© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

Beiträge zur Chemie der Zelle und Gewebe.

1. Über die Färbung thierischer Gewebe mit Berlinerblau.

Von

Dr. Theodor List

in Neapel.

Mit Tafel 22.

1. Über das Verhalten des Eisenchlorids zu den Nucleolarsubstanzen.

Dass der Zellkern der Lamellibranchiaten zwei verschiedene Nucleoluselemente enthält, war schon LEYDIG[1], v. HESSLING[2] und LACAZE-DUTHIERS[3] bekannt. FLEMMING[4] bestätigte dieses Vorkommen an *Anodonta*, *Unio* und *Dreissena*. Er unterscheidet[5] einen Hauptnucleolus und Nebennucleolen. Jener besteht aus einem kleineren Theile, der bedeutend stärker lichtbrechend und stärker tingirbar ist, und einem größeren, blasseren und schwächer chromatischen Abschnitte, der in Säure stärker quillt. Die Nebennucleolen zeigen dieselbe Lichtbrechung, Quell- und Tingirbarkeit wie der große blasse Theil des Hauptnucleolus. FLEMMING[5] stellte ferner fest (pag. 448), dass sich bei Anwendung von Kerntinctionen zwar der stark lichtbrechende Theil der Nucleolen besonders intensiv färbt, aber in erheblichem Grade auch der andere Theil und die Neben-

[1] F. LEYDIG, Über *Cyclas cornea* Lam. in: Arch. Anat. Phys. Jahrg. 1855 pag. 47—66 Taf. 6.

[2] TH. v. HESSLING, Die Perlmuschel und ihre Perlen. Leipzig 1859. 376 pagg. 7 Taf.

[3] H. LACAZE-DUTHIERS, Recherches sur les organes génitaux des Acéphales lamellibranches. in: Ann. Sc. N. (4) Tome 2 1854 pag. 155—248 Taf. 5—9.

[4] W. FLEMMING, Über die ersten Entwicklungserscheinungen am Ei der Teichmuschel. in: Arch. Mikr. Anat. 10. Bd. 1874 pag. 257—292 Taf. 16.

[5] Derselbe, Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung. Leipzig 1882. 424 pagg. 24 Figg. 8 Taf.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

nucleolen, zugleich natürlich das Kerngerüst. Eine ähnliche Verschiedenheit konstatirte O. Hertwig[1] bei den Eiern von *Tellina*, *Helix*, *Ascidia intestinalis*, *Sphaerechinus brevispinosus* und *Asteracanthion*. Nach ihm besteht der Hauptnucleolus aus Nucleïn und der Nebennucleolus aus Paranucleïn. Diese Bezeichnungen hält Flemming[2] (pag. 149) nicht für gerechtfertigt, da das Nucleïn doch für den Träger der chromatischen Kernsubstanz anzusehen ist, die nicht auf den stark lichtbrechenden Theil des Hauptnucleolus beschränkt sein kann, sondern wahrscheinlich auch in dem anderen schwach lichtbrechenden Theile und den Nebennucleolen vorkommt, etwa in einer besonderen chemischen Modification, für die es zweifelhaft ist, ob sie einen eigenen Namen (»Paranucleïn«) verdient. Diese Frage, ob das Nucleïn (des Kerngerüstes) und das Paranucleïn (des Nucleolus) vollkommen identisch sind, ist nach Hertwig[3] (pag. 43) bis heute noch nicht beantwortet. Er weist mit Recht darauf hin, dass im Allgemeinen zu viel Werth auf die formale Anordnung der einzelnen Bestandtheile der Zelle gelegt werde, während gerade hier mehr Gewicht auf die chemische Beschaffenheit der betreffenden Nucleolen zu legen sei. Für die Körner in den secernirenden Zellen (von Pancreas, Leber und Magenschleimhaut) fanden Lukjanow[4,5], Stolnikow[6] und Ogata[7] sehr komplicirte Verhältnisse. Je nach ihrem Verhalten zu Eosin, Nigrosin, Safranin u. a. Theerfarben werden die tingirten nucleolusartigen Gebilde als Karyosomen, Plasmosomen und Hyalosomen bezeichnet. Ferner stellte Lönnberg[8] Untersuchungen über das Vorkommen doppelter Nucleolarsubstanz an und konstatirte es an den Eiern von *Doris proxima*, *Mytilus* und *Aeolidia papillosa*.

---

[1] O. Hertwig, Weitere Beiträge zur Kenntnis der Bildung, Befruchtung und Theilung des thierischen Eies. in: Morph. Jahrb. 3. Bd. 1877 pag. 271—279, ibid. 4. Bd. 1878 pag. 156—175, 177—210 Taf. 6—11.

[2] Flemming, citirt oben pag. 477.

[3] O. Hertwig, Die Zelle und die Gewebe. Grundzüge der allgemeinen Anatomie und Physiologie. Jena 1893. 296 pagg. 168 Figg.

[4] S. M. Lukjanow, Über eine eigenthümliche Kolbenform des Kernkörperchens. in: Arch. Mikr. Anat. 32. Bd. 1888 pag. 474—478 Taf. 19.

[5] Derselbe, Beiträge zur Morphologie der Zelle. in: Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1887. Suppl. pag. 66—90 Taf. 5—11.

[6] Stolnikow, Vorgänge in den Leberzellen, insbesondere bei der Phosphorvergiftung. ibid. f. 1887. Suppl. pag. 1—27 Taf. 1, 2.

[7] M. Ogata, Die Veränderungen der Pankreaszellen bei der Secretion. ibid. f. 1883 pag. 405—437 Taf. 6.

[8] Einar Lönnberg, Kernstudien. in: Verh. Biol. Ver. Stockholm 4. Bd. 1892 pag. 83—97 6 Figg.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

Im Glauben, dass bis jetzt diese Nebennucleolen nur von Eikernen bekannt wären (die oben citirten Arbeiten scheinen dem Autor entgangen zu sein), untersuchte er die Leberzellen von *Doris proxima* und fand, dass bei gelungener Färbung mit Safranin, Gentiana und Orange der Nucleolus dunkelroth, der Nebennucleolus violettgrau wird. Die Lage beider Nucleolarbestandtheile ist sehr verschieden, bald sind sie getrennt, bald in einander versenkt. Ähnliche Befunde ergab auch die Leber von *Polycera ocellata*, *Aeolidia papillosa* und *Astacus fluviatilis*.

Haecker[1] (pag. 250) erwähnt, dass bei *Canthocamptus* gegen den Schluss der Eireifung, wenn die Verdichtung des Chromatins ihren Höhepunkt zu erreichen beginnt, neben dem verkleinerten Hauptnucleolus mehrere, sich meist weniger intensiv färbende Nebennucleolen auftreten. Er nimmt an, dass Veränderungen normaler Natur, die während dieser Zeit auf die ganze Zelle einwirken, die weitere Apposition der sich neu bildenden Nucleolarsubstanz an den Hauptnucleolus verhindern und Verdichtungscentren hervorrufen, die häufig ein anderes Färbungsvermögen besitzen als der Hauptnucleolus. Diese Befunde vergleicht Verf. vom rein morphologischen Standpunkte aus mit denen von Flemming[2] im Ei der Lamellibranchiaten konstatirten differenten Nucleolarsubstanzen. — Stauffacher[3] fand (pag. 204), dass sich bei *Cyclas* die doppelte Nucleolarsubstanz mit Hämalaun gleich tiefblau färbte, so dass zwischen beiden Nucleoli nur ein Größenunterschied bestand, während Boraxcarmin den kleineren stärker tingirte als den größeren. — In jüngster Zeit hat endlich Floderus[4] bei Ascidien (*Styela rustica*, *Ciona intestinalis* u. a.) gefunden, dass der Nucleolus im Sinne Flemming's im Leben (bei *Ciona*) eine stärker lichtbrechende, etwas fettglänzende Substanz darstellt, von welcher eine andere vacuolenähnliche, weniger lichtbrechende, entweder vollständig umschlossen oder wenigstens größtentheils begrenzt wird. Ob es sich wirklich um eine Vacuole oder ein Bläschen voll Flüssigkeit handelt, konnte nicht festgestellt wer-

---

[1] V. Haecker, Die Vorstadien der Eireifung (zusammenfassende Untersuchungen über die Bildung der Vierergruppen und das Verhalten der Keimbläschen-Nucleolen). in: Arch. Mikr. Anat. 45. Bd. 1895 pag. 200—273 Taf. 14—17.

[2] Flemming, citirt oben pag. 477.

[3] H. Stauffacher, Eibildung und Furchung von *Cyclas cornea* L. in: Jena. Zeit. Naturw. 28. Bd. 1894 pag. 196—246 Fig. Taf. 11—15.

[4] M. Floderus, Über die Bildung der Follikelhüllen bei den Ascidien. in: Zeit. Wiss. Z. 61. Bd. 1896 pag. 163—260 Taf. 10.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

den. Der Nucleolus selbst ist deutlich eosinophil. In älteren Keimbläschen wurden bisweilen außer dem großen Nucleolus meist einer, selten mehrere kleinere Nebennucleolen angetroffen. Selten erreichen sie die Größe des Hauptnucleolus. Bei *Ciona* verhalten sich Haupt- und Nebennucleolus Wasser und Magnesiumsulfat gegenüber ganz gleich. Auch bei der Einfachfärbung mit Hämatoxylin, Eosin, Safranin und Gentianaviolett nehmen beide diese Farben auf. Bei gelungener Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin ist der Nebennucleolus entschieden eosinophil, aus einer Mischung von Safranin und Gentianaviolett nimmt er jenes auf. »Bisweilen findet man jedoch Fälle, wo die Nebennucleolen sowohl von Hämatoxylin als Eosin sowie auch von Safranin und Gentianaviolett gleich stark gefärbt werden.«

Wir sehen hieraus, dass es kein sicheres Färbemittel giebt, das scharf darauf hinwiese, dass wirklich 2 verschiedene Nucleolarsubstanzen vorhanden sind, und es ist, wie Hertwig[1] auch hervorhebt, noch unmöglich, durchgreifende Regeln über die Tingirbarkeit der beiden Kernsubstanzen, Nucleïn und Paranucleïn, aufzustellen, da das Wesen des Färbungsprocesses uns noch zu wenig verständlich ist.

Eigene Untersuchungen. Während meiner Studien an Lamellibranchiaten, die für eine Monographie bestimmt sind, machte ich einige interessante Versuche an der Nucleolarsubstanz, die, wie ich im Verlaufe dieser Arbeit beweisen werde, von allgemeinerer Bedeutung sind und desshalb schon jetzt veröffentlicht werden mögen.

Erste Methode. Es handelt sich zunächst um Schnittpräparate von *Mytilus*, die von Material, in Sublimat conservirt, stammten und neben anderen Organen auch das Ovar getroffen hatten. Lässt man auf einen solchen Schnitt 2 Tropfen einer 1,5%igen Lösung von gelbem Blutlaugensalz etwa 5 Minuten lang einwirken, gießt dann den einen überflüssigen Tropfen ab und setzt 1—2 Tropfen einer 1%igen Salzsäure[2] zu, so kann man schon nach kurzer Zeit unter dem Mikroskope erkennen, dass in jeder Eizelle nur die Nebennucleolarsubstanz, das Paranucleïn, die charakteristische Berlinerblau-Reaction zeigt. Eine wesentliche Bedingung zum Gelingen der Reaction ist vor Allem die, dass das Präparat in Berührung mit der Luft bleibt; im Allgemeinen sollen ja eigentlich die beiden angewandten Reagentien gerade zum Nachweise von Eisen dienen, also direct keine

---

[1] Hertwig, citirt oben pag. 478.

[2] Die concentrirte Salzsäure hat das spec. Gewicht von 1,10.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

Fällung mit einander geben. Meist ist jedoch die Salzsäure nicht ganz frei von Eisen, und selbst wenn sie es ist, so kann bei ihrer langen Einwirkung auf gelbes Blutlaugensalz die Eisenblausäure oder Ferrocyanwasserstoffsäure entstehen und dann unter dem Einflusse des atmosphärischen Sauerstoffs Berlinerblau. Hieraus geht schon von selbst hervor, dass es immer zweckmäßig sein wird, möglichst wenig Flüssigkeit auf dem Schnitte zu haben[1]. Die Nebennucleolarsubstanz zeigt also eine stark ausgesprochene Affinität zur Säure. Das Berlinerblau ist als Farbe ganz brauchbar, da es in Wasser, verdünnten Säuren, Alkohol und Äther unlöslich ist, sonach einer weiteren Doppelfärbung und Überführung des Präparates in Balsam keine Hindernisse entgegensetzt. — Über *Mytilus* liegt nur die Beobachtung Lönnberg's[2] vor, wonach in den Nucleolen oft eine oder bisweilen zwei große hellere Kugeln in der Mitte oder ein wenig excentrisch liegen, die von der stärker tingirbaren Substanz, dem Hauptnucleolus Flemming's, vollständig umschlossen werden; »es ist schwer zu entscheiden, ob es sich hier nur um Vacuolen handelt«. Dass es aber keine Vacuolen, wenigstens in den meisten Fällen, sind, sondern wirklich Nebennucleolen, glaube ich durch die obige Reaction bewiesen zu haben. Um ein Bild von dem Verhältnis der Lage- und sonstigen Beziehungen der beiden Nucleolarsubstanzen zu einander zu bekommen, wurden die Schnitte tüchtig mit destillirtem Wasser abgespült und dann mit einem Carmin (Borax-, Para- oder Mayer's Carmin) nachgefärbt. Hierdurch bekommt man ein schönes Contrastbild[3].

Auf den so angefertigten Präparaten constatirte ich Folgendes. Die Masse des Hauptnucleolus, das Nucleïn, hatte sich scharf roth gefärbt, die Nebennucleolarsubstanz, das Paranucleïn, rein

[1] Sublimat wurde desshalb zur Conservirung genommen, da es neben seiner allgemein anerkannten Eigenschaft als vorzügliches Fällungsmittel für Eiweißkörper (wodurch möglichst viel in der Zelle erhalten bleibt) noch den Vorzug hat, schnell und vollständig entfernt werden zu können. Für die Eisenreaction wäre ja die Gegenwart von Sublimatkrystallen kein Hindernis, sondern gerade das Gegentheil, indem eine Umsetzung in Ferrocyanwasserstoffsäure resp. Berlinerblau begünstigt würde.

[2] Lönnberg, citirt oben pag. 478.

[3] Bei dieser Carminfärbung möchte ich anempfehlen, nicht das ganze Präparat in ein Glas voll Farblösung zu stellen, sondern nur einige Tropfen auf den Objectträger zu geben. Denn erstens ist es gut, wenn man nach kurzer Einwirkung der Farbe diese einmal wechselt, weil ja leicht Spuren der vorher angewandten Reagentien dem Präparat anhaften könnten, und zweitens würde durch diese die Lösung im Glase bald verderben.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

blau. Selbst in sehr jungen Eiern (solchen, die noch keinen Dotter besaßen) ließ sich auf diese Weise zeigen, dass beide Substanzen vorhanden sind. Bei *Mytilus* bildet der Hauptnucleolus stets die Hauptmasse. Er ist meist kugelig, seltener oval. Die Nebennucleolen sind bedeutend kleiner als der Hauptnucleolus und auch meist kugelig. In jungen Eiern (Taf. 22 Fig. 1) stellt der Hauptnucleolus oft eine große Kugel dar, in der ein kleiner Nebennucleolus eingelagert ist. Bisweilen trifft man 2 solcher Gebilde an, so auch in älteren Eiern (Fig. 4 und 6). Der Nebennucleolus kann aber auch wie eine Mütze auf dem Hauptnucleolus sitzen, oder er hat die Form einer Kugel, die beiderseits 2 Handgriffe besitzt (Fig. 2 und 3). Es giebt ferner viele Fälle, in denen außer dem einen vom Hauptnucleolus eingeschlossenen Nebennucleolus, der in älteren Eiern meist peripher liegt, noch andere darin auftreten, welche auch peripher lagern, und solche, die sich getrennt von ihm im Kernraume vorfinden (Fig. 5 und 7). Außerdem beobachtet man nicht selten im Hauptnucleolus eine oder mehrere echte Vacuolen (Fig. 7). Zuweilen liegt ein an der Peripherie der Hauptnucleolen gelagerter Nebennucleolus gerade vor einer Vacuole. Oft, wenn der Hauptnucleolus eine Vacuole einschließt, nimmt man in dem Chromatingerüst eine Menge blauer Kügelchen wahr, die besonders da, wo mehr Chromatin angehäuft ist, d. h. an den Kreuzungsstellen der Fäden, stärker sind (Fig. 8).

Ob es sich um Spaltungsprodukte des Chromatins oder Nährmaterial handelt, darauf werde ich in meiner Monographie näher eingehen.

Zugleich möchte ich für *Mytilus* noch Folgendes feststellen: der von Hessling[1] bei *Anodonta* entdeckte und von Flemming[2] bestätigte Nebenkörper ist auch bei *Mytilus* vorhanden. Stauffacher[3] fand ihn bei *Cyclas* nicht. Er ist seither nie mehr beobachtet worden. Ich finde aber nicht nur 1, sondern bis 3 vor, und zwar in jeder Lage vom Rande der Eizelle bis im Kerne selbst, zugleich war in diesem Stadium die Nebennucleolarsubstanz fein im Kerne vertheilt, und der Hauptnucleolus besaß mehrere Vacuolen.

Zweite Methode. Da die für *Mytilus* angewandte Methode (1), bei welcher das Object vorher nicht mit Eisen behandelt worden war,

---

[1] Th. v. Hessling, Einige Bemerkungen zu des Herrn Dr. Keber's Abhandlung »Über den Eintritt der Samenzellen in das Ei. Insterburg 1853«. in: Zeit. Wiss. Z. 5. Bd. 1854 pag. 392—419 Taf. 21.

[2] Flemming, citirt oben pag. 477.

[3] Stauffacher, citirt oben pag. 479.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

für größere Schnitte keine gleichmäßigen Resultate liefern möchte oder wenigstens die Reaction viel längere Zeit nothwendig hätte, so versuchte ich, mit Hilfe einer starken Säure Eisen in ganz geringer Menge an die Nebennucleolarsubstanz zu binden. Bei dieser Methode (2) diente mir *Pholas dactylus*, der sich durch besonders massige Nebennucleolarsubstanz auszeichnet, als Object. Die mit Wasser aufgeklebten Schnitte wurden eine halbe Stunde in ein Bad gestellt, das 50 ccm destillirtes Wasser, 10 Tropfen einer 0,5%igen Eisenchloridlösung[1] und 5 Tropfen 1%iger Salzsäure enthielt. Dann wurde das Präparat mit destillirtem Wasser tüchtig abgespült, 2 Tropfen der 1,5%igen Ferrocyankaliumlösung darauf gegeben, nach 5 Minuten (es kommt hierbei nicht so genau auf die Zeit an) das Überflüssige abgegossen, so dass schließlich der Schnitt gerade noch benetzt war, und nun 2 Tropfen der 1%igen Salzsäure zugesetzt. Die Reaction trat fast augenblicklich ein. Der Erfolg war vollkommen: schärfere Bilder dürften überhaupt nicht zu erreichen sein. Natürlich kommen bei unserem Objecte auch die günstigen morphologischen Beziehungen von Haupt- und Nebennucleolus in Betracht. Denn während bei *Mytilus* der Hauptnucleolus in älteren Stadien den Nebennucleolus bei Weitem an Masse übertrifft, ist es hier gerade umgekehrt. — Gehen wir von den Befunden bei den jüngsten Eiern aus: selbst hier, wo kaum der Hauptnucleolus mit Sicherheit zu erkennen ist, lässt sich das Paranucleïn deutlich darstellen (Fig. 9 und 10). In den jungen, schon Dotter führenden Eiern erkennt man auch klar den Hauptnucleolus, der hier an Masse dem Nebennucleolus noch gleichkommt oder ihn gar überwiegen kann (Fig. 11—14). Er hat oft die Form einer Mondsichel, während der übrige Theil der dazu gehörigen Kugel eine Vacuole bildet, dabei treten an dem Chromatingerüst zahlreiche kleine Kügelchen von Paranucleïn auf (Fig. 12). In anderen Eiern fehlt die Vacuole, ihr Raum wird vom Nebennucleolus ausgefüllt. Es kommen dann Stadien, wo die beiden Nucleolarsubstanzen gleiche Raumtheile einnehmen, wobei man jedoch immer am Chromatin die Paranucleïnsubstanz scharf hervortreten sieht. Zugleich kann dann noch ein freier Nebennucleolus vorhanden sein. In älteren Eiern überwiegt bei Weitem der Nebennucleolus den Hauptnucleolus an Masse (Fig. 15 bis 20). Jener stellt eine große Kugel dar, von der aber an dem der Kernperipherie zunächst gelegenen Abschnitte ein kleines Seg-

[1] An der Luft zerflossenes Eisenchlorid $^1/_2$ g auf 100 ccm dest. Wasser.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

ment fehlt, und dieses wird von dem Hauptnucleolus ausgefüllt, jedoch so, dass das Segment ein wenig größer und weiter ist. In einem solchen Ei sieht man auch noch einen im Kernraume liegenden Nebennucleolus (Fig. 15). Dieses eben geschilderte Ei möchte ich gleichsam als Typus für das Verhältnis des Hauptnucleolus zum Nebennucleolus hinstellen und mit dem von *Mytilus* (Fig. 5, s. auch oben pag. 482) vergleichen. Ein weiteres Stadium, das oft auftritt, stellt Fig. 16 dar. Hier sitzt der kleine Nebennucleolus, der vorhin frei im Kernraume lag, wie eine Knospe auf dem Hauptnucleolus. Die Dreitheiligkeit der Nucleolarsubstanzen äußert sich ferner in dem auf Fig. 18 dargestellten Bilde. Der Nebennucleolus hat mehr die Form einer Ellipse angenommen, die an beiden Polen der Längsachse Hauptnucleolen trägt. Zieht man noch das folgende Bild (Fig. 19) zum Vergleiche heran, so bekommt man gleichsam den Eindruck, als ob eine Theilung des Nebennucleolus stattgefunden hätte. Wir haben hier 2 gleich große Nebennucleoluskugeln, auf denen je ein gegen die Kernperipherie gerichteter Hauptnucleolus sitzt. Ein ähnliches Bild haben wir auch bei *Mytilus* (Fig. 6) gesehen. Während man sich aber bei *Mytilus* leicht davon überzeugte, dass die Nebennucleolen meist als Kugeln auftraten, ist es hier schwer, da ja der große Nebennucleolus meist eine einzige compacte blaue Kugel darstellt. Nur auf gewissen Stadien (Fig. 20) nimmt man wahr, dass auch hier das Ganze wieder aus Kugeln zusammengesetzt ist, die in einem Netz (Plastin) liegen.

Vertebraten-Typus: Als Beispiel wurden die Ovarialeier von *Pristiurus melanostomus* herangezogen. Auch hier zeigte sich die Nebennucleolarsubstanz den Methoden 1 und 2 gegenüber ebenso empfindlich wie bei *Mytilus* und *Pholas*. Während man in den jüngeren Eiern (Fig. 21 und 22) nur feststellen kann, dass die kleinsten Kügelchen immer an oder in nächster Nähe der Kernperipherie liegen, die größeren mehr central, so zeigen ältere Eier (Fig. 23 und 24) ganz allgemein eine periphere Anordnung des Nucleolus. Die meisten Nucleolen, besonders die größeren, lassen deutlich echte Vacuolen erkennen.

In neuester Zeit haben Kastschenko[1] und besonders Rückert[2]

---

[1] N. Kastschenko, Über den Reifungsprocess des Selachiereies. in: Zeit. Wiss. Z. 50. Bd. 1890 pag. 428—442 Taf. 17.

[2] J. Rückert, Zur Entwicklungsgeschichte des Ovarialeies bei Selachiern. in: Anat. Anzeiger 7. Jahrg. 1892 pag. 107—158 6 Figg.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

die Ovarialeier der Selachier näher untersucht und festgestellt, dass die Nucleolen im Maximum ihrer Entwicklung an Masse vielleicht dem 4. Theile des Inhaltes vom Keimbläschen gleichkommen und stets excentrisch liegen. Rückert gelangt zu dem Resultate, dass die Nucleolen zu Stoffwechselvorgängen der Chromosomen wohl in directer Beziehung stehen. Er lässt es unentschieden, ob die Nucleolen Stoffe (Chromatin, welcher Ansicht auch Flemming[1] ist) an die Chromosomen abgeben, ob sie Stoffe von ihnen aufnehmen, oder ob beides der Fall ist. Die Reaction würde für die zweite Annahme sprechen, denn wir überzeugten uns davon, dass kleinste Nucleoluskügelchen an den Chromosomen auftreten, sich wahrscheinlich dann davon ablösen und nach der Peripherie wandern, um dort zu größeren Kügelchen zu verschmelzen.

Dritte Methode. Echinodermen-Typus: Versuchsobject das Ovar von *Sphaerechinus granularis*. Wurde Methode 2 angewandt, so traten nur die an der chromatischen Substanz hängenden Nucleoluskügelchen hervor (Fig. 25). Die ausgesprochene Affinität der Nebennucleolarsubstanz zur Säure veranlasste mich dazu, der bei Methode 2 angewandten Mischung statt 5 Tropfen der 1%igen Salzsäure 15 Tropfen zuzusetzen. Die Behandlung und Einwirkungsdauer war im Übrigen genau wie sonst auch. Der Erfolg war vollkommen, d. h. der große Nebennucleolus trat in Form eines großen blaugrünen Bläschens (Fig. 26) scharf hervor, das im Innern eine Vacuole einzuschließen schien. Färbten wir aber nachher mit Carmin und zogen in angesäuertem Alkohol aus, so überzeugten wir uns davon, dass die vermeintliche Vacuole der Hauptnucleolus (Fig. 29) ist. Die Nebennucleolarsubstanz tritt bei dem Echinodermentypus ganz in den Vordergrund. In jungen und jüngsten Eiern kommt sie mit unserer Reaction schon scharf zum Vorschein, und zwar als ein größeres Bläschen nebst kleineren Kügelchen am Chromatingerüst (Fig. 28). Wenn Haecker[2] sagt, dass bei den Echinodermen an die Stelle zahlreicher Nebennucleolen »ein einziger formbeständiger Hauptnucleolus in vicarirender Weise« auftritt, so stimmt das also nicht ganz, wenn wir zunächst die Reaction allein als entscheidendes Merkmal gelten lassen, welche für ihn ja auch maßgebend war. Haecker beobachtete ferner (bei *Echinus microtuberculatus*) am

[1] Flemming, citirt oben pag. 477.

[2] V. Haecker, Das Keimbläschen, seine Elemente und Lageveränderungen. 2. Theil. Über die Function des Hauptnucleolus und das Aufsteigen des Keimbläschens. in: Arch. Mikr. Anat. 42. Bd. 1893 pag. 279—317 Taf. 19, 20.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

lebenden Ei, dass die Nebennucleolen um den Hauptnucleolus sich tanzend bewegen und von ihm dann aufgenommen werden, so dass auf ihnen das »Wachsthum des Hauptnucleolus« beruht. Ihre Substanz erfährt im Hauptnucleolus eine »weitere Spaltung«, worauf die Vacuolen schon hinweisen. Der Hauptnucleolus steht einerseits mit dem Kernsaft, andererseits mit den Vacuolen in diosmirender Verbindung, so dass die aufgenommene Nebennucleolarsubstanz nicht nur eine Verdichtung, sondern auch eine chemische Umsetzung erfahren muss. Der so entstandene Stoff sammelt sich dann in der Vacuole an und wird wieder ausgestoßen, so dass nach HAECKER die Vacuolenflüssigkeit als ein Secret des Kernes aufzufassen wäre. Ich selbst habe keine eingehenden Untersuchungen am lebenden Objekte vorgenommen und kann mir desshalb über die Aufnahme der Nebennucleolen und die Contractilität der Vacuolen kein Urtheil anmaßen. Jedoch weichen meine Resultate von denen HAECKER's darin principiell ab, dass eben festgestellt werden konnte, dass das, was H. Hauptnucleolus nennt, wie ein Nebennucleolus reagirt, und die Vacuole wie ein Hauptnucleolus. Dieser kann ein einheitlicher Körper oder aus mehreren (Vacuolen) zusammengesetzt sein, darunter findet man, wie ja auch sonst beim Hauptnucleolus oft konstatirt wurde, eine wirkliche leere Vacuole. Das Massenverhältnis der beiden Nucleolarsubstanzen zu einander ist sehr verschieden. Immer jedoch schließt der Hauptnucleolus den Nebennucleolus ein. — Ferner möchte ich darauf hinweisen, dass bei dem bis jetzt untersuchten Materiale so wenig Thatsächliches herausgekommen ist, dass die Angabe HAECKER's[1], wonach kleine, dotterarme Eier dem Echinodermentypus folgen mit einem einzigen allmählich größer werdenden Hauptnucleolus, große, dotterreiche hingegen dem Vertebraten-Typus mit zahlreichen Nebennucleolen, noch auf sehr schwanker Basis steht. Im Verhältnis zu den größeren Eiern der Lamellibranchiaten und den noch viel, viel größeren der Vertebraten besitzt das Ei der Echinodermen nicht viel weniger Nebennucleolar-Substanz als jene. Erst wenn die Ernährungsvorgänge der verschiedenen Ei-Typen näher untersucht sind, wird man der Lösung dieses Räthsels näher kommen.

Eine weitere Frage, die sich von selbst aufdrängte, war die: wie verhält sich ganz allgemein die Nucleolarsubstanz der übrigen Zellen den bisherigen Reagentien gegenüber?[2] Wie wir uns über-

[1] HAECKER, citirt oben pag. 479.

[2] Nach Abschluss meiner Arbeit fand ich, dass die bekannte Fällung von Eiweißkörpern durch gelbes Blutlaugensalz, das mit Essig- oder Salzsäure an-

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

zeugten, hatte bei den 3 Methoden nur der Nebennucleolus deutlich reagirt, nicht aber der Nucleolus schlechtweg, wie er in jeder Zelle vorkommt.

Vierte Methode. Von dem Schnitte wurde alles überflüssige Wasser abgegossen, 1 Tropfen der 0,5%igen Eisenchloridlösung (und 1 Tropfen 1%ige Salzsäure) zugesetzt. Nach einer Einwirkung von einer $^1/_2$ Stunde (oft genügt die Hälfte der Zeit und noch weniger) wurde mit destillirtem Wasser abgespült und die Berlinerblau-Reaction ausgeführt, wie sie bei den früher geschilderten Methoden aus einander gesetzt wurde. Das Resultat war, dass in jeder Zelle die Nucleolarsubstanz in Form blaugrüner Kügelchen scharf zum Vorscheine kam. Die Gewebe selbst blieben geradezu unberührt vom Eisen. Im Mollusken- wie im Vertebratengewebe hatte jede Zelle einen rundlichen Nucleolus; in secernirenden Zellen, z. B. den Darmzellen, traten 2 oder 3 auf, oder Größenunterschiede, wie z. B. der Nucleolus in der Leberzelle von *Mytilus* durch seine Größe auffällt.

Zur Methode sei noch angegeben, dass beim Molluskengewebe die anfängliche Hinzufügung eines Tropfens 1%iger Salzsäure von Vortheil, bei Vertebraten hingegen vollkommen entbehrlich war.

Allgemeines. Wir sind zu dem Resultate gekommen, dass die Nucleolarsubstanzen nach ihrem chemischen Verhalten 3 verschiedene Gebilde darstellen, von denen jedes wahrscheinlich wieder eine eigene complicirte chemische Zusammensetzung besitzt. Nach der bisherigen Bezeichnungsweise sind zu unterscheiden: Hauptnucleolus, Nebennucleolus und Nucleolus schlechtweg. Nach den Autoren sind es Ansammlungsstellen von Nucleïn resp. Paranucleïn. Für den Hauptnucleolus liegen bis jetzt nur Farbenreaktionen vor, und wenn diese auch keine gültigen Beweise liefern, so muss man doch das Nucleïn der chromatischen Substanz von dem des Hauptnucleolus trennen. In welchem Verhältnis beide zu einander stehen, darüber erlauben uns unsere jetzigen Kenntnisse kein bestimmtes Urtheil. Über den Nebennucleolus und den Nucleolus komme ich nach meinen Untersuchungen zu dem Resultate, dass beide mindestens verschiedene Modificationsstufen des Paranucleïns — wenn wir den Namen beibehalten wollen, der für uns vor der Hand aber nur ein Name sein

---

gesäuert ist, auch schon von botanischer Seite durch Zacharias zum Nachweis für Eiweißverbindungen wie auch für Nucleolen im Allgemeinen angewandt wurde. Vgl. E. Zacharias, Über Eiweiß, Nuclein und Plastin. in: Bot. Zeit. 41. Jahrg. pag. 210—215. Derselbe, Über den Nucleolus. ibid. 43. Jahrg. pag. 258—265, 273—283, 289—296.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

soll — darstellen. Wir haben gesehen, dass (bei *Mytilus* und *Pristiurus*) die Umsetzung des Ferrocyankaliums durch Salzsäure, wodurch Ferrocyanwasserstoffsäure und hieraus durch den Sauerstoff der Luft Berlinerblau entstand, allein genügte, um die Nebennucleolen zu färben. Diese Reaction zeigte uns den Weg, der einzuschlagen ist, um in jedem Falle diese Gebilde sicher festzustellen. Werden die Schnitte eine halbe Stunde lang in eine ganz schwache, mit Salzsäure angesäuerte Eisenchloridlösung gestellt (zu 50 ccm destillirtem Wasser gebe man 10 Tropfen einer 0,5%igen Eisenchloridlösung und 5 resp. 15 Tropfen einer 1%igen Salzsäure), und wird dann die Berlinerblaureaction ausgeführt, so bleiben Nucleïn und die verwandten Stoffe farblos, die Substanz des Nebennucleolus dagegen wird blau. Der Name Paranucleïn, gleichsam als Gegensatz zu Nucleïn, ist chemisch daher vollkommen gerechtfertigt.

Wenn wir die Reagentien concentrirter anwenden, d. h. 1 Tropfen des 0,5%igen Eisenchlorids plus 1 Tropfen 1%iger Salzsäure wenige Minuten bis $^1/_2$ Stunde (was von der Natur des Objectes abhängt) auf den Schnitt einwirken lassen und dann die Reaction ausführen, so tritt in jeder Zelle die Substanz des Nucleolus in Gestalt eines oder mehrerer blauer Kügelchen hervor. Die chromatischen Substanzen bleiben auch hierbei von der Reaction unberührt. Nach ihrem chemischen Verhalten stehen also Nebennucleolus und Nucleolus einander näher als Haupt- und Nebennucleolus.

Bei unseren heutigen mikroskopischen Untersuchungen spielen die Theerfarbstoffe eine wichtige und bedeutende Rolle. Wenn wir jedoch bis jetzt so wenig (dabei oft Widersprechendes) von der Zellchemie wissen, so hängt das, glaube ich, doch vielfach gerade von dem Gebrauche dieser Farben ab. Besonders verleitend ist die unglückliche Bezeichnungsweise saure und basische Farbstoffe. Da glaubte man früher ganz genau zu wissen, dass der eine Schleim wirklich sauer, der andere alkalisch reagirte, beide aber gaben nach Mayer[1] mit Mucicarmin resp. den basischen Theerfarben Methylgrün u. a. die charakteristische Reaction. Von den Nebennucleolen wird ausgesagt, sie färben sich mit Gentiana und Eosin, das erstere ist basisch, das andere sauer! Es ist schon mehrmals ausgesprochen

[1] P. Mayer, Über Schleimfärbung. in: Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 pag. 303–330.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

worden, dass die mikrochemischen Reactionen keine Auskunft über die Natur des Objectes geben, dass dessen rein chemische Untersuchung dazu nothwendig ist. Diese wird für die meisten Objecte nicht nur geradezu unüberwindliche technische Schwierigkeiten darbieten, sondern auch selbst, wenn sie sich auch ausführen lässt, uns immer noch 2 Unbekannte übrig lassen: das X ist die Fixirungsflüssigkeit und das Y der complicirt gebaute organische Farbstoff, der, wenn auch seine Constitutionsformel und Darstellung bekannt ist, trotzdem je nach der Bezugsquelle verschiedene Eigenschaften haben kann.

Ein Hauptvorzug meiner Methode liegt also darin, dass ich als Farbe zwei in allen ihren Eigenschaften bekannte Reagentien benutzt habe und bloß durch verschiedene Procent- und Mischungsverhältnisse eine Reihe von Resultaten über die Nucleolarsubstanz erhalten habe, auf die man bisher theilweise nur durch Anwendung verschiedener Farbstoffe unbekannter Natur hingewiesen worden war.

2. Über das Verhalten des Eisenchlorids zum Schleime.

(Taf. 22 Fig. 31.)

Vor Kurzem hat P. Mayer[1] festgestellt, dass Submaxillarismucin, das man in essigsaurem Eisen quellen lässt, Eisen aufnimmt und es sehr fest hält. Darauf hin geprüfte Schnitte von Vertebraten und Mollusken nahmen keinen Eisenalaun auf, und essigsaures Eisen auch nur dann, »wenn die Objectträger, mit einer dünnen Schicht der Lösung bedeckt, einige Tage in einer feuchten Kammer liegen, nicht aber, wenn man sie in der Lösung senkrecht aufstellt«, wobei die Vermuthung ausgesprochen wird, dass die Luft irgend eine Rolle dabei spielt. Gegen die Blutlaugensalze hat sich bei Mayer's Versuchen der Schleim ablehnend verhalten.

Bei meinen obigen Untersuchungen machte ich die interessante Wahrnehmung, dass selbst bei der einfachen Behandlung mit Blutlaugensalz, wo also kein Eisen in das Präparat gebracht wird, sondern einzig und allein durch Umsetzung (bewirkt durch die Salzsäure) die Ferrocyanwasserstoffsäure gebildet wird, woraus durch den Sauerstoff der Luft Berlinerblau entsteht, der im Darmlumen liegende freie Schleim sich stark blau färbt. Die Schleimdrüsen des

[1] Mayer, citirt oben pag. 488.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

Darmes selbst dagegen zeigten keine Spur einer Blaufärbung. Auch an anderen Stellen, wo die Schleimzellen reichlich auftreten, trat keine Reaction ein. Bei der zweiten zur Darstellung der Nebennucleoli angewandten Methode (50 ccm dest. Wasser + 10 Tropfen 0,5%iges Eisenchlorid + 5 Tropfen 1%ige Salzsäure) jedoch erhielt ich eine sehr schöne präcise und scharfe Färbung. Dabei stellte ich fest, dass nicht, wie MAYER angiebt, die Lösung nur dann wirksam ist, wenn sie in dünner Schicht auf das Präparat gegeben wird und lange einwirkt. Ich stellte die Schnitte $^1/_2$ Stunde in die Flüssigkeit, was vollkommen genügte. Der Luftzutritt ist nicht von Vortheil bei der Eisenaufnahme, da spielt die Säure eine Hauptrolle, sondern bei der Bildung des Berlinerblau-Niederschlages, und hierbei möchte ich immer anrathen, nur dünne Schichten (es genügen ja immer 1—2 Tropfen Ferrocyankalium resp. Salzsäure) auf das Präparat zu geben. Bei den mehr Eisen resp. Salzsäure enthaltenden Lösungen ist eine Mehraufnahme von Eisen und ein stärkerer Niederschlag fast ausgeschlossen, weil die schwache Flüssigkeit Alles leistet, was verlangt werden kann. Concentrirtere Reagentien schwächen die Reaction eher ab. Dem Schleime gegenüber verhält sich die Beize mit Eisenchlorid und Salzsäure genau wie das Mucicarmin MAYER's, d. h. die Schleimarten, die von jenem gefärbt werden, nehmen auch Eisen auf. Selbst die kleinen Unterschiede in der Stärke der Aufnahme bei verschiedenen Objecten, die dort constatirt wurden, treten auch hier zu Tage. In den Leberzellen werden gewisse Elemente sowohl vom Mucicarmin, als auch vom Eisen gefärbt. Andererseits nehmen die sogenannten eosinophilen Blutzellen der Lamellibranchiaten sehr gern selbst das schwach saure Eisenchlorid auf, Mucicarmin dagegen nie.

3. Über das Verhalten des Eisenchlorids zu den übrigen Geweben.

Wenn man auf einem Präparate, das mit der schwachen oder stärkeren Beize (50 ccm dest. Wasser + 10 Tropfen 0,5% Eisenchloridlösung + 5 resp. 15 Tropfen 1%iger Salzsäure) eine halbe Stunde behandelt wurde, die Berlinerblau-Reaction ausführt, mit destillirtem Wasser flüchtig abspült und nun einen Tropfen des 0,5%igen Eisenchlorids zusetzt, so bekommt man eine allgemeine Blaufärbung. Natürlich ist die erste Einwirkung des Eisenchlorids principiell nicht nothwendig, wesentlich dagegen die Behandlung mit Ferrocyankalium und Salzsäure; auch ohne Salzsäure bleibt die

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

Reaction aus. (Es sei denn, dass man das Präparat Tage lang beize). Da jedoch bei dem ersteren Verfahren die Salzsäure in wesentlich geringerer Stärke längere Zeit wirkt, und man zugleich, wenn etwa Drüsen vorhanden sind, weil diese das Eisen sehr stark an sich reißen, eine Differenzirung des Präparates erhält, so ziehe ich jenes Verfahren vor. Gerade die ganz schwache Säure wird von den Drüsen aufgenommen, während bei nur mäßig langer Einwirkung der 1%igen Säure die Affinität fast ganz verloren geht, ob durch Umsetzung, Lösung oder sonst einen chemischen Process, bleibt noch unentschieden. Die Musculatur hingegen tritt bei der 1%igen Säure stärker hervor, wobei jedoch die stärkere Quellung stört.

Im Allgemeinen bekommen wir eine Färbung, die etwa der eines mit Eosin, Indigcarmin etc. gefärbten Präparates entspricht.

4. Über das Verhalten anderer Eisensalze.

Von anderen Eisensalzen prüfte ich das essigsaure und das weinsteinsaure Salz. Von den Resultaten will ich nur einige hervorheben, da in einer späteren Arbeit genauer auf die Einzelheiten eingegangen wird.

Von beiden Salzen wurde eine concentrirte Lösung hergestellt und diese im Verhältnis von 1 : 200 verdünnt, so dass sie der früheren Eisenchloridlösung entsprach. Von diesen Stammlösungen wurden wie dort wieder verdünnte Lösungen gebraucht. Als Untersuchungsobjecte diente der Nebennucleolus von *Pholas* und der Schleim von *Mytilus*.

Auf den Nebennucleolus war die Einwirkung der ganz dünnen Lösung des weinsteinsauren Salzes (50 ccm dest. Wasser + 10 Tropfen 0,5%igen weinsteins. Eisens) am besten. Eine ähnliche Lösung des essigsauren Salzes ergab bei gleicher Einwirkungsdauer ($^1/_2$ Stunde) viel schlechtere Resultate, da nur ein schwacher Niederschlag hervorzubringen war. Sehr interessant war das Verhalten des Nebennucleolus, wenn ein Tropfen des 0,5%igen essigsauren Eisens, selbst nur auf kurze Zeit, auf das Präparat gegeben wurde: in der Nebennucleolarsubstanz war kein blauer Niederschlag mehr zu erzeugen.

Noch interessanter ist das Verhalten dieser beiden Salze dem Schleime gegenüber. So wurde das weinsteinsaure Eisen, mochte es nun concentrirt (0,5%ige Lösung) oder verdünnt (10 Tropfen des 0,5%igen + 50 ccm dest. Wasser) angewendet werden, nie vom

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

Schleime wirklich aufgenommen. Nur die periphere Partie der Schleimzelle zeigte gewöhnlich einen blauen Rand, während das Innere fast farblos blieb. Ähnlich verhielt sich auch das essigsaure Eisen: hier nahmen die Drüsen ganz geringe Mengen auf, was jedoch zu dem aus dem Eisenchlorid aufgenommenen Eisen in gar keinem Verhältnisse steht. Andere Drüsen aber, die vom Mucicarmin und Eisenchlorid wenig aufgespeichert hatten und leer erschienen, traten bei diesem Salze scharf hervor, was auf eine andere Drüsenform hinweist. Eine weitere Eigenthümlichkeit des essigsauren Salzes besteht darin, dass von der Musculatur aus schwachen Lösungen kein und auch aus starken nur wenig Eisen aufgenommen wird.

Ein ganz principieller Unterschied zwischen dem Eisenchlorid einerseits und dem essigsauren und weinsteinsauren Eisen andererseits besteht darin, dass die beiden letzteren, mögen sie in schwacher oder starker Lösung einwirken, stets eine allgemeine Färbung etwa wie Eosin hervorrufen.

Aus diesen Vergleichsversuchen geht also hervor, dass das Eisenchlorid in Verbindung mit freier Salzsäure die weitaus brauchbarsten Resultate liefert.

Wir haben, wie ich aus einander gesetzt habe, in ihm ein außerordentlich feines Reagens auf die Nebennucleolarsubstanz, die Nucleolen überhaupt, gewisse Schleimdrüsen (sogenannte Mucindrüsen) und können mit ihm allgemeine Färbungen hervorbringen; wobei wir es immer in der Hand haben, je nach der Concentrationsstufe und dem Mischungsverhältnisse von Salz und Säure etwas ganz Bestimmtes darzustellen.

Neapel, Zoologische Station, im Juli 1896.

Erklärung der Abbildungen
auf Tafel 22.

Alle Figuren sind mit der Camera bei ungefähr 700facher Vergrößerung entworfen, nur Fig. 23 und 24 bei 300facher Vergrößerung.

Es ist: *H.N* Hauptnucleolus, *N.N* Nebennucleolus, *N* Nucleolus, *Va* Vacuole, *Chr* Chromosomen, *L* Leberzellen, *D.E* Darmepithel, *Dr* Drüse, *MR* Mantelrand.

Fig. 1—29 sollen das Verhältnis von Haupt- und Nebennucleolus darstellen; Fig. 30 und 31 demonstriren den Nucleolus und die Drüsen.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

Fig. 1—8. Unreife Eier von *Mytilus gallo-provincialis*. Behandlung mit Ferrocyankalium und Salzsäure, Boraxcarmin.

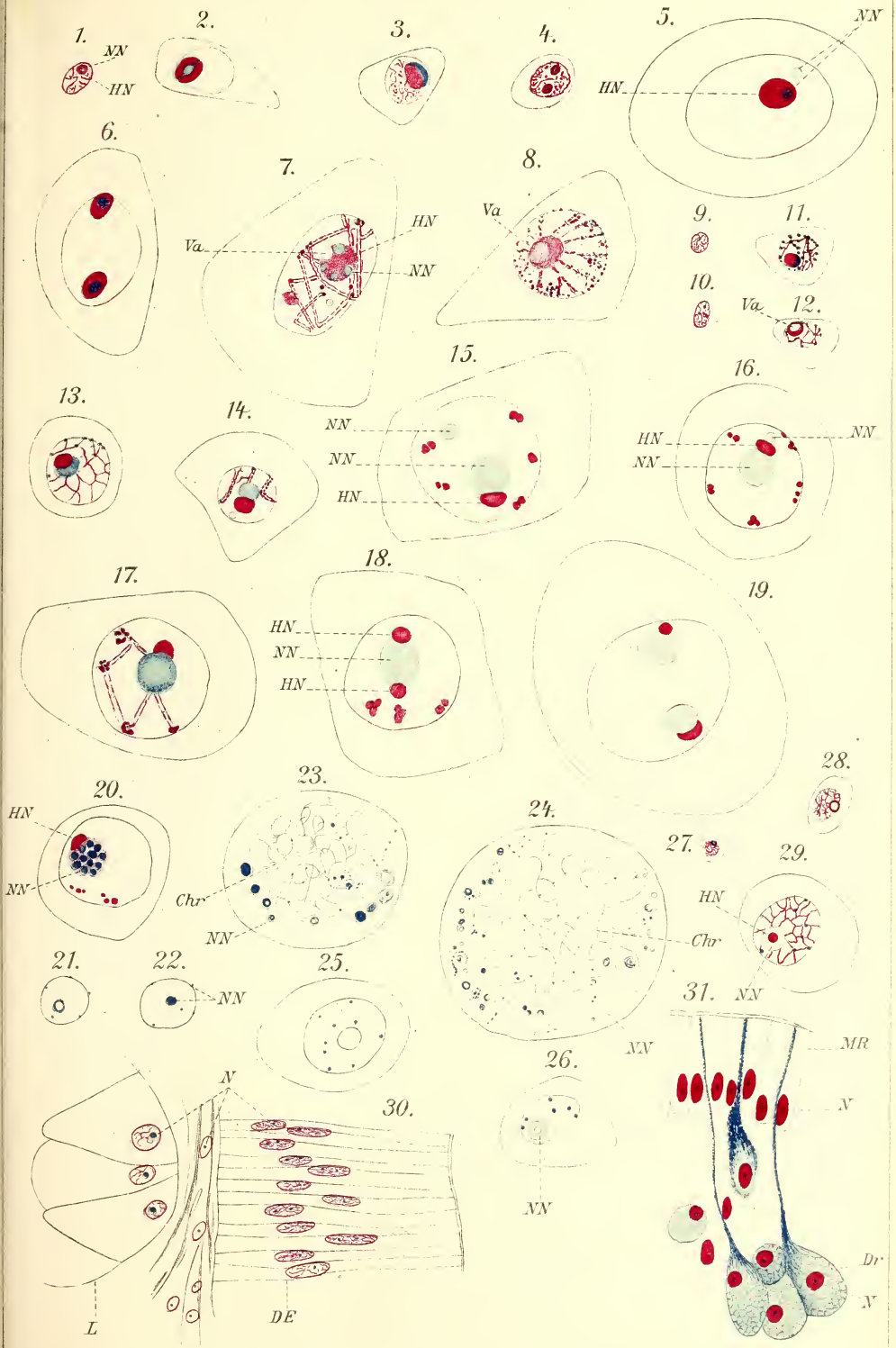
Fig. 9—20. Unreife Eier von *Pholas dactylus*. Die Schnittpräparate kamen auf $^1/_2$ Stunde in 50 ccm dest. Wasser + 10 Tropfen 0,5%igen Eisenchlorid + 5 Tropfen 1%iger Salzsäure, dann Berlinerblau-Reaction, Paracarmin.

Fig. 21—24. Kerne unreifer Eier von *Pristiurus melanostomus*. Behandlung wie eben.

Fig. 25—29. Unreife Eier von *Sphaerechinus granularis*. Behandlung: Fig. 25 wie bei *Pholas*, aber ohne Nachfärbung; Fig. 26 statt 5 Tropfen 1%iger Salzsäure 15, ebenfalls ohne Nachfärbung. Fig. 27—29 wie 26, nur mit Boraxcarmin nachgefärbt.

Fig. 30 und 31. *Mytilus gallo-provincialis*. Behandlung: 1 Tropfen 0,5%iges Eisenchlorid + 1 Tropfen 1%ige Salzsäure, Berlinerblau-Reaction, Boraxcarmin.

Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at



ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Mittheilungen aus der Zoologischen Station zu Neapel

Jahr/Year: 1897

Band/Volume: 12

Autor(en)/Author(s): List Theodor

Artikel/Article: Beiträge zur Chemie der Zelle und Gewebe. 1. Über die Färbung thierischer Gewebe mit Berlinerblau. 477-493