

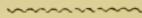
## Die Spermatozoen einiger Wirbelthiere.

Ein Beitrag zur Histochemie\*)

von

**F. Miescher.**

Hiezu Tafel I.



Bekanntlich wird in Basel der Fang des Rheinlaches (*Salmo Salar*) ziemlich lebhaft betrieben. Während der Laichzeit, im November, kann man zuweilen diese stattlichen Fische in grosser Zahl auf dem Markte sehen. Die reifen Geschlechtsprodukte dieser Thiere sind dabei als Abfall in beträchtlicher Menge zu erhalten. Die grosse Anstalt für künstliche Fischzucht in dem benachbarten Hüningen bezieht ihren ganzen Bedarf an Lachseiern, im Betrage von mehreren Millionen jährlich, von Herrn Friedrich Glaser, dem Besitzer der bedeutendsten hiesigen Fischhandlung.

Besonders verlockend ist hier für den Physiologen die Gelegenheit zur Gewinnung von Sperma. Von der rahmigen Flüssigkeit, die man als „Lachsmilch“ bezeichnet, habe ich zuweilen mit Erlaubniss der Verkäufer fast einen Schoppen auf einmal sammeln können. Am reinsten, als blendend weisse Crème, erhält man das Sekret vom lebenden Fisch; bei todtten Thieren fliesst häufig etwas Galle, Harn oder Blut mit aus.

Der Samen der Fische ist nun für die Wissenschaft vor andern werthvoll. Keine accessorischen Drüsen mengen ihre Produkte dem Sekret der Testikel bei. Wir haben

---

\*) Nach Vorträgen, gehalten im April 1872, März und November 1873.

hier blos Spermatozoen, suspendiert in einer verdünnten Salzlösung. Die grössten Mengen dieser Gebilde lassen sich aus den reifen Geschlechtsdrüsen selbst darstellen; in den enorm erweiterten Kanälen sind alsdann solche Massen von Samenzellen angehäuft, dass man für manche Zwecke das ganze Organ einfach als Sperma verarbeiten kann. Die Testikel eines 20pfündigen Lachses, im März ca. 15—20 Gr. wiegend, betragen im November 300 bis 400 Gr. und darüber.

Das Material zu der im Nachfolgenden mitgetheilten Untersuchung verdanke ich fast sämmtlich der freundlichen Gefälligkeit von Herrn Friedrich Glaser, die auch schon in andern Fällen wissenschaftliche Arbeiten über Fische wesentlich gefördert hat.

### 1. Die morphologische Struktur der Samenzellen des Lachses und einiger anderer Knochenfische.

An den Spermatozoen des Lachses ist, wie bei andern Wirbelthieren, constant Kopf, Schwanz und Mittelstück zu unterscheiden. Als besondere Eigenthümlichkeit ist hervorzuheben die äusserst geringe Massenentwicklung der beiden letzten Bestandtheile gegenüber dem Kopf. Der Schwanz ist ein gerader blasser Faden von äusserster Feinheit und ca.  $45\mu$  Länge; getrocknete Präparate zeigen ihn besonders deutlich. Er ist vergänglich; verdünnte (0,1%) Salzsäure oder Essigsäure lösen ihn rasch, destillirtes Wasser macht ihn wenigstens bald undeutlicher. Kochsalzlösung von 10% dagegen wirkt nicht quellend und zerstörend, sondern erhaltend, lässt ihn schärfer hervortreten. Dem Schwanzfaden in den Reactionen durchaus ähnlich verhält sich das kleine blasse, am Ursprung desselben eingeschaltete Knöpfchen, welches man als Mittelstück bezeichnen kann. Dass der Schwanz, wie Owsjannikow\*) angibt, sich

\*) Bulletin de l'Acad. de St. Pétersb. XIII 245.

bei der Wassereinwirkung pseudopodienähnlich zusammenziehe, kann ich nicht bestätigen. Vermuthlich wurde Owsjannikow durch eine irrthümliche Auffassung des Mittelstückes zu dieser Angabe veranlasst.

Der Kopf der Samenzellen, neben welchem die übrigen Theile an Masse beinahe verschwinden, ist stark lichtbrechend und besitzt ungefähr die Gestalt einer querhalbirten Bohne, deren Schnittfläche an den Kanten etwas abgerundet und in der Mitte schwach nabelförmig eingezogen ist, so dass das Gebilde, von der breiten Seite her gesehen, eine geringe Andeutung von Herzform zeigt. Grössendifferenzen, welche unzweifelhaft die Messungsfehler übertreffen, habe ich nicht nachweisen können. Als gleichzeitig die gesonderten Samen von zwölf Thieren unter möglichst gleichen Umständen, jedesmal mit Messung vieler Individuen, bei Zusatz von Jodserum, verglichen wurden, ergab sich sehr genau übereinstimmend für den grössten Längendurchmesser  $3,3\mu$ . Abweichungen von dieser Norm im Betrage von  $\frac{1}{3}\mu$  sind in dieser Beobachtungsreihe sicher nicht vorgekommen. Die grösste Breite beträgt  $2,5\mu$ , die Dicke circa  $1,3\mu$ .

Mit der äusseren Form ist nun aber die Beschreibung des Spermatozoenkopfes nicht abgeschlossen. Bei etwas hoher Einstellung des Fokus sieht man mitten auf seiner breiten Fläche einen Schatten, von welchem aus sich ein dunkler Streif gegen das Mittelstück hinzieht. Bei tieferer Einstellung kehrt sich das Verhältniss von hell und dunkel um. Dieses Bild hat neuerdings His\*) beschrieben und abgebildet, ohne auf die Deutung weiter einzugehen. Owsjannikow hat es schon früher gesehen und hält es für den Ausdruck einer Längsfurche. Da aber der optische Querschnitt der Köpfe, wenn sie in aufrechter Stellung dem

---

\*) His, über das reife Ei von Knochenfischen etc. — Leipzig 1873. Taf. I fig. 8.

Beobachter sich zeigen, immer oval, nie eingeschnürt erscheint, so fällt diese Deutung dahin, und der centrale Fleck muss auf einer Eigenthümlichkeit des inneren Baues beruhen.

Diese Annahme wird zur Evidenz bestätigt durch eine mikrochemische Reaction. Eine mit viel Wasser verdünnte weingeistige Cyaninlösung (Chinolinblau), durch Zusatz einer eben zureichenden Spur Salzsäure entfärbt, erhält durch kaustische, kohlen-saure, phosphorsaure Alkalien und alkalische Erden ihre blaue Farbe wieder. Auf die Brauchbarkeit dieses Reagens für histologische Zwecke wurde ich durch Herrn Prof. W. His aufmerksam gemacht. Behandelt man völlig frisches Lachssperma mit dieser farblosen Lösung, so färbt sich die Flüssigkeit, die auch Lakmus bläut, noch viel stärker aber die geformten Elemente. Die mikroskopische Prüfung zeigt nun, dass ganz constant an den Spermatozoenköpfen ein schwach lichtbrechender, farblos gebliebener Innenraum sich mit scharfer Contour gegen eine dicke, mehr oder weniger tief blau gefärbte Hülle abgrenzt. Das Resultat bleibt dasselbe, ob man die breite Seite, die Schmalseite oder den optischen Querschnitt ins Auge fasst. Dabei sieht man, dass der helle Innenraum eine ziemlich centrale Lage hat, und dass seine Form die des ganzen Kopfes ungefähr wiederholt, höchstens etwas mehr abgeplattet ist. Die grösste Breite desselben übertrifft um ein Geringes die Dicke der Hülle. Die Färbung der dicken Hüllenkapsel ist von der Flüssigkeit unabhängig; sie tritt auch dann ein, wenn man das Sperma genau neutralisirt hat. Längere Einwirkung von viel Wasser entzieht den Gebilden die Substanz, auf die es hier ankömmt; das Wasser färbt sich alsdann, die Samenzellen nicht mehr. Nach dem, was unten über die in Wasser löslichen Bestandtheile des Samens gesagt ist, werden vermuthlich phosphorsaure oder kohlen-saure Salze,

in die Hüllensubstanz imbibirt, die Ursache dieser schönen Reaction sein.

Noch andere Hilfsmittel dienen zur Aufhellung der inneren Struktur. Nicht selten zeigen schon die frischen Samenzellen die stark lichtbrechende Hülle von einem schwach brechenden Inhalt durch eine deutliche Contour abgegrenzt. Noch schärfer tritt dieses hervor auf Zusatz von Essigsäure oder sehr verdünnter (0,1%) Salzsäure, wodurch der Unterschied der Lichtbrechung sich wesentlich erhöht. Umgekehrt hebt Zusatz einer 10prozentigen Kochsalzlösung oder halbgesättigten Salpeterlösung den optischen Unterschied auf; die Hülle quillt und erblasst darin sofort.

Der beschriebene Innenraum ist nicht homogen; schon bei den genannten Behandlungsweisen zeigt er weitere Details bald mehr bald minder deutlich. Am schärfsten treten diese Verhältnisse hervor nach mehrstündiger Einwirkung von Goldchlorid ( $\frac{1}{2}\%$ ) und nachfolgendem Lichtzutritt. Hier bleibt die Hülle völlig farblos, der Innenraum dagegen erscheint scharf begrenzt und intensiv gelb gefärbt. Mittelstück und Schwanz bleiben farblos. Innerhalb des gelben Innenraums hebt sich nun ein eigenthümliches, gleichfalls farblos gebliebenes Gebilde ab. Es ist ein mässig stark lichtbrechendes, wie der optische Querschnitt zeigt, etwas abgeplattetes gerades Stäbchen, das, etwas zugespitzt, an der Basis des Innenraums, genau gegenüber der Insertion des Schwanzes beginnt, in der Richtung der Längsaxe des Kopfes drei Vierteltheile der Länge des Innenraums durchsetzt und schliesslich stumpf endigt. Durchmustert man mit einem guten Systeme (Hartnack imm. 10) die dicke Hülle an der Stelle, wo das Stäbchen entspringt, so erkennt man daselbst eine die Wand durchsetzende, sehr zarte Linie, dunkel bei höherer, hell bei etwas tieferer Einstellung; sie ist unzweifelhaft der

Ausdruck eines mit schwächer lichtbrechender Substanz angefüllten sehr feinen Kanals in der Kapselwand, durch welchen irgend eine Art von Continuität zwischen dem Mittelstück und dem Centralstäbchen hergestellt wird. Der Kanal, den ich Mikroporus nennen will, wird auch ohne Goldchlorid, namentlich mit Cyanin, zuweilen sichtbar; er ist sogar an frischen Samenzellen, durch die oben erwähnte Schattenlinie angedeutet. Seine Erkennung erfordert Behutsamkeit, und selbst innerhalb desselben Gesichtsfeldes zeigen ihn nicht alle Objekte gleich deutlich; es ist offenbar nur ein geringer Unterschied der Lichtbrechung gegenüber der Hülle, wodurch der Mikroporus sichtbar wird. Dass die Substanz, welche den Kanal ausfüllt, chemisch verschieden von der Hülle ist, ergibt sich aus dem Verhalten gegen Kochsalzlösung. Hier sieht man im Beginne der Einwirkung nicht selten die erblasste Hülle durchsetzt von einem feinen, nunmehr relativ stärker lichtbrechenden Faden, der sich vom Mittelstück aus ins Innere gebt.

Von Spermatozoen anderer Knochenfische habe ich bis jetzt die des Karpfens und des Hechtes geprüft. Die Samenzellen des Karpfens haben die Eigenschaft, in destillirtem Wasser zu einem glasigen Schleim zu verquellen. Diese Quellung kann verhindert und die Form der Gebilde gut erhalten werden, wenn zur Verdünnung des Samens eine Chlorbaryum- oder Chloreiumlösung von  $\frac{1}{2}\%$  verwendet wird. Auch der Schleim nach vollendeter Quellung wird durch diese beiden Salze in undurchsichtigen Flocken und Fetzen gefällt; die Form der Spermatozoen ist alsdann zerstört. Auch an den Samenzellen des Karpfens unterscheidet man zwischen Kopf und Schwanz ein sehr blasses knopfförmiges Mittelstück, oft schwer zu sehen, doch wahrscheinlich constant. Der Schwanz ist etwas weniger fein als beim Lachs. Der Kopf nähert

sich mehr der Form einer Halbkugel; sein Längendurchmesser, dem Breitendurchmesser beinahe gleich, beträgt circa  $2,5\mu$ . Die dicke Kapsel, der durch Goldchlorid gelb werdende, schwach lichtbrechende Innenraum und das stärker lichtbrechende, hier deutlich kolbige Centralstäbchen sind leicht zu unterscheiden. Auch gelingt es zuweilen, den Mikroporus zur Ansicht zu bringen.

Die Samenelemente des Hechtes sind wegen ihrer Kleinheit noch weniger günstige Objekte, als die des Karpfen. Der grösste Durchmesser ihrer Köpfe beträgt circa  $1,8\mu$ . Indess lässt sich nachweisen, dass die Struktur im Wesentlichen mit den bisher geschilderten Samenkörpern übereinstimmt. Hülle, Innenraum und Centralstäbchen sind mit starken Systemen deutlich zu erkennen. Die Form des Kopfes ist ähnlich wie beim Karpfen; die Substanz der Hülle aber gleicht insofern derjenigen des Lachssperma, dass sie nicht in Wasser, wohl aber in Kochsalzlösung schleimig aufquillt.

## 2. Die chemischen Bestandtheile der Spermatozoen des Rheinlachs.

Ueber die Chemie des Samens existiren verschiedene ältere Angaben, welche, so vereinzelt und dunkel sie auch sind, doch darauf hinweisen, dass hier ganz merkwürdige Verhältnisse obwalten müssen. Der bedeutende Phosphorgehalt des Samens ist schon seit Fourcroy und Vanquelin\*) (1791) bekannt. Gobley\*\*) (1851) fand reichlich phosphorhaltiges Fett (Lecithin) in den Samendrüsen des Karpfen. Kölliker\*\*\*) beobachtete Myelinformen bei der Zersetzung von Stiersamen. Frerichs†) untersuchte Samen verschie-

\*) Annales de chimie IX 64.

\*\*) Annalen der Chemie und Pharmacie XL pag. 275.

\*\*\*) Zeitschr. f. wiss. Zool. VII.

†) Todd, Cyclop. IV 505.

dener Thierklassen. Es ergab sich beim Karpfen und beim Kaninchen neben einer mässigen Menge Aetherextract als Hauptbestandtheil eine albuminoide Substanz, in Alkalien löslich, unlöslich im Ueberschuss von Säuren. Solche Reactionen genügten damals (1852), um dieselbe unter dem Namen des sogenannten Proteinbioxydes unterzubringen, eines Stoffes, der nach Mulder namentlich in Epithel- und Horngewebe verbreitet sein sollte, dessen chemische Individualität aber heutzutage Niemand mehr annimmt. In dem Samen des Haushahns dagegen überwogen ächte Eiweisskörper. Von Wichtigkeit ist die Beobachtung von Frerichs, dass das mit Aether völlig erschöpfte Karpfensperma beim Verbrennen eine durch freie Phosphorsäure saure Kohle gibt. Diese Angabe ist völlig unbeachtet geblieben; sie ist in die meisten gebräuchlichen physiologisch-chemischen Lehrbücher nicht übergegangen.

Die Anregung zu der im Folgenden mitgetheilten Untersuchung gab die jetzt wohl allgemein angenommene Ansicht der Histologen, dass wenn nicht die ganzen Spermatozoen, so doch die Köpfe derselben genetisch und nach ihrem mikrochemischen Verhalten die Bedeutung von umgewandelten Zellkernen haben sollen. Hier hoffte ich für das chemische Studium der Kerngebilde und der Nucleinstoffe ein ganz besonders leicht zugängliches Material zu finden, — um so mehr, da gerade beim Lachs die Masse des Fadens im Verhältniss zum Kopf fast verschwindend klein ist und man also, wenn obige Anschauung richtig ist, nahezu reine und intakte Kerne unter den Händen hat.

Die gemachten Voraussetzungen haben sich nun in sehr bemerkenswerther Weise bestätigt.

Eine Portion sehr reines, mit Wasser unvollständig gewaschenes Sperma, unter der Luftpumpe völlig getrocknet, ergab bei der Analyse mit Natronkalk 18,78% N.,

bei der Verbrennung mit Soda und Salpeter 11,31%  $P_2 O_5$ . Die getrocknete Hodensubstanz ergab, mit Soda und Salpeter verbrannt, bei zwei verschiedenen Thieren einen Gehalt von 0,278 und 0,280% Schwefel. Ein kleiner Theil der Phosphorsäure ist auf lösliche phosphorsaure Salze zu beziehen, nicht durch Ammoniak, wohl aber durch Magnesia-mixtur aus dem neutral oder alkalisch reagierenden Wasser-extract ohne vorherige Veraschung fällbar. Ihre Menge wurde bei einem reifen Hoden zu 0,85%, bei einer Portion reinen Sperma's zu 0,45% gefunden, auf die fettfreie Trockensubstanz berechnet. Phosphorsaurer Kalk oder Magnesia kann nicht wesentlich in Betracht kommen. Die Aschenanalyse stösst auf erhebliche Schwierigkeiten wegen der steinharten, schwer verbrennlichen sauren Kohle, die man erhält. Aber bei Extraction mit verdünnter Salzsäure gibt die frische sowohl als die fettfreie Samenmasse kaum Spuren von alkalischen Erden ab; ebenso wenig geht Phosphorsäure in Lösung, wenn die Substanz vorher mit Wasser gut gewaschen war. Der Phosphor ist unzweifelhaft an die organische Substanz gebunden. Von dem Schwefelgehalt ist etwa ein Drittel für lösliche schwefelsaure Salze in Abzug zu bringen.

Wir haben also einen Phosphorgehalt, höher als der des Lecithins, einen Stickstoffgehalt, höher als der des Eiweisses, einen Schwefelgehalt, geringer als bei irgend einem zelligen Gewebe.

Der Gehalt der Drüse an festen Bestandtheilen betrug bei einem noch etwas bluthaltigen, aber schon secernierenden Organ 22,88, bei einem völlig reifen, blutleeren Hoden 25,5%. Berücksichtigt man nun, dass die Zwischenflüssigkeit zwischen den Samenzellen fast nichts als eine sehr verdünnte Salzlösung ist, so ergibt sich eine nicht geringe Dichtigkeit der Zellmasse selbst.

Um die Samenzellen von der Flüssigkeit zu trennen,

können verschiedene Wege eingeschlagen werden. Direktes Filtriren gelingt nicht wohl; auch setzen sich die geformten Elemente nur sehr unvollständig zu Boden. Schüttelt man das Sperma mit Aether und Wasser, so gehen die Spermatozoen in die Grenzschicht und man kann nach einiger Zeit etwas klare wässrige Flüssigkeit abziehen. Dieselbe reagirt stark alkalisch und enthält fixe Alkalien, gebunden an Chlor, Phosphorsäure, Kohlensäure und Schwefelsäure, daneben sehr geringe Mengen organischer Substanz, worunter niemals Zucker. Zweimal wurde aus lebenden, kräftigen Thieren Samen abgestrichen; alsdann war die Flüssigkeit völlig eiweissfrei. In andern, vom todtten Thier stammenden Portionen fanden sich sehr geringe Mengen von Alkalialbuminat, durch Essigsäure fällbar, im Ueberschuss löslich. Von organischen Basen oder sonstigen stickstoffhaltigen Substanzen war niemals eine Spur zu finden. Jene eiweissfreien Samenflüssigkeiten blieben, etwaige Trübung durch die Salze abgerechnet, klar mit Bleiessig, Tannin, Sublimat, Quecksilbernitrat, Ferrocyankalium, Phosphormolybdänsäure, Jodquecksilberkalium. Also eine einfache Salzlösung, die wohl den letzten Verdacht beseitigt, dass die Zwischenflüssigkeit zwischen den Samenzellen das wesentliche Moment der Befruchtung sei.

Eine bequemere Methode, die Samenzellen zu isoliren, besteht in schwachem Ansäuern mit etwas Essigsäure, wobei sich dieselben als dichter pulvriger Niederschlag rasch absetzen. Vorhandenes Alkalialbuminat wird hiebei mit gefällt, meist aber so wenig, dass es bei der mikroskopischen Prüfung kaum gelingt, irgend welche amorphe Partikel zwischen den Formelementen aufzufinden. Die Fäden werden beim Ansäuern bald unsichtbar, so dass man es eigentlich fast bloß mit den Köpfen der Samenzellen zu thun hat. Einen ähnlichen Effekt, wie durch Essigsäure, erreicht man durch Zusatz einer Chlorecalcium-

oder Chlorbaryumlösung von  $\frac{1}{2}$ —1%. Die Spermatozoen, deren Substanz offenbar dichter geworden, setzen sich als schneeweisses Pulver zu Boden. Aus reifen Testikeln, in Tüllbeuteln zerdrückt und mit Wasser ausgeschlemmt, lassen sich in der geschilderten Weise die Spermatozoen in grossen Massen darstellen. Die Verunreinigung mit Drüsenzellen ist höchst unbedeutend, diejenige mit Albuminat zuweilen fast null, bei andern, weniger ausgereiften Exemplaren nicht zu vernachlässigen.

Bei diesen Manipulationen drängt sich ein Umstand auf, der für den völlig reifen Hoden bezeichnend ist, die ausserordentliche Blutleere. Der Blutgehalt des Organs, während der Entwicklungsperiode das Jahr hindurch oft sehr bedeutend, nimmt bei herannahender Geschlechtsreife bedeutend ab. Die Anämie erreicht schliesslich einen solchen Grad, dass Oberfläche und Schnittfläche schneeweiss werden, und dass das Wasser, mit welchem eine solche Drüse zerrieben wird, nach Absetzung der Formelemente nur ganz schwach röthlich gefärbt ist. Nach Ausfällung des Alkalialbuminates enthält die Flüssigkeit oft nur noch sehr geringe Mengen löslichen Eiweisses. Nessler's Reagens und Salzsäure geben keine Fällung, so dass auch Peptone oder stickstoffhaltige organische Basen ausgeschlossen sind. Die völlige Ausreifung findet man zuerst im oberen Theile des Hodens, von wo sie dann sehr rasch nach unten fort schreitet. Es kann daher das Organ seiner grössten Masse nach noch etwas bluthaltig sein, während das vas deferens schon fertiges Sekret aus den obersten Parthien enthält. Immer sind aber auch dann die Spermatozoen durch das ganze Organ fertig gebildet. Beim Karpfen sind die Unterschiede der Reife zwischen verschiedenen Abtheilungen der Drüse viel grösser.

Dieses Absperren der Blutzufuhr ist gewiss nicht ohne Bedeutung für die Reifung der Samenelemente und

namentlich für die Loslösung derselben von ihrer Keimstätte. Ist es vielleicht, wie bei den Pflanzen, gerade die Unterbrechung des Säftestroms, welche die Frucht zum Abfallen zwingt?

Die chemische Untersuchung der Spermatozoen direct im frischen Zustand bietet wenig Erquickliches; man hat eine resistente Substanz vor sich, die fast allen Lösungsmitteln schwer zugänglich ist. Kalilauge und Sodalösung geben trübe Gallerten, durch Säuren in Fetzen fällbar, im Ueberschuss unlöslich. Reste von unzerstörten Samenzellen bleiben noch lange Zeit in der Gallerte suspendirt.

Viel intensiver zerstörend als selbst kochende Kalilauge oder heisse concentrirte Salzsäure wirkt Kochsalz- oder Salpeterlösung von 10—15%. Man schüttelt nur einen Augenblick, und sofort hat man einen durchscheinenden, schleimigen Gallertklumpen, der sich fast mit der Scheere schneiden lässt und bei der mikroskopischen Prüfung so zu sagen keine erhaltenen Spermatozoen mehr zeigt. Unter dem Mikroskop lässt sich beobachten, dass es bei der Einwirkung des Kochsalzes die dicke Hülle des Kopfes ist, welche erblasst, enorm aufquillt und schliesslich unsichtbar wird. Mittelstück und Schwanz dagegen bleiben unverändert, erhalten sich sogar besser als in Wasser. In der gequollenen Masse sieht man meist ein oder mehrere runde glänzende Körnchen oder Tröpfchen ohne bestimmte Stellung. Dieselben sind nicht präformirt gewesen, sondern, wie sich später aufklären wird, durch die chemische Einwirkung des Salzes erst entstanden. Die durch Kochsalzlösung erhaltene Gallerte wird durch Wasser gefällt in durchscheinenden Fetzen, die allmählig schrumpfen und undurchsichtig werden. Mit angesäuertem Wasser erhält man völlig undurchsichtige, dichte, fasrige, zäh elastische Massen; die Struktur der Samenzellen ist nicht wiederhergestellt.

Es war von Interesse, zu erfahren, ob, nach Analogie anderer Elementartheile, Eiterzellen, Leberzellen, Muskelfasern, die Spermatozoen Eiweissstoffe enthielten, die in Wasser löslich, in verdünnten Säuren und in Salzen löslich seien. Jene Samenflüssigkeiten vom lebenden Thier, welche an Wasser keine Spur von Eiweiss abgaben, wurden nachher der Behandlung mit Cl H von 0,1% unterworfen. Das Filtrat gab immer beim Neutralisiren eine geringe Trübung, welche, nach dem Aufkochen in Flocken gesammelt, die Reactionen ächter Eiweisskörper, namentlich die Millon'sche Reaction, zeigte. Es kann wohl keinem Zweifel unterliegen, dass diese geringen Eiweiss Spuren aus Mittelstück und Schwanz stammen, die ja von verdünnten Säuren gelöst werden. Da aber diese beiden Formbestandtheile, der mikroskopischen Prüfung zufolge, gegen Kochsalzlösungen resistent sind, so wird man nicht an Myosin, sondern an den andern, in Cl H 0,1% löslichen Eiweisskörper der Muskelfaser zu denken haben (Substanz der Fleischprismen).

Nach Extraktion mit der verdünnten Säure zeigt die Samenmasse noch deutlich, obwohl schwach, Rothfärbung\*) mit Millons Reagens, enthält also noch etwas ächtes, aber schwer extrahirbares Eiweiss.

Das Alkoholätherextract. Die Entfettung des Sperma geschieht am besten mit warmem Alkohol. Der Verdampfungsrückstand des Extractes löst sich nahezu vollständig in Aether. Nur eine Spur eines krümligen Rückstandes bleibt zurück, der in Wasser löslich ist und aus Salzen organischer und anorganischer Säuren besteht (Milchsäure?). Cerebrin ist also nicht zugegen, überhaupt

---

\*) Die Millon'sche Reaction, — die beste für ungelöste Eiweisskörper — wurde immer genau nach Kühne's Vorschrift angestellt: Kochen mit säurefreiem Quecksilbernitrat und nachher Zusatz von etwas gelber Salpetersäure.

ausser Cholesterin keine unverseifbare Substanz. Von 100 Theilen Bleisalzen der fetten Säuren waren nach einer Bestimmung von Herrn Stud. von Speyr 46,0% in Aether löslich. Die Hälfte des Aetherextractes besteht aus Lecithin, der Rest aus Fett und Cholesterin. Für die Gegenwart des Lecithins liegen folgende Belege vor: die Darstellung des in Aether löslichen, in Alkohol unlöslichen Lecithin-Platinchlorids, das beim Erwärmen seiner Lösung auskristallisirende Kalksalz der Glycerinphosphorsäure, der in Wasser leicht lösliche Platinsalmiak des Neurin in den charakteristischen orangerothen Tafeln, die Goldverbindung derselben Base in schwerer löslichen gelben Nadeln, das salzsaure Neurin in zerfliesslichen Nadeln.

0,2450 gr. des Golddoppelsalzes gaben beim Glühen 0,1089 gr.

Gold, = 44,45% Gold (berechnet 44,43%).

Nachstehende Tabelle enthält die Ergebnisse einiger quantitativer Bestimmungen. Die Aetherextracte wurden im Vacuum, die Rückstände bei 105° getrocknet.

	I.	II.	III.	IV.	V.	
	Samen aus dem vas defer.			Sp.v.def.	Sperma	
	von je einem Lachs, direct			sperma-	e testic.	
	in Alcohol gebracht.			toz. mit	mit	
				Ä isolirt.	Ä isolirt.	
Menge der Substanz in gr. . .	1,0550	2,0825	4,5967	5,8770	—	
Gefunden an Aetherextract in grm. . . . .	0,1553	0,2975	0,6307	0,6440	0,3835	
P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Mg <sub>2</sub> aus dem Aetherextract in grm. . . . .	0,0112	0,0212	0,0460	0,0470	0,0280	
In 100 Theilen trocken Samens	{ in Aether lösl. Stoffe unlösliche Stoffe . .	14,72	14,29	13,72	10,95	—
sind enthalten		85,28	85,71	86,50	89,05	—
In 100 Theilen Aetherextract sind enthalten .	{ Lecithin . Cholesterin . . Fett . .	52,46	51,84	53,06	53,09	53,12
		} 47,54	} 48,16	15,76	} 46,91	13,00
				31,18		

Der Gehalt an Aetherextract zeigt ziemlich genaue Uebereinstimmung in drei Analysen von Sperma, das direkt mit Alkohol versetzt worden war. Bei der abweichenden Zahl in Nro. IV ist der Verdacht erlaubt, dass das Ansäuern und Auswaschen von Einfluss gewesen sei. Ob wirklich erhebliche Schwankungen des Fettgehalts vorkommen, muss demnach vorläufig dahingestellt bleiben.

Der in heissem Alkohol unlösliche Rückstand, das gewebbildende Gerüst der Samenzellen, zeigt noch Millon'sche und Xanthoproteinreaction, enthält noch durch Wasser nicht ausziehbaren Schwefel, quillt noch, wenn auch langsam, in Kochsalzlösung und löst sich ohne Gallertbildung in Kalilauge, wogegen Ammoniak und Soda-lösung nichts extrahiren.

Die folgende Zusammenstellung enthält die Resultate einiger Phosphor-, Schwefel- und Stickstoffbestimmungen. Sämmtliche untersuchte Substanzen sind mit Wasser, sowie mit heissem Alkohol und mit Aether möglichst erschöpft und bei 105° getrocknet.

	Menge der Sub- stanz in Gramm.	Gefunden in Grammen.			Gefunden in Procent.		
		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , Mg <sub>2</sub>	SO <sub>3</sub> , Ba	Platin, resp. Säure- äquiv.	Phos- phor.	Schwefel.	Stick- stoff.
1. Spermatozoen, rein isolirt, aus dem vas deferens.	0,4953	0,0969	—	—	5,464	—	—
	0,3868	—	—	5,81 cc.	—	—	21,03
2. dito von einem an- deren Thier.	0,4845	0,0943	—	—	5,436	—	—
3. ebenso von einem dritten Exemplar.	0,5173	0,1007	—	—	5,475	—	—
	1,8045	—	0,0265	—	—	0,201	—
	0,2810	—	—	0,4133	—	—	20,73
4. dito von einem vier- ten.	0,4967	0,0968	—	—	5,443	—	—
5. Sperm., aus den Testic. isol. mit A.	0,4132	0,0790	—	—	5,340	—	—
6. Drüsensubst. im Zu- stand höchster Reife	2,4750	0,4012	0,0346	—	4,650	0,192	—

Bemerkenswerth ist die genaue Uebereinstimmung im Phosphorgehalt von 4 untersuchten Samen ebenso vieler Thiere. Man sollte glauben, Analysen von Krystallen einer einzigen chemisch reinen Substanz vor sich zu haben. Eine 5te Portion weicht wohl nur deshalb um ein Geringes ab, weil das Sperma aus dem Hoden dargestellt, also nicht absolut rein ist.

In der That zeigt die weitere Untersuchung, dass eine einzige Substanz die weit überwiegende Hauptmasse dieses Samenrückstandes bildet; es ist eine unlösliche salzartige Verbindung einer sehr stickstoffreichen organischen Base mit einem phosphorreichen Nucleinkörper, welcher dabei die Rolle der Säure übernimmt. Und doch, so wird die weitere Darstellung lehren, haben wir ein Gemenge vor uns. Es sind noch andre, der Eiweissgruppe angehörige Substanzen da. Dass gerade hier ein so constantes Verhältniss der Bestandtheile innegehalten wird, ist gewiss von besonderer Bedeutung.

### Das Protamin.

Zur Darstellung der Base, für welche ich den Namen Protamin vorschlage, extrahirt man das entfettete Sperma mit verdünnter (1—2% H Cl) Salzsäure, stumpft den Säureüberschuss grösstentheils ab und versetzt mit Platinchlorid. Sämmtliches Protamin wird als Platinsalmiak gefällt. Man lässt ein paar Wochen stehen; der schön gelbe, anfangs harzige Niederschlag wird körnig krystallinisch und setzt sich vollständig ab, in Form von Aggregaten stark lichtbrechender mikroskopischer Kugeln und Knollen. Er ist nahezu völlig unlöslich in Wasser, Alkohol, Aether, Chloroform und Benzol, löslich in überschüssiger Salzsäure. Nach vollständiger Ausfällung mit Platinchlorid gibt das von Platin befreite Filtrat keine

Trübung mehr mit Jodquecksilberkalium und mit Phosphormolybdänsäure; es ist also keine andere Base zugegen. Die einzige Verunreinigung sind sehr geringe Spuren von Zersetzungsprodukten des phosphorhaltigen Körpers. Mit S H zersetzt und nochmals gefällt, ist er phosphorfrei. Zur Reinigung muss die fein zerriebene Substanz mit Wasser sehr sorgfältig ausgewaschen werden, da das Platinchlorid leicht salzsaures Salz mit niederreisst. Der als gelbes Pulver erhaltene Platinsalmiak gibt im trockenen Luftstrom bei 100° keine Salzsäure ab, lässt sich bei 105° ohne Verwitterung oder Zersetzung trocknen. Bei circa 120° schmilzt er unter beginnender Zersetzung.

Ein zweites Verfahren besteht darin, dass man mit sehr verdünnter Salpetersäure rasch extrahirt, abstumpft und mit Quecksilbernitrat fällt. Man erhält voluminösen weisfloekigen Niederschlag, in überschüssiger Säure löslich, gewöhnlich noch Spuren von Phosphor enthaltend. Mit Schwefelwasserstoff zersetzt, liefert er eine alkalisch reagierende Lösung.

Das salzsaure Protamin wird durch die Zersetzung des Platinsalmiaks mit Schwefelwasserstoff erhalten, bei rascherem Eindampfen als gummiartige Masse; bei langsamem Verdunsten über Schwefelsäure krystallisirt es, obschon schwierig und nur theilweise. Die fast mikroskopischen Kristalle gehören wohl unzweifelhaft dem rhombischen Systeme an. Schlanke, allseitig wohl ausgebildete reetanguläre Säulen ( $\infty$  P 0 P) sind die häufigste Form; doch kommen auch Nadeln und dicke Tafeln vor.

Leichter krystallisirt das salpetersaure Salz, durch Zersetzung der Hg Verbindung mit S H und nachherigen Säurezusatz erhalten. Beim Verdunsten über Schwefelsäure krystallisirt Alles bis auf den letzten Tropfen in gleichartigen Drusen von, wie es scheint gleichfalls rhombischen, mikroskopischen Prismen und Tafeln aus.

Beide Salze sind leicht löslich in Wasser, sehr schwer löslich in Alkohol, unlöslich in Aether. Sie haben einen sehr eigenthümlichen Geschmack, vorzugsweise adstringirend, daneben schwach süß und bitter zugleich.

Ausser den bereits beschriebenen, zeigen die Lösungen der Protaminsalze folgende Reactionen:

Phosphormolybdänsäure und Jodquecksilberkalium: hellgelbe, voluminös flockige Fällungen.

Ferrocyankalium. Weisse milchige Trübung, welche durchaus nicht flockig wird, sondern allmählig in Form mikroskopischer halbflüssiger glänzender Tröpfchen an der Wand des Gefässes sich absetzt. Allzugrosser Säureüberschuss verhindert die Reaction. Dieselbe ist für den Nachweis des Protamins auch bei sehr grosser Verdünnung geeignet. Ferridcyankalium und Platincyankalium verhalten sich ähnlich.

Quecksilberchlorid milchige Trübung durch halbflüssige Tropfen, in Säureüberschuss schwer löslich.

Ammoniakalische Silber- und Kupferlösungen: Keine Trübung. Neutrales Silbernitrat gibt eine weissflockige, in verdünnter Salpetersäure nicht leicht lösliche Fällung.

Goldchlorid fällt aus concentrirteren Lösungen des salzsauren Salzes eine orangefarbige pflasterartige Masse, beim Verdünnen löslich.

Ammon im Ueberschuss bewirkt für sich allein keine Veränderung. Setzt man aber nachher eine geringe Menge schwefelsaures Natron zu, so entsteht, wenn nicht zu viel Ammonsalz zugegen ist, eine starke milchige Trübung, aus ziemlich dünnflüssigen, nur mässig stark lichtbrechenden Tropfen bestehend. Schwefelsaures Natron ohne Ammon lässt die Lösung klar. Die Trübung löst sich leicht in überschüssigen Mineralsäuren, sowie auch in caustischem Natron und in Ammonsalzen. Auch in sehr viel Wasser

schwindet sie, besonders leicht beim Erwärmen. — Ganz ähnlich verhalten sich phosphorsaure Alkalien, in Verbindung mit überschüssigem Ammon.

Dampft man eine kleine Probe eines Protaminsalzes vorsichtig mit Salpetersäure ab, so entsteht ein citrongelber Fleck. Mit Natron übergossen, wird derselbe schön roth, welche Färbung beim Erwärmen vorübergehend ins Violette übergeht. Diese Reaction ist bemerkenswerth; sie stimmt genau überein mit dem Verhalten des Xanthins.

Werden Protaminverbindungen erhitzt, so schmilzt die Masse, indem sie stechend riechende, alkalisch reagierende Dämpfe ausstösst, und es hinterbleibt eine ziemlich schwer verbrennliche Kohle. Die Dämpfe bläuen kupferhaltiges Guajakpapier, was auf Blausäure hindeutet (Schönbein).

Die Darstellung des Protamins im freien Zustande hat Schwierigkeiten. Kalilauge fällt aus concentrirten Lösungen seiner Salze ölige Tropfen, die von Alkohol und Aether nicht aufgenommen werden, beim Verdünnen mit Wasser sich lösen. Frisch gefälltes Silberoxyd, mit salzsaurem Protamin digeriert, gibt neben Chlorsilber eine unlösliche Silberverbindung der Base. Magnesiahydrat ist nicht im Stande, den Salzen des Protamins ihre Säure zu entziehen. Zersetzt man dagegen den durch Phosphormolybdänsäure erhaltenen hellgelben Niederschlag mit Baryt und entfernt mit Kohlensäure den Barytüberschuss, so erhält man die freie Base als eine gummiartige Masse, die nicht unzersetzt flüchtig ist und mit alkalischer Reaction in Wasser sich löst, dagegen nicht in Alkohol und Aether.

Die Analysen des Platindoppelsalzes ergaben bei 5 verschiedenen Präparaten folgende Zahlen:

- I. 0,2054 gr. gaben beim Glühen 0,0488 gr. Platin, = 23,76% Pt.
- 0,7377 gr. mit Natronkalk verbrannt, sättigten 8,13 cc. Normal-schwefelsäure, = 15,43% N.

- II. 0,5924 gr. gaben beim Glühen 0,1370 gr. Platin, = 23,13% Pt.  
 0,2640 gr. gaben, mit Natronkalk geglüht, 0,2934 gr. Platin,  
 = 15,87% N.  
 0,2987 gr. gaben, mit chromsaurem Blei und vorgelegtem  
 Kupferoxyd und Kupfer verbrannt, 0,2629 CO<sub>2</sub>, = 24,01% C. \*)
- III. 0,5706 gr. gaben beim Glühen 0,1350 Platin, = 23,66%.  
 0,4175 gr. nach Carius mit Salpetersäure erhitzt, gaben 0,4064  
 Cl Ag, = 25,05% Cl.  
 0,3928 gr. gaben mit Natronkalk 0,4205 gr. Platin, = 15,10% N.
- IV. 1,3440 gr. gaben beim Glühen 0,3312 gr. Platin, = 24,643% Pt.  
 0,7250 gr. gaben 0,6158 CO<sub>2</sub> und 0,2842 H<sub>2</sub>O, = 23,16% C und  
 4,355% H.  
 0,2430 gr. gaben 0,2585 gr. Platin beim Glühen mit Natronkalk,  
 = 15,00% N.
- V. 0,7365 gr. gaben beim Glühen 0,1807 gr. Platin, = 24,535% Pt.  
 0,5580 gr. gaben 0,4748 CO<sub>2</sub> und 0,2158 H<sub>2</sub>O, = 23,21% C und  
 4,29% H.  
 0,5387 gr. gaben 0,4565 CO<sub>2</sub> und 0,2065 H<sub>2</sub>O, = 23,11% C  
 und 4,259% H.

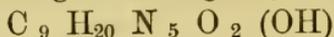
Die Zahlen sprechen dafür, dass auf fünf Stickstoffatome ein basischer Ammoniakrest kommt. Mit Ausnahme von II sind aber alle Plattingehalte etwas höher, als dem fünften Theil des Stickstoffs entspricht.

Der abnorm hohe Plattingehalt der beiden letzten Präparate führt sich wahrscheinlich darauf zurück, dass in diesen beiden Fällen die Protaminlösung in überschüssiges Platinchlorid war gegossen worden. Eine bloß mechanische Einschliessung von Platinchlorid ist mit Rücksicht auf das sehr sorgfältige Auswaschen nicht wahrscheinlich. Eher ist anzunehmen, dass beim Protamin leicht eines der vier andern Stickstoffatome schwachbasische Natur zeigen und etwas Platinsalz mit niederreißen kann. Berechnet man aus obigen Analysen nach Abzug des Platinchlorids die Zusammensetzung der freien Basis, so stimmen wohl die

\*) Ein leider zu spät entdeckter Wasserstoffgehalt des Kupfers vereitelte die H-Bestimmung.

Analysen hinreichend überein, um die Annahme eines Gemenges mehrerer Basen auszuschliessen.

Am besten stimmen die Zahlen, wie sich bei der eben genannten Berechnungsweise ergibt, mit der Formel



Berechnet	Gefunden				
	I	II	III	IV	V
C <sub>9</sub> 43,72		43,00		44,14	43,92
H <sub>21</sub> 8,50				8,68	8,52
N <sub>5</sub> 28,34	28,33	28,16	27,72	28,48	
O <sub>3</sub> 19,44					
100,00					

Ueber die Zersetzungsprodukte mag für diesmal nur ein Vorversuch hier erwähnt sein. Salzsaures Protamin, durch Zersetzung des Platinsalmiaks erhalten, wurde längere Zeit auf dem Wasserbade mit überschüssiger Salzsäure erwärmt und schliesslich eingedampft. Bei Zusatz von Wasser blieb in Form dicker, kurzer mikroskopischer Prismen eine schwer lösliche Substanz zurück, welche mit Salpetersäure und Natron exquisit die oben beschriebene Xanthinreaction gab. In Ammon waren die Kristalle leichter löslich, in der Lösung entstand durch ammoniakalisches Silber eine voluminöse Gallerte. Diese, in Salpetersäure heiss gelöst, gab beim Erkalten reichliche Kristalle einer salpetersauren Silberverbindung, mikroskopische Drusen von Prismen und Tafeln, wie es scheint, dem klinorhombischen System angehörig. Es ist also die Vermuthung nahe gelegt, dass Xanthin oder ein demselben nahe verwandter Körper durch blosse Spaltung aus dem Protamin entstehen könne. Gegen eigentliches Xanthin spricht aber der hohe H-Gehalt des Protamin.

Bei dem Vorgang der Reifung des Samens tritt das Protamin erst spät auf. Es fehlt noch gänzlich in Testikeln, welche um circa 4—6 Wochen von der Geschlechts-

reife entfernt sind und massenweise kernreiche Bildungszellen enthalten. Erst dann, wenn einmal innerhalb dieser Zellen Gebilde von der Form und der starken Lichtbrechung der Spermatozoenköpfe erkennbar sind, ist auch das Protamin nachzuweisen.

### Das Nuclein.

Der Rückstand nach Extraction mit Salzsäure zeigt unter dem Mikroskop noch Hülle und Inhalt und gibt die Millon'sche Reaction. In Kochsalzlösung quillt er nicht mehr, dagegen etwas in destillirtem Wasser.

0,3028 gr. dieses Rückstandes gaben mit Natronkalk 0,2199 Platin, = 13,45% N.

0,2302 gr. sättigten 2,91 CC. Normalsäure = 13,45% N.

0,2262 gr. gaben 0,0664  $P_2O_7Mg_2$  = 8,198% P. (18,79%  $P_2O_5$ ).

Die Reindarstellung des phosphorhaltigen Nucleinkörpers, der mit dem Protamin verbunden ist, ist keine ganz leichte Aufgabe. Die grosse Zersetzlichkeit dieses Stoffes sowie die Neigung, in unlösliche Modifikationen überzugehen, erfordern ganz besondere Vorsicht, wenn constante Resultate erreicht werden sollen. Als Regel ist zu beachten, dass man die einmal angefangenen Operationen möglichst rasch zu Ende führe. Die Substanz darf weder mit überschüssigem Alkali noch mit stärkerem Säureüberschuss längere Zeit in Berührung bleiben. Wo möglich wähle man die kalte Jahreszeit. Folgendes Verfahren hat sich mir schliesslich als zuverlässig bewährt.

Circa 25 gr. Sperma, das mit heissem Alkohol völlig erschöpft ist, wird mit verdünnter Salzsäure (H Cl 1%) möglichst rasch vollständig extrahirt, bis gelbes Blutlaugensalz die Extracte nicht mehr trübt. Die Masse darf nie mit neutralem Wasser in Berührung kommen, weil sie sonst quillt und klumpig wird. Der ungelöste Rückstand wird mit salzsäurehaltigem (0,5% H Cl) Wasser aufs

Feinste zerrieben und geschlemmt. Nachdem möglichste Zertheilung erreicht ist, fügt man zu der Flüssigkeit Natronlauge in mässigem Ueberschuss. Erwärmen ist unzulässig. Nach ein paar Minuten filtrirt man durch grobes Papier; die klare Lösung muss nahezu farblos oder höchstens hell weingelb sein. Ohne Verzug fällt man nun jede gewonnene Portion des Filtrates mit einer gerade zureichenden Menge Salzsäure unter Zusatz eines halben Volumtheils Alkohol. Der entstandene, völlig farblose Niederschlag setzt sich flockig ab, was ohne Alkohol nur sehr unvollkommen geschieht. Auch Zusatz von Kochsalz befördert die Ausfällung.

Die so gewonnene Substanz ist durchaus frei von Eiweiss. Wenn man nach der angegebenen Vorschrift verfährt, so gehen gar keine Albuminstoffe in Lösung. Die klaren Filtrate, mit Natron und Kupfervitriol gekocht, geben keine Spur von violetter Färbung. Der erhaltene Niederschlag bleibt bei der Millon'schen Reaction vollkommen farblos. Der in kaltem Natron ungelöste Rückstand, der als gallertige Masse auf dem Filter bleibt, enthält neben unlöslich gebliebenem Nuclein beträchtliche Mengen von Albuminstoffen. In erwärmter Natronlauge löst er sich und gibt dann, mit Kupfervitriol gekocht, eine prachtvolle, tief purpurviolette Färbung. Rauchende Salzsäure löst gleichfalls theilweise. Verdünnt man sodann mit viel Wasser und filtrirt, so wird das Filtrat durch Ferrocyankalium flockig gefällt und gibt beim Neutralisiren ein Präzipitat, welches intensive Millon'sche und Xanthoproteinreaction zeigt. Die mikroskopische Prüfung dieses Rückstandes, nachdem man ihn wieder schwach angesäuert, weist noch viele erkennbare Ueberbleibsel der Spermatozoenköpfe auf. Aber von den dicken glänzenden Hüllen sind nur noch dünne, angefressene Reste vorhanden, welche den durch die Säurewirkung aufgehellten Inhalt umgeben.

Diese Befunde zusammengenommen beweisen zur Evidenz, dass die Hülle der Spermatozoenköpfe frei von Eiweiss ist und neben Lecithin etc. ausschliesslich aus Nuclein, in Verbindung mit Protamin, besteht. Im Innern der Köpfe dagegen finden sich ächte Eiweisskörper. Darauf ist auch unzweifelhaft der vorgefundene geringe Schwefelgehalt (0,2%) zu beziehen.

Den Nucleinniederschlag lässt man nun einige Tage unter absolutem Alkohol stehen, wodurch er unlöslich wird. Alsdann kann man ihn zur Entfernung der Salze mit destillirtem Wasser auswaschen. Nochmals zu lösen und zu fällen ist überflüssig und vermehrt nur die Gefahr der Zersetzung. Schliesslich wird mit Alkohol und Aether entwässert und man hat ein salzfreies Präparat, das zum Behufe der Analyse bei 105° unter schwacher Bräunung sich trocknen lässt.

An dem frisch gefällten Nuclein sind folgende Charaktere und Reactionen zu bemerken: Es ist amorph, farblos, in Wasser etwas löslich; die Lösung wird durch Säuren getrübt. Leicht löslich ist es in Soda, Ammon,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; nach längerem Stehen jedoch nicht mehr. Es zeigt deutlich saure Eigenschaften, neutralisirt caustische Alkalien; ja, die Lösung in Natron oder Ammon reagirt sauer, so lange noch etwas ungelöst ist. Die Lösung in rauchender Salzsäure trübt sich, wenn man sofort mit viel Wasser verdünnt, nach wenigen Minuten nicht mehr.

Wie schon erwähnt, fehlt dem Körper die Millon'sche Rothfärbung, sowie die Färbung mit Kupfersalzen in alkalischer Lösung vollständig. Starke Salpetersäure färbt das Nuclein nicht gelb, löst es zur farblosen Flüssigkeit. Beim Erwärmen wird dieselbe schwach gelb, auf Zusatz von Ammon tiefer braungelb. Eine ächte Xanthoproteinreaction kann man diess nicht nennen. Jod färbt das Nuclein nur langsam und schwach gelb; die Färbung haftet ziemlich fest.

Weingeist trübt die Ammoniakalischen Nucleinlösungen erst bei weit über 50% Alkoholgehalt. Mit Chlorbaryum, Chlorecalcium und Chlormagnesium gibt eine verdünnte ammoniakalische (neutrale oder alkalische) Nucleinlösung keine Trübung. In einer Nucleinlösung dagegen, welche circa 40 Vol. % Alkohol enthält, entstehen auf Zusatz der genannten Erdsalze flockige weisse, in Ammon unlösliche Fällungen, salzartige Verbindungen der Basen mit Nuclein.

Kupfersulfat gibt ohne Alkoholzusatz mit neutralen Nucleinlösungen einen grünflockigen, in Wasser unlöslichen Niederschlag; derselbe ist jedoch in Ammon löslich. Ebenso Chlorzink und Silbersalpeter, letzterer nur in concentrirteren Lösungen. Die Verbindungen scheinen beständig zu sein; die Barytverbindung gibt bei fortgesetztem Auswaschen mit verdünntem Weingeist schliesslich kein Baryum mehr ab, ebenso die Kupferverbindung beim Auswaschen mit Wasser kein Kupfer.

Auch mit der organischen Base, an die das Nuclein im Samen gebunden war, lässt es sich von Neuem verbinden. Nuclein, in Ammon gelöst, gibt mit der Lösung eines Protaminsalzes einen nicht flockigen, sondern schweren pulvrigen Niederschlag, in Wasser und in Ammon überschuss unlöslich, in fixen Alkalien löslich. Der mikroskopischen Prüfung zufolge besteht dieser Niederschlag ausschliesslich aus stark lichtbrechenden soliden Kugeln\*) und Kugelaggregaten, Dotterkörnern oft zum Verwechselln ähnlich, je nach der Concentration der Lösung und sonstigen Umständen von verschiedener Grösse, von unmessbarer Kleinheit bis zu  $40\mu$  und darüber. In Kochsalzlösungen von 10% quellen sie auf. Dabei treten sehr oft eigenthümliche Verhältnisse zu Tage; die Kugeln erhalten

\*) Doppelbrechung war — wenigstens ohne Gipsplättchen — nicht zu constatiren. In starkem Alkohol zerbröckeln, durch Wasserentziehung, die Kugeln nach längerer Zeit.

z. B. eine doppelte Contour; von der blasser werdenden Inhaltsmasse scheiden sich stärker lichtbrechende Körner, so dass die Aehnlichkeit mit thierischen Formelementen, z. B. Zellkernen, nicht selten frappant wird.

Die beschriebene Substanz zeigt somit in ihrem Verhalten zu Wasser, Ammon, Natron, Kochsalz die grösste Aehnlichkeit mit den von der Hüllensubstanz der Spermatozoenköpfe früher beschriebenen Charakteren. Durch diese Thatsachen, in Verbindung mit den weiter unten mitgetheilten Analysen, wird unsere Auffassung über die chemische Beschaffenheit der Hülle endgiltig bestätigt. Die Art der Darstellung beweist zudem, dass es sich um eine salzartige, nicht ätherartige Verbindung handelt (nucleinsaures Protamin).

Eine gewiss auffallende Erscheinung, für einen sonst so resistenten Körper, ist jene sonderbare Quellung in Kochsalzlösungen. Sie ist der Ausdruck einer chemischen Umsetzung. Lässt man gut ausgewaschenes entfettetes Sperma in der Salzlösung quellen, so enthält das von den Gallertklümpchen getrennte Filtrat sehr merkliche Mengen von Protamin in neutral reagierender Lösung, nachweisbar durch Blutlaugensalz und Platinchlorid. Nuclein fehlt oder ist nur in Spuren vorhanden. Durch erneuten  $\text{ClNa}$ -Zusatz geht immer mehr Protamin in Lösung; doch bleibt es immer nur ein Bruchtheil des Ganzen. Giesst man aber die Gallerte, statt zu filtriren, in viel Wasser und schüttelt einen Augenblick, so ziehen sich die Klümpchen wieder zu undurchsichtigen Fetzen zusammen; das Wasser enthält nunmehr keine Spur von Protamin, die ursprüngliche Substanz ist regenerirt. Wir haben also einen partiellen Austausch von Säuren und Basen zwischen Chlornatrium und Nucleo-Protamin; derselbe ist gebunden an bestimmte Grenzwerte der  $\text{ClNa}$ -Concentration. Da das Nuclein, wie unten gezeigt werden soll, eine mehrbasische Säure ist,

so werden mehrere neue Verbindungen neben einander entstehen können, welche Nuclein, Natrium, Protamin in verschiedenen Verhältnissen und Combinationen enthalten und verschiedene Quellbarkeit besitzen. Daraus erklärt sich vielleicht der mikroskopische Befund, jene eigenthümliche morphologische Differenzierung.

Das Nuclein gehört zu den schwieriger diffundierenden Stoffen. Durch (deutsches) Pergamentpapier von verschiedenen Dicken, leicht durchgängig für Kochsalz und Protamin, waren in 3 Versuchen mit neutralem Nuclein-Ammon nach 12 Stunden nur geringe Spuren von Nuclein zu Wasser übergegangen, so dass das Wasser mit Protaminlösung, dem empfindlichsten Reagens auf Nuclein, sich eben merklich trübte. Durch Herzbeutel war in dieser Zeit gar nichts getreten.

Analysen wurden ausgeführt von dem Nuclein und seinen Verbindungen mit Baryum und Protamin.

I. 0,4748 gr. Nuclein gaben 0,1699  $P_2O_7Mg_2$  = 9,767% Phosphor.

0,2919 gr. mit Natronkalk geglüht sättigten 2,66 cc. Normal-schwefelsäure = 12,76% N.

0,2708 gr. = 2,50 cc. = 12,92% N.

0,1838 gr. gaben 0,1646 Platin, = 12,66% N.

II. 0,2595 gr. Nuclein gaben 0,0900  $P_2O_7Mg_2$  = 9,686% P.

Diese beiden Präparate zeigen nur deshalb so hohen Phosphorgehalt, weil nicht mit Wasser, sondern blos mit verdünntem Weingeist gewaschen wurde. Alle folgenden wurden genau nach dem oben beschriebenen Verfahren dargestellt. Bei I—VI wurde zweimal gelöst und gefällt.

III. 0,2390 gr. Nuclein gaben 0,0790  $P_2O_7Mg_2$ , = 9,232% P.

0,3116 gr. mit chromsaurem Blei und vorgelegtem Kupfer verbraunt, gaben 0,4175  $CO_2$  und 0,1490 Wasser = 36,54% Kohlenstoff und 5,31% Wasserstoff.

IV. 0,2609 gr. Nuclein gaben 0,0840  $P_2O_7Mg_2$  = 8,992% P.

0,2956 gr. gaben 0,4015  $CO_2$  und 0,1420  $HO_2$  = 37,04% Kohlenstoff und 5,34% Wasserstoff.

V. 0,2295 gr. Nuclein gaben 0,0755  $P_2O_7Mg_2 = 9,189\%$  P.

VI. 0,2525 gr. Nuclein gaben 0,0820  $P_2O_7Mg_2 = 9,070\%$  P.

Bei den folgenden vier Darstellungen endlich wurde eine zweite Lösung und Fällung unterlassen; es wurde bei Winterkälte, mit möglichster Beschleunigung, gearbeitet. Die Waschwasser enthielten gar nichts oder kaum Spuren von phosphorhaltigen Zersetzungsprodukten. Unzweifelhaft haben wir hier die wahre Zusammensetzung des reinen Nucleins. \*)

VII. 0,2697 gr. gaben 0,0920  $P_2O_7Mg_2 = 9,53\%$  P.

VIII. 0,2339 gr. gaben 0,0800  $P_2O_7Mg_2 = 9,55\%$  P.

0,2235 gr. gaben 0,2960  $CO_2$  und 0,1035  $H_2O_1 = 36,15\%$

Kohlenstoff und 5,14% Wasserstoff.

IX. 0,2340 gr. gaben 0,0810  $P_2O_7Mg_2 = 9,67\%$  P.

X. 0,4159 gr. gaben 0,1432  $P_2O_7Mg_2 = 9,61\%$  P.

Die Barytverbindung des Nucleins wurde zunächst dargestellt durch Fällung einer genau neutralen Lösung von Nuclein-Ammoniak mit Chlorbaryum, beide in 45%igem Weingeist gelöst, mit welchem auch der Niederschlag gewaschen wurde.

0,4073 gr. Nucl-Ba gaben 0,1058  $SO_4Ba$  und 0,1142  $P_2O_7Mg_2 = 14,7\%$  Baryum und 7,83% P.

0,2339 gr. gaben 0,1935 gr. Platin, = 11,7% N.

Bei drei andern Präparaten, mit eben so gutem Nuclein dargestellt betrug der Baryumgehalt 13,00, 13,58 15,70%.

Um ferner eine möglichst gesättigte Barytverbindung zu erhalten, wurde Nuclein, in überschüssigem Ammon gelöst, tropfenweise in eine ammoniakhaltige Chlorbaryumlösung gegossen. Beide Lösungen hatten 45% Alkoholgehalt. Für

\*) Eine grössere Anzahl von Analysen ganz reinen Nucleins, zu denen bis jetzt die Zeit fehlte, wird so bald als möglich mitgeteilt werden. Die mitgetheilten Analysen stammen bei II—X von 10 aufeinanderfolgenden Darstellungen. Nur ein Präparat aus dieser Reihe blieb unerwähnt; es war unter saurem Weingeist 2 Tage gestanden und hatte sich zersetzt (8,0% P).

Abhaltung der Kohlensäure wurde möglichst Sorge getragen; die dennoch vorhandenen geringen Spuren von Kohlensäure durch Absorption nach Erwärmen mit Salzsäure bestimmt und als kohlenaurer Baryt in Rechnung gebracht. Die weingeistige (45%) Waschflüssigkeit entzog der Verbindung kein Baryum. Das angewandte Nuclein stammte von den Präparaten VII—X.

I. 0,5505 gr. gaben 0,2085  $\text{SO}_4\text{Ba}$  = 22,3% Ba.

II. 0,3646 gr. gaben 0,1322  $\text{SO}_4\text{Ba}$  = 21,3% Ba.

III. 0,7105 gr. gaben 0,2592  $\text{SO}_4\text{Ba}$  = 21,4% Ba.

Die gefundenen Zahlen stimmen annähernd mit der Annahme, dass auf 3 Atome Phosphor (Nuclein = 9,6 P) 4 Aeq. Baryum zugehen sei.

berechnet	gefunden		
22,0	22,3	21,3	21,4

Das Nuclein ist demnach eine mindestens vierbasische Säure; unter dieser Annahme stimmt die gefundene Zusammensetzung mit der Formel

	$\text{C}_{29}$	$\text{H}_{49}$	$\text{N}_9$	$\text{P}_3$	$\text{O}_{22}$
	berechnet				gefunden
$\text{C}_{29}$		35,95			36,11
$\text{H}_{49}$		5,01			5,15
$\text{N}_9$		13,02			13,09 (Mittel)
$\text{P}_3$		9,61			9,59 (Mittel)
$\text{O}_{22}$		36,41			36,06
		<hr style="width: 50%; margin: 0 auto;"/>			<hr style="width: 50%; margin: 0 auto;"/>
		100,00			100,00

Die mitgetheilten Analysen zeigen, dass hier eine Substanz vorliegt, welche auch abgesehen vom Phosphorgehalt, durchaus sui generis ist. Berechnet man die Zusammensetzung einer Verbindung, aus welcher unter Eintritt von Phosphorsäure Nuclein könnte entstanden sein, z. B. unter Annahme eines Austrittes von 2  $\text{H}_2\text{O}$  für jedes Molekül Phosphorsäure, so ergeben sich Zahlenwerthe, die durch grossen O-Gehalt und geringeren C- und H-Gehalt vom Ei-

weiss abweichen, während der N-Gehalt damit übereinstimmt. Einige Analogien mit dem phosphorfrei berechneten Nuclein zeigen bis jetzt nur die von Hüfner\*) analysirten, mittelst der Glycerinmethode dargestellten Fermentsubstanzen.

	Fibrin	Pankreasferment	P-freies Nuclein
C	52,6	46,57	44,56
H	7,0	7,17	6,00
N	17,4	14,95	16,12
O	21,8	30,36	33,32
S	1,2	0,95	— —

Dieselben haben aber höhern H-Gehalt und enthalten noch Schwefel. Wenn man an eine genetische Beziehung zwischen Beiden denken wollte, so wären die Fermente ein Zwischenglied zwischen Eiweiss und Nuclein.

Die Mehrbasigkeit des Nucleins verräth sich nun auch in seinen Verbindungsverhältnissen mit Protamin. Der schon früher erwähnte, pulvrige Niederschlag, durch Fällung von neutralem Nucleinammoniak mit neutraler Lösung von salzsaurem Protamin erhalten, gab 5,96, 5,91 und 5,79% P bei überschüssigem Protamin, 6,64% P bei überschüssigem Nuclein, 6,14 und 6,44%, als weder das Eine noch das Andere im Ueberschuss war; durch Fällung mit überschüssigem Protamin in stark ammoniakalischer Lösung wurden Niederschläge von 3,75 und 4,42% P erhalten; diese letzteren enthielten kein Ammoniak in Verbindung, gaben aber beim Auswaschen etwas Protamin ab, was bei den übrigen Präparaten durchaus nicht der Fall war. Die Berechnung des Protamingehaltes auf Grund der Phosphorbestimmungen würde indess nicht ganz genau ausfallen, da der Phosphorgehalt des Nucleins so leicht im Laufe der Darstellung sich vermindert (um 0,2—0,6%). Es ist daher auch

---

\*) Hüfner, Unters. über ungeformte Fermente. J. f. prakt. Ch. V. 372.

nicht überflüssig, zu erwähnen, dass nur die besseren Nucleinpräparate (von 8,99—9,6<sup>0</sup>/<sub>100</sub> P) verwendet wurden, und dass die Abweichungen des P-Gehaltes sich mehrfach bei Verwendung derselben Lösungen in verschiedenen Mengenverhältnissen, mit oder ohne Ammonüberschuss, herausstellten.

Die Zusammensetzung der künstlichen Nucleo-Protamine, verglichen mit dem fettfreien Sperma (5,45<sup>0</sup>/<sub>100</sub> P) zeigt, dass der grösste Theil des Nucleins, wenn nicht Alles, an die organische Base gebunden ist. Völlige Sättigung ist aber nicht vorhanden, wie folgender, mehrfach wiederholter Versuch zeigte: Frisches, reines Sperma aus dem vas deferens wurde mit neutraler Lösung von salzsaurem Protamin versetzt. Sofort ballten sich die Samenelemente pulvrig zusammen und setzten sich rasch zu Boden, wie sonst nur unter Zusatz von Essigsäure. Offenbar waren dieselben dichter geworden; in der That schienen ihre Hüllen nun noch stärker lichtbrechend zu sein. Das Protamin war aus der Lösung verschwunden, nicht unbeträchtliche Mengen wurden so von dem Sperma absorbiert, so dass Ferrocyankalium keine Trübung mehr hervorrief. Die vorher alkalische Reaction wurde schon nach den ersten Tropfen neutral, aber nicht sauer, obschon alsdann noch ziemlich viel Protamin verschluckt wurde. Das Protamin ist also vermuthlich theils an die Stelle von Alkali, theils an diejenige von noch disponiblen basischem Wasserstoff im Nuclein des Sperma getreten. Nur der letztere Theil hatte Einfluss auf die Reaction der Flüssigkeit.

Diese Erfahrungen über die Verbindungsweise des Nucleins sind sehr lehrreich und für die Frage nach der chemischen Struktur von Gewebsbildnern überhaupt ein beachtenswerthes Beispiel. Wir haben hier einen mehrwerthigen Körper, welcher, ohne gelöst zu sein, einen ge-

wissen Grad chemischer Beweglichkeit besitzt. Anorganische und organische Basen, ohne dass sich, wie Filtrationsversuche zeigen, etwas von dem Nuclein zu verflüssigen braucht, treten aus und ein, ersetzen einander, vermehren und vermindern sich. Die verschiedenen Basicitäten scheinen ungleichen Ranges zu sein, so dass ein Theil der Verwandtschaft zum Alkali schon durch reines Wasser überwunden werden kann. An der merkwürdigen Zersetzung durch Kochsalz haben wir ein Beispiel gesehen, wie scheinbar ganz indifferente Substanzen durch theilweisen Umtausch der Bestandtheile tief in die Verhältnisse des Nucleo-Protamins eingreifen. Man kann somit wohl sagen, dass jede Aenderung des Salzgehaltes, der Concentration, der Alkaleszenz der umgebenden Lösung in der gewebbildenden Substanz, wie resistent dieselbe auch äusserlich scheine, einen neuen chemischen Gleichgewichtszustand hervorrufen wird.

Die nächste Analogie auf rein chemischem Gebiet für dieses sonderbare Verhalten bildet die gegenseitige Zersetzung der Salze in Lösungen, wie sie schon von Berthollet behauptet und seither durch die Beobachtungen über Hydrodiffusion deutlich dargethan wurde. Quellungs- und imbibitionsfähige Substanzen theilen ja mit dem gelösten Zustand eine der wesentlichsten Grundbedingungen chemischer Beweglichkeit; denn zwischen ihren Molekülen sind Wassertheilchen und Theilchen gelöster Körper beliebig verschiebbar, so sehr, dass ihre Vertheilung daselbst sich mit der Vertheilung in der umgebenden Flüssigkeit in ein, wenn auch unvollständiges Gleichgewicht setzen muss. Es wird daher nicht auffallen dürfen, wenn auch andere Gewebbildner, welche salzartige Verbindungen irgend einer Art sind, ähnliche Erscheinungen, wie das Nucleo-Protamin zeigen sollten.

Von allen diesen Stoffwanderungen und Umlagerungen

bleibt auch die physikalische Struktur nicht unberührt. Jede neue Combination von Nuclein, Alkali, Protamin, alkalischen Erden ist wieder ein Körper für sich, der seine besondere Anziehungskraft für Wassertheilchen (Quellbarkeit) und vielleicht auch sonst seine eigenthümliche Anordnung der Moleküle hat. So vermag Chlorcalcium oder Chlorbaryum das Sperma dichter zu machen, weil eine weniger quellbare Verbindung entsteht, wenn der vom Protamin freigelassene Antheil des basischen Nucleinwasserstoffs durch Calcium (resp. Baryum), als wenn er durch Alkalien oder gar nicht ersetzt ist. Noch viel auffallender ist dies beim Karpfen, wo wegen Mangel des Protamins der Austausch ein viel ausgiebigerer ist. Ammon, kohlen-saures Natron hinwiederum wirken quellend auf das Lachs-sperma, indem eine basischere Verbindung entsteht, ohne dass etwas in Lösung übertritt. Es wäre interessant zu wissen, ob dabei Kohlensäure in auspumpbare Form übergeführt wird (Bicarbonat).

Schwerer zu deuten ist der Einfluss der Säuren. Bei der Ausfällung frischen Samens mit Essigsäure wird zwar zunächst Alkalientziehung mitspielen. Aber auch protamin- und alkalifreier Spermarückstand quillt in neutralem Wasser und wird durch Säuren wieder dicht. Reines Nuclein, in Wasser gelöst, trübt sich durch Säurezusatz. Haben wir es hier vielleicht mit einem Einfluss der Säure auf die Hydratbildung zu thun?

So wie die Sachen nun stehen, ist, wie leicht einzu-sehen, eine Frage wiederum ganz offen. Ob die Hülle der Spermatozoenköpfe, wie sie im frischen Sekret vorliegen, ein chemisches Individuum ist, oder aus mehreren verschieden combinirten Nucleinsalzen besteht, lässt sich nicht sagen. Ersteres könnte möglicherweise der Fall sein, wenn z. B. sich auf drei Aequivalente Protamin genau 1 Aeq. Alkali ergäbe, was schwer zu erweisen ist. Letz-

terer Fall scheint mir viel wahrscheinlicher, da ja jede Aenderung des umgebenden Mediums in diesem Sinne wirken muss.

Eine Reihe von Beobachtern haben dem Einfluss von Säuren, Alkalien, Salzen auf die Bewegungen der Samenfäden ihre Aufmerksamkeit geschenkt. Es ist dabei viel vom Endosmose die Rede gewesen, von Aenderungen der Molekularanziehungen etc. Die eben erörterten Beobachtungen zeigen einen Weg, wie die verschiedensten, auch scheinbar indifferenten, Stoffe den chemischen und physikalischen Zustand eines Gewebsbildners beeinflussen können, auch dann, wenn wir mit dem Mikroskop nichts davon wahrnehmen. Und gewiss ist die Bewegung der Samenkörper wie bei jedem Apparat an gewisse physikalische Constanten der Bestandtheile geknüpft.

Ueber die Zersetzungsprodukte des Nucleins kann hier Näheres noch nicht mitgetheilt werden, da die Untersuchung derselben noch im Gange ist. Aller Phosphor des Nucleins ist als Phosphorsäure darin enthalten.

0,2390 Lachssperma, von Protamin befreit, gab nach fünfständigem Kochen mit concentrirter Salzsäure am Rückflusskühler, Uebersättigung mit Ammon und Fällen der klaren Lösung mit Magnesiamixtur,  $0,0704 \text{ P}_2\text{O}_7\text{Mg}_2 = 8,23\% \text{ P}$ . Die Verbrennung hatte ergeben  $8,20\% \text{ P}$ . (Siehe pag. 158.)

Der Phosphor erscheint beim Kochen mit Baryt nicht als Glycerinphosphorsäure, auch nicht als Phosphorsäure; man erhält ganz eigenthümliche phosphorhaltige Barytverbindungen. Neurin entsteht gleichfalls nicht.

Bemerkenswerth ist die ausserordentliche Neigung zur Abspaltung des Phosphors, wenn das Nuclein sich in gelöstem oder frisch gefällttem Zustande befindet. Dabei bleibt ein stickstoffreicherer Rest zurück, und eine phosphorreiche, durch basisch essigsäures Blei fällbare Substanz findet sich in Lösung. Säuren und Alkalien wirken zersetzend, je concentrirter, um so rascher; ja sogar Kochen mit Wasser.

Auch Verdauungsflüssigkeit spaltet bei längerer Einwirkung Phosphor ab, wie denn überhaupt das Nuclein keineswegs so resistent gegen Pepsin ist, als ich früher glaubte.

Diese Abspaltung ist es, welche die Reindarstellung des Nucleins so sehr erschwert. Man hat z. B. ein gutes Präparat dargestellt, lässt es aber über Nacht unter saurem wässrigem Weingeist stehen; Aussehen, Löslichkeit etc. scheinen ganz unverändert und man findet zu seinem Erstaunen 8,0 oder noch weniger P. In der ersten Zeit der Untersuchung, als ich die Fehlerquellen noch nicht kannte, erhielt ich Nucleine bis zu 3,8, ja bis zu 2,6% P herunter. Dabei zeigten die Präparate, wenn auch oft etwas gefärbt, alle Reactionen des reinen Nucleins, waren schwefelfrei, gaben Kalk- und Barytverbindungen, sowie auch charakteristisch geformte Protaminniederschläge, alle entsprechend phosphorärmer. Eine solche Verbindung enthielt, bei neutraler Reaction dargestellt, 3,35% P und 12,0% Baryum.

Diese Erfahrungen werfen einiges Licht auf die Stellung des Phosphors im Nuclein. Die sauren Eigenschaften, die Reactionen, der ganze äussere Habitus, haben mit dem Phosphorgehalt zunächst gar nichts zu thun und werden auf einem oder mehreren CO—OH beruhen müssen. Daneben mag vielleicht eine oder die andere Basicität der Phosphorsäureatome nebenher mitwirken. Der Hauptsache nach ist aber die Phosphorsäure anderweitig verwerthet, vermuthlich in irgend welchen, zusammengesetzten Aethern analogen, Bindungsweisen. Das Nuclein ist nicht eine gepaarte Phosphorsäure, nach Art der Glycerinphosphorsäure.

#### Quantitative Zusammensetzung des Lachssperma.

Zwei Protaminbestimmungen an fettfreiem Sperma durch Fällung mit Platinchlorid ergaben, nach Abzug des Platins und der äquivalenten Chlormenge 32,07 und 30,35%

organische Substanz. Aus der Differenz zwischen dem gefundenen Phosphorgehalt des protaminhaltigen und protaminfreien Sperma (5,45% und 8,23% P) berechnet sich 34,5<sup>0</sup>/<sub>100</sub>, zu hoch, weil ein wenig Phosphor mit in die saure Lösung ging.

Als mittlere Zusammensetzung von reinen Spermatozoen aus dem vas deferens ergibt sich folgende:

In 100 Theilen organischer Stoffe:

Nuclein	48,68
Protamin	26,76
Eiweissstoffe	10,32
Lecithin	7,47
Cholesterin	2,24
Fett	4,53
	<hr/>
	100,00.

### 3. Die Spermatozoen des Karpfens.

An reifen Testikeln des Karpfens habe ich einige vorläufige Versuche angestellt. Die Isolirung der Samenfäden wurde nicht versucht. Nach dem Entfetten mit heissem Alkohol lässt sich ein Wasserextract bereiten, was vorher wegen der grossen Quellbarkeit unmöglich ist. Das Wasser nimmt phosphorsaure Alkalien und von organischen Stoffen fast nur eine Spur von Nuclein auf; alle Reactionen auf Eiweiss, Peptone und organische Basen fallen negativ aus. Extrahirt man nachher mit sehr verdünnter Salzsäure, so geht keine Phosphorsäure, dagegen eine geringe Menge Kalk in Lösung; derselbe war also wohl an die organische Substanz (das Nuclein?) gebunden. Ausserdem aber geht nun in die saure Flüssigkeit in nicht unerheblicher Menge eine Substanz über, welche durch Neutralisation nicht gefällt wird und doch eiweissartige Reactionen gibt: weinrothe Färbung mit Millons Reagens, starke Xanthoproteinreaction, purpurviolette Färbung mit Kupfer-

salz und Natronlauge, weisslich flockige, zum Theil voluminöse Fällungen mit Ferrocyankalium, Platinchlorid, Phosphormolybdänsäure, Jodquecksilberkalium. \*) Diese Reactionen, falls sie, wie ich glaube, von einem und demselben Körper herrühren, deuten auf die Anwesenheit einer peptonartigen Substanz von basischen Eigenschaften, welche die Säure aus einer unlöslichen Verbindung frei macht. Der Platinniederschlag war frei von Schwefel und Phosphor. Nach Erschöpfung mit Salzsäure gab die Drüsen-substanz 4,82% P und nur sehr wenig Schwefel. Protamin war niemals nachzuweisen.

Dieselben eigenthümlichen peptonartigen Reactionen gab das saure Extrakt aus unreifen Lachstestikeln, die noch mit Bildungszellen gefüllt waren. Auch hier war der weisslich flockige Platinniederschlag frei von P und S. Die frisch gebildeten, aber noch in Zellen eingeschlossenen Samenkörper sind in diesem Stadium fast ebenso quellbar als die des Karpfens. Unstreitig besitzt der Karpfensamen eine gewisse Aehnlichkeit mit unreifem Lachssperma. Freilich können unfertige Samenelemente auch beim Karpfen zum Resultat beigetragen haben, da die Reifung, wenn sie im oberen Theile des Organes begonnen, mehrerer Monate bedarf, um sich über den ganzen Testikel auszubreiten, vom April bis tief in den Hochsommer. Indessen sind die angeführten Ergebnisse auch noch im Juli, auf dem Höhepunkt der Reife, gewonnen worden.

#### 4. Das Sperma des Frosches.

Eine Anzahl der Reife naher, mit fertigen Samen-fäden angefüllter Testikel von *Rana esculenta* und *temporaria* ergaben Folgendes: Pepsin löst die Schwänze, lässt

---

\*) Ferrocyankalium, Phosphormolybdänsäure, Jodquecksilberkalium wurden, wo von ihnen die Rede ist, immer in saurer Lösung angewandt.

die Köpfe intakt. In dem salzsauren Extrakt der entfetteten Substanz ist durchaus nichts von organischen Basen nachzuweisen, mittelst der schon mehrmals genannten Reactionen. Nach Erschöpfung mit verdünnten Säuren zeigt die Substanz beim Verbrennen noch reichlichen Phosphorgehalt.

### 5. Die Spermatozoen des Stieres.

Wenn es mir möglich geworden ist, das Sperma einer Säugethierspezies einer eingehenderen Prüfung zu unterwerfen, so verdanke ich diess vor Allem der andauernden, freundlichen Unterstützung, welche mir dabei Herr Veterinär B. Siegmund, Verwalter der hiesigen öffentlichen Schlachthanstalt, im Interesse der Wissenschaft auf das Bereitwilligste angedeihen liess. Nur durch seine Hilfe ist mir das relativ beträchtliche Material, das für eine derartige Untersuchung erforderlich war, zugänglich geworden.

Zur Isolierung der Samenzellen diene bei diesem Objekte folgendes Verfahren: Möglichst frische Epididymis vom Stier werden rein präparirt und von äusserlich sichtbaren Blutgefässen befreit. Man zerlegt alsdann die Organe mit einem Rasirmesser in feine Scheiben, bringt diese in ein Tüllbeutelchen und spült möglichst rasch, ohne vieles Drücken, mit wenig destillirtem Wasser das aus den Canälen fliessende Sekret heraus. Die erhaltene milchige Flüssigkeit enthält neben Spermatozoen nur dann andre Formbestandtheile in irgend merklicher Menge, wenn die Organe nicht mehr völlig frisch, turgescient sind, so dass die Epithelien bereits lockerer haften. Das reinste Produkt gewinnt man, wenn man blos die Schwänze gut gefüllter Nebenhoden in Arbeit nimmt. Ein direktes Abfiltrieren der Samenzellen ist mir nie anders als unvollständig gelungen. Setzt man dagegen ein paar Tropfen Essigsäure hinzu, so ballen sich die suspendierten Formbestandtheile mehr pulvrig zusammen, senken sich langsam und

können durch engporiges Papier mittelst der Bunsen'schen Pumpe gut abgetrennt werden. Nach nochmaligem Zertheilen in Wasser und Filtrieren sind sie von der Flüssigkeit befreit. Die Essigsäure kann nicht durch verdünnte Salzsäure ersetzt werden, eben so wenig durch Chlorcalcium oder Chlorbaryum.

In der abfiltrirten Flüssigkeit ist eine nicht unbedeutende Menge von Serumeiweiss, beim Sieden gerinnend.\*) Obwohl auf Zusatz von Ammoniak keine Trübung erfolgt, so lässt sich doch durch Oxalsäure eine sehr geringe Menge Kalk, durch Magnesiamixtur eine nicht unerhebliche Menge Phosphorsäure ausfällen. Man kann auch ohne Essigsäurezusatz etwas Suspensionsflüssigkeit gewinnen, durch direktes Filtriren, bis die Filter sich verstopfen, oder durch Schütteln mit Aether, worauf nach einiger Zeit die Formbestandtheile zwischen Aether und Wasser sich sammeln. In der so erhaltenen Flüssigkeit lassen sich neben den oben genannten Bestandtheilen noch merkliche Spuren eines Alkalbuminates nachweisen, durch Essigsäure erst bei stark saurer Reaction fällbar (wegen der anwesenden phosphorsauren Salze), in  $\text{CHI}$  0,1% löslich. Dieses haftet bei der angewendeten Methode der Isolierung den Samenzellen an, beträgt aber in günstigen Fällen so wenig, dass es der genauen mikroskopischen Prüfung kaum gelingt, amorphe Partikel zwischen den Spermatozoen nachzuweisen.

Die Reaction des reinen, aus den Kanälen fließenden Sperma habe ich constant deutlich sauer\*\*) gefunden, selbst in solchen Fällen, wo 2 bis 10 Minuten nach dem Tode

---

\*) Das Coagulum ist ohne Rückstand verdaulich, enthält also kein Nucleo-Albumin (Plósz).

\*\*) Longet hat Sperma mit Butter in der Wärme stehen lassen und — ohne Controlversuche — aus dem Auftreten saurer Reaction auf eine Fermentwirkung geschlossen. Ann. des sc. natur. IV Ser. 3. p. 15.

des Thieres die Prüfung geschah. Versuche hierüber sind in ziemlicher Anzahl theils von Herrn Siegmund, theils von mir selbst mit seiner Hülfe angestellt. Die Drüsen-substanz selbst reagierte nicht selten noch alkalisch. Dennoch wird die schon genannte, durch Salzsäure entfärbte wässrige Cyaninlösung öfters etwas gebläut, und zwar durch die Flüssigkeit, nicht durch die Formelemente. Es erklärt sich dies aus der bekannten Thatsache, dass die bleichende Wirkung verschiedener Säuren auf das Cyanin nicht genau ihrem Aequivalentgewicht umgekehrt proportional ist, sondern bei schwächeren, namentlich organischen Säuren einer grösseren Acidität bedarf als bei starken Mineralsäuren.

Die mikroskopische Untersuchung der Spermatozoen vom Stier hat schon viele Beobachter beschäftigt. In Bezug auf die äussere Form habe ich namentlich der getreuen Abbildung, welche Kölliker gibt, nur wenig beizufügen. Der Kopf einer solchen Samenzelle stellt eine dünne, fast genau ebene Platte dar, dem Längsschnitt einer Birne ähnlich, doch mit gleichmässigerer Verjüngung, mit abgerundetem Rand. Ihre Länge beträgt circa  $9,5\mu$ , die grösste Breite  $4,5\mu$ , ihre Dicke kaum mehr als  $1\mu$ . Aus einer leichten Einkerbung der Kopfplatte entspringt der Faden, äusserst scharf abgesetzt, ähnlich dem Stiel einer Frucht, mit einem sehr kurzen, schwächer lichtbrechenden Anfangsstückchen.

Vor Allem wird es sich nun fragen, ob auch beim Stier, wie bei Knochenfischen, dem Spermatozookopf eine innere Struktur zukomme. Es fehlt nicht an hierauf deutenden Angaben in der Litteratur, ohne dass jedoch genügende Belege vorlägen. Am bestimmtesten spricht sich Grohe\*) aus, der mit Hilfe von Anilinfärbung an den

\*) F. Grohe, über die Bewegungen der Samenkörper. Virch. Arch. XXXII 1865, pag. 419 und ff.

Samenelementen des Frosches und verschiedener Säugethiere eine „contractile“ Innenmasse finden will, die sich auch in den Faden fortsetzen soll. Was Schweigger-Seidel\*) darüber sagt, sieht mehr wie eine vage Vermuthung, als wie eine wirkliche Beweisführung aus. Im Gegensatz hiezu hält Kölliker an der homogenen Beschaffenheit der Köpfe speziell für den Säugethiersamen bis in die neuere Zeit (1867) fest.

Aus der soeben geschilderten regelmässigen Plattenform geht in der That hervor, dass man es hier mit einem für die Erkennung innerer Details sehr ungünstig beschaffenen Objekt zu thun hat. Was wir hier im Innern des Kopfes etwa vermuthen können, ein oder mehrere sehr dünne Schichten oder Gebilde von anderer Lichtbrechung als die Hülle, wird leicht wegen zu geringen Einflusses auf den Gang und die Stärke des durchfallenden Lichtes dem Blicke sich völlig entziehen. Es fehlen hier die beim Lachssperma beschriebenen, stark gekrümmten Grenzflächen der Schichten, welche durch ihre Linsenähnliche Wirkung die Unterscheidung erleichtern.\*\*)

Dennoch bin ich zur bestimmten Ueberzeugung gelangt, dass es auch hier an einer complicirteren Struktur nicht fehlt. Ohne Zusatz von Reagentien lässt sich auf der Flächenansicht zunächst nichts weiter erkennen, als ein bei höherer Einstellung hellerer, bei tieferer dunklerer Saum. Nach kurzer Behandlung mit sehr verdünnter Salzsäure (0,1% ClH) tritt dagegen dieser Saum nicht nur deutlicher hervor, sondern er erscheint auch durch eine scharfe einfache Contour von dem Mittelfeld abgegrenzt. Saum und Contour sind über den ganzen Umfang

---

\*) Schweigger-Seidel, über die Samenkörperchen und ihre Entwicklung. Arch. f. mikr. Anat. I. 328.

\*\*) Welcker, Beiträge zur Mikrographie, Zeitschr. f. rat. Med. N. Folge VIII 225, 1857.

der Platte zu erkennen, jedoch am deutlichsten an dem schmälern Ende, wo der Schwanz sich anheftet. Das Bild beruht nicht, wie bei den Blutkörperchen, auf einer centralen Depression; dagegen sprechen mit Entschiedenheit die optischen Längs- und Querschnitte, sowie der Umstand, dass beim Heben und Senken des Tubus der Saum seine Breite nicht ändert und die innere Contour ihre Stelle nicht verlässt. Es bleibt also keine andere Deutung des Gesehenen übrig, als die Annahme einer stärker lichtbrechenden,\*) ziemlich dicken Hülle, welche eine platte, wahrscheinlich sehr dünne Einlage einer optisch und chemisch differenten Substanz umschliesst. Diese schwächer lichtbrechende Innenschicht ist am dicksten auf der schmälern (Schwanz-)Seite, und schärft sich zu gegen die breite Seite.

Von einigen Beobachtern wird bei der Beschreibung des Sperma mehrerer Säugethiere ein dunkler Streif erwähnt, der über die Mitte der Kopfplatte hinüberläuft. Derselbe findet sich auch hier, als verwaschener Schatten, der sich nicht über die innere Hüllencontour hinaus erstreckt und bei derselben Einstellung, wie die letztere, am deutlichsten wahrzunehmen ist, nicht bei einer höheren oder tiefern, auf eine der freien Flächen gerichteten. Es handelt sich also hier um ein inneres Detailverhältniss, vielleicht um eine Stelle, wo sich die innere Schicht etwas rascher zuschärft unter entsprechender Verdickung der Hülle.

Von andern Reagentien gibt auch längere Behandlung mit Goldchlorid oder Osmiumsäure ( $\frac{1}{2}\%$ ) oft gute Bilder, namentlich zuweilen recht scharf die innere Contour.

---

\*) Grohe spricht von einer schwächer lichtbrechenden Membran; Schweigger-Seidel verwahrt sich ausdrücklich gegen den hellen Saum als Ausdruck einer Hülle. Es ist wohl möglich, dass das, was sie Hülle nennen, mit der von mir beschriebenen nichts zu thun hat.

Besondere Vortheile, durch Färbungen etc., bieten sie vor der Salzsäure nicht.

Die Uebereinstimmung mit der am Lachssperma beschriebenen Struktur geht noch weiter. Auch hier wird an der Insertionsstelle des Schwanzes mittelst der eben genannten Reagentien eine feine dunkle Linie sichtbar, welche die Hülle durchsetzt, als Ausdruck eines von schwacher lichtbrechender Substanz eingenommenen Mikroporus, welcher irgend eine Continuität zwischen dem Inhalt des Kopfes und dem Schwanze herstellt. Die Bohrung ist indess viel zu eng, als dass der ganze Schwanz unverjüngt hindurch treten könnte.

Weit schwieriger ist die Wahrnehmung des Gebildes, welches dem beim Lachssperma beschriebenen Centralkörperchen entspricht. Bei den schon erwähnten Behandlungsweisen, sowie auch nach sehr kurzer Einwirkung von sehr verdünnten kohlen sauren oder caustischen Alkalien trifft man unter der Menge der Samenelemente nicht selten auf solche, wo in dem bei etwas tiefer Einstellung hell erscheinenden Binnenraum ein matter dunklerer Streif zu sehen ist, welcher am Isthmus schmal beginnt, sich dann rasch verbreitert, ohne jedoch den Binnenraum ganz auszufüllen und schliesslich gegen die Mitte des Kopfes hin allmählig undeutlich wird (am besten mit Hartn. 8. Ocul. 4 bei schiefer Beleuchtung und Abhaltung alles auffallenden Lichtes). So unvollständig diese Beobachtung ist, so häufig sie misslingt, so weist sie doch unzweideutig auf die Anwesenheit eines besondern platten Innen-Gebildes, von welchem namentlich die etwas dickere und schmälere Partie sich dem Auge kundgibt. Ich zweifle nicht daran, dass sich in der Reihe der Säugethiere manche weit günstigere Objekte als das vorliegende werden finden lassen. Dahin gehören z. B. die dickeren, nicht völlig platten Spermatozoen des Hundes, an denen, wie ich mich überzeugt habe,

alle die genannten Strukturbestandtheile ohne allzugrosse Schwierigkeit zu erkennen sind.

Unter den zur Aufhellung innerer Struktur beim Sperma des Stieres verwendeten Reagentien ist bis jetzt das Cyanin nicht genannt worden, welches beim Lachsamen sich so vortheilhaft bewährte. In der That erhält man hier beim Versetzen mit farblosem  $\text{ClH}$ -haltigem Cyaninwasser keine Blaufärbung. Wenn man aber unverdünntes Sperma sehr kurze Zeit im Proberöhrchen mit 0,01—0,05prozentiger Kalilösung behandelt und einem Tröpfchen der Mischung auf dem Objektträger das entfärbte Cyaninwasser zusetzt, so tritt ziemlich intensive Blaufärbung, sowohl des Kopfes als des Schwanzes ein. Die Färbung des Kopfes ist nicht gleichmässig. Im Beginn der Einwirkung fällt es oft sehr ins Auge, dass vorzugsweise das Mittelfeld, dem Binnenraum entsprechend, sich bläut, und so von dem fast farblosen Saum sich scharf abgrenzt. Später verwischt sich der Unterschied durch Diffusion. Die Reaktion gelingt nicht bei gewässertem Samen. Blaues, neutrales oder schwach alkalisches Cyaninwasser bringt keine so auffallende Färbung hervor; das freie Cyanin als solches imbibiert sich also nicht leicht. Offenbar hat eine lösliche diffundirbare Substanz das Alkali energisch absorbirt und die gebildete Verbindung wird durch die Salzsäure des Cyaninwassers wieder zersetzt. Es ist kaum zu zweifeln, dass wir es hier mit einer schwächeren Säure zu thun haben, welche, in Freiheit gesetzt, das Cyanin nicht wiederum ebenso zu bleichen vermag, wie die äquivalente Menge Salzsäure.

Diese Thatsache ist gewiss nicht ohne Zusammenhang mit der von Kölliker entdeckten eigenthümlich belebenden Wirkung der Alkalien auf die Bewegungen der Samenfäden, einer Erscheinung, für welche schon Engelmann die Anwesenheit einer bewegungshemmenden Säure als wahr-

scheinlichste Ursache annimmt. Beim Lachs tritt die Säure in der Samenflüssigkeit nicht zu Tage, weil die dicke Hülle relativ reichlichen Vorrath an Alkali enthält. — Zugleich haben wir nunmehr eine erste Andeutung über einen Stoffumsatz in den Spermatozoen und über den Sitz desselben. Denn an eine andere Bildungsstätte der Säure ist zum Mindesten in denjenigen Versuchen nicht zu denken, wo unmittelbar nach dem Schlachten die Reaktion sauer befunden wurde, während die Drüsensubstanz selbst alkalisch reagierte und auch die Epithelien des Nebenhodens, im Gegensatz zu den Spermatozoen, mit farbloser Cyaninlösung ohne Weiteres sich intensiv bläuten. \*)

Die chemische Zusammensetzung der Samenfäden des Stieres ist bis jetzt höchstens in Bezug auf die in Aether löslichen Stoffe eingermassen geprüft worden. Was über die Zusammensetzung des ganzen Säugethierhodens durch Frerichs und Treskin\*\*) mitgetheilt worden ist, besagt aus bekannten anatomischen Gründen über das Sperma selbst nichts. Das längst bekannte Auftreten von Myelinformen bei der Fäulniss des Samens liess Lecithin vermuthen, das nach Treskin neben Cholesterin und gemeinem Fett in der Drüsensubstanz ziemlich reichlich vorkommt. Von Kölliker\*\*\*) haben wir eine Bestimmung des Aetherextraktes im Sperma des Nebenhodens, welche in 100 Theilen fester Substanz 12,07 Extrakt ergab.

Erschöpft man die isolirten Spermatozoen mit heissem Alkohol, so bleibt beim Verdunsten eine schmierig zähe, halb ölige Masse zurück, die in kaltem Aether vollständig

---

\*) Ueber die Cautelen, welche zur Vermeidung von Irrthümern beim Gebrauche des Cyanins und der Deutung der Resultate nöthig sind, behalte ich mir eine besondere Mittheilung vor.

\*\*) Pflüger, Arch. f. Phys. V. 122.

\*\*\*) l. c. p. 256.

löslich ist. Cerebrin ist also nicht vorhanden. Ein solches Aetherextrakt enthielt 4,536%  $P_2O_5$ , entsprechend 51,6% Lecithin.

Die gewebusbildende Grundlage der Stierspermatozoen gehört bekanntlich zu den resistantesten Gewebssubstanzen. Die Schwänze erblassen noch in kalter Kalilauge und lösen sich langsam. Die Köpfe zergehen nur in warmen Lösungen fixer Alkalien. Fettfreie, mit Essigsäure gut isolirte Samenfäden, erhitzt, geben eine beim Befeuchten sauer reagierende Kohle, in welcher ausser Phosphorsäure nur unbestimmbare Spuren von Kalk und Kieselsäure nachzuweisen sind.

I. gr. 0,5795 bei 105° trockener Samenfäden, mit Soda und Salpeter verbrannt, gaben 0,0505  $SO_4Ba$  und 0,0490  $P_2O_7Mg_2$ , = 1,18% S und 2,36% P. 0,5640 von derselben Substanz gaben 0,0478  $SO_4Ba$ , = 1,16% Schwefel.

II. gr. 0,4552 von andern Thieren gaben 0,0370  $P_2O_7Mg_2$ , = 2,27% P.

Eine Portion, laut mikroskopischer Prüfung, sehr rein isolirter Samenfäden wurden, nach feinsten Zertheilung durch Schütteln, frisch mit einer grossen Menge  $ClH$  von 0,1% behandelt und nach einigen Stunden abfiltrirt. Der unlösliche Rückstand betrug nach dem Entfetten und Trocknen 0,6753 gr. und enthielt 2,69% P. Beim Abnehmen vom Filter ergab sich durch Adhärenzen am Filter ein kleiner Verlust, der jedoch gewiss unter 5% betrug. Aus dem klaren Filtrat wurden 0,0495 gr. trocknen Neutralisationspräzipitates erhalten, welcher alle Reactionen eines ächten Eiweisskörpers zeigte. Diese Menge von 7,3% leicht extrahirbaren Eiweisses (Globulin oder Kalialbuminat), auf die fettfreie Gesamtschubstanz berechnet, ist viel zu bedeutend, als dass man sie auf die mikroskopisch kaum nachweisbaren Spuren von Albuminat aus dem Spermaserum beziehen könnte. Dieser Eiweisskörper stammt vielmehr

vermuthlich aus den Köpfen\*), deren Mittelfeld sich deutlich aufgehellt hat. Vermuthlich sind auch die Schwänze nicht ganz unbetheiligt, die unter geringer Quellung sichtlich etwas schwächer lichtbrechend werden.

Mehrere Male wurden auch Portionen entfetteter Samenfäden mit verdünnter Salzsäure extrahiert. Die Extracte gaben mit Blutlaugensalz, Platinchlorid, Jodquecksilberkalium, Phosphormolybdänsäure entweder gar nichts oder nur sehr geringe, nach Eiweiss aussehende Trübungen. Es fehlt also nicht nur das Protamin, sondern es ist auch keine andere dasselbe vertretende organische Base vorhanden.

Einen weiteren Schritt zur Zerlegung ermöglicht das Pepsin. Durch eine mindestens 6—10 Stunden lang fortgesetzte Behandlung mit künstlichem Magensaft gelingt es in der Regel, die Köpfe vollständig zu isolieren. Feine, zerbröckelnde Fädchen als Reste der Schwänze widerstehen hartnäckig, lösen sich aber doch schliesslich auf. Es scheint, als ob der Schwanz aus mehreren Stoffen von ungleicher Resistenz bestehe. Die isolirten Köpfe zeigten sich, wenn man die Verdauung nicht gar zu sehr über die erforderliche Zeit hinaus hat fort dauern lassen, in der Form recht wohl erhalten. Ihre äussere Contour ist glatt, nicht angefressen, die innere Contour der Hülle oft recht deutlich, sowie der Mikroporus. Die Hülle scheint überhaupt vorzugsweise Widerstand zu leisten. Durch öfteres Decantieren und Auswaschen auf dem Filter erhält man eine weissliche, etwas seidenschimmernde Masse, welche deutliche Millon'sche und Xanthoproteinreaktion gibt, sich weder in Ammon, noch in kochender Soda, noch in heisser

---

\*) Beim Lachssamen wurde das durch ClH von 0,1% extrahirbare Eiweiss auf Mittelstück und Schwanz bezogen, weil hier die Säure in der Hülle Protamin vorfindet und daher schwerlich auf das Innere einwirken wird.

concentrirter Salzsäure völlig auflöst. Die durch Kochen mit Soda entstehende Flüssigkeit schwärzt metallisches Silber.

- I. gr. 0,1894 gut isolirte getrocknete Köpfe, mit Soda und Salpeter verbrannt, gaben  $0,0330 \text{ P}_2\text{O}_7\text{Mg}_2$ , = 4,813% P.
- II. gr. 0,3025, sehr rein isolirt, von einer andern Darstellung, gaben  $0,0505 \text{ P}_2\text{O}_7\text{Mg}_2$ , = 4,66% P und  $0,0392 \text{ SO}_4\text{Ba}$ , = 1,78% Schwefel.
- III. gr. 0,3063, von einer dritten Darstellung, gaben  $0,0380 \text{ SO}_4\text{Ba}$ , = 1,70% Schwefel.

Der Vergleich dieser Analysen mit denen der intacten Samenzellen beweist, dass die verdauten Theile, somit der Schwanz, im Wesentlichen phosphorfrei sein müssen. Die Differenz im Phosphorgehalt vor und nach der Verdauung ist so gross, dass wahrscheinlich auch aus dem Kopfe selbst etwas P-freie Substanz wird in die Lösung übergegangen sein; denn das Gewicht des Schwanzes wird wohl schwerlich die volle Hälfte der ganzen Samenzelle betragen. Nach dem histochemischen Verhalten möchte ich solche verdauliche Substanz im Innern des Kopfes vermuthen. Sogar die phosphorhaltige Substanz selbst ist nicht völlig verschont geblieben. Die gebrauchte Verdauungsflüssigkeit enthält eine nicht zu vernachlässigende Menge von Phosphorsäure, die erst nach dem Verbrennen durch Magnesia gefällt werden kann. Auch von den Nucleinkörpern aus Eiter, Hühnerei, Lachssamen, habe ich die Erfahrung gemacht, dass sie unter dem Einflusse künstlichen Magensaftes sich langsam zersetzen.

Die Differenz im Schwefelgehalt (3 : 2) ist geringer als die der Phosphorgehalte (2 : 1). Die verdauten Stoffe werden also im Durchschnitt schwefelarm, aber nicht schwefelfrei sein (circa 0,6% S).

Zur Darstellung des phosphorhaltigen Körpers wird der gereinigte, in Wasser aufs feinste aufgeschlemmte Verdauungsrückstand auf circa 80° C. erwärmt, ein wenig

Natronlauge zugefügt und einige Minuten stehen gelassen, bis eben völlig klare Lösung erfolgt ist. Filtriren ist wozumöglich zu vermeiden. Die erhaltene hellweingelbe Lösung kühlte man rasch ab und fällt mit geringem Ueberschuss an Salzsäure das Nuclein aus, welches man durch nochmaliges Lösen und Fällen, durch Decantiren mit salzsäurehaltigem und dann mit destillirtem Wasser so gut es geht reinigen kann. Die erhaltene, fast oder ganz farblose, meist dicht flockige Masse unterscheidet sich also von dem früher beschriebenen Lachs nuclein sofort darin, dass sie ohne Alkoholzusatz gut auszufällen und auszuwaschen ist, ohne in dem reinen Wasser zu quellen. Der Substanz haften gewöhnlich Spuren von Eiweiss an. In dem gelungensten Falle (Analysen I) gab Millons Reagens noch eine ganz schwache Rosafärbung, in andern mehr. Sonst zeigen die Reactionen bemerkenswerthe Uebereinstimmung mit dem Lachs nuclein. Frisch gefällt, ist es leicht löslich in Soda lösung und in Ammoniak, wird aber beim Stehen bald wieder schwer löslich. Die ammoniakalische Lösung gibt, ohne Zusatz von Weingeist, Niederschläge mit Chlorbaryum, Chlorecalcium und Magnesiamixtur, dagegen nicht mit ammoniakalischer Silber- und Kupferlösung. Für die Zersetzlichkeit des Körpers spricht der grosse Verlust (in einem Falle  $\frac{4}{5}$  der ganzen Nucleinmenge), den man bei der Darstellung, sowie bei der Reinigung erleidet. Die Darstellung selbst geht offenbar mit einer chemischen Umwandlung einher, aus der unlöslichen Modifikation (Anhydrid?) in eine löslichere (Hydratation?)

Ich führe die Analyse des gelungensten Präparates, aus sehr reinen Köpfen (v. Anal. II oben) als farbloser Niederschlag erhalten, genauer an.

0,1622 gr. Nuclein gab 0,1882 Platin, = 16,40% N.

0,2630, von derselben Substanz, gaben mit Soda und Salpeter

0,0677  $P_2O_7Mg_2$ , = 7,189 P.

Zwei andre, sichtlich mehr zersetzte, etwas gefärbte Präparate, gaben 5,707% P, — 17,80% N und 5,379% P. Bei der Zersetzlichkeit des Nucleins ist dies nicht auffallend. Auch ist keine Garantie vorhanden, dass nicht auch der höchste gefundene Phosphorgehalt noch zu niedrig sei. In allen Fällen war keine Spur Schwefel nachzuweisen, nach 24stündigem Stehen der Schmelze mit Chlorbaryum.

Bei der Darstellung I, wo besonders rein isolirte Köpfe zur Verarbeitung kamen, wurde ferner das saure Filtrat nach Ausfällung des Nuclein genau neutralisiert. Es ergab sich ein ziemlich reichlicher Niederschlag (etwa  $\frac{1}{3}$  des erhaltenen Nuclein), der die Reactionen eines ächten Eiweisskörpers zeigte, namentlich intensive Rothfärbung durch das Millon'sche Reagens erlitt.

0,1410 dieses Niederschlages, bei 105° trocken, gaben 0,0130 SO<sub>4</sub>Ba,  
= 1,26% Schwefel und 0,0090 P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>Mg<sub>2</sub>, = 1,78% P.

Ob der Phosphorgehalt dazu gehört (Nucleoalbumin?) oder von Verunreinigung durch ein Zersetzungsprodukt des Nuclein herrührt, ist noch näher zu prüfen.

Jedenfalls besteht der Kopf einer Samenzelle vom Stier aus mindestens drei Substanzen.

- 1) **Nuclein**, S-frei, vermuthlich  $\frac{1}{2}$ — $\frac{2}{3}$  der Masse, in einer unlöslichen Modifikation.
- 2) **Eiweiss** (frei oder in einer P-haltigen Verbindung).
- 3) **Eine sehr schwefelreiche Substanz**, von jedenfalls über 4% S-Gehalt, die noch nicht isolirt ist, und auf welche der hohe Schwefelgehalt zurückgeführt werden muss.

Das Nuclein bildet unzweifelhaft die Hülle, schon deshalb, weil es die überwiegende Hauptmasse darstellt. Das schwefelarme Albuminat Nro. 2 stammt höchst wahrscheinlich aus dem Inhalt des Kopfes, der ja, ähnlich dem eiweissartigen Protoplasma, durch Säuren sich aufhellt.

Von der schwefelreichen Substanz ist noch wenig zu sagen.\*) Sie zersetzt sich bei der Darstellung. Man könnte vermuthen, dass sie das Centrankörperchen bilde. Aber ebenso möglich ist es, dass sie ursprünglich mit dem Nuclein verbunden war und sich bei der Darstellung abgespalten hat. Doch handelt es sich dabei nicht einfach um Schwefelalkali, da beim Ansäuern der Nucleinlösung nur zuweilen eine Spur von Schwefelwasserstoff-Geruch auftrat.

Vom Schwanz der Samenzelle steht nunmehr fest, dass er phosphorfrei ist, also von der Hülle des Kopfes durchaus verschieden zusammengesetzt. Eher ist eine Übereinstimmung denkbar mit Substanzen des Inhaltes, insofern als beide den Eiweissstoffen angehören. Die resistendere Hauptmasse des Schwanzes besitzt im Verhalten zu Reagentien eine bemerkenswerthe Aehnlichkeit mit der Substanz der Porenkapsel des Lachseies, welche unzweifelhaft durch Umwandlung von Zellprotoplasma (der Zona des Primordialeies) entstanden ist (His).

Die Substanz der Porenkapseln widersteht zweiprozentiger Kalilauge längere Zeit, wird dabei durchsichtig. Warme Alkalilauge lösen sie allmähig; ebenso künstlicher Magensaft bei 40°, indessen letzterer erst nach sehr langer Einwirkung, unter Bildung einer zuckerfreien Peptonlösung. Nach Reinigung mit Kali von 2% zur Entfernung des Vitellins geben sie intensive Xanthoproteinreaction und werden durch Millons Reagens aufs Tiefste roth. Aus der Lösung in warmer Kalilauge fällt beim Neutralisieren ein Albuminat in reichlicher Menge nieder. Der Schwefelgehalt betrug 0,76%. Von Phosphor fanden sich sehr geringe Spuren, wohl von mikroskopisch nachweisbaren anhaftenden Dotterkörnern herrührend. Also eine sehr unlösliche Eiweissmodifikation.

---

\*) Beim Lachs berechnet sich für die gefundenen 10% Eiweiss ein Schwefelgehalt von 1,70%, vielleicht noch zu niedrig, da wahrscheinlich die Eiweissmenge eher etwas zu hoch angegeben ist. Auch hier ist also eine schwefelreichere Substanz zu vermuthen.

Der muthmaassliche (s. oben) Schwefelgehalt (0,6%) des Schwanzes stimmt gleichfalls damit überein. Solche unlösliche, den coagulirten Eiweissstoffen vergleichbare, Eiweissmodifikationen scheinen hin und wieder in Zellen vorzukommen (vergl. z. B. Plósz, die eiweissartigen Substanzen der Leberzelle. Pflüger Arch. VII. 371). Doch sind die beiden hier besprochenen Beispiele noch resistenter und scheinen eine noch weitergehende Metamorphose des Protoplasma zu repräsentiren.

Der durch den Mikroporus hergestellte Contact zwischen Inhalt und Schwanz scheint durch einen Fortsatz des centralen Gebildes hergestellt zu werden, wie namentlich beim Lachs augenfällig ist. Und wenn es auch nunmehr feststeht, dass die Hauptmasse des Schwanzes protoplasmatischer Herkunft ist, so kann die Möglichkeit immer noch nicht ganz geleugnet werden, dass sie vielleicht doch eine Strecke weit nur den Belag bilde um einen aus dem Innern des Kopfes stammenden Centralfaden. Denn die genauen Beobachtungen von Kölliker über die Entwicklung des Stiersamens sind noch keineswegs widerlegt. \*)

Was den Unterschied zwischen Mittelstück und Schwanz betrifft, so will ich die Angaben von Schweigger-Seidel hierüber nicht in Abrede stellen. Unterschiede in der physikalischen Struktur, Dichtigkeit, Imbibitionsfähigkeit etc. können zwischen den verschiedenen Abschnitten des Schwanzes vorhanden sein. Tiefer greifende chemische Differenzen zwischen Mittelstück und Schwanzfaden habe ich jedoch bis jetzt nicht finden können. Namentlich verhalten sich beide übereinstimmend gegen Pepsin; ja sogar das kurze, schwach lichtbrechende Anfangsstückchen ist eben so resistent wie das Uebrige; das Reagens löst gar nicht besonders leicht Kopf und Schwanz von einander.

---

\*) l. c. pag. 265.

Es liegt mir hier, nachdem ich über das vorliegende Material an chemischen Thatsachen berichtet, die angenehme Pflicht ob, meinem Freunde und Collegen, Herrn Prof. Piccard, meine aufrichtige Dankbarkeit zu bezeugen für die Freundlichkeit, mit welcher er mir während der ersten Hälfte meiner Untersuchungen die Räumlichkeiten und Hilfsmittel der hiesigen chemischen Anstalt in liberalster Weise zu benützen gestattete, und auch sonst für manche werthvolle Unterstützung durch Rath und That. Auch Herrn Assistent H. Hagenbuch bin ich für manche zuvorkommende Hilfeleistung zu Dank verpflichtet.

#### 6. Physiologische Bemerkungen.

Ich will diese Mittheilung nicht schliessen, ohne mit einigen Worten die Frage zu berühren, welche Beziehungen die gefundenen chemischen Thatsachen zur speziellen Function der Samenfäden haben mögen. Manchen mag es verfrüht erscheinen. Auch für mich ist es der allgemeine Eindruck, dass wir bei der Chemie so gut wie bei der Morphologie der Samenfäden erst eine grosse Breite des Beobachtungsmaterials überblicken müssen, bevor wir über die physiologische Bedeutung der gefundenen einzelnen Details irgend etwas Bestimmtes aussagen dürfen. Der weitere Verlauf der Untersuchung, die sich auf möglichst verschiedene Thierklassen erstrecken soll, wird vielleicht gestatten, einen ersten Schritt in dieser Richtung zu thun. Aus der Mannigfaltigkeit nebensächlicher Momente müssen sich schliesslich die allgemein durchgreifenden Züge herauschälen lassen, in denen das Grundprinzip des Zeugungsvorganges sich verräth. Dennoch glaube ich, dass einige Bemerkungen über die Tragweite der bis jetzt erhaltenen Resultate nicht überflüssig sein werden.

Ueber das Problem, worauf die Wirkung des Samens beruhe, sind von den ältesten Zeiten an der Reihe nach

so ziemlich alle irgend denkbaren Hypothesen mehr oder minder nachdrücklich ausgesprochen worden. In der neuesten Zeit, — nach spärlichen Bemerkungen der Autoren zu schliessen, — neigen sich Manche der Idee zu, dass die Spermatozoen Träger von spezifischen, durch ihre chemischen Eigenschaften befruchtend wirkenden Materien sein möchten. In einem Lehrbuch der physiologischen Chemie\*) wird aufgefordert, dass man doch den Samen sorgfältig nach Fermenten durchsuche. Hiefür ist es nun besonders wichtig, dass uns im Lachssamen wenigstens ein unmittelbar reines Material geboten wird, aus welchem uns nichts Wesentliches durch vorbereitende, isolierende Operationen entschlüpfen kann. Im reinen Lachssperma ist aber durchaus keine in Wasser lösliche Substanz nachweisbar, die mit einem der bis jetzt bekannten Fermentkörper Aehnlichkeit hätte, die durch Alkohol, Tannin oder irgend eines der gebräuchlichen Metallsalze (basisch essigs. Blei, Jodquecksilberkali etc.) fällbar wäre; überhaupt nimmt das Wasser nur geringe Spuren organischer Substanz auf. Die überwiegende Hauptmasse besteht aus einem sehr resistenten Stoffe, der als dicke, schwer durchdringliche Kapsel fast den ganzen Rest umschliesst.

Thierische und pflanzliche Gewebe, die der Sitz lebhafter Umsetzungsvorgänge sind (keimende Samen und dergl.), zeigen oft Ozonreactionen. Der Same des Lachsen und des Stieres bläut weder reine noch  $H_2O_2$ haltige Guayaktinktur, zersetzt blos schwach  $H_2O_2$ . Auch faulen beide langsamer als irgend sonstige Zellen. Vom Stiersamen beobachtete ich einmal eine diastatische Wirkung, in andern Fällen wieder nicht. Bei der allgemeinen Verbreitung solcher Diastasen hätte diess auch keine Bedeutung. Freilich dürfen wir wieder nicht zu viel Kapital schlagen

---

\*) Kühne, physiolog. Chemie, pag. 558.

aus fehlender oder vorhandener Analogie mit den bekannteren Fermentstoffen. Auch das Alkoholferment lässt sich nicht durch Wasser aus der Hefe extrahiren. Wir können doch nicht wohl voraussetzen, dass wir in den paar Verdauungssäften schon Paradigmata besitzen für alle die sonderbaren chemischen Gleichgewichtsstörungen, welche die Bestandtheile organisirter Massen auf einander ausüben mögen.

Was wäre denn aber eigentlich geholfen, wenn sich ein recht spezifisches Samenferment vorfände, das geeignet wäre, irgend eine Substanz des Eies durch chemische Verwandtschaft energisch zu verändern. Es gehört heutzutage zu den wohlerworbenen, auch für Fermente speziell geprüften Sätzen, dass chemische Anziehungen nur in unendlich kleine Entfernungen wirken. Wie soll aber dafür gesorgt werden, dass jedes Molekül des Keimprotoplasma mit einem unlöslichen Ferment in Berührung komme, wie der Zucker mit der Hefenzelle. Selbst für ein — etwa durch den Einfluss der Eisubstanz — löslich gewordenes wäre bei dem Mangel einer Saftströmung die Schwierigkeit kaum geringer. Die Befruchtung wäre im Grunde nur erklärt für einen Punkt; für den Rest des Keimes bedürften wir ungefähr eben so vieler Hilfhypothesen, als wenn wir uns das Ferment wieder aus der Rechnung wegdenken.

Sofern wir überhaupt annehmen wollten, dass eine einzelne Substanz als Ferment oder auf irgend eine andere Art, etwa als ein chemischer Reiz, die spezifische Ursache der Befruchtung sei, so müsste man ohne Zweifel vor Allem an das Nuclein denken. Nucleinkörper haben sich constant als Hauptbestandtheil gefunden. Als Hüllensubstanzen der Köpfe werden sie vor Allem den Contact mit der zu befruchtenden Masse vermitteln, während z. B. bei Fischen der anders zusammengesetzte Inhalt durch eine

dicke Kapsel wie von der Aussenwelt abgesperrt erscheint.

Nun enthält aber das Ei schon in reichlicher Menge Nucleinstoffe in den bekannten Dotterkörnern. Ein Theil derselben mag in besondere Dotterzellen eingeschlossen sein; ein anderer Theil ist sicherlich in direktem Contact mit dem Keimprotoplasma. Nichts spricht dafür, dass die Samennucleine irgend besondere Charaktere gegenüber den Eiernucleinen besässen. Beim Karpfen wird die eigenthümliche Verquellbarkeit in Wasser bei der Dotterkugeln wie bei den Samenkörpern gefunden; beim Lachs, beim Säugethier fehlt sie beiden. Wie soll nun das Hinzutreten von einem Minimum einer Substanz, die in reichlicher Menge bereits vorhanden ist, so entscheidend in den ganzen Haushalt des Eies eingreifen? Und dasselbe gilt vom Lecithin, Eiweiss, Cholesterin; sie alle finden sich im Ei. Das Protamin hinwiederum besitzt so gar kein Analogon bei den übrigen untersuchten Thiersamen, dass in ihm unmöglich das entscheidende Agens gesucht werden kann.

In der That, nicht in einer bestimmten Substanz kann das Räthsel der Befruchtung verborgen liegen; das lässt sich schon jetzt mit grosser Wahrscheinlichkeit behaupten. Nicht ein Theil, sondern das Ganze als solches ist wirksam, durch das Zusammenwirken aller seiner Theile. Die constante Zusammensetzung des Lachssamens zeigt ja, wie genau das Verhältniss der einzelnen Theile innegehalten wird.

Deutlicher noch als alle chemischen Analysen sprechen freilich die Wirkungen der Zeugungsgesetze, die sich uns alltäglich in der Vererbung väterlicher Eigenschaften auf die Frucht kund geben.

Wenn wir uns den Samen nur als Träger eines spezifischen Befruchtungsstoffes denken, wie erklären wir dann die Abänderungen, die Variationen der Wirkung,

von Spezies zu Spezies, von Race zu Race, von Individuum zu Individuum? Wir hätten etwa die variable Menge der Substanz zur Verfügung. Unterschiede im chemischen Bau der Moleküle werden vorkommen, aber nur in begrenzter Mannigfaltigkeit. Man könnte sich die gesammten, im Ei gegebenen Bedingungen, die auf die Entwicklung von Einfluss sind, in eine grosse Formel zusammengefasst denken, durch deren Diskussion nach veränderten Werthen von  $t$  sich der Zustand der Frucht, die Lage und die Wachstumsgeschwindigkeit aller Theile für jeden Zeitpunkt ergäbe. In einer solchen Formel würde durch den Einfluss eines Befruchtungsstoffes bloß einer oder zwei Coefficienten variabel gemacht. Abgesehen von dem entscheidenden Anstoss zum Eintritt der Entwicklungsbewegung überhaupt, würde der männliche Einfluss sich auf die Schwächung oder Verstärkung weniger einzelner Eigenschaften des Keimes beschränken. So würde, mit Ausnahme gewisser Modifikationen, die immer wieder in ähnlicher Weise wiederkehren, der ganze Reichthum individueller Prägung als Erbtheil von der Mutter auf die Frucht übergehen.

Statt dessen sehen wir fast völlige Gleichberechtigung zwischen dem Samen und dem Ei. Es vererben sich auf die Frucht die allerverschiedensten Eigenthümlichkeiten vom Vater wie von der Mutter, bald mehr vom Einen, bald vom Andern, in unendlicher Mannigfaltigkeit und zahllosen Abstufungen. Weder die Ethnographen noch die Thierzüchter haben bis jetzt vermocht, über diese Vererbungsverhältnisse Regeln von irgend allgemeinerer Tragweite aufzustellen. \*)

---

\*) Nur so viel weiss man, dass die Variationen des Zeugungsmaterials eine gewisse Grenze nicht überschreiten dürfen, dass es eine Anpassung des Samens an das Ei gibt, welche bald mit grösserer, bald mit geringerer Strenge als Bedingung für die vollgültige

Alle diese Erfahrungen erfordern für den Menschen und die höheren Thiere durchaus, dass die Wirkung des Samens eine verwickelte sei, dass sie auf einer grösseren Zahl nahezu gleichwichtiger Faktoren beruhe, und dass die Variationen eines jeden dieser Faktoren in eigenthümlicher Weise den Gang der Entwicklung beeinflussen.

Eine Reihe von Gründen sprechen nun ferner überhaupt dagegen, dass chemische Thatsachen als solche, chemische Verwandtschaftskräfte das Entscheidende sind. Tiefgreifende Unterschiede im chemischen Bau kommen bei benachbarten Thierfamilien vor, so das Auftreten des Protamins beim Lachs und das Fehlen desselben beim Karpfen. Alle für das Sperma im Allgemeinen charakteristischen Stoffe kommen auch im Ei vor, aber nirgends in der besondern räumlichen Anordnung, wie im Sperma. Daneben hat sich, als das Gemeinsame in der chemischen Mannigfaltigkeit, eine complizirte Struktur der Samenkörper gezeigt, welche, wenn nicht aller Anschein trügt, ein für den Samen überhaupt typisches Prinzip der innern Anordnung verräth.

So werden wir von allen Seiten genöthigt, es mit Bestimmtheit auszusprechen: Es gibt keine spezifischen

---

Wechselwirkung zusammengehöriger, als Hinderniss für die Wechselwirkung unzusammengehöriger Geschlechtsprodukte mitspielt. In dieser Anpassung liegt ja das Geheimniss der Continuität der organischen Formen verborgen. Je schärfer sie zugespitzt ist, um so strenger wird Gleiches nur Gleiches erzeugen; je mehr Spielraum sie lässt, um so grösser die Variabilität. Vergl. z. B. die von Siebold zuerst erwähnte, von His genauer festgestellte exacte Uebereinstimmung in der Grösse der Mikropyle und der Samenkörper bei Salmoniden. So werden gewiss manche spezielle Details in dem so mannigfaltigen Baue der Samen und Eier gerade von diesem Gesichtspunkt aus ihre Deutung erhalten, während andere, mehr allgemein durchgreifende Züge sich auf die Grundbedingungen des Zeugungsvorganges beziehen werden.

Befruchtungssstoffe. Die chemischen Thatsachen haben sekundäre Bedeutung; sie sind einem höhern Gesichtspunkt untergeordnet.

Suchen wir nach einem Vergleiche, in welchen sich alle vorhandenen Erfahrungen fügen, so bleibt, wie mir scheint, nichts übrig, als das Bild eines Apparates, der eine Bewegung irgend einer Art erzeugt oder umwandelt. Ein zusammengesetztes Ganzes, nicht durch irgend ein Einzelnes, sondern durch seine Zusammensetzung wirksam. Die erzeugte Bewegung ist zahlloser Abänderungen fähig, in den feinsten Abstufungen und grosser Mannigfaltigkeit, je nach Substanz, Form, Grösse, gegenseitiger Lage der Theile.

In der That, die Auffassung der Befruchtung als eines physikalischen Bewegungsvorganges ist die einzige, welche nicht mit feststehenden Thatsachen in Widerspruch sich befindet. Es kann eine Bewegung innerhalb des Samens sein, die auf das Ei übertragen wird. Oder die Bewegung entsteht erst durch den Contact von Samen und Ei.

Welcher Natur dieser Bewegungsvorgang sein mag, darüber sind einstweilen nur Muthmassungen möglich. Man könnte an die Locomotion der Samenfäden denken, als an eine Art mechanischen Reizes. Aber noch näher wird es liegen, sich der molekularen Vorgänge bei der Nervenerregung zu erinnern; warum sollten auch solche fundamentale Eigenschaften organisirter Substanzen ein Privilegium des Nervensystems sein, das doch schliesslich mit allen andern Organen aus der Masse der Furchungskugeln entsprungen ist? Nirgends als auf diesem Gebiete kennen wir so grosse Wirkungen, eingeleitet durch Anstösse von so unmessbar kleinem Betrag an lebendiger Kraft. Wie der Muskel bei der Erregung seines Nerven, so wird auch das Ei bei der ihm adäquaten Erregung chemisch und physikalisch ein ganz anderes Ding; die Moleküle, nach-

dem sie von den Richtkräften des Samens erreicht worden, streben nicht nur nach einem neuen physikalischen Gleichgewicht, sondern sie wirken auch chemisch auf einander. Wie der Stoffwechsel des gereizten Muskels sich steigert und seine Richtung ändert, so beginnen auch im Ei Athmungsvorgänge und stoffliche Metamorphosen, wie sie für die wachsende Zelle bezeichnend sind. \*) Nur ein fundamentaler Unterschied besteht. Das neue Gleichgewicht überdauert im Muskel nur wenig den Reiz. Im Ei ist es der Ausgangspunkt einer unabsehbaren Kette von Vorgängen.

Die beiden besprochenen Möglichkeiten über das Wesen des Befruchtungsvorganges schliessen sich nun aber keineswegs aus. Es könnte z. B. der spezifische Reiz molekularer Natur sein, dagegen die Eigenthümlichkeiten der Locomotionsbewegung von Einfluss sein auf den Ort, wo der Reiz auf den Keim wirkt, auf die relativen und absoluten Zeiten, während welcher Contact mit verschiedenen Punkten des Keimes stattfindet, und dadurch, etwa im Sinne von W. His, auf die Vertheilung der Wachstumsintensitäten über die Keimscheibe, — anderer Möglichkeiten nicht zu gedenken.

Auffallende chemische Befunde, so das Auftreten des Protamins, lassen sich ohne Zwang unter die übrigen That-sachen einfügen, wenn man sich vorstellt, dass dadurch irgend welche physikalischen Constanten geändert werden, welche auf das Ganze der befruchtenden Bewegung von Einfluss sind. Beim Protamin z. B. liegt es nahe an die Dichtigkeit zu denken. So würden sich solche Vorkomm-

---

\*) Sehr hübsch lässt sich der Effect der Befruchtung an und für sich bei Fischeiern demonstrieren, wo unbefruchtete Eier neben den entwickelten mehrere Monate lang ganz unverändert bleiben, und kaum irgend merklich an Gewicht verlieren.

nisse in eine Reihe stellen mit Eigenthümlichkeiten der Form, Grösse etc., welche der typischen Anpassung an die Eier derselben Thierspezies zuzurechnen sind.

## 7. Die morphologische Frage.

Das reichliche Beobachtungsmaterial, welches sich über die Formverhältnisse der Samenfäden angehäuft hat, ist bis jetzt weniger zur Aufhellung ihrer physiologischen Funktion verwerthet worden, als zur Aufsuchung von Anknüpfungspunkten, um diese sonderbaren Gebilde in das System der übrigen Gewebelemente einreihen zu können. Aus verschiedenen Gründen ist die Mehrzahl der Histologen vorläufig dabei stehen geblieben, die Spermatozoen als Flimmerzellen mit überwiegendem Kern, dem Kopf — mit auffallend reduzierten Protoplasma, dem Mittelstück, — und mit ungewöhnlich entwickeltem Flagellum zu betrachten. Ueber die beiden letzteren Bestandtheile ist schon oben das Nöthige bemerkt worden; die Frage nach der Deutung des Spermatozoenkopfes als Kern bedarf noch einiger Erläuterung.

Zunächst wird es sich also darum handeln, ob wirklich, wie die Entwicklungsverhältnisse vermuthen lassen, die Köpfe der Samenkörper aus dem chemischen Material von Zellkernen, aus den für Kerne charakteristischen Stoffen aufgebaut sind.

Im Nachfolgenden sind einige vergleichende Versuche mitgetheilt, welche an Eiterkörperchen aus rasch gebildeten Abscessen, also an einfachen, dem entwicklungsfähigen Stadium angehörigen Zellen angestellt wurden, zur Ergänzung von solchen, welche bei einem früheren Anlass mitgetheilt worden sind.\*)

---

\*) Hoppe-Seyler, Medizinisch-chemische Untersuchungen pag. 441.

- I. 0,5163 gr. durch Pepsin aus den isolirten und entfetteten Eiterzellen \*) sehr rein dargestellte Kerne gaben 0,0735 gr.  $\text{SO}_4\text{Ba}$  und 0,0550  $\text{P}_2\text{O}_7\text{Mg}_2$ , = 1,95% S und 2,97% P.
- II. 0,4278 gr. von einem andern Eiter gaben 0,0415  $\text{P}_2\text{O}_7\text{Mg}_2$ , = 2,71% P.

Aus diesen und andern Eiterkernen wurde mehrmals die Reindarstellung des Nucleins versucht, nach der beim Stiersamen beschriebenen Methode. Die Lösungen in warmer Natronlauge waren gelblich, schwach opalescierend, nicht völlig klar filtrirbar. Das Nuclein wurde durch Salzsäure als farbloser, flockig krümliger Niederschlag gefällt ohne Alkoholzusatz und liess sich mit reinem Wasser waschen, wobei nur Spuren in Lösung gingen. Zur Reinigung wurde es nochmals in Natron gelöst und gefällt. Die frisch gefällte Substanz war leicht löslich in caustischem, kohlensaurem und phosphorsaurem Natron, sowie in Ammon; beim Stehen wurde sie schwerer löslich. Lösungen in möglichst wenig caustischem Natron reagirten neutral, was auf saure Eigenschaft hindeutet. Chlorbaryum, Chlorcalcium, Magnesiamixtur gaben in der ammoniakalischen Lösung ohne Alkoholzusatz flockige Niederschläge, doch nicht so vollständige Ausfällung, wie sie durch Säuren zu erhalten war. Kupfer- und Zinksalze gaben Fällungen, die in Ammon löslich waren, Protaminsalze einen dichten amorphen, in Ammon unlöslichen Niederschlag. Auf Erwärmen mit Salpetersäure trat Gelbfärbung, auf Ammonzusatz alsdann Orangefärbung auf. Millons Reagens färbte deutlich, aber ziemlich schwach roth. Natron und Kupfervitriol gaben beim Kochen purpurviolette Färbung. Der Körper enthielt unoxydirten Schwefel; die Lösung in kochender concentrirter Soda schwärzte intensiv metallisches Silber.

\*) Das nöthige Material wurde mir von den Herren Prof. Socin, Prof. Bischoff und Dr. Hugelshofer freundlichst zur Verfügung gestellt.

- I. gr. 0,4325 Nuclein, mit Soda und Salpeter verbrannt, gaben 0,0672  $\text{SO}_4\text{Ba}$ , = 2,13% S und 0,0562  $\text{P}_2\text{O}_7\text{Mg}_2$  = 3,63% P.
- II. gr. 0,3620 Nuclein von einer andern Darstellung gaben 0,0495  $\text{SO}_4\text{Ba}$ , = 1,85% S, und 0,0485  $\text{P}_2\text{O}_7\text{Mg}_2$  = 3,73% P. Dabei wurde nachgewiesen, dass bei der Behandlung mit Natronlauge kaum Spuren von phosphorhaltigen Zersetzungsprodukten entstanden waren.

Neben dem Nuclein war aus den Eiterkernen noch wie beim Sperma eine eiweissartige Substanz zu erhalten, welche mit Ferrocyankalium flockig sich trübte und aus dem sauren Filtrat vom Nucleinniederschlag durch Neutralisation gefällt wurde, intensive Millon'sche Reaction gab, Schwefel und wenig (1,9%) Phosphor enthielt. Ihre Menge war reichlich bei kürzerer Verdauung, so dass die Kerne, wenn auch sehr rein und nackt, noch ihren hellen Inhalt besaßen; sie war gering oder fast null, wenn die Pepsinwirkung fast nur noch die geschrumpften und gefalteten Hüllen der Kerne übrig gelassen hatte; demnach gehört dieses Albuminat wohl unzweifelhaft dem Kerninhalt an. \*)

Es hatte sich also zwischen Samen und Kernen in zwei Punkten Uebereinstimmung ergeben. Den Hauptunterschied bildete noch der Schwefelgehalt des Nucleins. Derselbe konnte nicht wohl auf Verunreinigung bezogen werden; denn besondere Versuche zeigten, dass die Verbindungen mit Kupfer, Kalk und Zink kaum minder reich an Schwefel waren. Nucleinkupfer gab, auf die organische Substanz berechnet, 2,38% S, Nucleinkalk direkt 1,55% S.

---

\*) Eine früher ausgesprochene Vermuthung, wonach aus dem Nuclein durch Alkalien und Säuren Albuminat entstehen kann, halte ich nicht mehr aufrecht. Das Eiweiss wird eben langsamer völlig zersetzt als das Nuclein und scheint daher aus diesem entstanden. Die damaligen Beobachtungen an sich bestätigen durchaus die eben mitgetheilten.

Indess sind doch die Schwefelgehalte nicht so sehr constant. Nach dem Schwefelgehalt der ganzen Kerne würde man neben Eiweiss einen noch grösseren Schwefelgehalt des Nucleins vermuthet haben; ein Theil der schwefelhaltigen Substanz scheint sich doch bei der Darstellung zersetzt zu haben.

Am wahrscheinlichsten, auf Grund dieser Befunde, erscheint mir die Annahme, dass es allerdings ein schwefelhaltiges Nuclein gibt, welches durch Alkalien in der Wärme gespalten wird in schwefelfreies Nuclein und eine unoxydirten Schwefel enthaltende Verbindung. Diese Verbindung ist nicht Eiweiss; dafür ist der Schwefelgehalt zu hoch; eher könnte man an eine Atomgruppe denken, wie sie beim Aufbau der Keratinsubstanzen sich mit betheiliget. Die Abspaltung geschieht leicht beim Stiersamen, schwieriger bei den Eiterkernen. Höchst wahrscheinlich kommen beide Nucleine gleichzeitig in den Kernen vor. Dies ist als gewiss anzusehen für die Dotterkörner des Hühneries. Hier zeigte der Verdauungsrückstand einen Schwefelgehalt von 0,45%. Bei der Darstellung des Nucleins waren kaum Spuren von Eiweiss als Acidalbumin in den Filtraten zu finden und es wurde (durch mehrmaliges Lösen mit möglichst wenig kaltem Natron) ein Nuclein von 0,25% Schwefel erhalten, welches, abgesehen vom viel höheren P-gehalt, alle Reactionen des Eiternucleins zeigte. Auch hier erwiesen sich die Verbindungen nicht als völlig schwefelfrei. Ich möchle vorschlagen, das schwefelhaltige Präparat als Sulfonuclein von dem Nuclein zu unterscheiden.

Die Schwierigkeit, beide Stoffe von einander zu trennen, beruht darin, dass die Anwesenheit der schwefelhaltigen Substanz am ganzen Habitus des Nuclein, Löslichkeit, Verhalten zu Metallsalzen etc. nichts wesentliches ändert. Nur die Millon'sche Rothfärbung und die Violett-färbung mit Natron und Kupfersalz könnte man darauf

beziehen, obschon dazu geringe Eiweissbeimengungen auch genügen würden.

Der Gedanke liegt nahe, dass im Baue der Kerngebilde das Sulfonuclein gegenüber dem Nuclein seine besondere Bedeutung hat. Wenn man die Struktur der bis jetzt untersuchten Objekte betrachtet, so sind die Schwefelgehalte um so kleiner, je mehr die Hülle an Masse alles Andere überwiegt. Es verdient daher für spätere Versuche die Frage Beachtung, ob nicht das Sulfonuclein den Gebilden des Inhalts (Nucleolus, Körnchenkreis etc.) zugehöre.

Es fragt sich nun ferner noch, ob man berechtigt ist, die schwefelfreien Nucleine von verschiedener Herkunft als identisch anzusehen. Dabei sind solche Eigenschaften ausser Spiel zu lassen, welche von kleinen Verunreinigungen herrühren können, wie z. B. die Millon'sche Reaction. Aber auch die Verschiedenheiten der Phosphorgehalte sind, wegen der Gefahr der Zersetzung, nur mit grösster Vorsicht zu verwerthen, streng genommen nur da, wo die Abwesenheit phosphorhaltiger Zersetzungsprodukte in der Verdauungsflüssigkeit und den sonstigen Filtraten ausdrücklich erwiesen wird.\*) Indessen ist es doch höchst wahrscheinlich, dass das Eiternuclein phosphorärmer ist, als die übrigen, da man bei derselben Behandlung aus Eiern und Samen höhere Phosphorgehalte bekommt; vielleicht ist die Anwesenheit der schwefelhaltigen Substanz die Ursache hievon.

Trotzdem bleiben noch Unterschiede übrig, welche sich nur schwierig anders als durch die Annahme verschie-

---

\*) J. Worm Müller ist durch die Zersetzlichkeit des Nucleins, die er nicht beachtete, zu irrthümlichen Annahmen veranlasst worden. (Pflügers Arch. VIII. 190.) Bei der Anwendung des Pepsins ist es rathsam, die bei feinster Zertheilung gerade eben nöthige Verdauungszeit sorgfältig auszuprobieren.

dener schwefelfreier Nucleine erklären lassen. Der um 3% höhere N-Gehalt des Körpers aus Stiersamen lässt sich zur Noth noch mit Hülfe der Annahme unterbringen, dass bei der Darstellung  $\frac{1}{4}$  des ursprünglichen Phosphorgehaltes in Form eines stickstofffreien Körpers sich abgespalten habe, — wie denn erfahrungsgemäss bei solcher Spaltung immer ein viel N-reicherer Rest zurückbleibt. Dagegen ist dieses Nuclein und seine Barytverbindung unlöslich in Wasser und lässt sich ohne Alkoholzusatz ausfällen, im Gegensatz zu dem löslichen Lachsnuclein. Die vorhandenen Thatsachen erlauben noch nicht, in dieser Angelegenheit endgiltig zu entscheiden.

In Bezug auf die Deutung der Spermatozoenköpfe steht nun also soviel fest, dass in allen Hauptzügen ihre Zusammensetzung sich auf das Material von Zellkernen zurückführen lässt. Damit ist aber die morphologische Frage erst halb gelöst. Die Kerne der Bildungszellen haben bei dieser Umwandlung in die Köpfe der Samenkörper eigenthümliche Metamorphosen erleiden müssen, so dass sie in Gestalt und äusserem Ansehen schliesslich oft weit von gewöhnlichen Zellkernen abweichen. Vom höchsten Interesse wäre es nun, zu wissen, ob durch alle diese Abweichungen hindurch das wichtigste Grundprinzip der Kernstruktur sich verfolgen lässt, irgend eine gesetzmässige räumliche Anordnung gewisser typischer Bestandtheile, durch deren Zusammenwirken der Kern zu einem so wichtigen Organ des Elementarorganismus wird. Denn da bei niederen Thieren (Myriapoden, Arachniden nach Kölliker) Samen ohne beweglichen Anhang, blos in Form umgewandelter Kerne auftreten kann, so ist offenbar der Kopf der Samenzelle der entscheidende Hauptbestandtheil.

Diese Frage lässt sich zur Zeit nicht beantworten, aus dem einfachen Grunde, weil die Histologie gar kein durchgreifendes Prinzip der Kernstruktur kennt. Der Kern

ist meist ein Bläschen (Kölliker) oder besitzt wenigstens eine deutliche Membran; zuweilen ist er membranlos, homogen (Stricker); im letzteren Falle ist er bald mehr solid, bald gallertig, vielleicht selbst zähflüssig, vacuolenähnlich (Furchungskugeln nach Remak und Reichert), je nach Lokalität und Entwicklungsstadium. Zu den wichtigsten Bestandtheilen des Kerns gehören die Kernkörperchen; ihre Zahl variirt von 0—16 und darüber (Auerbach). Dann werden wieder, namentlich im Bereich des Nervensystems, Kerne beschrieben von complizirterem Bau, etwa mit austretenden, freilich viel bestrittenen, Kernkörperchenfäden, und gerade hier wird der Vergleich mit der Struktur der Samenkörper besonders nahe gelegt.

Solche und andere Verhältnisse haben dem neuesten Beobachter über die Struktur der Kerne, Auerbach,\*) das für einen Histologen bemerkenswerthe Geständniss abge- nöthigt, dass „das einheitliche Prinzip der Erscheinungen oft tiefer liege als im Niveau des Morphologischen.“

In der That wird man eingestehen müssen, dass das Hauptkriterium für die Erkennung eines Formelementes als Kern bis jetzt nicht seine Beschaffenheit war, sondern der Ort, wo es sich findet; jedes beliebige rundliche Gebilde im Protoplasma einer Zelle, das nicht ein Fetttropfen, ein Kristall, ein Chlorophyll-, Stärke- oder Glycogenkorn, oder eine unzweifelhafte Vacuole ist, wird sofort, wenn es sonst an einem Kerne mangelt, der Kernnatur verdächtig, und man lässt sich auch nicht zu sehr irre machen, wenn das optische Verhalten etwas vom gewöhnlichen Schema abweicht. Dagegen fehlen alle Anhaltspunkte, sobald Gebilde von etwas auffallendem Aussehen an Orten vorkommen, wo man nicht geneigt ist, Kerne zu vermuthen. Die äusserlichen Analogien, welche, von einem Objekt auf

\*) Auerbach, organologische Studien. Breslau 1874. I, pag. 5.

andere übertragen, in so vielen Fällen richtig leiten, lassen hier im Stich. So ist es z. B. ein blosser Wortstreit, für oder gegen die Kernnatur der Dotterkörner auf Grund ihres optischen Verhaltens, ohne Herbeiziehung anderweitiger Thatsachen, irgend Etwas aussagen zu wollen.

Es ist daher an der Zeit, den Begriff des Zellkerns endlich einmal von diesen schwankenden Aeusserlichkeiten loszulösen und ihn an solche Eigenschaften zu knüpfen, welche in einem nahen innern Zusammenhang mit seiner allgemeinen physiologischen Funktion stehen müssen. Dahin gehört namentlich seine chemische Zusammensetzung. Wenn nicht aller Anschein trügt, so spielen hier Nucleinkörper eine Hauptrolle, vermöge ihrer Fähigkeit, im freien Zustande und als Verbindungen in Form plastischer, wasserhaltiger, quellungsfähiger Gebilde vom Protoplasma sich abzugrenzen. Auch gelöst, an Alkalien gebunden können Nucleinstoffe vorkommen; dann ist die Möglichkeit offen, dass sie im Protoplasma vertheilt sind; vielleicht ist diess gerade der Vorläufer mancher Kernneubildungen. Aus einem unreifen Lachshoden, welcher sich gerade auf dem Höhestadium der massenhaften Wucherung vielkerniger Zellen befand, erhielt ich nach dem Entfetten mit heissem Alkohol ein neutral reagierendes Wasserextract, aus welchem durch blosses Ansäuern mit  $\text{CH}_3\text{N}$  Nuclein in sehr reinem Zustande in beträchtlicher Menge gefällt wurde; offenbar war es an Alkalien gebunden, da organische Basen im Wasserextract fehlten.

Bei der Aufsuchung des Nucleins in den Geweben wird man die gewöhnlichen histochemischen Reactionen, Verhalten gegen Lösungsmittel etc. nicht als letzte Instanz anrufen dürfen. Die Vergleichung des so resistenten Stiersamens mit dem im Wasser verquellenden Karpfensperma zeigt, dass tiefgreifende Verwandtschaft der chemischen Struktur mit den grössten Unterschieden im äusseren

Verhalten Hand in Hand gehen kann. Vielmehr wird man, wo es irgend angeht, sich den Rücken durch Elementaranalysen decken müssen.

Von hier aus werden wir auch den mannigfaltigen Erscheinungsweisen der Kerngebilde nachgehen können, ohne den verbindenden Faden zu verlieren. An dem wesentlichen Grundstock des Materials wird man den Kern auch unter den verschiedensten Formen erkennen, im entwicklungsfähigen und im ruhenden vegetativen Stadium, in unfertiger Gestalt und im Zustand regressiver Metamorphose, in der Reduction und wiederum in der complizirteren Ausbildung für höhere Leistungen.

So z. B. enthalten die Dotterkörner des Hühnereies überwiegend Nuclein und daneben etwas Sulfonuclein; aber es fehlt fast gänzlich die eiweissartige Substanz, welche, vielleicht gleichfalls mit Nuclein verbunden, den Inhalt der Spermatozoen und der Eiterkerne ausmacht. Denn da die Zertheilung gar nicht sehr fein war, so hätte doch wenigstens, wie bei den genannten Objekten, etwas Eiweiss durch die Nucleinhüllen vor der raschen Verdauung geschützt werden müssen. Die Dotterkörner sind daher zu betrachten als reduzierte Kerne, für welche die Möglichkeit nicht a priori zu läugnen ist, dass sie auf irgend einen gegebenen Anstoss hin durch Intussusception von Eiweiss sich wieder vervollständigen können. Für die Auffassung des Eies ist diess nicht ohne Interesse. Wie sehr man auch sich Mühe gegeben hat, alle wesentlichen Elemente der Zellenstruktur, entweder im Werthe einer einzigen, oder vieler Zellen, im Ei wiederzuerkennen, — etwas muss doch fehlen, was zur Ausrüstung einer vollgiltigen lebenden Zelle gehört; es muss irgend einen Grund haben, wesshalb bei den höheren Thieren eine unzweifelhaft protoplasmatische Masse in einen trägen Ruhezustand verfällt, aus

welchem sie erst durch den Samen wieder erweckt wird.\*)

So sind der Gesichtspunkte mancherlei, welche zu möglichst ausgedehnten vergleichenden Forschungen über Kerngebilde und Samenkörper einladen. Sollte es gelingen, den strengen Nachweis zu führen, dass der Zutritt des Samens zum Ei der Hauptsache nach gleichwerthig ist mit dem Hinzutreten eines physiologisch vollgiltigen Zellkerns zur Masse des Eies, so würde das Räthsel der Befruchtung in wunderbarer Weise verschmelzen mit dem allgemeinen elementaren Problem des Zellenlebens; wir hätten in ihr ein unnachahmliches natürliches Experiment, das uns einen tiefen Einblick in die Rolle des Kerns überhaupt gestattete, und die Untersuchung des Samens hätte eine über die Frage der Zeugung weit hinausreichende Bedeutung; denn hier bietet uns die Natur in einer für die Zerlegung zugänglichen Form eine jener einfachen fundamentalen activen Anordnungen dar, welche im Stande sind, Spannkkräfte in die spezifische Form vitaler Bewegungsvorgänge umzusetzen.

Basel. Februar 1874.

P. S. Während der Revision der Correcturbogen wurde mir die neue Untersuchung von Th. Eimer\*\*) über die Samentäden mitgetheilt. Eimer's Ergebnisse stehen mit den meinigen durchaus nicht im Widerspruch, ergänzen dieselben vielmehr in erfreulicher Weise. Geleitet durch ein sehr günstiges Object, den Fledermaussamen, hat er den von mir nur vermutheten Centrfaden des Schwanzes

---

\*) Nach einer interessanten, von Dr. Lindgren im hiesigen Institut gemachten, Beobachtung ist das Keimbläschen des Säugethiereies (Rind, Schaf, Schwein) im Gegensatz zu den Kernen des Keimepithels, in  $\text{ClH } \frac{1}{1000}$  löslich.

\*\*) Eimer, über den Bau und die Bewegungen der Samentäden. Würzburg 1874.

wirklich nachweisen können. Seine Beobachtungen über die streng typische gesetzmässige Bewegungsweise der Spermatozoen stimmen gut überein mit den von mir aus ganz andern Grundlagen entwickelten Betrachtungen über das Wesen des Befruchtungsvorgangs.

### Erklärung der Tafel.

- Fig. I. a. Samenfaden vom Lachs, frisch in Jodserum bei hoher Fokalstellung.  
b. Ebendasselbe im optischen Querschnitt, Cyaninbehandlung.
- Fig. II. Samenfäden vom Lachs, mit Goldchlorid behandelt; Schwanzfaden weggelassen.  
a. von der Seite,  
b. von der breiten Fläche,  
c. im optischen Querschnitt.  
Sämtlich bei mittlerer Einstellung, so dass die stark lichtbrechende Hülle dunkel, Binnenraum und Mikroporus hell erscheinen.
- Fig. III. Samenfaden vom Karpfen, mit Goldchlorid behandelt: der helle Innenraum erscheint dabei gelb.
- Fig. IV. Kopf eines Samenfadens vom Stier mit Hüllencour, Mikroporus, queren Schatten und plattem centralem Körper. Nur selten sind an einem und demselben Objekte alle diese Details gleichzeitig deutlich.  
(Fig. I—III sind bei Hartnack im. 10 Ocul 4, Fig. IV bei Obj. 8. Ocul IV gezeichnet).
- Fig. V. Kristalle des salzsauren Protamin. Zwei Individuen liegen genau horizontal, so dass bei der mikroskopischen Beobachtung die basischen Flächen verschwinden.

Fig. I.

a b



Fig. II.

a b c



Fig. III



Fig. IV



Fig. V.

