

Romanowsky Staining: On the Question of Priority

A.V. Bezrukov, EMCO Ltd. Moscow.

Below is a summary of the methodical part of the works by Ch. I. Chenzinsky and D.L. Romanowsky, which laid the foundation of the techniques for staining of biological substances by means of a mixture of azure B, methylene blue and eosin. It shows that the priority in polychrome stain preparation by means of a mixture of azure B, methylene blue and eosin belongs to D.L. Romanowsky. His works initiated application of "Romanowsky staining, which has been used for 120 years all over the world.

In 2010, it will be 120 years since appearance of the first publication [12] on research of blood smears stained so that the effect further named as "Romanowsky" was showed.

The end of the nineteenth century, when the article was issued, was a period of rapid development of morphological methods in medicine due to the following reasons:

1. Applied medicine requirements, in particular, after discovery of the malaria plasmodium by Laveran, when reliable diagnostics methods were required.
2. Beginning of mass production of advanced microscope models.
3. Beginning of industrial synthesis of the recently discovered aniline dyes.

Our (Russian) compatriots Cheslav Ivanovich Chenzinsky and Dmitry Leonidovich Romanowsky happened to have made a decisive contribution to development of the thin blood film staining techniques.

The priority of using a compound dye based on methylene blue and eosin for blood smears and blood parasites analysis belongs to Cheslav Ivanovich Chenzinsky, who was a medical officer and Odessa city hospital anatomist.

In 1888, he published an article [20], and in 1889 he obtained the Ph. D. degree with "To the doctrine on malaria microorganisms" [19] dissertation. In these works, among other issues, application of methylene blue in combination with eosin for thin blood films and blood parasites staining was described.

Ch. I. Chenzinsky first used consecutive double staining with saturated water solution of methylene blue dissolved with half-distilled water and with eosin spirit solution (0,5g eosin, 60g ethanol and 40g water). Subsequently, he used a mixture of equal volumes of these solutions, and staining came in 4-5 minutes. The result was bicolor staining: erythrocytes were dyed in pink, malarial plasmodia became blue and were clearly visible against erythrocytes. Also, leukocyte nuclei were stained in blue.

Then, a number of outstanding Russian scientists with the international popularity worked in Odessa, among them I.I. Mechnikov who demonstrated the staining to Laveran. The technique

became well-known. Upon publication of works by Cheslav Ivanovich Chenzinsky, a number of researchers successfully applied this method of thin blood films staining with minor alterations. However, bicolor staining did not allow the researchers to reveal specifics of the malaria plasmodium structure, in particular, the nucleus of it and the detailed characteristics of blood cell morphology did not come to light also. It put D.L.Romanowsky, a doctor and chief of the St. Petersburg Nikolayevsky Military Hospital eye department, on modernizing the technique (Chenzinsky's methodology was described and discussed in his dissertation [13]).

The choice of dyes was made on the basis of Ch.I. Chenzinsky 's works.

Here that Dmitry Leonidovich wrote, proving the ratio choice between dyes:

"Having used Ehrlich's theory, his "Farbenanalyse", and noticing that the nuclei of the majority of cells are being stained mainly with the basic and neutral dyes, we began to search a neutral combination between methylene blue and eosin.

A priori, it was already possible to expect a neutral dye in the mixture of the aforementioned solutions, as one of dyes is alkalinous and another one is acidulous.

To eliminate issues that may influence the solubility of mixed dyes and the mixture, we took water solutions only.

Based on the numerous experiences, we discovered that if we mixed the filtered water solutions of methylene blue and eosin, then, at some point of time and at surplus of the last, a sediment which is insoluble in the mixture dropped out, and the mixture got a violet shade.

Such fall-out, possibly, had occurred earlier, but the sediment had dissolved in excess quantities of methylene blue.

Looking for permanent volumes for certain solutions, we found that the sediment started to appear clearly in the mixture of one part of the concentrated methylene blue solution and two parts of 1% water solution of eosin soluble in water.

*In this case, the mixture has great staining ability, especially nuclei are well stained, and the dye does not lose the selective ability; but in addition to the dyes involved, a third dye appears in the mixture, which has a special color and the greatest affinity to nuclei – or more exactly, to their **chromatin**. "*

Here, Romanowsky points out the presence (or occurrence) of the third dye in the mixture (as we know now, the third dye is azure B – an oxidation product of methylene blue, and in combination with eosin it stains nuclear chromatin in purple [23]). Now it is obvious that "the third dye" initially contained in the old methylene blue solution.

Further, Romanowsky clarifies how solutions and mixtures were prepared: *"The beginning of falling-out of the sediment – the time of the greatest nucleus staining ability of the*

mixture – can be found out using the following simple and practical method, as dyes of different firms are not identical of what we were convinced by experiences.

We pour some methylene blue solution (2 cc) into a graduated cylinder (10 cc) and carefully add eosin solution to it.

At first, the mixture remains dark blue but when neutralization occurs (e.g., in our case when adding 4 cc of eosin), eosin ceases mixing up with methylene blue and remains over the mixture surface in the form of a transparent layer of eosin solution which small surplus, however, does not influence the coloring. The mixture of dyes thus obtained is carefully stirred with a glass stick, but is not filtered, similar to all Ehrlich's dyes, because they lose their selective coloring ability for some reason during filtration.

... Methylene blue starts coloring best of all when mould appears on the solution surface, seen as a white film on it. We always had a big bottle with the methylene blue solution saturated to sediments. As it decreases, we add water, shake it up and, after settling, filter for usage.

... Notice that the old methylene blue solution requires less eosin for saturation. So it is necessary to repeat testing for sediments once per two months, thus in 9 months 1 volume of methylene blue demanded us to have 2 but 1 S volume of eosin."

Thus, apparently, during long storage methylene blue in the solution was gradually oxidized with formation of azure B and other derivative substances that led to polychromatic coloring of smears. Unfortunately, Romanowsky points out that "*dyes from different firms are not identical, of what we were convinced by experiences*", but does not inform us which dyes from what firms were used. In the book by Romanowsky's contemporary professor M.N.Nikiforov [9], the following is outlined concerning his technique:

"Good luck of coloring depends on the composition of methylene blue used, and, according to Gautier, the most reliable method is to use methylene blue from Badisches Soda-Anilin Fabrik, C and BGN marks, as well as eosin therefrom, A mark."

Below is an abstract by Romanowsky about the obtained tints of staining of different elements of smear in the first work [13]:

"In my preparations I always get the following picture: red balls are stained in pink, eosinophil protoplasm – in rich pink, malaria parasites and lymphocyte protoplasm – in light-blue, blood plates and white ball nuclei – in dark-violet, parasitic nuclei – in purple-violet, leukocyte protoplasm – in light-violet, in which case it is possible to see transitive colors from light-blue lymphocyte protoplasm to violet leukocytes. "

Dmitry Leonidovich was the first to publish results containing a description of absolutely not obvious effect of polychrome staining of blood smear and malaria parasites by means of the two dyes combination. He expressed the assumption that it was connected with some third dye (as we know now, it is azure B). Moreover, he observed and used the eosin with methylene blue (and probably with azure B) reaction (sedimentation). Other results in his dissertation are also very important for medicine and biology: research on the structure of various forms of malaria plasmodium and research on influence of quinine on plasmodium. Many experts, for example, [6, 10], consider Dmitry Leonidovich Romanowsky to be the first scientist who proved the approach to treatment which now is called chemotherapy. In this area, he left Paul Ehrlich behind for some years.

Unfortunately, in a number of publications [24, 27, 28] since 1978 Romanowsky's priority in developing the methodology of polychrome staining of blood smears and blood parasites by means of the compound dye including methylene blue (old solution) and eosin is called into question. R.D. Lilli in [24] refers that Ernest Malahovsky's (a doctor from Silesia) short article [25] was published three weeks earlier than Romanowsky's work in German published on August, 24th (September, 5th) [26]. Thus, Romanowsky's publications [12, 13] in Russian are ignored because they are hardly accessible by western researchers. Meanwhile, even in the first sentence of the well-known Romanowsky's work in German (D. Romanowsky Zur Frage der Parasitologie und Therapie der Malaria. St. Petersburger Medicinische Wochenschrift № 34 297-302; № 35, 307-315), the following statement is made: "*Vorwort: Vorliegende Arbeit des Dr. D. Romanowsky ist zuerst im Juni d. J. als Dissertation erschienen.*" (The preface: The given work by dr. D. Romanowsky first appeared in this June as a dissertation.) In other words, for anyone who read this work it should be obvious that before the publication of the dissertation in German, the dissertation in Russian was published where results had been stated in a fuller manner. Eventually, in weekly journal VRACH, 1891, №21, p.522 (the end of May or the beginning of June issue), in section "Chronicle and small news", there was the following information: "Military-medical Academy Conference recognized Messrs. K.I. Zuev, D.L. Romanowsky, G.G. Skorichenko and V.G. Slunin as Doctors of Medicine".

Thus, the publication chronology of results of D.L. Romanowsky is as follows:

СЛ.ХХVII. Изъ лабораторіи клиническаго профессора М. И. Афанасьева при Николаевскомъ Военномъ Госпиталѣ.
Къ вопросу о строеніи чужеродныхъ маляріи.

(Предварительное сообщеніе.)
 Д. Л. Романовскаго.

Чужеродныя, вызывающія малярію, предполагались уже некими, но дѣйствительно описаны впервые *Laveran*'омъ. Послѣдующія наблюденія многихъ ученыхъ (*Richard, Marchiafava, Celli, Golgi, Grassi, Canalis, Guarnieri, Autolosci, Angelini, Sternberg, Councilman, Osler, Мечниковъ, Сахаровъ, Хемницкій, Тимова* и др.), произведенныя въ разныхъ мѣстахъ земнаго шара, несомнѣнно доказали постоянное присутствіе этого чужероднаго въ крови болотныхъ больныхъ и его роль въ производствѣ болотныхъ заболѣваній и ихъ послѣдствій; видѣть съ тѣмъ былъ прослѣженъ и кругъ развитія даннаго чужероднаго въ связи съ приступами лихорадки. Но до сихъ поръ разбираемому чужеродному нѣтъ еще прочнаго мѣста въ классификаціи, нѣтъ и опредѣленнаго имени. *Laveran* называлъ его *haematozoaire de paludisme*, итальянцы—*plasmidium malariae*, *W. Osler*—*haematomonas malariae*, *Мечниковъ*—*haematophyllum malariae*, а въ послѣднее время *Grassi* и *Feletti* выдѣлили два вида—*haematocoba* и *Laverania*.

Мнѣ кажется, что главная причина разногласій заключается въ недостаточномъ знаніи биологіи и морфологіи чужероднаго. Трудность изученія первой осложняется невозможностью до послѣдняго времени получить такую питательную среду, въ которой можно бы разводить чужеродное и наблюдать его при желательныхъ намъ условіяхъ. До сихъ поръ это чужеродное еще не найдено свободнымъ въ природѣ, не смотря на точныя изслѣдованія воды, почвы и воздуха въ болотныхъ мѣстностяхъ. Произведенныя проф. *Данилевскимъ* и *Шаламиновымъ* изслѣдованія животныхъ, особенно холоднокровныхъ и птицъ, живущихъ въ болотныхъ мѣстностяхъ, показали, что въ крови этихъ животныхъ попадаются чужеродныя, тождественныя съ встрѣчающимися въ крови болотныхъ больныхъ, но нѣрѣдко неоназывающія никакого замѣтнаго вреднаго вліянія на пріотншія ихъ органы¹⁾. Эта сравнительная паразитологія крови много помогаетъ изученію темнаго вопроса о биологіи чужероднаго маляріи.

Изученіе морфологіи чужеродныхъ, водящихся въ крови болотныхъ больныхъ, тоже представляетъ много затрудненій, которыя зависятъ отчасти отъ величины изслѣдуемаго объекта (нѣрѣдко меньше $\frac{1}{2}$ краснаго шарика), а отчасти и отъ другихъ свойствъ его.

Сначала видѣли въ немъ комочекъ плазмы (*plasmidium*), способный къ амѣбонднымъ движеніямъ безъ слѣдовъ дифференціровки. Такъ какъ послѣднія вообще въ живыхъ животныхъ клѣточкахъ трудно различаются, то, конечно, въ живомъ, да при томъ еще столь маломъ организмѣ, какъ болотное чужеродное, врядъ-ли возможно видѣть строеніе; по этому замеченіе *Celli* и *Guarnieri* о томъ, что они видѣли ядра въ живыхъ чужеродныхъ, можетъ возбуждать нѣкоторое сомнѣніе—тѣмъ болѣе, что другіе авторы, напр., *Сахаровъ*, говорятъ, что ядра не удается видѣть ни при какомъ увеличеніи. А между тѣмъ въ доказательствѣ присутствія ядра лежитъ рѣшеніе большей части темнаго вопроса о морфологіи чужероднаго, какъ это и полагаютъ столь компетентные изслѣдователи, какъ *Grassi* и *Feletti*. Новѣйшіе факты, а также и теоретическія соображенія заставляютъ признать за ядромъ огромное значеніе и въ морфологическомъ развитіи клѣточекъ, и въ ихъ физиологической дѣятельности (проф. *С. М. Лукьяновъ*); приходится считать его на столько существенно необходимою принадлежностью всякой клѣточки, что скорѣе можно допустить существованіе голого ядра, чѣмъ безъ-ядерной протоплазмы. *Sacharis* полагаетъ, что мы не видимъ иногда ядра,

¹⁾ Статія уважаемаго автора сдана мнѣ въ редакцію еще до появленія въ печати послѣдней статьи проф. *Данилевскаго* (см. выше, стр. 1063).
 Реда.

можетъ быть, только потому, что оно не реагируетъ на извѣстныя намъ теперь краски. Отсюда естественно является вопросъ, можно ли при теперешнемъ состояніи нашихъ знаній допустить существованіе моперь, т. е., безъ-ядерныхъ организмовъ, число которыхъ, благодаря изслѣдованіямъ современныхъ естествоиспытателей, постоянно уменьшается и къ которымъ приходится до послѣдняго времени относить и чужеродное болотныхъ больныхъ. Если мы съ большою вѣроятностью можемъ сказать, что нѣтъ жизнеспособной клѣточки безъ ядра, то естественно уже и въ болотномъ чужеродномъ неять ядро—тѣмъ болѣе, что оно доказано у большинства *protozoa* и даже у тождественныхъ, по *Данилевскому*, чужеродныхъ, водящихся въ крови птицъ, хотя *Шаламиновъ*, описывая сѣтконогъ, говоритъ, что «онъ представляетъ однороднымъ, гомогеннымъ; болѣе дифференцированной части, какъ, напр., ядра, пока не удавалось видѣть, не смотря на примѣненіе различныхъ красящихъ веществъ.»

Доказательство присутствія ядра, кромѣ научнаго, такъ сказать, теоретическаго значенія имѣетъ и практическое, діагностическое примѣненіе, ибо въ красныхъ шарикахъ могутъ получаться разнообразныя, снѣія фигуры при окраскѣ метиленовой снѣжкой и помимо маляріи, даже и въ здоровой крови, на что и указывали противники ученія о чужеродномъ маляріи и что видѣли также и защитники послѣдняго, напр., *Celli* и *Guarnieri*, которые дали даже и соответствующіе рисунки. Конечно, кто хорошо уже знакомъ съ болотнымъ чужероднымъ, тотъ такихъ смѣшеній не допуститъ, но въ практикѣ возможна и подобная ошибка; а потому отысканіе для болѣе точнаго отличительнаго распознаванія чужероднаго удобнаго и при томъ по возможности практическаго способа имѣетъ основаніе и съ этой точки зрѣнія.

Первую работу въ этомъ направленіи произвели *Celli* и *Guarnieri* въ прошломъ году, при чемъ они изслѣдовали кровь больныхъ 4-дневной лихорадкой. Еще въ 1884 г. *Marchiafava* и *Celli*, окрашивая чужеродныхъ на сухихъ препаратахъ крови метиленовой снѣжкой, различали въ нихъ 2 части: наружную, темную—энтоплазму, и внутреннюю, блѣдную—эндоплазму.

Golgi въ споруляціонныхъ формахъ, и при томъ только при 4-дневной лихорадкѣ, видѣлъ въ центрѣ комочка блестящее тѣльце, сильно окрашивавшееся, которое онъ призналъ за ядро. Въ прошломъ году *Celli* и *Guarnieri* послѣ тщетной попытки) вынести строеніе разбираемаго чужероднаго всѣми нынѣшними способами закрѣпленія и окраски примѣнили наконецъ способъ *Vigoso* окрасиванія живой крови, пользуясь для этого растворомъ (безгипертонно приготовленнымъ) метиленовой снѣжки въ сывороточной жидкости (брюшной водяни). Этимъ способомъ они получили (въ амѣбонной ступени чужероднаго) энтоплазму, въ которой и складается пигментъ, и меньшую по объему эндоплазму, слабо окрашивающуюся, всегда безпигментную и расположенную то въ центрѣ, то по периферіи чужероднаго; въ этой-то эндоплазмѣ и лежитъ окруженное снѣтлымъ ободкомъ ядро то съ слабо-окрашеною, то съ сильно окрашеною снѣжкой. Тоже дѣленіе на энто- и эндоплазму замѣчается и въ спорахъ (формы маргаритокъ), при чемъ въ эндоплазмѣ видна сильно окрашенная точка.

Сахаровъ, разбирая работу авторовъ, полагаетъ, что они были введены въ заблужденіе, ибо въ эндоплазмѣ «ни при какихъ увеличеніяхъ не удается замѣтить ядра, и все заставляетъ думать, что это просто—часть кровянаго шарика, захваченная сошедшимися и слиявшимися пѣйдоподіями плазмодіи.»

Не считая изслѣдованій тѣхъ же авторовъ доказательными, *Grassi* и *Feletti*, въ свою очередь, произвели изслѣдованія въ томъ-же направленіи и «послѣ многихъ колебаній пришли наконецъ къ желаемому рѣшенію.» Въ сущности они, снѣтлоскопическимъ способомъ *Celli* и *Guarnieri*, выискали и яенте доказали то, что видѣли ихъ предшественники. Кромѣ того, они прослѣдили ядро во время его дѣленія. По описанію авторовъ, пузырьковидное, большое, ясное ядро похоже на такое-

1. The first publication (the preliminary message on 3 pages) was in the VRACH journal at the end of 1890. [12]. This article contains a clear description of the obtained results and the specific staining of the involved elements, though it is not mentioned that the old methylene blue solution was used.

Серія диссерацій, допущенныхъ къ защитѣ въ ИМПЕРАТОРСКОЙ Военно-Медицин-
ской Академіи въ 1890—1891 академическомъ году.

№ 98.

КЪ ВОПРОСУ
О ПАРАЗИТОЛОГИИ И ТЕРАПИИ
БОЛОТНОЙ ЛИХОРАДКИ.

ДИССЕРТАЦІЯ

НА СТЕПЕНЬ ДОКТОРА МЕДИЦИНЫ

ЛЕКАРЯ

ДМИТРИЯ ЛЕОНИДОВИЧА РОМАНОВСКАГО.

Изъ Кабинета Клиническаго профессора М. И. Афанасьева при Петербург-
скомъ Николаевскомъ военномъ госпиталѣ.

Цензорами диссертации, по порученію Конференціи, были профессора:
Л. В. Поповъ, А. О. Баталинъ и приватъ-доцентъ, клиническій
профессоръ М. И. Афанасьевъ.

—*—

С.-ПЕТЕРБУРГЪ.

Типографія И. П. Скороходова (Надсудинская, 43).
1891.

2. The second publication (the fullest one) was the edition of the dissertation by D.L. Romanowsky: "TO THE QUESTION ON PARASITOLOGY AND THERAPY OF THE MARSH FEVER" in Russian [13], it was published not later than the first week of June 1891.

MEDICINISCHE WOCHENSCHRIFT

unter der Redaction von

Prof. Dr. Karl Dehio.

Dr. Johannes Krannhals.

Dorpat.

Riga.

Dr. Theodor von Schröder.

St. Petersburg.

Die «St. Petersburger Medicinische Wochenschrift» erscheint jeden Sonnabend. — Der Abonnementspreis ist in Russland 8 Rbl. für das Jahr, 4 Rbl. für das halbe Jahr incl. Postzustellung; in den anderen Ländern 20 Mark jährlich, 10 Mark halbjährlich. Der Insertionspreis für die 3 mal gespaltene Zeile in Petit ist 16 Kop. oder 35 Pfenn. — Den Autoren werden 25 Separatabzüge ihrer Originalartikel zugesandt. — Referate werden nach dem Satze von 16 Rbl. pro Bogen honorirt.

Abonnements-Aufträge sowie alle Inserate bittet man ausschliesslich an die Buchhandlung von Carl Ricker in St. Petersburg, Newsky-Prospect № 14, zu richten. — Manuscripte sowie alle auf die Redaction bezüglichen Mittheilungen bittet man an den geschäftsführenden Redacteur Dr. Theodor von Schröder in St. Petersburg, Malaja Italjanskaja № 33, Quart. 3, zu richten. Sprechstunden täglich von 2—4 Uhr Nachm., ausser Sonntags.

№ 34

St. Petersburg, 24. August (5. September)

1891

Inhalt: D. Romanowsky: Zur Frage der Parasitologie und Therapie der Malaria. — Referate: R. Jasinski (Warschau): Ueber syphilitische Erkrankungen der Wirbelsäule. — Kaposi: Ueber die Pathogenese der Pigmentirungen und Entfärbungen der Haut. — Jarisch (Innsbruck): Ueber die Anatomie und Entwicklung des Oberhauptpigmentes beim Frosche. — A. Pulawski: Zur Behandlung der Diphtherie. — Chr. Ufer: Geistesstörungen in der Schule. — Prof. M. Litten: Die Centrifuge im Dienste der klinischen Medicin. — J. Prior: Die Einwirkung der Albuminate auf die Thätigkeit der gesunden und erkrankten Niere der Menschen und Thiere. — Bücheranzeigen und Besprechungen: Schuster (Aachen): Die Syphilis, deren Wesen, Verlauf und Behandlung. — Ludw. Meyer: Die Provinzial-Irrenanstalt zu Güttingen. Zur Erinnerung an Ihre Eröffnung vor 25 Jahren. — Programm des III. Aertzetages der Gesellschaft livländischer Aerzte in Walk. — Kleinere Mittheilungen und therapeutische Notizen. — Vermischtes. — Vacanzen. — Mortalitäts-Bulletin St. Petersburgs. — Anzeigen.

Исправления и пополнения помещеннаго въ «КАЛЕНДАРЬ ДЛЯ ВРАЧЕЙ ВСѢХЪ ВѢДОМСТВЪ»
СПИСКА ВРАЧЕЙ,
 просить сообщить **НЕМЕДЛЕННО** книжному магазину **К. Л. Рикера** въ С.-Петербургѣ, Невскій пр., 14.

Zur Frage der Parasitologie und Therapie der Malaria.

Von

Dr. D. Romanowsky.

Vorwort: Vorliegende Arbeit des Dr. D. Romanowsky ist zuerst im Juni d. J. als Dissertation erschienen.

Ganz abgesehen von der wissenschaftlichen Bedeutung der Arbeit möchten wir, dem Wunsche der Redaction entsprechend, die Leser dieser Wochenschrift noch besonders auf die rein praktische Seite der Sache aufmerksam machen, auch diejenigen der Collegen, die sich weniger für parasitologische Forschungen interessieren.

Es ist hier nicht der Ort, alle die Ursachen zu erörtern, die es zuwege bringen, dass das Stadium der Malaria, dieser merkwürdigsten unter allen Krankheiten, bei uns so sehr vernachlässigt worden^{*)}. Steht sie doch schon darin einzig da, dass der Infektionsstoff derselben nur einen Feind hat — die Cultur; ganz im Gegensatz zu allen anderen flieht die Malaria vor der Cultur.

Russland ist eins der wenigen europäischen Länder, dessen Bevölkerung noch gegenwärtig in ausgedehntem Maasse unter dieser Krankheit zu leiden hat. In welcher Ausdehnung — das ersehe man z. B. aus den betr. Berichten der militär-medizin. Verwaltung oder beispielsweise aus dem Factum, dass im Jahre 1888 eine einzige Institution — die Verwaltung der Transkaukas. Bahn. — für 41067 Malariakranke zu sorgen hatte, bei einem Personal von 7000 Menschen, wobei 280 Pfund Chinin verbraucht wurden^{**)}. In Wirklichkeit zählen die jährlichen Opfer der Krankheit nach Hunderttausenden, die radicalen Genesungen aber zu den Seltenheiten; letzteres daher, weil das Gegengift, Chinin, rein empirisch, d. h. tappend, gegeben werden musste.

Die Methode von Romanowsky lehrt uns die Strukturveränderungen des Parasiten kennen, die verschiedenen Entwicklungsstadien desselben bestimmen. Was aber für den Praktiker von besonderem Werth — Romanowsky weist uns den Weg, um die Vergiftungserscheinungen am Parasiten, (bei Anwendung von Chinin z. B.) zu erkennen, den richtigen Zeitpunkt, um dem Parasiten beizukommen, festzustellen.

Die Nützlichkeit der Färbemethode von Romanowsky er-

^{*)} Wenigstens sind uns Franzosen und Italiener auf dem Wege der Erforschung der Krankheit weit vorgeeilt.

^{**)} S. Ssacharow. Die Malaria an der Transkauk. Bahn im Jahre 1890. Mikroskopische Beobachtungen. Tiflis, 1889.

hellst am besten aus folgenden in Kürze zu erwähnenden Fällen:

I. Kräftiger Mann, 30 Jahr alt, früher stets gesund.

Nur 1874, in Kleinrussland, durch 11 Wochen hindurch an Febr. intern. gelitten. Jetzt erkrankt mit leichtem Schüttelfrost am 23. VII., aufgen. am 27. VII. Allgemein fieberhafter Zustand. Heftige Bronchitis. Keine Darmerscheinungen. Geringe Druckempfindlichkeit in Magen- und Lebergegend. Unerträglicher Schmerz in den Knochen des Oberschenkels, besonders im linken. Dieser für den Kranken subjectiv das einzige Symptom; denn das Schwächegefühl ist gering, der Appetit nicht ganz geschwunden. Die 6 mal täglich gemessenen Temperaturen ergeben ein continuirliches, stark remittirendes Fieber, zwischen 38° und 40°. Sonst objectiv nichts nachweisbar. Mit Rücksicht auf die Anamnese wird ein Recidiv der Malaria, deren Latenz ja bekanntlich von unbestimmt langer Dauer ist, angenommen und Blutpräparate nach Romanowsky angefertigt.

Wir ersuchen einen Collegen, der solche Präparate nie gesehen, namentlich auch z. B. Recurrensspirillen nur aus Abbildungen kennt, einen Blick in's Mikroskop zu thun: «Spirilla chaetena!» Ja, und zwar in einem Bilde, das solche nach anderen Methoden angefertigte an Anschaulichkeit bedeutend übertrifft^{***)}.

Wir fügen nur noch hinzu: So wenig dieser erste Anfall in seinem klinischen Bilde an Recurrens erinnerte, so noch weniger der 2te, in welchem der Kranke im Laufe von 36 Stunden leicht fieberte, ohne selbst etwas davon zu merken; dagegen ist der heute noch nicht abgelaufene 3te Anfall sowohl typisch als auch sehr schwer.

II. Eine junge Dame von 21 Jahren, bisher stets gesund. Erkrankt am 7./VIII. unter leichtem Frösteln; bald danach allgemeines schweres Unwohlsein. Kopfschmerz, grosse Schwäche, Hitzegefühl, völlige Appetitlosigkeit. Am nächstfolgenden Abend bedeutende kurzwährende Erleichterung, sonst bis heute keine Veränderung.

Status am 9./VIII. Abends. Graciler Bau, geringe Anaemie. Zunge wenig belegt. Durst. Appetitlosigkeit. Seit 30 Stunden obstipirt. Leib etwas aufgetrieben. Lebergränze hochstehend. Milz nicht nachweisbar. Keinerlei Schmerz. Objectiv sonst nichts nachweisbar. Temper. 39.6. P. 110. Schwangerschaft im 7ten Monat. Was die letzten Tage betrifft, so findet sich betreffs des Krankheitsverlaufs ein Widerspruch: die Kranke selbst will keinerlei Schwankungen, keinerlei Erleichterung, ausser der einen, erwähnten, gespürt haben. Der Mann dagegen will,

^{***)} Von der exquisiten Anschaulichkeit der Präparate überzeugten sich mehrere Collegen, denen wir dieselben demonstrieren.

3. The third publication — the work referred by the western researchers — was the dissertation statement in German in weekly journal St. Petersburg Medicinische Wochenschrift — was published on August, 24th (on September, 5th) 1891. [26].

The fourth publication [14], which was issued after dissertation defense, was devoted basically to the results of research on influence of quinine on malaria plasmodium.

Thus, Malahovsky published the work three weeks prior to the third publication [25], and by the time his article was issued, Romanowsky had already had the Doctor's degree, and his results concerning staining techniques had been already published, so his priority is obvious.

What is much more important than formal priority, in our opinion, is that Romanowsky's works stimulated further research on blood smears and malaria parasites staining, improvement of the techniques and dye formulations, industrial production of the dyes, in particular, developed thanks to works by Bernhard Nocht and Gustav Gimzy. For this reason, Gimza named the dye "Giemsasche Lösung für die Romanowsky färbung" – "Solution by Gimza for Romanowsky staining" [9, 21, 22].

It is necessary to notice that the International Committee on Standardization in Hematology (ICSH) is quite reasonably using such terms as "Romanowsky Effect" and "Romanowsky staining". The ICSH working group of experts on dyes and methods of staining consisting of the most recognized scientists gives the following definition:

Definition of the Romanowsky stain. The stain consists of a mixture of the cationic dye azure B and the anionic dye eosin Y, in aqueous solutions, in a ratio ranging from 6.5 to 7.3, with the two dyes acting separately or in conjunction on appropriately pre-treated biological substrates, to give a typical staining pattern which depends on the chemical and physical conditions of the substrate. ...

The Romanowsky effect. The unique effect of Romanowsky staining is based on the fact that with biological substrates the blue cationic dye azure B and the red-orange anionic dye eosin Y give more colours than just blue and red-orange Purple is the most important colour which characterizes the Romanowsky effect. [23]

In the other words, Romanowsky staining or, as it sometimes is called, by Romanowsky type staining, is a group of techniques in which the effect with the same name occurs. Close to this definition, the term "Romanowsky staining" was applied by his contemporaries, in particular, Bernhard Nocht, Sir William Boog Leishman, James Homer Wright , Gustav Gimza, Mikhail Nikiforovitch Nikiforov .

Despite 120-year history, "Romanowsky staining is of outstanding importance for the morphological identification of haemopoietic and other types of cells. [23]. Romanowsky effect mechanisms are still being analyzed, new variants of staining techniques are being developed, and in particular, which is very important, attempts of practical implementation of the standardized methodologies are being made [23]. Thus, the work begun by Russian scientists Cheslav Ivanovich Chenzinsky and Dmitry Leonidovich Romanowsky proceeds and benefits people. Thanks to them, and also thanks to those researchers whose names are not remembered.

REFERENCES

1. Алексеев Г.А., Засухин Д.Н. Памяти Дмитрия Леонидовича Романовского к 120-летию со дня рождения Пробл. Гематологии и переливания крови, 1981, т. 26, №3, с.59-60.
2. Дьяченко С.С. Дмитрий Леонидович Романовский (1861-1921) Врачебное дело, 1952, 4, 367-370.
3. Засухин Д.Н. У истоков отечественной протистологии. Ч.И. Хенцинский. Мед. Паразит и паразитарн. Бол., 1953, 1, 95-97.
4. Засухин Д.Н. Д.Л. Романовский (80 лет метода окраски крови и паразитов крови). Мед. Паразитология и паразит. бол. 1971, т. 40, № 6, с.729.
5. Идельчик Х.И., Левит М.М. Выдающиеся работы врачей Одесской городской больницы. Сов. здравоохран., 1949, 3, 48-54.
6. Кассирский И.А. Проблемы и учёные. М., 1949.
7. Л.Ч. Доктор медицины Ч.И. Хенцинский Зубоврачебный ежемесячник, 1916, 6, 117-118.
8. Мельников-Разведенков Н.Ф. Чеслав Иванович Хенцинский и его значение для научной медицины. Юбил. Сбор. Одесской окружной больницы 1902-1927, Одесса, 1927, 148-162.
9. Никифоров М.Н. Микроскопическая техника. (8-е издание, 1919 г.)
10. Плanelьс Х.Х. Вклад русских учёных в развитие химиотерапии инфекционных заболеваний. Журн. Микробиол., эпид., и иммунобиол., 1951, 9, 69-72.
11. Плотников Н.Н. Засухин Д.Н. Из истории борьбы с малярией в СССР. М., 1953, 88 стр. (стр.27-28).
12. Романовский Д.Л. «К ВОПРОСУ О СТРОЕНИИ ЧУЖЕЯДНЫХ МАЛЯРИИ», ВРАЧЬ, 1890 г., № 52, 1171-1173.
13. Романовский Д.Л. «К ВОПРОСУ О ПАРАЗИТОЛОГИИ И ТЕРАПИИ БОЛОТНОЙ ЛИХОРАДКИ», СПб, 1891 г. 118с.
14. Романовский Д.Л. «О СПЕЦИФИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ ХИНИНА ПРИ БОЛОТНОЙ ЛИХОРАДКЕ.» ВРАЧЬ, 1891 г., № 18, 438-440.
15. Саксонов П.П. Дмитрий Леонидович Романовский /1861-1921/ Фельдшер и акуш., 1950, 10, 41-43.
16. Фикс А.Ф. Приоритет Хенцинского в создании метода двойной окраски крови. Лабор. Дело, 1963, 4, 59-59.
17. Фридлиндер О. Памяти профессора Д.Л. Романовского Врачебная газета, 1922, 3-4, 112-112.
18. Хаютин Д.М. Ч. И. Хенцинский (К 40-летию со дня смерти) Арх. Патолог. 1956, 18, 2, 121-123.
19. Хенцинский Ч.И. К учению о микроорганизмах малярии. Дисс. Одесса, 1889.
20. Chenzinsky C: Zur lehre von mikroorganismus des malaria-fiebers. Zentralbl Bakteriол 83:457, 1888
21. Fleischer B. 100 years ago: Giemsa's solution for staining of plasmodia Tropical Medicine and International Health volume 9 no 7 pp 755–756 July 2004.
22. Giemsa G: Färbemethoden für malariaparasiten. Centbl Bakt 31:429, 1902.
23. ICSH reference method for staining of blood and bone marrow films by azure B and eosin Y (Romanowsky stain). *British Journal of Haematology*, 1984, 57, 707-710
24. Lillie RD: Romanowsky-Malachowski stains: The so-called Romanowsky stain: Malachowski's 1891 use of alkali polychromed methylene blue for malaria plasmodia. *Stain Technol.* 53:23-28, 1978.
25. Malachowski E: Zur morphologie des plasmodium malariae. *Centralbl Klin Med* 12: 601, 1891
26. Romanowsky, D. L. 1891. Zur Frage der Parasitologie und Therapie der Malaria. *St.Petersburg Med. Wochenschr.* 16: №34, 297-302; № 35, 307-316.
27. Woronzoff-Dashkoff K: The Ehrlich-Chenzinsky-Plehn-Malachowski-Romanowsky-Nocht-Jenner-May-Gruenwald-Leishman-Reuter-Wright-Giemsa-Lillie-Roe-Wilcox Stain: The mystery unfolds. *Clin Lab Med* 13:759, 1993.
28. Woronzoff-Dashkoff KK. (2002). THE WRIGHT-GIEMSA STAIN. Secrets Revealed. *Clin Lab Med.* 22 (1): 15–23.



Cheslav Ivanovich Chenzinsky



Dmitry Leonidovich Romanowsky