

Über die Anwendung reduzierbarer Farbstoffe beim Studium der Verteilung von Giften und ihrer Wirkungen auf die Zelltätigkeit.

Von

C. A. Herter.

Professor der Pharmakologie, Columbia University New-York.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Marburg.)
(Der Redaktion zugegangen am 30. Juli 1904.)

Die von Ehrlich in seiner Untersuchung über das Sauerstoffbedürfnis des Organismus neu eingeführte farbenanalytische Methode ist in der Physiologie und der Pharmakologie bisher nur wenig in Anwendung gekommen: in der Überzeugung aber, daß solche intravitale Färbungen beim Studium pathologischer Verhältnisse sich vielleicht sehr dienlich erweisen würden, habe ich sie schon vor zwei Jahren bei meinen Untersuchungen über die Adrenalinglykosurie angewandt, zunächst freilich ohne eindeutigen Erfolg. Ich fand nun vor kurzem, dank dem freundlichen Entgegenkommen der Herren Prof. Ehrlich und Prof. Hans Meyer, Gelegenheit, diese Studien wieder aufzunehmen, und will in der vorliegenden Notiz einige farbenanalytische Beobachtungen mitteilen, die ich bei Vergiftungen mit einigen narkotischen Giften, mit Kohlenoxyd und mit Adrenalin, sowie bei der Abkühlung gemacht habe, und die mir die Bedeutung der Methode zu erweisen scheinen.

Wegen seiner geringen Giftigkeit und der Leichtigkeit, mit der es zu einer Leukobase reduziert wird, ist zu derartigen Versuchen das Methylenblau ganz besonders geeignet. Wird dieser Farbstoff einem Tiere in eine Vene injiziert, so zeigt die Untersuchung im Leben oder sofort nach dem Tode viele Gewebe, entsprechend ihrer reduzierenden Kraft, ganz oder nahezu ganz ungefärbt — andere dagegen stark gebläut: das erhaltene Bild ist aber, wie vorausgeschickt werden mag, un-

gemein wechselnd und abhängig von einer Reihe von Faktoren, wie Größe und Spezies des Tieres, Menge der eingeführten Substanz, Stadium der Infusion und insbesondere auch der Zeit zwischen Infusion und Untersuchung der Organe. Wenn man indes Tiere von gleicher Art und Größe mit Methyleneblau behandelt und unter ganz ähnlichen Bedingungen untersucht, so sind die Resultate nahezu übereinstimmend.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden in der Regel die folgenden Bedingungen eingehalten: Kaninchen von 1500 bis 1800 g erhielten 40—50 ccm einer wässerigen Lösung, die 0,33% Methyleneblau und 0,8% NaCl enthielt, in die Vena jugularis, und zwar so, daß in 1 Min. etwa 2 ccm einfließen. Unter diesen Umständen tritt schon, wenn 25—30 ccm eingeflossen sind, etwas Blau um Mund und Nase auf, und auch die freigelegte Hals- und Brustmuskulatur zeigt sich grünbläulich gefärbt: diese Muskelfärbung nimmt noch zu und ist gegen Ende der Infusion sehr deutlich. Wird nun 5 Minuten später das Tier getötet, so zeigen die Muskeln weniger Farbe, die Lungen sind ganz ungefärbt, das Herz aber, besonders das rechte Herz, bläulich. Die Leber hat ihre gewöhnliche Farbe oder erscheint etwas dunkler als normal, die Galle ist grün und enthält, wie die Untersuchung ergibt, reduzierte und unreduzierte Farbsubstanz: das Pankreas ist leicht blau gefärbt und wird beträchtlich dunkler an der Luft. Die Niere ist ziemlich dunkel gefärbt und dunkelt an der Luft nach. Der Urin ist leicht grünlichblau gefärbt. Die Nebennieren sind gewöhnlich farblos, auf der Schnittfläche färbt sich die Rindenschicht blau, das Mark bleibt fast ungefärbt: das Gehirn ist ganz oder doch annähernd farblos, aber ein Gehalt an Leukobase gibt sich durch eine leichte Bläuung der grauen Substanz an der Luft zu erkennen. Läßt man das Tier verbluten, so ist die Farbe der Organe wohl etwas bleicher als sonst: das Blutserum enthält etwas Farbbase und an der Luft sich oxydierende Leukobase. Ganz ähnliche Bilder erhält man in entsprechenden Versuchen an Katzen und Hunden.

Wendet man die doppelte oder dreifache Menge Methyleneblau bei gleicher Injektionszeit an, so sind die Erscheinungen

sehr anders, und es ist besonders auffallend, daß dann die graue Hirnrinde an der Luft tief blau wird, und daß die Langerhansschen Inseln im Pankreas tief gefärbt sind im Gegensatz zu dem übrigen Drüsengewebe, das zwar deutlich, aber viel schwächer gefärbt ist.¹⁾ Es zeigte sich indes, daß die größeren Mengen Methylenblau die Besonderheiten, die bei der Anwendung von Giften auftraten, nicht so deutlich hervortreten ließen, daher es vorteilhafter war, mit kleinen Mengen Methylenblau zu arbeiten, wie ich es oben angegeben habe.

Immer geht, sogar bei kleinen Infusionsmengen, eine gewisse Quantität der Substanz in den Intestinaltraktus, besonders in den Magen, dessen Inhalt stets etwas blaugrün gefärbt ist.

Aus den frischen Organen, aus Gehirn, Nieren, Leber, dem Verdauungstraktus und seinem Inhalt, wie endlich aus dem Blutserum, läßt sich eine geringe Menge des Farbstoffs durch wässrige Extraktion wieder gewinnen, wobei die Umwandlung der in den Organen enthaltenen Leukobase in die Farbbase durch Anwendung von Oxydationsmitteln (H_2O_2 , $K_2S_2O_5$) selbstverständlich beschleunigt wird. Indes hat es sich ergeben, daß auf diese Weise immer nur ein Teil des Farbstoffs gewonnen wird: ein viel größerer findet sich — namentlich in Leber und Galle — als eine farblose mit Wasser extrahierbare, sich aber weder spontan an der Luft, noch durch Kochen unter Zusatz der angeführten Oxydationsmittel blau-färbende Modifikation, die dagegen durch Behandeln mit HCl leicht wieder in die sich rasch an der Luft bläuende Leukobase regeneriert wird. Kleine Mengen dieser Substanz fand ich auch in den Muskeln und mitunter auch in der Niere, dagegen nicht in der Lunge. Läßt man die zerstückelte, normal schokoladebraun gefärbte Leber eines infundierten Tieres 24 Stunden an der Luft liegen, so erfolgt kein merklicher Farbenwechsel; bei längerer Einwirkung der Fäulnis und Zersetzung aber beginnt sich die Masse blau zu färben: die Leukobase wird offenbar regeneriert und oxydiert.

Es handelt sich also allem Anschein nach um ein ungewein rasch — hauptsächlich oder allein in der Leber — ent-

¹⁾ Dies ist schon von Ehrlich bemerkt worden.

stehendes Umwandlungsprodukt, vielleicht eine gepaarte Verbindung des Leukomethylenblaus; nach einer Mitteilung von Ehrlich existiert eine Acetylverbindung des Leukomethylenblaus, die ungespalten nicht zu Methylenblau oxydiert werden kann: ich vermute, daß hier eine analoge Verbindung vorliegt, und hoffe bald näheres darüber mitteilen zu können. Es ist übrigens lange bekannt, daß der Urin von Menschen, die mit Methylenblau behandelt worden sind, sich durch Kochen mit Säure intensiver blau färbt, und vor kurzem hat Brauer die gleiche Beobachtung auch in bezug auf den Übergang des Methylenblaus in die Galle gemacht: es scheint aber übersehen worden zu sein, daß hierbei nicht einfach die Leukobase, welche bekanntlich sowohl in alkalischer wie in saurer Lösung leicht oxydabel ist, sondern ein bisher noch unbekanntes, im Organismus entstandenes Umwandlungsprodukt ausgeschieden wird.

In allen Vergiftungsversuchen wurde stets einem normalen Kontrolltier gleicher Größe und unter übrigens ganz gleichen Versuchsbedingungen Methylenblau infundiert und der Sektionsbefund in gleicher Weise erhoben: ohne Einhaltung dieser Vorsicht kann man leicht auffallende Unterschiede zwischen den Befunden am vergifteten und am normalen Tier sehen, die mit der Vergiftung selbst gar nichts zu tun haben.

Vergiftung mit narkotischen Stoffen der Fettreihe.

Tief mit Äther oder mit Chloroform narkotisierten Tieren, und zwar Kaninchen, Katzen und Hunden, wurde Methylenblau infundiert, die Tiere dann entweder durch das Narkoticum selbst oder durch Verbluten getötet. Bei Kaninchen und Katzen zeigten sich sehr sinnfällige Unterschiede gegenüber den Kontrolltieren, weniger deutlich bei Hunden. Das folgende Experiment gibt ein typisches Beispiel:

Eine Katze von 2200 g wurde tracheotomiert und mit einem Meyerschen Atnungsapparat verbunden unter Einschaltung einer Ätherflasche. Nach tiefer Ätherisierung wurde die Carotis mit dem Hg-Manometer verbunden: Blutdruck 100 mm. Später sank der Blutdruck auf ca. 70 mm und die größeren Pulsschwankungen ließen auf eine Erschlaffung der Gefäße

schließen. Nach bereits 45 Minuten lang unterhaltener tiefer Narkose wurde, ohne sie zu unterbrechen, 0,5%ige Methylenblaulösung, 1 ccm in 1 Minute, injiziert: nachdem 15 ccm eingelaufen waren, starb das Tier plötzlich unter Herzlähmung. Die Kontrollkatze wog 2100 g und wurde durch Stich ins Herz getötet: beide Tiere wurden gleich nach dem Tode geöffnet. Die folgende Übersicht gibt die Hauptresultate:

Normale Katze.

Leber: normal braun, reichliche grüne, methylenblauhaltige Galle.

Pankreas: deutlich blau, an der Luft sich tiefer färbend.

Nierenrinde: grünlich blau.
Mark: tiefblau an der Luft: wenig grüner Urin.

Nebennieren: Rinde wird allmählich schwach blau, Mark auch ein wenig.

Gehirn: sehr geringe Spuren von Blau, auch beim Liegen an der Luft.

Ätherkatze.

Leber: deutlich grün, sehr spärliche hellgelbe Galle: Gallensekretion anscheinend gehemmt.

Pankreas: bleich grünlich, an der Luft nachdunkelnd.

Nierenrinde: dunkler als beim Kontrolltier, viel grünblauer Urin.

Nebennieren: Rinde wird allmählich blau, Mark tiefblau.

Gehirn: deutliche Bläuung der Rinde, des Kleinhirns etc., rasch an der Luft eintretend.

Obwohl in diesem Versuch wegen des plötzlichen Todes weniger Methylenblau injiziert worden war, als in den meisten andern, so gibt er doch ein Bild der charakteristischen Merkmale, die sich in fast allen Ätherexperimenten zeigten: das Auffallendste davon ist das Fehlen des Methylenblaus in der Galle und die Anhäufung des Farbstoffs in der Leber, was an eine Hemmung der Gallensekretion denken läßt. Mit dieser Retention des Farbstoffes hängt es vielleicht zusammen, daß das Blutsrum — namentlich bei langanhaltender Narkose — mehr Blau enthält als das der Kontrolltiere, und daß infolgedessen auch andere Organe, wie Gehirn und Nebennieren, sich stärker tingieren. Doch ist es nicht ausgeschlossen, daß dabei noch andere Faktoren, wie abnorm geminderte Reduktions-

kraft der betreffenden Organe, mitwirken. Die regelmäßig schwächere Färbung des Pankreas bei dem narkotisierten Tier bleibt einstweilen ganz unerklärt.

Die wenig zahlreichen Versuche, die ich mit Chloroformnarkose gemacht habe, gaben im ganzen dieselben Resultate wie die mit Äther. Auch Chloralnarkose wirkt ähnlich: doch fand sich dabei nicht die für jene charakteristische, wie mir scheint, auch praktisch nicht unwichtige Veränderung der Leberfunktion.

Auch mit Sulfonal und mit Diäthylsulfon, einem in Wasser sehr leicht löslichen, kaum narkotisch wirkenden Sulfon, habe ich einige wenige Versuche angestellt, aus denen sich ergab, daß die vergiftete Leber meist erhebliche Mengen von Methyleneblau enthält, sowohl nach Sulfonal- wie nach Diäthylsulfonvergiftung: doch kamen auch Ausnahmen vor. Ich beabsichtige, die Sulfonvergiftung noch weiter zu verfolgen.

Vergiftung mit Blausäure.

Durch Gepperts ausgezeichnete Arbeit über den Gaswechsel im Organismus bei HCN-Vergiftung ist es sichergestellt, daß dabei die Gewebe die Fähigkeit verloren haben, aus dem Blut Sauerstoff aufzunehmen. Es schien mir von Interesse, diese Herabsetzung der Reduktionskraft der Gewebe auch mit der Methyleneblaumethode zu prüfen und direkt sichtbar zu machen.

Gerade in bezug auf diesen Punkt aber waren meine Resultate bei verschiedenen mit wechselnden Mengen HCN angestellten Vergiftungen so schwankend, daß sie zu bestimmten Schlüssen nicht berechtigen konnten. Dagegen kam eine Erscheinung ganz konstant in fünf Doppelversuchen zur Beobachtung, nämlich, daß das vergiftete Gehirn allemal sich viel weniger blau an der Luft färbte, wie das unvergiftete, und daß auch aus dem vergifteten Hirn mit verdünntem salzsäurehaltigen Alkohol viel weniger Farbstoff sich extrahieren ließ als aus dem normalen. Dies merkwürdige Resultat, das im Gegensatz zu den Ergebnissen bei der Äthernarkose steht, bin ich geneigt, auf eine verminderte Bindungsfähigkeit der Cerebralzellen für

das Methylenblau zurückzuführen: da das Blut der tief mit HCN vergifteten Tiere gewöhnlich mehr Methylenblau enthält, als das der unvergifteten Kontrolltiere, so erscheint die Unfähigkeit des Gehirns, Methylenblau aufzunehmen, noch bemerkenswerter. Eine genügende Erklärung kann dafür noch nicht gegeben werden; möglicherweise handelt es sich um einen analogen Prozeß, wie die Hemmung der Sauerstoffaufnahme. Jedenfalls scheint mir die Tatsache darauf hinzudeuten, daß bei der Blausäurevergiftung das Zentralnervensystem tiefer geschädigt wird als andere Teile des Organismus.

Vergiftung mit Leuchtgas.

Bei den mit Leuchtgas vergifteten Kaninchen wurde bemerkt, daß die Galle gelblich war und wenig Methylenblau oder Leukobase enthielt, gerade so wie bei langdauernder Äthernarkose. Die interessanteste Erscheinung aber boten die willkürlichen Muskeln, namentlich die Hals- und Brustmuskeln. Es ist schon erwähnt worden, daß, wenn einem Kaninchen von mittlerem Gewicht 25—30 ccm einer 0,33%igen Methylenblaulösung eingegossen werden, die Pektoralmuskeln eine blaue Farbe annehmen. Atmet das Tier jetzt Leuchtgas ein, so blaßt der grünblaue Ton der Muskeln bald ab und in wenigen Minuten erhalten die Muskeln ihre normale rötliche Farbe zurück. Wird jetzt kein Leuchtgas mehr zugeführt, so färben sie sich allmählich wieder grünblau, wie vorher: die erneute Zufuhr von Leuchtgas läßt nun wiederum die normale rote Farbe hervortreten und dieses Spiel des Farbenwechsels im Muskel kann so wiederholt hervorgerufen werden. Ebenso wie an den Brustmuskeln kann derselbe Wechsel auch im linken Ventrikel, wenn auch weniger deutlich, beobachtet werden, und auch die Leber zeigt den Farbumschlag, aber weniger ausgesprochen als die Muskeln.

Die Versuche lehren, daß eine auch nur mäßige und keineswegs tödliche Verminderung des Sauerstoffgehalts im Blut die genannten Organe augenblicklich zwingt, ihr intensives Sauerstoffbedürfnis durch Reduktion des Methylenblaus zu decken;

es ist offenbar derselbe Vorgang, den Ehrlich bereits bei Blut-sperre oder als postmortale Reduktion der Gewebe in seinen Versuchen mit Indophenol beschrieben hat, der sich aber unter Anwendung der CO-Vergiftung in besonders auffälliger Weise beobachten läßt.

Die Wirkung des Adrenalins.

Um zu bestimmen, wie die Verteilung des Methylenblaus durch Änderungen des Blutkreislaufs beeinflußt wird, machte ich einige Beobachtungen an Kaninchen, denen ich eine Adrenalinlösung 1 : 100000 kontinuierlich in eine Jugularvene einfließen ließ, und zwar so, daß der Blutdruck auf einer Höhe von etwa 30 mm Hg über dem normalen Anfangsdruck gehalten wurde. Gleichzeitig mit der Adrenalininfusion floß in die andere Jugularvene eine Methylenblaulösung. Bemerkenswert bei diesen Versuchen war es, daß die Nieren entweder gar nicht gefärbt waren oder doch nur sehr kleine Mengen Methylenblau enthielten. Dieser Erfolg ist nicht überraschend im Hinblick auf die bekannte Wirkung des Adrenalins auf die Nierengefäße: merkwürdig aber ist es, daß die Nebennieren Methylenblau in erheblich größerer Menge aufwiesen als die der Kontrolltiere. Diese Tatsache stimmt mit der Beobachtung überein, die mir auch in andern Versuchen auffiel, daß die Nebennieren meistens tief gefärbt gefunden werden, wenn die Nieren nicht Urin ausgeschieden haben und selber nur leicht gefärbt sind, und umgekehrt ganz farblos erscheinen, wenn die Nieren tief blau sind und gut sezerniert haben.

Das Gehirn wurde bei den Adrenalintieren blauer gefunden, als man nach der Menge des eingeführten Farbstoffs hätte vermuten sollen: es ist nicht unwahrscheinlich, daß als Folge der arteriellen Konstriktion in den übrigen Gefäßgebieten des großen Kreislaufs die intensivere Durchblutung des Gehirns ihm relativ viel Farbstoff und außerdem eine so reichliche Sauerstoffzufuhr brachte, daß die sonst starke Reduktion des Methylenblaus aufgehoben oder sehr vermindert wurde; das wären also gerade die umgekehrten Verhältnisse, wie bei den Nieren.

Die Wirkung der Temperaturerniedrigung.

Die Wirkung der Abkühlung auf die reduzierende Kraft der Gewebe ist sehr augenfällig: wenn ein Kaninchen mit einem Kaltwasserumschlag abgekühlt wird, so daß die Rektaltemperatur $30-32^{\circ}$ C. beträgt, und dann eine Infusion von 50 ccm der 0.33° igeu Methyleneblaulösung erhält, so erscheinen seine Organe von denen eines auf normaler Temperatur gehaltenen Kontrolltieres verschieden, und zwar treten die Unterschiede am stärksten hervor, wenn nach beendeter Infusion beide Tiere noch längere Zeit — 1—2 Stunden — unter Bewahrung ihres Temperaturunterschiedes am Leben gelassen werden: bei dem Kontrolltier findet man dann Herz und Lungen von völlig normalem Aussehen, die Muskeln ebenso oder ganz leicht gefärbt, die Leber etwas dunkel, die Nieren leicht gebläut und die Hirnrinde ebenso oder ganz ungefärbt: bei dem abgekühlten Tier dagegen sind Herz und Muskeln deutlich blau, die Nieren tiefblau und ebenso das Gehirn. Später tritt im Gehirn und den Muskeln Entfärbung, postmortale Reduktion ein.

Der Versuch zeigt sinnfällig, wie der Chemismus der Gewebe von ihrer Temperatur abhängig ist, und zwar besonders stark in den Muskeln und im Gehirn, während dagegen Lunge und Nebennieren keine sehr wesentliche Beeinträchtigung erleiden, wenigstens soweit es sich aus dem Verhalten dieser Organe zum Methyleneblau erschließen läßt.