

wäre dagegen die Verbindung des Wassers mit dem Protoplasma eine lockere, so dass sie schon durch einen relativ geringen Grad von Trockenheit oder Kälte gelöst und der Tod des Organismus herbeigeführt würde. [9]

Alfred Fischer, Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas.

Jena. Gustav Fischer. 1899.

In dem relativ kurzen Zeitraum der Entwicklung unserer modernen mikroskopischen Technik sind schon wiederholt Stimmen laut geworden, die davor warnen, alles was uns unsere fixierten, gefärbten, geschnittenen Präparate zeigen ohne Weiteres als Struktureigentümlichkeiten auch des lebenden Gewebes, der lebenden Zelle, anzusehen. Diesen Warnungen suchte man gelegentlich dadurch größeren Nachdruck zu geben, dass man Beobachtungen anstellte über die Wirkung von Fixierungsmitteln auf Eiweißlösungen. Derartige Versuche, die sich in sehr engen Grenzen bewegten, hatten keinen durchschlagenden Erfolg. Größeres Aufsehen erregten zuerst zwei kurze Mitteilungen von A. Fischer, die 1894 u. 1895 im Anatom. Anz. erschienen. Die damals nur in Bruchstücken mitgeteilten Beobachtungen und Ansichten hat Fischer auf breiter empirischer Grundlage zu begründen und systematisch durchzuführen versucht in seinem vor kurzem erschienenen Buch über Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas. Dieses Buch erweckte hervorragendes Interesse in den Kreisen aller derer, die mikroskopisch arbeiten. Wenn auch vielleicht gegen manche Ausführungen und Erklärungsversuche Einwände und Zurückweisungen hervortreten werden, so kam es doch keinem Zweifel unterliegen, dass dieses Buch eine große Anzahl äußerst wertvoller Beobachtungen, zusammengefasst durch anregende, fruchtbringende Gedanken enthält. Es wird wohl berufen sein auf dem Gebiet der Zellenlehre manche gründliche, klärende Diskussion herbeizuführen.

Wie viele und welche von den Struktureigentümlichkeiten, die wir an unseren fixierten und gefärbten mikroskopischen Präparaten beobachten, sind natürliche Bildungen, d. h. finden sich auch in der lebenden Zelle? — Diese Frage zu beantworten, das ist der Grundgedanke des Fischer'schen Buches. Dasselbe gliedert sich in 3 Hauptabschnitte. Deren erster behandelt die Fixierung, der zweite die Färbung; im Dritten wird erörtert, welche Resultate die vorstehenden Untersuchungen für unsere Anschauungen vom Bau des Protoplasmas ergeben.

1. Die Fixierung

hat den Zweck, die Strukturen der lebenden Zelle derart in einen unlöslichen Zustand zu überführen, dass sie all die eingreifenden Prozeduren der Entwässerung und Durchtränkung mit Paraffin, des Schneidens und Färbens ungeschädigt überstehen, so dass sie mit voller Naturtreue in unseren Präparaten hervortreten. Ja sogar wir erwarten in unseren Präparaten durch Färbung und Abänderung der Brechungsverhältnisse Strukturen wahrnehmen zu können, die unserem Auge bei Untersuchung der lebenden Zelle nicht zugänglich sind.

Die geforderte Unlöslichkeit der lebenden Zellstrukturen kommt nach F. bei der Fixierung zustande durch eine Fällung. Diese kann eine chemische sein, indem zwischen Bestandteilen des Fixierungsmittels und Eiweißkörpern chemische Verbindungen entstehen, oder eine physikalische, indem die Fixierungsmittel die Lösungskraft des Zellsaftes herabsetzen oder auch wasserentziehend auf die festeren Zellstrukturen einwirken. F. hält eine Fixierung durch chemische Fällung für den häufigeren Vorgang.

Die Zelle erscheint als eine Mischung von Eiweißkörpern verschiedenster Art in wechselndem Mengenverhältnis. Diese Eiweißstoffe stimmen nach F.'s Ansicht in ihrem physikalischen und chemischen Verhalten gegenüber den Fixierungsmitteln durchaus überein mit Lösungen von Eiweißkörpern, die wir künstlich herstellen können.

Auf der Grundlage dieser Anschauung unternimmt Fischer eine systematische Prüfung der Einwirkungen zahlreicher Fixierungsmittel auf eine große Anzahl von Eiweißkörpern. Die Technik der Versuche ist eine einfache. Lösungen der Eiweißkörper werden in kleinen Fläschchen oder Petri-Schalen mit den Fixierungsmitteln ausgefällt. Nach 24 St. hat sich der Niederschlag abgesetzt, die überstehende Flüssigkeit wird abgegossen und durch Washwasser ersetzt, das mehrmals gewechselt wird. Die Niederschläge wurden unter Wasser oder Alkohol aufgehoben. Die Fällungsform wird an gewöhnlichen Wasserpräparaten untersucht, zu Färbungsversuchen wurden Deckglas-trockenpräparate nach Art der Bakterien- und Blutpräparate hergestellt. Die Wahl der zu untersuchenden Eiweißkörper wurde durch verschiedene Momente beeinflusst. Zahlreiche Proteinstoffe sind in zuverlässig reinen und brauchbaren Zustände nicht leicht zu beschaffen, — von diesen wurde deshalb abgesehen. Weiterhin wurden ausgeschlossen die Mehrzahl jener Stoffe, welche man unter dem Namen der Proteide oder Albuminoide zusammenfasst. Diese stellen, wie z. B. Mucin, Elastin, Keratin, vorwiegend Ausscheidungsprodukte des lebenden Zelleibes dar und beteiligen sich nicht oder nur gering am Aufbau des Zellkörpers, der aber für F. im Vordergrund des Interesses steht. Die untersuchten Vertreter der Eiweißkörper im engeren Sinn und Nukleinkörper verteilen sich auf folgende Gruppen:

1. Verdauungsprodukte des Eiweißes, Peptone und Albumosen.
2. Albumine und Globuline,
3. Haemoglobin als Vertreter der Proteide,
4. Nukleoalbumine (Casein u. Conglutin),
5. Nukleinkörper (Nuklein aus Hefe, Hefe-Nukleinsäure, Thymus-Nukleinsäure).

Als Lösungsmittel diente meist Wasser, gelegentlich erwies sich ein geringer Zusatz von Kalilauge oder Essigsäure als notwendig. Dementsprechend war die Reaktion der Lösungen teils alkalisch, teils sauer, teils neutral. Von einem Salzzusatz wurde abgesehen, da sich bald zeigte, dass ein so geringer Salzgehalt, wie er in tierischen und pflanzlichen Zellen vorkommt, auf die Fällungsreaktion keinen Einfluß ausübt. Die Konzentration der Lösung darf keine zu geringe sein, da sonst die Fällung ausbleibt, aber auch keine zu hohe, da dann die Fixierungsmittel nur zu partieller Wirkung gelangen und eine sehr große Menge derselben zu vollständiger Ausfällung erforderlich ist.

Von Fixierungsmitteln wurde eine große Anzahl geprüft und zwar sowohl einfache Lösungen wie auch Mischungen von solchen. Eine Einteilung der Fixierungsmittel wird gegründet auf das spezifische Verhalten der Eiweißkörper zu denselben. Als Testobjekte erschienen geeignet: 1. Hefe-Nukleinsäure wegen ihren nahen Beziehungen zum Chromatin; 2. Deuteroalbumose, wohl als Verdauungsprodukt in gewissen Geweben erscheinend, 3. Serumalbumin als Vertreter der großen, fixierungstechnisch übereinstimmenden Gruppen der Albumine und Globuline. Aus dem Verhalten dieser drei Eiweißkörper zu den Fixierungsmitteln ergibt sich folgende Gruppierung derselben:

I. Nukleinsäure wird nicht, oder nur durch starke Konzentration gefällt, Deuteroalbumose wird gar nicht, Serumalbumin sowohl aus alkalischen als sauren Lösungen gefällt (Salpetersäure, Essigsäure und damit angesäuertem Alkohol).

II. Nukleinsäure wird gar nicht, Deuteroalbumose und Serumalbumin werden nur aus sauren, nicht aus alkalischen oder neutralen Lösungen gefällt. Die Niederschläge sind im Wasser unlöslich (Osmiumsäure, Kaliumbichromat, Altman's Gemisch, Müller'sche Lösung).

III. Nukleinsäure, Deuteroalbumose und Serumalbumin werden bei jeder Reaktion gefällt.

1. Untergruppe. Die Fällung der Nukleinsäure und der Deuteroalbumose ist in Wasser leicht löslich; Serumalbumin wird koaguliert (Alkohol, Aceton, Pikrinsäure, Pikrinschwefelsäure).

2. Untergruppe. Alle Fällungen in Wasser unlöslich (Chromsäure, Sublimat, Platinchlorid, Formaldehyd, Flemming's Gemisch, Hermann's Gemisch).

Dieser allgemeinen Anordnung folgend bespricht dann F. in eingehender Weise die Wirkungen der einzelnen Fixierungsmittel auf die verschiedenen, zur Untersuchung kommenden Eiweißkörper und erläutert seine Angaben durch Beispiele (S. 9—30). Aus diesen Darlegungen seien nur einige Punkte von allgemeinem Interesse hervorgehoben.

Salpetersäure als wichtigster Vertreter der Gruppe I ist als ein durchaus unzuverlässiges Fixierungsmittel anzusehen, da sie in verdünntem Zustand anders wirkt als im konzentrierten und die Fällungen mancher Eiweißkörper im Ueberschuss sich wieder lösen. Ähnliches gilt von der Essigsäure. In Gemischen jedoch wirkt sie vorteilhaft durch Ansäuerung, weil dann manche Fixierungsmittel überhaupt erst oder doch besser wirken.

Aus Gruppe II ist besonders hervorzuheben die Wirkung der Osmiumsäure und der Müller'schen Flüssigkeit. Beide werden hingestellt als schwache und unvollständige Fixierungsmittel, die gegenüber alkalischem Zellinhalt stets versagen. Die Veränderungen, welche alkalische Gewebstücke nach Fixierung mit Osmiumsäure bis zu ihrer Ueberführung in Xylol erfahren, schildert F. folgendermaßen: „Alle in den Geweben etwa gelösten Nuklealbumine und Nukleinkörper, ferner alle Peptone, Albumosen, Albumine und Globuline, auch Haemoglobine — man kann kurz sagen, sämtliche gelöste Eiweißkörper — sind nicht gefällt. In diesem Zustande beginnt das Auswaschen, d. h. durch Diffusion und Dialyse soll das Fixierungsmittel wieder entfernt werden. Gelöste Eiweißkörper diffundieren nur äusserst langsam, selbst der schnellste unter ihnen, das Pepton, diffundiert nach Kühne nur $\frac{1}{4}$ so schnell wie Trauben-

zucker. Beim Auswaschen von Gewebstücken handelt es sich aber um Dialyse, um Durchwandern tierischer Membranen oder membranartiger Bildungen, durch die wohl die Osmiumsäure hindurchwandern kann, aber sicher nicht die gar nicht dialysierbaren Eiweißkörper, die auch die Cellulosemembranen der Pflanzenzellen nur schwer passieren können. Selbst wenn man die Zeit des Auswaschens über das übliche Maß weit ausdehnen wollte, würde man doch die gelösten, von der Osmiumsäure nicht gefällten Eiweißkörper nicht entfernen können. Noch weniger geschieht das beim allmählichen Entwässern mit steigendem Alkohol, so dass dieser, wenn er fällungskräftig geworden ist, nun mehr alle diejenigen Eiweißkörper ausfällt, die ihm zugänglich sind. Da freie Säure oder Alkali beim Auswaschen dialytisch entfernt worden sind, so kann man annehmen, dass der Entwässerungsalkohol auf neutrale Gewebe wirkt. Es werden nunmehr sicher gefällt: Pepton, Albumosen, Albumine, Globuline, Haemoglobin, Nuklealbumine, Nukleine und Nukleinsäure; außer Pepton, Albumosen und Nukleinsäure werden alle die genannten Eiweißkörper durch den langen Aufenthalt in Alkohol koaguliert. Sie müssen also im farbigen Schnitt als Strukturen vortäuschende Fällungen berücksichtigt werden. Absoluter Alkohol würde auch aus alkalisch gebliebenen Gewebstücken alle oben genannten Eiweißkörper ausfällen. „Der Vorteil, den eine Osmiumfixierung alkalischer oder neutraler Gewebe wegen der geringen Fällungskraft der Osmiumsäure vielleicht bieten könnte, wird also durch die Nachbehandlung mit Alkohol aufgehoben. In Paraffinschnitten wird man neben der Wirkung der Osmiumsäure eine kräftige Fixierung durch Alkohol vor sich haben.“

Zu der III. Gruppe, 2. Untergruppe, gehören einige der augenblicklich beliebtesten Fixierungsmittel. Sie sind ganz besonders geeignet Artefakte zu erzeugen. „Wenn überhaupt bei beliebiger Reaktion Eiweißkörper im Protoplasma oder im Kern gelöst vorkommen, und ihre Menge nicht unter das Fällungsminimum, das sehr gering ist, herabsinkt, dann müssen sie durch diese „Fixierungsmittel“ derartig dauerhaft und unlöslich abgeschieden werden, dass sie im fertigen Präparat auch hervortreten.“

Die Eiweißkörper werden nach der Form in der sie von den Fixierungsmitteln ausgefällt werden, eingeteilt in Granulabildner und Gerinnselbildner. Die Niederschläge der ersteren bestehen aus Körnern sehr verschiedener Größe, die entweder isoliert sind, oder auch paarweise oder in Kettchen zusammengelagert. Die Niederschläge der Gerinnselbildner entsprechen dem sog. feinpunktierten Aussehen des Protoplasmas. Sie bilden feine Gerüste und Netze, die aus winzigen Körnchen gleicher Größe sich aufbauen. Granulabildner und Gerinnselbildner sind durch Zwischenformen verbunden, indem manche Eiweißkörper, wie Haemoglobin und Nukleinsäure, von den einen Fixierungsmitteln als Granula, von den anderen als Gerinnsel abgeschieden werden.

F. erklärt sich die Entstehung der beiden Niederschlagsformen so, dass stets beim Zusammentreffen von Eiweißlösung und Fixierungsmittel zuerst winzige Körnchen abgeschieden werden. Der weitere Verlauf ist verschieden, je nachdem der Eiweißkörper mehr oder weniger stark kolloidal ist. Handelt es sich um eine stark kolloidale Eiweißlösung mit sehr geringer Diffusionsgeschwindigkeit, so wird die Konzentrationsdifferenz in der Umgebung der zuerst abgeschiedenen Körnchen langsam ausgeglichen werden durch hinzu diffundierende Eiweißmolekel. Diese

werden zwischen den zuerst ausgeschiedenen Körnchen weiter ausgefällt und so entstehen die aus winzigen zusammengehäuften und an einander hängenden Globuliten aufgebauten Gerinnsel. Bei den weniger stark kolloidalen Eiweißstoffen aber wird sich die Konzentrationsdifferenz dank der größeren Diffusionsgeschwindigkeit um die zuerst ausgestellten Körnchen rasch ausgleichen und auf letztere neue Schichten abgelagert werden, so dass sie zu größeren Granulis heranwachsen. Die einzelnen Granulabildner und Gerinnselbildner werden dann nebst ihren Zwischenformen ausführlicher besprochen und mannigfache Reaktionen mit den verschiedenen Fixierungsmitteln geschildert und abgebildet (S. 33—50). Als Typus der Granulabildner fungiert Deuteroalbumose, der Gerinnselbildner Serumalbumin. Die Größe der Granula erweist sich abhängig von der Konzentration der Eiweißlösung und der Art des Fixierungsmittels. Je dünner die Eiweißlösung ist, desto kleiner und gleichmäßiger sind die niedergeschlagenen Granula. Manche Fixierungsmittel geben gleichmäßige Granula, andere ein buntes Gemisch großer und kleiner. Der größte Durchmesser der Granula ist bei verschiedenen Fixierungsmitteln außerordentlich wechselnd. Diese Beobachtungen gewinnen noch insofern Bedeutung, als es für später zu besprechende Färbungsversuche wünschenswert erscheint, Mischungen großer und kleiner Granula von durchaus übereinstimmendem chemischen Charakter herstellen zu können. Bei den Gerinnselbildnern erscheint Konzentration wie Reaktion der Lösung gleichgültig für die Fällungsform, letztere aber bei manchen Fixierungsmitteln entscheidend für die Fällungskraft.

Die Fällungsform der Eiweißkörper in Gemischen bleibt dieselbe wie in den isolierten Lösungen, wie aus mannigfachen mitgeteilten Versuchen hervorgeht. Aus Mischungen von Granula- und Gerinnselbildnern werden Granula und Gerinnsel neben einander oder in einander eingelagert durch das zugegossene Fixierungsmittel abgeschieden. Diese Beobachtung erscheint natürlich besonders bedeutungsvoll für die Auffassung der Fixierung der verschiedenartigen Eiweißbestandteile der Zellen.

Aus dem folgenden Kapitel über die Möglichkeit einer mikrochemischen Fixierungsanalyse seien nur einige Hauptpunkte hervorgehoben. Der Gedanke liegt wohl nicht zu fern, all die zahlreichen Erfahrungen, die aus den vorstehend geschilderten Beobachtungen und Versuchen über die Wirkungen zwischen Eiweißkörpern und Fixierungsmitteln hervorgehen, zu verwenden zu einer mikrochemischen Analyse des Zellinhalts. Vorläufig ist die Erkennung bestimmter chemischer Zellbestandteile aussichtsvoll nur für 2 Körper, nämlich für Albumose und reine Nukleinsäure; eine Unterscheidung der einzelnen Gerinnselbildner von einander ist bis jetzt nicht möglich. Der Nachweis der Nukleinsäure ist aber deshalb ziemlich bedeutungslos, da es sehr zu bezweifeln ist, dass irgendwo in der Zelle freie Nukleinsäure sich so ansammelt, dass sie im fixierten Präparat erkennbar wird. Nachzutragen wäre noch, dass Osmiumsäure verwendbar ist als ein Reagens auf die chemische Reaktion einer Zelle oder ihres Kernes. „Entstehen nämlich nur durch saure Fixierungsmittel Fällungen, durch Osmiumsäure und Kaliumbichromat aber nicht, so lag alkalische Reaktion vor.“ Jedenfalls sind vorläufig die Aussichten auf eine erfolgreiche mikrochemische Analyse der Zellbestandteile recht geringe.

Der Abschnitt über Fixierung schließt mit einer zusammenfassenden Betrachtung über die Resultate, welche sich aus dem Mitgeteilten für unsere Auffassung der Fixierung des Zellinhaltes ergeben.

Die feineren Strukturen des Protoplasmas und Kernes bestehen aus Eiweißkörpern und stellen in der lebenden Zelle keine unlöslichen, dauerhaften Gebilde dar. Deshalb bedürfen sie der Fixierung. Aufgabe der Fixierung ist es also, diese Stoffe unter Bewahrung ihrer morphologischen Ausgestaltung unlöslich zu machen. Dazu sind nicht alle Fixierungsmittel gleichmäßig befähigt, da manche wohl fällen, aber nicht unlöslich; die gebräuchlichsten allerdings fällen alle Eiweißkörper unlöslich.

Welche Veränderungen unter deren Einwirkung in der lebenden Zelle sich vollziehen, können wir nur dann ermessen, wenn wir uns die grundlegende Frage beantworten, in welchem Aggregatzustand die Eiweißkörper in der lebenden Zelle vorhanden sind.

Zwei Extreme stehen neben einander, entweder sie sind vollkommen gelöst, oder sie sind vollkommen fest. Letzteres schließt sich dadurch aus, dass sämtliche Eiweißkörper quellungsfähige Kolloide sind, die immer von dem Wasser des Protoplasmas etwas aufnehmen müssen. F. nimmt deshalb an, dass in der Zelle neben vollkommen gelösten Eiweißkörpern solche in allen Stadien der Quellung sich vorfinden. Die am stärksten gequollenen erscheinen zähflüssig, die am wenigsten gequollenen fest. Wie werden sich nun die Fixierungsmittel gegenüber diesem Aggregatzustand der Eiweißkörper verhalten?

Gelöste Eiweißkörper können diffus verteilt, oder in eine Vakuole eingeschlossen in der Zelle vorkommen. In beiden Fällen werden sie nach ihrer spezifischen Fällungsart je nach dem Fixierungsmittel in unlöslicher oder löslicher Form niedergeschlagen werden. Ist der Durchmesser der Vakuole, gering oder bei größerem Umfang der Vakuole die Konzentration des Inhalts groß, so kann es geschehen, dass die ursprüngliche Fällungsform nicht zu Tage tritt, sondern die ganze Vakuole in toto gefällt wird als ein homogenes Gebilde.

Gequollene Eiweißkörper werden umso mehr zur Ausscheidung in der spezifischen Fällungsform neigen, je dünnflüssiger sie sind; sie werden umso leichter sich in toto und homogen fixieren lassen, je zäher und wasserärmer sie sind.

Dies sind die hauptsächlichsten Gesichtspunkte, welche bei der Beurteilung der Fixierungswirkung im Auge zu behalten sind.

Wir müssen also sagen: Fixierungsmittel haben eine äußerst mannigfaltige Gelegenheit durch Fällung das ursprüngliche Strukturbild zu verändern. Nur für die lebend bereits festeren Gebilde bestehen einigermaßen günstige Aussichten auf eine naturgetreue Erhaltung. So z. B. sind die Chromosomen in der lebenden Zelle nicht feste Gebilde mit unverrückbarer Struktur, sie sind zähflüssig und nicht starr wie sie in den fixierten Präparaten erscheinen. Sicher werden sie durch die Fixierungsmittel in etwas verändert durch Wasserentziehung und Verdichtung, bisweilen wohl auch durch Gerinnung und spezifische Fällungsform der sie zusammensetzenden Eiweißkörper.

Ein unverzerrtes Abbild der ursprünglichen Struktur ist niemals durch die Fixierungsmittel zu erreichen, da ja alle noch nicht unlöslichen Zellbestandteile ausgefällt werden. Jedem Fixierungsmittel entspricht ein

ihm eigenes Fixierungsbild. Um nun eine kritische Scheidung zwischen künstlichen und natürlichen Strukturen vornehmen zu können ist es notwendig bei cellulären Fragen stets mehrere Fixierungsmittel anzuwenden. Diese können aber nicht beliebig ausgewählt werden, sondern müssen verschiedenen der aufgestellten fixierungstechnischen Gruppen angehören. Abweichungen der Befunde an verschiedenen Stellen eines Präparates geben nicht ohne Weiteres die Berechtigung zwischen den Bildern eine Auswahl zu treffen, die einen als gut fixiert und naturgetreu zu erklären, die anderen als schlecht fixiert unbeachtet zu lassen.

II. Die Färbung.

Ueber die Wirkungsweise der Farbstoffe auf die histologischen Präparate bestehen zwei sich bekämpfende Theorien, die man als physikalische und chemische unterscheiden kann. Nach der letzteren würde die Aufnahme der Farbe durch einzelne Zellbestandteile eine chemische Verbindung darstellen, die auf einer chemischen Affinität beruht.

Es würden also aus der Färbung Schlüsse über die chemische Verwandtschaft resp. Identität übereinstimmend sich färbender Zellbestandteile sich ergeben.

Diese Ansicht ist augenblicklich die herrschende.

Nach der physikalischen Färbungstheorie beruht die Aufnahme der Farbe durch bestimmte Zellbestandteile nur auf deren, eventuell wechselnden, physikalischen Beziehungen; es ist also nicht möglich, mit Hilfe der Färbung eine chemische Charakterisierung und Identifizierung bestimmter Zellbestandteile vorzunehmen. Letztere Annahme, die bereits von einzelnen Forschern vertreten wurde, sucht F. fest zu begründen durch eine Reihe von Versuchen, an welche sich kritische Erörterungen mit Berücksichtigung der Litteratur anknüpfen.

Zuerst wird besprochen die Wahl eines geeigneten Objectes für Färbungsversuche. Natürliche Objecte erscheinen dafür sehr wenig geeignet, da sie chemisch durchaus nicht präzis charakterisierbar sind. Wohl aber sind dazu verwendbar künstliche Granula und Gerinnsel. Diese sind chemisch annähernd bestimmbar, da sie entweder chemische Verbindungen zwischen Fixierungsmittel und Eiweißkörper oder physikalische Fällungen darstellen, die aus der Unlöslichkeit des Eiweißkörpers im hinzugegossenen Fixierungsmittel hervorgingen. Diese Niederschläge sind außerdem dem natürlichen Object möglichst ähnlich als Eiweißkörper, die mit denselben Fixierungsmitteln behandelt wurden. Ein weiterer, bereits erwähnter Vorteil derselben besteht darin, dass sie die Möglichkeit bieten ein und denselben chemischen Körper in verschiedener Größe des Kornes zu untersuchen.

F. prüft zuerst die Beziehungen zwischen Fixierungsmittel und Färbung. Es geschieht dies in der Weise, dass Niederschläge ohne vorangehendes Auswaschen zu Deckglastrockenpräparaten verwandt werden. Diese enthalten also noch Reste des Fixierungsmittels und werden mit den verschiedensten Farblösungen behandelt. Es zeigt sich nun, dass sich die Fixierungsmittel nach ihrem Verhalten zu den Farbstoffen in 3 Gruppen ordnen lassen und zwar 1. Indifferente; diese hindern auch wenn sie nicht ausgewaschen werden, die Färbung nicht (Alkohol, Formaldehyd, Essigsäure, nahezu indifferent Pikrinsäure). 2. partielle Farb-

feinde; sie verhindern ausgewaschen nur manche Färbungen (Chromsäure, Kaliumbichromat, Flemming'sche Lösung, Sublimat). 3. Totale Farbfeinde, setzen unter allen Umständen die Färbbarkeit des nicht ausgewaschenen Niederschlages herab, oder heben sie ganz auf (Platinchlorid, Hermann'sche Lösung, Tannin, Osmiumsäure, Altman'sche Lösung, Jodalkohol).

Beruhet diese Erscheinung der partiellen und totalen Farbfeindlichkeit auf einem chemischen oder physikalischen Vorgang? Darüber giebt folgender Versuch Aufschluß: Bringt man ein farbfeindliches Fixierungsmittel im Reagensglas mit einer Farblösung zusammen, so treten keine farbzerstörenden Umsetzungen ein. Daraus geht wohl zur Genüge hervor, dass die Farbfeindlichkeit keine chemischen Veränderungen zur Ursache haben kann. Auf physikalischem Wege aber sucht sich F. diese Erscheinung folgendermaßen zu erklären: Ein Teil des Fixierungsmittels geht mit dem Eiweißkörper eine chemische Verbindung ein, ein anderer Teil dagegen ist chemisch nicht gebunden, er ist chemisch überschüssig und lediglich adsorbiert. Dies nur physikalisch gebundene, adsorbierte Fixierungsmittel versperrt dem Farbstoff den Platz, da es alle Adsorptionsaffinitäten des Granulums sättigt, dasselbe „verstopft“. Dieser nur physikalisch gebundene Teil des Fixierungsmittels wird durch Auswaschen entfernt und nun kann das Granulum seine mechanischen Affinitäten aufs Neue sättigen und zwar mit dem Farbstoff. Die leichtere oder schwerere Auswaschbarkeit eines Fixierungsmittels ist die Resultante aus dem aktiven Adsorptionsvermögen der Granula und dem passiven Adsorptionscoefficienten des Fällungsmittels. Indifferenten Fixierungsmitteln werden fast gar nicht adsorbiert und verstopfen deshalb die Fällungsgranula nicht.

Diese Erwägung bildet für F. die Grundlage einer physikalischen Färbungstheorie, die er nun weiter zu stützen sucht.

Zuerst beschäftigt er sich mit der Frage; giebt es basophile und acidophile Eiweißkörper d. h. solche, die sich vorwiegend oder ausschließlich mit basischen oder mit sauren Farben färben? Zur Entscheidung dieser Frage sind nur solche Fällungsniederschläge verwendbar, die mit indifferenten Fixierungsmitteln hergestellt wurden. Denn diese Fällungen bewahren am besten das einem Eiweißkörper oder Gewebeelement innewohnende Färbungsvermögen, da sie ja das Fixierungsmittel fast gar nicht adsorbiert enthalten. Diese indifferenten Niederschläge lassen demnach das primäre Adsorptionsvermögen des Eiweißkörpers für die Farbe, die primäre Chromatophilie deutlich hervortreten. Die farbfeindlichen Fixierungsmittel, und zwar die schweren Metalle in denselben, verleihen dem Eiweißkörper neue färberische Eigenschaften, ein sekundäres Adsorptionsvermögen, sekundäre Chromatophilie. Diese sekundäre Färbungsstimmung richtet sich nur gegen saure Farben und Methylgrün und steht in gesetzmäßigen Beziehungen zum spezifischen Gewicht.

Aus zahlreichen Färbungsversuchen von indifferent gefällten Eiweißkörpern mit einfachen wässerigen Farblösungen ohne anschließende Differenzierung ergibt sich, dass alle Eiweißkörper mit alleiniger Ausnahme der Nukleinsäure sich indifferent verhalten, d. h. sowohl durch saure wie durch basische Farblösungen gefärbt werden. Die Nukleinsäure allein ist acidophob, sie färbt sich nicht mit sauren Farben. Diese eigentümliche

Ausnahme bleibt insofern ohne Bedeutung für die Beurteilung der Färbung des natürlichen Objektes, als hier keine freie Nukleinsäure vorkommt.

Uebrigens wird durch Schwefelsäure die Färbkraft saurer Farben erhöht und so kann durch Zusatz von Schwefelsäure zu sauren Farben die Acidophobie der Nukleinsäure mit Erfolg bekämpft werden. Die Wirkung der Schwefelsäure soll dabei keine chemische sein, weder auf die Farblösung, noch auf das Färbungsobjekt, sondern sie soll darin bestehen, dass sie die Löslichkeit des sauren Farbstoffes im Lösungswasser herabsetzt und so sein Ausfallen auf das Färbungsobjekt erleichtert.

In indifferent fixierten natürlichen Objekten ist also kein einziger Zellbestand acidophob. Die Chromosomen wie der ruhende Kern stimmen in ihrem Verhalten mit dem Nuklein überein. Totale Basophilie wird überhaupt nicht beobachtet. Dass die einzelnen Bestandteile in der Zelle denselben Farbstoff in sehr verschiedenem Grade speichern, ist auf mechanische, nicht auf chemische Ursachen zurückzuführen.

Nach der Widerlegung der Basophilie und Acidophilie wendet sich F. zu einem zweiten Argument der chemischen Färbungstheorie, der Färbung mit Differenzierung und Nachfärbung. Diese sog. *succedanea* Doppelfärbung besteht in maximaler Färbung mit einer einfachen Farblösung, dann maximale Entfärbung bis nur noch bestimmte Gewebelemente die Farbe behalten und darauf Nachfärbung mit einer zweiten, einfachen Farblösung. Von solchen bekannten Methoden *succedanea* Doppelfärbung wurden geprüft: 1. Altman's Säurefuchsin-Pikrialkohol, 2. Safranin-Säurealkohol-Gentiana (Flemming-Hermann), 3. Karbolfuchsin-Säure-Methylenblau (Tuberkelbacillenfärbung), 4. Gram'sche Färbung, 5. Eisenalaun-Haematoxylin (Benda-Heidenhain).

Aus den geschilderten Versuchen und Beobachtungen ergibt sich, dass keine chemischen Affinitäten, sondern vielmehr die Masse der einzelnen Färbungsobjekte sowie die Reihenfolge in der Anwendung der Farblösungen den Effekt bestimmen. Färbt man einen indifferenten Niederschlag, der aus großen und kleinen Granulis besteht, so behalten nach der Differenzierung die großen Körner die zuerst angewandte Farbe am längsten, die kleinen erscheinen in der Kontrastfarbe. Kehrt man aber die angewandten Farben um, so bleibt das Verhältnis dasselbe, indem stets die großen Granula die erste, die kleineren die zweite Farbe erhalten. Dieser Vorgang lässt sich nicht als ein chemischer sondern nur als ein physikalischer verstehen. Auf die Einzelheiten des von F. gegebenen Erklärungsversuches können wir hier nicht eingehen.

An dritter Stelle kommt zur Erörterung die Elektion gewisser Farbstoffe aus Farbgemischen durch bestimmte Zellbestandteile. Es ist dies die sog. *simultane* Doppelfärbung. Eine Differenzierung kommt hier nicht zur Anwendung. Gerade diese Art der Färbung gilt als ein untrüglicher Beweis für die Richtigkeit der chemischen Färbungstheorie. Von vornherein erscheinen bedenklich die vielfach auftretenden Mischfarben und die bekannte Launenhaftigkeit in den Resultaten der simultanen Doppelfärbung.

Die Farbmischungen sind einzuteilen in homogene und heterogene. Erstere sind entweder saure oder alkalische, sie bestehen nur aus sauren oder nur alkalischen Farblösungen, die heterogenen Gemische setzen sich aus beiden zusammen.

In den homogenen Farbmischungen wird die Färbkraft durch das Lösungsmittel — reines Wasser — für die einzelnen Komponenten in gleichem Sinne beeinflusst. Die Konzentration der einzelnen Farben ist aber in den meisten homogenen Gemischen verschieden wegen der verschiedenen Löslichkeit der Komponenten. Dies gilt auch in noch viel höherem Grade für die heterogenen Mischungen. In diesen wird auch die Färbkraft saurer Farben herabgedrückt, die der basischen erhalten. Außerdem tritt bisweilen eine partielle Fällung der basischen Farbe durch die saure ein.

Jedenfalls können wir annehmen, dass in der großen Mehrzahl sowohl homogener wie heterogener Farbgemische die einzelnen Komponenten nicht äquivalent sind, in der Regel in verschiedener Konzentration sich vorfinden.

Die Färbung beginnt mit einer Hydrodiffusion der Gemischkomponenten gegen die zu färbenden Objekte. Jede Komponente eines Farbgemisches diffundiert mit der ihr eigentümlichen Geschwindigkeit und proportional ihrer Konzentration und tritt in der hierdurch bestimmten Reihenfolge und Gewichtsmenge an das Objekt heran. Nach dieser Auffassung würde also das Resultat der simultanen Doppelfärbung nicht auf einer chemischen Elektion beruhen, sondern sich darstellen als das gemeinsame Ergebnis der relativen Diffusionsgeschwindigkeit und der Konzentration der Gemischkomponenten. Dass dem wirklich so ist, sucht F. durch eine lange Reihe von Versuchen und Berechnungen darzuthun (S. 118—158).

Sehr interessant und wichtig für die Begründung der physikalischen Färbungstheorie ist das Kapitel VI (S. 158—174). F. berichtet hier über eine Anzahl von Experimenten, durch Einlagerung eines Stoffes, der chemisch die Graula nicht verändert und auch den Farbstoffen gegenüber indifferent ist, die Färbung zu unterdrücken. Erfolge wurden erzielt durch Imprägnierung mit Fixierungsmitteln, Amidokörpern, Tannin, Albumose, Nukleinsäure. „Statt das Färbungsvermögen vollkommen zu vernichten, wurde auch versucht, es umzustimmen, die Chromatophilie zu verschieben“ z. B. Beseitigung der Acidophobie der Nukleinsäure. Damit erscheint ein neuer Beweis erbracht für die physikalische Adsorptionstheorie. Der Platz, den sonst die Farbstoffe einnehmen wird durch einen harmlosen Körper versperrt. Dies kann nur auf einer Sättigung mechanischer Affinitäten beruhen.

Nachdem F. in den dargelegten Beobachtungen und Reflexionen der physikalischen Färbungstheorie eine feste Grundlage gegeben, beschäftigt er sich in Kap. VII mit der Abfertigung einiger Einwände, welche in früherer Zeit gegen dieselbe erhoben wurden. Er weist dann noch in eingehender Besprechung darauf hin, dass es unberechtigt ist, das Chromatin als einen chemischen Begriff zu fassen, da es richtiger ein morphologischer sei. Auch sei es als unbegründet erwiesen, von Kernfarbstoffen zu reden. Besonders wendet er sich noch gegen das Bestreben von Bütschli und vielen Bakteriologen, aus Färbungsversuchen auf die Kernnatur der Bakterien zu schließen.

III. Der Bau des Protoplasmas.

Der III. und letzte Teil des Buches zerfällt wieder in drei Unterabschnitte. Deren erster behandelt die Strahlungen.

Ein charakteristisches Merkmal aller Strahlungen in den Zellen ist das Vorhandensein eines morphologischen Mittelpunktes, sei es nun Centrosom, Kern oder Nukleolus, von dem aus die Strahlen nach allen Richtungen hin sich erstrecken.

Alle Strahlen erscheinen als morphologischer Ausdruck für lebhafte Umwälzungen in wichtigen Abschnitten des Zellenlebens. Versuche, Strahlungen künstlich zu erzeugen, sind schon wiederholt gemacht worden. Die neuen Experimente von F. zeichnen sich den früheren gegenüber aus durch größere Annäherung an die natürlichen Verhältnisse.

F. unterscheidet zwei Arten von künstlichen Strahlungen, nämlich Fremdstrahlung und Selbststrahlung. Erstere wird erzeugt in Hollundermarkprismen, die mit einer Eiweißlösung injiziert sind. Fertigt man hiervon Schnitte an und setzt einige Tropfen Fixierungsflüssigkeit zu, während man unter dem Mikroskop beobachtet, so sieht man in vielen Fällen innerhalb je einer Hollundermarkzelle eine künstliche Strahlung auftreten. Diese beginnt stets an einem Kernreste, der im Innern einer sonst leeren Hollundermarkzelle zu liegen pflegt. Von hier schreitet die Strahlenbildung rasch nach der Peripherie der Zelle hin fort. Sind innerhalb einer Zelle mehrere (2—3) Kernreste vorhanden, so entstehen Strahlungen auch zwischen diesen und man erhält Bilder ähnlich den karyokinetischen Figuren. Die Erzeugung künstlicher Strahlungen im Hollundermark gelingt nicht nur durch Zusatz verschiedener Fixierungsmittel, sondern je nach der Wahl des injizierten Eiweißkörpers auch durch Verdünnen der Lösung mit Wasser oder durch Neutralisierung. Auch wenn Mischungen von Eiweißlösungen injiziert werden, lassen sich Strahlungen hervorrufen. Der Kernrest der Markzelle erscheint in allen diesen Versuchen als Centrum der Strahlung. Er wirkt dabei wohl ähnlich einem Staubteilchen, das in einer übersättigten Salzlösung Krystallisation verursacht. Von dem Ablauf des Vorganges macht sich F. folgende Vorstellung: Das Fixierungsmittel dringt von allen Seiten in Kugelwellen gegen den Kernrest vor und erreicht ihn in starker Verdünnung. Allmählich nimmt aber hier die Konzentration zu. Die Fällungskonzentration wird selbstverständlich zuerst in der Peripherie der Zelle erreicht, später erst in der Nähe des Kernrestes. Dieser wirkt nun als heterogener Körper, die Ausfällung beginnt in seiner Umgebung und setzt sich von da nach der Peripherie hin fort. Diese Erscheinung kann aber nur dann eintreten, wenn die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Eiweißlösung und Fixierungsmittel gering ist. Andernfalls beginnt die Ausfällung bereits an der Wand.

Ein anderer Versuch besteht darin, dass man einige Tropfen Eiweißlösung in einen Vaseline Rahmen auf dem Objektträger einschließt, ein Deckglas auflegt und dann durch ein kapilläres Glasröhrchen in das Centrum der Eiweißlösung Fixierungsflüssigkeit einströmen lässt. Es treten dann Strahlungen auf rings um die Mündung der Kapillare. Diese werden als Selbststrahlung bezeichnet. Im Prinzip ist diese Erscheinung in ganz analoger Weise zu erklären wie die Fremdstrahlung.

F. vergleicht dann die natürlichen Strahlungen mit seinen künstlichen. Die histologische Strahlung ist nicht dauernd in der Zelle vorhanden sondern entwickelt sich. In der Art dieser Entwicklung wie im Bau und Verlauf bestehen Uebereinstimmungen zwischen natürlichen

und künstlichen Strahlungen. Diese Uebereinstimmungen erscheinen F. so vollkommen, dass er seine künstlichen Strahlungen höher geschätzt haben will als eine nur rein äußerliche Nachahmung der natürlichen.

Wir kommen weiter zum zweiten Unterabschnitt. Derselbe beschäftigt sich mit Centralkörperchen und Sphäre. Einleitend sagt F., dass er Centrosomen und Strahlungen nicht durchweg als Fixierungsartefakte betrachtet. Es erscheint ihm aber wünschenswert, eine genaue Scheidung zwischen Natur und Kunst durchzuführen. In solchen Fällen aber, wo unbestreitbar natürliche Befunde vorliegen, soll der Versuch zu einer einfacheren Erklärung der Erscheinungen gemacht werden, die ohne Annahme eines neuen Zellorgans, eines Centralkörpers, auskommt.

An der Hand der Litteratur führt F. den Nachweis, dass die Centralkörper weder nach ihrer Färbungsart, noch nach morphologischen Eigentümlichkeiten, Zahl und Lage eindeutig charakterisiert sind. Es ist deshalb wohl anzunehmen, dass viele Dinge unberechtigter Weise als Centralkörper beschrieben sind. So z. B. mag dies öfters gelten für Nukleolen, die aus dem Kern ausgestoßen wurden und durch eine succedane Differenzierungsfärbung, sogen. Spiegelfärbung mit dunkeln Centrum und heller, entfärbter Peripherie Aehnlichkeit mit Centrosomen erhielten.

Weiterhin versucht F. zu zeigen, dass der Bau der mitotischen Figur und die Bewegungsvorgänge während der Kernteilung auch vollkommen sich verstehen lassen ohne die Annahme eines besonderen kinetischen Organs, ohne die Zuhilfenahme von Centralkörperchen und Sphäre.

So soll nach F.'s Darstellung die Karyokinese beginnen mit einem Längenwachstum des Kernes. Wenn dieses einen gewissen Grad erreicht habe, erfolge an den Polen eine Zerreißung der Wand, hier träten dann Nukleolen aus und infolge der eröffneten Diffusion zwischen den Eiweißbestandteilen von Zelleib und Kern bildeten sich vitale Niederschläge, die sich als Strahlungen gruppieren um einen ausgetretenen Nukleolus als Mittelpunkt, so dass nun das Bild von Centralkörperchen und Sphäre entstände.

Strahlungen lassen sich künstlich erzielen, brauchen also keine besonderen Zellorgane zu sein. Die Ursachen der natürlichen Strahlungen sieht F. wie die der künstlichen, in Fällungsvorgängen innerhalb der Eiweißstoffe der Zelle. Diese Fällungsvorgänge sollen mit manchen Zellprozessen einhergehen.

Um die Bewegung der Chromosomen zu erklären ist es nach F.'s Ansicht nicht nötig, komplizierte Bewegungsmechanismen anzunehmen. Dazu bedarf es keiner ziehenden oder schiebenden Spindelfasern und Polstrahlen. Wenn man annehme, dass den Chromosomen keine eigene Bewegungsfähigkeit zukäme, so genüge doch das Wachstum der Zelle und die gewöhnliche Protoplasmaabewegung vollständig um den Ortswechsel der Chromosomen zu vollziehen.

Ein besonderer kleiner Abschnitt behandelt die Centralkörper in der Spermatogenese.

Auch hier wie bei der Befruchtung erscheint F. die Annahme von Centralkörpern unnötig.

Die Spermatogenese gehe einher mit einer starken Verdichtung der Zell- und Kernsubstanzen der Spermatide im Dienste größerer Beweglichkeit. Solche verdichtete Zellbestandteile seien besonders bei der Un-

zuverlässigkeit der Färbemethoden, die ja nur physikalische Unterschiede anzeigen, wohl im Stande Centalkörper vorzutauschen. Die Spermastrahlung im befruchteten Ei sei auch ohne ein strahlererregendes Centalkörperchen verständlich durch die lebhaften physikalisch-chemischen Veränderungen, die bei diesem wichtigen Prozess sich jedenfalls abspielen werden.

Wir kommen zum letzten Abschnitt.

Dieser trägt den Titel: Die Polymorphie des Protoplasmas. F. weist aus der Litteratur nach, dass alle zur Zeit herrschenden Theorien über den Aufbau der lebendigen Substanz diese als monomorph erscheinen lassen, indem sie annehmen, dass die Struktur des Protoplasmas überall dieselbe ist. So lässt Altmann das Protoplasma sich zusammensetzen aus Granulis, nach Flemming ist es ein fädiges Gerüstwerk, nach Bütschli besteht es aus Waben. Dem gegenüber vertritt F. die Theorie der Polymorphie des Protoplasmas. Dasselbe ist im Allgemeinen flüssig, doch treten innerhalb desselben verschieden gestaltete, granuläre oder auch netzig gebaute, bald länger bestehende, bald schnell wieder verschwindende Ausfällungen auf, deren Aggregatzustand vom Zählflüssigen bis zum Festen schwanken wird. Homogen ist das Protoplasma häufig an der Oberfläche der Zellen, in deren Innern finden sich Granula, Gerüste, einzelne Fäden und auch gelegentlich Schaumstrukturen.

Auch künstlich gelang es F. mit Hilfe von Eiweißlösungen, die in Hollundermarkzellen injiziert waren, Bilder zu erzielen, die mit den polymorphen Gestaltungen des Zellprotoplasmas übereinzustimmen scheinen. So ergaben sich Granula, Gerüste und Fäden durch Fällungsprozesse. Schaumstrukturen entstanden durch Fällung und folgende Lösung mit einem langsam wirkenden Lösungsmittel. Zu diesen Fällungsversuchen fanden nicht nur Fixierungsmittel, sondern auch milder wirkende Reagentien, schwache Säuren und Alkalien Verwendung.

In ähnlicher Weise mögen durch Fällung und Wiederlösung nach F.'s Ansicht die polymorphen Strukturen des lebenden Protoplasmas sich bilden und vergehen. **Eggeling** (Strassburg). [20]

Charles B. Davenport, Statistical Methods, with especial reference to biological variation.

New-York and London, 1899. kl. 8°.

In einem außerordentlich handlich gestalteten Buehlein von VIII + 150 Seiten Umfang giebt der Verf. eine kurze, aber vollständige Uebersicht alles methodisch wissenswerthen der Biostatistik und eine große Anzahl zweckmäßig ausgeführter Tabellen zum Gebrauch bei den vorkommenden Rechnungen. Der Textteil (p. 1—39, 28 Fig.) zerfällt in fünf Kapitel. Das erste enthält Definitionen, Ratschläge für das Sammeln statistischer Untersuchungsobjekte und für die Behandlung solcher, bei denen direkte Messungen mit Schwierigkeiten verknüpft sind (Photographie, Camera-Zeichnung); ferner werden darin die üblichen Zählungs- und Messungsmethoden, sowie eine Reihe praktischer Messinstrumente (mit Abbildungen) besprochen, endlich Vorschläge zur schärferen und einheitlichen Bestimmung von Form- und Farbverhältnissen, erstere im Anschluss an die botanische Ausdrucksweise, gebracht. Das zweite handelt von der übersichtlichen Anordnung und der graphischen Darstellung der Zählungs-

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Biologisches Zentralblatt](#)

Jahr/Year: 1900

Band/Volume: [20](#)

Autor(en)/Author(s): Eggeling H.

Artikel/Article: [Alfred Fischer, Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas. 71-83](#)