

# Über eine Beziehung zwischen Kernstoffgehalt und Entwicklung.

Von  
**Ernst Masing.**

(Aus dem pharmakologischen Institut in Dorpat.)

(Der Redaktion zugegangen am 21. August 1911.)

In einer demnächst erscheinenden Arbeit<sup>1)</sup> habe ich nachzuweisen gesucht, daß die Erythrocyten von Säugern und Vögeln im Stadium verstärkter Blutregeneration (Anämien) reicher an Nucleinsäure sind, als in der Norm. Es ließ sich daraus mit großer Wahrscheinlichkeit der Schluß ziehen, daß junge unreife Blutzellen mehr Kernstoffe enthalten, als reife, und zwar anscheinend um so mehr, je jünger sie sind. — Die folgenden Beobachtungen sollen nun zeigen, daß diese Eigentümlichkeit nicht nur für Blutkörperchen gilt. Sie ist ebenso nachweisbar an wachsenden ganzen Organen und ganzen wachsenden Organismen; auch diese zeichnen sich durch eine relative Abnahme (bei absoluter Zunahme) des Nucleinsäuregehalts mit zunehmendem Alter aus.

Meine Beobachtungen beziehen sich auf Kaninchenembryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien und auf die wachsende und ausgewachsene Kaninchenleber. — Es wurde stets der Nucleinphosphor bestimmt und, um vergleichbare Zahlen zu erhalten, auf die gleiche Menge Stickstoff umgerechnet.

Ich ging im einzelnen in folgender Weise vor:

Sollten Embryonen oder die embryonale Leber zur Untersuchung kommen, so wurden trächtige Muttertiere laparotomiert, der Uterus amputiert, die Embryonen lebend entnommen, abgewogen, mit Schere und Fleischhackmaschine in einen gleichmäßigen Brei verwandelt, der keine größeren Gewebstücke mehr enthielt; die Zerkleinerung gelang ohne besondere Schwierigkeiten auch bei größeren Embryonen, nur die Haut mußte recht sorgfältig mit der Schere zerstückelt werden. — Noch einfacher ist die Behandlung der Leber, auch der des erwachsenen Tieres; es genügte vollständig, das Organ mit einem Holzstückchen zu zerklappen und die größeren Gefäße und Bindegewebszüge mit der Pincette

<sup>1)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol., Bd. 66.

zu entfernen. — Eine sorgfältige Zerkleinerung ist natürlich wichtig, um eine gute Extraktion der Phosphatide und des anorganischen Phosphors zu ermöglichen. Ältere Tiere zu einem gleichartigen Brei zu zerhacken, ist schon schwieriger; bei einem 60 g schweren jungen Tier war ich genötigt, die schon recht resistente Haut mit dem Fell ganz zu entfernen. — Daher habe ich auch darauf verzichtet, größere Tiere zu verarbeiten, weil ich die Fehler einer nicht genügenden Durchmischung des Breies fürchtete.

Der Brei wurde 4 mal mit heißem Alkohol und 4 mal mit kochendem Äther gründlich extrahiert, der letzte Ätherextrakt verdampft, verascht und auf Phosphor geprüft: er enthielt nie mehr als minimale Spuren von Phosphor.

Nach der Ätherextraktion ließ sich die Substanz in der Reibschale leicht in ein homogenes graubraunes Pulver verwandeln, das dann zur Entfernung des säurelöslichen P mit 1%—HCl behandelt, mit MgSO<sub>4</sub> ausgesalzen und mit Alkohol und Äther getrocknet wurde. — Das Nähere über die Methodik findet sich in einer früheren Arbeit.<sup>1)</sup>

Von dem so vorbehandelten trockenen Pulver wurden dann 1—1½ g in genau 100 ccm einer 1%igen NaOH-Lösung etwa 24 Stunden bei 38° gehalten, darauf 10 ccm für N-Bestimmung nach Kjeldahl entnommen und der Rest nach Plimmer und Scott<sup>2)</sup> weiter verarbeitet. Die Magnesiafällung ergab nie einen deutlichen Niederschlag; es war also der anorganische P genügend extrahiert und kein Phosphoprotein vorhanden; der noch vorhandene P konnte daher als Nuclein-P angesehen werden. — Die P-Bestimmungen geschahen immer nach Neuman<sup>3)</sup> alkalimetrisch; titriert wurde mit  $\frac{n}{2}$ -NaOH und  $\frac{n}{2}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, von dem abgelesenen Resultat wurden 0,3 ccm  $\frac{n}{2}$ -NaOH abgezogen, da beim Kochen mit destilliertem Wasser der Titer der  $\frac{n}{2}$ -NaOH-Lösung ein wenig abnimmt.

In einer Beziehung mußte ich von meiner früheren Methodik abweichen. Wenn man nach Plimmer und Scott vorgehen und die Probe auf event. präformierten oder abgespaltenen anorganischen P mit Magnesiämischung machen will, so ist es erforderlich, die Substanzlösung in 1%iger NaOH mit konzentrierter Essigsäure zu neutralisieren, um die hochmolekularen Eiweißderivate, die die Reaktion stören könnten, auszufällen. Bei meinen früheren Versuchen mit Seeigeleiern enthielt dieser Essigniederschlag immer nur belanglose Spuren von P; bei meinem jetzigen Material jedoch oft reichlich P, und, wie ich mehrfach nachweisen konnte, auch Purinbasen, also Nucleinsäure. — Daher habe ich diesmal den Essigniederschlag immer mit der klaren Lösung nach Anstellung der Magnesiareaktion zusammen verascht, um erhebliche Verluste zu vermeiden.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 67, S. 161.

<sup>2)</sup> Transactions of the Chemic. Society, 1908, Bd. 93, II, S. 1699.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 38, S. 336.

Auf den nachstehenden Tabellen I und II sind die Versuchsergebnisse übersichtlich zusammengestellt, geordnet nach dem Entwicklungsgrade der untersuchten Objekte. Das Entwicklungsstadium ließ sich allerdings nur annähernd abschätzen, doch geben auch die Gewichtszahlen (2. Spalte) einige Anhaltspunkte für die Beurteilung der Reife. Nur Versuch 7, Tab. I und Versuch 4, Tab. II fallen in dieser Beziehung außer der Reihe; das Gewicht der Tiere war niedriger (33 g), als das der weniger entwickelten der darüberstehenden Versuche; es handelte sich um Exemplare einer im Vergleich zu den übrigen benutzten Tieren auffallend kleinen Rasse; daher wohl auch das niedrige Gewicht.

Die letzten Stäbe beider Tabellen enthalten die Angaben, wieviel Milligramm Nucleinphosphor in jedem Versuch auf je 0,35 g N des mit Alkohol-Äther und HCl extrahierten Pulvers<sup>1)</sup> (also nicht des frischen Organbreis) kommen.

Tabelle I. Kaninchenembryonen.

Entwicklungsstadium	Durchschnittsgewicht eines Tieres in g	N abgelesen in ccm $n_{/10}\text{-H}_2\text{SO}_4$	Nuclein-P abgelesen in ccm $n_{/2}\text{-NaOH}$	Auf 0,35 g N mg. Nuclein-P
1. 18 kleine Embryonen von $\frac{1}{8}$ bis $1\frac{1}{2}$ cm Länge aus der 1. Hälfte der Gravidität; Gesamtstickstoffgehalt ca. 21 mg . . . . .	—	1.5	2.0	20,3
2. 2 Embryonen von je 21,5 g Gewicht im Durchschnitt; etwa Beginn der 4. Schwangerschaftswoche . . . . .	21,5	10,7	12,4	17,8
3. 1 Embryo desselben Stadiums . . . . .	22,5	8,4	9,4	17
4. 2 Embryonen, etwas älter als die vorigen . . . . .	28	8,0	8,0	14,7
5. 4 Embryonen, etwa 1—2 Tage vor der Geburt . . . . .	36	12,4	10,3	13
6. 2 reife Embryonen . . . . .	43	7,2	6,3	12
7. Eben geworfene Junge (kleine Rasse) . . . . .	33	8,4	6,8	11,7
8. 11 Tage altes Tier (Haut und Mageninhalt entfernt) . . . . .	57	12,1	9,5	11,9

<sup>1)</sup> Da bei der Extraktion auch N entzogen wird, so muß das fragliche Verhältnis im frischen ein etwas anderes sein.



Tabelle II. Kaninchenleber.

Entwicklungsstadium	Durchschnittsgewicht einer Leber in g	Durchschnittsgewicht des Tieres in g	N abgelesen in ccm $\frac{n}{10}$ - $H_2SO_4$	Nuclein-P, abgelesen in ccm $\frac{n}{2}$ -NaOH	Gesamt-N einer Leber in g	Auf
						0,35 g N mg Nuclein- P
1. 2 Lebern vom Beginn der 4. Embryonalwoche . . . . .	2	21,5	4,0	6,0	0,028	<b>22,8</b>
2. 5 Lebern eines etwas späteren Stadiums . . . . .	1,8	28	8,9	12,0	0,025	<b>20,4</b>
3. 5 Lebern 1—2 Tage vor der Geburt . . . . .	2,6	36	13,9	16,3	0,04	<b>18,0</b>
4. 4 Lebern ebengeworfener Tiere (kl. Rasse)	2,3	33	6,5	6,9	—	<b>17</b>
5. 2 Lebern 11 Tage alter Tiere . . . . .	4,0	72	10,7	11,0	0,1	<b>16</b>
6. 2 Lebern 22 Tage alter Tiere . . . . .	9,5	210	8,3	6,5	0,16	<b>12</b>
7. Leber eines erwachsenen Tieres . . . . .	65	1800	9,8	7,5	1,4	<b>11,5</b>
8. Leber erwachsen . . . . .	—	—	5,8	8,4	—	<b>10</b>

Tabelle III. Vergleichsweise seien hier noch einige Werte für den Nuclein-P anderer Zellen angeführt.

	Gesamt-N abgelesen in ccm $\frac{n}{10}$ - $H_2SO_4$	Nuclein-P abgelesen in ccm $\frac{n}{2}$ -NaOH	Auf 0,35 g Gesamt-N	
			Purin-N in mg	Nuclein-P in mg
1. Menschliches Carcinom (es handelte sich um einen bindegewebsreichen Plattenepithelkrebs der Wange) . . . . .	7,9	6,5	—	<b>12,5</b>
2. Ungefurchte Seeigeleier . . . . .	—	6,9	<b>16,1</b>	<b>14,4</b>
3. Pefhese . . . . .	5,7	—	<b>33,7</b>	ca. <b>30</b> <sup>1)</sup>
4. Kalbsthymus . . . . .	9,1	30,3	<b>54,6</b>	<b>50,8</b>

<sup>1)</sup> Der Nuclein-P ist in der Hefe nicht direkt bestimmt, da die HCl-Extraktion Schwierigkeiten macht; die angegebene Zahl ist aus dem nach Burian und Hall bestimmten Purin-N berechnet, unter der Voraussetzung, daß 4 Atome Nuclein-P auf 10 Atome Purin-N kommen.

Während es bei ganz jungen Embryonen (Tab. I) etwa 20 mg auf 0,35 g N sind, nehmen die Zahlen mit fortschreitender Entwicklung ziemlich kontinuierlich ab, um beim neugeborenen Tier 11—12 mg zu betragen; der letzte Wert im Versuch 8 ist anscheinend höher, als der im Versuch 7. Der Grund dafür liegt wohl darin, daß im Versuch 8 die (nucleinsäurearme) Haut des Tieres nicht mitverarbeitet worden war.

Dieselbe Erscheinung läßt sich in gleicher Weise auch an der Kaninchenleber verfolgen (Tab. II). Die Leber eines Embryo der 4. Woche enthält fast 23, die der neugeborenen 17, die des erwachsenen Tieres 10—11 mg Nuclein-P pro 0,35 g N: also auch hier eine relative Verarmung an Nucleinsäure bei der Entwicklung. — Ein Umstand darf freilich nicht außer acht gelassen werden. Die embryonale Leber ist blutbildend und alle hämatopoietischen und lymphatischen Organe haben bekanntlich einen sehr bedeutenden Gehalt an Kernstoffen: es wäre also möglich, daß die Abnahme des Nucleinsäuregehalts weiter nichts als der Ausdruck des Verschwindens des blutbildenden Gewebes aus der Leber wäre und nichts mit Veränderungen der Leberzellen selbst zu tun hätte.

Wenn auch nicht geleugnet werden kann, daß die Gegenwart von blutbildendem Gewebe möglicherweise in den ersten Versuchen (1 und 2) mitgespielt hat, so ist damit die ganze Erscheinung der Abnahme des Nucleinsäuregehaltes noch keineswegs erklärt. Im letzten Drittel der Schwangerschaft ist nämlich die Blutbildung in der Leber nach histologischen Befunden nur unbedeutend, sie verschwindet gegen Ende des intrauterinen Lebens ganz. (Naegeli.)

Wie die Tab. II zeigt, nimmt aber der Nucleinsäuregehalt auch nach der Geburt noch erheblich ab, was durch Schwund myeloiden Gewebes nicht mehr zu erklären ist, so daß wir genötigt werden, an entsprechende Veränderungen der Leberzellen selbst zu denken, also chemische Unterschiede zwischen den Leberzellen verschiedener Entwicklungsstadien zuzugeben.

Vergleicht man dünne Paraffinschnitte (1—2  $\mu$  Dicke) einer embryonalen und einer erwachsenen Kaninchenleber, so kann man sich leicht davon überzeugen, daß die Kerne der embryo-

nalen erstens absolut größer sind und besonders relativ, im Verhältnis zum Zelleibe, einen viel größeren Raum einnehmen, als die Kerne der erwachsenen Leber. Es scheint mir angängig, hierin den morphologischen Ausdruck der oben gefolgerten chemischen Unterschiede zu sehen.

Die in der Literatur niedergelegten Bestimmungen der Nucleinsäure des wachsenden Organismus lassen sich für meine Zwecke leider nicht direkt verwerten. Tichomiroff<sup>1)</sup> und Kossel<sup>2)</sup> zeigten an Insekten- bzw. Hühnerembryonen die Entstehung von Purinbasen; Burian und Schur<sup>3)</sup> fanden, daß einige Wochen alte Kaninchen und Hunde mehr Purinbasen und Nuclein-P enthalten, als neugeborene. Plimmer und Scott<sup>4)</sup> verfolgten die quantitativen Verschiebungen der verschiedenen P-Verbindungen während der Entwicklung des Hühnereies und fanden beispielsweise, daß das Hühnchen nach 14tägiger Bebrütung 21,5%, zum Schluß der Bebrütung 12% seines Gesamtphosphors als Nuclein-P enthält. — Ich konnte jedoch die vorliegenden Zahlen nicht gut benutzen, besonders da sie nicht auf vergleichbare Normen, wie z. B. Gesamtstickstoff, bezogen sind.

Zusammenfassend glaube ich also aus meinen Zahlen folgern zu können, daß sowohl ganze Kaninchenembryonen als auch die Kaninchenleber relativ um so mehr Nucleinsäure enthalten, je früher das Entwicklungsstadium ist, dem sie angehören. Daß trotzdem mit fortschreitender Entwicklung der Nucleinsäuregehalt absolut zunimmt, läßt sich unschwer aus den Zahlen der Tab. II. ableiten.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 9, S. 518.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 10, S. 246.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift. Bd. 23, S. 55.

<sup>4)</sup> Journ. of Physiology, Bd. 38, S. 247.