

Über Vitalfärbung, sowie hormonale und überhaupt humorale Beeinflussung des wachsenden Vogelembryos im Ei.

Von

J. Aug. Hammar,

Upsala.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 18. August 1922.)

Daß nicht alle angeborenen Eigenschaften als ererbt zu erachten sind, sondern daß diesbezüglich auch mit dem Einfluß des intrauterinen Milieus zu rechnen ist, ist keineswegs ein Gedanke der jüngsten Zeit. Erst mit der Entwicklung der Hormonlehre wurde aber ein Einblick in die Wirkungsweise des normalen intrauterinen Milieus ermöglicht. Dadurch wurde auch die Frage aktualisiert, was bei der normalen Fötalentwicklung von der Erbllichkeit, was von dem hormonalen Einflusse determiniert wird. Und man kann wohl sagen, daß diese Frage nicht bloß in theoretischer Hinsicht eine der wichtigsten und interessantesten von den vielen ist, welche im Gebiete der Endokrinologie auf ihre Lösung harren. Angesichts der Möglichkeit, die hormonalen Einflüsse in einer weit leichteren Weise als die rein erblichen zielbewußt zu beeinflussen, kann die Sache auch eine hervorragende praktische Bedeutung beanspruchen.

Hierzu kommt nun ferner, daß schon vorliegende Daten dazu nötigen, die Frage zu stellen, ob nicht Hormoneinflüsse erblich begründete Eigenschaften zu modifizieren vermögen, und wenn dies der Fall ist, innerhalb welcher Grenzen.

In letzterer Beziehung von Bedeutung sind die von Lillie (1917) klargestellten anatomischen Verhältnisse beim Entstehen des intersexuellen Individuums, das bei der Geburt geschlechtsverschiedener Zwillinge beim Rind fast regelmäßig neben einem normalen männlichen Individuum vorhanden ist. Der erwähnte Forscher hat ja betreffs dieser Mißbildungen dargelegt, daß ihr Vorkommen enge an das Vorhandensein einer Anastomose zwischen den Nabelgefäßen der beiden Föten geknüpft ist. Diese Anastomose fehlt beim Kalbe nur ausnahmsweise, und dann ist auch der weibliche Zwilling nicht intersexuell, sondern normal. Das Fehlen der Anastomose ist aber bei solchen Zwillingsgeburten des Schafes die Regel, und hier fehlen auch die intersexuellen Formen. Plausibel erscheint unter diesen Verhältnissen der Erklärungsversuch Lillies. Wenn die Anastomose vorhanden ist, soll das männliche Sexualhormon als das zuerst gebildete zu dem

weiblichen Zwilling übergeleitet werden; hier ruft es, je nach dem Zeitpunkt dieses Ereignisses, die mehr oder weniger tiefgreifenden Umgestaltungen des Geschlechtsapparats in männlicher Richtung hervor, welche die betreffenden intersexuellen Individuen auszeichnen. Ist dies aber tatsächlich der Fall, so liegt es nahe, zu vermuten, wie es auch *Goldschmidt* (1917) schon ausgesprochen hat, daß ebenso wie die Geschlechtsdifferenzierung auch andere durch die Befruchtung hervorgerufene Eigenschaften während ihrer Entfaltung einem hormonalen Einfluß zugänglich sein können.

Unter solchen Umständen wird es besonders auffällig, wie äußerst mangelhaft schon unsere anatomischen Kenntnisse des innersekretorischen Apparates sowohl des Fötus wie des schwangeren Weibes vorläufig sind. Auf diesem Forschungsgebiet, das ja doch keineswegs als unzugänglich zu erachten ist, stehen uns zurzeit eigentlich nur mehr vereinzelte Beobachtungen zur Verfügung; eine systematische Übersicht fehlt fast gänzlich. Aber so wichtig solche anatomische Beobachtungen als Grundlage unseres Wissens auch sind, sie vermögen niemals sichere Kenntnisse zu geben in den schwierigen Fragen von den Beziehungen der fötalen und der maternellen Hormone bei der normalen Entwicklung und von dem Einfluß, welchen hormonale Störungen der einen oder der anderen Art auf den Entwicklungsvorgang ausüben. Solchen Anforderungen kann nur das Experiment genügen.

Als Objekt solcher Experimente scheint das Vogelei mehrere Vorteile darzubieten. Bei einem mit dem des Säugers in vielen Punkten vergleichbaren Entwicklungsverlaufe ist das Vogelei nicht nur experimentellen Eingriffen weit leichter zugänglich als das im Uterus sich entwickelnde Säugerei; auch das Medium, in welchem sich der Dotter des Vogeleies während der Entwicklung des Fötus befindet, das Eiklar, stellt durch seine normalerweise konstantere Beschaffenheit einen günstigeren, leichter zu beurteilenden Faktor dar als die komplizierter gestaltete, allerlei unberechenbaren Einflüssen ausgesetzte Umwelt, welche der mütterliche Organismus für das Ei des viviparen Säugers darstellt.

Bekanntlich wird nun das Eiklar im Laufe der Entwicklung vom Fötus in Anspruch genommen und resorbiert. Es bietet sich hierdurch die Möglichkeit dar, durch Einverleibung des einen oder anderen Stoffes mit dem Eiklar den Einfluß des betreffenden Stoffes auf den wachsenden embryonalen Organismus zu prüfen. Unter solchen Stoffen, deren Prüfung besonders verheißend erscheint, stehen dem oben Angeführten gemäß innersekretorische Produkte verschiedener Art in der ersten Linie.

Zweck dieser Zeilen ist es zu zeigen, wie früh in der Entwicklung mit der Möglichkeit einer derartigen Beeinflussung zu rechnen ist, und wie solche Versuche in Einzelheiten gestaltet werden können.

Vitalfärbungen.

Beim Herantreten an die gestellte Aufgabe erschien es zunächst angezeigt, auszuprobieren, ob überhaupt eine Beimischung fremder Bestandteile zu dem Eiklar ohne Absterben des Eies vorgenommen werden kann, und wann deren Aufnahme durch den Dotter eventuell beginnt. Hier schien eine Verwendung vital färbender Stoffe, die anerkannterweise für das Protoplasma relativ mehr oder weniger unschädlich sind, als angemessen. Läßt sich doch bei solchen Stoffen ihr Vorhandensein und ihre Verteilung im Embryo direkt am lebenden bzw. überlebenden Objekt feststellen. Die von mir angestellten Versuche dienten eigentlich auch nur einem solchen orientierenden Zweck. Da sie aber auch an und für sich aussichtsreiche Resultate ergaben, scheint es nicht unnütz, mit einigen Worten etwas näher auf sie einzugehen.

Geprüft wurden folgende Farbstoffe: Neutralrot, Brillantkresylblau, Methylenblau rectif., Gentianaviolett, Alizarin, Janusgrün, Trypanblau und Pyrrolblau. Unter diesen ergaben nur die drei erstgenannten ein positives Resultat; die übrigen schienen eine so starke Schädigung des Dotters herbeizuführen, daß eine Entwicklung in keinem Falle erfolgte, wo die Farbe denselben erreicht hatte. Das Neutralrot erwies sich im Eiklar bei Zimmertemperatur als nicht besonders stark löslich. Wenn die Farbe in ungelöster Form zugeführt wurde, erfolgte aber die Lösung im Brutofen, so daß meistens schon nach eintägiger Bebrütung eine ziemlich kräftige gelblichrote Färbung des Eiklars zu erkennen war. Das Brillantkresylblau und das Methylenblau hingegen waren schon bei Zimmertemperatur leicht löslich.

Die Zuführung des Farbstoffes geschah versuchs halber auf verschiedene Weise. Einerseits wurde am spitzen Eipole nach Anbohrung mit einem scharfgeschliffenen, in die Drehbank eingesetzten Stahlröhre eine Kalotte von etwa 1 cm Durchmesser abgehoben und durch das so entstandene Loch der Farbstoff zugeführt. Andererseits wurde durch ein solches Loch mit einer sterilen Spritze Eiklar in einer Menge von 2—4 cm aufgesogen, mit dem Farbstoff zu einer intimen Mischung verrieben und dann wieder eingespritzt, eventuell unter Hinzufügung von so viel einem anderen Ei entnommenen Eiklar, daß der Raum innerhalb der Eischale gänzlich ausgefüllt wurde. Da es sich herausstellte, daß die Verteilung des in ungelöstem Zustande zugeführten Farbstoffes innerhalb des Eiklars, wenigstens während der ersten Bebrütungstage nicht selten eine ungenügende war, trotzdem daß das Ei alltäglich umgedreht wurde, kam auch — und zwar vom Methylenblau und vom Gentianaviolett — eine gesättigte Lösung des Farbstoffes in 0,9 % Kochsalzlösung zur Verwendung. Dieselbe wurde

durch mehrere (4—8) symmetrisch am Äquator des Eies angebrachte punktförmige Löcher eingespritzt, wobei durch andere ähnliche Löcher für den Abfluß eines etwa gleichgroßen Quantum des Eiklars gesorgt war und durch ein punktförmiges Loch am stumpfen Pol bis in die Luftkammer hinein die Möglichkeit eines Entweichens von Luft berücksichtigt wurde. Der Zweck dieses letzterwähnten Verfahrens, nämlich eine gleichmäßigere und schnellere Verteilung der Farbe im Eiklar wurde auch erreicht. Leider waren die derart behandelten Eier offenbar an und für sich wenig entwicklungsfähig, so daß ich von dem sonstigen Erfolg dieses Verfahrens nichts Sicheres mitzuteilen habe.

Die Eischale mag nun auf die eine oder andere Weise geöffnet gewesen sein: Der Verschuß erfolgte durch Überdeckung mit einem kleinen Stück Schalenhaut, die durch Eiklar angeklebt, angetrocknet und nach dem Trocknen durch zweimaliges Überstreichen mit Kollodium lackiert wurde. War eine Kalotte in der oben angegebenen Weise abgehoben worden, so wurde nach ihrem Wiederaufklappen als Deckel der Trennungsrand dermaßen behandelt. Die Bohrlöcher wiederum wurden vor dem Kollodiumanstrich außerhalb der Schalenhaut mit einem Stückchen der Kalkschale überdeckt¹⁾.

Färbung des Keimes wurde wiederholt, und zwar schon bei einem Entwicklungsgrad desselben beobachtet, der einer etwa 48 stündigen Bebrütung unter normalen Verhältnissen entspricht. Tatsächlich handelte es sich um eine etwas längere Frist, indem die behandelten Eier fast immer eine — durchschnittlich etwa 24 stündige — Verspätung in der Entwicklung aufwiesen.

Was die Ergebnisse der Färbung im übrigen anbetrifft, so verhielten sich das Neutralrot und das Brillantkresylblau so ähnlich, daß zu vermuten war, daß es in beiden Fällen dieselben Gebilde waren, die sich färbten — mit jener Farbe gelblichrot, mit dieser metachromatisch rotviolett bis purpurn. Die gefärbte Substanz hatte den Charakter von Körnchen, die den von mir (1912) des näheren untersuchten, mit denselben Vitalfärbungen darstellbaren »Purpurlipoidkörnchen« der weißen Blutkörperchen so ähnlich waren, daß die Vermutung nahe lag, daß es sich auch hier um gleichartige Gebilde handelt; dies bestimmt zu behaupten ist aber ohne eingehendere Untersuchungen nicht möglich.

Innerhalb des Embryos habe ich diese Gebilde besonders reichlich in gewissen Gebieten des Ektoderms, so z. B. in den Zellen am Boden der Linsengrube angetroffen. Auch das extraembryonale Ektoderm ist, wenigstens am zweiten Entwicklungstage, durch ähnliche Körnchen

¹⁾ Ich finde, daß eine ähnliche, nahe an der Hand liegende Verschußweise früher von Miß *Peebles* (1898) und *Lillie* (1903) gebraucht worden ist.

ausgezeichnet. Am reichlichsten und konstantesten finden sich aber derartige gefärbte Elemente im Gefäßhof, entlang der hier verlaufenden Gefäße, so daß die ganze Gefäßverästelung durch eine schöne rote Umsäumung der einzelnen Gefäße scharf hervorgehoben wird. Es ist ein sehr ansprechendes Schauspiel, innerhalb des derart schön rot-gefärbten Embryos und Gefäßhofs den Herzschlag und den Blutkreislauf unter Umständen mit normaler, allem Anschein nach von der Färbung gar nicht geschwächter Energie vor sich gehen zu sehen.

Auch im Nahrungsdotter treten unter günstigen Vorbedingungen in betreff der Farbkonzentration der nächsten Umgebung des Dotters ähnliche gefärbte Körnchen hervor. Selten ist aber hier mehr als eine dünne Oberflächenschicht an der Färbung beteiligt. Die betreffenden Granula des Nahrungsdotters sind ganz klein und liegen zwischen den großen Dotterkörnern, welche letztere meistens ganz ungefärbt angetroffen wurden.

Die Methylenblaufärbung läßt gleichfalls intrazelluläre Körnchen hervortreten, die aber blau, nicht metachromatisch gefärbt sind. Es handelt sich hier um weit kleinere Gebilde als die oben beschriebenen, und allem Anschein nach sind sie mit jenen nicht identisch. Eine allgemeinere, etwas übersichtlichere Färbung lag in keinem meiner Fälle vor, sondern es handelte sich um verschiedene größere oder kleinere Zellkomplexe in einer sonst ungefärbten Umgebung. Im Absterben begriffene Zellengruppen, welche durch chromatolytische Veränderungen der Zellkerne gekennzeichnet sind, trifft man mit etwa ähnlicher Verteilung im Gewebe solcher Embryonen, die in der Entwicklung zurückgeblieben sind, nach Paraffineinbettung und gewöhnlicher Kernfärbung an; ob die beiden Arten von Bildern wirklich zueinander Beziehung haben, muß vorläufig unentschieden bleiben.

Mehr als eine erste Orientierung über die Verwendbarkeit der Vitalfärbung des wachsenden Vogelembryos im Ei geben die vorstehenden Daten offenbar nicht. So viel läßt sich jedoch schon jetzt aussagen, daß wir in einer derartigen Verwendung der Vitalfärbung ein Mittel besitzen, bauliche Einzelheiten, die sonst wenig oder gar nicht sichtbar sind, mit größter Deutlichkeit hervortreten zu lassen. Gewisse stoffliche Umsetzungen und Verschiebungen innerhalb des sich entwickelnden Eies dürften nur auf diese Weise dem Untersucher zugänglich gemacht werden können.

Hormonzufuhr.

Die durch die Vitalfärbungsversuche gewonnene Erfahrung ergab, daß eine Entwicklung des Keimes auch nach Einverleibung fremder Stoffe mit dem Eiklar erfolgen kann, und daß solche Stoffe schon bei einem Entwicklungsgrad des Embryos, der dem zweiten Tag des

normalen Entwicklungsverlaufes entspricht, Aufnahme in den Embryo gefunden haben können. Insofern scheinen also die nötigen Vorbedingungen für Hormonversuche ähnlicher Art vorzuliegen.

Die für meine diesbezüglichen Versuche herangezogenen Organpräparate waren: 1. »Tabloid Thyroid Gland« (Burroughs Wellcome & Co.), jede Tablette angeblich 0,1 g der frischen, gesunden Schilddrüse vom Schaf entsprechend und nicht weniger als 0,05 % Jod in organischer Bindung enthaltend; 2. Hypophysin (Meister Lucius und Brüning), angeblich die wirksamen Substanzen von 200 g frischem Infundibularteil in 1 Liter Wasser enthaltend; 3. Pituitrin (Parke, Davis & Co., London); 4. Antuitrin, Extrakt des Vorderlappens der Hypophyse, von derselben Firma wie 3.

Die Schilddrüsen-tabletten wogen je etwa 0,08 g; sie wurden fein pulverisiert und in verschiedenen Dosen von 0,0025—0,160 g verwendet. Das Pulver wurde in solchen Dosen durch Verreibung mit einer kleinen Quantität (1—4 ccm) Eiklar vermischt und dann teils als Suspension, teils nach eintägiger Digerierung im Brutofen und Abfiltrierung des Ungelösten eingespritzt.

Von den übrigen, in steriler Lösung vorliegenden Präparaten wurden hauptsächlich zwei Dosierungen benutzt, nämlich 0,4 und 0,2 ccm der käuflichen Lösungen.

Die Schilddrüsenstoffe wurden versuchsweise in derselben Weise zugeführt, als dies für die Farbstoffe oben angegeben wurde: also einerseits nach Abhebung von einer Kalotte am spitzen Eipole und nachherigem Wiederauflegen derselben mit Dichtung des Schnittrandes durch angeklebte Schalenhaut und zweimaligen Kollodiumanstrich; andererseits unter Benutzung punktförmiger Bohrlöcher.

Der ersterwähnte Eingriff ist offenbar von ziemlich tiefgreifender Natur. Es läßt sich die Beimengung von Luft zum Eiklar nur schwer vermeiden, was offenbar die Entwicklungsfähigkeit des Eies schädigt. Zwar erwies sich der Eiinhalt gegen Infektion durch Mikroorganismen auffallend refraktär, so daß ich nur zweimal unter den 200—300 behandelten Eiern eine offenkundige Verfaulung antraf; ob diese durch den Eingriff oder nur durch allzu langes Aufbewahren der Eier seitens des Verkäufers verursacht worden war, muß unentschieden bleiben. Die Beimengung von Luft gibt sich aber in einer allzu frühen und allzu starken Verflüssigung des Dotters kund. In Eiern, deren Eiklar durch Luft etwas stärker verunreinigt war, fand sich häufig schon nach eintägiger Bebrütung ein Dotter, der in seinem größten Umfange verflüssigt war und weißlich aussah. In solchen Eiern blieb die Embryonalentwicklung meistens gänzlich aus.

Das punktförmige Anbohren der Eischale mit Einspritzung durch die Bohrlöcher und nachheriger Dichtung derselben erwies sich als

ein weit unschädlicherer Eingriff. Das Anbringen von multiplen Bohröffnungen erwies sich ferner als unnötig. Eine Injektionsöffnung und eine Kontrapunktion für das Abfließen von Eiklar schienen dem Zweck zu genügen.

Es gestaltete sich demnach das Verfahren, zu welchem meine Versuche mich führten, und welches ich als brauchbar empfehlen kann, folgendermaßen:

1. Mit einem in die Drehbank eingesetztem Bohreisen wird die Eischale an zwei Stellen punktförmig angebohrt, nämlich einerseits am spitzen Pole, andererseits an einer Stelle des Eiäquators. Es empfiehlt sich, die Anbohrung zu hemmen, ehe sie zum Durchbruch geführt hat, so daß bloß eine beträchtliche Verdünnung der Schale bewirkt wird. Dies erreicht man am leichtesten, wenn das Bohreisen nicht in eine langausgezogene, geschliffene Spitze ausläuft, sondern in Form einer stumpfwinkligen, niedrig kegelförmigen, aber nichtsdestoweniger scharfen Spitze abgestutzt ist.

2. Die angebohrten Stellen werden der Sterilisierung halber mit Spiritus abgerieben und trocknen gelassen.

3. Mit einer sterilen Glasnadel wird die äquatoriale Bohrstelle durchstoßen, und zwar so tief, daß die Schalenhaut mit Sicherheit auch perforiert wird. Um eine Beschädigung des Dotters zu vermeiden, wird darauf geachtet, daß eine Zeitlang vor dem Einstich weder die eine noch die andere Bohrstelle nach oben gekehrt gewesen ist.

4. Mit einer grobkalibrigen, quer abgeschliffenen, sterilen Hohl- nadel einer Pravazschen Spritze wird die am spitzen Pole befindliche Bohrstelle durchstoßen. Die Nadel wird ziemlich tief eingeführt, aber in schiefer Richtung, damit sie nicht auf den Dotter stößt. Die Stellung der Nadelspitze kann durch eine vorsichtige, rotierende Bewegung während der Entleerung der Spritze verändert werden, wenn eine Verteilung der eingespritzten Substanz erwünscht ist. Die Spritze ist vor dem Benutzen durch Auskochen zu sterilisieren.

Das äquatoriale Loch wird während der Injektion nach abwärts gekehrt. Ist die betreffende Bohrstelle gut durchstoßen, fließt dann aus derselben eine Portion von Eiklar ab, welche der eingespritzten Flüssigkeitsmenge ungefähr entspricht. Wie unten des Näheren ausgeführt werden soll, ist dieses Moment von Bedeutung, da der Verdacht vorliegt, daß eine Erhöhung des Innendrucks des Eies einen teratogenen Faktor darstellt.

Beim Abfließen des Eiklars wird darauf geachtet, daß die Außenfläche der Eischale nicht in größerem Umfange von demselben verunreinigt wird. Ausgetretenes Eiklar wird sogleich sorgfältig abgetupft, bzw. mit einem in steriles Wasser getauchten Wattebausch fortgewaschen, damit es nicht eintrockne und eine Art Firnis auf der Schale bilde, was bekanntlich Mißbildungen hervorrufen kann.

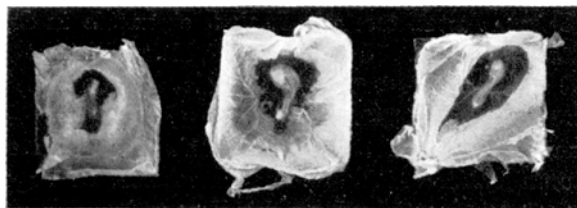
5. Sogleich nach der Injektion werden die Löcher der Eischale plombiert. Es kommt über jedes Loch zunächst ein mit Eiklar befeuchtetes Stückchen Schalenhaut von etwa 2—3 mm Durchmesser und darüber ein etwa gleichgroßes Stückchen der Kalkschale. Sind beide angetrocknet, so werden sie sowie ihre nächste Umgebung mit Kollodium überstrichen; nach dem Eintrocknen wird der Anstrich nochmals erneuert. In anderen Fällen habe ich die Kollodiumanstriche durch einen Tropfen geschmolzenen Paraffins von hohem Schmelzpunkt (60° C) mit Vorteil ersetzt. In dem einen wie in dem anderen Fall wird darauf geachtet, daß nur eine kleine Plombe angefertigt wird, so daß die Permeabilität der Eischale durch sie keine wesentliche Beeinträchtigung erfährt.

6. Um zu vermeiden, daß die äquatoriale Punktionsstelle bei der Bebrütung unmittelbar oberhalb der Keimscheibe zu liegen komme, und um die planmäßige Wendung der Eier während der Bebrütung zu erleichtern, habe ich das Ei am Äquator in einer Entfernung von 90° von der äquatorialen Stichöffnung mit blauem, und gerade gegenüber mit rotem Farbstift numeriert und dann stets darauf geachtet, daß das Ei im Brutofen mit der einen oder anderen Ziffer gerade nach oben zu liegen kommt.

Dieses Verfahren habe ich nun an einem Material von 100 Hühneriern geprüft. Die Bebrütung geschah in einem Brutapparat von der vorzüglichen Konstruktion der Rosehill-Fabrik in Norrköping. Von den Eiern, die sämtlich auf einmal zur Bebrütung kamen, wurden 60 Stück mit Hypophysensubstanzen injiziert, 40 zur Kontrolle verschiedentlich behandelt. Von jenen wurden 10 Stück mit Hypophysin 0,4 cem, 10 Stück mit Hypophysin 0,2 cem der käuflichen Lösung gespritzt. Mit Pituitrin 0,4 bzw. 0,2 cem gleichfalls je 10 Stück und mit Antuitrin 0,4 bzw. 0,2 cem gleichfalls je 10 Stück injiziert. Von den Kontrolleiern wurden 10 Stück mit 0,4 cem filtriertem Eiklar injiziert, das einem anderen Ei entnommen worden war; 10 andere wurden in gleicher Weise mit 0,2 cem derselben Flüssigkeit behandelt; weitere 10 wurden mit 0,4 cem Aqua dest. injiziert; die übrigen 10 Kontrolleier wurden bloß angestochen, ohne daß darauf eine Injektion vorgenommen wurde. Vom Ende des dritten Tages angefangen wurde jeden zweiten Tag ein Ei aus jeder Reihe von 10 Stück zur Untersuchung entnommen.

Diese Versuchsserie konnte erst im Herbst begonnen werden. Da die Eier bekanntlich in dieser Jahreszeit zur Bebrütung wenig geeignet sind, hatte man mit einem verringerten Entwicklungsvermögen zu rechnen. Nur die jüngsten, 3 Tage alten Eier enthielten durchweg

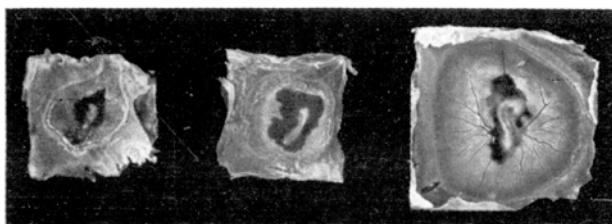
entwickelte Keime (Abb. 1). Mehrere derselben erwiesen sich aber als so rückständig in der Entwicklung, daß anzunehmen ist, daß sie, wenn ihre Bebrütung fortgesetzt worden wäre, in der Folge durch Absterben weggefallen wären. In der Tat ergaben die 60 mit Hypophysenpräparaten injizierten Eier beim Eröffnen insgesamt nur 28 Föten, was nahezu 47 % entspricht; die 40 Kontrolleier ergaben 16 Föten



Hypophysin 0,4

Hypophysin 0,2

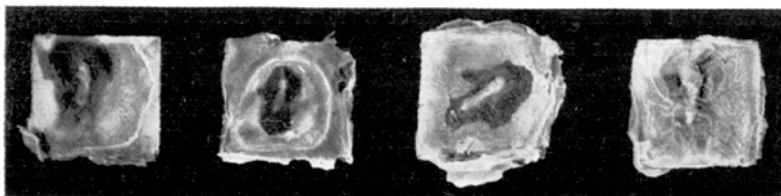
Pituitrin 0,4



Pituitrin 0,2

Antuitrin 0,4

Antuitrin 0,2



Albumen 0,2

Albumen 0,4

Punctio

Aqua dest. 0,4

Abb. 1. Dreitägige Bebrütung.

(40 %); unter diesen letzteren entstammten nur 3 den 10 angestochenen, nicht injizierten Eiern. Es läßt sich unter solchen Umständen wohl mit Recht vermuten, daß der hohe Prozentsatz der Eier, die ausfielen, nicht in erster Linie von dem vorgenommenen Eingriff abhing.

Was die qualitative Einwirkung der verwendeten Hypophysenpräparate anbetrifft, so habe ich nicht die Absicht, sie hier schon zu besprechen. Ebenso wie hinsichtlich der oben erwähnten Versuche

mit Schilddrüsensubstanz gilt auch für sie, daß eine weit größere Erfahrung, auch betreffs der Dosierung, dazu erforderlich wäre; das innersekretorische System der »Hypophysenföten« muß auch vorerst einer qualitativen und quantitativen Prüfung unterworfen werden.



Abb. 2. Fünfzehntägige Bebrütung.

Nur so viel läßt sich jetzt sagen, daß letztere Föten, von außen gesehen und unzerstückelt gewogen, sich in der Regel als groß, aber nicht als übergroß erwiesen; irgendein grundsätzlicher Unterschied zwischen den mit Antuitrin und den mit Derivaten des Hypophysen-

hinterlappens behandelten Föten ließ sich nicht feststellen. Meistens war der eine oder der andere der Kontrollföten noch größer. Zur Erläuterung des Angeführten möge eine Reihe von Bildern vom 15. Bebrütungstage dienen (Abb. 2).

Von dem hier vorzugsweise in Betracht kommenden methodologischen Gesichtspunkt aus wichtiger sind aber ein paar andere Momente.

Erstens der schon berührte Umstand, daß, wie nicht nur die zuletzt angeführte, sondern auch die früheren Versuchsreihen lehrten, fast immer eine gewisse Verspätung der Entwicklung unabhängig von der Art des zugeführten Stoffes bemerkbar war. Durchschnittlich möchte ich diese Verspätung auf etwa 24 Stunden schätzen, was zu berücksichtigen ist, wenn es einem auf bestimmte Entwicklungsstadien ankommt.

Zweitens ist es von Wichtigkeit, zu erfahren, inwiefern die verwendete Methode an und für sich geeignet ist, Abnormitäten in der Entwicklung hervorzurufen. Diesbezüglich habe ich in der soeben angeführten Serie Erfahrungen gemacht, die erwähnt werden müssen. Bei nicht weniger als fünf der erhaltenen Föten lag nämlich eine Augenatrophie vor; dieselbe war in dreien der Fälle einseitig — und zwar überall rechtseitig — in zweien doppelseitig. Die Mißbildung war anscheinend von der chemischen Beschaffenheit der injizierten Flüssigkeit nicht abhängig; zwei der Fälle mit einseitiger Atrophie entstammten Eiern, die mit 0,2 ccm Pituitrin injiziert worden waren, ein Fall mit doppelseitiger Atrophie betraf eines der mit 0,4 ccm Eiklar injizierten Kontrolleier, die zwei übrigen Fälle entstammten gleichfalls Kontrolleiern, die aber mit 0,4 ccm Aqua dest. injiziert worden waren. Vielleicht liegt es unter solchen Umständen am nächsten, an Störungen der Druckverhältnisse im Ei — sei es der grobmechanischen oder der osmotischen — als teratogenes Moment zu denken. Jedenfalls ist auch von früheren Experimentatoren, so von *Féré*, *Ferret* u. *Weber*, in Erfahrung gebracht worden, daß gerade Augenmißbildungen zu den häufigsten der experimentell hervorgerufenen Mißbildungen gehören.

Als beachtenswert möchte ich noch folgendes hervorheben:

Es bedeutet die Injektion ungelöster Substanzen allem Anschein nach eine beträchtlichere Schädigung des Eies als unter sonst vergleichbaren Verhältnissen die Injektion von Lösungen. Das Injizieren von Suspensionen erfolgt am besten in unmittelbarer Nähe des spitzen Eipols, damit kein Niederschlag fester Teile an der Dotterhaut und ganz besonders über der Keimscheibe zustande komme; solche Niederschläge haben fast ausnahmslos das Absterben des Keims zur Folge.

Die Lage des Eies nach der Injektion soll, wie schon oben angedeutet wurde, eine derartige sein, daß sich der Dotter nicht an eine der Läsionsstellen anlagern kann. Geschieht dies, so entsteht häufig

eine Verklebung der Dotterhaut mit der Schalenhaut, was in der Regel zu abnormer Entwicklung führt. Derartige Beobachtungen sind auch von früheren Experimentatoren gemacht worden.

Schon a priori ließe sich vermuten, daß das hier empfohlene Verfahren für eine Zufuhr zum Ei auch für andere Stoffe von sehr verschiedener Art, wie für Gifte, Nährstoffe, Stoffe, die den osmotischen Druck des Eiklars ändern, Antigene usw., verwertbar ist. In der Tat liegt in der Literatur diesbezüglich schon eine beträchtliche Erfahrung vor, worüber gleich mehr gesagt werden soll.

Da es wohl erforderlich ist, für einen jeden solchen Stoff nicht nur die zweckdienliche Dosierung, sondern auch den Einfluß einer Injektion in verschiedenen Stadien der Embryonalentwicklung auszuprobieren, so scheint der weitere technische Ausbau der Methode eine Aufgabe zu sein, der man in verschiedenen Fällen auf verschiedene Weise gerecht werden muß.

Geschichtliches.

Der Gedanke, durch Zufuhr fremder Stoffe zum Eiklar die Entwicklung des Vogelembryos im Ei zu beeinflussen, ist ja keineswegs ein fernliegender, und es war deshalb zu erwarten, daß meine diesbezüglichen Versuche auch nicht die ersten ihrer Art sein würden.

In der Tat findet man beim Durchsehen der Literatur, besonders jener etwas älteren Datums, eine nicht unbeträchtliche Menge von Arbeiten, die mit einer Methodik ausgeführt sind, welche mit der von mir benutzten mehr oder weniger nahe übereinstimmt. Die leitenden Gesichtspunkte waren aber damals andere als die hier angelegten, konstitutionellen. Hierin ist wohl vor allem die Erklärung dafür zu suchen, daß die betreffende Arbeitsweise nur ein vorübergehendes Interesse zu wecken vermochte und nunmehr allem Anschein nach derart in Vergessenheit geraten ist, daß ein Versuch, sie zu rehabilitieren, berechtigt sein kann.

Ausgangspunkt und Vorbedingung für die hier in Frage kommenden Versuche war die relativ große Resistenz äußeren Eingriffen gegenüber, welche dem Hühnerei erfahrungsgemäß zukommt. Diese Erfahrung datiert weit zurück. Hat doch *Beguelin* schon im Jahre 1749 eine «Mémoire sur l'art de couvrir les oeufs ouverts» veröffentlicht. Er entfernte gerade am stumpfen Pole ein zirkuläres Stück der Eischale von 6—8 Linien Durchmesser. Das Ei wurde mit dem genannten Pol nach oben gelagert, der Dotter durch verschiedene Kunstgriffe mit der Keimscheibe aufwärts gekehrt, die Öffnung mit einem genau anschließenden Stück Eischale überdeckt und das Ei in dieser aufrechten Stellung bebrütet. Solche Eingriffe wurden sowohl an unbebrüteten Eiern wie auch nach 1—3 tägiger Bebrütung ausgeführt.

Nach *Beguelin* haben mehrere Forscher diese oder ähnliche Methoden benutzt, um das wachsende Ei durch Abhebung des Deckels wiederholten Beobachtungen zugänglich zu machen. So in späterer Zeit *Preyer* (1885), *Teuscher* (1888), *Féré* (1897) und *Loisel* (1900). Die Methode ist auch durch Ankitten von Deckgläschen, Uhrgläschen u. dgl. als durchsichtigen Deckeln modifiziert worden. *Gerlach* (1887), *Féré* (1897) und *Loisel* (1900) haben sogar den ganzen Inhalt des Eies in eine Schale übertragen und die Bebrütung dort vorgenommen.

In diesen und anderen derartigen Fällen handelte es sich lediglich um fortlaufende Beobachtungen am lebenden Ei, und solche ließen sich nur kurze Zeit ausführen, indem auch in den günstigsten Fällen meistens ein Überleben bloß um wenige Tage vorkam.

Vom biologischen Gesichtspunkt aus noch interessanter waren die Versuche *Loisels* (1900/2), den Dotter des Hühnereies in das Eiklar von der Ente zu überführen und dort zu bebrüten. Dieser schon von *Beguelin* in Vorschlag gebrachte Versuch hatte in der allerdings geringen Anzahl von Fällen, wo er angestellt wurde, einen recht mäßigen Erfolg; unter sechs in dieser Weise behandelten Eiern zeigte nur eines, bei dem die Überführung in das heterogene Eiklar nach 12 stündiger Bebrütung erfolgt war, am dritten Tage einen lebenden Embryo; auch dieser war aber anormal.

Hier sei auch an die eingehenden Versuche erinnert, welche *Gerlach* (1887) anstellte, um seine mit einer besonderen Apparatur ausgeführte »Embryoskopie« zu begründen.

Injektionen eifremder Stoffe in das Hühnerei sind ebenfalls vielfach vorgenommen worden¹⁾. So von *Pouchet* und *Beauregard* (1877), deren Arbeit mir leider nicht zugänglich ist, aber angeblich die Entwicklung von Eiern behandelt, deren Eiweiß 50 cg Zucker zugeführt worden war. Ferner kommen hier u. a. in Betracht Untersuchungen von *Fubini* (1891) mit Kurare, von *Féré* (1893—1898), über welche unten mehr gesagt werden wird, von *Mirto* (1899) mit Neurin, Äthylalkohol und Azeton, von *Schimkewitsch* (1902) mit Kochsalz, Zucker, Wasser; auch Versuche mit Nikotin und Bromlithium werden erwähnt. *Zaretsky* (1910) berichtet über Vitalfärbungsversuche an Hühnereiern.

Sowohl hinsichtlich der Anzahl der angestellten Versuche, wie auch hinsichtlich der Menge der geprüften Substanzen übertreffen die Untersuchungen *Férés* sämtliche, die ich sonst in der Literatur angetroffen habe, und ich möchte dieselben hier mit einigen Worten besprechen.

¹⁾ *W. Roux* teilt mir mit, daß er 1876 Berlinerblau in die Keimhöhle des Hühnchens injiziert hat in der Hoffnung, daß die sie umgebenden Zellen den Farbstoff aufnehmen würden und daß vielleicht etwas Genaueres über die Herkunft des Entoblast ermittelt werden könnte. Nach der Bebrütung zeigte sich aber statt des blauen Farbstoffes eine intensiv gelbe diffuse Färbung in der Umgebung der Keimhöhle, so daß nichts Bezügliches zu erkennen war.

Nachdem *Féré* in einer Anzahl früherer Versuche Räucherungen von Eiern mit verschiedenen gasförmigen oder flüchtigen Stoffen angestellt hatte, ging er 1893 zu Injektionen über. Die hierbei benutzte Methode beschreibt er mit folgenden Worten: »On perfore la coquille préalablement lavée, avec une aiguille flambée, vers la grosse extrémité, de la manière à pénétrer dans l'albumen, sans atteindre la chambre à l'air; et en prenant les précautions antiseptiques nécessaires, on pratique l'injection avec la seringue de Malassez. On a soin de pratiquer la perforation et de faire l'injection en maintenant l'oeuf dans une position telle que l'albumen (peut) s'échapper par l'orifice pour faire place au liquide. Lorsqu'on pousse l'injection, après avoir enfoncé profondément la canule, il arrive souvent, si la quantité du liquide injecté ne dépasse pas un quart ou même un demi-centimètre cube, qu'elle trouve sa place sans que l'albumen soit rejeté au dehors, en refoulant la chambre à l'air. S'il s'écoule une petite quantité d'albumen, on essuie l'orifice que l'on obture rapidement avec la cire bouillante.«

Mit dieser Methode findet er nun, daß man in das Eiklar hinein wenigstens 1 ccm sterilisierter Aqua dest. injizieren kann, ohne die Entwicklung zu hemmen. Ferner hat er auf diese Weise die Wirkung einer großen Reihe verschiedener Stoffe, und zwar Salze, Gifte und organischer Stoffe, wie Glukose, Pepton, Kreatin und Xanthokreatin usf., geprüft.

Ich habe keine Veranlassung, auf die Ergebnisse dieser Versuche hier näher einzugehen. Sie haben zwar vielfach für unsere vorliegenden Zwecke den Wert von Vorversuchen, sind aber unter ganz anderen Gesichtspunkten ausgeführt worden als die hier vorgenommenen Experimente. Für *Féré* war ebenso wie auch für alle übrigen mir aus der Literatur bekannten Experimentatoren auf diesem Gebiete der teratologische Gesichtspunkt der leitende, und die Analyse der Ergebnisse wurde nicht weiter geführt als bis zur Feststellung, wie viele äußerlich normale, wie viele äußerlich als Mißbildungen erkennbare Embryonen aus den Einzelversuchen hervorgegangen waren.

Ja, *Ferret* und *Weber* (1904, 1904/5) haben sogar die Läsion der sekundären Eihüllen des Hühnereies als teratologische Methode empfohlen. Sie haben dabei den Einfluß jedes der verschiedenen sukzessiven Eingriffe, des Brechens der Kalkschale, der Perforation der Schalenhaut und des Einführens eines Platinafadens ins Eiklar, geprüft. Von diesen Eingriffen erwies sich der letztgenannte als der teratogenetisch wichtigste, indem die Autoren dabei fast konstant bedeutende Mißbildungen erhielten. Bei der Bewertung dieser Ergebnisse ist aber zu beachten, daß die betreffenden Eingriffe, dem teratologischen Zweck dieser Forscher entsprechend, gerade in der Umgebung der Keim-

scheibe erfolgten. Wurde das Ei nach dem Eingriff 180° weit um seine Achse gedreht, so bekamen sie, obgleich der Einstich in der Nähe der Keimscheibe erfolgte, unter sämtlichen entwickelten Embryonen 63 % normale. Einstich am abschüssigen Teil des Eies («au point décliné de l'oeuf») rief ebenfalls keine Mißbildungen hervor.

Nach den Erfahrungen dieser beiden Autoren sollen Einstiche am spitzen Eipol auch besonders schädigend wirken: Alle so erhaltenen Embryonen waren nämlich abnorm. Da die Autoren ausdrücklich bemerken, daß ihre Versuche »wenig zahlreich« waren, so ist wohl zu vermuten, daß der Zufall bei diesem mit dem meinigen nicht übereinstimmenden Ergebnis mitgewirkt hat.

Ich für meinen Teil bin eher geneigt, der Äußerung von *Fol* und *Warynski* (1885) beizupflichten, wenn sie sagen (p. 313): »Nous ne songeons nullement à affirmer que l'enlèvement d'un segment de la coquille et sa remise en place ne puissent jamais exercer une influence sur le développement de l'embryon. Tout dépend de la manière dont l'opération est faite. Ce que nous pouvons affirmer, c'est qu'en procédant avec une certaine dextérité qui ne s'acquiert que par une longue pratique, on arrive à ne troubler en rien le cours du développement normal.«

Die jüngste Arbeit hier in Frage kommender Art, welche ich in der Literatur angetroffen habe, stammt von *Waelsh* (1914). Er injizierte scharlachgefärbtes Öl in das Dotter unter der Keimscheibe 24 Stunden nach dem Anfang der Bebrütung und untersuchte nach weiterer zweitägiger Bebrütung. Er fand Epithelwucherungen und »Vervielfachung« des Medullarrohrs am Hinterende des Embryos. Auf diese Befunde gestützt, meint er, daß das Scharlach ein Mittel ist, das bestimmte embryonale Zellen zur Wucherung anzuregen vermag. Dieser Deutung tritt *Weber* (1914) allerdings entgegen unter Hinweis darauf, daß seiner und *Ferrets* Erfahrung nach die bloße Beschädigung der Schalenhaut genügt, um derartige Mißgestaltungen hervorzurufen.

In keinem bisher veröffentlichten Aufsatz über die hier berührten Fragen habe ich Versuche angetroffen, die mit Hormonen bzw. mit innersekretorischen Organprodukten ausgeführt waren. Wie nahe aber die Vornahme gerade solcher Versuche in gegenwärtiger Zeit liegt, geht am besten daraus hervor, daß ich, nachdem meine seit langem geplanten Versuche schon begonnen waren, zufälligerweise erfuhr, daß Dr. *J. Näslund* schon im Herbst 1920 prinzipiell gleichartige Versuche mit Injektion von Corpus luteum-Lipoiden ausgeführt hatte. Nach mündlicher Mitteilung dieses Experimentators wurden diese Versuche in mehreren Fällen bis zum Ausschlüpfen des reifen Küchelchen aus dem Ei glücklich durchgeführt.

Durch diese Versuche, über welche wohl der Autor selbst Näheres mitteilen wird, gebührt die Priorität der Anwendung dieser Methode auf die innersekretorischen Probleme des Fötallebens allem Anschein nach Dr. Näslund.

Was die Vitalfärbung betrifft, so ist es überraschend, wie wenig von derartigen Versuchen an Vogelembryonen in der von mir durchgesehenen Literatur anzutreffen war. Während für den Säugerembryo mehrere Untersuchungen vorliegen, habe ich für den Vogelembryo überhaupt nur die oben erwähnte Arbeit von Zaretsky (1910) gefunden.

Die Farbstoffinjektionen wurden in seinen Versuchen meistens am zweiten oder dritten Tage der Bebrütung ausgeführt, also zu einem Zeitpunkt, wo das Gefäßsystem des Embryos schon in voller Entwicklung ist, gelegentlich noch später, am vierten, fünften und sechsten Tage. Die Injektionen erfolgten in die Luftkammer des Eies hinein. Geprüft wurden Pyrrolblau, Trypanblau, Methylenblau und Neutralrot. Mit allen diesen Stoffen war der Erfolg, was die Färbung des Embryos selbst anbetrifft, ein negativer. Dagegen färbten sich im Gefäßhof »die großen vaskularisierten (perivaskulären?) grobkörnigen Zellen«, indem ihr Protoplasma gefärbte Gebilde wechselnder Größe von kleinsten, staubförmigen bis zu großen, kugeligen hervortreten ließ.

Als besonders schädlich erwies sich das Neutralrot, indem es nach zwei bis drei Tagen den Tod des Embryo hervorrief; wurde die Injektion mit dem Farbstoffe vor dem Beginn der Bebrütung vorgenommen, so trat gar keine Entwicklung ein.

Nur die Injektion einer Fluoreszinlösung war erfolgreich. Eine 0,5 % ige Fluoreszinlösung erwies ebenso wie beim Säugerembryo die Penetrationsfähigkeit dieses Farbstoffes in die Gewebe des sich entwickelnden Embryo, seine absolute Unschädlichkeit und schnelle Wiederentfernung aus dem Organismus. Die Beobachtung zeigte ferner, daß das Eindringen des Fluoreszins in die embryonalen Gewebe durch Resorption des gefärbten Eiweißes erfolgt war.

Nachschrift.

Das Vorstehende wurde schon vorigen Herbst niedergeschrieben. Ich habe jedoch die Veröffentlichung verschoben in der Hoffnung, zuvor noch einige weitere Versuche anstellen zu können. Insbesondere hoffte ich, den angeblich lipoiden Extrakt des Vorderlappens der Hypophyse prüfen zu können, der in Amerika unter dem Namen Tethelin verwendet und wegen seiner kräftigen Wirkung gelobt worden ist. Leider ist mir dies jedoch nicht möglich geworden, da die einzige Firma, welche meines Wissens das Präparat für Handelszwecke herstellte, die H. K. Mulford Company in Philadelphia, mir brieflich mitteilte, daß sie mit der Herstellung nunmehr aufgehört hat.

Unter solchen Umständen beschloß ich, die Verwendbarkeit einiger anderer lipoider Stoffe zu Experimenten vorliegender Art in den Bereich der Untersuchung zu ziehen; ich tat dies um so lieber, als ich über eine relativ beträchtliche Menge von Lipoidstoffen verfügte, welche ich im Laufe einer anderen Untersuchung aus menschlichen Nebennieren durch Äther- bzw. Alkohol-Ätherextraktion und nachfolgender Verflüchtigung des Extraktionsmittels isoliert hatte.

Die betreffenden Nebennierenlipoide waren teils ungefärbt, teils mit Scharlach R stark gefärbt. Sowohl die ungefärbten als auch die gefärbten Lipoide entstammten einer großen Zahl — jede der beiden Gruppen ungefähr 50 — Nebennieren von Personen verschiedenen Alters und verschiedener Todesart. Sie wurden, die ungefärbten für sich und die gefärbten für sich, bei schwacher Wärme alle miteinander vermischt. Die Mischungen stellten eine bei Zimmertemperatur festweiche Masse dar, welche, um injiziert werden zu können, mit Pflanzenöl verdünnt wurde. Eine Hälfte der ungefärbten und eine Hälfte der gefärbten Lipoidportion wurden also mit Olivenöl zu gleicher Menge vermischt; den anderen Hälften wurde Mandelöl in gleicher Menge beigemischt. Von diesen verdünnten Lipoidgemischen wurden Dosen von 0,2 bzw. von 0,4 und 0,8 ccm insgesamt 80 Eiern injiziert. Zur Kontrolle dienten einerseits 20 ganz unbehandelte Eier, andererseits 60 weitere, denen Oliven- bzw. Mandelöl oder *Adeps lanae* in Dosen von 0,2 ccm injiziert wurden; alle die drei letzterwähnten Fettstoffe kamen sowohl ungefärbt als auch mit Scharlach gefärbt zur Verwendung. Die Versuchsserie umfaßte demnach im ganzen 160 Eier, von welchen etwa ein Drittel jeder Behandlungsart nach 7 tägiger, etwa ein Drittel nach 14 tägiger und ein etwa Drittel nach 21 tägiger Bebrütung untersucht wurde. Die Eröffnung der Eier wurde unter Wasser von Körpertemperatur vorgenommen.

Die 20 unbehandelten Kontrolleier ergaben nach 7 Tagen 4, nach 14 Tagen 6 und nach 21 Tagen 4, insgesamt also 14 Föten, von denen einer tot war. Die entsprechenden Zahlen der mit verdünnten Lipoidstoffen injizierten 80 Eier waren 5 bzw. 10 und 14, insgesamt also 29 Föten, von denen 13 abgestorben waren. Für die bloß mit Fetten gespritzten 60 Eier waren die entsprechenden Zahlen: 13, 10 und 9, insgesamt also 32, darunter 20 abgestorbene. Unter den 8 reifen Föten, die aus den injizierten Eiern hervorgingen, welche nach 21 Tagen untersucht wurden, entstammten 2 Eiern, die mit 0,2 ccm ungefärbtem Olivenöl injiziert waren und 1 einem mit der gleichen Quantität ungefärbtem Mandelöl behandeltem Ei; 2 waren mit 0,2 ccm ungefärbter Lipoid-Ölivenölmischung, 1 mit 0,2 ccm der gleichen gefärbten Mischung und 2 waren mit 0,4 ccm ungefärbter Lipoid-Mandelölmischung behandelt worden.

Ich brauche auf weitere Einzelheiten der verschiedenen Versuche nicht einzugehen, da die Untersuchung der injizierten Eier mit überzeugender Klarheit zeigte, daß die Ursache der übergroßen Schädigung, des beträchtlichen Prozentsatzes unentwickelter Eier und während der Entwicklung abgestorbener Embryonen nicht in erster Linie in der verschiedenen chemischen Beschaffenheit der injizierten Substanzen zu suchen ist.

Es lagen sogar in keinem einzigen Falle positive Belege dafür vor, daß die eingespritzten Lipide und Fette wirklich von dem Fötus resorbiert worden waren. Nur in den soeben erwähnten Fällen, wo aus injizierten Eiern reife Föten hervorgingen, ließ sich aus dem Umstande, daß diese Stoffe nicht wiedergefunden werden konnten, eine Resorption derselben erschließen. Sonst waren die injizierten Stoffe in allen Fällen bei der Nachuntersuchung im Eiklar zu sehen, und zwar mit besonderer Auffälligkeit dort, wo sie durch die Scharlachfärbung kenntlich gemacht worden waren.

Der erhobene Befund macht es recht wahrscheinlich, daß *in das Eiklar injizierte wasserunlösliche Stoffe in den früheren Stadien der Embryonalentwicklung nicht zur Resorption kommen, sondern erst mit dem im Endstadium stattfindenden totalen Einverleiben des Eiklars in den Fötus aufgenommen werden.*

Die Verteilung der injizierten Stoffe, besonders auffällig, wo es sich um gefärbte Stoffe handelte, bot eine genügende Erklärung für den Ausfall der Entwicklung. Die injizierten Substanzen hatten sich in einigen Fällen gerade an der Einstichstelle am spitzen Eipol angesammelt und waren hier von einer festen Schicht von Eiklar gleichsam eingekapselt. Dies war dort der Fall, wo die Eier zur Entwicklung gekommen waren. In der Mehrzahl der Fälle war aber eine derartige vollständige Abkapselung nicht erfolgt. Die injizierte Substanz war ihrem geringeren spezifischen Gewicht entsprechend innerhalb des Eiklars in größerer oder geringerer Menge bis zu dem höchsten Punkte des Eies aufgestiegen und hatte sich dort über die Keimscheibe ausgebreitet. In den Fällen, wo es sich um die leichtbeweglichen Öle handelte, hatte sich ferner bei der Umwendung der Eier, welche während der Bebrütung stattfand, die Ölschicht der neuen Lage des Eies immer wieder angepaßt und war also auch jetzt nach dem höchsten Punkt des Eies gewandert. So fanden sich fast regelmäßig in den mit gefärbtem Öl beschickten Eiern an der Innenseite der Schale drei rotgefärbte Flecke: einer an der Einstichstelle am spitzen Pol und zwei an den beiden Stellen des Äquators, wo die angeschriebenen Nummern die während der Bebrütung des Eies zu oberst liegenden Punkte anzeigten.

Eine solche Ausbreitung der injizierten Stoffe innerhalb der Eischale dürfte wohl, von anderen denkbaren Wirkungen abgesehen, ein

ähnliches Hindernis für den Gasaustausch des Eies darstellen, wie dies erfahrungsgemäß eine Überziehung der Schale mit Firnis im Gebiete der Keimscheibe bewirkt. Es ist deshalb erklärlich, daß in beiden Fällen der Einfluß auf den Keim gleich deletär ist. Hiermit ist eine Erfahrung über die Grenzen der Brauchbarkeit der Methode gewonnen, die mir wichtig genug zu sein scheint:

Injizierte Stoffe, die spezifisch leichter als das Eiklar und in demselben nicht löslich sind, gefährden, wenn sie nach der Injektion ins Eiklar dem Gesetze der Schwere Folge leisten können, das Leben des Keims, indem sie sich oberhalb der Keimscheibe ansammeln und den Gasaustausch erschweren.

Ich habe hier einen Versuch gemacht, die Aufmerksamkeit auf eine schon alte Methode zu lenken, die geeignet zu sein scheint, in der Neuzeit aktuell gewordene Probleme der Konstitutionsforschung experimentell klarzulegen. Ich möchte meine Darlegungen nicht beschließen, ohne hervorgehoben zu haben, daß in jüngerer Zeit eine andere Methode veröffentlicht worden ist, die vielleicht demselben Zweck wie die hier beschriebene dienlich gemacht werden kann. Ich meine die von *Murphy* (1913) und *Vera Danchakoff* (1916, 1918) geübte Überpflanzung lebender Zellen auf die Allantois des Vogeleies. Da diese Gewebeskultur indessen erst dann ausführbar zu sein scheint, wenn die Allantois sich mit ihren Gefäßen an der Innenfläche der Eischale ausgebreitet hat, also am Ende der ersten Bebrütungswoche, so hat sie anscheinend eine zeitlich beschränkere Brauchbarkeit als die hier behandelte Methode.

Welche tiefgreifenden Einwirkungen auf den Fötus nichtsdestoweniger durch Gewebskulturen dieser Art an der Allantois des wachsenden Vogeleies hervorgerufen werden können, dafür erbringen die hochinteressanten Resultate über eine Umgestaltung der Leukozytenverhältnisse des Fötus durch Milztransplantation, über welche besonders die letzterwähnte Verfasserin berichtet, eindrucksvolle Belege.

Auf meinen Vorschlag hin hat Dr. *J. Näslund* eine Prüfung der Verwendbarkeit der betreffenden Transplantationsmethode über eine Frage innersekretorischer Natur begonnen.

Literatur.

(Mit * bezeichnete Arbeiten waren mir nicht zugänglich.)

Béguelin, 1749, Mémoire sur l'art de couvrir les œufs ouverts. Histoire de l'Acad. des Sciences et Belles-Lettres Berlin. p. 71. — *Danchakoff, Vera*, 1916, Equivalence of Different Hematopoietic Anlages. (By the Method of Stimulation of Their Stem Cells.) I. Spleen. Am. Journ. Anat. 20. — *Dies*, 1918, II. Grafts of Adult Spleen on the Allantois and Response of the Allantoic Tissues. Ibi-

dem 24. — *Féré, Ch.*, 1894—1898, Eine große Menge kleiner Mitteilungen in *Compt. rend. Soc. Biol. Paris*, Sér. X, 1—3, 5. — Ders., 1895, Études expérimentales sur l'influence tératogène ou dégénérative des alcools et des essences sur l'embryon de poulet. *Journ. de l'anat. et de la physiol.* 31. — Ders., 1897, Note sur la résistance de l'embryon de poulet aux traumatismes de l'œuf. *Ibidem* 33. — *Ferret, P. E.*, 1904, Essai d'embryologie expérimentale. Influence tératogénique des lésions des enveloppes secondaires de l'œuf de poulet. Thèse, Nancy. (Auch in *Arch. d'anat. microscop.* 7.) — Ders. u. *Weber, A.*, 1904, Malformations du système nerveux de l'embryon de poulet obtenus expérimentalement. Anomalies des ébauches oculaires primitives. *Compt. rend. Soc. Biol. Paris* 56. — *Fol, H.*, u. *Warynski, S.*, 1885, Sur la méthode en tératogénie. *Recueil zool. suisse* 2. — **Pubini*, 1891, Influence du curare sur le développement du poussin. *Arch. ital. de biol.* 15. — *Gerlach, L.*, 1882, Über ein Verfahren, bei horizontal gelagerten Hühnereiern den die Keimscheibe überdeckenden Bezirk der Eischale möglichst genau zu bestimmen. *Sitzungsber. Phys.-med. Soc. Erlangen*. — *Goldschmidt, R.*, 1917, Intersexuality and the endocrine aspect of sex. *Endocrinology* 1. — *Hammar, J. A.*, 1912, Lipoidbildung in den weißen Blutkörperchen. Mikroskopische Studien zur Autolyse des Blutes. *K. Svenska Vet.-Akads. Handl. N. F.* 49, 3. — *Lillie, F. R.*, 1903, Experimental Studies on the Development of the Organs in the Embryo of the Fowl (*Gallus domesticus*). *Biol. Bull.* 5. — Ders., 1917, The freemartin; a study of the action of sex hormones in foetal life of cattle. *Journ. Exper. Zool.* 23. — *Loisel, G.*, 1900, Incubation d'ovules de poule retirés de leur coquille. *Compt. rend. Soc. Biol. Paris* 52. — Ders., 1900, 2, Développement d'ovules de poule incubés dans de l'albumen de canard. *Ibidem*. — *Mirto, G.*, 1899, Sul potere teratogeno o degenerativo della neurina, dell'alcool etilico e dell'acetone sul sistema nervoso embrionale. *Ann. di Neurologia* 27. — *Murphy, J. B.*, 1913, Transplantability of Tissues to the Embryo of Foreign Species. Its Bearing on Questions of Tissue Specificity and Tumour Immunity. *Journ. exp. Med.* 17. — Ders., 1916, The effect of adult chicken organ grafts on the chick embryo. *Ibidem* 24. — *Peebles, Florence*, 1898, Some Experiments on the Primitive Streak of the Chick. *Arch. f. Entw.-Meeh.* 7. — **Pouchet* u. *Beauregard*, 1877, Note sur le développement d'œuf à l'albumine desquelles on a ajouté 50 centigr. du sucre cristallisé. *Gaz. méd. de Paris*. — *Preyer, W.*, 1884, Spezielle Physiologie des Embryo. Leipzig. — *Schimkewitsch, W.*, 1902, Über die Entwicklung des Hühnchens unter künstlichen Bedingungen. *Anat. Anz.* 20. — **Tarulli, L.*, 1890, La pressione nell'intorno dell'uovo di pollo e i suoi effetti sullo sviluppo. *Atti e Rendiconti d'Accad. med.-chir. Perugia* 2. — *Teuscher, H.*, 1888, Einige Beobachtungen am lebenden Hühnerembryo. *Fortschr. d. Med.* 6. — *Waelach, L.*, 1914, Über experimentelle Erzeugung von Epithelwucherungen und Vervielfachungen des Medullarrohres bei Hühnerembryonen. *Arch. f. Entw.-Meeh.* 38. — *Weber, A.*, 1914, A propos du travail de *L. Waelach* intitulé: Experimentelle Erzeugung usw. *Ibidem* 40. — *Zaretzky, S.*, 1910, Versuche über vitale Färbung des Embryo. *Virchows Arch.* 201.