

Aus dem Anatomischen Institut zu Greifswald.

## Zur Morphologie der vitalen Granulafärbung.

Von

Wilhelm von Moellendorff.

Hierzu Tafel XV und XVI.

### Inhalt:

	Seite
I. Einleitung . . . . .	463
II. Morphologie der granulären Färbung mit sauren Farbstoffen . . . . .	465
III. Morphologie der vitalen Färbung mit basischen Farbstoffen . . . . .	470
a) Die vitale Färbung der Dotterplättchen . . . . .	472
b) Die vitale Färbung der Zellgranula . . . . .	475
IV. Die Färbung saurer Farbstoffgranula durch basische Farbstoffe . . . . .	477
a) Vitale Versuche an Kaulquappen . . . . .	478
b) Supravitale Versuche an Kaulquappen: die Granulafärbung ist ein reaktiver Vorgang . . . . .	481
V. Supravitale Färbungen an Mäuseorganen: die Färbbarkeit der sauren Farbstoffgranula und normaler Zellgranula durch basische Farbstoffe sind analoge Vorgänge . . . . .	485
VI. Schluss: Für die vitale Färbung mit basischen Farbstoffen ist nur die chemische oder kolloidchemische Struktur der Granula massgebend, keine besondere vitale Tätigkeit derselben . . . . .	490
Literaturverzeichnis . . . . .	499
Erklärung der Tafelabbildungen . . . . .	501

### I. Einleitung.

Die Färbung unfixierter Gewebe hat seit den achtziger Jahren des vorigen Jahrhunderts eine Fülle von Beobachtungen gefördert, die für die mannigfachsten Fragen der Morphologie und der Physiologie verwertet worden sind. Die Durchsicht der unzähligen Arbeiten, in denen mit wechselndem Erfolge Färbungen in unfixierten Geweben von verschiedenem Grade des Lebenszustandes mitgeteilt sind, liefert das auffallende Ergebnis, dass die Geschichte dieses Gebietes unserer Färbetechnik in technischer Beziehung kaum einen Fortschritt zu verzeichnen hat. Seitdem besonders durch Ehrlich Farbstoffe eingeführt worden waren, deren Anwendung auf lebende Gewebe in ihrer Klarheit

fast unübertreffliche Färbungen gestattete, ist mit diesen Farbstoffen an allen möglichen Objekten experimentiert worden; die dabei gewonnenen Bilder waren in den meisten Fällen ähnlich. Nur von der Fragestellung, von der jeweils gegebenen Deutung hing es ab, welche Bedeutung diesen Bildern zugesprochen wurde.

Durch Erweiterung der Versuche auf eine grosse Anzahl von Farbstoffen ist mehrfach versucht worden, in den Mechanismus der Färbung einzudringen. Überblicken wir aber das bisher erreichte Ergebnis, so muss gesagt werden, dass wir erst in den allerersten Anfängen eines Verständnisses der Farbstoffwirkung stehen. Es ist in erster Linie die Histophysiologie, die bisher wirklichen Nutzen aus den Farbstoffversuchen gezogen hat, nachdem es den Bemühungen R. Hoebers, W. Ruhlands, W. Schulemanns, W. von Moellendorffs u. a. gelungen ist, den Wirkungsmechanismus einer ganzen Gruppe von Farbstoffen einigermaßen aufzuklären: durch die Erkenntnis, dass für die Wirkung fast aller sauren Farbstoffe in erster Linie ihr Lösungszustand massgebend ist, wurden die Probleme der Zellpermeabilität, der Phagozytose, der Nieren- und Leberphysiologie nicht unwesentlich gefördert. Die Zytomorphologie ist dabei bis zu einem gewissen Grade leer ausgegangen, da theoretische Erwägungen und experimentelle Beobachtungen den Schluss nahe legten, dass die granulären Abscheidungen der sauren Farbstoffe Neubildungen im Zellenbau seien, dass präformierte, dem Zellforscher auch sonst zugängliche granuläre Bildungen mit der Speicherung saurer Farbstoffe nicht betraut seien (W. Schulemann und H. M. Evans, von Moellendorff).

Über die Auffassung der Wirkung basischer Farbstoffe herrscht dagegen noch eine grosse Unsicherheit; diese kommt besonders gut zum Ausdruck in dem grossen Werke von J. Arnold (1914). Hier wogt der Streit, ob präformierte Granula gefärbt werden, oder ob die bei der Wirkung gewisser basischer Farbstoffe auftretenden Granulabilder Kunstprodukte sind, ob lebenswichtige Organellen die Farbspeicherung besorgen, ob Abfallsprodukte des Stoffwechsels gefärbt werden. Man weiss auch nicht, ob die Farbspeicherung als chemischer Vorgang einer Reaktion zwischen Granulumsbstanz und Farbstoff aufgefasst werden soll, oder ob eine Lösung der Farbstoffe in einem als spezifisches Lösungsmittel bezeichneten Substrate stattfindet.

Wenn ich angesichts dieser Sachlage mit einigen Arbeiten die grosse Literatur über diesen Gegenstand vermehre, so tue ich dies in der Hoffnung, gerade die Wirkungsweise der basischen Farbstoffe von einem umfassenden Standpunkt aus beleuchten zu können. Alle Spekulationen, ob eine wirkliche Vitalfärbung, d. h. eine Farbspeicherung in zweifellos funktionierenden Elementen der Zelle ohne Beeinträchtigung ihrer Leistung möglich ist, ob ferner die Färbung als Leistung der Granula oder anderer Zellgebilde aufzufassen ist, können ja doch erst erörtert werden, wenn wir die Bedingungen kennen, unter denen eine Färbung möglich ist.

Zu diesem Zwecke war es notwendig, zunächst an geeigneten Objekten den Vorgang der Granulafärbung genauer zu verfolgen, wobei Beobachtungen gemacht wurden, die schon vielfach auch von anderer Seite beschrieben sind, deren Deutung aber erst möglich wurde, als es gelang, die gleichen Bilder an experimentell erzeugten Granulis von bekannter Zusammensetzung zu machen. Dadurch konnte ich zu einer befriedigenden Deutung der Morphologie der Granulafärbung gelangen, die den Vorgang auf Phänomene zurückführt, die im Reagenzglas nachgeahmt werden können. Einige Ergebnisse dieser Forschungen hat schon meine Schülerin E. Herzfeld (1917) veröffentlicht.

In dieser ersten Mitteilung ist es meine Aufgabe, den Vorgang der basischen Granulafärbung klarzulegen; eine kurze Zusammenstellung unserer Auffassung der sauren Granulabildung stelle ich voran, weil sie zum Verständnis der weiteren Auseinandersetzungen notwendig ist und durch einige neue Ergebnisse ergänzt werden konnte.

In einer zweiten Mitteilung werden sodann die allgemeinen Grundlagen aufgedeckt, die zu der vitalen Farbstoffwirkung notwendig sind; durch die Beachtung der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Farbstoffe konnte auch hier ein befriedigendes Ergebnis gewonnen werden.

## **II. Morphologie der granulären Färbung mit sauren Farbstoffen.**

In einer Reihe von Untersuchungen habe ich meine Ansicht begründet, dass saure Farben in den Zellen, in denen sie ab-

gelagert werden, meist neue Granula bilden. Diese Ansicht widerspricht der der meisten älteren Untersucher, die entweder in der Ablagerungsart saurer und basischer Farben keinen prinzipiellen morphologischen Unterschied annahmen (so Arnold, Goldmann u. a.) oder sogar ausdrücklich angeben, dass saure Farbstoffe an präformierte, zum Teil plastosomale Bestandteile der Zellen gebunden werden (Gross, Aschoff und seine Schule u. v. a.). Eine erfreuliche Übereinstimmung mit meiner Ansicht geben die Untersuchungen von botanischer Seite (Ruhland) und die Schulemanns und seiner Mitarbeiter.

Neuere Untersuchungen lehren mich, dass auch saure Farbstoffe unter gewissen Umständen an präformierte Zellgranula herangehen.

Ein Fall, der allerdings aus meinem jetzigen Thema herausfällt, ist die sog. „postvitale“ Färbung mit sauren Farben; er ist schon aus einer Reihe früherer Untersuchungen bekannt. Ihrer Natur nach bedürfen diese Vorgänge allerdings noch einer Klärung. Zu dieser Gruppe von Färbungen rechne ich die Färbung der eosinophilen Leukozytengranula durch saure Farbstoffe (Trypanblau nach Schulemann, Pappenheim, Nakano). Diese Färbung kommt wohl nur an abgetötetem, z.B. formolisiertem Material vor, ist aber weitgehend different. Hierhin gehört auch die von mir (1913) seinerzeit als vital beschriebene, aber wahrscheinlich auch nur postvital in der Fixierungsflüssigkeit oder ohne dieselbe nach dem Absterben auftretende Färbung der eosinophilen Zellen der Darmwand mit Trypanblau, Natronkarmin, Nigrosin und anderen sauren Farbstoffen. Auch die damals beschriebene Färbung der Granula in Becherzellen und Panethschen Zellen dürfte zu diesen Vorgängen zu rechnen sein.

Neuerdings habe ich an Kaulquappen und erwachsenen Fröschen mit zahlreichen sauren Farbstoffen supravitale Färbungen an unfixiertem Material erzielt. Hier sind es stark lichtbrechende Granula in sehr formvariablen Bindegewebszellen, die besonders mit Eosin und verwandten Farbstoffen nach dem Tode des Tieres rasch und intensiv reagieren.

In allen diesen Fällen werden also saure Farbstoffe, besonders nach Ausschaltung des Lebenszustandes, an zweifellos präformierte Granula rasch und intensiv abgelagert. Ob dieser Färbung physikalische oder chemische Vorgänge zugrunde liegen, ist unbekannt.

Jedenfalls ist das Gebiet dieser postvitalen Färbungen mit sauren Farbstoffen streng abzusondern von der Granulabildung saurer Farben, die nur im lebenden Gewebe vorkommt, also ein spezifisch vitaler Vorgang ist.

Es darf geradezu als ein Beweis für die Erhaltung des Zellenlebens im Carrel'schen Präparat angesehen werden, dass Hofmann (1914) zeigen konnte, dass im Plasma wachsende embryonale Lebersternzellen Trypanblau aus dem Plasma granulär abzulagern vermögen.

Die Granulabildung ist charakterisiert durch die Art ihres Werdens; die allmähliche Zunahme der Grösse, der Dichte, sowie der Zahl der Granula in der Zelle lassen bei genauer Untersuchung den Vorgang relativ leicht beobachten. Dass jedoch nicht stets neue Granula von einem in die Zelle eintretenden Farbstoffe gebildet zu werden brauchen, lehren folgende Beobachtungen.

Bei gleichzeitiger Anwendung zweier saurer Farbstoffe erhält man vielfach neben getrennten Granulis auch Mischgranula; nur handelt es sich hier um eine richtige Mischung, nicht um ein gelöstes Reaktionsprodukt, wie es bei der Kombination eines sauren mit einem basischen Farbstoffe entsteht.

Die oft zu beobachtende Entstehung von Mischgranula bei der Anwendung eines Gemisches zweier saurer Farbstoffe lehrt, dass nicht unbedingt der saure Farbstoff neue Granula bei seinem Eintritt in die Zelle zu bilden braucht. Die Konzentration, bis zu der ein Granulum mit einem oder mehreren Stoffen beladen ist, dürfte dafür ausschlaggebend sein, ob ein neu in die Zelle eintretender Stoff sich in ein „präformiertes“ Granulum zumischen kann, oder ob für ihn ein neues Granulum gebildet werden soll. Zu der gleichen Vorstellung führen Beobachtungen an Tieren, deren Nierenzellen mit reichlichem gelbem, wohl einem dem Leberstoffwechsel entstammenden, auf dem Ausscheidungswege befindlichen Pigmente angefüllt waren; dies Pigment ist granulär angeordnet und hindert das Zustandekommen einer granulären Ablagerung saurer Farbstoffe empfindlich. Ein Teil der Pigmenttropfen nimmt jedoch spärliche Mengen sauren Farbstoffes auf, wodurch bei blauen Farbstoffen eine verschieden intensive Grünfärbung der Pigmenttropfen hervorgerufen wird (Siehe Fig. 2

und 3, Taf. XV). Dies ist also ein Fall, in dem mit Sicherheit saure Farbstoffe in Granula eintreten, die vorher schon in der Zelle vorhanden waren. Hier sind aber trotzdem ganz andere Vorgänge beobachtet, als bei der Färbung mit basischen Farbstoffen. Es handelt sich hier um das Konkurrieren zweier in gleicher Weise zur Granulabildung befähigter Substanzen um den Sitz in einem Granulum, nicht um die Reaktion des einen Stoffes mit dem anderen.

Fig. 1 zeigt dagegen zwei Vornierenzellen einer Kaulquappe aus einer Trypanblaukultur; das Tier, das schon reichlich Trypanblau abgelagert hatte, wurde vor der Untersuchung zwei Tage in einer Lösung von Vitalneurot (1:5000) belassen. Hier sind beide sauren Farbstoffe in getrennten Granulis abgelagert. So klare Resultate erhält man nur, wenn der eine Farbstoff (Trypanblau) schon lange abgelagert ist, so dass die von ihm gebildeten Granula „fertig“ (Schulemann) sind.

Die genannten Beobachtungen lehren einmal, dass, wie auch besonders für die Säugetiere schon seit längerer Zeit bekannt ist, unter bestimmten Umständen dem Körper entstammende Substanzen in den Nierenzellen in ähnlicher Form granulär abgelagert werden können wie saure Farbstoffe. Aus dem Umstande, dass in solche Pigmentgranula ein Teil des sauren Farbstoffes einzudringen vermag, ist weiterhin zu schliessen, dass Pigmentgranula und Farbstoffgranula in weitem Umfange analoge Bildungen sind. Es ist anzunehmen, dass auch ungefärbte Substanzen des Körpers zur Granulabildung befähigt sind, dass ein Teil der zahlreichen Granula in Nierenzellen solche durch Konzentration in den Zellen abgelagerte Substanzen, vielleicht Eiweisskörper sind.

Ich bin trotzdem weit davon entfernt, etwa anzunehmen, alle granulären Bildungen in den Zellen seien in dieser Weise entstanden, eine Vermutung, die in einem Satze der Arbeit von Schulemann und Evans (1915) enthalten ist. Sie sagen S. 208: „Seine (Tschaschins) Arbeiten aber geben uns den Anlass, mit allem Vorbehalt darauf hinzudeuten, ob nicht die echten Chondriosomen gleichwertig (nicht identisch!) den durch die Vitalfärbung (sc. mit sauren Farbstoffen. D. Verf.) entstehenden Farbstoffgranula seien.“ Die Veranlassung zu diesem Satze gaben die Arbeiten Tschaschins, der auf Grund blosser

Ähnlichkeit von Mitochondrienpräparaten und Vitalfärbungsbildern die Behauptung aufgestellt hatte, die Chondriosomen seien die Farbstoffträger, die Begründung des Schulemannschen Satzes erfolgte aus ähnlichen Gesichtspunkten, wie sie von mir oben angedeutet wurden. In einer ganzen Reihe von Fällen können aber Mitochondrien sicherlich von den einer Vitalfärbung mit basischen Farbstoffen im allgemeinen zugänglichen Gebilden abge sondert werden, während die sauren Farbstoffgranula sowohl, wie andere der Zelle eigene Granula den basischen Farbstoffen zugänglich sind. Ich möchte die fast ausnahmslose Regel, dass typische Plastosomen einer vitalen Färbung schwer zugänglich sind (s. Duesbergs Referat), geradezu als grundlegend für die Abtrennung dieser Granula von Plastosomen betrachten.

Der Vorgang der Granulabildung bei sauren Farbstoffen ist durch eine langsame, allmählich eintretende Verminderung der Dispersität charakterisiert. Dieselbe ist begleitet und vorwiegend wohl verursacht durch die zunehmende Konzentrierung des Farbstoffes in den Granulis. Morphologisch sind diese Stufen in der Granulaentwicklung hauptsächlich an dem Dunklerwerden der Granula zu erkennen. Einen besonders schönen Fall, gleichzeitig einen guten Beweis für unsere Auffassung, entdeckte Schulemann (1914) in dem Verhalten verschiedener Farbstoffe (Bordeaux extra usw.), bei deren Konzentrierung Metachromasie eintritt. Vorher rot gefärbte Granula enthielten eine zunehmende Zahl blauer Körnchen — der Farbstoff flockt in den Granulis blau aus. Durch diese Beobachtungen werden auch Bilder verständlich, die man bei nicht metachromasierenden Farbstoffen erhält. Auch hier ist bei zunehmender Konzentrierung vielfach in vorher homogen durchgefärbten Granulis (s. Fig. 2) das Auftreten kleinster Substanzkörnchen zu beobachten (Fig. 3, Taf. XV). Dass es sich hier um das Ausflocken des Farbstoffes handelt, darin ist wohl Schulemann unbedingt beizustimmen.

Durch diese und andere, in früheren eigenen Arbeiten und den Veröffentlichungen Schulemanns niedergelegte Beobachtungen halte ich die Frage der Granulabildung saurer Farbstoffe nach der morphologischen Seite hin für im wesentlichen geklärt. Anders steht es mit der Morphologie der Granula, die mit basischen Farbstoffen färbbar sind.

### III. Morphologie der vitalen Färbung mit basischen Farbstoffen.

Bezüglich der älteren Literatur verweise ich auf die übersichtliche Zusammenstellung Fischels in dem Abschnitt „Vitale Färbung“ in der Enzyklopädie f. mikr. Techn. Eine wesentliche Förderung über die dort referierten Angaben hinaus hat unsere Kenntnis über die Wirkung der basischen Farbstoffe nicht erfahren.

Fischel, dem neben Arnold u. a. ein grosses Verdienst an dem Ausbau unserer Kenntnisse auf diesem schwierigen Gebiete zukommt, gibt zu, dass in vielen Fällen eine vitale Färbung mit basischen Farbstoffen auch „tote“ Zellbestandteile, wie durch Phagozytose aufgenommene Fremdkörper, Abfallsprodukte des Stoffwechsels usw. darstellt. Über diese hinaus färben sich aber nach seiner Ansicht zweifellos auch integrierende Bestandteile der Zellen, die er deswegen als integrierend betrachtet, weil sie sich konstant und in „anscheinend unveränderlicher Form im Zellleib“ vorfinden; „sie weisen den Farbstoffen gegenüber eine viel hochgradigere Elektivität auf, als die anderen Gebilde und finden sich schliesslich in einzelnen Zellarten in typischer Form und Anordnung vor“. Sie „bilden zum Teil vielleicht auch einen lebenden Anteil des Protoplasmas“. Was die Konstanz der Granula angeht, so ist auf die Erörterung im 2. Abschnitt dieser Arbeit zu verweisen. Auch dauerndem Wechsel unterworfenen Granula müssen eine annähernd konstante Anordnung in der Zelle einnehmen, da sie an den Bau des Protoplasmas gebunden sind. Die schwer zu beweisende Konstanz ist also jedenfalls kein Beweis für die funktionelle Wichtigkeit eines Strukturelements.

Fischel, der im wesentlichen Vitalfärbung nur mit basischen Farbstoffen beobachtet zu haben scheint, hebt ferner mit aller Schärfe hervor, dass auch die letztere Art von granulären Einschlüssen jedenfalls präformiert sei; wir können bei der eingehenden Kenntnis des Ausfalls der vitalen Färbung mit sauren Farbstoffen mit aller Bestimmtheit den Satz an den Anfang unserer Betrachtungen stellen:

Basische Farbstoffe, im Gegensatz zu sauren, **färben**, d. h. die Farbstoffe lagern sich an vorher in den Zellen sichtbare, meist granuläre Bildungen an, während saure Farbstoffe im allgemeinen abgelagert werden an Stellen, die vorher von sichtbaren Strukturelementen nicht eingenommen wurden.



Von diesem Satze ist eine Ausnahme in den Fällen zu sehen, in denen es nach Fischel zu einem Auskristallisieren der Farbstoffsubstanz kommt; bei Anwendung von Bismarckbraun Nilblausulfat und -chlorhydrat scheiden sich in wechselnder Menge in und zwischen den Zellen Kristallnadeln aus, die nach dem Autor die normale Funktion in keiner ersichtlichen Weise beeinträchtigen. Ob und in welchem Umfange ein Teil der gefärbten Granula erst durch die Farbeinwirkung entstehen, ist eine ebenfalls noch nicht entschiedene Frage. Wir werden im Verlaufe der nachstehenden Mitteilung die Entstehung derartiger „Kunstprodukte“ teilweise kennen lernen.

Dass eine Färbung präformierter Zellbestandteile vorkommt, darf heute als so gesichert angesehen werden, dass es eines näheren Eingehens auf diese Vorgänge nicht bedürfte, wenn wir nicht an unserem Material eine Reihe von Beobachtungen gemacht hätten, die meines Erachtens den Mechanismus der Granulafärbung genauer beleuchten.

Die nachfolgenden, in Kürze mitgeteilten Ergebnisse entstammen Versuchen meiner Frau (Sommer 1915), die auch die Zeichnungen sämtlich frisch nach dem überlebenden Präparat anfertigte. Wir arbeiteten mit Quappen von *Rana fusca* und *esculenta*, die im wesentlichen die gleichen Resultate ergaben; Verschiedenheiten z. T. interessantester Natur ergaben sich nur bezüglich des Alters der Larven, worauf öfters eingegangen werden wird.

Folgende Farbstoffe wurden verwandt:

Neutralrot,	Diazin grün,
Nilblausulfat,	Naphtholblau,
Bismarckbraun,	Nilblauchlorhydrat,
Janusgrün,	Methylenblau rectif.,
Toluidinblau,	Methylenblau BX,

sämtlich von Grübler in Leipzig bezogen.

Von diesen Farbstoffen ergaben Nilblauchlorhydrat, Diazin grün, Toluidinblau, Janusgrün bezüglich der Nieren in unseren Versuchen ein völlig negatives Resultat bei starker Giftwirkung. Deshalb wurde von ihrer Anwendung bald abgesehen. Die stärkere Giftwirkung der basischen Farbstoffe verlangt ganz allgemein, wie auch Fischel hervorhebt, eine vorsichtige Dosierung. Wird z. B. Neutralrot in so verdünnter Lösung

(ca. 1:300 000) angewandt, dass das Wasser noch eben einen rötlichen Schimmer besitzt, so wird der Farbstoff gut vertragen. Will man dagegen rasch eine kräftige Färbung erzielen, so verwendet man Lösungen 1:10 000 bis 1:50 000. In solchen Lösungen aber werden die Quappen schon nach zwei Stunden sehr matt, so dass sie nach dieser Zeit spätestens in reines Wasser übertragen werden müssen.

In ähnlicher Geschwindigkeit tritt die Farbreaktion mit Nilblausulfat ein. Lösungen 1:300 000 genügen bei jungen Larven schon, um innerhalb einer halben bis zwei Stunden eine kräftige Granulafärbung in der Niere hervorzurufen. Bei älteren Individuen scheint die Reaktion nicht mehr so stürmisch zu verlaufen; hier konnten wir erst mit Lösungen 1:30 000 kräftigere Färbungen erzielen.

Auch Bismarckbraun färbt in Lösungen 1:10 000 bis 1:60 000 rasch und kräftig. Dagegen waren unsere Resultate mit Methylenblau nicht so befriedigend. Hier fand sich an der Niere nur Pigmentfärbung. In anderen Organen (Darm, Leber usw.) reagieren auch unpigmentierte, granuläre Einschlüsse mit dem Methylenblau. An der Niere erzielten wir in unseren allerdings mit diesem Farbstoffe nicht sehr zahlreichen Versuchen keine schönen Färbungen (siehe dagegen Schultze 1888).

Entgegen den Angaben Fischels konnten wir uns nicht von der langen Haltbarkeit der basischen Färbungen nach Übertragung der Versuchstiere in reines Wasser überzeugen. Allerdings behält die Haut auffallend lange eine gewisse Färbung, aber vor allem die Niere zeigt sehr bald (schon nach 24 Stunden) eine erhebliche Abnahme der zuerst sehr kräftigen Färbungen. Eine gewisse Menge von Farbe bleibt dann allerdings längere Zeit in den Zellen erhalten.

Hauptuntersuchungsobjekt war zumeist die Vorniere mit ihren grossen granularen Zellen, besonders deshalb, weil an ihr auch die sauren Farbstoffe eingelagert werden. Unsere Versuche erstreckten sich vornehmlich auch auf die jüngsten Entwicklungszustände dieses Organs, ohne dass dabei die Ergebnisse an den übrigen Körperzellen vernachlässigt worden wären.

#### a) Die vitale Färbung der Dotterplättchen.

Bei Larven, die soeben ihre Gallerthülle verlassen haben, enthalten die Vornierenzellen ebenso wie alle übrigen Körper-

zellen reichlich Dotterplättchen. Diese nehmen basische Farbstoffe (Neutralrot, Nilblausulfat) mit grosser Avidität auf. Dabei ist anfangs das ganze Dotterplättchen durchgefärbt und erscheint gelbrot (die Bilder wiederholen sich in allen Körperzellen, siehe Fig. 4, Taf. XV).

Bei etwas älteren Larven (mit sichtbaren äusseren Kiemen) ändert sich das Bild in auffallender Weise. Trotz gleichartiger Behandlung (diese Versuche wurden mit ganz dünnen Neutralrotlösungen gemacht) ist nur ein geringer Prozentsatz von Dotterplättchen noch intensiv homogen färbbar. Viel häufiger erhält man das Bild der Fig. 5: den blass gefärbten Dotterplättchen sitzen flache, stark gefärbte Kappen auf, die wohl meist kreisförmig rund, aber flach gestaltet sind und deshalb bei Flächen- und Kantenansicht recht verschieden aussehen. Solche Bilder wurden sowohl dann erhalten, wenn die Quappen in verdünnten Farbstofflösungen bis zum Auftreten dieser Zerfallserscheinungen gehalten wurden, wie dann, wenn entsprechende Stadien frisch in die Farbstofflösung gebracht wurden. Zu gleicher Zeit treten in den Zellen neben den Dotterplättchen, die anfangs neben Pigmentkörnchen die einzigen auffälligen Zelleinschlüsse darstellen, mit Neutralrot färbbare kleine Granula auf (siehe Fig. 6, Taf. XV). Auch ungefärbte kleine Granula werden jetzt sichtbar. Zunächst könnte daran gedacht werden, dass diese eigentartigen Zerfallsbilder auf die Farbstoffwirkung zurückzuführen seien. Die relative Grösse dieser Zelleinschlüsse gestattet aber mit Sicherheit diese Möglichkeit auszuschliessen. Auch an ungefärbten, frisch zerpupften Quappen lassen sich alle diese Bilder erkennen.

Danach zeigt die basische Färbung in diesem Falle einige bemerkenswerte Punkte: 1. Mit Sicherheit handelt es sich um eine Färbung präformierter, wohl charakterisierter Zelleinschlüsse. Die Dotterplättchen — das wird wohl allgemein angenommen — sind schon der Eizelle in dieser Form beigegebenes Deutoplasma, das bei dem Zellstoffwechsel als Nährmaterial zu dienen hat, also eine im wesentlichen passive Rolle spielt.

2. In den physikalischen oder chemischen Eigenschaften der Dotterplättchen muss es begründet sein, dass sie sich mit Neutralrot und anderen basischen Farbstoffen färben — auf diesen Punkt einzugehen ist hier nicht der Ort.

3. Aus den Dotterplättchen tritt eine die basischen Farbstoffe besonders kräftig an sich reissende Substanz aus, die offenbar als Granulum noch eine Zeitlang erkennbar bleibt (s. Fig. 6 und 7). Diese Tatsache muss besonders bedeutsam erscheinen. Sie kann in zweierlei Weise verwertet werden. Entweder es entstehen wirklich aus den Dotterplättchen aktive Orte des Zellenstoffwechsels, eine Annahme, die mir wenig Wahrscheinliches für sich zu haben scheint, oder vielmehr: die beobachteten Umbildungs- und Übergangsformen aus Dotterplättchen in typische „Granula“ sind geeignet, der Auffassung eine kräftige Stütze zu geben, die die mit basischen Farbstoffen in den Zellen darstellbaren Granula als passive Bestandteile der Zellen ganz allgemein betrachtet. Mit einer solchen Vorstellung ist die Anschauung Pfeffers und Ruhlands vereinbar, dass in Pflanzenzellen die vitale Reaktion mit basischen Farbstoffen auf dem Gehalt an Gerbsäure beruhe. Für diese Ansicht sprechen auch die Resultate meiner unten mitzuteilenden Versuche mit Kombinationsfärbungen. Es darf dabei nicht überraschen, dass bei älteren Larven in fast allen Zellen Granula in relativ gleichförmiger Beschaffenheit angetroffen werden, die zu basischen Farbstoffen Verwandtschaft besitzen. Denn je weiter der Zerfall der Dotterplättchen fortschreitet, um so mehr tritt die aktive Nahrungsaufnahme der Kaulquappe in den Vordergrund; es ist durchaus vorstellbar, dass nunmehr aus anderen Quellen stammende Substanzen bei der Verarbeitung in den Zellen in ähnlicher Form und Verteilung auftreten, wie dies von den Granulis gilt, die beim Dotterplättchenzerfall in Erscheinung treten. Diese Auffassung liegt nach den oben beschriebenen Ergebnissen der Ablagerungsart saurer Farben um so näher, als wir an ihnen die Fähigkeit des Zellenprotoplasmas erkannt haben, gelöste, in die Zelle eindringende Substanzen in Granulaform abzulagern.

Die Ergebnisse der Dotterplättchenfärbung betrachte ich deshalb als wichtig, weil sie uns ein Beispiel geben, wie aus anerkannt passiven Nahrungseinschlüssen sich Granula ablösen, die bezüglich ihrer Färbbarkeit die Verwandtschaft mit ihren Ursprungssubstanzen dartun, bezüglich ihrer Form und Verteilung aber auffallend ähnlich sind den Granulis, die in allen späteren Stadien der Entwicklung mit basischen Farbstoffen reagieren

und von anderer Seite (besonders Fischel, Arnold) als aktive Zellorte aufgefasst werden.

A. Fischel erwähnt ausdrücklich, dass die Dotterplättchen in Epithelzellen des Schwanzes von Rana-Larven sich mit Methylenblau, Bismarckbraun und Neutralrot nicht färben: Methylenblau färbte nur Pigmentkörnchen, Bismarckbraun einen Teil der in den Zellen sichtbaren, verschieden grossen Granula hellgelb, mit Neutralrot liessen sich zwei Arten von Granulis färben: 1. solche, die offenbar den Bismarckbraungranulis entsprechen, daneben 2. ganz feine Granula. Die Dotterplättchen blieben gänzlich ungefärbt.

Die Ergebnisse Fischels stehen aber nur scheinbar im Gegensatz zu den meinigen; denn seine Quappen waren, nach der Grösse zu schliessen, die er auf 8—10 mm angibt schon wesentlich älter als das von mir erfolgreich verwandte Material. Auch ich konnte zeigen, dass mit dem durch das Wachstum und die weitere Entwicklung bedingten Zerfall der Dotterplättchen ihre Färbbarkeit aufhört und an die teilweise offenbar aus ihnen entstandenen kleinen Zellgranula übergeht.

Hinzufügen möchte ich noch, dass es auch sehr gut gelingt, noch in der Gallerthülle befindlichen Laich mit Neutralrot, Nilblausulfat usw. zu färben, und dass es hier ausschliesslich die Dotterplättchen sind, die eine intensive Färbung annehmen.

#### b) Die vitale Färbung der Zellgranula.

Nach Verlust des Dotters in den Zellen ist die Färbung wesentlich verschieden von der anfangs geschilderten. Am wenigsten unterscheidet sich die Geschwindigkeit des Färbungseintrittes. Nach zahlreichen Vorversuchen wurde für Neutralrot die Konzentration 1:50000, Nilblausulfat 1:300000, Bismarckbraun 1:15000 gewählt; die genauesten Beobachtungen wurden mit Neutralrot gewonnen.

Um zahlreiche präformierte, schön runde, verschieden stark lichtbrechende Granula ordnen sich ganz kleine, scharf abgegrenzte, intensiv gefärbte Granula an. Die eigenartige kranzförmige Anordnung dieser ersten Granula findet eine Analogie in der Anordnung, die vielfach die Pigmentgranula besitzen (vgl. Fig. 8 und 9).

Diese Analogie in der Lagerung soll hier nur erwähnt werden,

ohne dass damit zwischen beiden Bildungen eine möglicherweise in Betracht kommende Identität behauptet werden soll. Die Pigmentfrage ist zu verwickelt, um hier nebenher aufgerollt zu werden.

Die beobachtete ringförmige Anordnung feinsten Granula ist aber, wo sie beobachtet wird, stets eine vorübergehende Erscheinung. Kurze Zeit später tritt unter allmählicher Durchfärbung der präformierten, anfänglich noch ungefärbten Granula der Farbstoff aus den zuerst beobachteten Umstellungsgranulisaus. Typische, in diesem Stadium angetroffene Granulabilder zeigt Fig. 9. Im weiteren Verlaufe der Färbung mit Neutralrot ändert sich das Bild immer mehr zugunsten der homogen durchgefärbten Granula, die anfänglich beobachteten Umstellungsbilder verschwinden völlig. Die zuerst nur hell durchgefärbten präformierten Granula werden mit weiterem Zutritt basischen Farbstoffes immer dunkler und bekommen damit das Aussehen von schwarzroten, ungelösten Farbstoffmassen.

Diese von uns vielfach beobachtete Reihenfolge in der Ausbildung der Granulafärbung ergänzt in manchen Punkten die von A. Fischel (1900) und anderen Autoren gegebene Darstellung. Eine anfängliche Anhäufung der Farbstoffe am Rande der Granula beschreibt Fischel sehr eingehend bei den Granulis der Leydig'schen Zellen, wo er mit Bismarckbraun und Nilblaulorhydrat im Anfange der Färbung intensive, ringförmig die Granula umgebende Farbstoffanhäufungen beobachtete. die im weiteren Verlaufe der Färbung bei Bismarckbraun wieder verschwinden, indem an ihre Stelle eine hellere Durchfärbung der Granulasubstanz tritt. Bei Nilblaulorhydrat haben die Ringe einen violetten Farbenton.

Bis zu diesem Stadium geht bei der Neutralrotfärbung die Ablagerung von statten, ohne dass die Zellen wesentliche Veränderungen in Form und Lagerung ihrer Granula erkennen liessen. Im weiteren Verlaufe, bei noch längerer Einwirkung des Farbstoffes oder bei Anwendung zu hoher Konzentrationen verstärkt sich die Färbung natürlich sehr, nicht jedoch ohne gleichzeitig intensiv eingreifende Veränderung in dem ganzen Aussehen der Zellen hervorzubringen. Die vorher einzeln liegenden Granula klumpen sich mit benachbarten zu traubenförmigen Bildungen zusammen, um die herum sich Vakuolen bilden, die

schliesslich beträchtliche Dimensionen erreichen können. Von solchen Bildungen wird hier ganz abgesehen, sie gehören sicherlich schon in den Bereich grober pathologischer Veränderungen.

Von vielen Einzelheiten in der Färbung, besonders von den vielfach beobachteten Schwankungen soll hier nicht die Rede sein; nur kurz soll erwähnt werden, dass der Pigmentgehalt der Zellen von grossem Einfluss auf den Färbungsvorgang ist, indem die Pigmentgranula selbst einer intensiven Farbstoffspeicherung fähig sind, wie schon Fischel sicher beobachtet hat.

Die geschilderten feineren Vorgänge bei der vitalen Granulafärbung mit basischen Farben hätten nun nur geringes Interesse, wenn es nicht gelungen wäre, die Bedeutung dieser Erscheinungen zu erkennen.

#### **IV. Die Färbung saurer Farbstoffgranula durch basische Farbstoffe.**

Schon in der Arbeit von E. Herzfeld (1916) ist eingehend dargelegt worden, dass basische Farbstoffe dann erheblich anders wirken, wenn dem Versuchstiere vorher ein saurer Farbstoff, der zur Granulabildung befähigt ist, eingegeben worden war. Sie konnte die eigenartigen Angaben von R. Hoerber und E. Königberg (1905) aufklären und durch mannigfach abgeänderte Versuchsbedingungen zeigen, dass in diesen Fällen der basische Farbstoff an die Granula des sauren angelagert wird. Der basische Farbstoff wird von den ihm sonst zugänglichen Granulis durch die Anwesenheit der den sauren Farbstoff enthaltenden Granula abgelenkt.

Dies Ergebnis wird nur erhalten, wenn der saure Farbstoff während der Zufuhr des basischen schon in der Zelle abgelagert ist; bei den Versuchen am erwachsenen Tiere ist deshalb ein reines Versuchsergebnis schwer zu erzielen, sofern man auf die Injektion der Farbstoffe angewiesen ist. Lässt man z. B. Wasserblau, einen sauren Farbstoff, eine bestimmte Zeit einwirken, bis es sicher zu Granulabildung gekommen ist, und injiziert darauf Neutralrot, so werden zunächst alle Wasserblaugranula von Neutralrot überfärbt; allmählich macht sich aber der Überschuss des basischen Farbstoffes geltend, es kommt zur Farbstoffablagerung auch an ungefärbten Zellgranulis. Diese Färbung der genuinen

Zellgranula tritt aber erst nach Absättigung sämtlicher in der Zelle enthaltenen Wasserblaugranula auf.

Eigenartig und bei näherer Überlegung für die Auffassung der Granulafärbung von höchstem Interesse war das Ergebnis der umgekehrten Versuchsanordnung; nach Ausschaltung aller, der Natur der Versuche entspringenden Mängel, konnte gezeigt werden, dass ein saurer Farbstoff, der einem mit Neutralrot gefärbten Versuchstiere subkutan injiziert wurde, nicht von seiner gewohnten Wirkungsweise abgelenkt wurde.

Der Erhebung dieses Ergebnisses standen erheblich grössere Schwierigkeiten im Wege; um noch eine genügend starke basische Färbung bei Versuchsende beobachten zu können, war es erforderlich, die Injektion des sauren Farbstoffes schon zu einer Zeit folgen zu lassen, wo noch beträchtliche Mengen des basischen Farbstoffes im Blute kreisten. Es war also vorauszusehen, dass die sich neu bildenden Granula des sauren Farbstoffes zu einem Teile von dem ständig noch die Zellen durchsetzenden basischen Farbstoffe überfärbt werden würden. Dieser Vorstellung entsprachen auch die Ergebnisse der Versuche Herzfelds, in denen nur unter günstigen Verhältnissen neben rein basisch gefärbten und Mischgranulis auch solche Granula beobachtet wurden, die den sauren Farbstoff rein enthielten. Näheres über die damaligen Ergebnisse muss in der Originalarbeit nachgesehen werden.

#### a) Vitale Versuche an Kaulquappen.

Zur Ergänzung dieser Versuche teile ich hier noch eine ähnliche Fragen behandelnde Versuchsreihe besonders deshalb mit, weil es uns gelungen ist, in die feinere Morphologie auch dieser Vorgänge einzudringen. Die erwähnten Schwierigkeiten, die einer Beurteilung der Kombinationsversuche mit basischen und sauren Farbstoffen besonders in den Fällen entgegenstanden, wo der basische Farbstoff dem sauren vorangeschickt wurde, mussten wegfallen, wenn es gelang, eine Versuchsanordnung zu erzielen, bei der einerseits die basische Färbung dauerhaft genug ist, um die beträchtliche Zeit in Anspruch nehmende Färbung mit sauren Farbstoffen zu überstehen, bei der andererseits die Zufuhr des basischen Farbstoffes dann wirklich abgeschnitten ist, wenn die Einwirkung des sauren Farbstoffes beginnt. Solche Bedingungen herzustellen, ermöglichten Versuche mit Kaulquappen.



Ich habe schon a. a. O. (1916,1) ausgeführt, dass entgegen früheren Ansichten (Fischel) eine vitale Färbung mit sauren Farbstoffen auch an diesem für Versuche so bequemen Materiale gelingt; man muss nur darauf achten, dass die Farblösung nicht zu schwach ist und dass der durch Diffusionsversuche zu ermittelnde Dispersitätsgrad der Lösung den geeigneten Wert besitzt. Die Technik ist im übrigen denkbar einfach: man bringt die Quappen in Lösungen der Farbstoffe in gut abgestandenem Brunnenwasser (in Konzentrationen von 1:1000—10 000), wo die für saure Farbstoffe charakteristische Ablagerung in Sternzellen, Hauptstücken der Vor- und Urniere, Histiocyten nach 2—5—8 Tagen, je nach dem angewandten Farbstoffe beginnt. Die Ablagerung erreicht im Verlaufe von Monaten ganz beträchtliche Grade, ohne dass die Tiere erkennbare Schädigungen davontrügen; eine nennenswerte Verzögerung in der Entwicklung der Quappen gegenüber normalen Tieren wird durch die Farbstoffeinwirkung nicht verursacht.

Bei der frischen Untersuchung ist besonders auf die Konzentration der als Zusatzmedium zu verwendenden Kochsalzlösung zu achten; je nach dem Alter der Quappen muss dieselbe variiert werden. In jedem Falle ist bei diesem Material die für die erwachsenen Froschgewebe isotonische Konzentration von 0,65% hypertonisch. Nach zahlreichen Versuchen verwandte ich bei Quappen mittleren Entwicklungsgrades eine 0,32%ige Kochsalzlösung. Bei noch jüngeren Tieren muss noch eine schwächere Konzentration genommen werden.

Ein Blick auf Fig. 10—12 genügt, um schlagend die Richtigkeit der in der Herzfeldschen Arbeit gezogenen Schlüsse zu erweisen. Fig. 10 zeigt zwei Zellen der Vorniere eines Tieres, das lange Zeit in einer starken Trypanblaulösung gelebt hatte. Im Protoplasma liegen meist schön runde, von kleinsten Pigmentkörnchen umstellte Trypanblaugranula. Nach einstündiger Einwirkung von Neutralrot auf ein Tier der gleichen Kultur erhält man das Bild der Fig. 11; sämtliche Trypanblaugranula sind violett umgefärbt, reine Neutralrotgranula sind noch nicht zu erkennen. Sie kommen dagegen nach vierstündiger Neutralroteinwirkung in reichlicher Menge zum Vorschein (Fig. 12). Unter den ungefärbten Trypanblaugranulis finden sich teilweise solche, die die Neutralfarbe in einem helleren Mischton enthalten; sie sind als

einfache Mischgranula aufzufassen im Gegensatz zu den fast schwarzen, opaken Granulis, die den Mischfarbstoff ausgefällt enthalten. Die gleichen Möglichkeiten der Mischfärbung fand Herzfeld in ihren Versuchen an erwachsenen Fröschen und Mäusen.

Sehr viel klarer und beweisender als an erwachsenen Tieren, bei denen man zur direkten Einverleibung der Farbstoffe in den Tierkörper gezwungen ist, sind an unserem Material die Ergebnisse bei umgekehrter Anwendung beider Farbstoffarten. Fig. 13 zeigt neben rein blauen Granulis, die das saure Wasserblau unvermischt enthalten, rein rote mit Neutralrot gefärbte Granula. Die letzteren sind der Überrest einer ursprünglich sehr starken, der Kaulquappe zuerst beigebrachten Neutralrotfärbung. Die später in der Zelle abgelagerten Wasserblaugranula sind keine Bindung mit dem Neutralrot, das an die Zellgranula gebunden war, eingegangen.

Die Versuche waren in folgender Weise angestellt worden: nach zweistündigem Aufenthalt in einer Neutralrotlösung 1:30 000 kamen die Quappen in Wasser für einen Tag; in der Wasserblaulösung (1:5000) ist nach 4 Tagen eine deutliche Bildung von blauen Granulis zu erkennen; zu keiner Zeit wurde ein Mischgranulum beobachtet.

Für diese Farbstoffkombinationen ergibt sich also folgende Auffassung, die auch von Herzfeld vertreten wurde:

1. Der in einer Zelle abgelagerte saure Farbstoff behält seine Reaktionsfähigkeit mit basischen Farbstoffen innerhalb der Granula bei.

2. Der an Zellgranula gebundene basische Farbstoff besitzt innerhalb des Granulums nicht mehr die Fähigkeit, mit sauren Farbstoffen zu reagieren, er muss demnach an die Granulasubstanz verankert sein.

Man darf nun nicht erwarten, mit beliebigen basischen und sauren Farbstoffen in den Zellen eine Reaktion erzielen zu können. An dem Kaulquappenmaterial gelang uns die Reaktion bei folgenden Farbstoffkombinationen ausnahmslos: Trypanblau mit nachfolgender Färbung durch Neutralrot und Bismarckbraun, Wasserblau-Neutralrot, Vitalneurot-Nilblausulfat. Dabei ist es für den Ausfall der Reaktion gleichgültig, ob der basische Farbstoff vital oder supravital angewandt wird. Im einzelnen ergeben sich natürlich

für die einzelnen Farbstoffe charakteristische Verschiedenheiten, die aber für unsere Frage nicht von Belang sind. Später zu berichtende Versuche an Mäusen mit einem ausgedehnten Farbstoffmaterial werden die Bedingungen genauer kennen lehren, die für die Wirkungsweise der verschiedenen Farbstoffe in Betracht kommen.

Niemals ist es mir gelungen, an mit Neutralrot oder Bismarckbraun gefärbten Tieren durch nachträgliche Behandlung mit Wasserblau oder Trypanblau eine Umfärbung der einmal gefärbten Neutralrotgranula zu erzielen. Auch wenn Trypanblau supravital, also in bedeutend stärkerer Konzentration als im vitalen Versuche an die mit Neutralrot gefärbten Zellen herangebracht wird, wird niemals auch nur eine Spur des blauen, sauren Farbstoffes in das mit basischem Farbstoff beschickte Granulum hineingezogen. Im Gegenteil scheint die durch die Anwesenheit des Trypanblau in dem Aussenmedium hervorgerufene stark saure Reaktion das Neutralrot schneller aus seinen Granulis herauszuziehen, als dies unter normalen Umständen beim Absterben der Zellen geschieht. es bildet sich in solchen Versuchen sehr rasch eine rötliche Diffusfärbung unter Verschwinden der granulären Neutralrotfärbung aus.

**b) Supravitale Versuche an Kaulquappen: die Granulafärbung ist ein reaktiver Vorgang.**

Um die feineren Vorgänge bei der Wirkung basischen Farbstoffes auf abgelagerten sauren Farbstoff zu beobachten, ist es zweckmässig, den basischen Farbstoff supravital anzuwenden, weil die Reaktion die ersten Stadien sehr rasch durchheilt: am besten nimmt man die Vorniere aus dem Tiere und setzt den basischen Farbstoff erst zu, wenn man eine zur Untersuchung geeignete Stelle mit Ölimmersion eingestellt hat. Die Untersuchungen haben uns im wesentlichen zwei Arten des Reaktionsablaufes kennen gelehrt, die allerdings zu dem gleichen Ziel, der Ausflockung eines Reaktionsgemisches zwischen saurem und basischem Farbstoff führten.

In dem einen Falle verursacht der Zutritt des basischen Farbstoffes eine Fällung am Rande der sauren Granula. Fig. 14, Taf. XVI zeigt den Ablauf der Reaktion in den Zellen einer mit Wasserblau vital beladenen Urniere, der supravital Neutralrot

zugesetzt wurde. Bei a ein reines Wasserblaugranulum, bei b erste Neutralrotwirkung: Randfällung; die Stelle c zeigt die durch Hineindiffundieren des basischen Farbstoffes immer mehr zunehmende Umfärbung des sauren Granulums, die schliesslich bei d zur völligen Rotfärbung der Granula geführt hat.

Eine Abweichung von diesem Typus, der, wie man sieht, eine völlige Übereinstimmung mit den Stadien einer einfachen vitalen Granulafärbung mit Neutralrot aufweist, zeigt die Reaktion des Oxydasefarbstoffes auf Granula von Bordeaux (Weiler ter Meer). Fig. 15 zeigt bei a die roten Granula von feinsten Fällungsgranula umstellt; durch völlige Erreichung des Neutralpunktes (b) ändert sich das Bild, indem unter vollständigem Abblenden des Granuluminhaltes die Ausflockung des Neutralproduktes vollständig wird.

Ganz ähnliche Bilder bekommt man bei Verwendung stark verdünnter Oxydasereagenzien auch an normalen Zellen, wie auch z. B. S. Graeff (1912) beobachtet und beschrieben hat. Auch er zeigte, dass der Farbstoff an der Oberfläche präformierter Granula in feinsten Körnchen abgelagert wird. Er glaubt trotzdem, dass die Oxydasewirkung eine Eigenschaft der Granula sei, wenn er sich auch nicht unbedingt für diese Ansicht entscheiden kann. Die Möglichkeit, die Oxydasewirkung auch an sauren Farbstoffgranulis zu erzielen, dürfte erweisen, dass der Vorgang der Farbstoffbildung unter der Einwirkung der Oxydase abzutrennen ist von der Fixation des fertigen Farbstoffes an die Granula. Beide Vorgänge sind offenbar an verschiedene Substrate der Zelle geknüpft.

Ähnlich sind die Vorgänge in Fig. 16 und 17, Taf. XVI. Besonders lehrreich ist Fig. 16, die die Neutralrotwirkung auf ein mit Trypanblaugranulis versehenes Vornierenkanälchen darstellt. Von links nach rechts sind hier fast schematisch die verschiedenen Stadien der Wirkung des basischen Farbstoffes zu erkennen. Bei a, wo noch kein Neutralrot hingekommen war, sind noch unvermischte Trypanblaugranula erhalten; das erste Stadium der Neutralrotwirkung lässt hier aber Randfällungen vermissen; der ganze Inhalt des Granulums wird violett und etwas opak, ohne dass eine deutliche Substanzausflockung zunächst zu erkennen wäre. Unter immer stärkerem Überwiegen des roten Farbstoffes wird bei c der Granulainhalt immer deutlicher

inhomogen, um bei d endlich unter Entfärbung der Lösung aus einzelnen rotbraun gefärbten Körnchen zu bestehen. Hier hatte der basische Farbstoff schon am längsten Zeit, seine Wirkung zu entfalten

Ganz ähnlich ist Fig. 17 zu verstehen, die die Wirkung von Nilblausulfat auf Neuvitalrotgranula zeigt. Hier ist der Vorgang besonders gut zu verfolgen durch die Stadien a, b, c, weil die Granula des sauren Farbstoffes in dieser Urniere eine bedeutende Grösse erreicht hatten.

Die beiden geschilderten Typen des Reaktionsverlaufes sind, wie mich einige Beobachtungen lehren, nicht prinzipiell verschieden; ob die Reaktion nach dem ersten oder dem zweiten Typus verläuft, hängt wesentlich von der Konzentration ab, in der der basische Farbstoff an den sauren herantritt. Setzen wir z. B. dem Präparate einer Wasserblauurniere vorsichtig vom Rande aus Neutralrot zu, so blieb die anfängliche Randfällung aus, es kam gleich zu einer diffusen Durchfärbung des Granuluminhaltes, worauf erst nachträglich der Granulainhalt in der Gesamtheit ausflockte. Beschleunigten wir dagegen den Farbzutritt durch leichtes Anheben des Deckglases, so traten momentan die typischen Randfällungsbilder auf. Die Erklärung für diesen Einfluss der Konzentration geben Reagenzglasversuche ab. Nur am Neutralpunkt tritt völlige Ausfällung des Neutralproduktes ein. Geringer Überschuss des sauren oder des basischen Farbstoffes bringt das Neutralprodukt in Lösung; besonders trifft dies zu, wenn der eine der Farbstoffe hochkolloidal ist; in unserem Falle ist Wasserblau ein grobdisperser Farbstoff.

Tritt nun an ein Granulum, in dem Wasserblau in relativ hoher Konzentration enthalten ist, Neutralrot in schwacher Konzentration heran, so wird die geringe Menge des jeweils gebildeten Neutralproduktes stets rasch von dem Überschuss des sauren Farbstoffes gelöst; erst wenn durch genügenden Zutritt des basischen Farbstoffes der Neutralpunkt erreicht ist, wird das ganze Granulum inhomogen, das Neutralprodukt flockt aus.

Zutritt des basischen Farbstoffes in starker Konzentration dagegen verursacht Randfällung, wobei nun eine Umfärbung des Granuluminhaltes vor vollständiger Ausflockung desselben anzeigt, dass die anfängliche Menge des zugetretenen basischen Farbstoffes noch nicht genügt hat, um die ganze Menge des sauren

Farbstoffes zu kompensieren. Vollständige Randausfällung spricht entweder für starke Konzentration des basischen Farbstoffes oder für schwache Konzentration des sauren Farbstoffes in den Granulis. Endlich zeigen die basischen Farbstoffe auch eine verschieden starke Fällungskraft.

Besonders hinweisen möchte ich noch auf das prinzipiell gleichartige Verhalten des Oxydasefarbstoffes.

Die Reaktion wurde nach der v. Gierckeschen Vorschrift für die supravitale Methode angestellt. Ich muss mir versagen, an dieser Stelle genauer auf den Ablauf der Oxydasereaktion einzugehen, da mich dies zu weit von dem hier behandelten Thema abführen würde.

Die Tatsache, dass die Oxydasereaktion auch an Granulis erhalten wird, die sicherlich nicht zu dem normalen Inhalt der Zellen gehören, sondern die Lösung eines Fremdstoffes enthalten, lehrt, dass wohl zum Zustandekommen der Oxydasefärbung eine aktive Granulatätigkeit nicht notwendig ist. In der Färbewirkung gleicht die Oxydasefärbung einer basischen Vital- oder Supravitalfärbung fast völlig. Ich bin mir aber bewusst, dass zur Bildung des Farbstoffes gleichwohl eine aktive Tätigkeit des Gewebes angenommen werden muss: wird ja doch durch das Vorhandensein von Gewebstücken die Bildung des Farbstoffes aus seinen Komponenten gegenüber einer einfachen Mischung beider Komponenten, die man an der freien Luft stehen lässt, erheblich beschleunigt! Die Oxydasewirkung, die zur Bildung des Farbstoffes notwendig ist, scheint jedoch, das lehren meine Ergebnisse, nicht eine Funktion der färbaren Granula zu sein, sondern vielmehr des aktiven, zwischen den Granulis gelegenen Protoplasmas der Zellen.

Die hier genauer geschilderten Einzelvorgänge bei der Reaktion eines basischen Farbstoffes mit granulär im lebenden Organismus abgelagertem sauren Farbstoff stimmen so auffallend mit den oben insbesondere für Neutralrot genau beobachteten Bildern überein, dass ich gleich anfangs geneigt war, aus diesen Versuchen auf das Wesen der vitalen Granulafärbung mit basischen Farbstoffen Rückschlüsse zu ziehen. Die Reaktion des basischen Farbstoffes mit den in der normalen Zelle vorkommenden Granulis einerseits, den in der gleichen Zellart erzeugten künstlichen Granulis aus saurem Farbstoff andererseits, hat morpho-

logisch betrachtet so viel Übereinstimmendes, dass der Schluss sehr nahe liegt, es handle sich in beiden Fällen um identische Vorgänge.

Die weitere auffallende Übereinstimmung der Kombinationswirkung saurer und basischer Farbstoffe auf die Granula mit dem Ausfall der Reagenzglasversuche, in denen saurer mit basischem Farbstoff zusammengebracht wurde, eine Übereinstimmung, auf die E. Herzfeld zuerst eingehend hingewiesen hat, lassen es als sehr wahrscheinlich gelten, dass wir in der Auflagerung des basischen Farbstoffes auf den granulär abgelagerten sauren Farbstoff eine Reaktion beider Farbstoffe miteinander zu sehen haben, wobei ein „Lebendzustand“ des Granulums oder eine besondere vitale Tätigkeit desselben nicht notwendig ist. Der ganze Vorgang würde also lediglich die Möglichkeit erweisen, dass man innerhalb der lebenden Zelle das Reaktionsprodukt zwischen einem sauren und einem basischen Farbstoffe gerade so gut wie im Reagenzglase erzeugen kann.

Die im vorigen Absatze erwähnte Übereinstimmung dieses Reaktionsvorganges mit dem Verlaufe der basischen vitalen und supravitalen Färbung würde aber unseren Kombinationsversuchen bezüglich der Auffassung der Granulasubstanz, wenigstens derjenigen Granula, die der supravitalen und vitalen basischen Färbung zugänglich sind, eine grössere Tragweite verleihen. Man könnte zum mindesten aus der erwähnten Parallele schliessen, dass zum Zustandekommen der Granulafärbung eine besondere vitale Tätigkeit der Granula nicht notwendig ist; dass also die Möglichkeit der Farbstoffspeicherung keineswegs als ein spezifisch vitaler Vorgang aufgefasst werden kann, wenigstens nicht von seiten der Granula.

Ehe ich aber mit Sicherheit aus den oben erwähnten Versuchen diese Schlüsse zog, mussten noch weitere Versuche an gestellt werden, die, wie ich hoffe, den Weg zur Lösung dieser vielfach bearbeiteten schwierigen Probleme zeigen.

#### **V. Supravitale Färbungen an Mäuseorganen: Die Färbbarkeit der sauren Farbstoffgranula und normaler Zellgranula durch basische Farbstoffe sind analoge Vorgänge.**

Wie oben schon ausgeführt wurde, war besonders in den Versuchen mit Kaulquappen nur mit einer Auswahl von

basischen Farbstoffen eine Granulafärbung zu erzielen; der vitale Versuch ist zwar zweifellos für viele Fragen, besonders für die Frage der Vitalität des Färbungsbildes, entscheidend; andererseits stören, wenn man möglichst rein die Reaktion der Zellgranula auf basische Farbstoffe prüfen will, die vitalen Eigenschaften der Zelle, an der Spitze die Oxydations- und Reduktionskraft der Zellen empfindlich die Beurteilung der Versuche. In viel geringerem Maße ist diese Schwierigkeit den supravitalen Versuchen eigen. Andererseits lehren die zahlreichen Versuche früherer Autoren, insbesondere die sorgfältigen Arbeiten Arnolds, dass bei den vital wirkenden Farbstoffen durchweg ein entsprechendes Färbeergebnis auch supravital entstehen kann, vorausgesetzt, dass die richtigen Bedingungen hergestellt werden. Bei allen diesen Versuchen handelt es sich in erster Linie darum, die richtige Konzentration des Farbstoffes anzuwenden, die einerseits genügt, um in nicht zu langer Zeit die Granula zu färben, andererseits nicht zu stark ist, so dass eine zerstörende Wirkung auf das Protoplasma ausgeübt wird.

Für mich kam es in erster Linie darauf an, zu untersuchen, ob bei einer grösseren Reihe von Farbstoffen tatsächlich eine Parallele besteht zwischen der Fähigkeit, in der normalen Zelle Granula zu färben, und der Fähigkeit, mit saurem Farbstoffe, der während des Lebens in den Zellen in granulärer Form abgelagert worden war, in Reaktion zu treten. Hierzu bedurfte es nur der supravitalen Methode, die vor allem beträchtlich viel weniger mit Mühe verknüpft ist; so konnte ich zur Erreichung ausreichender Ergebnisse mit einer viel kleineren Anzahl von Versuchstieren auskommen.

Zu den Versuchen verwandte ich weisse Mäuse, die entweder ohne Vorbehandlung sofort nach der Tötung durch Chloroform zu supravitalen Färbeversuchen genommen wurden; in anderen Fällen wurde der Untersuchung eine ausgiebige Behandlung mit sauren Farbstoffen vorangeschickt. Die Beobachtungen erstreckten sich auf Leber und Niere, beides Organe, in denen erfahrungsgemäss saure Farbstoffe intensiv abgelagert werden.

Abgesehen von der Untersuchung normaler Mäuse, wurde die Färbungstendenz basischer Farbstoffe an Mäusen beobachtet, die mit folgenden sauren Farbstoffen vorbehandelt waren: Trypanblau, Wasserblau, Pyrrholblau, Neuvitalrot, Brillantkongou.



Von allen gut löslichen basischen Farbstoffen wurde eine n/10000-Lösung angewandt; eine Reihe von Farbstoffen löst sich aber in Wasser so schlecht, dass sich nicht einmal eine n/1000-Lösung herstellen lässt. In diesen Fällen wurde darauf geachtet, dass die Farblösung etwa so intensiv gefärbt erschien, wie die übrigen Farbstofflösungen. Als Ausgangslösung diente in der Regel eine n/100-Lösung, von welcher durch Verdünnen mit 0,96% iger Kochsalzlösung die geeignete Versuchskonzentration hergestellt wurde.

Von den verwandten basischen Farbstoffen lieferte die Aktien-Gesellschaft für Anilin-Fabrikation, Berlin: Kristallviolett 6 B Pulver,  
die Badische Anilin- und Soda-Fabrik, Ludwigshafen: Irisamin G extra, Rhodamin B extra, 3B extra, S extra, Safranin B extra, Viktoriablau B, R, 4 RS,  
die Höchster Farbwerke: Auramin konz., Malachitgrün Krist. chem. rein, Rhodamin O, Vesuvin 4BG konz., Methylen-grün extra gelbl. O,  
die Farbwerke Durand & Huguenin A.-G., Basel: Basler Blau BB, Chrysoidin R, Muskarin,  
die Farbenfabriken vorm. Fr. Bayer, Leverkusen: Capriblau GON, Diamantfuchsin kl. Krist., Methylenblau BB, Methylenviolett 5 B,  
die Firma L. Cassella, Frankfurt a. M.: Indazin M,  
die Firma R. Geigy, Basel: Neublau R,  
die Firma Sandoz, Basel: Prune pure,  
die Firma Kalle & Co., Biebrich a. Rhein: Rosanilin Base,  
die Firma Fr. Merck, Darmstadt: Thionin (Ehrlich),  
die Firma Leonhardt, Frankfurt a. M.: Acridinrot 3 B.

Den genannten Firmen sage ich auch an dieser Stelle für die bereitwillige Überlassung von Proben dieser und vieler anderer Farbstoffe zu meinen Versuchen aufrichtigen Dank. Durch Überlassung von Farbstoffproben haben mich ferner folgende Firmen zu grossem Danke verpflichtet: die Basler chem. Fabriken, Weiler-ter-Meer, Ürdingen.

Ausserdem wurden von Grübler in Leipzig bezogen: Bismarckbraun, Methylenblau rectific., BX, Neutralrot, Nilblau-chlorhydrat, Nilblausulfat, Toluidinblau, von Kahlbaum, Berlin: Rhodamin B, Rhodamin G extra.

Aus der Tabelle auf S. 489, in der die Ergebnisse der Versuche bezgl. der Granulafärbung zusammengestellt sind, ergibt sich zunächst die bekannte Tatsache, dass nicht alle basischen Farbstoffe in gleicher Weise zur Granulafärbung geeignet sind; die Farbstoffe sind in der Tabelle annähernd nach der Güte der Granulafärbung geordnet. Welche Eigenschaften der basischen Farbstoffe dieselben zur Granulafärbung befähigen näher zu umschreiben, soll Gegenstand einer besonderen Mitteilung sein.

Hier möge nur zum Verständnis der Tabelle auf die Begriffe eingegangen werden, die zur Bezeichnung der Färbeergebnisse bei den einzelnen Farbstoffen gewählt wurden.

Die Bezeichnung „fehlt“ wurde dann erteilt, wenn nur eine starke Diffusfärbung der Zellen eintrat, die, wenn es überhaupt zu einer Granulafärbung kam, jedenfalls so stark war, dass die Granulafärbung nicht zum Ausdruck kam. Waren saure Farbstoffgranula in den Zellen eingelagert, so war oft zu beobachten, dass der basische Farbstoff die Granula ganz frei liess.

„Schlecht“ ist die Granulafärbung dann, wenn gleichzeitig mit einer Granulafärbung eine beträchtliche Diffusfärbung des Protoplasmas eintrat.

„Mittel“ soll bedeuten, dass wohl gleichzeitig mit der Granulafärbung eine diffuse Farbstoffverbreitung auch im übrigen Protoplasma sich ausbildete, dass aber die Diffusfärbung in ihrer Stärke gegen die Granulafärbung bedeutend zurücktrat.

„Gute“ Granulafärber sind alle Farbstoffe, die sich in erster Linie an Granula anlagern, während eine Diffusfärbung entweder längere Zeit ganz ausbleibt, oder nur sehr schwach zum Ausdruck kommt.

Die Einteilung der Farbstoffe ist hier also im wesentlichen nach dem Grade der Elektivität einer Granulafärbung erfolgt.

Als wichtigstes hier in Betracht kommendes Ergebnis der Versuche betrachte ich, dass in keinem Versuche, in dem statt normaler Granula die Granula eines sauren Farbstoffes den Zellen eingelagert waren, die granulafärbende Eigenschaft eines Farbstoffes verschlechtert worden wäre. Ganz ausnahmslos gilt die Regel, dass in allen Fällen, wo saure Farbstoffe granulär den Zellen eingelagert sind, der basische Farbstoff, sofern er beim normalen Tiere granulär färbt, an die Granula des sauren Farbstoffes

Basischer Farbstoff	Granulafärbung bei					
	normalem Tier	Brillant- kongo	Neuvital- rot	Trypan- blau	Wasser- blau	Pyrrhol- blau
Rhodamin O	fehlt				fraglich	
Safranin B	fehlt				fraglich	
extra	fehlt	schlecht			fraglich	
Rosanilin						
Base	fehlt			schlecht	schlecht	
Diamant-						
fuchsin	fehlt			schlecht	schlecht	fehlt
Acridinrot 3B	fehlt			schlecht	schlecht	schlecht
Irisamin G						
extra	fraglich	schlecht			schlecht	schlecht
Rhodamin G						
extra	fraglich					
Rhodamin B	schlecht			schlecht	schlecht	
Rhodamin B						
extra	schlecht				schlecht	
Rhodamin 3B						
extra	schlecht					
Chrysoidin R	schlecht			mittel	mittel	mittel
Malachitgrün	mittel	gut	gut	gut	gut	
Viktoriablau						
4 RS	mittel	mittel				
Capriblau 60N	mittel	gut				
Indazin M	mittel	gut	gut			
Auramin konz.	mittel			gut	gut	gut
Vesuvium 4BG	mittel	gut				
Methylviolett						
5 B	mittel	gut	gut	gut	gut	
Kristallviolett.	mittel	gut	gut	gut	gut	
Viktoriablau						
B	mittel	gut				
Bismarck-						
braun	mittel			gut	gut	gut
Neublau R	gut	gut	gut	gut		
Muskarin	gut	gut	gut			
Viktoriablau						
R	gut	gut				
Nilblausulfat	gut	gut	gut			
Methylenblau						
BX	gut	gut				
Basler Blau						
BB	?	gut				
Neutralrot	gut	gut		gut	gut	gut
Methylenblau						
BB	gut	gut	gut			
Methylengrün						
extra gelbl.O	gut	gut	gut	gut	gut	
Toluidinblau	gut	gut		gut	gut	
Nilblausulfat						
hydrat	gut	gut				
Methylenblau						
rectif.	gut	gut	gut			
Thionin	gut					

gezogen wird. Diese Beobachtung bestätigt also die Befunde Herzfelds und erhebt diese wohl zur allgemeinen Regel.

Sofern also saure Farbstoffe in einer Gewebszelle Granula gebildet haben, wird ein Granula färbender basischer Farbstoff zuerst so lange an diesen sauren Farbstoffgranulis verankert, bis diese letzteren abgesättigt sind. Erst dann, nach intensiver Umfärbung der sauren Farbstoffgranula, kommt es zu einer Färbung zelleigner Granula. Auch diese bei anderem Material genauer beobachtete Erscheinung bestätigte sich in diesen Versuchen ausnahmslos.

Auch bei diesen Versuchen sah ich die mannigfaltigsten Bilder während der Reaktion der basischen mit den sauren Farbstoffen; teils werden homogen erscheinende Mischgranula beobachtet, teils kommt es zu typischen Randfällungen, endlich auch zu vollkommener Ausfällung, erkennbar an fast schwarzer undurchsichtiger Färbung der Granula.

Die genaue Betrachtung der Tabelle lehrt noch weiter, dass die basischen Farbstoffe in ihrer Tendenz, sich an Zellgranula zu lagern, zumeist verstärkt werden, wenn die Zellgranula aus saurer Farbstofflösung bestehen. Besonders kommt diese Tatsache zum Ausdruck bei den schlechten Granulafärbern (Rhodamin O bis Chrysoidin R in der Tabelle S. 489). Auch die Farbstoffe Malachitgrün bis Bismarckbraun, beim normalen Tiere mittelgute Granulafärber, sind für saure Farbstoffgranula ausgezeichnete Färber: die Granulafärbung eilt in diesen Fällen der Diffusfärbung viel rascher voraus als bei den zelleigenen Granulis eines mit sauren Farbstoffen nicht behandelten Tieres.

## VI. Schluss:

**Für die vitale Färbung mit basischen Farbstoffen ist nur die chemische oder kolloidchemische Struktur der Granula massgebend, keine besondere vitale Tätigkeit derselben.**

Fasse ich kurz das mir wesentlich Erscheinende an diesen Versuchen zusammen, so komme ich zu folgenden Schlüssen: 1. Es besteht eine ausnahmslose Parallelität zwischen der Färbbarkeit normaler, in tierischen Zellen vorkommender Granula mit solchen, die durch den Eintritt saurer Farb-

stoffe in die Zellen gebildet werden, wenn man zur Färbung basische Farbstoffe anwendet. 2. Die feineren Vorgänge zur Zeit der Färbung sind bei zelleigenen und sauren Farbstoffgranulis identisch und bestehen in allmählicher Zumischung des basischen Farbstoffes zu der Granulums substanz bis zur Absättigung, wobei je nach der angewandten Konzentration der Farbstoffe mehr oder weniger deutliche Fällungsbilder erhalten werden. 3. Vergleicht man die Färbungsergebnisse, die man mit einer grösseren Reihe basischer Farbstoffe an zelleigenen Granulis einerseits, an sauren Farbstoffgranulis andererseits erhält, so ordnen sich die Farbstoffe in gleicher Reihenfolge.

Es ergibt sich also, dass die durch basische Farbstoffe vital und supravital färbbaren Granula den künstlich durch Eingabe saurer Farbstoffe erzeugbaren Granulis analoge Bildungen sind.

Nimmt man weiter an, dass die sauren Farbstoffe abgelagert werden, ohne dass hierzu besondere präformierte Granula in Betracht kommen, eine Annahme, die m. E. so gut wie sicher ist —, so muss notgedrungen nach den Ergebnissen meiner neuen Versuche zugegeben werden, dass die durch die basische Vital- und Supravitalfärbung dargestellten Granula passive eingelagerte Substanzen sind, denen besondere aktive Eigenschaften für die Funktionen der Zellen nicht zugesprochen werden können.

Dieses Ergebnis deckt sich dem Sinne nach fast vollständig mit der von Evans und Schulemann (1915) ausgesprochenen Vermutung, dass die sauren Farbstoffgranula gewissen Zellgranulationen analog zu betrachten seien. Nur halte ich diese Vermutung nunmehr für experimentell erwiesen. Gleichzeitig muss ich aber, um Verwirrungen von vornherein vorzubeugen, mit aller Entschiedenheit darauf hinweisen, dass von Chondriosomen (d. i. plastosomalen Substanzen) in diesem Zusammenhang keine Rede sein kann. Die Plastosomen halte ich mit der Mehrzahl der Autoren (siehe Duesbergs Referat) für der Zelle wesentliche konstante Bildungen, die die Fähigkeit einer Farbstoffspeicherung nur ausnahmsweise zu besitzen scheinen.

Wenigstens kann dies mit Bestimmtheit für die hier genauer untersuchten Zellen der Leber und der Niere gesagt werden. In den Hauptstücken der Niere, in denen typische Chondriokonten (die Heidenhainschen Stäbchen) schon im

frischen Präparate leicht zu erkennen sind, geht der basische Farbstoff nie an diese Bildungen, so lange wenigstens eine postmortale Veränderung auszuschliessen ist; Arnold beschreibt allerdings eine stäbchenartige blasse Färbung mit Methylenblau, die aber der Granulafärbung erst langsam nachfolgte. Dass auch die sauren Farbstoffe trotz der bestimmten Versicherung von Gross, Aschoff und seiner Schule nicht von den Stäbchen gespeichert werden, glaube ich in meiner Nierenarbeit ausreichend nachgewiesen zu haben, besonders durch die gleichzeitige Darstellung der Farbstoffgranula und der Stäbchen im Altmannpräparat. Eine Kontrolle der durch Vitalfärbung erhaltenen Bilder durch gleichzeitige typische Darstellung der plastosomalen Gebilde sollte in allen den Fällen unternommen werden, wo eine Identität der vitalfärbbaren Granula mit Plastosomen ausgesprochen werden soll.

Worauf die Färbungen der Stäbchen in den Nierenzellen und anderer Plastosomen mit Janusgrün (Laguesse 1912 u. a.) beruht, vermag ich mangels eigener Erfahrungen nicht anzugeben.

Es ist eine mich ausreichend befriedigende Anschauung anzunehmen, dass im normalen Zellenleben, als Begleiterscheinung des Stoffwechsels, eine wechselnde Ablagerung von Substanzen in granulärer Form statthat: wir können nach den Farbstoffversuchen darauf schliessen, dass diese Substanzen offenbar einen Dispersitätsgrad besitzen müssen, der dem der zur Ablagerung befähigten sauren Farbstoffe annähernd entspricht. Ferner können wir nach dem Verhalten dieser granulär abgelagerten Substanzen zu basischen Farbstoffen annehmen, dass es sich um saure Substanzen handelt. Die ihnen eigentümliche Azidität kann nicht sehr gross sein, jedenfalls ist sie wohl geringer als die der zu meinen Versuchen verwandten sauren Farbstoffe, da die Granulafärbung bei allen diesen sauren Farbstoffen gegenüber der normalen Granulafärbung durch basische Farbstoffe wesentlich verstärkt wurde.

In der Tabelle S. 489 sind bzgl. der Granulafärbung nur graduelle Unterschiede, nicht prinzipielle Besonderheiten der Färbung vermerkt. In der Tat konnte ich bei meinem Material prinzipielle Verschiedenheiten (Färbung verschiedener Granulaarten durch verschiedene Farbstoffe usw.) nicht beobachten. Im lebenden Organismus scheinen dagegen solche spezifische Affinitäten vor-

zukommen. Ich erinnere z. B. daran, dass Amphibienlarven aus einem Gemische von Neutralrot und Methylenblau den ersten Farbstoff in Granulis fast sämtlicher Hautzellen speichern, während Methylenblau von den Granulis einer bestimmten Zellart immer wieder bevorzugt wird (A. Fischel 1901). Dies Verhalten scheint ohne weiteres nicht erklärlich, ausser wenn man chemische besondere Affinitäten anzunehmen geneigt ist. Solchen müsste aber genauer nachgegangen werden. Unmöglich wäre diese Auffassung nicht, wenn auch meine weiteren Arbeiten, über die in dem folgenden Artikel berichtet werden soll, gezeigt haben, dass anscheinend nur der Grad der Fällungskraft des basischen Farbstoffes für den Ausfall der Granulafärbung bedeutungsvoll ist. Es wäre jedenfalls nunmehr, nachdem ein genügender Anhalt für die Auffassung der Granulafärbung als eines Reaktionsvorganges gewonnen ist, systematisch den „spezifischen Affinitäten“ nachzugehen. Nach den Anschauungen, die ich mir nach den später zu schildernden Versuchen zu bilden gezwungen war, neige ich dazu, die „spezifischen Affinitäten“ auf den Einfluss des Milieus zurückzuführen, das die Granula umgibt. Es ist sehr wohl denkbar, dass Methylenblau vital nur da färbt, wo dieser sehr leicht entfärbbare Farbstoff sich halten kann; es ist weiter gut vorstellbar, dass verschiedene Zellprotoplasmen in verschiedenem Grade befähigt sind, den eindringenden Farbstoff zu entfärben. Der Farbstoff könnte also sehr wohl an und für sich eine stärkere Affinität zu sämtlichen Zellgranulis besitzen als Neutralrot, lässt nur die Granula der meisten Zellen ungefärbt, weil er beim Eintritt in diese Zellen sofort entfärbt wird. Neutralrot, der viel beständigere Farbstoff entfaltet dagegen ungestört seine Granulafärbung, ohne in nennenswerter Weise reduziert zu werden. Es wäre also immerhin denkbar, dass die Erklärung für scheinbare Spezifitäten in der angedeuteten Weise ausfallen müsste. Diese Besonderheiten bedürfen aber noch genauer Untersuchung.

Ganz kurz hindeuten möchte ich an dieser Stelle auch auf das vielfach erörterte Verhalten der oft metachromatisch färbenden Substanzen. Ein konkretes Beispiel bietet Neutralrot, das wie schon oft hervorgehoben worden ist, die Granula in allen Tönen von gelbrot bis violettrot färbt. Zweifellos lässt dies Verhalten, wie auch schon Ehrlich hervorhob, einen Schluss auf den

wechselnden Reaktionszustand der färbbaren Zellorte zu. Das erwähnte Verhalten des Neutralrot steht aber nicht im Widerspruch zu der Ansicht, dass bei der Granulafärbung ein Reaktionsvorgang abläuft.

Ich habe schon angedeutet, dass die Vereinigung des basischen mit dem sauren Farbstoff im Reagenzglas vollständig nachgeahmt werden kann. Es ist noch nicht entschieden, ob bei dieser Verbindung eine Salzbildung statthat, oder ob eine kolloidchemische gegenseitige Fällung der ganzen Farbstoffe anzunehmen ist. Von dem Ergebnis der Erforschung der Reaktionsweise von Farbstoffen entgegengesetzter Ladung untereinander wird es abhängen, welche Vorstellung wir uns von dem Vorgang der Granulafärbung machen sollen. Tritt Lackbildung ein (M. Heidenhain), so müsste die freie Farbstoffbase mit der Granulasubstanz eine neue Verbindung eingehen, die dann in der Regel die gleiche Farbe aufweist, wie das zum Versuche verwandte Farbstoffsalz. Die z. B. bei Neutralrot so wechselnde Tönung der gefärbten Granula würde in diesem Falle einem wechselnden Grade von Ionisation der neuen Verbindung innerhalb des Granulums entsprechen; durch Anwesenheit von Alkali würde die Dissoziation unter Freiwerden der Farbstoffbase begünstigt werden, wodurch der Farbton nach Gelbbraun verschoben würde. Die Blaurotfärbung würde einer geringeren Dissoziation entsprechen, die in schwach saurer Lösung der Granulafarbverbindung anzunehmen wäre. Zu dieser Erklärung stimmen die Ergebnisse meiner Versuche sehr gut. Aber auch bei Annahme einer Kolloidfällung würden sich der Erklärung keine nennenswerten Schwierigkeiten in den Weg stellen.

Man muss sich vorstellen, daß die Reaktion, d. h. ein stärkerer oder schwächerer Grad der Dissoziation des Farbsalzes, bei der Färbung eine grosse Rolle spielen wird. Darauf lassen besonders auch schon vorhandene Untersuchungen (Brodersen 1914, A. Bethe 1906 u. a.) schliessen, die den grossen Einfluss eines minimalen Säure- oder Alkalizusatzes auf Färbungen darthaten. Diese Untersuchungen müssten systematisch fortgeführt werden und würden einen guten Prüfstein für die Richtigkeit meiner Anschauungen abgeben.

Aus der Tatsache, dass es mit allen untersuchten basischen Farbstoffen, die für sich allein gewisse Granula in den Nieren-



zellen färben, gelang, vital in den Zellen eingelagerte saure Farbstoffgranula zu überfärben, dass weiterhin eine ausnahmslose Parallelität zwischen der Fähigkeit, normale Granula und saure Farbstoffgranula zu färben, bei allen untersuchten basischen Farbstoffen verschiedenartigster Konstitution gefunden wurde, halte ich mich für berechtigt, diese Kategorie von Granula für inaktive Elemente der Zelle zu halten.

Ob diese Auffassung für alle wirklich vital, d. h. ohne wesentliche Beeinträchtigung des Zellenlebens färbaren Granula durchgeführt werden kann, ist noch nicht klar zu entscheiden. Dass die von Fischel (1900) angeführten Gründe für eine aktive Bedeutung der von ihm bei Amphibienlarven gefärbten Granula nicht ausreichen, habe ich bereits oben (S. 470) dargelegt und ist auch schon von anderer Seite hervorgehoben worden (s. M. Heidenhain 1911). Ich kann es mir hier umso mehr versagen, auf alle so sehr verschiedenartigen Deutungen, die die basisch färbaren Granula von den verschiedenen Untersuchern erfahren haben, einzugehen, als ich demnächst in einem umfassenden Referat über das gesamte Gebiet der vitalen Färbung (Merkel und Bonnets Ergebnisse) ausführlich auf diese Fragen eingehe.

Von der Mehrzahl der heutigen Forscher als funktionell wichtig angesehene Strukturelemente der Zelle, Zellkern, Zentrosoma, Basalkörperchen der Zilien, Plastosomen färben sich nicht vital.

Beobachtungen über vitale Zellkernfärbungen sind zahlreich in der Literatur zu finden, ich halte es für möglich, dass bei Protozoen (Brandt, Przesmycki, Prowazek u. a.) und bei manchen Pflanzen (Campbell u. a.) mit einer Reihe von Farbstoffen Kernfärbungen zu erzielen sind, ohne dass komplizierte Verrichtungen der Zellen (Kernteilung, Körnchenströmung usw.) sofort unmöglich gemacht werden. In diesen Fällen aber handelt es sich, wie Fischel sehr richtig hervorhebt, stets nur um eine diffuse Durchtränkung, also Lösung des Farbstoffes im Kernsaft in schwacher Konzentration. Ausserdem ist nicht auszuschließen, ob trotz scheinbar normalen Ablaufes der Lebenserscheinungen nicht doch Störungen, für uns nur unsichtbar, in der Zelle Platz gegriffen haben.

Die bei höheren Organismen gefundenen Kernfärbungen im lebenden Tiere betreffen dagegen stets, wie man heute sicher weiss, grob geschädigte oder gar abgestorbene Zellen.

Über eine vitale Färbung von Zentrosomen habe ich in der Literatur bisher keine Angabe gefunden.

Vitale Färbungen der Basalkörnchen der Zilien sind an Protozoen (Puetter u. a.) und an den Wimperzellen von Metazoen (R. Krause) beobachtet worden. Über die Bedeutung des ersteren Befundes steht mir kein Urteil zu, in den Versuchen an Metazoenzellen handelt es sich aber sicherlich um eine Färbung absterbender Zellen, bei denen allerdings der Geisselschlag noch eine Zeitlang erhalten bleibt.

Was endlich die Plastosomen anlangt, so scheint mir aus den vorhandenen Mitteilungen tatsächlich hervorzugehen, dass besonders mit Janusgrün solche Gebilde in der unfixierten Zelle dargestellt worden sind. Seit Michaelis, der zuerst mit diesem Farbstoff die Plastosomen in Speicheldrüsenzellen darstellte, sind bis in die neueste Zeit an den verschiedensten Zellen (Knorpel-, Samen-, Drüsenzellen usw., worüber genauere Angaben in meinem Referat) Strukturen mit Janusgrün gefärbt worden, die mit den Plastosomen in Gestalt und Anordnung so grosse Ähnlichkeit haben, dass man kaum umhin kann, die Identität beider Bildungen zuzugeben. So viel mir bekannt, ist diese Färbung bisher noch nicht im lebenden Organismus erzielt worden; Michaelis zeigte ja auch, dass Janusgrün im lebenden Organismus zum grossen Teil zerstört wird. Auffällig ist auch die lange Dauer bis zum Eintritt der Plastosomenfärbung im supravitalen Versuche (30—40 Minuten). Da ich selbst bisher über ausgedehntere Erfahrungen mit diesem Farbstoffe nicht verfüge, vermag ich ein bindendes Urteil über diese Vorgänge nicht abzugeben. Ich glaube aber, dass die Färbung in jedem Falle die absterbende Zelle betrifft und vermutlich auf anderen Vorgängen beruht als die in Rede stehenden Färbungen mit dem von mir verwandten basischen Farbstoffe.

Einige kurze Bemerkungen noch zu dem Arnoldschen Begriffe Plasmosomen: Arnold glaubt, dass die mit Neutralrot und Methylenblau von ihm vital gefärbten Granula umgewandelte Plasmosomen seien, also kleinste Strukturelemente der Zellen zur Grundlage haben, die besonders deutlich durch ihre Verbindung mit Stoffwechselprodukten der Zellen, auch von aussen den Zellen zugeführten Substanzen wie Fett, Eisen usw. in Erscheinung treten. Ob tatsächlich für diese Strukturen eine solche Grund-

lage angenommen werden muss, ist äusserst schwer zu entscheiden. Was aber die für die Arnoldschen Gebilde charakteristischen Erscheinungen anlangt, aus denen gerade auf ihre Bedeutung als eines für das Zellenleben wichtigen und unentbehrlichen Strukturelementes geschlossen wurde, so geht aus meinen Untersuchungen wohl mit Sicherheit hervor, dass zum Zustandekommen der vitalen Färbbarkeit eine aktive Tätigkeit der Granula nicht angenommen zu werden braucht. Denn erstens laufen die gleichen Erscheinungen wie an diesen Granulis auch an Tröpfchen einer sauren Farbstofflösung ab, die vital in die Zellen eingelagert wurde; und zweitens kann man die Erscheinungen, die sich zwischen saurem und basischem Farbstoff innerhalb der Zellen abspielen, im Reagenzglas völlig nachahmen und aus physikalisch-chemischen Beziehungen zwischen diesen beiden Substanzen erklären. Der weitere Schluss, dass zum Zustandekommen der basischen Vitalfärbung nur die Existenz eines reaktionsfähigen Stoffes in den Granulis erforderlich sei, ist demnach wohl berechtigt.

Nach diesen Darlegungen könnte es scheinen, als wenn die Vitalität der Zellen bei dem Zustandekommen der besagten Färbungsserscheinungen überhaupt keine Rolle spielte. Dies wäre aber ein Schluss, der mit den allgemeinen Erfahrungen in keiner Weise in Einklang zu bringen wäre. Diese Art der Granulafärbung ist zweifellos für die lebende Zelle charakteristisch und ist nicht mehr zu beobachten, wenn die Zelle abgestorben ist. Die Grenze, wo für diesen Fall das Leben der Zelle aufhört, ihr Tod beginnt, ist naturgemäss sehr schwer zu definieren.

Ich finde ein gutes Beispiel, wie man sich den Einfluss des Lebenszustandes der Zellen auf den Ausfall der Granulafärbung vorstellen kann, in den Versuchen über die Färbbarkeit phagozytierter Massen, die zuerst von Hofer (1890) mit Erfolg begonnen, später von Plato weiter ausgebaut wurden. Ersterer beobachtete, dass abgestorbene Infusorien sich mit Bismarckbraun nur ganz hellgelb färben, nach ihrer Aufnahme in den Amöbenkörper aber intensiv färbbar werden; aus diesen Befunden geht deutlich hervor, dass das lebende Protoplasma es ist, das durch die Produktion einer den Nahrungskörper durchdringenden (nach unseren jetzigen Erfahrungen sauren) Substanz

dem Infusor die Färbbarkeit verleiht. Der gleiche Schluss lässt sich aus Platos Versuchen über die Färbbarkeit intra- und extrazellulärer Gonococcen mit Neutralrot ziehen.

Ebenso wie hier die Fähigkeit des Protoplasmas erwiesen ist, intrazellulär saure Substanzen abzuscheiden, so liegt die Annahme nahe, dass auch ohne das Vorhandensein eines phagozytierten Fremdkörpers eine intrazelluläre Abscheidung saurer Substanzen (Eiweisse, Fettsäuren) möglich ist. Dass alle färbaren Granula phagozytierte Massen seien, braucht und kann man nicht annehmen.

Noch in vielen anderen Beziehungen wirkt der Lebenszustand der Zelle auf das Ergebnis der Farbstoffreaktion ein. Die vielfach beobachteten Anzeichen von reduzierenden und oxydierenden Eigenschaften des Zellenprotoplasmas stehen unter diesen Eigenschaften obenan; sie stören am meisten die Beurteilung der für einen Farbstoff typischen Reaktionsweise mit bestimmten Zellbestandteilen. In einer weiteren, fast abgeschlossenen Mitteilung werde ich darzulegen haben, dass neben diesen zum Teil noch kaum exakt fassbaren Eigentümlichkeiten des lebenden Protoplasmas, auch bestimmte physikalische Zustände des zwischen den Granulis gelegenen Protoplasmas von bestimmendem Einfluss auf das Ergebnis der Granulafärbung sind. Besonders der Gehalt an Lipoiden in demselben ist von grosser Bedeutung. Diese später genauer zu erörternden Beziehungen und die in der vorliegenden Mitteilung niedergelegten Beobachtungen über den Mechanismus der Granulafärbung lassen es schon heute als sicher erscheinen, dass die Granulafärbung mit basischen Farbstoffen von seiten der Granula ein passiver Vorgang ist. Nur die chemische Struktur der Granula ist von ausschlaggebender Bedeutung.

Aktiv eingreifen kann in den physikalisch-chemischen Vorgang der Färbung nur das intergranuläre Protoplasma dadurch, dass es den Farbstoff zerstört. Daneben machen sich von seiten des intergranulären Protoplasmas Einflüsse geltend, die ihre Ursache in der physikalischen Zusammensetzung des Protoplasmas haben.

Nicht die Granula also sind es, die als Träger des Stoffwechsels in der Zelle zu betrachten sind, sondern das intergranuläre Protoplasma. In diesem spielen sich alle wichtigen Vorgänge des Zellenlebens ab. Welche Rolle hierbei den Plastosomen zukommt, muss unentschieden bleiben.

### Literaturverzeichnis.

1. Arnold, J., 1914: Über Plasmastrukturen, Jena, G. Fischer (darin ausführliche Literaturangaben).
2. Aschoff, L., 1912: Zur Morphologie der Nierensekretion unter normalen und pathologischen Bedingungen, nach Untersuchungen von Dr. Suzuki. Zentralbl. allg. Pathol. u. pathol. Anat. 23.
3. Bethe, A., 1905: Die Einwirkung von Säure und Alkalien auf die Färbung und Färbbarkeit tierischer Gewebe. Hofmeisters Beiträge 6, 399—425.
4. Brandt, C., 1881: Färbung lebender einzelliger Organismen. Biol. Zentralbl. 1.
5. Brodersen, 1915: Beobachtungen an der Ossifikationsgrenze des Knorpels, II. Anat. Anz. 47, 577—595.
6. Campbell, Douglas, H., 1887: The Staining of living Nuclei. Unters. aus d. botan. Institut Tübingen, Bd. II.
7. Duesberg, J., 1912: Plastosomen, „Apparato reticolare interno“ und Chromidialapparat. Merkel u. Bonnets Ergebnisse d. Anat. und Entwicklungsgesch. 20, 567—916.
8. Evans, H. M. und Schulemann, W., 1915: Über Natur und Genese der durch saure Farbstoffe entstehenden Vitalfärbungsgranula. Fol. haemat. Arch. 19, 207—219.
9. Evans, H. M., Schulemann, W. und Wilborn, F., 1913: Die vitale Färbung mit sauren Farbstoffen. Jahresber. schles. Gesellsch. vaterl. Kultur 1913.
10. Dieselben, 1914: Die vitale Färbung mit sauren Farbstoffen in ihrer Bedeutung für pharmakologische Probleme. Deutsch. Med. Wochenschr. 1914, Nr. 30.
11. Fischel, A., 1901: Untersuchungen über vitale Färbung. Anat. Hefte, Bd. 16, 417—519.
12. Derselbe, 1910: Vitale Färbung in Encyclop. der mikr. Technik, II. Aufl.
13. Goldmann, E. 1909: Die äussere und innere Sekretion des gesunden Organismus im Lichte der vitalen Färbung. Tübingen, Laupp.
14. Derselbe, 1912: Neue Untersuchungen über die äussere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der „vitalen“ Färbung. Tübingen, Laupp.
15. Derselbe, 1913: Vitalfärbung und Zentralnervensystem. Abh. d. Kgl. Preuss. Akad. d. Wissensch. 1913, Physik.-Mathem. Kl.
16. Giercke, E. von, 1911: Die oxydierenden Zellfermente. Münch. Med. Wochenschr. 1911, Nr. 44.
17. Graaff, S., 1912: Die Naphtholblau-Oxydasereaktion der Gewebszellen nach Untersuchungen am unfixierten Präparat. Frankf. Zeitschr. f. Pathol. II, 358—384.
18. Gross, W., 1911: Experimentelle Untersuchungen über die Zusammenhänge zwischen histologischen Veränderungen und Funktionsstörungen der Niere. Zieglers Beitr. 51, 528—576.

19. Derselbe, 1914: Über den Zusammenhang zwischen Farbstoffausscheidung und vitaler Färbung der Nieren. Verh. d. Deutsch. path. Ges. in Zentralbl. Pathol. Nr. 9.
20. Heidenhain, M., 1911: Plasma und Zelle II v. Bardeleben, Handb. d. Anat. 8, 434—487.
21. Herzfeld, E., 1917: Über die Natur der am lebenden Tiere erhaltenen granulären Färbungen bei Verwendung basischer und saurer Farbstoffe. Anat. Hefte, Bd. 54, 447—523.
22. Hoeber, R. und Königsberg, 1905: Farbstoffausscheidung durch die Nieren. Pflüg. Arch. 108, 323.
23. Hofer, Br., 1890, Experimentelle Untersuchungen über den Einfluss des Kernes auf das Protoplasma. Jen. Zeitschr. f. Naturw. 24, 105—175.
24. Hofmann, P., 1914: Vitale Färbung embryonaler Zellen in Gewebekulturen. Fol. haemat. 18, 136—139.
25. Krause, R., 1904: Gibt es eine „vitale“ Färbung? Anat. Anz. 24, 400—403.
26. Laguesse, E., 1912: Méthode de coloration vitale des chondriosomes par le vert Janus, Compt. rend. Soc. Biol. Paris 73, 150—153.
27. Michaelis, L., 1900: Die vitale Färbung, eine Darstellungsmethode der Zellgranula. Arch. mikr. Anat. 55, 558—575.
28. Möllendorff, Wilh. von, 1914: Vitalfärbung mit sauren Farbstoffen und ihre Abhängigkeit vom Lösungszustande der Farbstoffe. Deutsch. Med. Wochenschr. 1914, Nr. 41.
29. Derselbe, 1915: Die Dispersität der Farbstoffe, ihre Beziehungen zu Ausscheidung und Speicherung in der Niere. Anat. Hefte, Bd. 53, 81—324.
30. Derselbe, 1916: Die Speicherung saurer Farben im Tierkörper, ein physikalischer Vorgang. Kolloid-Zeitschr. 18, 81—90.
31. Derselbe, 1913: Über Vitalfärbung der Granula in den Schleimzellen des Säugetierdarmes. Anat. Anz. Ergänzungsheft z. Bd. 42, 117—123.
32. Pappenheim, A. und Nakano, 1912: Beiträge über Beziehungen zwischen Vitalfärbung, Supravitalfärbung und Oxydasereaktion. Fol. haemat. 14.
33. Pfeffer, W., 1886: Über Aufnahme von Anilinfarben in lebenden Zellen. Unters. bot. Inst. Tübingen 2, 179—332.
34. Prowazek, S. von, 1898: Vitalfärbung mit Neutralrot an Protozoen, Zeitschr. wissenschaftl. Zool. 63.
35. Przesmycki, 1897: Über die intravitale Färbung des Kernes und des Protoplasmas. Biol. Zentralbl. 17, 321—335 und 353—364.
36. Puetter, A., 1900: Studien über Thigmotaxis bei Protisten. Arch. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. 1900, Suppl.
37. Plato, J., 1900: Über die „vitale“ Färbbarkeit der Phagozyten des Menschen und der Säugetiere mit Neutralrot. Arch. mikr. Anat. 56, 868—914.
38. Ruhlmann, W., 1912: Studien über die Aufnahme von Kolloiden durch die pflanzliche Plasmahaut. Jahrb. wiss. Bot. 51, 376—431.
39. Schulemann, W., 1914: Über Metachromasie bei Vitalfarbstoffen. Diss. med. Breslau 1914, 31 S.

40. Schultze, O., 1887: Die vitale Methylenblaureaktion der Zellgranula. Anat. Anz. 2, 684—688.
41. Suzuki, T., 1912: Zur Morphologie der Nierensekretion unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Jena, G. Fischer, 244 S.
42. Tschaschin, S., 1912: Über vitale Färbung der Chondriosomen in Bindegewebszellen mit Pyrrholblau. Fol. haem. 14, Archiv.

### Erklärung der Abbildungen auf Tafel XV und XVI.

Sämtliche Abbildungen sind nach frischen, unfixierten Präparaten mit Zeiss Apochr. Imm. 2 mm und Komp.-Ok. 4 gezeichnet; die Vergrößerung betrug 920. Material: verschieden alte Quappen von *Rana temporaria* und *esculenta*.

- Fig. 1. Zwei Zellen eines Vornierenkanälchens; die Quappe hat ca. 4 Wochen in einer Trypanblaulösung (1:10000), darauf 2 Tage in einer Vitalneurotlösung (1:5000) gelebt. Ablagerung rein hellroter Granula neben den alten, dunklen Trypanblaugranulis.
- Fig. 2 und 3. Zellen aus der Wand eines Urnierenkanälchens; Fig. 2 mit homogenen Granulis nach viertägigem, Fig. 3 nach sechstägigem Aufenthalt in einer Lösung von Wasserblau (1:5000); bei Fig. 3 Kolloidauflöckung
- Fig. 4. Zwei Zellen einer frisch aus der Gallerthülle geschlüpften Quappe, die sich in Neutralrotlösung entwickelt hatte; neben feinen Pigmentkörnchen verschieden stark homogen durchgefärbte Dotterplättchen.
- Fig. 5. Zelle aus dem 2. Abschnitt eines Vornierenkanälchens einer etwas älteren Quappe (mit eben sichtbaren äusseren Kiemen), die sich in verdünnter Neutralrotlösung entwickelt hatte. Dotterplättchen mit Randkappen, die viel intensiver gefärbt sind als die übrige Masse des Plättchens; Zerfallserscheinungen an den Dotterplättchen.
- Fig. 6 und 7. Zellen aus dem Glaskörper aus demselben Tier wie Fig. 5; Fig. 6 zeigt neben zerfallenden Dotterplättchen Granula, Fig. 7 nur noch Granula.
- Fig. 8. Vorniere einer ca. 12 mm langen Kaulquappe, Neutralrot 1:30000, 24 Std.; kranzförmige Anordnung der Neutralrotgranula um präformierte Granula der Zellen; bei b eine Granulagruppe stärker vergrößert.
- Fig. 9. Vorniere einer Kaulquappe gleichen Alters wie Fig. 8, Neutralrot 1:30000, 1/2 Std.; neben Bildungen wie in Fig. 8 beginnende Durchfärbung der präformierten Granula.
- Fig. 10. Vorniere einer älteren Kaulquappe nach ca. vierwöchentlichem Aufenthalt in einer Trypanblaulösung 1:10000; kranzförmige Anordnung von Pigmentgranula um die Trypanblaugranula.
- Fig. 11. Vorniere einer Trypanblaukaulquappe wie in Fig. 10 nach einstündigem Aufenthalt des Tieres in einer Lösung von Neutralrot 1:30000: sämtliche Trypanblaugranula sind zu violetten Massen ausgefällt.

- Fig. 12. Vorniere einer Trypanblauquappe wie in Fig. 10 nach vierstündigem Aufenthalt in einer Lösung von Neutralrot 1:30 000; nach Ausfällung sämtlicher Trypanblaugranula sind zahlreiche andere Zellgranula durch Neutralrot gefärbt.
- Fig. 13. Urnieren einer älteren Kaulquappe; dieselbe war nach zweistündigem Aufenthalt in Neutralrot (1:30 000) in reines Wasser für 24 Stunden übertragen worden, worauf sie noch 4 Tage in Wasserblau (1:5000) lebend gehalten wurde. Neben den Überresten der anfänglich starken Neutralrotfärbung sind die Wasserblaugranula entstanden, ohne dass beide Farbstoffe in den Granulis miteinander reagiert hätten.
- Fig. 14. Zellen aus einer mit Wasserblau vital beladenen Urnieren; bei a reines Wasserblau-Granulum: b bis d verschiedene Stadien der Umfärbung nach Zusatz von Neutralrot (supravital); bei b erste Wirkung-Randfällung; bei c beginnende Umfärbung des Granulum-inhaltes, bei d vollkommene Rotfärbung der Wasserblaugranula. Alle Stadien der Farbwirkung rühren von der gleichen Urnieren her.
- Fig. 15. Urnierzellen mit vitaler Ablagerung von Bordeaux (Weiler-ter-Mer), nach Zusatz des Oxydasegemisches nach v Giercke: a zeigt die anfänglichen Stadien der Reaktion: Fällungsgranula an der Oberfläche der sauren roten Granula; durch weitere Einwirkung des Oxydasefarbstoffes wird der saure Farbstoff an der Oberfläche seines Granulums vollständig ausgeflockt, so dass das Granulum selbst farblos wird (b).
- Fig. 16. Vornierenkanälchen mit Einlagerung von Trypanblaugranula; supravitale Neutralrotwirkung. Durch allmähliches Eindringen des basischen Farbstoffes sind alle Stadien der Umfärbung nebeneinander ausgebildet. a zeigt unveränderte Trypanblaugranula, b Umfärbung derselben durch den ersten zudringenden basischen Farbstoff; bei c beginnende, bei d vollständige Ausflockung des Neutralproduktes. x = Zellkerne.
- Fig. 17. Urnierenkanälchenzellen mit vitaler Ablagerung von Neuvitalrot, supravitale Einwirkung von Nilblausulfat; die über Kerngrösse angewachsenen Granula werden bei a durch den ersten hinzutretenden basischen Farbstoff ausgeflockt, bei b werden die Flocken durch reichlicher hinzuströmenden basischen Farbstoff dunkler; nach der völligen Ausflockung sammeln sich die Flocken an der Oberfläche des im übrigen farblos gewordenen Granulums an. x = Zellkerne.
-





