Zur physikalischen Chemie der histologischen Färbung.

II. Substantive (direkte) Färbung der histologischen fixierten Präparate.

Von

Masaji Seki.

(Aus dem Anatomischen Institut der Mediz. Fakultät zu Okayama, Japan.)

Inhaltsangabe.

I. Färbung des Darmwandpräparates mit sauren Farbstoffen. Beiträge zur Theorie der van Giesonschen Färbung.	636
II. Färbung des Salamanderschwanzpräparates mit sauren Farbstoffen	645
III. Verschiedenheiten der Färbungsvorgänge mit basischen Farbstoffen von denen mit sauren	647
IV. Färbung der fixierten Präparate mit basischen Farbstoffen	649
V. Zusammenfassung	652

Betrachten wir, dass das wichtigste Agens, welches die Anfärbung des Siliciumdioxids hervorbringt, die elektrische Ladung des Adsorbens und die der Farbstoffe ist, so drängt sich nun die Frage auf, ob und inwieweit es an den Vorgängen der histologischen Färbung beteiligt ist. Seit mehreren Jahren haben Keller und seine Mitarbeiter eine Reihe wertvoller Arbeiten durchgeführt. Sie betonen, dass die elektrische statische Ladung der Gewebe für die Aufnahme von Farbstoffen massgebend ist, und zwar bei negativer Ladung derselben die positiv geladenen Farbstoffe aufgenommen werden, umgekehrt bei positiver Ladung die negativ geladenen Farbstoffe. Die Beziehung zwischen der elektrischen Ladung der roten Blutkörperchen verschiedener Tiere und ihrer Färbbarkeit haben wir auch wohl bemerkt ('23). Solche elektrischen Ladungsverhältnisse sind sonst von vielen Forschern häufig wahrgenommen worden. Die Untersuchungen über die sog. Elektropie von Karczag

sind unter anderem sehr lehrreich. Im folgenden möchten wir näher auf dieses Thema eingehen.

1. Färbung des Darmwandpräparates mit sauren Farbstoffen. Beiträge zur Theorie der van Giesonschen Färbung.

In Beziehung auf die einfachste substantive (direkte) histologische Färbung herrscht immer noch Verschiedenheit der Meinung. Eine eingehende Geschichte der histologischen Färbung zu geben ist nicht unsere Aufgabe. Wir möchten hier nur vor allem eine wertvolle Arbeit von v. Möllendorff nennen. Er unterscheidet zwischen einer Durchtränkungs-färbung und einer Niederschlagsfärbung ('24). Die erstere entsteht besonders bei sauren Farbstoffen. Basische Farbstoffe können ausser dieser auch noch Niederschlagsfärbung geben. Nach ihm hängt das Ergebnis bei der Durchtränkungs-färbung lediglich von der Dispersität der Farbstofflösungen und der Dichte der zu färbenden Strukturen ab. Saure Farbstoffe färben um so rascher, je diffusibler sie sind, und sie haften bei der Differenzierung in denjenigen Strukturen am längsten, in die sie zuletzt eingedrungen sind. Die Niederschlags-färbung beruht auf einer Ausflockung der Farbstoffe an bestimmten Gewebsstrukturen. Diese klare Anschauung über histologische Färbung von v. Möllendorff ist heute im wesentlichen völlig gültig. Im Details aber verwickelt sich die Sache zuweilen.

Wenn man einen Paraffinschnitt der Darmwand vom Kaninchen, welche in Carnoyscher Flüssigkeit—aus 60 ccm absolutem Alkohol, 30 ccm Chloroform und 10 ccm Eisessig bestehend und daher kein Metallsalz enthaltend—fixiert ist, in eine dünne Säurefuchsinlösung von $\text{pH}=3,5^1$ legt, so wird die Stärke der Tingierung:

Muskulatur, Zottenepithel, Bindegewebe in Zotten $\gg$
Bindegewebe der Submukosa.

Nach Abspülen in dest. Wasser bleibt die Reihenfolge der Tingierung der Gewebe gleich, obwohl der Färbungsgrad im allgemeinen etwas abnimmt. Beinahe dieselbe Reihenfolge ist zu sehen, wenn man den Schnitt von Anfang an in einer einfachen wässerigen Säurefuchsinlösung färbt, obgleich wieder die Stärke der Färbung etwas geringer ist.

Im allgemeinen färbt ein saurer Farbstoff die Gewebe besser bei saurer Reak-

1) Die Farblösung mit $\text{pH}=3,7$ war mit der Pufferlösung hergestellt, die nach Sörensen aus 47 Teilen „Zitrat“ und 53 Teilen „Salzsäure“ besteht. „Zitrat“ ist eine Lösung von 21,008g krystallisierter Zitronensäure+200 ccm n-Natronlauge, auf 1 Liter aufgefüllt. „Salzsäure“ ist eine 0,1 n-Salzsäure.

tion. Der Hauptgrund dafür ist, dass die Gewebe in saurer Lösung ihre negative Ladung einbüßen und ihre positive Ladung vermehren. Manchmal aber vermindert sich die negative Ladung eines Farbstoffes bedeutend, und sogar eine merkliche positive Ladung kann dafür auftreten, oder der Farbstoff wird geflockt. In diesem Falle wird das Ergebnis der Färbung kompliziert. Näheres davon wird in den bald erscheinenden Mitteilungen über die Färbung mit Carmin, Hämatoxylin und Orcein erörtert.

Indes, wenn man einen zuvor mit Fuchsin gefärbten Schnitt in eine schwache Pikrinsäurelösung (ziemlich stark sauer) bringt, ändert sich die Reihenfolge der Tingierung der Gewebe mit Säurefuchsin wie folgt:

Muskulatur, Bindegewebe d. Submukosa > Alle anderen.

Und wenn man den Schnitt in eine konzentrierte Pikrinsäurelösung, oder in eine Pikrinsäurelösung von $\text{pH}=3,5$ legt, so wird die Tingierung:

Bindegewebe d. Submukosa > Muskulatur $\supset$ Bindegewebe in Zotten > Zottenepithel.

Es seien die wesentlichsten Punkte der vorstehenden Versuche nochmals kurz erwähnt. Bei der Färbung mit einer einfachen wässerigen Säurefuchsinlösung färben sich Muskulatur, Zottenepithel u. a. gut und das Bindegewebe der Submukosa schlechter, und so kommt die bei der van Giesonschen Methode charakteristische starke Färbung des Bindegewebes nicht zutage. Wenn man aber solches Präparat in eine Pikrinsäurelösung bringt, geht einst in dem Bindegewebe haftendes Säurefuchsin verhältnismässig schwer in die Lösung hinaus. Sogar in einer konzentrierten Pikrinsäurelösung oder in einer Pikrinsäurelösung mit starker saurer Reaktion bleibt die rote Farbe am längsten im Bindegewebe, während das Zottenepithel sich am leichtesten entfärbt.

Es ist die Frage, wie kommt in konzentrierter Pikrinsäure bzw. in Pikrinsäure von starker saurer Reaktion die stärkere Haftung des Säurefuchsin im Bindegewebe der Submukosa und das leichtere Herausgehen desselben aus der Muskulatur und Zottenepithel? Eine richtige Erklärung dafür ist ja erforderlich.

Das zuvor in die Muskulatur und das Zottenepithel eingedrungene Säurefuchsin konnte nicht leicht durch ein einfaches Abspülen in Wasser herausgezogen werden. Es ging erst in einer Pikrinsäurelösung heraus, wobei der Farbstoff im Bindegewebe der Submukosa am hartnäckigsten haftete. Ist das Agens, welches den Farbstoff aus dem Gewebe herausgehen liess, die Wasserstoffionen der Pikrinsäure? Dies ist unwahrscheinlich. Denn, wie wir gesehen haben, waren die Färbungsverhältnisse der Gewebe bei Benutzung der Säurefuchsinlösung von $\text{pH}=3,2$ und bei der einfachen wässerigen Säurefuchsinlösung beinahe gleich, ausgenommen dass der Färbegrad bei dem letzteren Fall im allgemeinen schwächer war. Wir müssen somit annehmen, dass es die Pikrinsäureanionen sind, die das Säurefuchsin aus der Muskulatur und dem Zottenepithel schnell hinausgehen lassen.

Bevor wir zu einer näheren Erklärung der van Giesonschen Färbung kommen, muss die Art der Färbung mit Pikrinsäure studiert werden. Färben wir ein Schnittpräparat Darmwand in einer verdünnten Pikrinsäurelösung, so wird:

Muskulatur > Zottenepithel > Bindegewebe in Zotten >
Bindegewebe der Submukosa.

Und das Bindegewebe der Submukosa ist fast farblos.

In Pikrinsäure+Pufferlösung von pH=3,5 wird die Färbung im allgemeinen besser; die Reihenfolge der Färbung der Gewebe lautet:

Zottenepithel > Bindegewebe in Zotten, Muskulatur >
Bindegewebe der Submukosa.

Mit anderen Worten: die Pikrinsäure färbt wie das Säurefuchsin die Muskulatur und das Zottenepithel gut, das Bindegewebe der Submukosa am schlechtesten. Man sieht also, dass eigentlich sowohl Säurefuchsin als auch Pikrinsäure in der Muskulatur und dem Zottenepithel bestens anreichern.¹⁾ Erst wenn beide zusammen in einer Lösung vorhanden sind, dann färbt sich die Muskulatur mit Pikrinsäure und das Bindegewebe mit Säurefuchsin stärker, wie man bei der van Giesonschen Färbung sieht.

Vergleichen wir nun die Färbungsart des Säurefuchsin mit der der Pikrinsäure. V. Möllendorff hat gezeigt, dass saure Farbstoffe progressiv um so rascher allgemein färben, je diffusibler sie sind, dass die Farben in die verschiedenen Strukturen verschieden schnell eindringen und bei Differenzierung in denjenigen Strukturen am längsten haften, in die sie zuletzt eingedrungen sind. Säurefuchsin ist ein Farbstoff, der verhältnismässig grossmolekular und wenig diffusibel ist, während Pikrinsäure kleinemolekular und mehr diffusibel ist. Auf Grund dieser Tatsache können wir mit v. Möllendorff den Vorgang der van Giesonschen Färbung bequemstens in der folgenden Weise erklären: Pikrinsäure dringt zunächst rasch und viel in alle Gewebe ein. Säurefuchsin dringt schwerer in die Muskula-

1) Es ist leicht begreiflich, dass, je reicher ein Gewebe an färbbaren Substanzen ist, desto stärker es sich färbt. Die Muskulatur und das Zottenepithel sind in der Tat diejenigen Gewebe, die substanzreich sind, was bei ungefärbtem Schnittpräparate zu konstatieren ist. Bei solchem Präparate wird das Bindegewebe der Submukosa am hellsten gesehen. So in der Muskulatur und dem Zottenepithel können die färbbaren Substanzen reichlich und dicht vorhanden sein. Diese Verhältnisse sind ohne Zweifel der Grund dafür, dass sie sich sowohl mit Säurefuchsin als auch mit Pikrinsäure bei der singulären Färbung gut färben, während das Bindegewebe der Submukosa sich mit ihnen schlechter färbt.

tur ein, da die letztere zu dichte Struktur und daher zu enge Poren für das Eindringen des Farbstoffes hat, während in das weitporige Bindegewebe Säurefuchsin leicht hineinzutreten fähig ist und stark (stärker als Pikrinsäure¹⁾) in der Struktur haftet. Wenn man einen zuvor mit Säurefuchsin gefärbten Schnitt in Pikrinsäurelösung legt, so reichert die kleinmolekulare und hoch diffusible Pikrinsäure in der dichten und engporigen Muskulatur verhältnismässig viel an und tritt mit Säurefuchsin um die Adsorption an Substrat in Konkurrenz. Obgleich die Pikrinsäure eigentlich viel weniger adsorbierbar ist, kann sie Säurefuchsin daraus vertreiben, da sie dort an Zahl weit übertreffbar ist.

Wir haben oben gesehen, dass die Pikrinsäureanionen das Säurefuchsin aus Geweben vertreiben (S. 637), so dass das wesentliche Moment der Konkurrenz zwischen beiden Farbstoffen (Pikrinsäure und Säurefuchsin) eine gegenseitige Wirkung ihrer negativen elektrischen Ladungen sein muss.

Im lockeren Bindegewebe der Submukosa ist die Porenweite grösser, und das Säurefuchsin kann hier viel eintreten, so dass Säurefuchsin dank seiner starken Adsorbierbarkeit (im Vergleich mit Pikrinsäure) das Bindegewebe besser zu färben imstande ist.²⁾ Wenn man aber mit zu vieler Menge der Pikrinsäure bzw. mit zu weniger Menge des Säurefuchsin färbt, so wird das Säurefuchsin selbst an Bindegewebe nicht viel haften; es wird nämlich aus dem Gewebe von einer verhältnismässig reichen Menge von Pikrinsäure vertrieben.

In der obigen Darlegung ist die stärkere Adsorbierbarkeit des Säurefuchsin im Vergleiche mit Pikrinsäure schweigend genehmigt ohne besondere Beobachtung. Saure Farbstoffe färben die Gewebe im grossen und ganzen diffus (Durchtränkungsfärbung). Aber diese diffuse Färbung ist keine blosse Imbibition, vielmehr ist sie in der Hauptsache ein Adsorptionsvorgang. Saure Farbstoffe können daher verschiedene Gewebsstrukturen verschieden stark tingieren, nicht bloss weil die letzteren verschieden dicht oder locker sind, sondern weil sie verschiedenartige Adsorbierungsfähigkeit besitzen. Z. B. eosinophile Granula, rote Blutkörperchen und mit Formalin fixiertes Bindegewebe färben sich besonders gut. Im Gegensatz färben sich hyaline Knorpelgrundsubstanz und Schleim fast gar nicht. Die Adsorbierbarkeit des Säurefuchsin und der Pikrinsäure wird nun genauer im folgenden studiert.

1) 2) Über die Tatsache, dass in weitporigen Strukturen Säurefuchsin besser als Pikrinsäure haftet, ist eine besondere Beobachtung erforderlich. Siehe S. 640 f.

Im Farbgemische bei van Giesonscher Färbung gibt es Pikrinsäure bedeutend mehr als Säurefuchsin. In dem lockeren Gewebe, wie dem Bindegewebe der Submukosa, wo Säurefuchsin ohne grosses mechanisches Hindernis eingehen kann, wird das letztere besser als die Pikrinsäure von den Gewebestrukturen adsorbiert, ausgenommen dass das Säurefuchsin im Vergleich mit Pikrinsäure zu wenig in der Lösung vorhanden ist. Der Nachweis der besseren Adsorbierbarkeit des Säurefuchsin ist auf dreierlei Weise möglich.

Entweder

1) Die Moleküle des Säurefuchsin sind viel grösser als die der Pikrinsäure. Wenn man voraussetzt, dass die gleiche Anzahl von Molekülen der beiden Farbstoffe adsorbiert werden, muss die Menge (das Mass) des adsorbierten Säurefuchsin viel grösser als die der Pikrinsäure sein. Die von Chemikern angegebenen Atomzahlen der Farbstoffe sind in der nächsten Tabelle zitiert (nach bekannten Farbstofftabellen von Schultz, Rowe u. a.). Da von verschiedenen Fabriken unter demselben Namen oft etwas andere Farbstoffe in den Handel gekommen sind, können unter stehende Zahlen natürlich nicht sehr exakt sein.

Methoden der Färbung	Komponente der Farbkombination mit Atomzahlen			
van Gieson	Pikrinsäure	19	Säurefuchsin	58
Mallory	{ Orange G	39	Anilinblau	78
	{ Säurefuchsin	58(57?)		
Heidenhain	Pikrinsäure	19	Blauschwarz	67
Freeborn	Pikrinsäure	19	Nigrosin	>19
Traina	Pikrinsäure	19	Wasserblau	84
v. Möllendorff	Eosin bl.	41?	Methylblau	84
Heidenhains Azanfärbung	{ Gold-Orange G	36?(35?)	Anilinblau	78
	{ Azokarmin B	62		

Von beiden Farbkomponenten färbt das grössermolekulare das lockere weitporige Bindegewebe an.¹⁾

Die Molekulargrösse des Säurefuchsin steht in engerer Beziehung zu der Beweglichkeit und der Tendenz des Farbstoffes unlöslich zu werden. Diese letzteren zwei Eigenschaften sind wichtiger. Hierüber wird unter 2) und 3) gesprochen werden.

oder

2) Das grossmolekulare Säurefuchsin ist weniger diffusibel als die Pikrinsäure. Die Beweglichkeit der Säurefuchsinionen muss weniger lebhaft sein. Die Diffusibilität der Farbstoffe in Agargallerte (0,5g Agar+100 ccm 1/15 molare Phosphatlösung von pH=7,0; die Gallerte ist also von neutraler Reaktion und wohl gepuffert) ist wie folgt²⁾.

1) In Wirklichkeit aber mag die Sache in Folge der etwaigen chemischen Reaktion zwischen dem Substrat und Farbstoffe und ferner in Folge der womöglichen Polymerisation und Dissoziation der Farbstoffe etwas komplizierter sein.

2) Siehe dazu die erste Mitteilung!

Methoden der Färbung	Diffusion der Farbstoffe in Phosphat-Agar in 4 Stunden (mm)			
van Gieson	Pikrinsäure	9	Säurefuchsin	3
Mallory	Orange G	9	Anilinblau	1,5
	Säurefuchsin	3		
Heidenhain	Pikrinsäure	9	Blauschwarz	weniger als 2
Freeborn	Pikrinsäure	9	Nigrosin	2,5
Traina	Pikrinsäure	9	Wasserblau	1,5
v. Möllendorff	Eosin	6	Methylblau	1,5
Heidenhains Azanfärbung	Gold-Orange G	9	Anilinblau	1,5
	Azokarmin B	6		

Wenn man mit einer von diesen Farbstoffkombinationen Schnitte färbt, so tingiert sich das Bindegewebe immer mit einem weniger diffusiblen Farbstoffe, wie Säurefuchsin. Anilinblau, Blauschwarz, Nigrosin, Wasserblau und Methylblau.

oder

3) Obwohl das Siliciumdioxid sich nicht mit sauren Farbstoffen färbt¹⁾, können sich Aluminiumsilicat (Kaolin) ($\text{H}_2\text{Al}_2(\text{SiO}_4)_2 + \text{H}_2\text{O}$) und basisches Aluminiumoxyd (Al_2O_3) und -hydroxyd ($\text{Al}(\text{OH})_3$) mit ihnen verbinden und färben. Die Farbstoffe werden dadurch unlöslich gemacht, sei die Verbindung zwischen diesen anorganischen Substanzen und den Farbstoffen von chemischer Natur oder sei sie bloss eine physikalische Erscheinung (Rheinboldt und Wedekind ('23) bezeichnen die Bindung organischer Farbstoffe durch unlösliche anorganische Substrate als „elektroaffine Adsorption“). Die Tendenz unlöslich zu werden mit diesen Substanzen, vielleicht auch die Neigung zu Flockung im physikalisch-chemischen Sinne, ist bei Säurefuchsin bedeutender als bei Pikrinsäure. Die Details sind wie folgt.

Während einiger Tage wäscht man das Pulver des Aluminiumsilicats und anderer mit dest. Wasser, indem man sie wiederholend im Wasser suspendiert und nach Sedimentierung das überstehende Wasser dekantiert. Das zuletzt über das Sediment des Aluminiumsilicats zurückgebliebene Wasser hatte pH=6,3. Das des Aluminiumoxyd hatte pH=7,4. Beim Aluminiumhydroxyd war pH=7,9. Nun stellt man mit 1/15 molarer Phosphatlösung (pH=7,0) 1%ige Suspension von Aluminiumsilicat und von anderen her. Andererseits bereitet man mit gleicher Phosphatlösung 0,01%- und 0,001%ige Farbstofflösungen. Zu jeder 5 ccm Farbstofflösung tut man 5 ccm Suspension hinzu, und schüttelt die so erhaltenen Gemische von Zeit zu Zeit und lässt sie dann eine Nacht über stehen. Am nächsten Morgen wird die Färbung der Bodensätze mit blossen Augen beobachtet. Die Resultate sind in der Tabelle 1 auf der nächsten Seite.

Das Aluminiumsilicat (kieselsaure Erde) (Kaolin) ist eigentlich sauer. Die mit der Substanz um 0,5% versetzte 1/15 molare Phosphatlösung von pH=7,0 vermehrt ihre Wasserstoffionenkonzentration und zeigt endlich pH=6,7. Dessenungeachtet färbt sich das Aluminiumsilicat mit den meisten sauren Farbstoffen infolge seiner ampholytischen Natur oder seiner hydrolytischen Dissoziation und auch infolge der womöglichen Ver-

1) Darüber in der ersten Mitteilung.

Tabelle 1. Färbung des Aluminiumsilicats, des Aluminiumoxyds und des Aluminiumhydroxyds mit sauren Farbstoffen in Phosphatlösung (pH=7,0).

Farbstoffe	Färbung des Al-Silicats in		Färbung des Al-Oxyds in		Färbung des Al-Hydroxyds in		Diffusibilität	Bemerkungen
	0,0005%iger Farblösung	0,004%iger Farblösung	0,0005%iger Farblösung	0,005%iger Farblösung	0,0005%iger Farblösung	0,005%iger Farblösung		
1) Pikrinsäure	—	—	—	±	—	±	##	
2) Tropaeolin O	—	—	—	+	—	+	##	
3) Fluorescein	—	±	±	±	—	+	##	
4) Trypanblau	±	+	±	±	—	+	++	
5) Thiazinbraun	±	+	±	+	±	+	++	
6) Orange G	—	—	—	±	—	+	##	
7) Bordeaux R	—	±	±	+	±	+	++	
8) Eosin bl.	±	+	±	+	—	+	++	
9) Azokarmin B	±	+	—	+	—	+	++	
10) Indigcarmin	—	—	—	±	±	±	++	
11) Scharlach R	—	±	±	±	—	±	++	
12) Nigrosin*)	—	±	—	+	—	+	+	*) Die Farbstoffe ziemlich schwer löslich.
13) Indulin*)	±	+	—	±	±	+	+	
14) Alizarinsulfosaures Natron	+	+	++	++	##	##	++	
15) Methylorange	—	±	—	±	±	±	##	
16) Blauschwarz**)	±	+	—	+	—	+	+	**) Die Farbstoffe schwer löslich.
17) Phenolrot**)	—	—	—	+	—	++	##	
18) Lichtgrün F.S.	+	++	±	+	±	+	++	
19) Alizarinrot	+	++	±	++	±	##	++	
20) Aurantia	—	±	—	+	—	+	##	
21) Bleu de Lyon	+	++	+	++	+	++	±	
22) Echtrot	+	++	+	++	+	##	++	
23) Rose bengale	±	+	±	++	±	++	++	
24) Congorot	+	++	++	++	++	##	+	
25) Wasserblau***)	++	++	±?	++?	±?	+	±	***) Die mit Al-Oxyd u. -Hydroxyd versetzten Farblösungen verblassen sehr.
26) Säurefuchsin***)	±	+	—	+	—	+	+	
27) Methylblau***)	++	##	±?	+	±?	+	±	
28) Anilinblau***)	+	++	±?	+	±?	+	±	
29) Lithioncarmin	—	+	±	±	++	+	+	
30) Carminsaures Natron	—	+	—	±	++	±	+	
31) Alkaliblau***) ***)	±	++	—	+	—	+	±	

Zeichenerklärung: Bei Färbungen des Al-Silicats u. a. bedeuten — keine Färbung, ± spurweise, +, ++, ## stärkere Färbung und endlich ### intensive Färbung. Die Diffusibilität eines Farbstoffes, welcher in 4 Stunden 1–5 mm in Agargallerte geht, ist mit ± gezeigt; 6–10 mm mit +; 11–20 mm mit ++; und noch grössere Diffusibilität mit ##.

unreinigung der Substanz. Nach Michaelis und Rona ('19) enthalten sog. Kiesel-säurepräparate ohne Ausnahme mehr oder weniger Spuren von Calcium (Calciumsilicat?) und geben somit die Möglichkeit einer Austauschadsorption.

Das basische Aluminiumoxyd und -hydroxyd färbt sich mit jedem sauren Farbstoffe. Die mit dem Aluminiumoxyd um 0,5% zugesetzte neutrale 1/15 molare Phosphatlösung zeigte pH=7,15, bei Aluminiumhydroxyd war die Zahl 7,3.

Die Farbstoffe mit bedeutender Dispersität, wie Pikrinsäure, Tropaeolin O, Fluorescein, Orange G, Methylorange, Phenolrot und Aurantia färben immer schlecht, während schwach diffusibles Bleu de Lyon und Congorot gut färbten. Nigrosin, Indulin und Blauschwarz sind zwar schwach diffusibel, aber ihre Löslichkeit in Phosphatlösung (pH=7,0) ist von vorn herein gering, und die Farbstoffe können natürlich nicht stark färben.

Wasserblau, Säurefuchsin, Methylblau, Anilinblau und Alkaliblau färben Aluminiumoxyd und -hydroxyd trotz ihrer geringen Diffusibilität nicht viel, denn sie verblassen (vielleicht infolge der intramolekularen Umlagerungen bei alkalischer Reaktion).

Wir kommen nun auf die Frage der Tendenz der Farbstoffe unlöslich zu werden bei van Giesonscher Färbung u. dgl. zurück. Aus der Tabelle geht hervor, dass Säurefuchsin mit Aluminiumsilicat u. a. besser unlöslich wird als Pikrinsäure¹⁾; Anilinblau besser als Orange G und Säurefuchsin; Blauschwarz, Nigrosin und Wasserblau besser als Pikrinsäure; Methylblau besser als Eosin; und endlich Anilinblau besser als (Gold-Orange G und) Azokarmin B. Wir möchten hier darauf aufmerksam machen, dass für die Tendenz der sauren Farbstoffe unlöslich zu werden mit obigen anorganischen Substanzen, besonders mit Aluminiumsilicat, die Molekulargrösse und die Diffusibilität der Farbstoffe massgebend sind, dass aber andere Beschaffenheiten der Farbstoffe beinahe belanglos zu sein scheinen.

Es zeigt sich ferner, dass sowohl unfixierte als auch mit Formalin und anderen fixierte Gelatineplatten sich mit Farbstoffen bedeutender Dispersität und Diffusibilität im allgemeinen schlecht und mit grossmolekularen oder hochkolloidalen Farbstoffen im Gegenteil gut färben. Hierhin gehört auch die Feststellung von Traube und Shikata ('23), dass eine Adsorption saurer Farbstoffe im allgemeinen um so besser erfolgt, je geringer ihre Dispersität ist. Die Meinung von Heidenhain ('02, S. 136), dass man bei grösserem Molekül von Farbstoffen eine geringere Fällungskraft gegenüber dem Albumin und Casein als bei kleinerem Molekül haben würde, ist hier nicht gültig. Er stellte sich vor, dass die Azidität, also die Fällungskraft sinkt, wenn die sauren Gruppen sich über einen grösseren Kern hin verteilen, dass sie steigt, wenn sie an einem kleinen Kern sich zusammendrängen. So einfach liegen die Verhältnisse aber leider nicht.

Die obenerwähnten drei Beschaffenheiten der Farbstoffe, die Molekulargrösse (definiert durch die Zahl der Atome im Molekül), die Diffusibilität und die Tendenz unlöslich zu werden, stehen miteinander in enger Beziehung und sind für eine bessere oder schlechtere Adsorbierbarkeit von hoher Bedeutung.

1) Mit Aluminiumoxyd und -hydroxyd verblasst Säurefuchsin sehr und die Beobachtung ist fast unmöglich.

Der Verfasser erlaubt sich, einen Teil von Versuchen, die er einst während seines Aufenthaltes in Deutschland (1926) auf Anraten von Herrn Prof. v. Möllendorff gemacht hat, hier hinzufügen.

Man schichtet eine 0,5%ige Lösung von sauren Farbstoffen: Patentblau, Chromotrop und Methylblau, welche mit 1/10 molarer Phosphatlösung ($\text{pH}=7,0$) hergestellt ist, auf 10%iger Gelatinegallerte in Reagensglas über. Die Gallerte ist ebenfalls mit neutraler 1/10 molarer Phosphatlösung bereitet. Die Farbstoffe diffundieren jeder für sich 8 mm, 5,5 mm und 1 mm (bei derselben Bedingung Pikrinsäure 11 mm und Säurefuchsin 7 mm) in 8 Stunden. Färbt man mit diesen Farbstoffen die mit Carnoyscher Flüssigkeit fixierten Paraffinschnitte der Darinwand in einer 1/10 molaren Phosphatlösung ($\text{pH}=7,0$), so wird die Reihenfolge der Stärke der Färbung mit Patentblau:

Muskulatur, Zottenepithel>Bindegewebe in Zotten>

Bindegewebe der Submukosa>Epithelzellkerne,

mit Chromotrop:

Muskulatur>Zottenepithel>Bindegewebe in Zotten>

Bindegewebe der Submukosa>Epithelzellkerne,

und mit Methylblau:

Bindegewebe der Submukosa und in Zotten>Zottenepithel>Muskulatur>Epithelzellkerne.

Epithelzellkerne färben sich immer am schlechtesten, denn sie bestehen, wie später erwähnt wird, zum grossen Teil aus stark negativ geladenen Substanzen und stossen die ebenfalls negativ geladenen sauren Farbstoffe ab. Das Bindegewebe der Submukosa ist zu locker und an färbaren Substanzen zu arm, um sich mit gewöhnlichen Farbstoffen sehr stark zu färben. Die Reihenfolge der Färbbarkeit der Muskulatur, des Zottenepithels und des Bindegewebes in Zotten und der Submukosa mit Patentblau und Chromotrop ist umgekehrt zu der mit Methylblau. Berücksichtigt man die Tatsache, dass die Reihenfolge der Dichtigkeit der Gewebe

Muskulatur>Zottenepithel>Bindegewebe in Zotten>

Bindegewebe der Submukosa

ist, so liegt es nahe, anzunehmen, dass, wenn die Gewebe auch sonst gewöhnlich sich mit dieser Reihenfolge stark färben, die Moleküle oder Teilchen des Methylblaus doch zu gross sind, um in die Muskulatur einzudringen und sie gut zu färben. Die Dichtigkeit des Zottenepithels steht in der nächsten Ordnung und konnte sich also mit dem Farbstoffe mässig färben. Das Bindegewebe in Zotten und besonders das der Submukosa ist locker. Das grossmolekulare oder vielmehr kolloidale

Methylblau konnte wohl darin durchdringen und durch seine hohe Tinktorialkraft (siehe oben!) das Gewebe stärkstens färben.

II. Färbung des Salamanderschwanzpräparates mit sauren Färbstoffen.

Wenn man einen in Zenkerscher Flüssigkeit fixierten Paraffinschnitt des Salamanderschwanzes in einer wässrigen Säurefuchsinlösung einlegt, so ist die Reihenfolge der Stärke der Färbung:

Darmepithel > quergestreifte Muskelfasern, glatte Muskelfasern > Epidermis > kollagene Fasern > Knorpelgrundsubstanz.

In einer Säurefuchsinlösung von pH=3,5 (gepuffert durch „Zitrat“ + „Salzsäure“ nach Sörensen) wird die Färbung im allgemeinen stärker und die Reihenfolge bedeutender, aber immer in derselben Anordnung.

Färbt man aber solchen Schnitt mit einem geeigneten Gemisch von Säurefuchsin und Pikrinsäure, so wird sich die Reihenfolge der Färbung mit Säurefuchsin völlig ändern und wird:

kollagene Fasern > Epidermis > quergestreifte Muskelfasern, glatte Muskelfasern, Darmepithel $\geq$ Knorpelgrundsubstanz.

Also wird die Reihenfolge umgekehrt mit Ausnahme von Knorpelgrundsubstanz. Auf demselben Schnitte ist die Reihenfolge der Färbung mit Pikrinsäure:

Darmepithel > quergestreifte Muskelfasern, glatte Muskelfasern > Epidermis > kollagene Fasern, Knorpelgrundsubstanz.

Dieselbe Reihenfolge sieht man, wenn Pikrinsäure allein anstatt Säurefuchsin und Pikrinsäure angewendet wird. Und noch beachtenswert ist, dass diese Reihenfolge diejenige ist, die man oben bei der singulären Färbung mit Säurefuchsin gesehen hat.

Die Ergebnisse der obigen Versuchsreihe erklären sich wie folgt. Säurefuchsin färbt eigentlich diejenigen Gewebe gut, die färbbare Substanzen dicht enthalten, wie Muskulatur, Darmepithel u. a. Indes wenn kleinmolekulare leicht diffusible Pikrinsäure zugleich in der Lösung vorhanden ist, dringt sie verhältnismässig leicht und viel in die dichten weitporigen Strukturen ein und verdrängt daraus Säurefuchsin. Die Verdrängung wird vielleicht hauptsächlich durch negative elektrische Ladungen der beiden Farbstoffe verursacht. Das Bindegewebe ist aber locker und weitporig und deshalb kann sich sowohl kleinmolekulare

Pikrinsäure als auch grossmolekulares Säurefuchsin darin anhäufen. Wenn diese zwei Farbstoffe zu gleicher Zeit in der Lösung vorhanden sind, so haftet Säurefuchsin im Bindegewebe deshalb stärker und färbt es rot, weil seine Adsorbierbarkeit grösser ist als die der Pikrinsäure.

Es gibt Gewebsteile, welche sich nicht nach dieser Regel richten. Die Knorpelgrundsubstanz ist ein solcher. Diese Substanz tingiert sich nicht leicht mit Säurefuchsin, Pikrinsäure und mit dem Gemische der beiden Farbstoffe. Bei der Knorpelgrundsubstanz herrscht der Vorgang der van Giesonschen Färbung nicht, bloss weil die Substanz unserer Meinung nach elektrisch stark negativ geladen ist und deshalb auf ebenfalls negativ geladene saure Farbstoffe abstossend wirkt.

Forschen wir jetzt der Heidenhainschen Azanfärbung ('15) nach. Diese Färbung ist als Modifikation der Malloryschen Methode ganz ausgezeichnet. Gold-Orange G, Azokarmin B oder G und Anilinblau werden dabei angewandt. Wenn man einen Schnitt von Salamanderschwanz mit Gold-Orange G in einer Phosphatlösung mit pH=7,0 oder 3,5 färbt, ist die Stärke der Tingierung:

Darmepithel, quergestreifte Muskelfasern > glatte Muskelfasern > Epidermis > kollagene Fasern > Knorpelgrundsubstanz,

und mit Azokamin B:

Darmepithel, quergestreifte Muskelfasern > glatte Muskelfasern > Epidermis > kollagene Fasern > Knorpelgrundsubstanz.

Die Reihenfolgen sind ganz gleich. Indes mit Anilinblau in einer Phosphatlösung mit pH=3,5 wird die Reihenfolge ganz anders:

Kollagene Fasern > quergestreifte Muskelfasern, glatte Muskelfasern > Darmepithel, Epidermis > Knorpelgrundsubstanz.

Hier tingiert sich das Bindegewebe am stärksten aus dem Grunde, dass die Moleküle und Teilchen des Anilinblaus zu gross sind, um in die dichteren Gewebe leicht einzudringen, dass sie sich aber in dem lockeren Bindegewebe dank ihrer grosser Adsorbierbarkeit viel anhäufen, genau wie wir bei der Färbung der Darmwandsschnitte mit Methylblau gesehen haben (S. 644).

Endlich möchten wir Einflüsse der Vermehrung der Wasserstoffionenkonzentration auf die Färbung kurz erörtern.

Bei pH=7,0 färben sich die Gewebe des Salamanderschwanzes mit Anilinblau

im allgemeinen schwächer und die Tingierung des Bindegewebes zeigt sich weniger als bei pH=3,5.

Wir fügen noch einige Beispiele hinzu: Färbt man einen Paraffinschnitt von Kaninchenleber (fixiert mit Carnoyscher Flüssigkeit) mit Methylblau, so wird Tingierung bei pH=7,0:

Bindegewebe $\geq$ Gitterfasern $>$ Leberzellprotoplasma,
bei pH=3,5:

Bindegewebe $>$ Gitterfasern $>$ Leberzellprotoplasma,
und beim letzteren Fall ist die Tingierung der beiden ersteren Gewebsteile besonders gut.

Ferner mit Säurefuchsin wird die Tingierung bei pH=7,0:

Bindegewebe = Leberzellprotoplasma,
bei pH=3,5:

Bindegewebe $>$ Leberzellprotoplasma.

Die Färbbarkeit des Bindegewebes vermehrt sich also mit saurerer Reaktion. Der Grund ist zweifach, und zwar einerseits setzt sich die Dispersität des Anilinblaus bzw. Methylblaus herab und die Teilchen des Farbstoffes vergrössern sich, und andererseits erniedrigt sich besonders die negative Ladung des Bindegewebes bei saurer Reaktion, während seine positive Ladung sich bedeutend erhöht. Diesbezügliche genaue Untersuchungen sind dringend notwendig. Darüber in späteren Mitteilungen.

III. Verschiedenheiten der Färbungsvorgänge mit basischen Farbstoffen von denen mit sauren.

Für das Ergebnis der Färbung mit sauren Farbstoffen ist eine Molekular- oder Teilchengrösse, also eine Diffusibilität der Farbstoffe, von der grössten Bedeutung. Die dichten engporigen Gewebe färben sich nicht mit zu grossmolekularen sauren Farbstoffen, während die lockeren weitporigen Gewebe sich in der Regel mit grossmolekularen besser als mit kleinmolekularen färben. Die Beziehung zwischen der Diffusibilität und der Tinktorialkraft kann auch wohl bei der Färbung mit basischen Farbstoffen bemerkt werden. Wir haben schon gesehen, dass bei der Färbung des Pulvers von Siliciumdioxid (SiO_2) mit basischen Farbstoffen diejenigen Farbstoffe grosse Tinktorialkraft zeigen, die in Agargallerte schwach diffusibel sind, dass aber die leicht diffusiblen die Substanz weniger färben¹⁾. Das Aluminiumsilicat (kiesel-saure Erde) (Kaolin) färbt sich mit basischen Farbstoffen im allgemeinen sehr stark. Wenn man die Beziehung zwischen der Diffusibilität der Farbstoffe und der Stärke der Färbung des Aluminiumsilicats beobachtet,

1) Siehe in der ersten Mitteilung.

so findet man die Tatsache, dass auch hier schwach diffusible Farbstoffe bestens färben. Bei der Färbung des basischen Aluminiumoxyds und -hydroxyds kann man ebenfalls dieselbe Regel wahrnehmen. Die Einzelheiten sind wie folgt.

Die Pulver dieser anorganischen Substanzen werden gewaschen, indem sie wiederholend im dest. Wasser suspendiert werden und nach Sedimentierung das überstehende wasser dekantiert wird. Nach einigen Tagen stellt man mit 1/15 molarer Phosphatlösung (pH=7,0) 1%ige Suspensionen der Substanzen her. Zu 5 ccm der 0,01%- oder 0,001%igen Farbstofflösung, die ebenfalls mit 1/15 molarer Phosphatlösung bereitet ist, fügt man 5 ccm der 1%igen Suspension hinzu. Man schüttelt die Gemische hin und wieder und lässt sie eine Nacht über im Zimmer, und Beobachtung. Die Resultate sind in der Tabelle 2.

Tabelle 2. Färbung des Aluminiumsilicats, des Aluminiumoxyds und des Aluminiumhydroxyds mit basischen Farbstoffen in Phosphatlösung (pH=7,0).

Farbstoffe	Färbung des Al-Silicats in		Färbung des Al-Oxyds in		Färbung des Al-Hydroxyds in		Diffusibilität in Phosphat-Agar	Bemerkungen
	0,0005%iger Farblösung	0,005%iger Farblösung	0,0005%iger Farblösung	0,005%iger Farblösung	0,0005%iger Farblösung	0,005%iger Farblösung		
1) Methylengrün	##	##	—	—	—	±	##	*) Farbstoffe verblasen beträchtlich.
2) Methylgrün*)	++	##	—	—	—	—	+?	
3) Methylblau BX	++	##	—	±	—	##	##	
4) Safranin	++	##	—	±	—	++	##	
5) Toluidinblau	##	##	±	+	±	##	##	
6) Azur II	##	##	±	++	++	##	++	
7) Nilblau-Sulfat	++	##	±	+	±	##	##	
8) Acridinrot	+	##	—	±	—	±	##	
9) Gentianaviolett	##	##	±	##	±	##	++	
10) Crystallviolett	++	##	±	++	±	##	++	
11) Methylviolett B	++	##	±	++	±	++	++	
12) Janusgrün*)	##	##	++	++	±	##	+	
13) Pyronin	+	##	—	±	—	±	##	
14) Dahlia	++	##	—	++	—	++	++	
15) Jodgrün*)	##	##	—	—	—	—	++?	
16) Fuchsin	++	##	—	±	—	±	##	
17) Malachitgrün*)	—	—	—	—	—	—	++?	
18) Thionin	+	##	—	±	—	±	++	
19) Bismarckbraun	++	##	—	++	+	++	++	
20) Neutralrot	##	##	—	±	—	+	?	

Zeichenerklärung: Bei Färbungen des Al-Silicats u. a. bedeuten — keine Färbung, ± spurweise, +, ++, ## stärkere Färbung und endlich ### intensive Färbung. Die Diffusibilität eines Farbstoffes, welcher in 4 Stunden mit konzentrierter Farbe bis 2 mm bzw. mit dünner Farbe bis 4 mm geht, ist mit + bezeichnet; die Diffusibilität eines Farbstoffes, welcher mit konzentrierter Farbe bis 3 mm bzw. mit dünner Farbe bis 6 mm vorrückt, ist mit ++ und noch grössere Diffusibilität ist mit ## angedeutet.

Das saure Aluminiumsilicat tingiert sich besonders gut. Das basische Aluminiumoxyd und -hydroxyd färben sich auch beträchtlich, da sie erstens ampholytisch sind und zweitens Beimengungen von anderen Substanzen stets vorhanden sind (Verunreinigung). Inwieweit dabei ein Adsorptionsvorgang nach dem Gibb- Thomsonschen Prinzip herrscht, ist daher nicht klar.

Jedenfalls können wir aus der Tabelle 2 die Beziehung zwischen der Diffusibilität in Agargallerte und der Tinktorialkraft entnehmen; Farbstoffe mit hoher Diffusibilität wie Methylengrün, Safranin, Acridinrot, Pyronin und Fuchsin färben wenig, während wenig diffusibles Janusgrün sehr stark färbt.

Während bei sauren Farbstoffen die Molekulargrösse—definiert durch die Zahl der Atome im Molekül—in enger Beziehung zur Diffusibilität steht, kann dieser Zusammenhang bei basischen Farbstoffen kaum gefunden werden. Zählt man Atome der Moleküle der sehr diffusiblen basischen Farbstoffe, so ist die Zahl:

Methylengrün	40(41?),
Safranin	44(u. 47),
Acridinrot	41(34?),
Pyronin	40,
Fuchsin	40.

Die des gering diffusiblen Janusgrüns ist etwa 70.

Aber das mässig diffusible Thionin hat nur 26(27?) Atome. Das Dahlia, welche ebenfalls mässig diffusibel ist, besteht aus 63(62?) Atomen.

Zu beachten ist daher, dass die Adsorbierbarkeit der basischen Farbstoffe nicht viel von physikalischen Beschaffenheiten, wie Molekulargrösse und Diffusibilität im strikten Sinne, d. h. freiem Diffusionsvermögen, abhängt, sondern im wesentlichen von chemischer Eigenschaft. Hier weichen basische Farbstoffe sehr von sauren Farbstoffen in Bezug auf Färbung ab. Die Tinktorialkraft der basischen Farbstoffe beruht hauptsächlich auf der chemischen Adsorbierbarkeit derselben¹⁾. Die basischen Farbstoffe sind in der Regel deswegen schwach diffusibel, weil sie stark adsorbiert werden (und umgekehrt leicht diffusibel, weil gering adsorbierbar). Die stark adsorbierten Farbstoffe häufen sich an der oberflächlichen Schicht des Substrates und verstopfen den Weg der nachfolgenden Farbstoffionen oder -teilchen.

IV. Färbung der fixierten Präparate mit basischen Farbstoffen.

Die meisten im Wasser gelösten basischen Farbstoffe, vor allem Janusgrün, Gentianaviolett und seines Gleichen (Crystallviolett und

1) Siehe hierzu: Michaelis, '20.

Methylviolett B), sind stark adsorbierbar, und wir sehen öfters, dass sie an Glaswand oder an anderen elektrisch negativ geladenen Gegenständen fest haften und nicht leicht mit Wasser ausgewaschen werden. Wenn wir mit einer verdünnten wässerigen Lösung basischen Farbstoffes histologische Schnitte färben, tingieren sich gewisse Gewebsteile, wie Zellkerne, hyaline Knorpelgrundsubstanz und Schleim, die bedeutend elektrisch negativ geladen sind, besonders gut. Die anderen vielen Gewebe können dabei fast ungefärbt bleiben. So kommen Elektionen in der Regel viel prägnanter zum Vorschein im Vergleich mit der Färbung mit sauren Farbstoffen. Während saure Farbstoffe die Gewebe ziemlich diffus färben (Durchtränkungs-färbung) und das Ergebnis viel von der Dispersität von Farbstoffen und der Dichtigkeit von Geweben abhängt, ist für die Verteilung von basischen Farbstoffen in Gewebe die Adsorbierbarkeit der Farbstoffe an Gewebsteilen von der grössten Bedeutung (Niederschlagsfärbung). Die Molekulargrösse der basischen Farbstoffe und die Dichtigkeit der Gewebsteile haben mit der Verteilung der Farbstoffe gewöhnlich nicht viel zu tun (im Gegensatz zu sauren Farbstoffen).

Beim Abspülen der mit sauren Farbstoffen gefärbten Schnitte verlassen kleinemolekulare, leicht diffusible Farbstoffe schnell die Schnitte; grossmolekulare, schwach diffusible jedoch langsam. Aber die mit basischen Farbstoffen gefärbten Schnitte werden gewöhnlich nur schwer mit Wasser ausgewaschen (ausgenommen dass man beim Waschen die basischen Farbstoffe leicht lösende Mittel benutzt). Dies ist auch auf die stärkere Adsorbierbarkeit der Farbstoffe zurückzuführen.

Im folgenden sollen uns einige Färbungen mit basischen Farbstoffen beschäftigen. Legen wir einen Paraffinschnitt von einem in Carnoy-scher Flüssigkeit fixierten Kaninchendarm in eine verdünnte Lösung basischen Farbstoffes, z. B. in die des Toluidinblaus ein, so färben sich Kerne des Zottenepithels und der Bindegewebszellen besonders gut (metachromatisch) und andere Gewebsteile stehen in der Färbung um vieles nach. Die Reihenfolge der Färbungsstärke ist bei Benutzung einer wässerigen Toluidinblaulösung oder einer Toluidinblaulösung gepuffert mit neutraler Phosphatlösung („prim. Kaliumphosphat“ + „sek. Natriumphosphat“ nach Sörensen):

Zellkerne¹⁾ » Zottenepithel > Muskulatur > Bindegewebe²⁾.

Der Unterschied der Färbung zwischen Zellkernen und Zottenepithel ist dabei sehr weit.

1) Zellkerne sind reich an sauren Eiweisstoffen, Nukleoproteiden.

2) Der Hauptbestandteil des Bindegewebes ist das Kollagen; mehr als ein Drittel seines Stickstoffes ist in der Basenfraction enthalten. Es liefert viel Arginin und Lysin (basische Aminosäuren).

Bei pH=10,0 („Borat“ + „Natron“ nach Sörensen) vermehrt sich die Färbung überhaupt ohne Änderung der Reihenfolge der Färbungsstärke. Bei pH=3,5 („Zitrat“ + „Salzsäure“ nach Sörensen) vermindert sich dagegen die Färbung überhaupt, aber die Reihenfolge bleibt ebenfalls unverändert.

Die Vermehrung der Färbung bei alkalischer Reaktion und die Verminderung derselben bei saurer Reaktion sind im Sinne der physikalischen Chemie dadurch erklärt, dass die Gewebe zum grössten Teil aus ampholytischen Substanzen bestehen, deren isoelektrische Punkte bei saurer Reaktion liegen, und dass ihre negative Ladung sich mit der Verminderung der Wasserstoffionenkonzentration erhöht und mit der Vermehrung derselben erniedrigt. Freilich werden die positiv geladenen basischen Farbstoffe von der erhöhten negativen Ladung der Gewebe besser adsorbiert, und umgekehrt¹⁾.

Färben wir ferner Paraffinschnitte von Salamanderschwanz, der in Zenkerscher Flüssigkeit fixiert worden ist, mit einer wässerigen Toluidinblaulösung. Wir sehen alle Zellkerne besonders gut gefärbt. Die Reihenfolge der Färbung der übrigen Elemente ist:

Zellkerne»Epidermis>quergestreifte Muskelfasern>
Darmepithel, Knorpelgrundsubstanz (rötlich metachromatisch), glatte Muskelfasern>Bindegewebsfasern (ganz schwach rötlich metachromatisch).

Bei der Färbung mit einer wässerigen Neutralrotlösung ist das Ergebnis dasselbe.

Wenn wir so gefärbte Schnitte in eine Pufferlösung von pH=3,5 („Zitrat“ + „Salzsäure“) bringen, entfärben sich die Bindegewebsfasern am raschesten und ihnen folgen die glatten und quergestreiften Muskelfasern. Zellkerne entfärben sich zuletzt.

Wir verfehlen nicht die Farbstoffe zu beobachten: Nilblau-Sulfat, Janusgrün, Bismarckbraun und Neutralrot, die eine etwas sonderliche Stellung zu anderen Farbstoffen nehmen. Sie färben nicht nur Zellkerne, Knorpelgrundsubstanz und Schleim, sondern auch Zytoplasma, kollagene Fasern u. a. sehr gut. Dies ist durch die leichte Flockbarkeit und die starke Adsorbierbarkeit der Farbstoffe bedingt.

Von Interesse dürfte noch folgender Versuch sein.

Das basische Fuchsin färbt auch Zytoplasma und kollagene Fasern gut und die mikroskopischen Bilder ähneln sich mit den der sauren Farbstoffe. Dieser Farbstoff wandert kataphoretisch nur gering zur Kathode trotz seiner relativ hohen Diffusionsfähigkeit; seine positive Ladung muss tatsächlich geringfügig sein. Noch wichtiger ist, dass der

1) Die Details lassen sich in später erscheinenden Mitteilungen III-IX, vor allen VIII, gründlich erörtern. -

Farbstoff zum Teil merklich zur Anode wandert (siehe Tabelle 2 in der ersten Mitteilung), und dass er durch CaCl_2 leicht geflockt wird (näheres in späteren Mitteilungen). Es scheint uns sehr wahrscheinlich, dass das Fuchsinmolekül mehr oder weniger bedeutend negativ geladene Atomgruppen besitzt oder die Fuchsinlösung in Wirklichkeit negativ geladene Ionen oder Teilchen enthält. Diese Beschaffenheit des Fuchsins ist bei der Färbung der elastischen Fasern mit Resorcinfuchsin nach Weigert von grosser Bedeutung. Darüber in der Mitteilung VII.

Färbt man einen Paraffinschnitt von einem in Zenkerscher Flüssigkeit fixierten Salamanderschwanz mit Fuchsin, so ist die Tingierung der Kerne der Bindegewebszellen am stärksten. Ferner: Epidermis, Darmepithel > glatte Muskelfasern, quergestreifte Muskelfasern, Knorpelgrundsubstanz > kollagene Fasern. Die starke Tingierung der Bindegewebszellkerne und die ziemlich gute Färbung der Knorpelgrundsubstanz sind merklich verschieden von dem Ergebnis der Färbung mit Säurefuchsin.

Bei der Färbung eines Schnittes von Rippenknorpel des Kaninchens mit Fuchsin tingiert sich der grösste mittlere Teil des Knorpels sehr gut und zwar besser als quergestreifte Muskelfasern. Die Reihenfolge der Tingierung ist: Bindegewebszellkerne > Knorpelgrundsubstanz > Erythrozyten > quergestreifte Muskelfasern > kollagene Fasern.

V. Zusammenfassung.

Die wesentlichen Ergebnisse lassen sich in folgender Weise zusammenfassen.

1) Die drei Beschaffenheiten der sauren Farbstoffe, die Molekulargrösse, die Diffusibilität und die Tendenz unlöslich zu werden, stehen miteinander in enger Beziehung; und mit steigender Molekulargrösse, mit verminderter Diffusibilität und endlich mit vermehrter Tendenz unlöslich zu werden, werden saure Farbstoffe besser an die Gewebe adsorbiert.

2) Bei der van Giesonschen Färbung des fixierten Darmwandpräparates dringt die Pikrinsäure, welche, wenn auch gering adsorbierbar, aber doch leicht diffusibel ist, in dichte engporige Gewebe, wie Muskulatur und Zottenepithel, verhältnismässig viel ein und konkurriert mit dem ebenfalls negativ geladenen Säurefuchsin um eine Adsorption an Substrat und vertreibt es. Aber das Bindegewebe der Submukosa ist im Gegenteil locker und weitporig, so dass das grossmolekulare Säurefuchsin daran mit seiner stärkeren Adsorbierbarkeit viel besser haftet als die Pikrinsäure.

Dieselben Vorgänge wurden auch bei der Färbung des Salamanderschwanzes und der anderen beobachtet.

3) Fast alle sauren Farbstoffe färben ziemlich alle Gewebsteile im grossen und ganzen diffus und werden leicht mit Wasser ausgewaschen,

da die Gewebe zum grössten Teil aus den Substanzen bestehen, deren isoelektrische Punkte wie wohl bekannt bei saurer Reaktion liegen, also elektrisch negativ geladen sind. Die positiv geladenen basischen Farbstoffe besitzen dagegen in der Regel starke Affinitäten zu gewissen Gewebsteilen, welche stark sauer, also hoch negativ geladen sind (Zellkerne, hyaline Knorpelgrundsubstanz, Schleim u. a.). Und das Ergebnis der Färbung steht nicht viel zu der Dispersität von Farbstoffen und der Dichtungszustände von Gewebsteilen in Beziehung, sondern die Färbung vollzieht sich im wesentlichen nach Massgabe der chemischen Adsorbierbarkeit des Farbstoffes und der Negativität der Ladung von Gewebsteilen. Hier liegt eine grosse Verschiedenheit der Färbungsvorgänge beider Farbstoffe.

4) Bei der vermehrten Wasserstoffionenkonzentration der Medien erniedrigt sich die negative Ladung der Gewebe und erhöht sich die positive, so dass die Aufnahme der negativ geladenen sauren Farbstoffe gefördert, die der positiv geladenen basischen Farbstoffe gehemmt wird. Ein Basenzusatz wirkt gerade umgekehrt. Bei der Verwendung der umladbaren oder durch Wasserstoff- oder Hydroxylionen leicht flockbaren Farbstoffe ist die Sache viel komplizierter. Darüber wird eine Reihe Studien in den nachfolgenden Mitteilungen zu finden sein.

Literaturverzeichnis.

- Bethe, A., Die Einwirkung von Säuren und Alkalien auf die Färbung und Färbbarkeit tierischer Gewebe. Hofmeisters Beitr. Bd. 6, 1905.
- Beutner, R., B. E. Caywood, J. Lozner and H. M. Douthitt, The relation of life to electricity. Part 1: Stainability and electromotive forces of artificial systems which reproduce conditions in living tissues in accordance with the experimental work of G. W. Crile. Protoplasma, Bd. 10, 1930.
- Bucherer, H. Th. Lehrb. d. Farbenchemie, 2. Aufl. Leipzig. 1921.
- Enzyklopädie d. mikrosk. Technik. Hrsg. v. R. Krause, 1926-27.
- Fischer, A., Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas. Jena. 1899.
- Georgievics, G., Handb. d. Farbenchemie, 5. Aufl. Leipzig u. Wien. 1922.
- Glasunow, M., Zur Frage der Zelloidin-färbung mit basischen und sauren Farbstoffen. Z. f. wiss. Mikrosk., Bd. 44, 1927.
- Gortner, R.A., The nature of the combination between certain acid dyes and proteins. J. of Biol. Chem., Vol. 74, 1927.
- Halphen, G., et A. Riche, Contribution à l'étude des teintures histologiques. C. R. Acad. Sciences, T. 140, 1905.
- Heidenhain, M., Über chemische Umsetzungen zwischen Eiweisskörpern und Anilinfarben. Pflügers Arch., Bd. 90, 1902.
- , Über die Mallorysche Bindegewebsfärbung mit Karmin und Azokarmin als Vorfarben. Z. f. wiss. Mikrosk., Bd. 32, 1915.

- Heidenhain, R., Färbungen. Enzykl. d. mikr. Technik, hrsg. von R. Krause, 1926.
- Karczag, L., Methoden der Elektropie. Abderhaldens Handb. d. biolog. Arbeitsmethoden. Abt. 5, Teil 2, 1. Hälfte, 1928.
- Kedrowsky, B., Anwendung von heterodispersen Eosin zur Färbung histologischer Präparate. Z. f. wiss. Mikrosk., Bd. 47, 1930.
- Keller, R., Die Elektrizität in der Zelle, 2. Aufl., 1925.
- Kestner, O., Zur Chemie mikroskopischer Färbungen. Arch. f. Dermatol. u. Syphilis, Orig. Bd. 130, 1921.
- Michaelis, L., und P. Rona, Weiteres zur Theorie der Adsorption der Elektrolyte: Die Adsorption der organischen Farbstoffe. Bioch. Z., Bd. 97, 1919.
- , Der heutige Stand der allgemeinen Theorie der histologischen Färbung. Arch. f. mikr. Anat., Bd. 94, 1920.
- Möllendorff, W. v., Polemik mit P. G. Unna in: Dermat. Wochenschr., 1923.
- und M. v. Möllendorff, Untersuchungen zur Theorie der Färbung fixierter Präparate. III. Durchtränkungs- und Niederschlagsfärbung als Haupterscheinungen bei der histologischen Färbung. Ergebn. d. Anat. u. Entw., Bd. 25, 1924.
- Pelet-Jolivet, L., Die Theorie des Färbeprozesses. Dresden. 1910.
- Pischinger, A., Die Lage des isoelektrischen Punktes histologischer Elemente als Ursache ihrer verschiedenen Färbbarkeit. Z. f. Zellf. u. mikr. Anat., Bd. 3, 1926.
- Posner, C., Farbenanalytische Untersuchungen. Verhandl. d. Congr. f. innere Medizin, Congr. 12, 1893.
- Rheinboldt, H., und E. Wedekind, Über die Bindung organischer Farbstoffe durch anorganische Substrate. Kolloidchem. Beihefte, Bd. 17, 1923.
- Rowe, F. M., Colour Index. Bradford. 1924.
- Seki, M., Über die Beziehung zwischen der elektrischen Eigenladung von Zellen und ihrer Phagozytose und Färbbarkeit und einige Bemerkungen über die Beziehung zwischen der Eigenladung von Bakterien und ihrer Widerstandsfähigkeit gegen Farbstoffe. Mitt. d. mediz. Gesellsch. zu Okayama, Nr. 406, 1923.
- , Zur physikalischen Chemie der histologischen Färbung. I. Vorläufige Mitteilung. Elektrische Ladung von Farbstoffen und ihre wichtige Rolle bei der Färbung des Siliciumdioxids (SiO_2). Folia anat. japonica, Bd. 10, 1932.
- Schultz, G., Farbstofftabellen, 6. Aufl. Berlin. 1923.
- Sörensen, S. P. L., Enzymstudien. II. Über Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen. Bioch. Z., Bd. 21, 1909.
- Traube, J., und M. Shikata, Beziehungen zwischen Adsorption und Dispersität von Farbstoffen. Koll.-Z. Bd. 22, 1923.
- Unna, P. G., Chromolyse. Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. 5, Teil 2, 1928.
- Wertheimer, E., Über den Einfluss von Ionen auf Farbstoffe und die Anfärbbarkeit von Geweben. Pflügers Arch., Bd. 202, 1924.