

# Untersuchungen über das Blut der Ascidien.

## III. Mitteilung.

Von

M. Henze.

(Aus der chemisch-physiologischen Abteilung der zoologischen Station zu Neapel.)

(Der Redaktion zugegangen am 26. Juni 1913.)

In zwei früheren Mitteilungen<sup>1)</sup> habe ich über das Vorkommen einer organischen Vanadiumverbindung in den Blutzellen von *Phallusia mamillata* berichtet und gleichzeitig auf die stark saure Reaktion im Innern dieser Zellen hingewiesen, die durch die Anwesenheit freier Schwefelsäure bedingt ist.

Unterdessen ist es gelungen, auch bei einigen anderen, häufiger im neapolitanischen Golfe vorkommenden Ascidien dieses seltene Element nachzuweisen, und zwar auf makrochemischem Wege. Außer bei *Phallusia*, wo der Nachweis infolge hinreichender Blutmengen leicht zu führen ist,<sup>2)</sup> findet sich Vanadium bei folgenden Ascidien: *Ascidia mentula*, *A. fumigata*, *Ciona intestinalis*, *Diazona violacea*. Für *Cynthia papillosa* wage ich es nicht mit Sicherheit zu behaupten. Es fehlen hier scheinbar auch die charakteristischen Blutzellen, von denen unten die Rede sein wird. Damit erhält das Vanadvorkommen eine allgemeinere Bedeutung und bleibt nicht als ein besonderes Kuriosum auf *Phallusia* beschränkt.

Bei der mikroskopischen Untersuchung des Ascidienblutes begegnet man sehr verschieden aussehenden Formelementen.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 72, S. 494 und Bd. 79, S. 215.

<sup>2)</sup> Die Angaben über den qualitativen Nachweis des Vanadiums finden sich in der ersten Mitteilung. Handelt es sich um sehr minime Blutmengen, wie z. B. bei *Diazona*, so muß man sich beim makrochemischen Nachweis darauf beschränken, das Vanadium in der Weise nachzuweisen, daß man das ganze Tier verascht. Am besten benutzt man dann die Farbreaktion, welche Vanadverbindungen mit Pyrogallol und anderen Phenolen in schwach essigsaurer Lösung liefern (cf. erste Mitteilung). Natürlich muß die zu untersuchende Flüssigkeit eisenfrei sein, da Eisensalze mit Phenolen ähnliche Farbenreaktionen geben. Eine Reihe derartiger komplexen Eisen-Phenolverbindungen, in denen das Eisen maskiert ist, sind in letzter Zeit von R. F. Weinland und K. Binder studiert worden (Erste Mitteilung in Berl. B., Bd. 45, S. 148). Möglicherweise handelt es sich bei Vanadsalzen um analoge komplexe Verbindungen.

Es finden sich nicht nur Differenzen hinsichtlich der Gestalt der Blutzellen bei den soeben angeführten Arten, sondern auch das Blut ein und derselben Art führt verschiedene Zellen. So sind z. B. im Blute von *Phallusia* zum mindesten zwei Haupttypen von Blutzellen zu unterscheiden. Ich habe vergeblich in der zoologischen Literatur nach genaueren Angaben gesucht. Was darüber zu finden ist, befriedigt nicht. Im Hinblick auf das interessante Vanadvorkommen dürfte sich eine eingehendere histologische und physiologische Untersuchung gewiß lohnen, die ich kompetenteren Beobachtern überlassen muß. Die folgenden Notizen sind vielleicht geeignet, einige Anhaltspunkte zu geben.

Wie soeben erwähnt, erkennt man im Blute von *Phallusia mamillata* mindestens zwei deutlich voneinander abweichende Zellformen. Ob zwischen diesen auch Übergangsformen existieren, vermag ich nicht zu entscheiden. Das eine sind runde oder elliptische Zellen von größerem Durchmesser; die andere Art der Zellen dürfte man am besten als «Maulbeerformen» bezeichnen. Sie scheinen aus einzelnen Granula zusammengesetzt. Ihre Struktur wird noch deutlicher, wenn man eine Spur Ammoniak unter das Deckglas fließen läßt oder den Blutropfen einen Augenblick über eine offene Ammoniakflasche hält. Die Maulbeere löst sich dabei gleichsam in die einzelnen Beeren auf und färbt sich bald grünlich-braun beim völligen Zerfall. Diese maulbeerförmigen Zellen lassen sich im Blute aller obenerwähnten vanadführenden Ascidien wiedererkennen und haben in frischem Blute meist eine leichte, grünliche Färbung. Bei *Ascidia fumigata* sind sie intensiv grünlich-gelb, so daß das Blut selbst diesen Farbton aufweist.

Die maulbeerartigen Blutzellen — am typischsten und leichtesten zu erkennen sind sie bei *Phallusia m.* — verdienen insofern besonderes Interesse, als sie ohne Zweifel die Träger der Vanadverbindung wie auch der freien Schwefelsäure sind.

Bisher ist es nicht gelungen, die zwei erwähnten Zelltypen mechanisch voneinander zu trennen, um eine gesonderte makrochemische Untersuchung zu ermöglichen. Im nachstehenden glaube ich jedoch die eben geäußerte Ansicht mit Hilfe mikro-

chemischer Reaktionen begründen zu können. Zu diesem Zwecke sei daran erinnert, daß bei der Hämolyse der abzentrifugierten Blutkörperchen des Phallusiablutes durch destilliertes Wasser eine stark sauer reagierende, braune Flüssigkeit erhalten wird, die die Vanadverbindung in genuiner Form enthält. Diese früher (cf. zweite Mitteilung) kurzweg als «braune Lösung» bezeichnete Flüssigkeit ist außerordentlich unbeständig, da alle oxydierend wirkenden Substanzen die Vanadverbindung unter Farbenänderung und Denaturierung in eine höhere Oxydationsstufe überführen. Diese Eigenschaft der Vanadverbindung läßt sich nun dazu benutzen, sie in der Zelle mikrochemisch nachzuweisen. Mit den sonstigen Oxydationsmitteln gelingt dies nicht oder nicht sicher; zum Teil wohl, weil dieselben nicht in die Zelle eindringen, zum Teil aber auch, weil ein Überschuß des oxydierenden Agens wieder Entfärbung der Vanadverbindung bedingt und eine genaue Dosierung wohl kaum angängig ist.

Dagegen eignet sich vorzüglich die Osmiumsäure zum mikrochemischen Nachweis. Wie prompt die genuine Vanadverbindung damit reagiert, zeigt sich beim Zutropfen einer etwa einprozentigen Osmiumsäurelösung zu der «braunen Lösung». Es tritt momentan eine wechselseitige Umsetzung ein unter gleichzeitiger Abscheidung schwarzer, niederer Oxydationsstufen des Osmiums. Läßt man nun zu einem frischen, unter dem Deckglas befindlichen Blutpräparat vorsichtig Osmiumsäure zufließen, so beobachtet man im selben Moment eine tief-schwarze Färbung sämtlicher maulbeerförmiger Blutzellen. Besonders hervorzuheben ist diese momentan eintretende Schwärzung. Die anderen, runden Blutzellen bleiben dagegen ungefärbt oder werden höchstens allmählich etwas grau, wohl infolge ihres Gehalts an Fetten oder fettähnlichen Substanzen.

Hierbei wäre zu erwähnen, daß auch Jodlösung (J, JK-Lösung) zur Charakterisierung der Maulbeerzellen benutzt werden kann. Sie werden dadurch sehr schnell tiefdunkel gefärbt, doch nehmen auch die runden Zellen ziemlich bald Jod auf, so daß die Unterschiede unsicher werden. Die Anwendung von Osmiumsäure ist entschieden vorzuziehen.

Mit Hilfe in die Zellen eindringender Indikatoren läßt sich

weiter feststellen, in welchen der geformten Elemente die freie Schwefelsäure lokalisiert ist. Es sind dies wiederum die maulbeerförmigen Vanadzellen, wie dies schon aus früher angedeuteten chemischen Gründen zu erwarten war. Fügt man in Meerwasser gelöstes Neutralrot zu einem frischen Blutpräparat, so färben sich die Maulbeerzellen intensiv violettrot. Die anderen Zellen nehmen dagegen einen gelbbraunlichen Farbton an, wie er für die nahezu neutrale Reaktion des Seewassers charakteristisch ist.

Noch schönere Resultate erhält man mit Methylrot.<sup>1)</sup> Der Indikator färbt das Seewasser resp. das Blutplasma gelb; während er, in die Maulbeerzellen eingedrungen, sofort in tiefrot umschlägt. Auf diese Weise sind dieselben aufs schärfste von den runden Zellen zu unterscheiden, die nicht oder kaum gefärbt werden, da der Indikator in sie überhaupt nicht einzudringen scheint.

Ohne Zweifel wird das Vanadvorkommen noch bei vielen anderen Ascidien konstatiert werden. In erster Linie dürften jene Arten in Frage kommen, bei denen über Farbenänderungen, speziell beim Verletzen oder Absterben, in blaugrün oder blauschwarz berichtet worden ist, und wofür zum Teil Spekulationen über Melanose oder reduzierende Fermente geltend gemacht worden sind. Sie werden durch die leichte Veränderlichkeit von Vanadverbindungen ihre Erklärung finden. — Daß nebenbei auch Allgemeinfärbungen der Tiere infolge besonderer Pigmente vorkommen können, ist selbstverständlich nicht ausgeschlossen. Ich erwähne dies in Anbetracht einer soeben erschienenen Arbeit von Herdmann über *Diazona violacea*.<sup>2)</sup> *Diazona violacea* aus dem Golf von Neapel ist frisch gedredst so gut wie farblos, höchstens könnte man eine Andeutung einer graugrünlischen Färbung gelten lassen. Das Tier hält sich speziell im Sommer sehr schlecht im Aquarium und schon nach kurzem Aufenthalt

<sup>1)</sup> Methylrot oder p-Dimethylamino-azo-benzol-ortho-carbonsäure wurde von S. Palitzsch zur Messung der Wasserstoffionenkonzentration vorgeschlagen. Der Meßbereich des Indikators liegt zwischen  $p_{\text{H}} = 4,2$  bis  $p_{\text{H}} = 6,3$ . cf. Biochem. Zeitschr., Bd. 37, S. 131 (1913).

<sup>2)</sup> W. H. Herdmann, *Diazona violacea* in *Spolia Runiana Linnean Soc. Journ. (Zoology)*, Vol. 32, May 1913.

beginnen die Tiere grünlich zu werden und besonders die Ingestionsöffnungen nehmen die charakteristische blaugrüne Farbe der veränderten Vanadverbindung an. Die Färbung kann bei den geringen Blutmengen der kleinen Tiere selbstverständlich nicht so intensiv sein, wie es z. B. der Fall ist bei absterbenden Phallusien. Wie eingangs gezeigt, gehört *Diazona* zu den vanadführenden Ascidien. Bei der von Herdmann beschriebenen Varietät: *Diazona-hebridica-violacea* soll überdies auch ein alkohollösliches grünes Pigment vorkommen, wofür er den Namen «Synthetin» einführt.

Im Anhang sei noch auf die stark rotgelb gefärbten Pigmentzellen des Blutes von *Ascidia mentula* hingewiesen, die sich namentlich in den feineren Blutkapillaren anhäufen und die rote Färbung der Tiere bedingen. Diese Zellen scheinen wie aus Schollen zusammengesetzt und erinnern äußerlich an die Maulbeereellen, doch werden sie weder von Osmiumsäure noch von Methylrot gefärbt. Neben ihnen finden sich im Blute die typischen Maulbeereellen und die runden Zellen.

Das Pigment der roten Zellen ist außerordentlich beständig und hat vor allem keinen Lipoidcharakter, da es absolut unlöslich ist in allen organischen Solventien, ebensowenig auch in Wasser. Verdünnte Alkalien machen die Färbung etwas dunkler, verdünnte Säuren bedingen eine Farbenänderung in hellgelb. Durch längere Einwirkung verdünnter Säuren scheint das Pigment langsam in Lösung zu gehen und durch Alkalien wenigstens teilweise wieder gefällt zu werden. Manches schien dafür zu sprechen, daß die eigentümlichen Pigmentzellen Umwandlungsformen der Vanadzellen seien und um dies zu beweisen, wurde versucht, dieselben von den anderen Formelementen zu trennen, was jedoch nicht gelang. Es wurden dann stark mit Pigmentzellen beladene Gewebe längere Zeit mit destilliertem Wasser gewaschen, um dadurch die Vanadzellen zu hämolysieren und die Vanadverbindungen zu entfernen. Die so behandelten Gewebe geben noch deutlich Vanadreaktion beim Veraschen. Trotzdem ist dieses positive Resultat nicht einwandfrei genug und die Natur des roten Pigments bleibt somit vor der Hand noch ungeklärt.