

Ueber die mikrochemische Localisation des Phosphors in den Geweben¹⁾.

Von

Leon Lilienfeld und Achille Monti.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts in Berlin.)
(Der Redaction zugegangen am 7. September 1892.)

Es ist die Aufgabe der biologischen Chemie, das Vorkommen der Stoffe in den thierischen und pflanzlichen Geweben nicht nur der Menge, sondern auch der Vertheilung nach festzustellen. Hierdurch wird erst ein Verständniss vieler anatomischer Verhältnisse angebahnt und die Beziehung der Form zur Function in manchen Fällen klargelegt.

Wir besitzen erst wenige Reactionen, welche uns in rationeller Weise über die Zusammensetzung der Theile eines mikroskopischen Bildes Aufschluss geben. Die Färbungen, von denen noch nicht einmal feststeht, ob sie auf physikalischer oder chemischer Grundlage beruhen, können für eine Erkennung der chemischen Beschaffenheit nicht ausschlaggebend sein. In den Geweben des Thierkörpers sind es vor Allem die Reactionen auf Eisen, auf Glykogen, auf Amyloid, die durch Osmiumsäure hervorgerufenen Färbungen, die Xanthoproteinreaction, Millon's Reaction, das Verhalten der verschiedenen Bestandtheile der Gewebe zu den Lösungsmitteln, welche man als rationelle Reactionen bezeichnen kann; eines grösseren Reichthums an derartigen Methoden kann sich die Botanik rühmen.

Die biochemische Wichtigkeit der Phosphorverbindungen in's Auge fassend, haben wir versucht, eine mikrochemische Reaction auf Phosphorsäure ausfindig zu machen. Hierbei

¹⁾ Vorläufige Mittheilung: Verh. d. physiol. Ges. zu Berlin vom 24. Juni 1892. Abgedruckt im Archiv f. Physiologie, herausg. v. E. du Bois-Reymond, Jahrg. 1892.

mussten wir von vornherein erwarten, dass die in den Gewebstheilen enthaltene Phosphorsäure in verschiedener Weise reagirt, je nachdem sie als Phosphat oder in organischer Bindung (Lecithin, Protagon, Nuclein, Paranuclein) vorhanden ist.

Wir benutzten das molybdänsaure Ammoniak, welches mit phosphorsauren Salzen in salpetersaurer Lösung einen sich ziemlich schnell entwickelnden Niederschlag bildet, hingegen mit Anhydridformen der Phosphorsäure oder mit organischen Verbindungen derselben nur dann eine Fällung gibt, wenn sich aus denselben Orthophosphorsäure abgespalten hat.

Wenn man einen phosphorsäurehaltigen Gewebstheil in eine salpetersaure Lösung von Ammoniummolybdat legt, so wird die Molybdänsäure an denjenigen Stellen, wo sich Phosphorsäure befindet, niedergeschlagen. Der entstehende Niederschlag ist gelb, also nicht ohne Weiteres wahrnehmbar: er muss erst durch eine chemische Reaction in einen gefärbten Körper verwandelt werden. Als eine derartige Reaction benutzten wir die Reduction, welche bekanntlich aus der Molybdänsäure blau gefärbte, niedere Oxyde bildet¹⁾.

Wir versuchten es mit verschiedenen Reductionsmitteln. Zu diesem Behufe legten wir die Gewebstücke in Ammoniummolybdat, wuschen sie mit Wasser aus und brachten sie dann in das Reductionsmittel. Die Alkaloide, welche bekanntermassen mit Ammoniummolybdat in schwefelsäurehaltiger Lösung Farbenreactionen geben, erwiesen sich für uns als unbrauchbar; nachher versuchen wir es mit Zinnchlorür und Eisenvitriol; beide geben zwar eine grüne oder blaue Färbung, welche aber für vorliegende Zwecke zu schwach ist. Etwas bessere Resultate bekamen wir mit Gerbsäure und die besten und beweisendsten mit Pyrogallol, welches uns nie im Stiche liess und immer klare und intensive Bilder gab. Das Pyrogallol gibt schon im Reagensglase mit Phosphormolybdänsäure eine intensiv braune bis schwarze Färbung, wobei niedere Molybdänoxyde entstehen.

¹⁾ Stahl, Molybdänsäure, als Farbreagens auf gewisse aromatische Oxydkörper, Berichte d. deutsch. chem. Gesellschaft. No. 9, 1892.

Eine Schwierigkeit, welche wir zu bekämpfen hatten, bestand darin, dass die Phosphorsäure in den meisten Zellkernen und Geweben nicht im freien Zustande, sondern in mehr oder weniger fester organischer Verbindung auftritt. Es hat sich aber bei unseren Untersuchungen herausgestellt, dass beim Einwirken des Ammoniummolybdat und nachheriger Reduction nicht nur an denjenigen Orten, wo sich Phosphate befinden, eine Färbung entsteht, sondern dass auch ein Theil der organisch gebundenen Phosphorsäure und sogar Metaphosphorsäure reagirt. Wahrscheinlich erfolgt in diesen Fällen während der Digestion mit molybdänsaurem Ammoniak eine Umwandlung in Orthosäure. Gleich zu Anfang sahen wir, dass manche Gewebe nach kurzem Verweilen in Ammoniummolybdat bei nachheriger Behandlung mit Pyrogallol nur sehr schwache Färbung gaben, während sich andere sogleich intensiv tingirten. Es war dies nur durch die grössere oder geringere Intensität der organischen Phosphorsäurebindung zu erklären. Diese Annahme bestätigte sich, als wir die Gewebstücke vorher mit Barytwasser oder Natriumcarbonat behandelten, oder sie längere Zeit in Ammoniummolybdat verweilen liessen. In allen diesen Fällen, wo wir die Phosphorsäure artificiell abspalteten — beim Ammoniummolybdat durch die in der Lösung vorhandene Salpetersäure —, erhielten wir intensive Phosphorreaction.

Der Gang unserer Methode war folgender. Da es unbekannt ist, mit welchen chemischen Veränderungen die verschiedenen Härtungsmethoden einhergehen, hielten wir es für angezeigt, frische Organe zu benutzen. Der Umstand, dass das Ammoniummolybdat nur sehr kleine Stücke durchtränken kann, machte das Arbeiten mit frischen fertigen Schnitten, Zupf-, Schab- und Klatschpräparaten nothwendig. Doch geben auch im Alkohol gehärtete Präparate ziemlich gute Bilder. Wir benutzten eine nach Fresenius¹⁾ bereitete Lösung von molybdänsaurem Ammoniak. Die Zeit, welche die Präparate in letzterer verweilen sollen, hängt natürlicher-

¹⁾ Fresenius, Quantitative chemische Analyse, Braunschweig 1877—87, Bd. II, S. 691 (Anmerkung).

weise von dem chemischen Zustand der in den Geweben enthaltenen Phosphorsäure ab. Ist in den Organen freie Phosphorsäure enthalten, so genügt schon ein Augenblick, um sie mikrochemisch zu fällen, ist dagegen die Phosphorsäure an organische Atomcomplexe gebunden, so hängt die Zeit von der Festigkeit der Bindung ab. Bei lockerer Bindung der Phosphorsäure genügen einige Minuten bis zu einer halben Stunde, bei fester Bindung dagegen muss man die Gewebstücke mehrere Stunden mit Ammoniummolybdat behandeln. Will man sich die Zeit abkürzen, so muss man die gebundene Phosphorsäure durch Behandlung mit Natriumcarbonat oder Barytwasser frei machen. Wenn die Gewebe sehr reich an Phosphor sind, so bemerkt man schon jetzt an den in der Ammoniummolybdatlösung befindlichen Stücken eine makroskopisch erkennbare, schwach gelbe Färbung, welche von gefällter Phosphormolybdänsäure herrührt. Nachdem die Stücke genügend lange mit molybdänsäurem Ammoniak in Berührung waren, werden sie sorgfältig, und zwar bis zum Verschwinden des Ammoniummolybdats, aus dem Waschwasser ausgewaschen. Man prüft dies am besten durch Zusatz von Pyrogallol zum Waschwasser: entsteht eine braune oder gelbe Färbung des Wassers bei Pyrogallolzusatz, so ist noch Ammoniummolybdat in demselben vorhanden. Bleibt das Wasser klar und ungefärbt, dann ist es von Ammoniummolybdat frei. In der Regel genügt dreimaliges Auswaschen. Jetzt kommen die Stücke in eine 20 procentige Lösung von Pyrogallol. Das Pyrogallol reducirt die gebildete Phosphormolybdänsäure und es entsteht demgemäss an den phosphorreichen Stellen des Präparates je nach dem Phosphorgehalte eine gelbe, braune oder schwarze Färbung. Die Stücke dürfen nicht zu lange mit Pyrogallol in Berührung bleiben, weil die ursprüngliche Intensität der Färbung dadurch abnimmt. Einige Minuten genügen. Das Pyrogallol wird wieder bis zum Verschwinden der Reduction mit Ammoniummolybdat im Waschwasser ausgewaschen und das Präparat in Wasser untersucht. Bei der Untersuchung in Wasser bekommt man sehr schöne Bilder. Wenn jedoch die Stücke zu lange in Wasser verweilen, ver-

ändert sich allmählig die schöne Reaction und die Färbung wird immer mehr diffus und blass. Um diesem Nachtheile aus dem Wege zu gehen, haben wir zuerst unsere Präparate recht eilig der Beobachtung unterzogen, dann haben wir versucht, Dauerpräparate herzustellen. Glycerin entfärbt die Präparate sehr schnell, Farrant'sche Mischung conservirt sie etwas besser, die schönsten Conservirungspräparate erhielten wir jedoch beim Einschliessen in Canadabalsam, nach vorheriger Entwässerung mit Alkohol und Klärung in Xylol.

Der Umstand, dass die in Wasser lange Zeit gebliebenen Schnitte eine diffuse Färbung darbieten, veranlasste uns zu anderen Versuchen. Wir wollten nämlich die in der wässerigen Pyrogallollösung eventuell stattfindende Diffusion vermeiden und wir entwässerten zu diesem Ende die mit Ammoniummolybdat behandelten, gut gewaschenen Schnitte mit Alkohol und brachten sie dann in ätherische Pyrogallollösung. Die Schnitte blieben ungefärbt. Wenn wir aber dieselben Schnitte wieder in Alkohol und Wasser legten und dann nochmals in ätherische Pyrogallollösung, so erhielten sie eine intensive Färbung. Daraus müssen wir den Schluss ziehen, dass Wasser für die Reaction unentbehrlich ist.

Wenn wir mit Wasser benetzte Schnitte direct in ätherische Pyrogallollösung bringen, so tritt die Färbung ein, wobei aber die kleine Wassermenge nicht genügt, um eine erhebliche Diffusion des entstandenen Farbstoffes zu bewirken. In der That bleibt bei diesen schnell mit Alkohol entwässerten und in Canada eingeschlossenen Präparaten die Färbung intensiv und differenzirt; niemals wird sie blass und diffus, wie bei den mit wässriger Pyrogallollösung lange behandelten Stücken.

Gleich im Beginn unserer Untersuchungen waren wir uns darüber klar, dass man gegen unsere Methode verschiedene Einwände machen kann. Um uns Sicherheit zu verschaffen, haben wir die uns bewussten Einwände auf ihre Stichhaltigkeit geprüft. Der erste Einwand bestand darin, dass die erhaltene Färbung nichts mit dem Phosphorgehalt zu schaffen hat und blos auf Niederschlägen beruht, welche von den Zellkernen mechanisch gefesselt werden. In der That wird jedem

Histologen sich der Gedanke aufdrängen, dass unserer Methode kein besonderer chemischer Process, sondern bloß eine einfache physikalische Imbibition mit dem Farbstoff zu Grunde liegt, der bei dem Zusammentritt von molybdänsaurem Ammon mit Pyrogallol entsteht. Dieser Einwand wird aber gleich unhaltbar, wenn man den Umstand in Erwägung zieht, dass das gewöhnliche in Wasser lösliche Ammoniummolybdat durch das wiederholte Waschen aus den Geweben entfernt wird und dass auch bei Annahme eines unvollständigen Auswaschens die eventuell im Schnitte zurückbleibende in das Pyrogallol übertragene Menge von Ammoniummolybdat absolut nicht genügen kann, um eine für die Tinction der Gewebe genügende Farbstoffmenge zu erzeugen. Es müsste sich ja auch die den Schnitt umgebende Pyrogallollösung irgendwie tingiren; sie bleibt aber absolut ungefärbt. Wir können über einen Versuch berichten, welcher diesen Einwand klar widerlegt. Wir haben frische, mit molybdänsaurem Ammoniak behandelte Schnitte aus Lilienvarieten dreimal in Wasser gewaschen, dann in gewöhnlichem und in absolutem Alkohol gut entwässert, nunmehr in Aether und wieder in absoluten Alkohol, nachher in Terpentinöl, wieder in absoluten Alkohol, verdünnten Alkohol, Wasser und schliesslich in Pyrogallollösung gebracht. Die charakteristische Färbung trat bei diesen Schnitten eben so wie bei den einfach mit Wasser gewaschenen schön zu Tage.

Daraus glauben wir schliessen zu müssen, dass bei der Einwirkung des molybdänsauren Ammons in den Geweben eine unlösliche, durch das vielfache Waschen nicht entfernbare Verbindung entsteht, welche von dem nun nachfolgenden Pyrogallol gefärbt wird. Thatsächlich bietet die Phosphormolybdänsäure die Eigenschaften einer solchen Verbindung dar.

Wir versuchten auch, ob bei umgekehrter Behandlung eine Färbung entsteht. Zu diesem Behufe legten wir zellreiche Gewebstücke zuerst in Pyrogallol und nachher in Ammoniummolybdat: wir bekamen absolut keine Färbung, wenn wir auch die Stücke gar nicht wuschen; brachten wir sie aber zuerst in Ammoniummolybdat und dann in Pyrogallol, so gab der phosphorreiche Zellkern eine intensive Färbung.

Der zweite Einwand, den wir uns machten, war, dass vielleicht die Salpetersäure mit dem Eiweiss die Farbenreaction gibt, welche sich bei Pyrogallolzusatz verstärkt und gar nicht auf Kosten des Phosphors zu rechnen ist.

Durch folgende Versuche prüften wir nun den Werth unserer Methode.

Wir unterwarfen ein Stück hart gesottenen Eiweisses aus einem Hühnerei unserer Behandlung. Das Eiweissstück färbte sich zwar schwach, aber doch kenntlich gelb. Diese Thatsache verurtheilte entweder vollständig unsere Methode, oder es enthielt das Eiereiweiss Phosphor. In der That gab ein Stück desselben Eiweisses, mit Soda und Salpeter geschmolzen, Phosphorreaction. Wir versuchten es nun mit einem absolut phosphorfreien Pepton. Letzteres gab absolut keine Färbung und blieb schneeweiss. Zum Vergleich unterwarfen wir unserer Methode einen phosphorreichen Kernbestandtheil, das Nucleohiston. Dieses wurde, mit unserer Methode behandelt, pechschwarz.

Im Laufe unserer Untersuchungen hat sich unter Anderem herausgestellt, dass die Grundsubstanz des hyalinen Knorpels sich nicht färbt, also keinen reactionsfähigen Phosphor enthält. Wir legten frische Knorpelstücke in Metaphosphorsäure, wuschen sie aus und unterwarfen sie dann unserer Reaction: die mit Metaphosphorsäure durchtränkte Grundsubstanz färbte sich jetzt intensiv.

Zellreiche Stücke von Salamanderlarven, in denen sich blos der Kern intensiv tingirte, während das Cytoplasma fast farblos blieb, behandelten wir längere Zeit mit Nucleinsäure, welche bekanntlich mit phosphorfreiem Eiweiss Verbindungen eingeht. Sie vereinigte sich also mit den Eiweisskörpern des Cytoplasmas und verwandelte sie — so zu sagen — in Kernsubstanz. Als wir nun die mit Nucleinsäure behandelten Präparate unserer Methode unterwarfen, bekamen wir eine diffuse Färbung der Zellen: sowohl Kern als Leib waren intensiv tingirt.

Im frischen Sperma ist bekanntlich die Phosphorsäure im Nuclein ausserordentlich fest gebunden und macht die

Spermatozoën äusserst widerstandsfähig gegen unsere Methode. Wenn wir also die Spermatozoën vom anhaftenden Ammoniummolybdat auch gar nicht frei wuschen und sie direct in Pyrogallol brachten, bekamen wir ebenfalls gar keine Färbung. Wenn wir jedoch Sperma längere Zeit mit molybdänsaurem Ammoniak behandelten und so die Phosphorsäure frei machten, färbten sich die gewaschenen Spermatozoën intensiv.

Es ergibt sich aus diesen Versuchen, dass der Phosphor in seinen Sauerstoffverbindungen jedenfalls mit Hilfe dieser Methode mikroskopisch nachweisbar ist. Es bleibt freilich die Möglichkeit bestehen, dass es ausser der Phosphorsäure noch andere und zwar organische Substanzen geben könne, welche unter diesen Verhältnissen Molybdänsäure fixiren. Sollte dies auch der Fall sein, so würde trotzdem unsere Methode ihren Werth nicht verlieren, denn es werden bekanntlich manche chemische Reactionen benutzt, welche nicht eindeutig, sondern verschiedenen Substanzen gemeinsam sind.

Das Ammoniak löst bekanntlich sehr leicht Phosphormolybdänsäure. Wir brachten zellreiche Schnitte von Lilien und Muskelstücke in Ammoniummolybdat, wuschen sie aus und dann legten wir einige von ihnen in Ammoniakflüssigkeit und einige direct in Pyrogallol. Die ersten wurden dann mit Wasser sorgfältig von Ammoniak frei gewaschen und ebenfalls mit Pyrogallol behandelt. Schon makroskopisch sahen wir, dass die mit Ammoniak behandelten Präparate vollständig ungefärbt blieben, während sich die anderen intensiv tingirten. Das Mikroskop bestätigte diesen Befund; denn während an den Präparaten, welche mit Ammoniak in keiner Berührung waren, eine höchst intensive Färbung, also Phosphorreaction, eintrat, waren die anderen vollständig farblos und in den Lilienschnitten waren keine Zellkerne zu erkennen. Das Ammoniak löst also die in den Zellen sich bildende Molybdänsäureverbindung, ebenso wie es Phosphormolybdänsäure zu lösen im Stande ist.

Wir gehen jetzt zu dem speciellen Theile unserer Arbeit über, also zu den Ergebnissen, welche uns die einzelnen Organe und Gewebe lieferten.

Zellen im Allgemeinen. Zu diesem Behufe untersuchten wir grosse Zellen aus Lilienknospen und Spargeln. Beide ergaben eine intensive braune Farbe des Zellkerns und eine schwach gelbe Färbung des Primordialschlauches. Es schien uns anfänglich, dass auch die Umrisse der Zellen gefärbt sind; doch zeigte sich bei Schnitten, welche längere Zeit in Ammoniummolybdat verweilten oder wo sich der Primordialschlauch contrahirt hat, dass die Zellmembran absolut ungefärbt war, was auch mit den makrochemischen Untersuchungen, welche schon seit langer Zeit lehren, dass Cellulose phosphorfrei ist, sehr gut übereinstimmt. Daneben sahen wir, dass die Stärkekörner ungefärbt bleiben, während die Cytomikrosomen schwach gelbe Tinction annehmen. Im Kern färben sich in erster Linie äusserst intensiv die Karyomikrosomen, also die optischen Querschnitte des Karyomitoms. In den Ovarien der befruchteten Lilien fanden wir Embryonen, welche sich als sehr phosphorreich erwiesen.

Von grossem Interesse ist ohne Zweifel die Frage nach der Vertheilung des Phosphors während der Vermehrung der Zelle. Bei jungen Lilienembryonen fanden wir viele Mitosen, die uns sehr lehrreiche Bilder gaben. Bei diesen Pflanzentheilen hat nämlich unsere Reaction sehr gut das Karyomitom gefärbt, während das Karyoenchylem und das ganze Zellprotoplasma sehr schwach gefärbt erschienen. Bei diesen Präparaten konnten wir schöne Knäuel-, Halbtonnen- und Doppelsternformen erkennen, bei denen die Chromosomen intensiv gefärbt waren. Alle anderen Bestandtheile des Kernes und des Cytoplasmas blieben verhältnissmässig sehr blass. Aus diesen Versuchen geht hervor, dass bei Lilienembryonen der reactionsfähige Phosphor besonders an das Karyomitom gebunden ist. Man kann freilich den Einwand machen, dass die Mitosen sich deshalb so gut färben, weil sie eine besondere Affinität zu den Stoffen zeigen. Aber nicht alle sich vermehrenden Zellen verhalten sich gegenüber unserer Methode wie die Lilienembryonen.

Ganz anders verhalten sich z. B. die Hodenzellen der Salamander. Wir haben reife Hoden der Salamander, bei

denen mit den gewöhnlichen Methoden sehr viele Kerntheilungen zu finden waren, mit unserer Methode untersucht. Allein nach unserer Behandlung sind sämtliche Hodenzellen braunschwarz geworden, so dass kein Unterschied zwischen Kern und Protoplasma zu erkennen war. Wir müssen daraus den Schluss ziehen, dass die Hodenzellen sehr phosphorreich sind und dass der reactionsfähige Phosphor selbst im Cytoplasma sehr verbreitet ist. Auch scheint uns das Verhalten der Hodenzellen im Vergleich mit den Zellen der Lilienembryonen gut zu zeigen, dass unsere Reaction gar nicht als gewöhnliche Färbung, sondern als ein chemischer Process aufzufassen ist.

Es ist bekannt, dass in manchen Pflanzenzellen natürliche Krystalle vorkommen, welche aus einem phosphorhaltigen Proteid, dem sogenannten Vitellin, bestehen. Wir untersuchten die Krystalloide von *Bertholletia excelsa*, welche mittels Fischleims auf einem Deckglas aufgeklebt, unserer Behandlung unterworfen wurden. Sie gaben die Phosphorreaction mit einer gelbbraunen Farbe, während der Fischleim ungefärbt blieb. Darnach war es auch interessant, dieselben Krystalle in frischen Schnitten von Paranüssen auf ihren Phosphor zu prüfen. Wir befestigten die Schnitte mit Leim auf einem Deckglas, um im Laufe der Operationen die Krystalle aus den Schnitten nicht zu verlieren. Auch an diesen Schnitten waren die Krystalle sehr gut gefärbt. Allein daneben gaben auch die Zellkerne und die Primordialschläuche eine starke Phosphorreaction. Auch hier blieb die Zellmembran ganz ungefärbt. Bei der Untersuchung des Hollundermarks ergab sich, dass sich dasselbe gar nicht färbt.

Bakterien. Die Bakterien färben sich schwach braun; sie enthalten also reactionsfähigen Phosphor.

Von thierischen Geweben untersuchten wir folgende.

Epithelzellen. Wir behandelten nach unserer Methode Epithelzellen der Haut von Fröschen und von Salamanderlarven. An diesen Zellen sahen wir, dass sich die Kerne braun färbten, während das Cytoplasma fast ungefärbt blieb. Wir bemerkten jedoch, dass bei den Epithelzellen der tieferen Schichten und bei den Epithelzellen der Hautdrüsen des

Frosches sich auch das Cytoplasma färbte. An diesen Präparaten waren zwischen den Zellen Mucinschichten oder Mucinfäden zu erkennen, welche ganz ungefärbt blieben. Dieser Befund steht in gutem Einklange mit der Makrochemie, welche das echte Mucin für phosphorfrei erklärt. Aehnliche Bilder ergaben auch Epithelzellen aus der Froschzunge. Andere Epithelzellen haben wir im menschlichen Zungenbeleg studirt; diese breiten, dünnen Pflasterzellen zeigen einen phosphorhaltigen Kern und phosphorfreies Protoplasma. Auch in den Hoden von *Melolontha vulgaris* sahen wir grosse Epithelzellen mit braunem, also phosphorreichem Kern und gelbem Cytoplasma.

Hydra. Von niederen Thieren haben wir einige Hydren auf Phosphor geprüft. Hier konnten wir die Vertheilung des Phosphors am besten im Ektoderma studiren. Die Tegumentalzellen der Hydra sind sehr gut an den Tentakeln zu sehen. Es hat sich ergeben, dass die Zellen im Allgemeinen ziemlich phosphorreich, also braun gefärbt sind. Die Umrisse der Zellen sind gut zu erkennen; die Kerne sind viel intensiver als das Cytoplasma gefärbt. Alle Geisseln sind ausgetreten und vollkommen ungefärbt.

Spermatozoën. Wir untersuchten Sperma vom Eber, Hund und Frosch, und zwar an Deckglausstrichpräparaten. Unterwarfen wir frische Spermatozoën sofort der Behandlung und behandelten sie ganz kurze Zeit mit Ammoniummolybdat, so bekamen wir äusserst schwache Reactionen. Je länger jedoch das Sperma mit Ammoniummolybdat in Berührung war, um so intensiver trat die Phosphorreaction auf. Diese Thatsache findet ihre Erklärung in dem Umstande, dass speciell in gewissen Samenzellen die reichlich vorkommende Phosphorsäure im Nuclein äusserst fest gebunden ist. Durch die Wirkung der Salpetersäure wird sie allmählig frei gemacht. Diese Annahme bestätigte sich, wenn wir frisches Sperma mit Natriumcarbonat oder Barytwasser behandelten, wobei die Phosphorreaction sofort eintrat. Wir wollen sogleich bemerken, dass die Spermatozoën vom Frosch die Reaction zwar nicht intensiver, aber schneller als die anderen gaben; die Phosphor-

säure ist also im Froschsperma z. Th. lockerer gebunden. Die Bilder gestalteten sich folgendermassen: Beim Froschsperma sind die Köpfe intensiv und gleichförmig gefärbt, die Schwänze sind vollkommen farblos. Beim Eber sind die Köpfe und die Mittelstücke sehr stark, die Schwänze schwach gefärbt. Beim Hund sind die Köpfe intensiv gefärbt, wobei sich ein Unterschied in der Vertheilung des Phosphors geltend macht: es sind nämlich die hinteren Partien der Köpfe viel intensiver als die vorderen gefärbt.

Blut. Wir prüften Blut vom Frosch und vom Menschen. Wir versuchten es zu allererst mit Trockenpräparaten nach Ehrlich, welche wir der Behandlung mit Ammoniummolybdat und Pyrogallol unterwarfen. Diese Methode erwies sich als unbrauchbar für unsere Reaction; es scheint, dass bei der Eintrocknung durch Hitze die chemischen Merkmale des Blutes verloren gehen. Wir griffen daher nach einer anderen Methode, welche darin bestand, dass wir das Blut auf Deckglässern ausstrichen und sofort, bevor es eintrocknete, in Ammoniummolybdat brachten, welches sich als gutes Fixationsmittel für Blut erwies. Das Froschblut ergab, dass die rothen Blutkörperchen sich intensiv tingiren, wobei der ganz braune Kern phosphorreicher erscheint als das Cytoplasma. Mit Menschenblut erhielten wir folgende Resultate: Die rothen Blutkörperchen färben sich stark gelbbraun; ihr grosser Phosphorgehalt steht sehr gut mit ihrem Gehalte an Lecithin in Einklang. In den Leukocyten ist der Kern braun gefärbt; allein auch das Cytoplasma scheint kleine Mengen von Phosphor zu enthalten, denn es färbt sich schwach gelb. Dieselben Bilder wie mit Leukocyten bekamen wir mit einem Präparate von Eiterzellen, welche aus einer kleinen Hautpustel stammen. Das interessanteste Ergebniss lieferten die Plättchen, indem sie sich dunkelbraun färbten. Dieser hohe Phosphorgehalt der Plättchen liefert noch eine schöne Bestätigung der von Einem von uns schon früher dargelegten Untersuchungen, welchen zu Folge die Plättchen Nuclein enthalten. An Präparaten von geronnenem Blute färbt sich das Faserstoffnetz gar nicht, während die Plättchen

und die Zellkerne der Leukocyten intensive Tinction annehmen.

Bindegewebe. Wir haben lockeres und festes Bindegewebe untersucht. Beim letzteren Bindegewebe aus der Zunge des Frosches ist die Grundsubstanz ungefärbt, sie scheint also phosphorfrei zu sein. Die Kerne der Bindegewebszellen geben die Reaction mit schwarzbrauner Farbe. Beim festen Bindegewebe aus den Sehnen des Frosches und der Käfer scheint die Grundsubstanz ebenfalls phosphorfrei zu sein.

Knochen. Wir brachten frische dünne Knochen aus dem Sternum des Sperlings und Schädelknochen der Maus direct in Ammoniummolybdat. Sofort entstand ein heftiges Aufbrausen der Flüssigkeit, indem die Salpetersäure die kohlensauren Salze der Knochen löste. Zu derselben Zeit entstand ein riesiger gelber Niederschlag von Phosphormolybdänsäure rings um die Knochenstücke, welcher auf grosse Mengen freier Phosphorsäure hindeutete. Als die Kalksalze aufgelöst waren, dachten wir, die ganze Phosphorsäure wäre den Knochen entzogen. Dies war aber nicht der Fall, denn die gewaschenen entkalkten Stücke wurden, in Pyrogallol gebracht, schwarz. Mikroskopisch waren aber die Bilder, der vielen Niederschläge und Gasblasen wegen, werthlos.

Knorpel. Es wurden die hyalinen Knorpel der Salamanderlarven und des Frosches untersucht. Die Grundsubstanz ist vollständig phosphorfrei, während die Zellen, und besonders der Kern, Phosphor enthalten. Wir unterschieden stark und schwach gefärbte Kerne. Die kleinen homogenen Kerne sind intensiv gefärbt, während an den grossen granulirten Kernen sich blos die Nucleomikrosomen intensiv tingiren. Dieser Unterschied im Phosphorgehalte scheint der Ausdruck verschiedener Entwicklungsstadien der Knorpelzellen zu sein. Wir brachten Knorpelstücke in Orthophosphorsäure und behandelten sie nachher nach unserer Methode. Es kam dabei dasselbe Phänomen wie bei den Knochen zu Stande: riesige Niederschläge und schmutzige schwarze Färbung. Wir durchtränkten feine Knorpelstücke mit Nucleinsäure. Hiernach färbte sich die nucleinisirte Grundsubstanz ziemlich stark.

Nervenzellen. Wir prüften Nervenzellen der Maus und des Kaninchens. Zu diesem Ende härteten wir ein Kaninchengehirn in Salpetersäure, fertigten Schnitte an und behandelten sie nach unserer Methode. Wir fanden an diesen Präparaten, dass die Rinde intensiver gefärbt ist als das Mark. Bei der mikroskopischen Untersuchung der Präparate war die Orientirung durch die diffuse braune Färbung der Rinde erschwert. Jedenfalls konnten wir feststellen, dass in einer Reihe von Nervenzellen das ganze Cytoplasma stark gefärbt war, während sich der Kern viel schwächer färbte. Manchmal sind die Kerne gar nicht zu erkennen. An denselben Schnitten aber konnten wir Kerne sehen, welche sehr gut gefärbt waren. Es ist möglich, dass diese Kerne der Neuroglia angehören.

Nieren. Das ganze Cytoplasma der Nierenepithelien ist phosphorreich, und zwar enthalten sie salzartig gebundene Phosphorsäure, was daraus zu schliessen ist, dass die Reaction sofort eintritt. Es steht dies wahrscheinlich in Beziehung mit der freien Phosphorsäure des Harns.

Muskeln. Wir prüften auf ihren Phosphorgehalt die quergestreiften Muskelfasern des Frosches und der *Melolontha vulgaris*. Die Muskeln ergaben das frappanteste Resultat und waren ein sehr werthvoller Probirstein für die Beweisfähigkeit unserer Methode. Der Muskel enthält bekanntermassen grosse Mengen von Phosphorsäure, welche wahrscheinlich als Kaliumphosphat in demselben enthalten ist. Wir erwarteten also vom Muskel sofortige und intensive Reaction, was sich auch in ausgiebigem Maasse bestätigte. Nachdem die Muskeln ein paar Minuten in Ammoniummolybdat verweilten, tritt mit Pyrogallol eine derart intensive Färbung ein, dass man unter dem Mikroskop an den Präparaten beinahe nichts unterscheiden kann. Wenn wir die Präparate in Farrant'scher Mischung sich ein wenig entfärben liessen, dann konnten wir leicht beobachten, dass die Phosphorreaction besonders an die dunklen Streifen gebunden ist. Wir sind demnach geneigt, zu glauben, dass die dunklen Streifen phosphorsäurereicher sind als die hellen.

Zum Schlusse wollen wir noch auf einen Gedanken hinweisen, welcher sich uns bei der Sichtung unserer Resultate aufdrängte. Wir sahen, dass die Zellkerne der entwicklungs-fähigen jungen Zelle immer sehr phosphorreich sind, dass aber in Zellen, bei welchen die Fortpflanzungsfähigkeit in den Hintergrund tritt, um einer specifischen Function Platz zu machen, der Zellkern seinen Phosphor grösstentheils verliert. Als Beispiel citiren wir die Nervenzellen, welche, ihr Fortpflanzungsvermögen einbüssend, psychische Functionen übernehmen. Die neueren Arbeiten auf diesem Gebiete haben experimentell gezeigt, dass die Ganglienzellen der erwachsenen Säugethiere sich nicht mehr vermehren können. Es ist also der Gedanke sehr schwer abzuweisen, dass der Phosphorgehalt ein steter Begleiter des Fortpflanzungsvermögens ist. Diese Annahme entspricht den Untersuchungen von Kossel¹⁾ über den Nucleïngehalt der embryonalen Gewebe im Vergleich mit den Geweben der erwachsenen Thiere; sie findet auch eine Bestätigung in einer neueren Arbeit von Szymkiewicz²⁾, welche ergab, dass die Leberzellen am reichsten an Phosphor in der Fötalperiode sind und dass ihr Phosphorgehalt gleich nach der Geburt sehr stark abnimmt, um mit der weiteren Entwicklung der Thiere noch mehr abzunehmen. Es wird sich hier wohl um den Phosphor des Nucleïns handeln.

Zum Schluss sei es uns gestattet, dem Herrn Professor Kossel für das warme Interesse, welches er am Fortgang unserer Untersuchungen nahm, innigst zu danken.

¹⁾ A. Kossel, Zur Chemie des Zellkerns, Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. 7, Heft 1. — Derselbe, Gewebelehre von Schiefferdecker und Kossel, I. Theil, Braunschweig 1891, S. 57 und 232.

²⁾ F. St. Szymkiewicz, Ueber den Schwefel- und Phosphorgehalt der Leberzellen des Rindes in den verschiedenen Lebensaltern. (Inaug.-Dissert., Dorpat 1891.)
