

Ueber einige mikrochemische Reactionen.

Von

Constantin Saint-Hilaire,

Assistent am Histologischen Laboratorium der Kais. Universität in St. Petersburg.

(Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 17. August 1898.)

Als ich diesen Sommer unter der Leitung des Herrn Prof. A. Kossel die mikrochemischen Reactionen studirte, versuchte ich unter anderem eine Methode zum Nachweis der Harnsäure in loco zu finden. Auf den Rath des Herrn Prof. A. Kossel habe ich dazu das schwer lösliche Salz der Harnsäure mit Kupferoxydul angewandt. Kupferoxydul wird aus der Lösung durch Harnsäure aufgenommen und dort fixirt, wo Harnsäure in den Geweben abgelagert ist. Das fixirte Kupfer kann durch Ferrocyankalium nachgewiesen werden, indem sich ferrocyanwasserstoffsaures Kupferoxydul bildet, welches sich ziemlich schnell zu dem rothbraun gefärbten Oxydsalz oxydirt. Man erhält also einen lebhaft rothen Farbenton an den Harnsäure enthaltenden Gewebetheilen. In der That habe ich ziemlich gut gelungene Präparate der Niere von *Helix pomatia* und des Infarets der Kinderniere erhalten.

Die Methoden waren folgende: 1) Die Präparate waren mit Alkohol gehärtet, in Celloidin eingebettet und in Schnitte zerlegt worden. Die Schnitte wurden für einige Stunden in die Kupfersulfatlösung (10—5^o/o) gelegt, dann direkt in eine siedende gesättigte Lösung von Natriumbisulfit für 1—2 Minuten übertragen. Hierdurch wird die Reduction des Kupferoxyds und damit die Bildung des schwer löslichen harnsauren Kupferoxyduls bewirkt. Die Präparate wurden jetzt sorgfältig aus-

gewaschen und endlich mit einer Lösung von Ferrocyankalium behandelt. Dieselbe Reaction gelingt auch gut, wenn das unfixirte Organ für einige Zeit direkt in eine heisse Lösung des Natriumbisulfits, welche mit so viel Kupfersulfat versetzt ist, dass kein Niederschlag entsteht, gelegt wird; dann wird das Organ ausgewaschen, zerzupft oder in Schnitte zerlegt und mit Ferrocyankalium behandelt.

2) Die Schnitte wurden in eine alkalische Kupferoxydul-lösung gebracht, welche durch Auflösen von Natriumhyposulfid, Seignettesalz und Kupfersulfat (nach dem Recept von Arthaud und Butte¹⁾ bereitet und der ein Zusatz von Natriumcarbonat gemacht war, um eine schwach alkalische Reaction hervorzurufen. Nach sorgfältigem Ausspülen mit Wasser wurden die Schnitte in Ferrocyankaliumlösung übertragen.

Die beiden Methoden geben fast gleiche Resultate: die Harnsäureconcremente sind roth gefärbt.

An einigen Präparaten aber machte ich die Beobachtung, dass auch das Chromatinnetz der Zellkerne gefärbt ist.

Da der Gedanke nahe lag, dass hier die Alloxurkörper, welche sich aus dem Nuclein abspalten, die Ursache der Reaction sind, so versuchte ich diese Reaction direkt an einigen reinen chemischen Präparaten dieser Stoffe, die Herr Prof. Kossel zu meiner Verfügung stellte. Kupferoxydul-lösung ruft einen Niederschlag, der mit Ferrocyankalium eine rothe Färbung gibt, nicht nur in den Lösungen der Harnsäure, des Adenins, des Hypoxanthins u. a. Basen, sondern auch in den Lösungen von Histon, Protamin (in verdünnten Lösungen oder bei Zusatz des HCl) und ähnlichen Stoffen hervor.

Die durch Kupferoxydulreaction erhaltene Kernfärbung war aber sehr unbeständig, und es war schwer, sich klar zu machen, weshalb sie das eine Mal gelang und das andere Mal nicht zu Tage kam.

Um dies zu ergründen, modificirte ich die Methoden und fand, dass die Kernfärbung constanter ist, wenn die Natriumcarbonatlösung nach der Mischung von Arthaud gebraucht

¹⁾ Maly, Jahresber. f. Thier-Chemie. Bd. XX. S. 180.

wird, auch wenn man an Stelle der Arthaud'schen Lösung zunächst eine Lösung von schwefelsaurem Kupferoxyd (0,3% und dann eine Natriumcarbonatlösung (0,2% wässrige oder alkoholische Lösung) einwirken lässt, oder wenn man die violette alkalische Lösung anwendet, welche man erhält, wenn man Pepton, Histon und andere Stoffe mit Natronlauge und Kupfersulfat versetzt. In heissen Lösungen geht die Reaction schneller und vollkommener vor sich. Kupfersulfat allein gibt nur eine diffuse Färbung, die Gegenwart von Alkali ist also nothwendig.

Man kann nach der Kupfersulfatlösung anstatt Natriumcarbonat auch andere alkalische Lösungen anwenden, wie z. B. eine schwache Lösung von Natronhydrat. Bei der Behandlung mit Alkalien nach Kupfersulfat bekommt der Schnitt einen violetten Farbenton, wie bei der Biuretreaction, weshalb ich auf den Gedanken kam, direkt eine alkalische Peptonkupferlösung anzuwenden. Die letztere gibt oft gute Resultate selbst in den Fällen, wo die zwei ersteren Methoden sich als erfolglos erwiesen. Man bekommt dabei Bilder, die lebhaft an eine schöne Karminfärbung erinnern.

Das alles beweist, dass die Kernfärbungsreaction andersartig ist, als die oben geschilderte Harnsäurereaction. Sie hängt nicht von der Gegenwart des Kupferoxyduls ab, sondern wird durch Kupferoxydsalz bei Gegenwart von Alkali hervorgerufen. Die Bindung des Kupfers erfolgt also ebenso wie bei der Biuretreaction. Wir sind berechtigt, sie als eine modificirte Biuretreaction zu betrachten und zunächst auf diejenigen Bestandtheile der Gewebe zu beziehen, welche die Biuretreaction geben. Der Umstand aber, dass die Reaction auch manchmal in Kupferoxydullösung vorkommt, kann dadurch erklärt werden, dass manche Kernstoffe (Histon, Protamin) durch Kupferoxydul fällbar sind, wie ich oben erwähnt habe.

Für meine Untersuchungen gebrauchte ich sehr verschiedene Objekte, wie: Gewebe des Tritons und des Frosches, Niere des Kindes und der Ratte, Thymus des Kalbes, Haut der Ratte, Muskeln und andere Organe des Flusskrebses, Leber und Zwitterdrüse von Helix u. a. Die meisten dieser Präparate

sind sehr gut gelungen, es waren aber darunter auch solche, bei denen ich keine Kernfärbung hervorrufen konnte, wie z. B. bei der Niere des Tritons. In diesen Fällen habe ich die Bemerkung gemacht, dass an Stelle des Kernes das Protoplasma gefärbt war. Das nähere Studium hat mir gezeigt, dass der Grund dieser Erscheinung in der Fixirung der Objekte liegt.

Es fragt sich nun, welcher Bestandtheil des Kernes gibt zu dieser Reaction Veranlassung? Um diese Frage zu ergründen, machte ich eine ganze Reihe von Versuchen über die Wirkung verschiedener chemischer Reagentien auf diese Reaction.

Zunächst war es wichtig zu erfahren, ob sich der fragliche Stoff im Kerne in freiem oder gebundenem Zustande befindet. An frischen Präparaten, wie z. B. in Schnitten des Kalb- oder Froschknorpels, an Muskeln des Krebses und an Thymus konnte ich bei Anwendung aller oben geschilderten Methoden keine Kernfärbung hervorrufen. Eine Fixirung der Präparate erschien unentbehrlich. Es ist also als wahrscheinlich zu betrachten, dass der Stoff von dem die Reaction abhängt, sich in einem gebundenen Zustande befindet. Für die Fixirung kann man sehr viele Lösungen anwenden: Alkohol, Sublimat, verdünnte Essigsäure, Chlorwasserstoffsäure, Magnesiumsulfat, Natriumphosphat, Ammoniumsulfat, Kupfersulfat (10⁰/o).

Wie es scheint, kann der fragliche Stoff sehr leicht aus dem Kern ins Protoplasma übergehen, eine rasche Fixirung ist also nothwendig. In einem grossen Stück, besonders eines compacten Gewebes, können wir oft bemerken, dass in den inneren Schichten das Protoplasma, in den äusseren dagegen die Kerne gefärbt sind. Diese Veränderung in der Färbung dürfte wohl auf die Wirkung gewisser im Protoplasma enthaltener Stoffe zurückzuführen sein.

Dann versuchte ich an gut fixirten Präparaten (z. B. mit Alkohol) vor der Kupferbehandlung den fraglichen Stoff zu lösen. Es ist mir dies in der That gelungen und zwar durch Anwendung der Mineralsäurelösungen (HCl , NH_4OH , H_2SO_4), besonders gut aber dann, wenn ich die Schmitte etwa 5 Minuten der Wirkung siedenden Wassers aussetzte. Nach der Säurewirkung (10 Minuten), lässt der Kern noch ein zartes Chro-

matinnetz mit feinen rothen Körnchen erkennen. Nach der Extraction mit heissem Wasser bekommt man keine Kernfärbung mehr, ebensowenig nach dem Kochen mit schwachen Säurelösungen. In diesen Fällen färbt sich gewöhnlich das Protoplasma anstatt des Kernes, was z. B. sehr deutlich in den Harnkanälchen der Kinderniere zu sehen ist. Das Chromatin wird aber bei diesen Einwirkungen nicht gelöst und kann leicht mit Hämatoxylin gefärbt werden. Die Auflösung des die Kupferreaction gebenden Körpers wird auch durch warmes (60° oder 35°) und selbst durch kaltes Wasser bewirkt (24 bis 48 St.)

Ein interessantes Bild bekommt man, wenn man die Muskeln des Flusskrebses mit irgend einer Lösung fixirt, dann eine Minute im Wasser kocht und nun die Kupferreaction anstellt: die Kerne haben sich allmählich gelöst und erscheinen als dunkle undeutlich konturirte verschwommene Flecken, nur inmitten des Muskelstücks sind sie unverändert geblieben.

Eine ganz umgekehrte Wirkung haben die Alkalien und einige Salze: sie verstärken die Reaction, so z. B. Natriumcarbonat, Natronhydrat, Natriumphosphat, Ammoniumsulfat, Magnesiumsulfat, Calciumhydrat und einige andere: besonders stark aber wirkt Ammoniak, bei dessen Anwendung man eine vollkommene Kernfärbung bekommt. Wenn die Schnitte nach der Ammoniakbehandlung mit Wasser gekocht werden, ist die typische Färbung doch noch zu erhalten. Kocht man die Schnitte mit Wasser, welches Spuren von Ammoniak enthält, werden die die Kupferreaction gebenden Stoffe nicht gelöst: wenn dieselben aber bereits aufgelöst sind, so ist die nachträgliche Behandlung mit Ammoniak ohne Wirkung.

Die erwähnten Reactionen beweisen, dass die Kernfärbung nicht von Adenin oder anderen Alloxurbasen abhängt, wie man vermuthen könnte, da diese nur mit Kupferoxydul unlösliche Verbindungen geben und da sie sich in Alkalien mehr oder weniger leicht lösen.

Zieht man die Löslichkeitsverhältnisse des die Kupferreaction gebenden Körpers in Betracht, so wird man auf das Histon hingewiesen. Dieses nimmt, wie die Biuretreaction

beweist, Kupferoxyd in alkalischer Lösung auf. Es ist in Wasser und in Säuren löslich, durch Ammoniumchlorid, Magnesium- und Ammoniumsulfat, Natriumcarbonat und Natronhydrat fällbar; und vor allem wird es durch Ammoniak niedergeschlagen, was die Wirkung des Ammoniaks auch bei dieser Färbungsmethode gut erklärt. (Kossel¹⁾, Liliensfeld²⁾.)

In welcher Weise die Wirkung der Fixierungsmittel aufzufassen ist, mag vorläufig dahingestellt bleiben. Eine nahe-
liegende Frage ist die, in welcher Form das Histon in den Zellkernen vorhanden sei — ob als freies Histon oder in Verbindung mit Nucleinstoffen als Nucleohiston. Das Verhalten beider zu den Reagentien ist ein verschiedenes und ich habe einige Versuche mit Thymusgewebe angestellt, in der Hoffnung, einiges zur Lösung dieser Frage beizutragen. Ich wählte die Thymusdrüse, weil die Kernstoffe dieses Organs ausführlicher untersucht sind, und es schien mir besonders interessant, das Verhalten des fixirten und des frischen Gewebes zu vergleichen. Diese Versuche sprechen für die Annahme, dass das Histon als Nucleohiston in den Kernen vorliegt. Um das Thymushiston aus dem Gewebe darzustellen, extrahirt man das Nucleohiston mit Wasser, fällt es aus der wässerigen Lösung mit verdünnter Essigsäure, wäscht den Niederschlag mit Alkohol und Aether aus und zersetzt ihn endlich mit schwacher Salzsäurelösung. Ich versuchte dieselben Operationen auf das Thymusgewebe anzuwenden. In der That habe ich mit Wasser Nucleohiston aus den Zellkernen extrahirt, nach dieser Operation ist das Histon dort keinesfalls mehr mikrochemisch zu finden. Wenn ich andererseits das Thymusgewebe mit einer verdünnten Essigsäurelösung fixirt und durch absoluten Alkohol in Celloidin eingebettet hatte, bekam ich auf den Schnitten nur eine sehr undeutliche Kernfärbung. Es ist also zu vermuthen, dass sich hier in den Kernen Nucleohiston befindet, welches keine Kupferreaction gibt. Nach einer gelinden Behandlung der mit Essigsäure fixirten Schnitte mit einer verdünnten Salzsäure-

¹⁾ Zeitsch. f. physiol. Chemie, Bd. VIII, S. 511

²⁾ Ebenda, Bd. XX, S. 89.

lösung (welche zur Extraction des Histons nicht ausreicht), war die Kupferreaction der Kerne intensiver: nach längerer Einwirkung der Säure hingegen bleibt die Reaction völlig aus, offenbar wird hier der kupferbindende Körper ganz gelöst. Ammoniak, nach der Essigsäure angewandt, hat auf die Reaction keinen Einfluss. Aus allen diesen Reactionen müssen wir schliessen, dass eine schwache Essigsäurelösung Kerne in anderer Weise wie Alkohol fixirt. Aus frischem Thymusgewebe zieht Salzsäure in starken sowie in verdünnten wässerigen Lösungen das Histon aus, aber eine alkoholische HCl-Lösung hat diese Wirkung nicht, weil, wenn auch Nucleo-Histon zersetzt wird, doch dessen Bestandtheile im Alkohol nicht löslich sind.

Nach der Behandlung des frischen Gewebes mit Eisessig, der Nucleohiston auflöst, bemerken wir die Kernfärbung nur in den inneren Theilen der Gewebestückchen.

Während Alkalien (Natronlauge, Ammoniak), wenn sie auf Alkoholpräparate einwirken, die Reaction verstärken, verhindern sie dieselbe, wenn sie direkt auf frische Präparate gebracht werden. Alkalische Pepton-Kupferlösung ruft bei frischen Präparaten keine Kernfärbung hervor. Alkoholische Alkalienlösungen sind dagegen gute Fixierungsmittel für den diese Kupferreaction gebenden Körper.

Nach den Angaben von Lilienfeld hat Kalkwasser einen zersetzenden Einfluss auf Nucleohiston, wobei man eine unlösliche Kalkverbindung des Histons bekommt. Stückchen der Thymusdrüse, 2 Tage in Kalkwasser gelassen, geben in der That eine sehr intensive Kernfärbung. Derselbe Verfasser weist darauf hin, dass auch kochendes Wasser diese Zersetzung hervorruft: Histon wird aber dabei coagulirt und Nuclein geht in die Lösung über. Nach der Einwirkung siedenden Wassers bekam ich in Thymus keine Reaction. Man könnte dies durch die Coagulation des Histons erklären: aber es ist mir wahrscheinlicher, dass das Ausbleiben der Reaction in diesem Falle auf eine Lösung des Histons durch das heisse Wasser zu beziehen ist.

Aus allen diesen Reactionen und einigen weiteren Beobachtungen, auf deren Mittheilung ich hier verzichte, glaube

ich den Schluss ziehen zu müssen, dass das Histon in den untersuchten Geweben als Nucleohiston vorliegt.

Das oben Angeführte bestätigt noch besser die ausgesprochene Vermuthung über den Sinn unserer Reaction. Verschiedene Zellen haben Histone, die in ihren Reactionen verschieden sind. Eine mit Hülfe dieser Kupferreaction durchgeführte Vergleichung der Zellen mit Rücksicht auf den chemischen Bau des Kernes, wird meiner Meinung nach interessante Resultate ergeben.

Eine ausführliche Arbeit mit Abbildungen wird später veröffentlicht.

Zum Schluss halte ich es für eine angenehme Pflicht, dem Herrn Prof. A. Kossel meinen herzlichsten Dank für seine bereitwillige überaus freundliche Hülfe und sein beständiges Interesse an meiner Arbeit auszusprechen.