplasma der Zelle traten. Das kleine rechts gelegene Stäbchen zerfiel in Körnchen, die aber ihre ursprüngliche Anordnung beibehielten. Schliesslich trat ein Stillstand in den Veränderungen ein, so dass die Zelle gezeichnet werden konnte. Die Quellung der Stäbchen ist häufig eine hochgradige bis zu Kugelform, ohne dass es zu einem Zerfall kommt (Zelle *c*, links unten)<sup>1)</sup>.

Ich konnte derartige Beobachtungen noch häufig wiederholen. Die Zerstörung der intracellulären Bacillen spielte sich stets unter dem Bilde der Aufquellung und des Zerfalls in immer kleinere Körnchen ab, die aber noch lange ihre Färbbarkeit mit Neutralroth beibehielten. Eine nicht färbbare Hülle blieb häufig im Zelleib zurück.

Fig. 2 zeigt die Exsudat-Leucocyten eines Meerschweinchens,

---

1) Ein sehr gutes Object zum Studium der kugeligen Aufquellung sind die Typhusbacillen in Meerschweinchen-Leucocyten. Wenn man vom Peritoneal-Exsudat ungefähr  $\frac{1}{2}$  h. nach Injection der Bouillon-aufschwemmung entnimmt, so findet man fast in allen Leucocyten der Form nach gut erhaltene Bacillen, einzeln oder in kleinen Fäden von 3—4 Exemplaren. Nach  $1\frac{1}{2}$  bis 2stündigem Aufenthalt in den Leucocyten sind aber fast alle Bacillen kugelig aufgequollen und äusserst intensiv gefärbt. Die ursprünglichen Fäden sehen dann aus wie kleine Ketten. Ein äusserst zierliches Bild. Man kann den ganzen Vorgang unter dem Mikroskope verfolgen, wenn man nur von Zeit zu Zeit eine Spur Neutralrothlösung zufließen lässt, damit das Präparat nicht austrocknet.

H. Rossel (18) glaubt, dass bei der intracellulären Abtödtung der Bacterien an eine Einwirkung der Nucleinsäure auf dieselben gedacht werden könne. Im Stadium der Aufquellung reagiren die Bacterien — wie die Färbung mit Neutralroth zeigt — meistens alkalisch, so dass an eine Säurewirkung nur für die ersten schädigenden oder abtödtenden Einwirkungen gedacht werden kann, und auch hier nur in vereinzelt Fällen.

welches bei einigen früheren Versuchen abgetödtete Milzbrandbacillen injicirt erhalten hatte. Ich verwandte es zu dem vorliegenden Versuch mit lebenden Milzbrandbacillen, da diese von den Leucocyten im Sinne einer Immunisirung vorbehandelter Thiere leichter aufgenommen werden. Vor der Injection der lebenden Bacillen überzeugte ich mich durch eine Probe-Entnahme davon, dass die Exsudatzellen keinerlei bacillenähnliche Einschlüsse enthielten. Im übrigen verfuhr ich wie bei dem vorigen Versuch.

Der Unterschied zwischen diesen Bacillen und den abgetödteten des vorigen Versuches ist auffallend. Hier ist kaum etwas von Aufquellung und Zerfall zu sehen, die Intensität der Färbung ist eine viel geringere, und die letztere blieb vor allem nur wenige Minuten bestehen. Die meisten Zellen konnten in Folge dessen nur skizzirt werden, die Farbe musste z. T. nachträglich eingezeichnet werden.

Fig. 4 zeigt die Exsudat-Leucocyten eines Meerschweinchens, welches Meerschweinchens-Leucocyten, die einige Minuten einer Temperatur von ca.  $50^{\circ}$  ausgesetzt gewesen waren, injicirt erhalten hatte. In der Zelle *a* sehen wir einen Leucocyten, der einen anderen durch Phagocytose aufgenommen hat. Der Kern des inneren Leucocyten ist gefärbt, während das Protoplasma ungefärbt geblieben ist. Dies ist die Regel für durch Phagocytose aufgenommene Leucocyten, so lange sie in ihrem Wirthe noch ein morphologisches Ganzes bilden. Auch färbbare Einschlüsse des inneren Leucocyten fand ich stets ungefärbt.

Das Schicksal dieser durch Phagocytose aufgenommenen Leucocyten wird durch die Zellen *b* und *d* illustriert. In beiden Zellen lagen bei Beginn der über  $1\frac{1}{2}$  h. Stunden sich erstreckenden Beobachtung morphologisch intacte Leucocyten, wie in der Zelle *a*.

Die Abgrenzung des inneren Leucocyten gegen den äusseren ist im Anfang stets eine scharfe. Infolge eines ganz eigenthümlichen, am besten vielleicht mit dem Ausdrucke „Auslaugung“ zu belegenden Vorganges, strömten in der Zelle *b* sowohl Kern als Protoplasmabestandtheile des inneren Leucocyten in das Protoplasma des äusseren, wobei man den Eindruck gewann, dass an der Grenze beider Leucocyten ein gewisser Widerstand überwunden wurde. Die ausgegangenen Bestandtheile nahmen im äusseren, lebenden Leuco-

cyten eine ganz unregelmässige Lage ein und behielten noch lange ihre Färbung bei. Der innere Leucocyt schrumpfte bedeutend zusammen. (S. unterer Pol der Zelle *b*.)

Ganz anders verhielt sich der innere Leucocyt in der Zelle *d*. Hier verschwand bald jede Begrenzung des inneren gegen den äusseren Leucocyten und die gefärbten Kern- und Protoplasmatheile lagen frei in der einschliessenden Zelle.

In der Zelle *c* liegt ein durch Phagocytose aufgenommenes rothes Blutkörperchen. Bei Beginn der Beobachtung stellte es eine leuchtend roth gefärbte Kugel dar, während sonst in der Zelle keinerlei gefärbte Gebilde vorhanden waren. Nach und nach traten aber immer mehr gefärbte Körnchen in das Zellprotoplasma, und schliesslich blieb ein fast ungefärbter „Blut-schatten“ in der Zelle zurück.

An den mit Neutralroth vital gefärbten Gebilden erkennt man sehr häufig einen hellen Hof, der auch in den Zeichnungen mehr oder minder deutlich zum Ausdruck kommt. Dieser Hof scheint in vielen Fällen wenigstens zu dem aufgenommenen Gebilde selbst zu gehören (Schleimhüllen?). Bei vitaler Färbung mit Methylenblau nimmt er häufig den Farbstoff an, z. B. bei der Gonococcenfärbung.

Ich erwähnte bereits in meiner vorläufigen Mittheilung, dass in den Eiterzellen des gonorrhoeischen Urethralsecrets häufig leuchtend roth gefärbte Kugeln vorkommen. Ich habe diesen Gebilden später grosse Aufmerksamkeit geschenkt und bin zu der Ueberzeugung gekommen, dass sie einen doppelten Ursprung haben können. Die Kugeln treten häufig dann auf, wenn es durch instrumentelle Eingriffe zu leichten Blutungen in die Urethra gekommen ist und sind z. T. nichts anderes als durch Phagocytose aufgenommene rothe Blutkörperchen. Ein anderer Theil dieser Kugeln hat einen ganz anderen Ursprung. Ich wurde auf denselben aufmerksam, als ich den Inhalt einer gonorrhoeisch erkrankten Samenblase kurz nach der Expression derselben untersuchte. Das Secret enthielt zahlreiche lebende Spermatozoen, auf deren Verhalten zum Neutralroth ich vielleicht an anderer Stelle näher eingehe. Hier möchte ich nur erwähnen, dass fast in allen Eiterkörperchen neben fuxinrothen Gonococcen orange- bis braunroth gefärbte Spermatozoenköpfe lagen, die theils ihre charakteristische Form behalten hatten, theils aber

zu Kugeln aufgequollen waren, die sich in allen Punkten genau wie die Kugeln der früher untersuchten Urethral-Secretzellen verhielten. Schwanz und Mittelstück der Spermatozoen waren theils erhalten und leicht roth gefärbt, theils in zahlreiche kleine rothe Kugeln zerfallen, die durch ihre Anordnung noch deutlich den Verlauf des Fadens erkennen liessen. Innerhalb des roth gefärbten Kopfes war häufig ein ungefärbter kleiner Streifen zu sehen, der vermuthlich identisch ist mit den z. B. im Kopfe der Hundespermatozoen zu findenden, mit Osmium sich färbenden Gebilde, die ich (32) im Arch. f. mikr. Anat. Bd. 48, Tafel XII, Fig. 8 abgebildet habe.

Dieser Befund veranlasste mich, das Verhalten intracellulärer Fetttröpfchen zum Neutralroth zu untersuchen. Ich injicirte deshalb in die Bauchhöhle von Meerschweinchen eine Suspension von Olivenöl in Bouillon. Die Fetttröpfchen wurden prompt von den Leucocyten aufgenommen, blieben aber völlig ungefärbt. Ich injicirte ferner getrocknetes und nachher fein pulverisirtes Hühnereiweiss.

In den Leucocyten traten darauf grosse matt orangeroth gefärbte unregelmässig contourirte Schollen auf.

Ich stellte nun noch weitere Untersuchungen darüber an, ob nicht doch auch auf einem anderen Wege als dem der Phagocytose vital färbbare Gebilde in den Leucocyten auftreten können.

Ich dachte hierbei zunächst an die Vacuolen, von denen es in der einschlägigen Literatur oft genug behauptet worden ist, dass sie sich vital färben können<sup>1)</sup>. Ich glaube, dass ein grosser Theil dieser Angaben auf einem allerdings sehr nahe liegenden Irrthum beruht, der darauf zurückzuführen ist, dass viele sich vital färbende Zelleinschlüsse Kugelform haben und im fixirten Präparat — da sie sich dort vielfach nicht färben — den Eindruck von Vacuolen erwecken. Ganz besonders instructiv bezüglich dieser Frage war mir der Eiter eines Prostataabscesses. Fast jede Zelle dieses Eiters enthielt mehrere unzweifelhafte

---

1) Teichmann (l. c. pg. 33) behandelt die Färbung der „Vacuolen“ ausführlich, fügt aber hinzu: „wir wollen der Kürze halber diesen Ausdruck beibehalten, obwohl auch wir die betreffenden Bildungen nicht für Flüssigkeitsräume halten.“

Vacuolen, und in jeder Vacuole befanden sich mehrere ungefärbte Diplococcenpaare (keine Gonococcen), die eine lebhaftige Molecularbewegung zeigten.

Im körnigen Protoplasma lagen ausserdem ziemlich intensiv gefärbte kurze Stäbchen meistens in Diploform. Die Vacuolen selbst aber waren völlig ungefärbt. Es stimmt dies ja auch mit den Befunden bei den Vorticellen überein. Ich ging nun auch so vor, dass ich eine Zeit lang jede Zelle, die vital gefärbte Kugeln enthielt, mittelst physiologischer Kochsalzlösung entfärbte. Niemals fand ich dann bei der Untersuchung mit enger Blende innerhalb der entfärbten Kugeln Partikel, die die Brown'sche Molecularbewegung zeigten, überhaupt traten dann meistens Strukturen auf, die Vacuolen mit Sicherheit ausschliessen mussten.

Mir ist die vitale Färbbarkeit der Vacuolen in den Leucocyten im höchsten Grade unwahrscheinlich.

Ich suchte ferner auf experimentellem Wege zu entscheiden, ob nicht mechanische Einflüsse, die eine partielle Schädigung des Protoplasmas hervorrufen können, zu einem Auftreten vital färbbarer Gebilde führen. Ich injicirte zum Beispiel in die Bauchhöhle von Meeresschweinchen chinesische Tusche sowie feinste Eisenstäubchen. Man könnte sich ja denken, dass derartige Substanzen, wenn sie in der Zelle liegen, auf diese einen Reiz ausüben, und dass die Zelle auf diesen Reiz hin um den Fremdkörper einen Stoff ausscheidet, der sich vital mit Neutralroth färbt. Ich habe niemals etwas derartiges beobachten können, obwohl ich nie versäumte, das Präparat, welches doch stets vital gefärbte Kugeln enthielt, unter steter Beobachtung zu entfärben. Ich hätte dann doch wenigstens einige male im Inneren einer solchen Kugel nach der Entfärbung ein Tuschekörnchen etc. finden müssen. Eine derartige Ausscheidung um den Fremdkörper trat auch dann nicht auf, wenn ich durch leichtes rotirendes Reiben des Deckgläschens auf dem Objectträger eine partielle Schädigung des Protoplasmas derjenigen Zellen herbeizuführen versucht hatte, die die Körnchen enthielten.

Ich kam innerhalb des Rahmens meiner Untersuchungen also zu dem Schlusse, dass die sich in den Leucocyten vital färbenden

Substanzen eiweissartiger Natur und durch Phagocytose aufgenommen sind, dass ferner eine andere Art der Entstehung dieser Gebilde als durch Phagocytose unbewiesen und unwahrscheinlich ist. Die „specifischen“ Granulationen möchte ich hier nicht näher in Betracht ziehen, da wir über ihre Entstehung nichts Bestimmtes wissen.

### III. Ueber die Abhängigkeit der Färbung von der Lage des färbbaren Gebildes innerhalb der Zelle.

Wir hatten im vorigen Abschnitte gesehen, dass abgetödtete Milzbrandbacillen, wenn sie von Leucocyten aufgenommen sind, sich mit Neutralroth sehr intensiv färben, dass aber auch extracelluläre Milzbrandbacillen in der gleich starken Farblösung eine wenn auch sehr geringe Färbung annehmen. Es galt nun zu entscheiden, ob die so intensive Färbung innerhalb der Zelle gebunden sei an die Lage, oder ob sie nur hervorgerufen sei durch irgendwelche in der Zelle aufgetretenen Veränderungen des Bacillus selbst, in dem Sinne, dass der Bacillus, nachdem die Veränderungen einmal eingetreten wären, seine intensive Färbbarkeit auch extracellulär beibehalten würde. Das letztere ist aber durchaus nicht der Fall. Man kann sich auf folgende Weise davon überzeugen: Wenn man sich ein Exsudat verschafft hat, wie es den in Fig. 3 abgebildeten Zellen entspricht, und ein Präparat angefertigt hat mit einem recht dünnen und elastischen Deckgläschen, so wird es nicht schwer sein, mittelst eines Streifen Fliesspapiers so viel Flüssigkeit seitlich abzusaugen, dass die Leucocyten deutlich platt gedrückt erscheinen. Wenn man sich nun mit einer starken Trockenlinse einen Complex von Zellen einstellt, die recht zahlreiche und intensiv gefärbte Milzbrandbacillen enthalten, so gelingt es leicht, durch sanften, mittelst einer Präparirnadel ausgeübten Druck auf das Deckgläschen die eine oder andere dieser Zellen zum Platzen zu bringen. Mir ist dies fast regelmässig geglückt, und ich konnte dann stets beobachten, dass die Milzbrandbacillen an der lädirten Stelle die Zelle verliessen und

im Momente des Austritts sich fast völlig entfärbten. Der ganze Vorgang nahm nie mehr als 4 bis 5 Sekunden in Anspruch.

Auch bei allen anderen Mikroorganismen, die ich daraufhin geprüft habe, sowie bei Spermatozoen, trat diese Entfärbung beim Austritt aus der Zelle ein. Die Kerne der durch Phagocytose aufgenommenen Leucocyten blieben aber unverändert gefärbt. Die Zerfallsprodukte der rothen Blutkörperchen blassten deutlich ab, ohne dass völlige Entfärbung eintrat.

Ich komme nun zu der zellphysiologisch so interessanten Thatsache, dass nicht alle Zellorte dem Eintritte der vitalen Färbung gleich günstig sind. Ich wurde zu einer Untersuchung dieser Verhältnisse veranlasst durch die bereits mitgetheilte Beobachtung, dass intensiv gefärbte Gonococcen sich entfärben, wenn sie bei Ortsveränderungen des Leucocyten in das periphere Hyaloplasma gelangen. Diese Beobachtung ist inzwischen von Richter (42) auch für das Methylenblau bestätigt worden. Grosse Gebilde, wie Milzbrandbacillen, eignen sich für diese Untersuchungen nicht, da die durch Phagocytose aufgenommenen Elemente im allgemeinen eine um so grössere Neigung haben, auch bei Ortsveränderungen der Zelle im centralen körnigen Protoplasma — dem Granuloplasma — liegen zu bleiben, je grösser sie selbst sind. Je kleiner die aufgenommenen Gebilde sind, um so leichter folgen sie den Strömungen des Granuloplasmas in die Ausläufer des Hyaloplasmas hinein, dabei nehmen sie häufig eine endständige Stellung ein, das heisst, sie liegen an der Grenze des Hyalo- und Granuloplasmas.

Die Ausläufer des Granuloplasmas sind manchmal so schmal, dass die endständigen Gonococcen wie eine kolbige Anschwellung desselben erscheinen und nur mittelst eines äusserst feinen Fadens von Granuloplasma mit der centralen grösseren Anhäufung desselben zusammenhängen. In dieser endständigen Lage ist der Gonococcus stets nur schwach gefärbt, selbst wenn im Centrum der Zelle tief fuchsinrothe Coccen liegen. Er ist fast vollständig vom Hyaloplasma umschlossen, und man erwartet, dass er sich im nächsten Momente gänzlich vom Granuloplasma löst. Dies tritt aber nur selten ein. In den meisten Fällen fliesst eine grössere Menge Granuloplasma nach, der Gonococcus verliert

seine vorgeschobene endständige Stellung, auch der Ausläufer des Hyaloplasmas wird kürzer, und bald ist der Gonococcus wieder von einem deutlichen Mantel von Granuloplasma umschlossen. Seine Färbung nimmt alsdann bald wieder zu. In anderen selteneren Fällen kommt es aber thatsächlich zu einer Loslösung des Gonococcus vom Granuloplasma. Der Ausläufer der letzteren wird wieder eingezogen, und der Gonococcus liegt eine Zeit lang völlig ungefärbt und nur durch einen charakteristischen Reflex bei enger Blende kenntlich im Hyaloplasma. Wenn dann aus irgend welchen Gründen die amöboiden Bewegungen aufhören und der Leucocyt wieder Kugelform annimmt, so wird das Hyaloplasma vom Granuloplasma gleichsam eingezogen, es verschwindet. Hierbei gelangt auch der Gonococcus wieder ins Granuloplasma, und allmählich tritt seine Färbung wieder auf. Einen Austritt der Gonococcen aus dem Verbande der Zelle habe ich nie beobachtet.

Es empfiehlt sich nicht, bei diesen Untersuchungen, die übrigens an die Geduld und Ausdauer des Beobachters die grössten Anforderungen stellen, einen heizbaren Objecttisch zu verwenden, der zu seiner Regulirung doch stets ein grosses Theil Aufmerksamkeit verlangt. Es genügt vielmehr vollkommen, in die nächste Nähe des Mikrosopes eine Wärmequelle, z. B. eine Gasglühlampe, zu stellen.

Auch bei dem Vorgange der Phagocytose kann man sich von der Richtigkeit der oben mitgetheilten Beobachtungen überzeugen. Das aufzunehmende Gebilde wird nämlich immer erst vom Hyaloplasma umflossen, gelangt dann ins Granuloplasma, nimmt aber stets erst in diesem eine Färbung an. Sehr interessant ist in dieser Beziehung die Aufnahme menschlicher Spermatozoen von Meerschweinchen-Leucocyten. Diese Aufnahme findet sowohl vom Kopfe als vom Schwanze des Spermatozoons aus statt. Die Aufnahme vom Schwanze aus scheint merkwürdiger Weise die häufigere zu sein. Man findet dann vielfach folgendes Bild: Der Leucocyt zeigt an einer Stelle einen lediglich aus Hyaloplasma bestehenden Fortsatz, im Inneren desselben sieht man bei enger Blende deutlich einen ungefärbten Spermatozoenkopf, der zugehörige Schwanz liegt aber geschlängelt und mehrfach geknickt, sowie deutlich gefärbt im Granuloplasma. Auch bei der Aufnahme des Spermatozoons vom Kopfe

aus tritt eine Färbung desselben im Hyaloplasma niemals ein, obwohl sich die Köpfe lebender, d. h. sich schlängelnder menschlicher Spermatozoen, auch extracellulär, zuweilen orangeroth färben.

Bei der Aufnahme von abgetödteten Milzbrandbacillen liegen die Verhältnisse ähnlich. Ich studirte diese Aufnahme besonders an den Exsudat-Leucocyten der weissen Maus, da diesen relativ kleinen Zellen die Aufnahme so grosser Gebilde beträchtliche Schwierigkeiten bereitet, und man deshalb häufig Milzbrandstäbchen findet, die nur an einem Ende von einem Leucocyten umflossen sind, während der grösste Theil des Bacillus noch extracellulär liegt. Der Leucocyt sieht dann vielfach aus wie eine ganz eigenthümlich gestaltete knopfförmige Endanschwellung des Bacillus. An einer Stelle des Leucocyten befindet sich in der Regel eine Einschnürung, die das Bacillenende fest zu umgreifen scheint. Obwohl nun abgetödtete Milzbrandbacillen extracellulär, wenn auch schwach, gefärbt sind, bemerkte ich an dem von dem Leucocyten aufgenommenen Theil unter den beschriebenen Bedingungen niemals die Spur einer Färbung. Die letztere trat vielmehr erst ein, wenn das Stäbchen völlig von der Zelle umflossen war, wobei diese übrigens selbst häufig eine langgestreckte Form annahm. Häufig blieb aber auch nach völliger Aufnahme die Färbung aus; ich vermochte aber nicht zu entscheiden, ob dies auf eine Schädigung der Zelle oder auf eine partielle Lage des aufgenommenen Bacillus im Hyaloplasma zurückzuführen war. Die Beurtheilung der Lage grösserer intracellulärer Gebilde bietet überhaupt einige Schwierigkeiten. So hat es häufig den Anschein, dass Milzbrandbacillen theils im Granuloplasma, theils im Hyaloplasma liegen, bei genauem Zusehen aber erkennt man bisweilen, dass der anscheinend im Hyaloplasma liegende Theil noch von einem schmalen Saume Granuloplasma umgeben ist. Mit Rücksicht auf die mitgetheilte Beobachtung von der entfärbenden Wirkung des Hyaloplasmas auf Gonococcen könnte man nun erwarten, dass Milzbrandbacillen in ihrem im Hyaloplasma oder in der Nähe desselben liegenden Theil ungefärbt, in dem im Granuloplasma gelegenen Theil aber gefärbt wären. Ich habe eine derartige Beobachtung aber nie gemacht, sondern in solchen schwer zu beurtheilenden Fällen den Bacillus stets im Ganzen gefärbt oder ungefärbt gefunden. Dagegen trat die ent-

färbende Eigenschaft des Hyaloplasmas der Meerschweinchenleucocyten deutlich hervor bei der Aufnahme abgetödteter, extracellulär leicht gefärbter Typhusbacillen und Gonococcen.

Auch innerhalb der Vacuolen tritt, wie ich mehrfach constatiren konnte, eine vitale Färbung mit Neutralroth nicht ein.

Aeusserst interessant ist das Verhalten des aus den intracellulären rothen Blutkörperchen in das Protoplasma des einschliessenden Leucocyten ausgetretenen Hämoglobins. Besonders instruktiv war das Blut einer leukämischen Patientin. Ich hatte einen Tropfen vom Ohrläppchen entnommen und denselben ungefähr mit der zehnfachen Menge Neutralrothlösung gemischt über Nacht, vor Austrocknung geschützt, stehen lassen. Am anderen Morgen waren die Leucocyten erfüllt von farblosen Blutschatten und von Hämoglobin, welches mit Neutralroth äusserst intensiv gefärbt war. Die Leucocyten sandten zahlreiche Ausläufer aus und zogen sie wieder ein. Das Hämoglobin folgte allen diesen Strömungen des Granulo- und Hyaloplasmas, bildete bald langgestreckte Fäden, bald Ringe, bald grössere, bald kleinere Kugeln. Die Färbung war völlig unabhängig von der Lage, und die gegenseitige Durchtränkung des Hyaloplasmas und des Hämoglobins eine so innige, dass die hyaloplasmatischen Ausläufer vielfach in toto gefärbt erschienen, und man niemals auf den Gedanken gekommen wäre, dass hier eine Mischung zweier sich dem Farbstoff gegenüber verschieden verhaltender Eiweisskörper vorliege, wenn man nicht kurz vorher beobachtet hätte, wie das gefärbte Hämoglobin in den ungefärbten hyaloplasmatischen Ausläufer strömte. Da die Färbung des intracellulären Hämoglobins, wie wir gesehen haben, auch unabhängig ist von dem Leben der Zelle, ebenso wie die Kernfärbung des inneren Leucocyten, so können wir sie auch nicht als eine „vitale“ in unserem Sinne ansehen. Im Uebrigen habe ich innerhalb des Rahmens meiner Untersuchungen die Ueberzeugung gewonnen, dass im Hyaloplasma eine vitale Färbung der Zelleinschlüsse nicht eintritt resp. nicht lange bestehen bleiben kann.

Ich hatte nun schon in meiner vorläufigen Mittheilung erwähnt, dass auch innerhalb des Granuloplasmas neben gefärbten

auch ungefärbte Gonococcen liegen können. Bei einer näheren Untersuchung dieser Verhältnisse kamen zwei Möglichkeiten in Betracht. Das verschiedene Verhalten zum Farbstoff konnte seinen Grund haben einmal in irgend einer besonderen Eigenschaft des sonst färbbaren Gebildes selbst, das andere Mal in irgend einer Besonderheit seiner Lage. Die letztere Möglichkeit ist a priori durchaus nicht von der Hand zu weisen, wenn wir nur bedenken, dass Hyaloplasma und Granuloplasma nur in Ausnahmefällen (bei amöboiden Bewegungen und bei der Phagocytose) örtlich leicht getrennt erkennbar sind. In der ruhenden Zelle durchflechten sie sich innig, und es ist völlig unmöglich zu erklären, dieser Gonococcus liegt im Hyaloplasma, jener im Granuloplasma. Ich sah keinen Weg, der Entscheidung dieser Frage näher zu treten. Dagegen war die andere Möglichkeit der experimentellen Bearbeitung zugänglich durch Untersuchungen

#### IV. Ueber die Abhängigkeit der vitalen Färbung intracellulärer Mikroorganismen von ihrem Lebenszustande.

Ich muss hier eine Angabe Metschnikoffs (23) erwähnen, die bisher sehr wenig Beachtung gefunden hat und in die Litteratur über die vitalen Färbungen nicht aufgenommen worden ist. Die Angabe lautet: „Wenn man zu einem Tropfen Exsudat, welches Phagocyten und Bacterien enthält, etwas von einer ungiftigen schwachen Lösung einer basischen Anilinfarbe zusetzt, so werden die intracellulär abgetöteten Bacterien intensiv gefärbt, während die lebendigen farblos bleiben. Wenn dagegen die Verdauung der Bacterien bereits Fortschritte gemacht hat, so färben sich diese Mikroben nur ungenügend und theilweise und bleiben schliesslich gänzlich ungefärbt. Die Membran ist viel fester als der Inhalt und bleibt oft lange im Inneren des Phagocyten.“ Ueber die verwandten Farbstoffe giebt M. nichts an. Das Neutralroth scheint nicht benutzt worden zu sein. Ich fand die Angabe M's. erst, als ich meine Untersuchungen fast beendet hatte.

Es ist klar, dass eine Bestätigung dieser Thatsache auch praktisch von der allergrössten Bedeutung sein würde, z. B. für

unsere Auffassung von der Infectiosität der Gonorrhoe. Wenn man bedenkt, dass in bestimmten Stadien dieser Erkrankung die überwiegende Mehrzahl aller im Secret befindlichen Gonococcen intracellulär liegt, und dass sich von diesen intracellulären häufig fast alle vital färben lassen, so würde, die Richtigkeit der Metschnikoff'schen Angabe vorausgesetzt, ein Mensch in diesem Stadium nicht infectiöser sein, als ein chronisch kranker, der in spärlichem Secret nur wenig extracelluläre Gonococcen hat. Es müsste sich dies auch beim Culturverfahren ausprägen. Dies ist aber durchaus nicht der Fall, vielmehr ist nach den Erfahrungen an unserer Klinik, *ceteris paribus*, die Zahl der aufgehenden Colonien um so grösser, je mehr Gonococcen im Ausgangsmaterial vorhanden waren, gleichviel ob diese extra- oder intracellulär lagen.

Einer einschränkenden Ergänzung bedarf die Angabe Metschnikoffs, wenigstens was das Neutralroth anbetrifft, jedenfalls in dem Sinne, dass das Ausbleiben der Färbung unter sonst derselben günstigen Bedingungen, noch nicht dafür spricht, dass der ungefärbte Mikroorganismus lebt. Denn wir haben im vorigen Capitel gesehen, dass sich gefärbte Gonococcen entfärben, wenn sie ins Hyaloplasma gelangen.

Die Metschnikoff'sche Angabe ist in ihrer allgemeinen Fassung jedenfalls nicht gültig, aber es liegen ihr richtige Beobachtungen zu Grunde.

Wenn man einem Meerschweinchen abgetötete und einem anderen lebende Milzbrandbacillen in die Bauchhöhle injicirt, beide Thiere nach einer bestimmten Zeit tötet, die getöteten Thiere etwa eine Stunde lang ruhig liegen lässt, und dann die Exsudat-Leucocyten mit Neutralroth untersucht, so wird man in den Zellen des ersten Thieres massenhaft gefärbte Milzbrandbacillen finden, während die intracellulären Bacillen beim zweiten Thiere keinerlei Färbung aufweisen. Es wäre dieser Versuch ohne weiteres im Sinne Metschnikoffs zu deuten.

Wenn man aber schneller vorgeht, namentlich bei der Untersuchung des zweiten Thieres, und ca. 10 Minuten nach der Injection aus der Bauchhöhle entnimmt, so wird man im wesentlichen die Verhältnisse finden, die in den Figg. 2 u. 3 zum Ausdruck kommen, d. h. Färbung sowohl der tot als auch der lebend injicirten Bacillen. Ein wesentlicher Unterschied besteht

nur darin, dass die lebend injicirten Bacillen sich äusserst schnell wieder entfärben. Darin liegt allerdings noch kein Beweis, dass die gefärbten intracellulären Milzbrandbacillen auch thatsächlich leben und die Entfärbung könnte auf irgend eine äussere die Zelle treffende Schädigung zurückzuführen sein. Wir werden später sehen, dass die Verhältnisse hier ziemlich verwickelt sind, und dass ein Beweis für das Leben aller lebend injicirten und nun intracellulär liegenden Milzbrandbacillen nicht erbracht werden kann. Dagegen ist es nicht schwer, sich in einem Einzelfalle zu überzeugen, dass ein gefärbt in einer Zelle liegender Milzbrandbacillus leben, das heisst sich vermehren kann. Zu diesem Zwecke genügt es, sich eine Zelle einzustellen, die nur wenige gefärbte Milzbrandglieder enthält, z. B. Zelle *a* in Fig. 2.

Man muss sich davon überzeugen, dass keine ungefärbten Glieder in derselben vorhanden sind, und dass während der nun folgenden längeren Beobachtung keine Stäbchen neu aufgenommen werden. (Ich habe das letztere übrigens unter derartigen Bedingungen niemals gesehen.)

Man wird nun leicht constatiren können, dass nach der bald eintretenden Entfärbung innerhalb weniger Stunden eine deutliche Vermehrung der intracellulären Milzbrandbacillen eingetreten ist. Häufig wird die Zelle dabei gesprengt. Wenn man ein derartiges Präparat über Nacht — vor Austrocknung geschützt — liegen lässt, so findet man am anderen Morgen überhaupt keine Zellen mehr, sondern das ganze Gesichtsfeld ist erfüllt von dicht gedrängten Bacillen. Bemerkenswerth ist, dass bei der Entfärbung der lebend injicirten Milzbrandbacillen auch diejenigen gefärbten Körnchen etc. betroffen werden, die in anderen Zellen ihre Färbung lange beizubehalten pflegen.

Man kann sich dies besonders anschaulich machen, wenn man einem Meerschweinchen neben lebenden Milzbrandbacillen irgendwelche abgetödeten Bacterien in die Bauchhöhle injicirt, z. B. die Aufschwemmung einer Cultur von *Vibrio Metschnikoff*, der seine Färbbarkeit in den Meerschweinchenleucocyten lange beizubehalten pflegt. Man findet dann leicht Zellen, die beide Arten von Mikroorganismen enthalten, und kann sich davon überzeugen, dass die Entfärbung häufig fast gleichzeitig an beiden Arten

auftritt. Da sowohl tote Milzbrandbacillen als tote Vibrionen ihre Färbung in den Zellen lange beizubehalten pflegen, so unterliegt es wohl keinem Zweifel, dass das die Entfärbung herbeiführende Moment in den Lebensfunctionen der intracellulären Milzbrandbacillen zu suchen ist. Ob in unserm Falle das vom Milzbrandbacillus ausgehende entfärbende Moment den *Vibrio direct* oder *indirect* durch Vermittlung der vielleicht geschädigten Zelle trifft, ist nicht ohne Weiteres zu entscheiden. Möglicher Weise kommen beide Factoren in Betracht und unterstützen sich gegenseitig zu verstärkter Wirkung. Bezüglich der sich so intensiv und lange färbenden Gonococcen des Urethralsecrets habe ich bereits ein Moment angeführt, welches für ihren ungeschwächten Lebenszustand spricht, nämlich das relativ üppige Wachstum derselben beim Culturverfahren. Man kann diese Anschauung noch stützen durch Beobachtungen mittelst des Isolirverfahrens. Wenn man nämlich die durch 5 Minuten langes Erhitzen auf 60° sicher abgetöteten Gonococcen einer frischen ca. 17 Stunden alten Cultur von den isolirten menschlichen Leucocyten aufnehmen lässt, so kann man alsbald einen Umschlag der fuchsinrothen Farbe in eine mehr orangerothe und ein deutliches Aufquellen der Coccen constatiren. Es sind dies dieselben Erscheinungen, die an diesen Coccen in den Leucocyten des Meer-schweinchens beobachtet werden können. Die Gonococcen des Urethralsecrets halten Form und Farbe lange, was doch mit Sicherheit dafür spricht, dass sie nicht schwer geschädigt sein können. Die angeführten Beispiele mögen genügen zum Beweise, dass die oben mitgetheilte Angabe Metschnikoffs, wenigstens was das Neutralroth anbetrifft, in jeglicher Hinsicht einer Einschränkung bedarf. Sie kann zwar in einzelnen Fällen zutreffen, andererseits können sich aber auch lebende Mikroorganismen intracellulär färben und tote ungefärbt bleiben, oder sich so schnell entfärben, dass ihre Färbung der Beobachtung leicht entgeht.

Wie dies zu deuten ist, wird im folgenden Abschnitt besprochen werden.

### V. Ueber das Wesen der vitalen Leucocytenfärbung.

Wir haben in den vorigen Kapiteln gesehen, dass sich in lebenden Leucocyten nur solche Gebilde eiweissartiger Natur mit Neutralroth färben, die durch Phagocytose in dieselben aufgenommen sind. Wir sahen aber ferner, dass die Bedingungen dieser Färbung nicht für alle Gebilde dieselben sind. Die Färbung der Mikroorganismen, Spermatozoen etc. war abhängig von der Lage des gefärbten Gebildes innerhalb der Zelle und von dem Lebenszustande der letzteren, dagegen erwies sich die Kernfärbung der inneren, morphologisch intacten Leucocyten, sowie die Färbung des Hämoglobins unabhängig von diesen Momenten. Es ist unbedingt nothwendig, diese beiden prinziell verschiedenen Färbungen streng auseinander zu halten und von „vitaler“ Färbung nur dann zu sprechen, wenn sie sich in der That abhängig erweist von der Vitalität der Zelle. Diese Abhängigkeit kann nicht anders constatirt werden, als dadurch, dass wir künstlich die Zelle in einer ganz bestimmten Weise schädigen, die den Farbstoff selbst nicht beeinflusst, z. B. durch langsame Uebererwärmung, unter steter Beobachtung. Das Ausbleiben der Kern- und Protoplasmafärbung dagegen beweist nicht, dass die Lebensfunktionen der Zelle noch voll erhalten sind.

Die „vitale“ Färbung der Leucocyteneinschlüsse in diesem engeren Sinne erscheint eben wegen ihrer Abhängigkeit von den Lebensfunktionen der einschliessenden Zelle überaus wichtig und bedeutungsvoll. Ihr eingehendes Studium führt zu ganz bestimmten Vorstellungen von dem Wesen dieser Färbung. Indem ich das letztere hier näher bespreche, soweit meine Kenntniss desselben reicht, bin ich mir wohl bewusst, ein äusserst schwieriges Gebiet zu betreten, dessen genaue Erforschung noch in weite Fernen gerückt erscheint. Sollte meine Deutung der mitgetheilten Beobachtungen im weiteren Fortschritt unserer zell-physiologischen Kenntnisse nicht in allen Punkten eine Bestätigung erfahren, so giebt sie doch auf alle Fälle, wie mir scheint, die Richtung der weiteren Forschung an.

Es ist nun nöthig, die chemischen Eigenschaften des ver-

wandten Farbstoffs näher zu betrachten. (Das von mir gebrauchte Präparat stammt aus der Fabrik von Leopold Cassella & Co. in Frankfurt a. Main). Das Neutralroth ist ein dunkel-schwarz-grünes Pulver, welches in Wasser und Alkohol leicht löslich ist. Der Farbstoff ist ein Chlorhydrat des Dimethyldiamidotoluphenazins und entsteht bei der Einwirkung von salzsaurem Nitrosomethylanilin auf *m*-Toluyldiamin. Es ist äusserst empfindlich gegen Alkali. Seine carmoisinrothe wässrige Lösung schlägt bei Zusatz von Spuren von Alkali ins Gelb-orange um. Der Alkaligehalt des Brunnenwassers genügt hierzu (Ehrlich). Ja, der Umschlag tritt sogar ein, wenn wir die Farbösung einige Zeit in dünnen Glascapillaren halten. Salzsäure ruft einen blauen, Schwefelsäure einen grünen Farbenton hervor.

Das Neutralroth ist leicht reductionsfähig, und geht bei der Reduction in einen farblosen Körper, in ein „Leucoproduct“, über. Dieses Leucoproduct wird selbst vom indifferenten Sauerstoff der Luft wieder reoxydirt, wobei die ursprüngliche Farbe wieder erscheint. Man kann sich hiervon leicht überzeugen, wenn man eine wässrige Lösung mit Zinkstaub schüttelt, leicht erwärmt und den Zinkstaub absitzen lässt. Die Flüssigkeit wird dann im allgemeinen farblos. Führt man dann leise Schläge gegen das Reagensglas, so senken sich von der Oberfläche der Lösung leichte Wolken des an der Luft reoxydirten Farbstoffes nach unten. Am besten kann man sich von dieser Reoxydation überzeugen, wenn man das Leucoproduct auf ein Stück Fliesspapier giesst. Es tritt sofort wieder eine fuchsinrothe Farbe auf. Derartige, durch indifferenten Sauerstoff reoxydable Farbstoffe bezeichnet man als „küpenbildende“, oder autoxydable.

Vergleichen wir nun mit diesen stets leicht *in vitro* anzustellenden Versuchen die beschriebenen Erscheinungen in den Leucocyten, so fällt in vielen Punkten eine deutliche Analogie auf. Der Farbenwechsel der in den Meerschweinchen-Leucocyten aufquellenden Gonococcen vom Fuchsinroth ins Gelborange deutet ohne weiteres auf eine Zunahme der Alkalescenz der aufquellenden Gebilde hin. Die Entfärbung der Gonococcen im Hyaloplasma, die Wiedertärbung im Granuloplasma, sowie die Entfärbung der Zelleinschlüsse in der geschädigten oder absterbenden Zelle erinnert an die Reagensglasversuche der Reduction und Oxydation.

Gehen wir von dem beschriebenen Versuch mit abgetöteten Milzbrandbacillen aus. Wir haben ein Präparat angefertigt, welches zahlreiche lebende Leucocyten enthält, die abgetötete Milzbrandbacillen aufgenommen haben; ausserdem befinden sich noch zahlreiche abgetötete Milzbrandbacillen extracellulär. Wir lassen nun einen Tropfen dünner Neutralrothlösung unter das Deckglas fliessen, und beobachten, dass zunächst die extracellulären Milzbrandbacillen einen leicht rothen Farbenton annehmen. Bald aber beginnen auch die intracellulären sich zu färben. Während aber die Intensität der Färbung der extracellulären Bacillen annähernd constant bleibt, nimmt die Färbung der intracellulären zu, um innerhalb einer bestimmten Zeit (ca.  $\frac{1}{4}$  h.) ihr Maximum zu erreichen. Der Unterschied in der Intensität der Färbung zwischen den intra- und extracellulären Milzbrandbacillen ist dann häufig ein so grosser, dass eine vielfach (etwa 30 mal) stärkere Neutralrothlösung nöthig wäre, um die extracellulären gleich stark zu färben.

Während der ganzen Dauer der Beobachtung hat der Leib des Leucocyten auch nicht die Spur einer Färbung angenommen.

Wie kommt der Farbstoff in die intracellulären Milzbrandbacillen? Dass er bei der Phagocytose des Milzbrandbacillus mit aufgenommen wurde, ist ausgeschlossen, denn wir haben ihn erst später zugesetzt. Die geringe Concentration der Farblösung kann auch nicht die Ursache des Ausbleibens der Zellfärbung sein, denn die Concentration genügt vollkommen zur Kern- und Protoplasmafärbung abgetöteter Leucocyten. Wäre dies nicht der Fall, so könnte man annehmen, dass der Farbstoff als solcher Zell- und Bacillenleib durchdringt und nur infolge der hochgradigen Veränderungen, welche die Milzbrandbacillen intracellulär erleiden, infolge der Aufquellung, im Sinne einer rein mechanischen Auffassung ein ganz besonders günstiges Depot dort findet. Dann müsste die Färbung in ihrer Intensität bestehen bleiben, wenn der Bacillus den Zelleib verlässt. Wir haben aber gesehen, dass die Färbung in diesem Falle auf den Grad der ursprünglich extracellulären hinabsinkt, ebenso wie die Algenzellen sich entfärben, wenn sie die Vacuolen der Vorticelle verlassen. Lebend injicirte und aus der geplatzen Zelle austretende Milzbrandbacillen entfärben sich vollständig. Es bleibt in der That keine andere Mög-

lichkeit bestehen, als dass der Farbstoff in irgend einer für das Auge nicht wahrnehmbaren Modification den Zellenleib durchdringt. Da das Reductionsproduct des Neutralroths farblos ist, und wir auf der anderen Seite wissen, dass das lebende Protoplasma auch noch viel stärkerer Reductionsleistungen fähig ist, als nöthig sind, um das Neutralroth in seine farblose Modification überzuführen, die Reoxydation des Leucoproductes aber keine eigentlichen Zelleistungen beansprucht, so dürfte die Annahme, dass wir es in der That in den beschriebenen Erscheinungen mit Oxydations und Reductionsvorgängen zu thun haben, keinen ernstlichen Zweifeln begegnen. Diese Annahme kann noch wesentlich gestützt werden durch eine genaue Beobachtung der durch verschiedene Einflüsse hervorgerufenen Entfärbungen der Zelleinschlüsse. Ich hatte in dem I. Abschnitte gezeigt, dass bei einer schnellen Abtötung der Zellen, z. B. durch starkes Erhitzen des frischen Präparates, zunächst noch eine distincte Färbung der Zelleinschlüsse erhalten bleibt, die aber bald verschwindet. Diese Entfärbung geht offenbar auf dem Wege der langsamen Diffusion vor sich. Es tritt nämlich zuerst eine gefärbte Zone in der Umgebung des ursprünglich distinct gefärbten Zelleinschlusses auf, diese Zone wird immer breiter, gleichzeitig wird die Intensität der Färbung geringer und schliesslich zeigt die ganze Zelle mitsamt ihren Einschlüssen einen gleichmässigen leicht rothen Farbenton.

Ganz anders verläuft die Entfärbung bei der Schädigung der Zelle durch langsames Erwärmen. Hierbei verschwindet der Farbstoff, ohne dass man sagen könnte, wohin, obwohl der Vorgang häufig so langsam verläuft, dass eine Diffusion, wie im ersten Falle, dem Auge nicht entgehen würde. Wir wissen nun, dass gerade absterbende Gewebe besonders stark reduciren (Ehrlich) und es unterliegt wohl keinem Zweifel, dass der Farbstoff in diesem Falle die Zelle als Leucoproduct verlässt. Die geschädigte Zelle reisst allen erreichbaren Sauerstoff an sich und reducirt infolgedessen den Farbstoff.

Der positive Nachweis, dass in der That das Leucoproduct in dem Zelleibe circulirt, erscheint zwar nicht unmöglich, muss aber wegen nicht geringer technischer Schwierigkeiten späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben <sup>1)</sup>.

1) Wenn man ein Präparat, welches zahlreiche vital gefärbte  
Arch. f. mikrosk. Anat. Bd. 56

Sehr interessant ist auch die dritte Art der Entfärbung, die wir kennen gelernt haben, nämlich die prompte Entfärbung der Zelleinschlüsse durch Entfernung des pericellulären Farbstoffes mittelst Kochsalzlösung, wobei eine Schädigung der Zelle ausgeschlossen erscheint.

Wir sind in Anbetracht dieser Thatsache zu der Annahme gezwungen, dass die Färbung der Zelleinschlüsse gleichsam in jedem Momente wenigstens theilweise neu entsteht, dass eine fortwährende Circulation von Leucoprodukt durch die Zelle stattfindet, und dass in jedem Momente neues Leucoprodukt in den Einschlüssen in die Oxyform übergeht. Wir müssen hier zwei Dinge streng unterscheiden. Einmal die Thatsache der Färbung dieser intracellulären Milzbrandbacillen überhaupt (bei ungefärbter Zelle), die einfach so gedeutet werden kann,

---

Einschlüsse enthält, eintrocknen lässt, so findet man dann häufig den Zelleib ganz leicht gelb-roth gefärbt. Würde die Menge des in der Zelle circulirenden Leucoproductes auch nur annähernd der Menge des in den Einschlüssen aufgespeicherten Farbstoffes entsprechen, so müsste bei der Oxydation an der Luft eine viel stärkere Färbung des Zelleibes eintreten. Die leicht gelb-rothe Färbung ist nicht als sicherer Beweis für die Circulation des Leucoproductes unter normalen Verhältnissen anzusehen, da beim Eintrocknungsprocess sich naturgemäss die Concentration der Farblösung fortwährend steigert und es ausserdem wahrscheinlich ist, dass die Zelle, bevor sie vollständig austrocknet, ein, wenn auch kurzes Stadium der schweren Schädigung durchläuft. Hierfür spricht die Thatsache, dass man in einem nach Arnold angefertigten Dauerpräparat stets weniger gefärbte Gebilde antrifft, als im frischen Präparat. Es kann also der die gelbrothe Färbung hervorrufoende Farbstoff ebensowohl aus den durch die terminale Zellschädigung entfärbten Einschlüssen herrühren. Auch Versuche, die ich mit dem von Merck (Darmstadt) neuerdings hergestellten säurefreien 30% Wasserstoffsperoxyd anstellte, sind nicht beweisend zu verwerthen. Wenn man einen Tropfen dieses Präparates unter das Deckglas fliessen lässt, so treten sofort zahlreiche Gasblasen auf. Man hat dann Mühe, in den zwischen mehreren einander berührenden Gasblasen frei bleibenden Flüssigkeitsräumen die Zellen wiederzufinden. Dieselben sind dann ganz eigenthümlich verändert. Sie erscheinen grösser und infolge gegenseitiger Abplattung polygonal. Die Färbung der Einschlüsse ist gut erhalten und bleibt es auffallend lange. Auch hier ist der Zelleib leicht gelbroth gefärbt. Aber auch diese Färbung kann nicht mit Sicherheit auf eine Oxydation des circulirenden Leucoproductes durch das Wasserstoffsperoxyd zurückgeführt werden, da der extracelluläre Farbstoff vorher nicht entfernt werden kann.

dass das in der ganzen Zelle circulirende Leucoprodukt in den intracellulären Milzbrandbacillen indifferenten Sauerstoff findet, durch den es reoxydirt wird; das andere Mal die so auffallende Thatsache, dass der Farbstoff in dem intracellulären Milzbrandbacillus in so hohem Grade aufgespeichert wird. Was den ersten Punkt anbelangt, so muss es zweifelhaft erscheinen, ob der zur Reoxydation verwandte Sauerstoff stets als „indifferent“ anzusehen ist. Wir müssen in Betracht ziehen, dass der Bacillus in hohem Grade unter dem Einflusse der Zelle steht. Er wird von der letzteren zur Aufquellung und zum Zerfall gebracht und es ist sehr wohl möglich, dass diese doch sicher von den Phagoeyten ausgehende Zerstörung auf einem Oxydationsprozess beruht oder doch mit einem Oxydationsprozess verbunden ist. Es erscheint das auch aus vielen anderen Gründen sehr plausibel, namentlich aber deshalb, weil auch lebende intracelluläre Milzbrandbacillen, die doch unter gewöhnlichen Umständen nachgewiesenermaassen reduzieren, in der lebenden ungeschädigten Zelle, wenn auch nur kurze Zeit, gefärbt sein können.

Was den zweiten Punkt, die Aufspeicherung anbelangt, so kommt für unseren Farbstoff möglicherweise die von Ehrlich mitgetheilte Thatsache in Betracht, „dass die Reduktionsstufen der küpenbildenden Farben insgesamt leichter diffundiren als die Farben selbst“. Es würde dann anzunehmen sein, dass in der Zeiteinheit mehr Farbstoff in der Leucoform in die Einschlüsse eindringt, als in der Oxyform dieselben wieder verlassen kann.

Es fände auf diese Weise eine Anhäufung von Farbstoff in den Einschlüssen statt, welche die so auffallende und sonst gar nicht zu erklärende Intensität der Färbung bewirkt, und so lange andauern müsste, als überhaupt noch Farbstoff in irgend einer Form durch die Zelle circulirt <sup>1)</sup>.

Es ist, wie erwähnt, im höchsten Grade wahrscheinlich, dass die vitale Färbung mit Neutralroth in vielen Fällen der Ausdruck eines von der Zelle ausgehenden und auf den Ein-

---

1) In ähnlicher Weise erklärt Pfeffer (31) die Speicherung des Farbstoffes (Methylenblau) in Pflanzenzellen; er nimmt an, dass der Farbstoff in der Zelle in irgend einer Weise in eine nicht oder schwer diosmirbare Verbindung übergeführt wird.

schluss gerichteten Oxydationsprozesses, also gleichsam eine Reizerscheinung des lebenden Granuloplasmas ist, denn ohne diese Annahme kann die Färbung an sich reducirender lebender intracellulärer Milzbrandbacillen nicht erklärt werden.

Pfeffer leugnet, dass sich in lebenden Pflanzenzellen Oxydationsvorgänge abspielen. Der Autor stellte fest, dass in lebenden Zellen bei Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd Färbungen (oder Entfärbungen) auftreten, die auf Oxydation beruhen und folgert aus dem Ausbleiben dieser Färbungen etc. unter normalen Bedingungen, dass vom Protoplasma allein keine Oxydation vermittelt wird. Die Versuche und ihre Ergebnisse sind auf die Leucocyten nicht ohne weiteres übertragbar. Pfeffer selbst giebt an, dass das Wasserstoffsuperoxyd selbst in 0,01%igen Lösungen die Pflanzenzelle leicht schädige. Leucocyten werden bereits durch viel schwächere Concentrationen geschädigt, und die geschädigten Zellen bieten, wie wir gesehen haben, ganz andere Verhältnisse dar. Auch ist es mir zweifelhaft ob  $H_2O_2$  als solches in lebende Leucocyten eindringt. Im Uebrigen konnten auch wir in Leucocyten, die keine fremden eiweissartigen Einschlüsse enthielten, keine Oxydationsvorgänge nachweisen.

Dabei muss eben diesem Granuloplasma oder einem besonders gearteten Bestandtheil desselben die Fähigkeit der Reduktion zuerkannt werden, denn sonst müsste der Farbstoff sichtbar, in der Oxyform, an den Bacillus herantreten.

Das Hyaloplasma dagegen hat, wenigstens dem Neutralroth gegenüber, vorwiegend reducirende Eigenschaften <sup>1)</sup>.

Wenn es erlaubt ist, sich einmal auf einen teleologischen Standpunkt zu stellen, so verstehen wir jetzt, weshalb die durch Phagocytose aufgenommenen Mikroorganismen fast stets im Granuloplasma gehalten werden. Gerade dieser Zellbestandtheil hat, wie es scheint, die Fähigkeit zu oxydiren und zu zerstören, an ihn scheint die Erreichung des Endzweckes der Phagocytose, die völlige Beseitigung der eingedrungenen Mikroorganismen als solcher geknüpft zu sein. Gelingt der Zelle die Zerstörung des eingelagerten Gebildes leicht, so wird dasselbe — wie wir dies z. B. an den abgetöteten Milzbrandbacillen gesehen haben —

---

2) Kowalewsky (16) färbte die amöboiden Froschleucocyten vital mit Methylenblau und fand bei ungefärbtem Zelleib central gelegene gefärbte Körnerhaufen. Bezüglich der peripheren Protoplasmaschicht, die lebend den Farbstoff nicht annimmt, schliesst er, dass sie entweder reducirende Eigenschaften habe oder nicht alkalisch reagire. „Möglicherweise wirken beide Momente mit.“

erst in toto gefärbt, allmählich aber nehmen die färbbaren (oxydablen?) Substanzen ab, der Bacillenleib färbt sich nur theilweise, und zerfällt schliesslich in immer kleinere Partikel, deren Färbung nach kürzerer oder längerer Zeit verschwindet.

Ganz anders liegen die Verhältnisse bei der Phagocytose lebender Milzbrandbacillen. Hier wirken zwei Momente einer intensiven Färbung entgegen, nämlich die reducirende Kraft des Milzbrandbacillus selbst <sup>1)</sup> und die bald auftretende Schädigung der Zelle. So kommt es, dass, wie wir gesehen haben, zwar eine kurze Zeit lang eine Färbung eines lebenden intracellulären Milzbrandstäbchens bestehen bleiben kann durch das Ueberwiegen der Oxydationskraft des Granuloplasmas. Bald aber unterliegt die Zelle in dem Kampfe gegen den stärkeren Feind, sie wird geschädigt und Zelle und Bacillus unterstützen sich gegenseitig in der Reduction des Farbstoffes. So kommt es, dass in einer solchen Zelle nicht nur eine schnelle Entfärbung der Milzbrandbacillen, sondern auch vielfach der anderen zufällig vorhandenen Einschlüsse auftritt. (Vgl. den Versuch mit lebenden Milzbrandbacillen und abgetöteten Vibr. *Metschnikoff*).

Ein ganz besonderes Verhalten zeigen die Gonococcen in den menschlichen Leucocyten. Hier besteht ein relativ friedliches Zusammenleben. Es tritt weder eine deutliche Schädigung der Zelle durch die Gonococcen, noch eine Auflösung der Gonococcen durch die Zelle ein. Die Folge ist, dass die Färbung der Gonococcen ausserordentlich lange bestehen bleibt, und dass die letzteren ihre charakteristische Form ausserordentlich lange beibehalten.

Bekanntlich hat Ehrlich in seiner klassischen Monographie über das Sauerstoffbedürfniss des Organismus zum ersten Male eingehend und systematisch versucht, die Oxydations- und Reduktionskraft lebender Gewebe durch ihr Verhalten zu besonders geeigneten Farbstoffen zu bestimmen. Ehrlich berücksichtigte nur die makroskopisch erkennbaren Erscheinungen an den Geweben und zieht die Zellen, als die eigentlichen Träger dieser Erscheinungen, nur in seinen Schlüssen in Betracht.

---

1) Müller (27) hat auch die Milzbrandbacillen in den Bereich seiner Untersuchungen gezogen und auch an ihnen reducirende Eigenschaften nachgewiesen.

Ehrlich geht von der festgestellten Thatsache aus: „dass erstens das lebende Protoplasma Sauerstoff durch chemische Bindung aufnimmt, und dass zweitens ein solches oxydirtes Plasma denselben wieder abgeben und so Oxydation vermitteln kann.“ Er theilt die Sauerstofforte des Protoplasmas in drei Zonen ein: „Die erste von ihnen umfasst die Orte der höchsten Sauerstoffaffinität. Sie verharret während der normalen Thätigkeit der Organe stets in gesättigtem Zustande und stellt somit, da sie erst im Nothfall, wenn die Zelle unter Sauerstoffmangel existiren soll, verwandt wird, die Sauerstoffreserve des Protoplasmas dar. Die zweite Gruppe enthält diejenigen Sauerstofforte, die während der normalen Thätigkeit der Zelle functioniren, indem sie hierbei bald oxydirt, bald reducirt werden, die dritte diejenigen, die auch während der normalen Thätigkeit der Zelle stets unbesetzt bleiben und die daher eine continuirliche Zugkraft auf den Blutsauerstoff ausüben. Es folgt aus dieser Definition, dass das functionirende Protoplasma gleichsam ein Janusgesicht besitzen muss, indem es einerseits durch Vermittlung seiner sauerstoffgesättigten Orte bestimmte Verbindungen oxydiren und andere Verbindungen mit Hilfe der ungesättigten Gruppen reduciren kann.“ (S. 115, l. c.)

Die hier mitgetheilten Beobachtungen über Reductions- und Oxydationsvorgänge in lebenden Zellen haben naturgemäss viele Berührungspunkte mit den Ehrlich'schen Untersuchungen an den Geweben. Es ist mir nicht möglich, auf einen Vergleich der Einzelheiten hier näher einzugehen, muss vielmehr auf das Original verweisen. Es besteht in vielen Punkten eine erfreuliche Uebereinstimmung der auf so verschiedenen Wegen gewonnenen Anschauungen. Trotzdem scheint es mir gewagt, die aus den Färbungsercheinungen der Leucocyten auf dem Höhepunkt ihrer Function gezogenen Schlüsse ohne weiteres auf die Gewebszellen zu übertragen. Die vielfach ganz spezifischen Functionen der letzteren (Drüsenzellen), ihre Abhängigkeit von der Blutcirculation, die Schwierigkeit, sie in ganz lebensfrischem Zustande zu untersuchen und zu beobachten, die vielfach gänzlich fehlenden Kriterien ihres Lebenszustandes, mögen die Verhältnisse hier völlig anders gestalten und die Bildung eines einwandsfreien Urtheils bis zur Unmöglichkeit erschweren.

Ehrlich selbst giebt an (l. c. S. 167), dass man die „Phagocyten Metschnikoffs“ nicht mit den von ihm untersuchten Gewebszellen bezüglich der Oxydations- und Reductionsercheinungen indentifiziren dürfe.

Die Versuche, mittelst der vitalen Leucocytenfärbung die Structur des Protoplasmas

aufzuklären, verdienen eine äusserst kritische Beurtheilung. Wenn man bedenkt, in wie kurzer Zeit sich häufig die Phagocytose abspielt, und Gelegenheit hatte, sich zu überzeugen, dass selbst in den physiologischer Weise in den serösen Höhlen stets zu findenden Leucocyten häufig genug Gebilde angetroffen werden, die nur durch Phagocytose in dieselben hineingelangt sein können (rothe Blutkörperchen, Blutplättchen, abgestorbene Leucocyten etc.), so wird man bei jedem Körnchen eines Phagocyten sehr vorsichtig sein mit der Annahme, dass es einen integrirenden Bestandtheil des letzteren bildet. Ich halte es deshalb auch nicht für gerathen, an Leucocyten, die stundenlang in den Maschen des Hollundermarkes sich aufgehoben haben, Untersuchungen über die Anordnung der präformirten Granula anzustellen, wie Arnold dies gethan hat. Schon die Thatsache allein, dass frisch aus der Blutbahn ausgewanderte Leucocyten auf dem Höhepunkte ihrer Funktion in den allermeisten Fällen keinerlei vital färbbare Gebilde zeigen, beweist, dass die integrirenden Bestandtheile dieser Zellen keine Neigung haben, sich „vital“ zu färben. Auf die Anordnung gefärbter Granula in Reihen möchte ich kein so grosses Gewicht legen, wie Arnold. Auch „Granula“, die sicher durch Phagocytose entstanden sind, zeigen häufig eine reihenweise Anordnung. Ich brauche nur auf die Befunde Przesmyckis am Actinosphärium hinzuweisen. Auch an Leucocyten, die Zeldetritus aufgenommen haben, kann man sich häufig von der reihenweisen Anordnung der ectogenen „Granula“ überzeugen, namentlich bei amöboiden Bewegungen der Zellen.

Dagegen ist die vitale Leucocyten-Färbung mit Neutralroth ganz besonders geeignet, die durch Phagocytose aufgenommenen Gebilde als solche zu erkennen und ihr Schicksal weiter zu verfolgen. Die Empfindlichkeit des Neutralroths gegen Spuren von Alkali, sowie die Eigenschaft der Küpenbildung wird dabei den Zellphysiologen ganz besonders interessiren. Ich theile die Hoffnung Ehrlichs, „dass ein eingehendes Studium dieser Neutralrothmethoden . . . . in die feinsten Probleme des Zellebens einführen wird.“ (Anämie S. 86).

Es ist mir eine angenehme Pflicht, meinem sehr verehrten Chef, Herrn Geheimrat Neisser, für die Anregung zu der vor-

liegenden Studie und die stets fördernden Ratschläge auch an dieser Stelle aufrichtigen Dank abzustatten.

#### Z u s a m m e n f a s s u n g.

I. In lebenden Leucocyten färben sich mit Neutralroth mit Vorliebe solche Substanzen eiweissartiger Natur, die durch Phagocytose in dieselben aufgenommen sind. (Mikroorganismen, rothe Blutkörperchen, Spermatozoen, Zerfallsprodukte anderer Zellen, Blutplättchen, Hühnereiweiss etc.).

II. Die Färbung des grössten Theiles dieser Einschlüsse ist abhängig von dem Leben der einschliessenden Zelle. In stark geschädigten und absterbenden Zellen tritt die Färbung nicht auf, resp. sie verschwindet bald. Es dürfte sich empfehlen, nur diese Art der Färbung als „vitale“ zu bezeichnen.

III. Nicht alle Zellgebiete sind der „vitalen“ Färbung gleich günstig. Eine intensive und andauernde Färbung tritt nur im Granuloplasma auf. Das Hyaloplasma und die Vacuolen sind der Färbung ungünstig.

IV. Die „vitale“ Färbung ist gebunden an die Lage des gefärbten Gebildes in der Zelle. Beim Austritt aus der Zelle tritt Entfärbung ein. (Vergl. den geschilderten Vorgang bei den Vorticellen).

V. Die „vitale“ Färbbarkeit von Vacuolen, sowie von „Stoffwechsel- und Secretionsproducten“ in den Leucocyten, ferner von integrirenden, an den Lebensfunktionen der Zelle activ theilnehmenden Structurelementen ist unbewiesen.

VI. Die „vitale“ Färbung intracellulärer Mikroorganismen ist abhängig von dem Lebenszustande derselben, sowie von der Schädigung, die sie der einschliessenden Zelle zufügen.

VII. Am Granuloplasma lassen sich unter bestimmten Umständen dem Neutralroth gegenüber oxydirende, am Hyaloplasma reducirende Eigenschaften nachweisen.

---

### Erklärung der Abbildungen auf Taf. XXXV.

- Fig. 1. *Carchesium polypinum* (nach R. Hertwig) vital mit Neutralroth gefärbt. *NV* = Nahrungsvacuolen, deren Inhalt (kleine Algen) sich färbte. *NV'* = farblose collabirte Vacuole nach Austritt der Algen. *CV* = contractile Vacuole. *K* = Kern *NK* = Nebenkern. *WK* = Wimperkranz.
- Fig. 2. Meerschweinchen - Leucocyten, die z. Th. lebende Milzbrandbacillen enthalten.
- Fig. 3. Meerschweinchen-Leucocyten mit toten, aufquellenden und zerfallenden Milzbrandbacillen.
- Fig. 4. Zellen *a*, *b* und *d* enthalten abgetötete Leucocyten. Zelle *d* enthält ein rothes Blutkörperchen.
- Fig. 5. Aus einem vital gefärbten Gonorrhoe-Präparat. Die Zellen *a* und *b* enthalten neben fuchsinrothen Gonococcen orangerothe Spermatozoenköpfe, Zelle *c* ein rothes Blutkörperchen, die übrigen Zellen nur Gonococcen.

Die Figuren 2—4 sind vom Zeichner der Klinik H. Kröner, die Fig. 1 und 5 vom Verf. angefertigt. (Zeiss  $\frac{1}{12}$ .)

### Literatur-Verzeichniss.

1. Arnold, Ueber Granulafärbung lebender und überlebender Leucocyten. *Virchow's Arch.* Bd. 157.
2. Arnstein, Die Methylenblau-Färbung als histologische Methode. *Anatom. Anz.* Bd. II. 1887.
3. Barker, On the presence of iron in the granules of the eosinophile leucocytes. *John Hopkin Hosp. Bullet.* N. 42. Oct. 1894.
4. Brandt, Färbung lebender einzelliger Organismen. *Biol. Centralbl.* Bd. I. 1887. No. 7.
5. Certes, Sur un procédé de coloration des infusoires et des éléments anatomiques pendant la vie. *Zoolog. Anz.* Bd. IV. 1881.
6. Chrzonczewsky, Zur Anatomie und Physiologie der Leber. *Virch. Arch.* Bd. XXXV, pg. 153.
7. Ehrlich, Das Sauerstoffbedürfniss des Organismus. Berlin 1885.
8. Derselbe, Ueber die Methylenblaureaction der lebenden Nervensubstanz. *Deutsch. med. Woch.* 1886 No. 4.
9. Derselbe, Zur biologischen Verwerthung des Methylenblau. *Biol. Centralblatt* Bd. VII. 1886.
10. Derselbe, Ueber Neutralroth. *Allgem. medicin. Centralzeitung.* 1894. No. 2.
11. Ehrlich und Lazarus, Die Anämie. I. Normale und pathol. *Histologie des Blutes.* Nothnagels spec. Pathol. und Therapie Bd. VIII. 1898.

12. Galeotti, Ricercha sulla colorabilita delle cellule vivente. Zeitschrift f. wiss. Mikroskopie (ausführliche Literatur) Bd. XI. 1894.
13. Gerlach, Ueber die Einwirkung von Farbstoff auf lebende Gewebe; siehe Gierke, Zeitschr. f. wiss. Mikrosk. Bd. I. 1884, p. 83.
14. Heidenhain, Mikroskopische Beiträge zur Anatomie und Physiologie der Nieren. Arch. f. mikr. Anat. Bd. X. 1875.
15. Kiefer, Eigenbewegung der Gonococcen. Berlin. Klin. Woch. 1896, pg. 83.
16. Kowalewsky, Ueber das Verhalten der morphologischen Bestandtheile der Lymphe und des Blutes zu Methylenblau. Anat. Anz. Bd. III. 1888.
17. Derselbe, Ein Beitrag zur Kenntniss der Excretionsorgane. Biol. Centralbl. Bd. IX. 1889.
18. Kossel, H., Ueber die Einwirkung der Nucleinsäure auf Bacterien. Sitzungsber. der physiolog. Gesellschaft zu Berlin. Sitzung vom 8. Dez. 1893.
19. Kühn, Notiz über vitale Reaction der Zellgranula nach subcutaner Methylenblauinjection. Arch. f. Anat. und Entwicklungsgeschichte. 1890. pg. 113.
20. Maurel, Recherches experimentales sur les Leucocytes du sang. Paris 1890.
21. Martinotti, Sopra l'assorbimento dei colori d'anilina per parte delle cellule animali viventi. Zeitschr. f. wiss. Mikrosk. Bd. V. 1888.
22. Mayer, S., Ueber die Wirkung der Farbstoffe violett B. und Neutralroth. Sitzungsber. des deutsch. naturw. medic. Vereins f. Böhm. Lotos. 1896. No. 2.
23. Metschnikoff, Ueber die Immunität bei Infectiouskrankheiten mit besonderer Berücksichtigung der Cellulartheorie. Lubarsch-Ostertag Ergebnisse, Abth. 1. 1896.
24. Mitrophanow, Ueber Zellen-Granulationen. Biolog. Centralblatt Bd. IX. 1889.
25. Moore, Eigenbewegung d. Gonococcen. Berl. med. Ges. Dez. 1895.
26. Mosso, Anwendung des Methylgrün zur Erkennung der chemischen Reaction und des Todes der Zellen. Virch. Arch. Bd. CXIII.
27. Müller, Ueber das Reductionsvermögen der Bacterien. Centralbl. f. Bact. Bd. 26.
28. Nakanishi, Vorläufige Mittheilungen über eine neue Färbungsmethode zur Darstellung des feineren Baues der Bacterien. (Münch. med. Wochenschr. 1900. No. 6.)
29. Pappenheim, Ueber Entwicklung und Ausbildung der Erythroblasten. Virch. Arch. Bd. 145.
30. Pfeffer, Beiträge zur Kenntniss der Oxydationsvorgänge in lebenden Zellen. Abhdl. d. math. phys. Classe d. Kgl. sächsisch. Gesellschaft d. Wissensch. Leipzig 1889.
31. Derselbe, Ueber Aufnahme von Anilinfarben in lebenden Zellen. Ein Beitrag zur Mechanik des Stoffaustausches. Unters. a. d. Bot. Institut. Tübingen, siehe Zeitschr. f. wiss. Mikrosk. Bd. III. 1883.

32. Plato, Die interstitiellen Zellen des Hodens und ihre physiologische Bedeutung. Arch. f. mikr. Anat. Bd. 48. 1896.
  33. Derselbe, Ueber Gonococcenfärbung mit Neutralroth in lebenden Leucocyten. Berl. Klin. Wochenschr. 1899. No. 49.
  34. Prowaczek, Vitalfärbungen mit Neutralroth an Protozoen. Zeitschrift f. wissensch. Zoologie Bd. 63. 1898.
  35. Przesmycki, Ueber die intravitale Färbung des Kerns etc. Biol. Centralbl. XVII. 1897.
  36. Schindler, Beiträge zur Kenntniss der Malpighi'schen Gefäße der Insekten. Zeitschr. f. wiss. Zoologie Bd. XXX. 1878.
  37. Schulze, O., Die vitale Methylenblau-Reaction der Zellgranula. Anatom. Anzeig. Bd. II. 1887.
  38. Solger, Zur Physiologie der sogenannten Venenanlage der Cephalopoden. Zool. Anz. Bd. IV. 1881.
  39. Teichmann, Mikr. Beitr. zur Lehre von der Fettresorption. Inaug.-Dissert. 1891.
  40. Wittich, Physiologie der Nieren. Arch. f. mikr. Anat. 1875.
  41. Zoja, Die vitale Methylenblaufärbung bei Hydra. Zool. Anzeig. Bd. XV. 1892.
  42. Richter, Ueber die Anwendung des Neutralroth zur Gonococcenfärbung. Dermat. Zeitschrift. 1900. Heft 2.
  43. Plato, Ueber die Beurtheilung des Lebenszustandes und der Leistungen der Phagocyten mittelst der vitalen Neutralrothfärbung. Münch. med. Woch. 1900. No. 36.
-