

Die Mikrochemie der Mitose, zugleich eine Kritik mikrochemischer Methoden.

Von

Dr. med. L. Heine,
Assistenten am physiologischen Institut in Marburg.

(Aus dem Laboratorium des Physiologischen Institutes zu Marburg.)
(Der Redaction zugegangen am 7. März 1896.)

Bei den Untersuchungen über das Vorkommen der Nucleinsäure in den Organen hat sich ergeben, dass sie aus einzelnen Organen, z. B. aus der Thymusdrüse des Kalbes und den Spermatozoen des Lachses mit Leichtigkeit dargestellt werden kann, während andere zellenreiche Gewebe, z. B. die Pankreasdrüsen, die schwer zersetzlichen Verbindungen der Nucleinsäure mit Eiweiss liefern. Da die ungepaarte Nucleinsäure sehr eigenthümliche Eigenschaften besitzt, welche in den gepaarten Verbindungen mit Eiweiss mehr oder weniger verschwunden sind, so liegt der Gedanke nahe, dass die Bildung und die Zersetzung dieser Verbindungen ein physiologisch bedeutungsvoller Vorgang sei, der mit wichtigen Funktionen des Zellkerns in engem Zusammenhange stehe. Besonders erwünscht müsste es sein, einen Zusammenhang zwischen den morphologischen Vorgängen bei der Mitose und den chemischen Veränderungen der Nucleinsubstanzen aufzufinden. Die Resultate, welche Lilienfeld mit der Ehrlich'schen Färbung erhalten hat, schienen darauf hinzuweisen, dass bei denjenigen Zuständen, wo eine morphologische Sonderung innerhalb des Zellkerns vor sich geht, auch eine chemische Dissociation der Kernbestandtheile, eine Abtrennung der Nucleinsäure von Eiweiss, also eine Bildung ungepaarter Nuclein-

säure aus den Nucleinen eintrete. Nach Liliensfeld¹⁾ gibt freie Nucleinsäure eine grüne, Eiweiss eine rothe, Nucleine oder Nucleoproteide eine blaue Färbung mit diesem Farbgemisch. Dementsprechend soll in ruhenden Kernen eine blaugrüne, in mitotischen Kernschleifen hingegen eine für freie Nucleinsäure charakteristische Grünfärbung eintreten.

In der Weiterverfolgung dieses Gedankens suchte ich durch mikrochemische Untersuchungen genauer die verschiedenen chemischen Substanzen bezw. die Chronologie des «Freiwerdens» der Nucleinsäure festzustellen.

Dass dieser Gedanke der Ausgangspunkt der Arbeit war, kommt vielleicht der Glaubwürdigkeit des Gefundenen zu gute, denn ich fand das Gegentheil: Das Wesen der Mitose scheint mir demnach nicht in einer chemischen Dissociation der Nucleinstoffe zu bestehen, die Substanzen scheinen vielmehr ihre Eigenthümlichkeit als Eiweissverbindungen der Nucleinsäure zu bewahren, nur ihre physikalische Gruppierung wird in der Mitose, vermuthlich zum Zweck der genauen Halbierung, vereinfacht.

Die Untersuchungsmethoden.

Die Methoden, welche uns zur Verfügung stehen, um amorphe chemische Bestandtheile der Zelle unter dem Mikroskop zu erkennen, sind folgende:

1. Farbenreactionen der zu suchenden Stoffe, z. B. Millon's Reaction der Eiweisskörper, Jodreaction der Stärke.
2. Die Löslichkeitsverhältnisse.
3. Das Verhalten gegen Farbstoffe (in der metachromatischen Färbung mit Lakmus, Congo, Methylviolett etc., oder elective Färbung mit Farbgemischen).

Wir beginnen mit der Betrachtung der letzteren, da diese bei den Nucleinstoffen bisher vorwiegend benützt sind. Die Anwendung des Gemisches von einem basischen mit einem sauern Farbstoffe ist bisher vorwiegend von folgendem Ge-

¹⁾ Verh. der Berl. physiol. Ges., s. Arch. f. (An. u.) Phys. 93, S. 395.

sichtspunkte aus erfolgt: Die in den mikroskopischen Objecten enthaltenen Säuren nehmen in Folge der Wahlverwandtschaft die basischen Farbstoffe auf, so z. B. die Nucleinsäure das Methylgrün, die basischen Substanzen, z. B. Histon, den saueren Farbstoff (in diesem Falle Rubin S¹). Metachromatische Farbstoffe, Lakmus, Congo, Methylviolett, Alkannin, verändern ihren Farbton, je nachdem saure oder basische Stoffe vorherrschen.

Man würde aber zu unrichtigen Schlüssen gelangen, wenn man diese wohldefinierten chemischen Affinitäten allein zur Beurtheilung des Färbeprocesses heranziehen wollte. Die neueren Untersuchungen über den Färbeprocess und die Versuche über das Absorptionsvermögen fester Stoffe für gelöste Bestandtheile haben vielmehr gezeigt, dass hier noch andere, weniger gut gekannte Vorgänge im Spiele sind, welche z. Th. auf Bildung sehr lockerer, in stetiger Dissociation befindlicher chemischer Verbindungen²), z. Th. auch auf denjenigen physikalischen Vorgängen beruhen, welche man nach E. du Bois-Reymond's Vorgang als Adsorption bezeichnet³). Um zu zeigen, welchen Täuschungen man unterliegen kann, wenn man diese Vorgänge ausschliesslich auf chemische Wahlverwandtschaft im gewöhnlichen Sinne zurückführt, braucht man nur Thier- oder Holzkohle mit dem Ehrlich'schen Gemisch zu schütteln; je nach den Bedingungen beobachtet man dann, dass die Flüssigkeit eine grüne oder rothe Farbe annimmt. Bald wird also der saure, bald der basische Farbstoff von der Kohle aufgenommen. Auch folgender Versuch ist in dieser Beziehung lehrreich: Behandelt man frisches Fibrin und zugleich Fibrin, welches einige Zeit mit Alkohol oder Wasser gekocht worden ist, gleichlange mit Methylgrün-Rubin S und wäscht dann mit 96 proc. Alkohol aus, so ist das letztere noch blauviolett zu einer Zeit, wo das erstere schon rein roth ist, schliesslich wird es aber auch roth. Demnach darf es nicht wunderbar erscheinen, dass chemisch analoge Theile je nach ihrer physi-

¹) Lilienfeld l. c.

²) van Bemmelen, ü. d. Bindung gelöster Stoffe durch Kieselsäure u. s. w., Journal f. pract. Ch., 1881, 23, S. 324.

³) Ostwald, allg. Chemie, Bd. I, 1885, S. 790.

kalischen Beschaffenheit ein verschiedenartiges Verhalten zu Farbstoffen zeigen können¹⁾, und dass die Vorbehandlung unter Umständen einen wesentlichen Einfluss auf die mikroskopischen Färbungsmethoden zeigen kann. Auch entsprechen die Angaben des Forschers über die Kernfärbung durchaus nicht dem Schema, welches man bei einseitiger Berücksichtigung der chemischen Eigenschaften erwarten sollte. So färbt sich nach Miescher²⁾ die dicke Hülle der Spermatozoenköpfe des Rheinlaches (Sitz der Nucleinsäure) durchaus nicht intensiv mit Safranin, Methylgrün u. s. w., wohl aber der Inhalt der Köpfe, welcher kein Nuclein enthält. Zacharias³⁾ behauptet, dass die Kopfhüllen (ganz bes. aber nach Behandlung mit 0,3% HCl) ausgesprochen kyanophil seien (Methylenblau als Typus der basischen Farbstoffe angenommen, man wird also besser basiophil sagen). In auffallendem Gegensatz zu allen gewöhnlichen Annahmen steht auch folgende Stelle in Hertwig's «Die Zelle und die Gewebe». S. 35 findet sich dieses Citat von Fol: «Der färbbare Theil des Zellkerns (das Nuclein), verhält sich dem an ihn gebundenen Farbstoff gegenüber wie ein schwach alkalischer Körper». Auch darüber, ob ein Farbkörper sauer oder basisch ist, findet man abweichende Angaben, wenigstens führt Waldeyer in seiner Arbeit über die Zelle⁴⁾ das Safranin, diesen specifischen Kernfarbstoff unter den saueren Farbstoffen auf. Er färbt ja allerdings auch die echten Nucleolen sehr gern. Auch das Hämatoxylin erklärt Benda für eine Farbsäure⁵⁾. Vielleicht erklären sich obige Differenzen daraus, dass die verschiedenen Autoren verschiedene Fixirungs- bzw. Härtungsflüssigkeiten anwendeten. So färben sich nach meinen Versuchen z. B. in Salamander-

¹⁾ Georgievics und Löwy: Ueber das Wesen des Färbeprocesses. Monatshefte f. Chemie, XVI, 1895, S. 345.

²⁾ Fragments physiologiques sur le saumon du Rhin, Arch. des sciences physiques et naturelles, 3^e période, T. XXVIII, Genève, dec. 1892.

³⁾ Ueber Chromatophilie, Ber. d. Deutschen Botan. Gesellschaft, Bd. XI, 3. Heft.

⁴⁾ D. Med. Wochenschr., 1895, Nr. 43 ff.

⁵⁾ Berl. Ges. f. Psychiatr. u. Nervenkr., (s. Arch. f. Psych., Bd. XXII, 1894, S. 918).

hoden, die nach Hermann fixirt wurden, die Kerne mit Ehrlich-Biondi'scher Lösung roth, (RubinS), Spermatozoenköpfe und Mitosen roth-orange. Grün war nur das Celloidin! Aehnliche Verhältnisse findet man auch bei Formolpräparaten. Weitere Widersprüche finden sich zwischen Liliensfeld und Zacharias. Nach ersterem färbt sich durch Alkohol gefälltes Eieralbumin gar nicht¹⁾, nach letzterem jedoch rein roth (RubinS)²⁾. Ferner ist im Ovovitellin der Complex der Paranucleinsäure enthalten, diese lässt sich isoliren und tingirt sich nach meinen Versuchen rein grün, das Ovovitellin jedoch tingirt sich rein roth; nach Liliensfeld³⁾ müsste man entsprechend dem Nucleohiston eine Mischfarbe verlangen. Das Nucleohiston färbt sich übrigens nach meinen Untersuchungen auch ziemlich rein grün. Es wird dabei auch auf die Einhaltung einer bestimmten Methode ankommen. Ich habe 1,9 gr. RubinS-Kryst. in 200 cbcm. 50% Alk., 1,7 gr. Methylgrün ebenfalls in 200 cbcm. 50% Alk. gelöst, diese Lösungen zu gleichen Theilen zusammengegossen, 10fach verdünnt, die Schnitte bezw. Substanzen bis zu 5 Minuten darin gelassen und dann eben so lange in 96% Alk. ausgewaschen. (Vergl. dazu das oben über frisches und gekochtes Fibrin Gesagte.) Zu berücksichtigen ist hierbei auch, dass sich Schnitte, welche mehrere Wochen resp. Monate in Mikroskopirschalen mit ursprünglich 70% Alkohol gelegen haben, viel weniger intensiv mit dem grünen Farbstoff beladen. Vielleicht ist durch das Wasser nach Verdunsten des Alkohols das Chromatin grossentheils gelöst oder zersetzt. Man muss die Schnitte also ziemlich schnell verarbeiten.

Wenn somit die Farbstoffe auch wichtige Hilfsmittel für die mikrochemische Untersuchung darstellen, so kann doch auf sie allein eine Entscheidung nicht gegründet werden (über einige andere Farbstoffe s. u.). Wir wollen nunmehr einen Blick auf die Lösungsmittel und ihren Werth für die mikrochemische Lokalisation der Nucleine werfen.

¹⁾ L. c.

²⁾ Ueber Chromatophilin (l. c.), S. 189.

³⁾ L. c.

Miescher¹⁾ schreibt S. 69: «Bei der Aufsuchung des Nucleïns in den Geweben wird man die gewöhnlichen histochemischen Reactionen, Verhalten gegen Lösungsmittel u. s. w. nicht als letzte Instanz anrufen dürfen. Die Vergleichung des so resistenten Stiersamens mit dem in Wasser verquellenden Karpfensperma zeigt, dass tief greifende Verwandtschaft der chemischen Struktur mit den grössten Unterschieden im äusseren Verhalten Hand in Hand gehen kann. Vielmehr wird man, wo es irgend angeht, sich den Rücken durch Elementaranalysen decken müssen». Das ist in der That wenig ermuthigend. Auch die Pepsinsalzsäure gehört zu diesen nur mit Vorsicht für die Diagnose der Nucleïne zu verwendenden Lösungsmitteln, denn schon nach 1—1½ stündiger Verdauung bei 40° C. sind Salamander-Spermatozoonköpfe und Mitosen völlig ausgelaugt (s. u.).

Was nun drittens die Farbenreactionen im engen Sinne anbelangt, so gibt Berl.-Blau- und Millon'sche Reaction ebenso wie die Jodreaction sehr schwache Zeichnungen, in denen man nicht viel Einzelnes sehen kann.

Die Lilienfeld-Monti'sche Molybdänreaction in der von Pollacci modificirten Gestalt gibt gute Bilder, tritt aber, wie ich nachgewiesen habe, nicht allein mit Phosphor, sondern auch mit phosphorfreiem Eiweiss und anderen Stoffen ein²⁾. Die Reduction des gebundenen Molybdännitrates ist am besten nach Pollacci³⁾ mit wässriger (oder 5% alkoholischer) Zinnchlorürlösung zu bewirken.

Ziehen wir aus allen diesen Ueberlegungen das Schlussresultat, so müssen wir uns dahin aussprechen: Es gibt zur Zeit noch keine Untersuchungsmethoden, welche mikrochemisch gestatten, die Nucleïnsubstanzen — Nucleoproteïde, die verschiedenen Nucleïne, Nucleïnsäuren, Paranucleïnsäuren und deren Salze — genauer unter sich zu unterscheiden und demnach zu lokalisiren. Dass die Millon'sche, die Berl.-Blau- und die Molybdänreaction überall da, wo wir Chromatin an-

¹⁾ Die Spermatozoen einiger Wirbelthiere. Verhandlungen der naturforsch. Ges. in Basel, VI, Heft 1, S. 138—208, 1874.

²⁾ Lilienfeld und Monti, Zeitschr. f. physiol. Ch., Bd. 17, S. 410.

³⁾ Ref. in der Zeitschr. f. wiss. Mikr., XI, 4, S. 539.

nehmen, positiv ausfallen, scheint dafür zu sprechen, dass die ungepaarten Säuren (Nucleinsäure und Paranucleinsäure) und ihre eiweissfreien Salze in Spermatozoenköpfen und Mitosen nicht vorkommen. Betreffs der Mitose kann ich demnach nur nachweisen, dass sich die in den Chromosomen enthaltenen Substanzen durch unsere mikrochemischen Untersuchungsmethoden nicht von denen des sogenannten ruhenden Zellkerns, sowie — soweit kann ich meine Ausführungen erweitern — von denen der Salamander-Spermatozoenköpfe unterscheiden lassen. Diese Behauptung wird durch die nachfolgenden Ergebnisse begründet.

Resultate der Untersuchung.

Wegen der Grösse der mikroskopischen Objecte, insbesondere der Kerne, wählte ich den gefleckten Salamander und den Erdmolech (*Triton crist.*). Die Fixirung darf natürlich nur in Alkohol geschehen und zwar zuerst in 90 proc., dann in Alk. abs. je für wenige Stunden. Dann Einbettung in Celloidin und Zerlegung in möglichst gleichdicke Schnitte (10—15 μ).

Was zunächst durch Tinktionen festzustellen ist, ist folgendes. Spermatozoenköpfe und Mitosen färben sich mit Rubin-S-Methylgrün grün, die ruhenden Kerne haben in der That einen blauen Ton, sieht man jedoch genau zu, so erkennt man, dass denn doch das Chromatingerüst der Hauptsache nach grün ist und nur — weil von einer roth gefärbten Substanz eingeschlossen — blau erscheint (s. u.). Freilich braucht man dazu ausgezeichnete optische Instrumente. (Mir stand ein Mikroskop von Zeiss (Homog. apochr. Immers. mit Compens-Ocularen) zu Gebote.) Alles übrige — Spermatozoen-, Mittel- und Schwanzstück, Cytoplasma, achromatische Figur, Centrosomen, Hermann'sche Körper mit Ring¹⁾ — färbt sich roth. Rothe sowohl wie blaue concentrirte wässrige Lakmuslösung bringt eine nur wenig scharfe, allgemeine Rothfärbung zu Stande.

Methylviolett färbt nur die chromatischen Theile blauviolett, nach Behandlung mit 0.8% HCl mehr violett (s. u.).

¹⁾ S. Beiträge zur Histiol. des Hodens, I. c.

Alkannin, rothe wie blaue alkoholische Lösung, gibt nur Rothfärbung.

Phenolphthaleïn, violettes wie farbloses, färbt nichts. Blaues Congo färbt ebenso wie rothes die chromatischen Theile weniger roth als die achromatischen.

Somit ergeben also einfache Tinktionsmethoden keinen Unterschied der Mitosen und Spermatozoenköpfe gegenüber den ruhenden Zellkernen.

Schliessen wir daran die Betrachtung der eigentlichen Farbenreactionen, so ist zu erwähnen, dass die Millon'sche und die Berl.-Blau-Reaction überall da die intensivste Färbung geben, wo Chromatin lokalisiert ist. Diese zwei Reactionen geben jedoch in den von mir untersuchten Objecten, gleichwie die Behandlung mit Jod (in Jodkalium), zwar übereinstimmende, doch wenig markante Zeichnungen, so dass ich ihnen die Molybdänreaction zum Nachweis des Eiweisses bei Weitem vorziehe. Auch diese Methode gibt überall da die intensivste Zeichnung, wo Chromatin ist, sie färbt aber auch Spindelfiguren, Polkörperchen, Spermatozoenschwänze, Cytoplasma u. s. w. Auch sie gibt keine Differenzirung der Mitosen gegenüber den ruhenden Zellkernen — abgesehen natürlich davon, dass die Chromatinschleifen dunkler erscheinen, weil hier das Chromatin auf einen kleinen Raum zusammengezogen ist, während es in dem ruhenden Zellkern über den ganzen Kern fein vertheilt ist.

Wenden wir uns nun zu den Lösungsmitteln, um zu sehen, was sich nach der Behandlung mit diesen durch nachfolgende Färbung noch kenntlich machen lässt.

Zunächst muss hier leider von manchem charakteristischen Lösungsmittel abgesehen werden, da die Eigenthümlichkeiten der Nucleïnsubstanzen in dieser Beziehung nach Alkoholbehandlung vielfach verloren gehen. So konnte ich z. B. mit Kochsalzlösung (10%), mit Lösung von Na_2HPO_4 (1%), Soda (1%), Ammoniak (10%) keine bestimmten Veränderungen — abgesehen von geringen Quellungen — selbst nach 10—20stündiger Behandlung constatiren. Zumal Mitosen und Spermatozoenköpfe verhalten sich gegen diese Stoffe durchaus indifferent, was, wenn freie Nucleïn Säure eine ausschlaggebende

Rolle spielte, schwer einzusehen wäre. Demgegenüber setzte ein wochenlanges Liegen der Schnitte in destill. Wasser die Tingirbarkeit wesentlich, in allen chromatischen Theilen gleichmässig für alle angewandten Methoden herab. (Methylviolett, Grünfärbung bei Anwendung von Rubin-S-Methylgrün, Molybdänreaction, Eisenhämatoxylinreaction u. s. w.)

Behandlung der Schnitte mit HCl 0,3% (8 chem. rauch. HCl i. L) für 12 - 15 St. bewirkten nach meinen Beobachtungen durchaus nicht, wie Zacharias¹⁾ angibt, eine erhöhte Empfänglichkeit des Chromatins für basische Farbstoffe, was dieser Forscher mit der Lösung von Protamin in Beziehung bringt, sondern setzte in sämtlichen chromatischen Substanzen die Farbreaction, zumal die Grünfärbung mit Ehrlich's Farbmischung wesentlich herab. Bei der Methylviolettreaction schlug die blauviolette Reaction des Chromatins sonderbarerweise in ein deutliches Rothviolett um; wenn die Entfernung des Protamins oder einer anderen Base den Ausschlag gäbe, hätte man Blaufärbung erwarten müssen. Auch Molybdän- und Eisenhämatoxylinreaction waren beträchtlich herabgesetzt. Selbstverständlich müssen die Schnitte nach Behandlung mit den betr. Agentien gründlichst in destillirtem Wasser ausgewaschen werden. Geringe Mengen zurückgehaltener Säuren oder Alkalien erhöhen die Tingirbarkeit.

Salzsäure (4 Theile conc. Säure mit 3 Theilen Wasser) löste Alles, was sich mit Ehrlich-Biondi's Mischung grün färbte, auf, es blieben nur noch morphologisch erkennbar röthlich gefärbt die Kopfhüllen und Schwänze der Spermatozoen, die Plastingerüste der ruhenden Kerne und die Hüllen (Plastin) der Mitosen²⁾. Methylanilinviolett färbte diese nun deutlich blau. Molybdän gab die entsprechende Reaction, Eisenhämatoxylin ebenso.

Sehr verdünnte Natronhydratlösung ($\frac{1}{10}$ normal = 0,4%) wirkte ganz ähnlich, doch nicht so deletär. Die Spermatozoenköpfe waren wie ausgelaugt, die Hüllen (und Schwänze) blieben

¹⁾ L. c.

²⁾ «Plastin» hier immer im Sinne Zacharias' Cytoplasma und Zellkern. Ber. der deutschen Bot. Ges., 1893, XI, S. 5.

wie bei Behandlung mit HCl (4:3) zurück, und in den ruhenden Kernen die Plastingerüste.

Bei den in Theilung begriffenen Kernen kann man nun hier auf das Deutlichste sehen, dass das Chromatingerüst des Kerns eigentlich ein Plastingerüst ist, in dessen hohlen Balken das Chromatin drinsitzt. Wird dieses letztere durch Natronlauge ($\frac{1}{10}$ norm.) oder durch Salzsäure (4:3) oder durch Pepsinsalzsäure ausgelaugt, so bleibt das Plastin und im Innern dieses Balkenwerkes (nicht etwa dazwischen) vom Chromatin das Negativ zurück. Die Mitosen stellen sich dann wohl erkennbar als Hohlräume dar, deren Plastinhülle Molybdänreaction, Blaufärbung mit Méthylanilinviolett-, Eisenhämatoxylin-Reaction und rothe Reaction mit Ehrlich's Mischung geben.

An solchen mit Pepsinsalzsäure, HCl (4:3) oder NaOH ($\frac{1}{10}$ norm.) behandelten Schnitten sieht man nun ausser diesen Plastinhüllen der Chromosomen noch, zwar verwaschen, doch unverkennbar, die achromatische Spindelfigur, deren Fäden sich an den Plastinhüllen inseriren. Demnach ist wahrscheinlich die das Centrosom umgebende Strahlung der Hauptsache nach als eine Plastinstrahlung anzusehen, die sich bis in das Kernplastingerüst fortsetzt. Es vereinfacht sich also das complirte Kerngerüst (Plastingerüst mit Nuclein-Chromatinfüllung) in der Mitose soweit, dass es in Gestalt der Schleifen ziemlich übersichtlich vor uns liegt. Das Plastin des Kerns wird also zur Hülle der Chromosomen, das des Zelleibes zur Centrosomenstrahlung mit Insertion theils an den Chromosomenhüllen, theils an der Zellmembran.

A n h a n g.

Bei der Anwendung eines Gemisches von 2 basischen Farben erhielt ich Färbungen, die für die oben dargelegte Abhängigkeit der elektiven Tinktion von physikalischen (d. h. nicht chemischen) Zuständen nicht uninteressant sind: ich füge deshalb Einiges davon hier an.

Wenn bei Färbung mit Rubin-S-Methylgrünmischung durch den rothen (sauern) Farbstoff die basischen, durch den grünen (basischen) Farbstoff die sauern Eiweisskörper gefärbt

werden sollten, so erschien es mir rathsam, bei der Färbung auf die im vorliegenden Falle weniger interessirenden (basischen) Eiweisskörper überhaupt zu verzichten und durch Anwendung eines Gemisches von 2 basischen Farben eine um so genauere Differenzirung der sauren (vermuthlich Nuclein-)Stoffe zu erreichen. Ich benutzte dazu eine Mischung von Methylgrün und Saffranin, kam jedoch zu dem Resultate, dass es völlig von physikalischen Verhältnissen abhängt, welcher von beiden Farbstoffen im Schnitt fixirt wurde, so dass er durch 96 proc. Alkohol nicht so leicht ausgezogen werden konnte. Bei dieser Methode trat an den Zellkernen der Salamanderhoden eine sonderbare Zeichnung ein: auf der dem Centrum des Organs zugewandten (also auf der der Alkoholwirkung entgegengesetzten) Seite zeigten die periphersten Zellkerne am deutlichsten, die weiter nach innen gelegenen immer weniger ausgesprochen einen bisweilen geradezu zipfelmützenartig ausgezogenen, meist kugelförmigen stumpfen roth gefärbten Pol, während das Chromatingerüst des Kerns grün oder blau tingirt war. Auf der diesem Pol entgegengesetzten Seite war der Kern vielfach nicht scharf kontourirt, verbreitert und bisweilen geradezu geplatzt. Dass dieses als eine Alkoholwirkung anzusehen ist, wurde mir durch weitere Versuche klar, wie aber diese sonderbaren Formen zu Stande kommen, kann ich nicht sagen. Dass es keine vitale Erscheinung ist — etwa negativer Chemotropismus — scheint mir dadurch bewiesen, dass man die Erscheinung in der gleichen Weise an Hoden findet, welche zur Ausschaltung vitaler Prozesse längere Zeit Chloroformdämpfen ausgesetzt oder $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde in 1 proc. Natriumfluoridlösung (Arthur¹⁾) gelegen hatten. Es muss also wohl Schrumpfungerscheinung sein. Schneidet man den frischen Hoden mitten durch und wirft die zwei Hälften in Alkohol, so richten sich die rothen Pole dem Mittelpunkt je ihrer Hodenhälfte zu. Verzichtet man auf eine Fixirung im eigentlichen Sinne und härtet in Alkohol von ansteigender Konzentration, so ist die Erscheinung viel weniger deutlich und der betreffende

¹⁾ S. Maly's Berichte, Bd. 22, S. 132. Glycolyse dans le sang. Compt. rend., 114, S. 605.

Kernpol färbt sich nun grün oder blau. Monaster in der Peripherie des Schnittes werden oft halb roth, halb blau violett gefärbt, ja bisweilen liess ein Schleifenschenkel zwei Farben deutlich unterscheiden. Am Darm waren diese rothen Pole alle dem Lumen zugerichtet, wurde jedoch der Darm frisch der Länge nach aufgeschnitten und aufgefaltet, mit der Peritonealfläche auf Kork fixirt und nun in Alkohol geworfen, so waren die Pole dem Darmlumen abgewendet.

Behandelt man derartige Schnitte vor der Färbung mit sehr schwacher Säure ($\frac{1}{10}$ norm. Essigs. oder Oxals.), von der man sicher ist, dass sie nicht chemisch verändernd auf das Chromatin einwirkt, so färbt sich nun alles, was vorher eine differente Färbung annahm, nur noch roth, nach entsprechender Behandlung mit sehr verd. Ammoniaklösung nur noch grün. Behandelt man erst mit Säure, dann mit Alkali, dann wieder mit Säure, so erhält man Färbungen, als ob man nur mit Säure behandelt hätte. Es wird sich also um eine Schrumpfung durch Säure, um eine Auflockerung durch Alkali handeln. Zu dieser Erklärung würde passen, dass das Molekül des Methylgrünes grösser ist als das der Saffranine¹⁾. Auch manches andere Experiment mit anderen Organen und Vergleichung der Farbeffecte mit den Farbreactionen der aus diesen Organen dargestellten chemischen Substanzen bewies mir, dass physikalische Verhältnisse bei diesen Tinktionen ausschlaggebend sind. So färben sich z. B. im Störhoden die reifen Spermatozoenköpfe grün, die Zellkerne blau violett, die aus demselben Hoden makrochemisch isolirten Spermatozoenköpfe aber (als Ausgangspunkt zur Gewinnung von Nucleinsäure) rein roth.

Demnach darf man aus den Bildern, die man nach Anwendung zweier basischer Farben erhält, keine Schlüsse auf die chemische Natur der gefärbten Bestandtheile ziehen, zumal nicht nach Fixirung in Flüssigkeiten von chemisch äusserst starken Affinitäten (Triacidmischung). So benutzt Field²⁾

¹⁾ S. Schultz-Julius tabellar. Uebersicht der künstl. org. Farbstoffe, Berlin 1891).

²⁾ Ref. im Centralblatt f. Phys., 1894, S. 26.

eine Mischung von Saffr. und Dahlia, Hermann in seiner schönen Arbeit über die Histiologie des Hodens¹⁾ Saffr.-Gentiana, Ehrlich Fuchsin-Methylgrün, ferner Scharlach und unreines Methylgrün (beides Mischungen zweier basischer Farben). Jedenfalls unterliegen auch Färbungen mit 2 sauren Farben, wie sie vielfach angewendet werden, sehr physikalischen Zuständen, so dass ich bei den oben ausgeführten Untersuchungen aus der Ehrlich-Bondi'schen Mischung Orange wegliess.

Es sei mir erlaubt, meinem Chef, Herrn Professor Kossel, auch an dieser Stelle dafür zu danken, dass er stets freundlichst bereit war, mich bei diesen auf seine Veranlassung unternommenen Untersuchungen mit Rath und That zu unterstützen.

³⁾ Arch. f. mikr. An., 1889, II, S. 64 und 65.

Druckfehler - Berichtigung.

Seite 1 dieses Bandes, Zeile 14 von unten liess Schweinepepsins statt Kalbspepsins.
