

- Fig. 14. Ohrknorpel vom ausgewachsenen Kaninchen. Degenerative Entzündung. Obj. D, Oc. 2.
- Fig. 15. Ohrknorpel vom ausgewachsenen Kaninchen. Sehr langsame Entzündung: a. degenerierte Zone; b. neugebildete Knoten. Obj. A, Oc. 2.
- Fig. 16. Einige Zellen von der peripherischen Portion der Zone b des vorgenannten Präparates. Obj. $\frac{1}{2}$, Oc. 2.
- Fig. 17. Knorpel-Fettropfen vom 75 Jahre alten Menschen. Obj. $\frac{1}{2}$, Oc. 2.
- Fig. 18. Fettropfen aus dem Ohrknorpel vom ausgewachsenen Kaninchen, seit 15 Tagen in physiologischer Kochsalz-Lösung bei 37°C . Obj. $\frac{1}{2}$, Oc. 2.

IX.

Eine Notiz über Trockenpräparate von Spermatozoen

von

Prof. E. Neumann
in Königsberg.

In einem Aufsatz: „Untersuchungen über die Entwicklung der Spermatozoiden“, Archiv f. mikr. Anat., Bd. XI, 1875, habe ich gezeigt, dass bei den reifen Samenfäden der *Rana temporanea* der Kopf, an dem man früher eine Differenzirung seiner Substanz nicht bemerkte, aus zwei Stücken von verschiedener Beschaffenheit zusammengesetzt ist, einem etwas dickeren, cylindrischen Hauptkörper und einem fein zugespitzten, zuweilen hakenförmig gekrümmten, vorderen Endstück; letzteres wird gegenwärtig gewöhnlich als *Retzius'scher Spiess*¹⁾ bezeichnet und ist als ein unter verschiedenen Modificationen bei zahlreichen Thiergattungen auftretendes Attribut der Spermatozoen bekannt geworden. Zur Darstellung dieses Structur-Verhältnisses erwies sich mir damals eine durch Mischung einer Sol. Extr. Campechiani mit Alaun hergestellte Hämatoxylin-Lösung nützlich, bei Anwendung derselben trat das Hauptstück des Kopfes nicht nur durch Annahme einer blauen Färbung in deutlichen Gegensatz zu dem farblos bleibenden Spitzenteile und Schwanz, sondern zeichnete sich auch vor diesen Abschnitten dadurch aus, dass es sich stark verbreiterte (bis zu 0,002 bis 0,003 mm), unter Verlust seines normalen Glanzes blasse Contouren annahm und aus der gestreckten Form in eine geschlängelte überging, indem es zahlreiche wellenförmige Biegungen und Knickungen zeigte, Veränderungen, an denen die beiden Endstücke, vordere Spitze und Schwanz nicht teilnahmen.

Es ist mir zur Zeit nicht mehr möglich, genau die Bedingungen anzugeben, unter welchen mir diese durch eine Abbildung illustrierte Beobachtung gelang, doch möchte ich nach dem negativen Ausfall einiger, neuerdings gemachten Versuche, dieselbe in gleicher Weise zu wiederholen, ver-

¹⁾ *Retzius*, Biologische Untersuchungen, 1881.

muthen, dass die am meisten interessirende Erscheinung, die starke Aufquellung des Kopfes, excl. Spiess, weniger von der benutzten Hämatoxylin-Lösung, als von einer zur Verdünnung des Sperma dienenden anderen Zusatz-Flüssigkeit abhängig war. Seitdem fand ich jedoch ein anderes Verfahren, durch welches man in einfachster Weise mit grosser Sicherheit denselben Erfolg erzielt:

Man mischt auf dem Objectglase ein dem Hoden oder dem (im Frühjahr) gefüllten Receptaculum seminis entnommenes Tröpfchen Sperma mit einer dünnen (physiologischen) Kochsalz-Lösung, stellt sich von dieser Mischung ein Trockenpräparat, am besten durch Abschleudern des Flüssigkeits-Tropfens und Schwenken in der Luft, her und lässt sodann unter ein trocken aufgelegtes Deckglas ein wenig Methylviolet-Lösung (etwa 1 pCt. oder auch schwächer) vom Rande aus eindringen. Innerhalb einer oder weniger Minuten kann auf diese Weise ein Präparat gewonnen werden, welches die erwähnte, dreifache Gliederung des Samenfadens aufs Deutlichste zeigt, freilich in verschiedenen Abstufungen; die besten Bilder pflegen die am Rande der zurückgebliebenen Flüssigkeits-Schicht gelegenen, am stärksten eingetrockneten Fäden zu liefern. Der eigentliche Kopf erscheint als ein violettgefärbter, gequollener, mehr oder weniger zahlreiche, meistens dicht zusammengeschobene Windungen bildender Strang mit wenig markirten Umrissen; an ihn heftet sich einerseits der zarte, etwas glänzende, gerade oder kommaartige Spiess, andererseits der lineare, ebenfalls etwas glänzende Schwanzfaden. Abweichend von meiner früheren Beschreibung sah ich jedoch bei dieser Untersuchungs-Methode auch die letzteren Theile sich färben. Was die erwähnte, spiraling gewundene oder wellig geschlangelte Form des gequollene Kopfes betrifft, so konnte ich mich überzeugen, dass dieselbe nicht, wie meine ursprüngliche Annahme war, auf einem einfachen „Zusammenschnurren mit entsprechender Verkürzung“ beruht, sondern vielmehr davon herrübrt, dass gleichzeitig mit der Dickenzunahme auch eine starke Ausdehnung des Kopfes in seiner Längsachse stattfindet, welche ihn zwingt, sich zwischen den beiden durch das Eintrocknen auf dem Glase fixirten Endstücken (Spiess und Schwanz) zusammen zu schieben.

Bemerkenswerth ist ferner, dass an der Verbindungsstelle zwischen dem Kopfe und dem Schwanzfaden letzterer zu einem kleinen, in den Kopf hineinragenden oder von seiner gequollenen Substanz ganz umflossenen Knöpfchen anschwillt, so dass dadurch eine Aehnlichkeit des Schwanzes mit einer Stecknadel entsteht (Fig. 1). Es dürfte, namentlich bei einem Vergleich mit den gleich zu beschreibenden Bildern von Salamander-Spermatozoen, zweifellos sein, dass dieses Knöpfchen als ein dem sogen. Mittelstück (Schweigger-Seidel¹) anderer Samenfäden gleichwerthiges Gebilde zu betrachten ist, wonach man bekanntlich bei den reifen Samenfäden des braunen Grasfrosches in ihrem natürlichen Zustande vergeblich sucht.²)

¹⁾ Schweigger-Seidel, Ueber die Samenkörperchen und ihre Entwicklung. Arch. f. mikr. Anat., I., 1865.

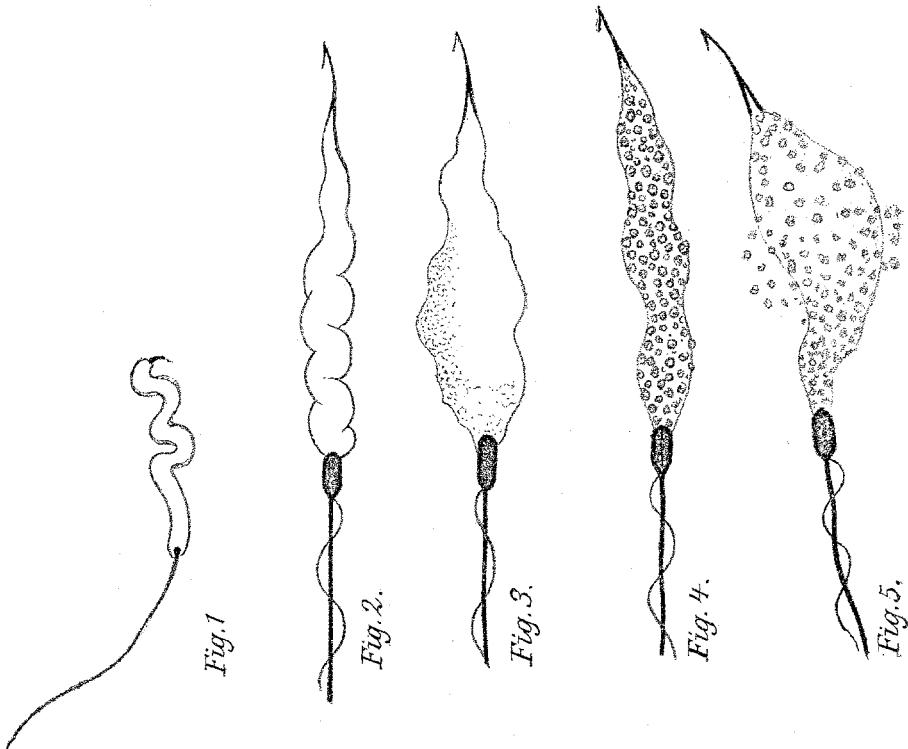
²⁾ Bei meinen früheren Untersuchungen (a. a. O.) war mir die Existenz dieses

Aehnliche Resultate lieferte die Untersuchung bei *Salamandra maculosa*, wie ich sie im August d. J. an frisch eingefangenen Thieren im Harz ausführte. Fertigt man in der angegebenen Weise Trockenpräparate von der beim Zerzupfen von Hodenstückchen in Salzwasser entstehenden milchigen Flüssigkeit an (eventuell kann auch das in den Siebold'schen Kloakenschlüchen der Weibchen angehäufte Sperma benutzt werden) und färbt dieselben unter dem Deckglase mit einer Lösung von Methylviolett, so treten an dem Kopfe der Samenfäden ganz analoge Veränderungen ein; entsprechend den viel grösseren Dimensionen der Objecte sind alle Verhältnisse aber noch viel deutlicher zu erkennen, als bei *Rana temporanea*. Das Aufquellen des Kopfes zeigt sich wiederum durch starke Verbreiterung und Annahme einer gewundenen, spiraling gekrümmten Form, er wird zugleich hell und hyalin und erscheint entweder homogen oder leicht gekörnt (Fig. 2, der hintere Theil des Spermatozoon ist hier, wie in den folgenden Figuren weggelassen), die übrigen Theile sind dagegen nicht wesentlich verändert, sie behalten ihre Form, ihre scharfen Contouren und einen gewissen Glanz bei, am Vorderende des Spiesses zeigt sich häufig ein kleiner Widerhaken, seine Basis macht den Eindruck eines schmalen, hoblen Kegels, hinter dem Kopfe sieht man das kräftig entwickelte cylindrische Mittelstück und die beiden sich an dasselbe anheftenden Fäden, den geraden Achsen- und den Spiral-fäden; auch dass der letztere den ersten hinten erheblich überragt, lässt sich erkennen, die Flossen-Membran zwischen beiden Fäden bleibt dagegen unsichtbar. In den höheren Graden der Aufquellung des Kopfes (Fig. 3) hört fast jede sichtbare, lineare Begrenzung seiner Substanz auf, die einzelnen verbreiterten Windungen verschmelzen untereinander, und der Kopf scheint zu einem unregelmässig geformten, nur noch durch die Färbung markirten Klümpchen zerflossen zu sein. Schliesslich sei erwähnt, dass bei diesem Versuch auch eine charakteristische, häufig sehr auffällige Farben-Differenz an den einzelnen Theilen der Samenfäden auftritt; während nehmlich, Spiess, Mittelstück und Schwanzfäden eine mehr oder weniger gesättigte, blaue Farbe annehmen, erscheint der gequollene oder in Auflösung begriffne Kopf in jenem rosaroten Farbenton, welchen das Methylviolett, wie bekannt, an amyloiden Substanzen hervorruft, eine Eigenthümlichkeit, welche ich an den Samenfäden des Frosches nur in leisen Andeutungen wahrgenommen habe.

Ein sehr überraschendes Bild bietet sich nun ferner dar, wenn man zu den in angegebener Weise mit Salzwasser hergestellten Trockenpräparaten an Stelle des Methylviolet eine Lugol'sche Jodlösung (Jod 1, Jodkali 2,

Bestandtheiles der Samenfäden von *Rana temp.* entgangen und ich batte den Kopf, weil in der Mitte zwischen vorderem Endstück (Spiess) und Schwanz gelegen, als das Mittelstück bezeichnet, zugleich aber hervorgehoben, dass dieser Theil in seinen Reactionen nicht mit dem Schweigger-Seidel'schen Mittelstück, sondern mit dem Kopf anderer Spermatozoen überein zu stimmen scheine.

Aq. 100) zufiessen lässt. Zu dem beschriebenen, mit auffälliger Verunstaltung verbundenen Aufquellen des Kopfes, welches auch hier zu einer fast vollständigen Auflösung desselben zu einem formlosen, nicht mehr scharf abgrenzbaren Klumpen führen kann (Fig. 4 und 5), gesellt sich nehmlich



hier das Auftreten einer grossen Zahl von kleineren oder grösseren, dunkelrandigen, fettglänzenden Kugelchen, so dass man lebhaft an die Bilder einer Fettdegeneration zelliger Elemente erinnert wird; diese fettartigen Gebilde befinden sich meistens dichtgedrängt in der hyalinen Grundsubstanz, ohne bestimmte Anordnung oder wohl auch in perl schnurartiger Aneinanderreihung, eingelagert, bisweilen rücken sie auch an einzelnen Stellen mehr auseinander, und wenn die Grundsubstanz gänzlich zerfliesst, zerstreuen sie sich am Rande derselben. Auch hier bietet übrigens die durch die Jodlösung erzeugte Färbung ein gewisses Interesse; jene, Fettkügelchen vortäuschenden Einlagerungen heben sich nehmlich durch eine röthlichbraune Farbe, wie sie dem Amyloid und dem Glykogen zukommt, von der fast farblos bleibenden, hyalinen Grundsubstanz ab, die übrigen unversehrt gebliebenen Theile des Samenfadens erscheinen in der gewöhnlichen gelben

Jodfarbe, unter ihnen zeichnet sich zugleich das Mittelstück durch einen besonders lebhaften Glanz aus.

Diese an den getrockneten Samenfäden des Salamanders bei Behandlung mit Jodlösungen beobachteten Erscheinungen veranlassten mich, die Untersuchung bei dem Frosche (R. temp.) nochmals aufzunehmen und auch an ihnen die Jodwirkung zu prüfen. In der Erwartung, hier dieselben eigenthümlichen Veränderungen des Samenfadenkopfes wiederzufinden, wurde ich jedoch getäuscht; der stark gequollene und gewundene Körper des Kopfes behielt bei Zusatz von Jodlösungen seine homogene, blosse Beschaffenheit und färbte sich jodgelb; körnige, fettähnliche Ausscheidungs-Produkte zeigten sich nicht.

Bei den beschriebenen Versuchen wirken drei Factoren auf die Samenfäden ein: die Kochsalz-Lösung, die Eintrocknung und die zuletzt zugefügte Farbstoff-Lösung (Methylviolett bezw. Jod), es muss daher die Frage aufgeworfen werden, welchen Antheil diese verschiedenen Einflüsse an den Veränderungen, insbesondere an der Aufquellung des Kopfes haben? Controlversuche ergeben zweifellos, dass das wichtigste Moment in der Mischung des Sperma mit der Kochsalz-Lösung, die sich hier keineswegs als „physiologisch“ erweist, gegeben ist. Wiederholt man nehmlich den Versuch in der Art, dass man dem Hodensaft keine Flüssigkeit zusetzt oder statt einer Kochsalz-Lösung Aqua destillata benutzt, so weicht das Bild der Samenfäden im Präparat nicht wesentlich von dem natürlichen Zustande derselben ab, wenn man etwa von einer im letzteren Falle eintretenden Einrollung der Fäden absieht. Da nun aber andererseits die angewandte Kochsalz-Lösung sich ebenfalls, wenn man das Präparat in feuchtem Zustande untersucht, indifferent verhält, und auch ein Zusatz von Farbstoff-Lösung zu dem feuchten Präparat hierin Nichts ändert, so ergiebt sich, dass es hauptsächlich auf die mit der Verdunstung der Kochsalz-Lösung verbundene, dem wirklichen Eintrocknen vorausgehende Zunahme der Concentration dieser Lösung, welche alle Stadien bis zur vollkommenen Sättigung durchläuft, ankommt, und es könnte nur Wunder nehmen, dass die hierdurch bedingte Wirkung so schnell, fast momentan sich geltend macht. Eine wirkliche Auflösung des Kopfes erreicht man allerdings nur, wenn man eine starke (etwa 10 pCt.) Lösung von Kochsalz einige Zeit auf die Samenfäden einwirken lässt, alsdann findet man dieselbe in der Flüssigkeit auf ihren Schwanztheil einschliesslich Mittelstück (über den Spiess ist es mir nicht möglich, etwas Bestimmtes zu sagen) reducirt, wie es vor langer Zeit Schweigger-Seidel (a. a. O.) als Folge der Einwirkung von concentrirter Salzsäure auf das Sperma von Triton taenius beschrieben und abgebildet hat.

Ich glaubte hiernach die Anstellung von Versuchen mit einigen anderen Salzlösungen, um ihre Wirkung auf die Samenfäden bei der Eintrocknung zu prüfen, nicht unterlassen zu dürfen, und es zeigte sich, dass Natron sulphuric., Magnesia sulph., Borax, Jodkali und Natr. Bicarbonic. sich ähnlich verhielten, wie Kochsalz; besonders energisch war die Wirkung des Jodkali, und es erklärt sich daraus, dass durch directes Eintrocknen des mit

der Lugol'schen Lösung vermischten Sperma ganz dieselben Erscheinungen zu Stande kommen, wie bei der nachträglichen Hinzufügung dieser Lösung zu den trockenen Kochsalz-Präparaten. Wirkungslos verhielten sich dagegen Solutionen von Sublimat, Alaun, Zucker.

... Dürfen wir also als das Ergebniss dieser Beobachtungen die Thatsache bezeichnen, dass die Substanz des Spermatozoen-Kopfes bei *Rana temporanea* sowohl, als bei *Salamandra maculosa*, welche, wie wir annehmen dürfen, im Wesentlichen aus sogen. Nuclein (oder Chromatin) besteht, in gewissen Salzlösungen unter Auftreten eigenthümlicher Quellungs-Erscheinungen, welche zum Theil (bei den Jod-Versuchen) mit der Ausscheidung besonderer, ihrer Natur nach vorläufig nicht zu definirenden Zersetzung-Producte verbunden sind, sich auflöst, so schliesst sich dieses auf mikrochemischem Wege gewonnene Resultat an Erfahrungen der physiologischen Chemie an. Miescher¹⁾ hatte bei der chemischen Untersuchung des Lachs-Sperma gefunden, dass die in den Spermatozoen desselben enthaltene Nuclein-Verbindung in Kochsalz-Lösung von 10 pCt. stark ausquillt. Kossel²⁾ führt ebenfalls als Eigenschaft des Nuclein seine Quellung in Alkalien, in kohlensaurem Natron und in 10 pCt. Kochsalz-Lösung an, und bei O. Hertwig³⁾, welcher die Botaniker Zacharias und Schwarz citirt, finde ich die Angabe, dass das Nuclein bei Anwendung von 10—20 pCt. Lösungen von Kochsalz, schwefelsaurem Magnesia, phosphorsaurem Kali oder Aq. calcis unter Quellung allmählig in Lösung übergeht. Es wird jedoch zu beachten sein, dass die Nucleine verschiedener Provenienz keineswegs identische chemische Körper sind, und dass sie nicht durchweg die angeführten Eigenschaften besitzen. Miescher stellte bereits fest, dass in chemischer Beziehung ein Unterschied besteht zwischen den Spermatozoen des Lachses und anderer, von ihm untersuchter Thiere (Frosch, Karpfen, Stier). Kossel hebt ausdrücklich hervor, dass es mehrere verschiedene Kern-Nucleine giebt, und ich kann die auffallende That-sache berichten, dass es bei den Spermatozoen der *Rana esculenta*, sowie anderer Thiergattungen, soweit ich bei ihnen eine Untersuchung nach derselben, oben angegebenen Methode vornahm, und auch bei denen des Menschen nicht gelingt, die charakteristischen Veränderungen hervorzurufen, wie ich sie für *Rana temporanea* und *Salamandra maculosa* beschrieben habe; aber auch bei diesen letzteren Thieren lieferten mir die Kerne anderer zelliger Elemente, z. B. der Blutzellen und der in den Samen-Canälchen enthaltenen Bildungs-zellen der Spermatozöen bisher nur negative Resultate; in den letzteren scheint also bei der fortschreitenden Entwicklung ein besonderer Act der Reifung der Kernsubstanz einzutreten, welcher für den Befruchtungs-Vor-gang wahrscheinlich nicht ohne Bedeutung ist.

Königsberg, im October 1899.

¹⁾ F. Miescher, Verhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft zu Basel, VI, 1874.

²⁾ Behrens, Kossel und Schiefferdecker, Die Gewebe des menschlichen Körpers, I, S. 260, 1889.

³⁾ O. Hertwig, Die Zelle und die Gewebe, I, S. 35, 1893.