

# Über eine neue Reaktion der Fette (Chromchrysoidinreaktion). Über die Fettkörper des Hautgewebes im allgemeinen.<sup>1)</sup>

Von

Dr. **Leonardo Martinotti**, Assistent und Privatdozent.

Mit einer Tafel.

(Aus der dermatologischen Klinik der Kgl. Universität Modena.

Vorstand: Prof. P. Colombini.)

(Der Redaktion zugegangen am 6. Mai 1914.)

Bei der Untersuchung des normalen menschlichen Hautgewebes in morphologischer und biochemischer Hinsicht gelang es mir, eine spezielle Reaktion festzustellen, welche in einem mehr oder weniger zeitweiligen Unlöslichwerden der in der Haut befindlichen Fette besteht.<sup>2)</sup>

Diese Reaktion gründet sich auf folgendes von mir aufgestellte Prinzip:

«Es gibt eine Reihe von Farbstoffen, die außer einer natürlichen Affinität für die Fette des Unterhautgewebes auch noch die Fähigkeit besitzen, dieselben zeitweilig unlöslich zu machen, wenn mit ihrer Einwirkung noch diejenige eines oxydierenden Agens, wie der Chromsäure oder eines Bichromates verknüpft ist. Die dadurch bewirkte Unlöslichkeit der Fette geht soweit, daß man die Schnitte (hergestellt am Gefriermikrotom aus in Formol fixierten und hernach der Reaktion unterworfenen Gewebstücken) in Lösungsmittel für Fette

<sup>1)</sup> Eine vorläufige Mitteilung dieser Abhandlung erfolgte am 16. Januar 1914 in der Medizinischen Gesellschaft zu Modena.

<sup>2)</sup> Wie ich schon in einer anderen Arbeit bemerkt habe, erfolgt auch bei Anwendung des Chromhämatoxylinlackes (wenn man das Kaliumbichromat durch das entsprechende Lithiumsalz, weniger gut durch das Mg- oder NH<sub>4</sub>-Salz ersetzt) ein Unlöslichwerden der Fette des Unterhautzellgewebes.

(wie Benzol, Xylol usw.) einbringen und in Kanadabalsam einschließen kann, ohne daß die Fette selbst in Lösung gehen würden. Die Reaktion bleibt durch verschieden lange Zeit bestehen, je nach der Natur der fixierten Fette; so bleiben einige Fette nach dieser Behandlung ständig unlöslich (wie Eleidin und seine Derivate), andere aber nur für eine verschieden lange, von 1—15 Tagen wechselnde Zeit (z. B. die Fette des Gewebes der Unterhaut).

Die Technik ist außerordentlich einfach:

Die am Gefriermikrotom, aus in Formol fixierten Stücken, hergestellten Hautschnitte werden in destilliertem Wasser gewaschen und dann für 5—10 Minuten bis zu mehreren Stunden in die wässrige Farbstofflösung eingebracht; hierauf wäscht man sie kurz mit destilliertem Wasser, bringt sie für eine Minute (nicht länger!) in eine 10%ige Kaliumbichromatlösung, unterwirft sie einer neuerlichen kurzen Waschung und gibt sie der Reihe nach in absolutem Alkohol, Benzol, Xylol und schließlich neutralem Balsam. Die Fette der Unterhaut werden dadurch zeitweilig unlöslich gemacht.

Diese erwähnte Eigenschaft ist den Aminoazoverbindungen eigentümlich; wahrscheinlich ist sie auf das Aminobenzol und Azobenzol zurückzuführen; sie ist von Verbindung zu Verbindung großen Schwankungen unterworfen.

In der nebenstehenden Tabelle ist das Intensitätsausmaß, mit der die Reaktion bei den verschiedenen Substanzen erfolgt, angegeben: diese Tabelle, welche vollständiger ist, als eine analoge, welche ich bezüglich des Salvarsans<sup>1)</sup> angegeben habe, könnte den Anschein erwecken, daß sie mit letzterer nicht in allen Punkten übereinstimmt; in Wirklichkeit ist der Widerspruch nur scheinbar und übrigens muß ich hinzufügen, daß man mit Proben verschiedener Fabrikate nicht immer gleichartige Ergebnisse erzielte. Folgende Tabelle enthält bloß die Hauptdaten.

<sup>1)</sup> Roma, XV. Riun. della Società Dermatologica Italiana, 19 dicembre 1913.

Substanz	Reaktion	Substanz	Reaktion
Amidobenzol . . . . .	—	Amidoazotoluol . . . . .	+
Amidotoluol . . . . .	—	Diamidoazobenzol . . . . .	+++
Azobenzol . . . . .	—	Triamidoazobenzol <sup>2)</sup> . . . . .	+
Azotoluol . . . . .	—	Diazoamidobenzol <sup>3)</sup> . . . . .	+
Diamidobenzol . . . . .	+	Dimethylamidazobenzol <sup>4)</sup> . . . . .	+
Diazobenzol . . . . .	—	Phenylaminoazobenzol . . . . .	+
Oxyazobenzol . . . . .	—	Acetylamidoazobenzol . . . . .	+
Dioxyazobenzol <sup>1)</sup> . . . . .	—	Safranin-azo- $\beta$ -naphthol- chlorid <sup>5)</sup> (Indoinblau) . . . . .	+
Amidoazobenzol . . . . .	++		

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß die für die erwähnte Reaktion wichtigsten Körper das Diaminobenzol und das Amidoazobenzol sind; die Intensität der Reaktion erfährt beim Diazoaminobenzol keine Steigerung, während sie beim Diaminoazobenzol zunimmt; das Triaminoazobenzol gibt die Reaktion nur vorübergehend und in sehr geringem Maße. Es sei hinzugefügt, daß bloß das Orthodiamidobenzol die Reaktion gibt; bei der Meta- oder Paraverbindung ist nichts oder fast nichts von ihr zu bemerken; das Chlorid der entsprechenden Verbindung gibt immer eine stärkere Reaktion als die bloße Base (wahrscheinlich zufolge seiner größeren Löslichkeit). Die Mono- und Disulfoderivate sind für diese Zwecke fast völlig unbrauchbar; desgleichen auch die höheren Abkömmlinge des Aminoazobenzols, wie Sudan III, Brillanterocean, Croceinscharlach 3 B, Ponceau 5 R, Biebricher Scharlach, usw.

Die entsprechenden im Handel erhältlichen Aminoazotoluolderivate verhalten sich analog wie die homologen Benzolverbindungen; aber die Intensität, mit der sie die Reaktion geben, ist immer ungleich geringer und oft inkonstant.

<sup>1)</sup> Mit einem von Grüber stammenden Präparate erhielt ich positive, aber inkonstante Ergebnisse.

<sup>2)</sup> Einige Male war die Reaktion vollständig negativ.

<sup>3)</sup> Das Zeichen + bedeutet: Reaktion ist zweifelhaft.

<sup>4)</sup> Friediger (Münch. M. W., 1912, S. 2865) hat derartige Substanzen zur Färbung der Fette in Faeces und Darminhalt verwendet.

<sup>5)</sup> Es ist notwendig, zuerst das Bichromat einwirken zu lassen.

Wenn man zuerst ein Amidoazobenzol (namentlich das Chlorid des Diaminoazobenzols) und ein Aminoazotoluol (z. B. Spritgelb) einwirken läßt, werden die rotgefärbten Schnitte farblos; taucht man sie nun in Chromsäure ein, so werden sie braun, aber die Fette lösen sich fast alle; geht man aber in umgekehrter Reihenfolge vor, behandelt man also die Schnitte zuerst mit Spritgelb und dann mit Chrysoidin, so erhält man die gewöhnliche Fixierung ohne besondere Vorteile.

Daraus läßt sich theoretisch ableiten, daß die für diese Zwecke am besten verwendbare Verbindung das Chlorid des Phenylazo-*o*-phenylendiamins ist; diese Verbindung stand mir aber nicht zur Verfügung und ich weiß nicht, ob sie überhaupt schon dargestellt wurde; das homologe Metaderivat (Chlorid des Phenylazo-*m*-Phenylendiamins oder *m*-Diamidoazobenzols) gibt vorzügliche Resultate und stellt ohne Zweifel eine für die erwähnten Zwecke ausgezeichnet verwendbare Substanz vor. Wegen der beiden Hauptreagentien kann man die Reaktion als «Chromchrysoidin-Reaktion» bezeichnen.

Ein anderer Farbstoff, der gleichfalls diese Reaktion liefert, ist das Indoinblau (Chlorid des Safraninazo- $\beta$ -naphthol): hier muß jedoch die Einwirkung des Bichromats vorangehen; die dem Indoin analogen Azosafranine, wie das Diazingrün (Janusgrün), das Janusblau und Janusrot führen nicht oder nur in unvollständiger Weise zum Unlöslichwerden der Fette.<sup>1)</sup> Das Salvarsan gibt ebenfalls diese Reaktion.<sup>2)</sup>

Untersuchen wir einen Schnitt, an dem die Chromchrysoidinreaktion ausgeführt wurde in destilliertem Wasser, so sehen wir, daß die Fette, das Eleidin und das Myelin der Nerven goldgelb gefärbt sind. Die Fette des Unterhautgewebes zeigen mitunter sehr zahlreiche, eingeschlossene Luftbläschen. Die Kerne, namentlich jene der drüsigen Organe, zeigen eine strohgelbe Färbung, während sie bei jenen der Epidermis kaum angedeutet ist oder fehlt.

<sup>1)</sup> Tatsächlich gehören alle diese Körper zu den Aminoazoverbindungen, da sie als Azoderivate der Disazoammoniumbase betrachtet werden. (Nietzky, Chemie der organischen Farbstoffe, 1906, V. Aufl., S. 49.)

<sup>2)</sup> Martinotti, XV. Riunione della società dermatologica Italiana. Roma, 19 dicembre 1913.

In Nachbarschaft der Kerne und zwar namentlich jener der Drüsenepithelien und des Corpus mucosum in geringerem Maße jener der Hornschicht oder gar des Bindegewebes finden sich zahllose bald mehr bald weniger aneinander gelagerte, bald mehr isolierte kleinste Tröpfchen von ziegelroter Farbe. Einige von ihnen wandeln sich später in Körnchen von Keratohyalin um.

Oftmals kann man beobachten, daß diese Tröpfchen sich in den zwischen den Zellen des Stratum Malpighii gelegenen Zwischenräumen lokalisieren. Sie reihen sich kettenförmig aneinander, so daß sie im Mikroskope ähnlich aussehen wie Membranen. Diese Membran tritt um so deutlicher hervor, je mehr die Färbung zunimmt, bis sie endlich intensiv braunschwarz gefärbt in der Hornschicht erscheint.

Die Nagelplatte, sowie die jüngeren Teile der Haare geben die Reaktion in sehr intensiver und stabiler Weise; dies bestätigt meine schon in früheren Arbeiten ausgesprochene Ansicht, daß sich diese beiden Bildungen unmittelbar vom Eleidin ableiten und reichlich Fett enthalten.

Untersucht man (nach Waschen in Alkohol und Benzol) die Schnitte in Kanadabalsam, so geht die Reaktion in den Kernen, welche mit irgend einem basischen Farbstoff gefärbt sind, verloren; sie bleibt aber in fast allen anderen Teilen bestehen und scheint oftmals noch ausgeprägter zu sein; die Erscheinung der Unlöslichkeit der Fette ist sehr klar zu beobachten.

In Anbetracht der Wichtigkeit dieser Reaktion erachte ich es als zweckmäßig, sie im einzelnen näher zu behandeln.

Was das Chrysoidin anlangt, so benötigt man eine gewöhnliche 1%ige, nicht zu alte wässrige Lösung, die man mindestens 5—10 Minuten auf die Schnitte einwirken läßt; man kann aber auch ohne Nachteil 12—24 Stunden färben.

Mit der Chrysoidinfärbung kann auch die Färbung mit Safranin<sup>1)</sup> verknüpft werden; als Oxydationsmittel kann man

<sup>1)</sup> Eine 1%ige wässrige Lösung von Toluosafraninchlorid und eine 1%ige wässrige Lösung von Diamidoazobenzol werden im Momente des Gebrauchs gemischt. (Es bildet sich ein Scharlach.)

10%ige wässrige Chromsäure verwenden: das Fett der Fettzellen erscheint dann gelb gefärbt mit roten Tropfen, die in der Fettmasse eingebettet liegen.

Bei Einwirkung des Bichromates ist besonders zu beachten:

a) Verwendet man Kaliumbichromat in zu großer Verdünnung (1—2%), so werden die Fette und zwar namentlich die Fette der Unterhaut fast gar nicht fixiert; beträgt die Konzentration ca. 5%, so ist die Fixierung eine teilweise.

b) Ist die Lösung 10%ig, so erfolgt vollständige Fixierung; die Dauer der Einwirkung darf aber nur kurz sein; läßt man die 10%ige Bichromatlösung länger einwirken, so geht die Unlöslichkeit der neutralen Fette wieder vollständig verloren; hingegen scheint die Fixierung der epithelialen Tröpfchen besser zu sein.

c) Daraus ergibt sich, daß bei Einwirkung einer 1%igen Chrysoidinlösung in der Dauer von einigen Minuten bis zu mehreren Stunden, die optimale Dauer der Einwirkung einer konzentrierten Kaliumbichromatlösung 1—2 Minuten (auf keinen Fall mehr als 2 Minuten) beträgt. Verwendet man wässrige Chromsäure zu 10% bei einer Einwirkungsdauer von 1 Minute, so ist die Reaktion noch intensiver.

An Stelle der wässrigen 10%igen Chromsäurelösung kann man auch eine alkoholische Lösung verwenden. Diese wird im Momente des Gebrauches hergestellt (10%ige wässrige Chromsäurelösung und 95%iger Alkohol); die Fixation der Fette des Unterhautgewebes ist sehr vollkommen, vollständig und gleichförmig.

Läßt man Chrysoidin und Chromsäure bzw. Kaliumbichromat gleichzeitig einwirken, so erfolgt nur eine teilweise oder gar keine Fixierung.

Verwendet man Perchromsäure, die man sich immer im Augenblicke des Gebrauchs herstellt, indem man wässrige 10%ige Chromsäure und das im Handel erhältliche Wasserstoff-superoxyd zu gleichen Teilen mischt,<sup>1)</sup> so erfolgt eine sehr schöne Fixation der epidermalen Membranen. Verwendet man

<sup>1)</sup> Hollemann, *Chimica inorganica*, Milano 1914, S. 405.

die verschiedenen Salze der Chromsäure, so beobachtet man verschiedene sehr interessante, die einzelnen Zell- und Gewebsbestandteile (Kerne, Membranen, Eleidin, Fette usw.) betreffende Fixierungen.

Die Chromate geben nur teilweise und vorübergehende Fixierungen; bezüglich der Bichromate ist zu bemerken:

Für die Kerne eignet sich am besten das Bichromat des Kupfers; in zweiter Linie kommen dafür das Calcium- und Baryumsalz in Betracht.<sup>1)</sup>

Zur Fixierung der Tröpfchen im epithelialen Gewebe der Epidermis und der zugehörigen Teile eignet sich besonders das Ammoniumbichromat, sowie in zweiter Stelle die Lithium- und Zinkverbindung.

Für die cellulären Fette verwendet man am besten Chromsäure in wässriger oder alkoholischer Lösung, dann kommt in zweiter Linie Kaliumbichromat und schließlich Natrium- und Zinkbichromat.

Für das Myelin der Nerven eignet sich sehr gut Ammoniumbichromat.

Zur Fixierung des Eleidins leisten zahlreiche Salze ausgezeichnete Dienste; außer der Chromsäure, die am besten ist, können die Bichromate des Ammoniums, Calciums, Magnesiums, Kalium, Kupfer, sowie Chromalaun mit gutem Erfolg verwendet werden.

Für die Membranen der Epidermiszellen kommt in erster Linie Perchromsäure in Betracht; sehr empfehlenswert sind Lithium- und Magnesiumbichromat; am besten lassen sich die Membranen der Hornschicht nachweisen, die schon mit Chromsäure deutlich zu sehen sind, dann kommen jene des Stratum lucidum, des Stratum granulosum und des Stratum mucosum. Bei der Demonstration der Membranen des Stratum mucosum kommt noch ein zweiter Faktor hinzu; die Deshydratation und Wirkung der Fettlösungsmittel (namentlich des Benzols), worauf noch näher eingegangen werden soll.

---

<sup>1)</sup> Die Analogie zwischen der Wirkung dieser Bichromate und jener von Burchardt bei der Fixation von Geweben beobachteten wird niemandem entgehen. (S. Enzykl. d. mikr. Techn. Artikel: chromsaure Salze.)

Ein besonderes Interesse hat der Chromalaun, der gleichfalls in 10%iger Lösung zur Anwendung kommt. Läßt man denselben 1–2 Minuten einwirken, so fixiert er die Fette mit der Besonderheit, daß er dieselben in Form von Tropfen verschiedener Größe unlöslich macht; immerhin ist die Größe der Tropfen so weit gleichförmig, daß die Fettzelle ein maulbeerartiges Aussehen gewinnt; das Chromacetat (Merck, 20 Bé, verdünnt mit dem gleichen Volumen Wasser) gibt eine wässrige Fixierung des Eleidins.

Ausgehend von dem Gedanken, daß diese Wirkung der Chromsäure und ihrer Salze bloß auf ihren oxydierenden Eigenschaften beruhen könnte, untersuchte ich andere Körper, welche oxydierend wirkten.

Um nicht die gewöhnlichsten derselben aufzuzählen, möchte ich darauf hinweisen, daß die Vanadiumsalze, und zwar namentlich das Chlorat, eine sehr schöne Fixierung des Eleidins bewirken, während alles Übrige nur wenig oder gar nicht fixiert wird. Eisenchlorid fixiert nur das Eleidin.

Das Kaliumpermanganat (in sehr schwacher, frisch hergestellter Lösung) gibt eine partielle Fixierung, die zunimmt und durch leichtes Ansäuern der Permanganatlösung mit Schwefelsäure vollständig gemacht werden kann.

Bei dem käuflichen Wasserstoffsperoxyd (verdünnt mit destilliertem Wasser [1:4–8]) erscheint die Fixierung der neutralen Fette kaum angedeutet oder fehlt überhaupt. Hingegen läßt sich eine Fixierung der epithelialen Granuli erzielen, die aber nur schwach ausgeprägt ist.

Fügt man den oxydierenden Körpern nur Chrysoidinlösung hinzu, so kann man eine Fixierung der Fette bewirken, die aber immer nur teilweise und sehr unvollständig ist.

Reduzierende Substanzen bewirken keinerlei Fixierung.

Legt man die Schnitte, ehe die Reaktion ausgeführt wird, für einige Minuten in Alkohol von 80%, so erfolgt nur mehr eine teilweise Fixierung der Fette, deren Ausdehnung von der Dauer des Aufenthaltes im Alkohol abhängt; die Fixierung erfolgt dann in der Peripherie der endocellulären Fettmasse; das Eleidin nimmt hingegen eine sehr lebhaft braune Farbe an,

und die Membrane in der Höhe des Stratum granulosum, welche aus einer Reihe kleiner, rötlich-braun gefärbter und rosenkranzartig angeordneter Tropfen besteht, tritt deutlich hervor. Eine derartige Membrane erscheint auch schon im Corpus mucosum und in der Basalschicht; ihr Auftreten ist aber nicht konstant, was vielleicht entweder auf technischen Unzulänglichkeiten oder auf einem früheren oder späteren Erscheinen der Membrane selbst beruhen dürfte. Die in der Umgebung des Stratum corneum liegenden Zellen sind braungelb gefärbt.

Gibt man die Schnitte nach dem Verweilen in Alkohol in ein Lösungsmittel für Fette, wie z. B. Benzol, so treten die Membranen des Stratum granulosum, Str. lucidum und Str. corneum deutlich hervor. Auch in den Zellen des Str. corneum erscheint die Membran in intensiver, rötlich-brauner Farbe. Natürlich lösen sich alle Fette des Unterhautgewebes, sowie auch einige Tröpfchen, die man in den Epithelien beobachten kann.<sup>1)</sup> Verwendet man nach dem Durchgang durch Alkohol und Benzol Lithiumbichromat, so treten die keratohyalinogenen Tropfen deutlichst hervor.

Glycerin löst rasch einen großen Teil der Fette des Unterhautgewebes, läßt aber das Eleidin und Myelin unberührt. Aceton wirkt in der gleichen Weise, nur viel intensiver; die Fette des Unterhautgewebes lösen sich fast gänzlich, häufig aber bleibt eine Substanz von schwammigem Aussehen, eine Art von Stroma oder Gerüst, von hellgelber Farbe zurück.

Die in Paraffin eingeschlossenen, dann mittels Benzol entparaffinierten und behandelten Stücke (die nicht ans Glas angeklebt werden) geben die Reaktion für die Membranen des Str. corneum (die mitunter sehr schön zu sehen sind), des Str. lucidum und des Eleidins.

Behandlung mit Alkoholäther macht die protoplasmatischen Tropfen deutlicher.

Wenn die Fixierung der Fette des Unterhautgewebes

---

<sup>1)</sup> Ich möchte daran erinnern, daß die Elemente des Str. lucidum (auch in den von mir bezeichneten Färbungsverfahren) auf einfachen Gefrierschnitten, besser nach Einchließen oder Auswaschen in Alkohol eventuell auch Benzol zu sehen sind. (Martinotti, l. c.)

nur teilweise ist, so erfolgt sie an der Peripherie der Zelle in Form eines Ringes oder Halbmondes von geringerer oder größerer Ausdehnung. Die Periode des Lösens beginnt gleichzeitig in der ganzen Fettmasse oder aber setzt im Centrum ein und setzt sich gegen die Peripherie hin fort; zuletzt wird die Membran aufgelöst, welche sich auch am stärksten färbt.

Während des Lösungsvorganges kann die Fettmasse ein krümeliges oder körniges Aussehen annehmen, oder es kann zur Ausbildung spiralig gewundener Stäbchen kommen, die an gewisse in der Cytologie wohlbekannte Bilder von Kernteilungsfiguren erinnern. Übrigens erfolgt die Fixierung bei allen Bichromaten nicht in der nämlichen Weise; bei einigen ist sie homogen, bei andern bekommt die Fettmasse ein feinkörniges Aussehen, bei diesen ist sie vollständig, bei jenen teilweise.

Wie dem nun auch sei, so ist die Fixation nicht dauernd, sondern verschwindet mit der Zeit, ob nun das Präparat in Wasser, Lävulose oder Kanadabalsam bezw. Damarlack eingeschlossen ist.

Am frühesten verschwinden die Reaktionen in den Kernen, dann lösen sich die Fette des Unterhautgewebes, das Myelin und die Membranen. Die kleinen, innerhalb der Epithelien befindlichen Tröpfchen widerstehen etwas länger.

Das Eleidin, Tricoeleidin und Onicoeleidin können für lange Zeit als beständig betrachtet werden, da sie einer Lösung monatelang Widerstand entgegensetzen.

Nicht alle Lösungsmittel bewirken mit gleicher Schnelligkeit eine Auflösung derart fixierter Fettkörper; Alkohol, Petroläther und Ligroin lösen am langsamsten; dann folgen Aceton, Schwefeläther, ätherische Öle wie Bergamotte-, Rosmarin-, Zimmt-, Dost-, Majoran-, Nelken- und Zedernholzöl, Methylsalicylsäure, Anilinöl; am Schluß stehen Tetrachlorkohlenstoff, Schwefelkohlenstoff, Benzol, Toluol, Xylol, Chloroform, Terpentinöl, Benzin, Glycerin.

Die Chromchrysoidinreaktion, deren Bedeutung ich wohl kaum zu betonen brauche, führt uns auf eine Reihe weiterer Probleme, so namentlich auf die Frage nach der Natur des Eleidins und der Membranen des Stratum corneum, Str.

lucidum und Malpighii, nach der Konstitution der Nägel und Haare (die gleichfalls, wie schon erwähnt, die Reaktion liefern), nach der Verteilung der Fette in der Haut und der Hornschicht im besonderen, sowie auf die Frage nach dem biochemischen Mechanismus des Verhornungsvorganges; alles Fragen, die ich teilweise in anderen Arbeiten eingehender behandeln werde. Hier sei mir nur gestattet, darauf hinzuweisen, daß auch andere schon bekannte Reaktionen, wie jene des Cuprohämatoxylin- und Chromhämatoxylinlackes, was das Eleidin und seine Derivate (Onicoeleidin, Tricoeleidin) anlangt, positiv sind und daß, nach Ersatz des Kaliumbichromats im Chromhämatoxylinlack durch Lithiumbichromat, auch die Fette des Unterhautgewebes unlöslich werden, wodurch also die Analogien zwischen den verschiedenen Fetten der Haut zunehmen. Der Schluß, daß die Chromchrysoidinreaktion ein neues, außerordentlich empfindliches Mittel ist, Substanzen fettartiger Natur, deren Nachweis mittels anderer Mittel bisher nicht möglich war, zu erkennen, erscheint mir daher umsomehr gerechtfertigt. Es würde nun die Frage zu erörtern sein, welche die fixierten Fette sind und ob alle diese reine Fette sind oder lipoidartige Verbindungen mit anderen Körpern, z. B. mit Proteinen vorstellen. Diese Frage ist sehr schwierig und ihre Klarstellung erfordert weitere Untersuchungen. Vergleicht man die bisher bekannten mikrochemischen Fettreaktionen, so ist es sehr wahrscheinlich, daß es sich um Fettsäuren oder neutrale Fette handelt (und die Natur der Fette des Unterhautgewebes steht wohl außer allem Zweifel); immerhin ist die Möglichkeit, daß man es in gewissen Fällen mit Verbindungen von Fetten und albuminartigen Körpern zu tun hat, gar nicht ausgeschlossen.

Ehe ich schließe, möchte ich darauf hinweisen, daß unter den Körpern, welche die in Rede stehende Reaktion ergeben, sich auch das Salvarsan<sup>1)</sup> befindet und daß fast alle diese Verbindungen auf Hautwunden eine die Epithelbildung anreizende Wirkung haben, die gleichen Schritt hält mit der Intensität, mit der sie die Chromchrysoidinreaktion ergeben.

---

<sup>1)</sup> Zeitschrift für Chemotherapie, Bd. II, S. 183.

## Schlußfolgerungen.

1. Es gibt eine den Aminoazoverbindungen angehörige Gruppe von Farbstoffen, welche die Eigenschaft hat, Fette zu fixieren und bei Gegenwart eines Oxydationsmittels unlöslich zu machen.

2. Das Prototyp dieser Körper ist das Chrysoidin (m-Diamidoazobenzolchlorhydrat). Die besten hierfür verwendbare Oxydationsmittel sind Chromsäure und die Bichromate; man kann daher diese Reaktion mit gutem Rechte als Chromchrysoidinreaktion bezeichnen.

3. Alle diese Substanzen haben auch eine bemerkenswerte epithelbildende Wirkung auf Hautwunden.

4. Mittels dieser Reaktion läßt sich die Anwesenheit von Fettkörpern in der menschlichen Epidermis, namentlich in den Membranen, im Keratohyalin, Eleidin und den Eleidinabkömmlingen der Nägel und Haare (Onicoeleidin und Tricoeleidin) nachweisen. Dadurch wird zugleich im Gegensatz zur bisherigen Auffassung die große Bedeutung, welche den Fetten im Verhornungsprozesse, namentlich der Hautanhänge zukommt, demonstriert.

5. Bis jetzt ist es nicht möglich gewesen, genau festzustellen, welches die Körper sind, die die Chromchrysoidinreaktion geben; es ist jedoch sehr wahrscheinlich, daß es sich vorwiegend um Fettsäuren, Neutralfette und Fetteiweißverbindungen (Lipoproteide) handeln dürfte.

## Zusammenfassung der Technik.

Die Chrom-Chrysoidinreaktion wird am besten in folgender Weise vorgenommen:

1. Sehr frische Hautstückchen (oder Teile anderer Organe) werden in 10% wässriger Formollösung fixiert.

2. Die am Gefriermikrotom gefertigten Schnitte wäscht man in destilliertem Wasser.

3. Die Färbung wird in einer einprozentigen, wässrigen Chrysoidinlösung (Diamidoazobenzolchlorid) 5—10 Minuten lang und auch länger vorgenommen.

4. Die Schnitte werden kurz gewaschen und hernach eine Minute lang in das oxydierende Agens, gewöhnlich Chromsäure oder Kaliumbichromat in 10% wässriger Lösung eingebracht; die Verwendung von Bichromat ist aber auf Grund der einzelnen Untersuchung (s. unten) vorzuziehen.

5. Nun wäscht man die Schnitte in Wasser und bringt sie

6. rasch der Reihe nach in absoluten Alkohol, Benzol,<sup>1)</sup> Xylol und schließt sie in neutralen Kanadabalsam von Grüber ein.

7. Die mikroskopische Untersuchung nehme man in Anbetracht der Instabilität der Fixierung einiger dieser Fette möglichst bald vor.

Hinsichtlich der Wahl des Oxydationsmittels sei an folgendes erinnert<sup>2)</sup>:

1. Für die Fette des Unterhautgewebes eignet sich besonders gut eine Mischung von gleichen Teilen Chromsäure in 10% wässriger Lösung und 95% Alkohols, die im Momente des Gebrauches hergestellt wird: sehr gut verwendbar sind die einfachen wässrigen Lösungen von Chromsäure und Kaliumbichromat, weniger gut die Bichromate von Zink und Natrium. Die so unlöslich gewordenen Fette sind von gelbbrauner Farbe und verbleiben höchstens ein oder zwei Wochen in diesem Zustande.

Verwendet man an Stelle der einfachen Chrysoidinlösung eine Mischung von Chrysoidin und Safranin T (zu gleichen Teilen in 1%iger Lösung) und oxydiert man mit wässriger Chromsäure, so beobachtet man, daß das Fett der Fettzellen dunkelgelb gefärbt ist und Tropfen von lebhaft roter Farbe in der Fettmasse eingelagert erscheinen.

Verwendet man als Oxydationsmittel Chromalaun zu 10%, so wird das Fett der einzelnen Zellen nicht mehr in

<sup>1)</sup> Das Benzol puriss. crystallis. von Merck ist auch in 90 bis 95%igem Alkohol löslich, weshalb man die Entwässerung der Schnitte begünstigt, wenn man es vor Xylol anwendet.

<sup>2)</sup> Alle Chromverbindungen wurden natürlich, wie Kaliumbichromat und Chromsäure, in der unter Punkt 4 angegebenen Weise verwendet, also in 10%iger wässriger Lösung, denn es ist zu beachten, daß die Oxydation intensiv, aber auch kurz sein muß (ca. 1 Minute).

homogener Weise fixiert, sondern in Form vieler Kügelchen, die dann der Fettmasse ein charakteristisches maulbeerartiges Aussehen verleihen.

2. Für die Fixierung des Myelins der Nerven der Haut eignet sich besonders Ammonium- und Lithiumbichromat, sowie auch alkoholische Chromsäure. Das Myelin wird dunkelgelb gefärbt; diese Fixierung bleibt einige Tage bestehen.

3. Für die im Innern epithelialer Gewebe zu beobachtenden Fetttröpfchen (im Malpighischen Körper, Haarfollikel, Drüsengewebe), inklusive die keratohyalinogenen Tropfen und das Keratohyalin eignen sich besonders Ammonium- und Lithiumbichromat; weniger gut ist Zinkbichromat. Die Reaktion erscheint noch deutlicher, wenn man die Schnitte für einige Augenblicke (15—30 Sekunden) in 95%igen Alkohol, dann in Alkoholäther und dann von neuem in 95%igen Alkohol bringt, hierauf mit destilliertem Wasser wäscht und nun die Reaktion ausführt.

Die in Frage stehenden Tropfen sind braun gefärbt und bleiben mehrere Tage bestehen.

4. Bei den Kernen erfolgt eine sehr intensive Reaktion bei Verwendung von Kupferbichromat; weniger bei Calcium- und Baryumbichromat. In einigen Fällen (nicht immer) scheint die Reaktion nach Behandlung der Schnitte mit Alkoholäther deutlicher zu werden. (Vgl. den vorhergehenden Punkt.) Sehr häufig unterbleibt bei Kernen diese Reaktion; es findet kein Unlöslichwerden statt.

5. Für die Membran der Epidermiszellen eignet sich vor allem Perchromsäure (die man im Gebrauchsmomente herstellt, indem man gleiche Teile von wässriger 10%iger Chromsäurelösung und käuflichem Wasserstoffsperoxyd mischt), Ammoniumperchromat und auch Lithium- und Ammoniumbichromat.

Oftmals läßt sich eine Intensitätssteigerung der Reaktion erzielen, wenn man die Schnitte für einige Momente (10—20 Sek.) in 95%igen Alkohol, dann in Benzol, dann wieder in 95%igen Alkohol, hierauf in destilliertes Wasser bringt und schließlich in der gewöhnlichen Weise erst mit Chrysoidin, dann mit



Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie. Band XCI, Tafel I.

Zu L. Martinotti, Über eine neue Reaktion der Fette etc.

Lithiumbichromat behandelt. Mit Hilfe des letzteren lassen sich besonders die epithelialen Fetttropfen gut zur Anschauung bringen.

Bei den Membranen der Hornschicht (falls sie die Reaktion geben) dauert die Fixierung am längsten an (bis zu einigen Wochen); jene des Stratum lucidum und granulosum bewahren die Reaktion nur einige Tage.

6. Das Eleidin und seine Derivate (Tricoeleidin, Onicoeleidin) sind in dieser Hinsicht am beständigsten (namentlich das Onicoeleidin), indem bei ihnen die Reaktion monatelang bewahrt bleibt. Fast alle Bichromate (von K,  $\text{NH}_4$ , Ca, Mg), wässrige und alkoholische Chromsäure, sowie Chromalaun, Chromnitrat geben die Reaktion, welche sehr intensiv und deutlich erfolgt, wobei das Eleidin und seine Derivate dunkel goldgelb gefärbt werden.

#### Tafelerklärung.

Mikrophotographie auf einer Lumière-Autochromplatte eines in Kanadabalsam eingeschlossenen Hautpräparates, an welchem die Chromchrysoidinreaktion durchgeführt wurde.

---