(Aus der anatomischen Abteilung des Carolinischen Institutes in Stockholm
und dem physiologischen Institut der Universität Upsala.)

Der osmotische Druck während der Embryonalentwicklung von *Rana temporaria*.

Von

E. Louis Backman und J. Runnström.

Inhaltsübersicht.

	Seite
I. Einleitung	287
II. Kulturen in Salzlösungen	292
III. Bestimmungen des Gefrierpunktes	300
IV. Bestimmungen des Volums von Embryonen auf verschiedenen Entwicklungsstufen	306
V. Die Ursache der Reduktion des osmotischen Druckes	316
VI. Welche zellulären Prozesse bedingen die Reduktion des osmotischen Druckes?	325
VII. Anpassung oder phylogenetische Erscheinung?	332
VIII. Der Zusammenhang zwischen der Parthenogenese und der Reduktion des osmotischen Druckes	335
IX. Die Ursache der Steigerung des osmotischen Druckes	342
X. Zusammenfassung	344

I. Einleitung.

Der Inhalt der Zellen stellt eine Mischung verschiedener disperser Systeme dar. Als Dispersionsmittel kann das Wasser, das in grösserer oder geringerer Quantität in jeder lebenden Zelle vorkommt, angesprochen werden. Die übrigen Bestandteile des Zellinhaltes sind die verschiedenen dispersen Phasen. Derartige Phasen sind: Lipoide, Eiweissstoffe, anorganische Salze usw. Der Dispersionsgrad kann natürlich erheblich wechseln: es kommen reine Emulsionen vor, die als Tröpfchen erscheinen können; ferner gelatinierte Phasen, ohne scharfe Grenzen in den festen Aggregatzustand übergehend, welche als gewisse Strukturbilder, wie z. B. Fibrillen, Netzbildungen und

vielleicht selbst Schaumfigurationen, hervorbringend gedacht werden können. Ebenso können die kolloiden Lösungen selbst von verschiedenen Dispersitätsgraden sein, und endlich kommen sogenannte echte Lösungen vor, die entweder molekulardispers mit unbedeutender Molekulargrösse oder molekular- und iondispers sein können. Es ist dabei ein Gleichgewicht zwischen der Anzahl der Moleküle und der der Ionen vorhanden; bei unendlicher Verdünnung herrscht vollständige Ionisation. Der osmotische Druck einer Lösung ist der Anzahl der gelösten Moleküle und Ionen proportional. Die Folge dieses Verhältnisses ist auch, dass kolloide Lösungen einen sehr niedrigen bis gar keinen osmotischen Druck geben. Der osmotische Druck der Zelle muss also hauptsächlich und zum grösseren Teil von den feineren dispersen Phasen und demzufolge vor allem von den in den Zellen überhaupt in der höchsten Prozentquantität vorkommenden anorganischen Alkalisalzen und übrigen Kristalloiden abhängen.

Im allgemeinen dürfte man sagen können, dass, wenn eine Zelle in einem flüssigen Medium sich befindet, wie ein solches im tierischen Organismus im Blut und in den Gewebsflüssigkeiten gegeben ist, stets ein Ausgleich zwischen dem osmotischen Druck der Zelle und dem des umgebenden Mediums durch Aufnahme oder Abgabe von Wasser von seiten der Zelle vor sich gehen muss, vorausgesetzt, dass die Hautschicht der Zelle — wie es in den meisten Fällen sich verhält — als eine semipermeable Membran angesprochen werden kann. Es können dann grössere Druckdifferenzen nur entstehen, wenn ein mechanisches Hindernis für die Volumveränderungen der Zelle vorhanden ist, so wie es z. B. bei gewissen Pflanzenzellen mit besonders stark entwickelten Membranen der Fall ist und auch bei manchen tierischen Zellen vorkommen dürfte. Als Regel darf wohl gelten, dass die Zelle nicht die Fähigkeit besitzt, allzu grosse Differenzen zwischen ihrem eigenen osmotischen Drucke und dem der Umgebung zu ertragen, oder besser ausgedrückt: dass ihr nicht die Fähigkeit zukommt, sich den Ausgleichsprozessen, die infolge der Differenz des osmotischen Druckes in Wirksamkeit treten, anzupassen, wenn wir von einer Anpassungsfähigkeit innerhalb sehr enger Grenzen absehen. Befindet sich nun die Zelle in einem hypertonischen Medium, so wird ein Herausdiffundieren von Wasser aus der Zelle in die Umgebung stattfinden, wodurch wieder eine Konzentrierung von den in der Zelle gelösten Stoffen bewirkt wird; die Zelle schrumpft. Diese Konzentrierung aber wird die normalen

Lösungsverhältnisse stören, und da das Lösungsverhältnis der Kolloide in erheblichem Grade von dem Vorhandensein und der Konzentration gewisser anorganischer Ionen abhängig ist, werden Veränderungen dieser Art geradezu eine Fällung, eine Gelumwandlung von Kolloiden hervorrufen, was den Tod der Zelle zur Folge haben kann. Wenn aber die Zelle von einem hypotonischen Medium umgeben ist, so wird die Zelle Wasser aus der Umgebung aufnehmen und demzufolge schwellen, was so lange andauern wird, bis die Elastizität der Zellmembran überschritten und die Zellwand gesprengt wird. Auch die Wasseraufnahme wird eine veränderte Konzentration der verschiedenen Ionen hervorrufen und somit veränderte Lösungsverhältnisse für die Kolloide schaffen. Es steht ja fest, dass ein gewisser Gehalt an anorganischen Salzen notwendig ist, um Globuline in Lösung zu erhalten, und dass die Globuline bei Verminderung des Salzgehaltes ausgefällt werden.

Anderseits glauben aber Loeb¹⁾ u. a. behaupten zu müssen, dass es auch Tierzellen gibt, die eine Hautschicht besitzen, die für Wasser vollständig oder beinahe vollständig impermeabel, für verschiedene Arten von Ionen aber in ungleichem Grade permeabel ist, wie z. B. das Ei des Fundulus.

Es gibt aber auch tierische Formen, deren Zellen in sehr hohem Grade die Fähigkeit zukommt, sich Schwankungen in dem osmotischen Druck ihres Mediums anzupassen. So hat u. a. Frédéricq²⁾ gefunden, dass eine Mehrzahl der im Meere lebenden wirbellosen Tiere ihren eigenen osmotischen Druck in Übereinstimmung mit dem der Umgebung mehr oder weniger schnell ändern können. Dasselbe ist nach den Untersuchungen von Bottazzi³⁾ auch hinsichtlich der Selachier der Fall. Die Veränderungen in dem eigenen osmotischen Druck dieser Tiere kommen nicht bei allen Formen in derselben Weise zustande. Bei den am tiefsten stehenden Arten werden diese Veränderungen vielleicht einfach durch Hinaus- und Hineindiffundieren von Wasser verursacht. Dagegen dürften die Verhältnisse mehr kom-

1) J. Loeb, Die chemische Entwicklungserregung des tierischen Eies. J. Springer, Berlin 1909.

2) C. Frédéricq, Influence du milieu ambiant sur la composition du sang des animaux aquatiques. Arch. de Zool. exp. Sér. 2 t. 3 p. XXXIV. 1885.

3) Fil. Bottazzi, Osmotischer Druck und elektrische Leitfähigkeit der Flüssigkeiten der einzelligen, pflanzlichen und tierischen Organismen. Ergebn. d. Physiol. Bd. 9 S. 161. 1908.

pliziert sein z. B. bei den Selachiern, bei denen eine vollständige Übereinstimmung zwischen dem osmotischen Druck des inneren und dem des äusseren Mediums zwar vorhanden, die chemische Zusammensetzung dieser beiden Medien aber nichtdestoweniger sehr verschieden ist. Bei diesen Tieren sind nämlich etwa 50 % von dem NaCl-Gehalt des Meereswassers durch Harnstoff ersetzt¹⁾. Hinsichtlich der Selachier kann man also an die Funktion der Nieren als wenigstens eines der den osmotischen Druck bestimmenden Faktoren denken. Dass ein Faktor derselben Art auch für manche Mollusken von Bedeutung ist, dürfte man vielleicht daraus schliessen können, dass ihre Organflüssigkeiten vom Meereswasser qualitativ ziemlich abweichen, und auch aus einigen Versuchen, die einer von uns (J. Runnström) während des Sommers 1910 ausgeführt hat, und in denen gezeigt wurde, dass, wenn Mollusken aus normalem Meereswasser in verdünntes Meereswasser versetzt werden, Wasser nicht aufgenommen wird. Erst unter den Teleostiern trifft man gemäss der herrschenden Auffassung Formen an, welche einen eigenen osmotischen Druck besitzen, der bei den Süsswassertieren grösser als der der Umgebung, bei den Salzwassertieren aber niedriger als dieser ist. Aber auch die Teleostier zeigen beim Versetzen aus Salzwasser in Süsswasser oder umgekehrt eine mehr oder weniger erhebliche Veränderung ihres eigenen osmotischen Druckes, die in derselben Richtung vor sich geht wie die Veränderung im osmotischen Drucke der Umgebung. Man nimmt an, dass die Fähigkeit des Organismus, den eigenen osmotischen Druck auf einem konstanten, von der Umgebung unabhängigen Niveau beibehalten zu können, erst bei den Landvertebraten angetroffen wird. Die Tiere können daher in zwei grosse Gruppen eingeteilt werden: in homoiosmotische Tiere, welchen die Fähigkeit zukommt, ihren osmotischen Druck konstant zu erhalten, und poikilosmotische, welchen diese Fähigkeit nicht zukommt (Höber). Nach Höber²⁾, Bottazzi³⁾, Hamburger⁴⁾ u. a. soll die Homoiosmose eine Fähigkeit

1) S. Baglioni, Einige Daten zur Kenntnis der quantitativen Zusammensetzung verschiedener Körperflüssigkeiten von Seetieren. Hofmeister's Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. Bd. 9 S. 50. 1906.

2) R. Höber, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. W. Engelmann, Leipzig 1906.

3) Fil. Bottazzi, l. c.

4) H. J. Hamburger, Osmotischer Druck und Ionenlehre in den med. Wissenschaften. Bergmann, Wiesbaden 1902.

sein, die nur allmählich im Verlaufe der Entwicklung erworben wird; die Entwicklung soll einen Druck von acht Atmosphären (den der Landvertebraten) zum Ziele haben. Erst bei den Amphibien soll diese Eigenschaft vollkommen ausgeprägt vorhanden sein. Unser gewöhnlicher Frosch wäre demgemäss ein vollkommen homoiosmotisches Tier.

Gegen diese Einteilung der Tierwelt in die zwei grossen Gruppen der homoiosmotischen und poikilosmotischen Tiere dürften indessen Einwände gemacht werden können. Die schon längst festgestellte Tatsache, dass sowohl der gewöhnliche Krebs als auch ein Teil der Süsswassermollusken einen eigenen osmotischen Druck besitzen, der von der Umgebung unabhängig zu sein scheint, hätte doch an und für sich, wenn man besser darauf acht gegeben hätte, die Aufstellung der Hypothese niemals erlaubt, „dass mit der Erlangung einer gewissen Entwicklungsstufe die Emanzipierung vom osmotischen Druck beginnt“ [Höber¹⁾]. Einer von uns beiden [L. Backman²⁾] hat Versuche an Wasserkäfern und Libellen ausgeführt, welche deutlich zeigen, dass schon bei diesen Tieren die homoiosmotische Eigenschaft vollkommen ausgebildet ist, wenigstens wenn nur die Verhältnisse, unter denen diese Tiere normal leben, in Betracht kommen. Darum liegt die Folgerung (als die wahrscheinlichste) am nächsten, dass die Homoiosmose grösstenteils eine durch Anpassung an äussere Verhältnisse erworbene Eigenschaft ist, die durch das Bedürfnis der Zellen, sich gegen Schwellung und Trocknen zu schützen, veranlasst worden ist³⁾. Di Homoiosmose wäre somit eine Anpassungserscheinung bei gewissen speziellen Tiergattungen, nicht dagegen eine allmählich während der fortlaufenden Phylogenese immer deutlicher auftretende Entwicklungserscheinung.

Indessen dürfte man teilweise zugestehen können, dass auch die Phylogenie hier von Bedeutung ist und in Betracht gezogen werden muss,

1) R. Höber, l. c.

2) E. Louis Backman, Der osmotische Druck bei einigen Wasserkäfern Zentrabl. f. Physiol. Bd. 25 S. 779. 1911. — E. Louis Backman, Über den osmotischen Druck der Libellen während ihrer Larven- und Imago Stadien. Zentrabl. f. Physiol. Bd. 25 S. 835. 1911.

3) E. Louis Backman, Über die Entstehung der homoiosmotischen Eigenschaften. Zentrabl. f. Physiol. Bd. 25 S. 837. 1911.

wenn es gilt, sich ein Urteil über die osmotischen Druckverhältnisse eines Tieres zu bilden. So hat man gefunden, dass eine Meeresschildkröte, *Thalassochelys caretta*¹⁾, ungefähr denselben osmotischen Druck wie die Landvertebraten besitzt; so verhält es sich auch mit den im Salzwasser lebenden Vertebraten überhaupt²⁾.

II. Kulturen in Salzlösungen.

Eine Frage, die bisher sehr wenig beachtet worden ist, ist die nach den osmotischen Druckverhältnissen bei dem Individuum während dessen embryonaler Entwicklung sowie bei dem Ei während der Befruchtung und der ersten Zellteilungen. Die letztgenannte Frage dürfte kaum je aufgestellt worden sein.

A priori dürfte man zu vermuten berechtigt sein, dass die Verhältnisse wesentlich verschieden sein können, je nachdem die Embryonalentwicklung innerhalb oder ausserhalb des mütterlichen Organismus vor sich geht. Im ersten Falle könnte man sich die Entstehung von Verschiedenheiten denken, die davon abhängig wären, ob ein Nahrungsaustausch zwischen dem Organismus des Muttertieres und dem des Embryos vorhanden ist oder nicht. Man weiss ja, dass das Blut des menschlichen Fötus und das der Mutter isotonisch sind [Krönig und Fueth³⁾]. Dagegen hat man aber feststellen können, dass beim Schafe das fötale Blut hypertonisch im Verhältnis zu dem des Muttertieres ist [Jacqué⁴⁾]. Unlängst ist es Atkins⁵⁾ gelungen, zu zeigen, dass die Eier einiger Vögel einen höheren Gefrierpunkt

1) Fil. Bottazzi, l. c.

2) Jolyet, Sur quelques conditions de l'adaptation des mammifères cétacés à la vie constante aquatique. *Compt. rend. soc. Biol.* t. 54 p. 293. 1902. — P. Portier, Détermination de la pression osmotiques du sang et des liquides internes des vertébrés des contrées polaires arctiques. *Compt. rend. soc. Biol.* t. 62 p. 627. 1907.

3) Krönig und Fueth, Vergleichende Untersuchungen über den osmotischen Druck im mütterlichen und kindlichen Blut. *Monatschr. f. Geburtsh. u. Gynäkol.* Bd. 13 H. 2. 1901.

4) Jacqué, De la genèse des liquides amniotiques allantoidiens. *Arch. intern. de Physiol.* t. 3. 1905/06. — Jacqué, De la genèse des liquides amniotiques et allantoidiens. *Mém. publ. p. l'Acad. R. de Belgique* 1902.

5) G. Atkins, The osmotic pressure of the blood and eggs of birds. *Proc. Dublin Soc.* t. 12 p. 123. 1909. — G. Atkins, The osmotic pressure of the egg of the common fowl and its changes during incubation. *Biochemic. Journ.* vol. 4. p. 480. 1909.

als das Blutserum des erwachsenen Tieres haben, dass das Ei also einen niedrigeren osmotischen Druck als der Vogelorganismus hat. Diese Untersuchungen von Atkins werden wir weiter unten näher erörtern.

Wie schon vorher hervorgehoben wurde, wird der Frosch als ein vollkommen homoiosmotisches Tier angesprochen. Sein Verhältnis zu den übrigen Tierklassen hinsichtlich des osmotischen Druckes geht auch aus folgender Tabelle hervor:

Tabelle I.

Tierart		Gefrierpunkt des Serums oder der Körperflüssigkeit	Untersucher
<i>Coelenterata:</i>	<i>Alcyonum palmatum</i> . . .	— 2,196°	Bottazzi ¹⁾
<i>Echinodermata:</i>	<i>Asteropecten aurantiacus</i> . . .	— 2,312°	" ¹⁾
<i>Vermes:</i>	<i>Sipunculus nudus</i>	— 2,31°	" ¹⁾
<i>Crustacea:</i>	<i>Maja squinado</i>	— 2,36°	" ¹⁾
	<i>Astacus fluviatilis</i>	— 0,80°	Frédéricq ²⁾
	<i>Ocropus macropus</i>	— 2,24°	Bottazzi ¹⁾
<i>Insecta:</i>	<i>Dytiscus marginalis</i>	— 0,56°	Widmark ³⁾
<i>Selacchii:</i>	<i>Mustelus vulgaris</i>	— 2,98°	Bottazzi ¹⁾
<i>Teleostii:</i>	<i>Crenilabrus pavo</i>	— 0,74—0,76°	" ¹⁾
	<i>Box salpa</i>	— 0,82—0,88°	" ¹⁾
	<i>Anguilla vulgaris</i>	— 0,58—0,69°	Frédéricq ²⁾
	<i>Barbus fluviatilis</i>	— 0,475—0,558°	" ²⁾
<i>Amphibia:</i>	<i>Salamandra maculata</i>	— 0,479°	Höber ⁴⁾
	<i>Rana esculenta</i>	— 0,465°	" ⁴⁾
<i>Reptilia:</i>	<i>Emys europaea</i>	— 0,475°	" ⁴⁾
	<i>Thalassochelys caretta</i>	— 0,61°	Bottazzi ¹⁾
<i>Mammalia:</i>	<i>Ovis aries</i>	— 0,619°	Hamburger ⁵⁾
	<i>Lepus cuniculus</i>	— 0,592°	" ⁵⁾
	<i>Felis domestica</i>	— 0,638°	" ⁵⁾
	<i>Canis familiaris</i>	— 0,571°	" ⁵⁾
	<i>Homo sapiens</i>	— 0,526°	" ⁵⁾

Da nun unser gewöhnlicher Frosch, *Rana temporaria*, obwohl im erwachsenen Zustande in gewissem Grade ein Landtier, seine Eier jedoch in Süsswasser ablegt, wo sowohl die Befruchtung als auch die embryonale, sowie die larvale Entwicklung vor sich gehen, so erscheint die Vermutung nicht ganz unberechtigt, dass eben die verschiedenen äusseren Verhältnisse, in denen der Frosch die ver-

1) Fil. Bottazzi, l. c.

2) C. Frédéricq, l. c.

3) E. P. M. Widmark, Notizen über den osmotischen Druck der Hämolymphe einiger Wasserkäfer. Zeitschr. f. allg. Physiol. Bd. 10 S. 431. 1910.

4) R. Höber, l. c.

5) H. J. Hamburger, l. c.

schiedenen Stufen seiner Entwicklung durchlebt, die Verschiedenheiten in den inneren Eigenschaften des Tieres zustande bringen könnten. Als wir im Frühling des Jahres 1909 in der anatomischen Abteilung des Carolinischen Institutes zu Stockholm eine Untersuchung über die Wirkung verschiedener organischer und anorganischer Salzlösungen auf die embryonale Entwicklung des gewöhnlichen Frosches, *Rana temporaria*, begonnen hatten ¹⁾, fanden wir sehr bald, wie weiter unten geschildert wird, dass die Wirkung, die isotonische Lösungen verschiedener Salze hervorriefen, im grossen und ganzen ziemlich übereinstimmend war. Wir sahen uns daher veranlasst, eine namentlich osmotische, nicht aber eine spezifische Wirkung der Salzlösungen anzunehmen. Da wir aber auch von Salzkonzentrationen, die isotonisch oder selbst hypotonisch im Verhältnis zum Serum des erwachsenen Frosches waren, dieselbe Wirkung erhielten, wurden wir zu der Vermutung geleitet, es seien das befruchtete Froschei und seine früheren Entwicklungsstadien hypotonisch, nicht aber isotonisch gegenüber dem erwachsenen Frosch. Da diese Erscheinung zum Teil schon an und für sich das grösste Interesse darbot, weiterhin aber auch uns sehr geeignet erschien, unsere Auffassung von der Natur der Homoiosmose zu verändern, so unternahmen wir Untersuchungen, die dahin ausgingen, festzustellen, wie sich der osmotische Druck des Froscheies bei der Befruchtung und während der embryonalen Entwicklung verhält.

Diese Untersuchungsreihe wurde in der anatomischen Abteilung des Carolinischen Institutes zu Stockholm begonnen, und über die Versuche, welche dort ausgeführt wurden, haben wir in einer vorläufigen Mitteilung in der Biochemischen Zeitschrift (1909) ziemlich ausführlich berichtet. Während des Frühlings 1910 haben wir diese Untersuchungen fortgesetzt und vorläufig zum Abschluss gebracht. Diese weiteren Untersuchungen sind im physiologischen Institut der Universität Upsala ausgeführt. Es ist uns eine angenehme Pflicht, dem Direktor der anatomischen Abteilung, Herrn Prof. Dr. med. E. Müller, sowie dem Direktor

1) E. Louis Backman und J. Runnström, Physikalisch-chemische Faktoren bei der Embryonalentwicklung. Biochem. Zeitschr. Bd. 22 S. 290. 1909. Compt. rend. Soc. Biol. t. 67 p. 414. 1909. — E. Louis Backman und J. Runnström, Osmotiska tryckets förhållande hos *Rana temporaria* under embryonalutvecklingen. Upsala Läkareförenings Förh. t. 16 p. 350. 1911.

des physiologischen Institutes, Herrn Prof. Dr. med. Hj. Öhrvall auch an dieser Stelle unseren aufrichtigsten Dank auszusprechen für die Erlaubnis, unsere Untersuchungen in den genannten Instituten auszuführen, und für die uns zuteil gewordene grosse Liebenswürdigkeit.

Das Wasser, worin die Frösche laichen, ist sehr arm an Salzen und hat daher einen Gefrierpunkt, der erheblich höher liegt als der Gefrierpunkt des Froschserums:

Serum von *Rana temporaria* $\Delta = 0,456$

Süsswasser, worin der Froschlaich gelegt wird . . $\Delta = 0,060$

So entsteht die Frage, ob die eben gelegten Eier einen niedrigeren osmotischen Druck besitzen als das Muttertier, oder ob sie, durch einen gewissen Grad von Impermeabilität für Wasser geschützt, wie das nach Loeb¹⁾ beim Fundulusei der Fall sein soll, imstande sind, das Eindringen des umgebenden Wassers ins Ei zu verhindern. Denn ein Eindringen von Wasser müsste ja die unmittelbare Folge des erheblichen Unterschieds zwischen dem osmotischen Druck des äusseren Mediums und dem des Zellinhaltes sein, und wir müssten a priori voraussetzen, dass das Eindringen von Wasser schliesslich eine Sprengung der Zellmembran zu verursachen geeignet wäre. Die erstere Möglichkeit dürfte man ohne weiteres als sehr unwahrscheinlich betrachten können, insofern man die eventuell vorhandene osmotische Druckdifferenz als durch Befruchtung bedingt nicht ansehen will, weil man nicht voraussetzen darf, dass eine osmotische Veränderung des Eies im Mutterleibe selbst, sei es im Ovarium oder dem Ovidukt, zustande kommen könnte. Hieraus geht hervor, dass Kulturversuche an Froscheiern in verschiedenen Salzlösungen ein gewisses Interesse darbieten müssen.

Mehrere Verfasser haben solche Versuche angestellt; von diesen wollen wir nur einen Teil in Kürze besprechen, weil sie im allgemeinen nicht so angestellt sind, dass sie Schlüsse mit bezug auf die gezeichneten Fragen erlaubten.

O. Hertwig²⁾ verwendete Salzlösungen von folgenden Konzentrationen: 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0% NaCl. Es zeigte sich, dass diese Konzentrationen

1) J. Loeb, l. c.

2) O. Hertwig, Die Entwicklung des Frosches unter dem Einfluss schwächerer und stärkerer Kochsalzlösungen. Arch. f. mikr. Anat. Bd. 44 S. 285. 1895.

sämtlich eine schädliche Wirkung auf die Entwicklung des Froscheies ausübten; die prozentig stärkeren Lösungen erlaubten nur ganz wenige Teilungen des Eies, die schwächeren erlaubten zwar eine Entwicklung, die aber in vielen Beziehungen abnorm verlief. Die Beobachtungen wurden nur bis zum Ende des sechsten Tages fortgesetzt. Wir möchten ganz besonders hervorheben, dass nicht einmal eine Lösung von 0,6% NaCl die normale Entwicklung des Eies erlaubte, und nichtsdestoweniger ist dieser prozentige Gehalt von NaCl selbst etwas niedriger als der, welcher mit dem Froschserum isotonisch ist.

Man könnte hier aber an eine Giftwirkung von NaCl auf das Froschei denken. Für die Lösung der aufgestellten Frage sind daher Untersuchungen von grösserem Interesse, welche darauf hinausgingen, das Verhalten von Froscheiern in einer für den erwachsenen Frosch physiologischen Salzlösung zu ermitteln. Solche Untersuchungen sind von Wilson¹⁾ ausgeführt worden. In seinem Kulturversuche in Ringer'scher Lösung entwickelten sich Froscheier nur bis zu dem Stadium, in dem es zum Verschluss der Medullarwülste kommt; über dieses Stadium hinaus brachten es nur einzelne Embryone. Die von Wilson angewandte Ringer'sche Lösung hatte folgende Zusammensetzung:

NaCl (0,75%)	100 ccm
KCl (1,0%)	3 "
Ca ₃ (PO ₄) ₂ bis zur Sättigung.	

Umfassende Versuche mit verschiedenen Lösungen hat Jenkinsson²⁾ (1906) angestellt. In seinen Versuchen war der osmotische Druck stets derselbe: er entsprach einer 0,65% igen NaCl-Lösung. In allen diesen Lösungen kam es zu einer, je nach den verschiedenen in den Lösungen vorhandenen Stoffen, verschiedenen pathologischen Entwicklung.

Mit den von uns ausgeführten Kulturversuchen an Froscheiern beabsichtigten wir zunächst, zu untersuchen, wie sich Eier in verschieden konzentrierten Salzlösungen, speziell in solchen von niedrigem osmotischen Druck, verhalten. In der von Göthlin³⁾ zusammengesetzten Serumsalzlösung für Frösche glaubten wir eine mit dem normalen Gewebe, sowie mit dem Serum des Frosches vollständig isotonische und zugleich eine in der Hauptsache isoionische Salzlösung zu besitzen. Die Göthlin'sche Serumsalzlösung ist folgendermaassen zusammengesetzt:

NaCl	0,65 %
KCl	0,01 %

1) C. B. Wilson, Experiments on the early development of the amphibian embryo under the influence of Ringer and salt solutions. Arch. f. Entwicklungsm. Bd. 5 S. 615. 1897.

2) J. W. Jenkinsson, On the effect of certain solutions upon the development of the Frogs egg. Arch. f. Entwicklungsm. Bd. 21 S. 367. 1908.

3) G. Göthlin, Über die chemischen Bedingungen für die Aktivität des überlebenden Froschherzens. Skand. Arch. f. Physiol. Bd. 12 S. 1. 1901.

CaCl₂ 0,0065 %

NaHCO₃ 0,1 %

Aqu. dest.

Unsere Versuche, befruchtete Froscheier in dieser Lösung zu kultivieren, führten indessen zu dem überraschenden Ergebnis, dass diese Lösung, die sonst so ausserordentlich brauchbar für die verschiedenen Gewebe des Frosches sich erwiesen hatte, und in der man einen Muskel, Nerv usw. stunden-, ja tagelang überlebend und funktionsfähig erhalten kann, in hohem Grade schädlich, ja, sogar unbrauchbar für die Entwicklung der Eizelle ist. Die Embryonalentwicklung wurde in ihr verzögert und gedieh niemals bis zur Lösung der Embryonen aus der Gallerthülle¹⁾. Schon auf Grund

1) Die Froscheier sind, wie bekannt, von drei Schichten einer Gallerthülle umgeben. Die innere, dünnste und deutlich festere Hülle bekommen sie schon während des Durchganges durch den oberen Teil des Oviduktes, die beiden anderen Gallerthüllen aber in dessen unterem Teil. Diese Gallerthüllen weisen bei der Laichablage eine nur unbedeutende Dicke auf, schwellen aber gleich nach der Eiablage ins Wasser erheblich an. Die innere Gallerthülle schmiegt sich dicht an das Ei an, und das ist vielleicht die Ursache, warum die Eier nach der Ablage, aber ehe die Befruchtung geschehen ist, jede beliebige Lage einnehmen können. Die Eier bieten einen helleren Pol, den vegetativen, bzw. den Dotterpol, und einen dunkleren Pol, den animalen, dar. Die Befruchtung geschieht in folgender Art: unmittelbar nach dem Durchgang durch die Kloake heraus ins Wasser werden die Laichkörner mit Sperma übergossen. Sobald eine Spermie in ein Ei gedrungen und die Befruchtung also vollzogen ist, zieht sich das Ei etwas zusammen und eine Flüssigkeit (Zellsaft oder Sekret?) wird aus ihm ausgepresst (Schultze, Untersuchungen über die Reifung und Befruchtung des Amphibieneies. Zeitschr. f. wissensch. Zool. Bd. 45 S. 177. 1887). Hierdurch entsteht ein Zwischenraum zwischen der Eimembran und der inneren Gallerthülle, des sogenannten Chorion. Infolge hiervon rotiert das Ei und nimmt eine den Forderungen der Schwerkraft entsprechende Lage an, d. h. es stellt sich mit dem Dotterpol nach unten und dem animalen Pol nach oben ein. Wenn die Frühlingstemperatur normal ist, beginnt die erste Zellteilung nach etwa 2 Stunden. So wird die Entwicklung bis zum sechsten oder siebenten Tage fortgesetzt, wonach der Embryo, mit deutlich abgesetztem Schwanz und geschlossenen Medullarwülsten, aus den Gallerthüllen ausschlüpft. Während der Entwicklung in der Gallerthülle beginnen die Medullarwälle einander näher zu rücken, und gleichzeitig werden die sogenannten Saugwarzen angelegt, welche eine schleimige Flüssigkeit während des Verweilens in der Gallerthülle absondern. Es sei auch daran erinnert, dass in dem früheren Stadium, wo die Blastulahöhle gebildet wird, dieselbe schon von einer eiweisshaltigen Flüssigkeit erfüllt ist (Morgan, Die Entwicklung des Froscheies. W. Engelmann, Leipzig 1904).

dieses Versuches könnte man es als sichergestellt betrachten, dass das befruchtete Froschei, das die Fähigkeit, in einer physiologischen Serumsalzlösung sich normal zu entwickeln, nicht besitzt, denselben osmotischen Druck wie das Muttertier nicht besitzen kann, sondern — man bedenke, dass die Entwicklung in dem im Verhältnis zum Froschserum stark hypotonischen Süßwasser vor sich geht — einen osmotischen Druck haben muss, der niedriger ist als der des erwachsenen Frosches.

Wir untersuchten auch Froschkulturen in Göthlin'scher Serumsalzlösung, die mit ein, zwei oder drei Teilen Wasser verdünnt worden war. Die Embryonalentwicklung war in allen diesen Lösungen deutlich verzögert. Auch in gewöhnlichen Salzlösungen, z. B. von NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂ usw., wurden Kulturversuche angestellt, hauptsächlich in der Absicht, die Wirkung der niedrigeren Konzentrationen zu ermitteln. Wir könnten so nachweisen, dass $\frac{N}{6}$ -Lösungen eine Entwicklung über die allerersten Furchungsstadien hinaus nicht erlaubten. Der Tod der Embryonen trat schon im Verlaufe des ersten Entwicklungstages ein. Der Konzentrationsgrad $\frac{N}{10}$ bedingt eine verzögerte und in verschiedenen Beziehungen abnorme Entwicklung, die sich selten über dasjenige Stadium hinaus erstreckt, wo der Embryo aus den Gallerthüllen schlüpft. In $\frac{N}{20}$ -Lösungen verläuft die Entwicklung normal, von einer gewissen Verzögerung abgesehen. Bei einem Konzentrationsgrade von $\frac{N}{100}$ war auch die Entwicklungsgeschwindigkeit vollständig normal. Wir haben auch eine Reihe von Versuchen angestellt, in denen Froscheier in Aqua destillata gehalten wurden, und haben gefunden, dass ihre Entwicklung dabei beinahe vollkommen normal verläuft, wenn auch ein wenig verzögert.

Endlich haben wir feststellen können, dass, wenn man Froschembryonen unmittelbar nach ihrem Ausschlüpfen aus den Gallert-hüllen in eine mit gleichen Teilen Wasser verdünnte Göthlin'sche Lösung versetzt, sie ihre Entwicklung in normaler Weise fortsetzen können. Brachten wir aber in eine gleich verdünnte Göthlin'sche Lösung Embryonen unmittelbar vor dem eigentlichen Ausschlüpfungs-termin aus den Gallerthüllen, so lebten sie zwar noch ein bis zwei

Tage, aber die Gallerthüllen platzten nie, die Embryonen verblieben in ihnen und starben.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass man mit Notwendigkeit zu der Annahme geführt wird, dass die befruchteten Eier von *Rana temporaria* einen geringeren osmotischen Druck als der voll entwickelte Frosch besitzen. Die Versuche weisen auch darauf hin, dass der osmotische Druck des eben befruchteten Eies etwa bei $\frac{N}{100}$ und Aqua destillata zu suchen ist, also erheblich geringer als der für den erwachsenen Frosch charakteristische Druck ist. Die Versuche zeigen zugleich, dass der osmotische Druck der Embryonen mit fortschreitender Entwicklung zunimmt, was man schon aus theoretischen Gründen hätte erwarten können. Denn die Kulturversuche mit eben aus den Gallerthüllen ausgeschlüpften Embryonen in mit gleichem Volumen Wasser verdünnter Göthlin'scher Serumsalzlösung hatten ja ergeben, dass die Entwicklung normal vor sich geht, während im Gegenteil eine normale Entwicklung nicht zustande kommen kann, wenn Embryonen in einem früheren Stadium in die genannte Lösung versetzt wurden. Hieraus dürfte man mit Sicherheit schliessen können, dass die eben ausgeschlüpften Embryonen einen osmotischen Druck haben, der höher als der der genannten Lösung oder diesem Drucke gleich ist.

Die Ergebnisse erlauben auch noch den Schluss, dass die Fähigkeit, den eigenen osmotischen Druck unabhängig von der stark hypotonischen Umgebung zu erhalten, während der fortschreitenden Entwicklung immer deutlicher hervortritt. Das steht möglicherweise mit einer gewissen allmählich sich ausbildenden Impermeabilität für Wasser in Zusammenhang. Diese Impermeabilität dürfte dann stärker entwickelt sein als die der Gewebszellen des Frosches überhaupt und — wie wir weiter unten zeigen wollen — namentlich stärker entwickelt als die des unbefruchteten Eies.

Von der anderen, schon in der Einleitung erwähnten Möglichkeit, dass das Froschei die Eigenschaft, für Wasser impermeabel zu sein, durch den Befruchtungsprozess erwerbe, dürfte man absehen können, wenn man bedenkt, dass dann das befruchtete Froschei mit dem unbefruchteten Ei und folglich auch mit dem voll ausgebildeten Frosch etwa isotonisch sein würde. Dann wäre es beinahe unerklärlich, warum das Froschei in isotonischen NaCl-Lösungen oder in Göthlin'scher physiologischer Serumsalzlösung sich normal nicht entwickeln kann.

III. Gefrierpunktsbestimmungen.

Um die eben erwähnten Verhältnisse nach Möglichkeit näher zu studieren und um exaktere Werte für den osmotischen Druck des Froscheies in verschiedenen Entwicklungsstadien zu gewinnen, führten wir nach Beckmann's Methode eine Reihe direkter Gefrierpunktsbestimmungen an Froscheiern in verschiedenen Stadien aus.

Die Bestimmungen wurden in folgender Weise ausgeführt: Nachdem für die Laichmasse, deren Eier in bezug auf ihren Gefrierpunkt untersucht werden sollten, das Entwicklungsstadium bestimmt worden war, wurde jedes einzelne Laichkorn so sauber als nur irgend möglich aus den umgebenden Gallerthüllen herausgeschnitten. Die Eier wurden unterdes über einer Kältemischung aufbewahrt, um die Wirkung der Autolyse zu verhindern, welche bekanntlich in der Richtung, den osmotischen Druck des Zellinhalts zu steigern, wirkt. Als wir eine hinreichende Quantität von gereinigten Eiern gesammelt hatten, wurden die Eier zerquetscht und zerrieben und der Gefrierpunkt auf die übliche Weise bestimmt; die Unterkältung betrug niemals mehr als $0,5^{\circ}$. Die in der untenstehenden Tabelle mitgeteilten Werte sind Durchschnittswerte aus einer stets grösseren Anzahl von Versuchen, die an Eiern derselben Entwicklungsstadien ausgeführt wurden.

Die Befreiung der Eier aus den Gallerthüllen gelingt sehr leicht bei den Entwicklungsstadien, die den Nr. 3, 4 und 5 in der untenstehenden Tabelle entsprechen; schwieriger dagegen ist sie bei den früheren Stadien, entsprechend Nr. 1 und 2 der Tabelle. Es gelingt hier sogar nicht immer, die Gallerthülle von sämtlichen Eiern vollständig zu entfernen; die innere, dünnste Hülle, das Chorion, bleibt gern am Ei haften. Doch bemühten wir uns stets, so sauber als nur irgend möglich die umgebenden Gallerthüllen von der Eimembran zu entfernen.

Die Gallerthüllen selbst besitzen einen osmotischen Druck, der wahrscheinlich fast gleich Null ist. Wir haben auch eine Reihe Bestimmungen an Gallertmassen von Eiern ausgeführt, die in Leitungswasser gezüchtet worden waren, und diese Bestimmungen haben für den Gefrierpunkt der Gallerte den mittleren Wert von $\Delta = 0,015$ ergeben. Diese Senkung des Gefrierpunktes dürfte aber vom in die Gallerte aufgenommenen und in ihr eingeschlossenen Leitungswasser mit ziemlicher Wahrscheinlichkeit herzuleiten sein; denn wir haben auch gefunden, dass das angewandte Leitungswasser dieselbe Gefrierpunktsenkung, nämlich $\Delta = 0,015$, darbietet.

Ein Zusatz von Gallertmasse zur Eissubstanz muss also eine Verdünnung der osmotisch wirksamen Substanz und somit eine Steigerung des Gefrierpunktes zur Folge haben. Aber eine einfache Berechnung zeigt, dass sogar ein Zusatz von einem dem Eivolumen gleichen Gallertvolumen den ursprünglichen osmotischen Druck nicht einmal auf den halben Wert herabdrücken würde. Bei einer grösseren Verdünnung findet eben eine stärkere Dissoziation der osmotisch wirksamen Stoffe und damit eine Senkung des Gefrierpunktes und eine Erhöhung des osmotischen Druckes statt. Die Gallertmasse, die an den Eiern in den be-

treffenden Stadien haften geblieben war, erreichte übrigens niemals eine nennenswerte Menge.

Beim Zerquetschen der Eier könnte vielleicht eine Autolyse in der Eiermasse in der Zeit zwischen dem Beginn des Zerquetschens und dem der Gefrierpunktsbestimmung eingetreten sein. Das müsste dazu führen, dass die grösseren Moleküle in kleinere, aber osmotisch wirksamere zersprengt würden, woraus ein niedrigerer Gefrierpunkt und ein höherer osmotischer Druck resultieren würde.

Eine andere eventuelle Fehlerquelle bei diesen Gefrierpunktsbestimmungen soll noch hervorgehoben werden. In dem Brei, der beim Zerquetschen der Eier entsteht, sind auch die verschiedenen anderen Lösungen enthalten, welche in der Chorionhöhle und dem Ei vorhanden sind. Denn aus dem Ei wird, wie schon hervorgehoben wurde, nach der Befruchtung eine Flüssigkeit abgesondert, die den Zwischenraum zwischen dem Ei und dem Chorion ausfüllt. Die Menge dieser Flüssigkeit nimmt während der fortschreitenden Entwicklung zu, wie wir das haben feststellen können; es erweitert sich der Zwischenraum zwischen dem Ei und dem Chorion. Ferner entsteht schon in dem achtzelligen Stadium ein Hohlraum zwischen den Zellen des oberen Poles, und dieser Hohlraum ist von einer eiweisshaltigen Flüssigkeit erfüllt [Morgan¹⁾]. Man kann aber mit gutem Recht behaupten, dass diese Flüssigkeiten, sowohl die der Chorionhöhle wie die der Blastulahöhle, isotonisch oder hypotonisch mit der Zellsubstanz selbst sein müssen; sie können nämlich nicht hypertonisch gegenüber dieser sein, weil — wenn die Auslegung der Versuche mit Salzlösungen richtig ist — es sich gezeigt hat, dass die Eizellen in dichteren Medien als die, welche $\frac{N}{100}$ -Lösungen entsprechen, ganz normal sich nicht entwickeln können. Man könnte somit denken, dass diese Fehlerquelle eventuell in der Richtung wirksam wäre, die Konzentration der Eisubstanz zu vermindern. Aber die Flüssigkeitsmenge der Chorionhöhle in den Stadien, die 1 und 2 der Tabelle II entsprechen, ist nur ganz unbedeutend im Vergleich zur Masse des Eies.

Eine bedeutende Rolle hinsichtlich der Herabsetzung des osmotischen Druckes in diesen frühen Entwicklungsstadien dürfte daher diesen Faktoren nicht zugesprochen werden können. Und schon bei dem Stadium Nr. 3 liegt, wie gesagt, keine Schwierigkeit mehr vor, die Eier sowohl aus den Gallerthüllen, als von der Flüssigkeit der Chorionhöhle vollständig zu befreien.

Es kommt aber jetzt eine neue Fehlerquelle in Betracht: sowohl der Urdarm wie der spätere Darm schliessen wohl Wasser ein. Die Menge desselben muss aber im Verhältnis zu der des übrigen Organismus so winzig sein, dass man von der dadurch entstandenen Verdünnung völlig absehen kann.

Die untenstehende Tabelle gibt die mittleren Werte an, die aus verschiedenen Untersuchungen derselben Stadien sich ergeben haben. Die einzelnen Versuche ergaben niemals Werte, die mehr als um

1) T. H. Morgan, l. c.

0,02° differierten, und dieser Umstand scheint uns dafür zu sprechen, dass die eben erwähnten eventuellen Fehlerquellen belanglos gewesen sind.

Tabelle II.

Δ -Bestimmungen an Eiern von *Rana temporaria*.

Nr.	Stadium	Δ
1.	Befruchtete ungeteilte Eier	0,045
2.	Halbmondförmig ausgebildeter Urmund	0,042
3.	Ringförmig ausgebildeter Urmund (Beginnende Längsstreckung)	0,215
4.	Noch nicht vollständig geschlossene Medullarfalten . .	0,215
5.	Mit kleiner Schwanzknospe und beginnendem Absetzen des Kopfes	0,230
6.	(5 Tage alt) 20—25 Tage alte Froschlarven	0,405

Die Tabelle bestätigt vollauf die Schlüsse, die wir aus unseren Zuchtversuchen in der Göthlin'schen sowie in den übrigen Salzlösungen gezogen haben. Zum Vergleich teilen wir hier einige Gefrierpunktsbestimmungen von solchen Salzlösungen mit:

Tabelle III.

Δ -Bestimmungen von Salzlösungen.

Lösung	Δ
$\frac{N}{6}$ (NaCl).	0,610
$\frac{N}{100}$ (NaCl)	0,050
Göthlin's Lösung	0,445

Wie aus den Tabellen II und III hervorgeht, liegt der osmotische Druck des eben befruchteten Froscheies ziemlich nahe bei Null, es ist mit dem Süßwasser (für welches $\Delta = 0,060$ sich ergibt), in dem die Froscheier abgelegt worden waren, und ebenso mit $\frac{N}{100}$ -Salzlösungen isotonisch, sowie nur unbedeutend höher als der osmotische Druck von destilliertem Wasser. Der osmotische Druck des befruchteten Froscheies beträgt somit etwa ein Zehntel von dem osmotischen Druck des Serums des erwachsenen Frosches oder von dem des unbefruchteten Eies.

Tabelle IV.

 Δ -Bestimmungen von Serum und Eiern von *Rana temporaria*.

Völlig reife Ovarialeier	$\Delta = 0,48$
Serum des erwachsenen Frosches	$\Delta = 0,465$

Die Tabelle II zeigt ausserdem noch, dass dieser niedrige osmotische Druck — ein Zehntel von dem des erwachsenen Frosches — während der früheren Entwicklungsstadien konstant beibehalten wird, und dass erst im Stadium des ringförmig ausgebildeten Urmundes und des noch nicht eingezogenen **Rusconi'schen** Pfropfens eine ziemlich auffallende und schnell einsetzende Vergrösserung des osmotischen Druckes festgestellt werden kann. Es scheint ferner besonders erwähnt werden zu müssen, dass diese Druckerhöhung, was den Zeitpunkt ihres Eintritts betrifft, genau mit dem beginnenden Längenwachstum dieses Entwicklungsstadiums zusammenfällt, was wir weiter unten durch die Ergebnisse direkter Messungen belegen wollen. Doch schon hier sei besonders hervorgehoben, dass die Steigerung des osmotischen Druckes des Embryos mit der Ausbildung der Keimblätter zusammenfällt. Oder mit anderen Worten: Die Erhöhung des osmotischen Druckes fällt mit dem Zeitpunkt zusammen, wo die bisher vom Gesichtspunkt der Zellspezifität indifferenten Furchungszellen infolge der Ausbildung der Keimblätter in Zellen differenziert werden, die mit Bezug auf ihre Eigenschaften und Aufgaben einen sehr ungleichen Wert besitzen.

Wenn also die Keimblattendifferenzierung beginnt und die Gastrulation beendet ist, steigt der osmotische Druck und erreicht bald einen Wert, der etwa die Hälfte von dem des erwachsenen Frosches ausmacht. Während der fortgesetzten Entwicklung innerhalb der Gallerthüllen kommt nur eine äusserst unbedeutende Erhöhung des osmotischen Druckes des Embryos zustande, bis während des fünften oder sechsten Tages die Froschembryonen mit der Göthlin'schen Serumsalzlösung mit dem gleichen Volum destillierten Wassers verdünnt, vollständig isotonisch werden. Hierdurch erklärt es sich, warum die Embryonen in einer derartigen Lösung fortleben können, wenn sie in dieselbe zu einem Zeitpunkt versetzt werden, wo sie eben die Gallerthüllen verlassen haben. Es

wäre von grossem Interesse gewesen, eine Reihe von Versuchen an Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien nach dem Verlassen der Gallerthülle durchzuführen; es hat uns aber dazu leider an Zeit gefehlt. Es ist wahrscheinlich, dass der osmotische Druck nur langsam bis zu seinem endgültigen Wert ansteigt, nachdem die Froschembryonen ins Freie ausgeschlüpft sind. Wir haben gefunden, dass die Embryonen, wenn sie 20—25 Tage alt sind, einen osmotischen Druck besitzen, der nur um ein wenig hinter dem endgültigen zurücksteht; sie zeigen nämlich $\Delta = 0,405$. Vielleicht wird der entgültige Druck etwas früher erreicht; dass es nicht allzu früh eintreten kann, geht aus den Untersuchungen Schaper's¹⁾ (1902) hervor, die wir weiter unten noch besprechen werden.

Wir glauben noch hervorheben zu müssen, dass die soeben geschilderten Veränderungen des osmotischen Druckes als bestimmte Phasen der Entwicklung sich ganz genau folgend erscheinen. Die erste starke Erhöhung des osmotischen Druckes tritt gleichzeitig mit der ersten Längsstreckung ein. Dann bleibt der Druck für eine Zeit etwa konstant — diese Periode dauert ungefähr bis zum Ausschlüpfen aus den Gallerthüllen fort. Darauf tritt noch einmal eine Erhöhung des Druckes ein. Man darf wohl annehmen, dass jede Phase des Zuwachses mit einer Vermehrung des osmotischen Druckes zusammenfällt, oder dass jene vielleicht von dieser eingeleitet wird.

Einen sehr wichtigen Faktor des Wachstums, sowohl der Zelle wie der Gewebe, bildet die Wasseraufnahme. Die für diese Wasseraufnahme erforderliche Arbeit wird wieder namentlich vom osmotischen Druck geleistet. Doch dürfen wohl andere Faktoren, wie es z. B. bei der Schwellung durch Wasserimbibition der Fall ist, dabei mitspielen.

Die Bedeutung der Wasseraufnahme für das Wachstum ist vor allem von Davenport (1897)¹⁾ und Schaper (1902)²⁾ untersucht worden. Beide haben nur Eier und Embryonen vom Frosch untersucht. Sie bestimmten den Wassergehalt in verschiedenen Entwicklungsstadien. Schaper bestimmte auch das Volum und den Aschengehalt der Eier. Diese Forscher haben gefunden, dass während

1) C. B. Davenport, The role of water in growth. Proc. of the Boston Soc. of Nat. Hist. vol. 28 p. 73. 1897.

2) A. Schaper, Beiträge zur Analyse des tierischen Wachstums. Arch. f. Entwicklunsm. Bd. 14 S. 306. 1902.

der fortschreitenden Entwicklung am sechsten Entwicklungstage nur wenig Wasser aufgenommen wird, so lange die Entwicklung noch in den Gallerthüllen vor sich geht. Die während dieser Periode zustande kommende Längsstreckung würde so grossenteils von einer Stoffverschiebung innerhalb des Embryos selbst herzuleiten sein. Nach der Durchbrechung der Gallerthüllen wird indessen die Wasseraufnahme sehr schnell gesteigert, während des ersten Tages nach dem Auschlüpfen um 5 %, während des zweiten Tages um 2,61 % usw. Vom 20. Tage der Entwicklung an wird die Wasseraufnahme beinahe konstant. Sie hat dann ihr Maximum erreicht. Beim weiteren Fortschreiten der Metamorphose wird die prozentische Wasseraufnahme etwas geringer. Da aber der absolute Gehalt an organischen Bestandteilen sowie der Aschengehalt im Embryo während der ganzen Entwicklungszeit andauernd zunimmt, so wird natürlich auch der absolute Wassergehalt während der Entwicklung ansteigen, um etwa zur Zeit der Verwandlung sein Maximum zu erreichen.

Es ergibt sich also, dass, wenn mit dem 20. Entwicklungstage der endgültige osmotische Druck beinahe voll erreicht ist, auch der für das larvale Leben endgültige Wassergehalt des Organismus erreicht ist. Das scheint eine gewichtige Stütze zu sein für unsere Vermutung, dass die Veränderungen des osmotischen Druckes und des Zuwachses — oder wenn man will: der Wasseraufnahme — wenigstens beim Frosche miteinander in engem Zusammenhang stehen.

Schaper hat sich dahin ausgesprochen, dass „das Wasser nur auf dem Wege der osmotischen Imbibition in den Organismus gelangen kann“. — Durch die fortlaufende Steigerung des osmotischen Druckes von dem unerheblichen Wert, den er während der ersten Entwicklung nach der Befruchtung unserer Tabelle entsprechend besitzt, bis zu dem Wert der Froschlarven in einem Alter von 20—25 Tagen, wird diese Wasserimbibition normiert. (Die osmotischen Kräfte aber, die während der Entwicklung in Wirksamkeit gesetzt werden, dürften doch erheblich grösser sein, als es aus den von uns erhaltenen Werten des Gefrierpunktes hervorgeht, weil die Wasseraufnahme je eine den osmotischen Druck herabsetzende Kraft ausmacht.)

Wir haben im vorhergehenden von einer gewissen Impermeabilität der Zellmembran gesprochen, die während des Entwicklungsganges erworben wurde. Es ist darauf hingewiesen, dass, obwohl Wasser von den Zellen aufgenommen wird, doch niemals ein völliger

Ausgleich zwischen dem äusseren und dem inneren Medium herbeigeführt würde. Es ist indessen schwer, sich eine Impermeabilität vorzustellen, die es dem Wasser zwar gestattet, die Zellmembran zu passieren, aber nur bis zu einem gewissen Mengenverhältnis. Diese „relative Impermeabilität“ dürfte daher vielleicht nur eine Täuschung sein, und die Erklärung für dieses Phänomen wäre wo anders zu suchen. Wenn der Volumzunahme einer Zelle mechanische Hindernisse entgegenstehen, und dabei die Wasseraufnahme und damit die Volumzunahme von einer Ungleichheit des osmotischen Druckes des inneren und des äusseren Mediums abhängt, so wird jede weitere Volumzunahme und jede weitere Wasseraufnahme verhindert. Nun bildet zwar die Elastizität der Zellmembran schon ein solches Hindernis, in ganz besonderem Grade dürfte aber das für die Hautschicht selbst zutreffen. Die Wasseraufnahme kann also nur bis zu einem gewissen Grade vor sich gehen, nämlich nur soweit als es die Elastizität der Hautschicht gestattet. Auf diesem Momente beruht bekanntlich der Turgor der Gewebe. Man kann auch — wie es schon Schaper bemerkt hat — beobachten, dass bei Froschembryonen, wenigstens vom vierten bis fünften Entwicklungstage an bis zur Metamorphose, ein ausgesprochenes Turgor vorhanden ist. Schaper erwähnt auch die grosse Rolle, die der Turgor hinsichtlich der Konfiguration der Froschlarven spielt, bevor Stützsubstanz gebildet ist.

Wir wollen bemerken, dass während der ersten Entwicklungsstadien oder vor dem Beginn der Längsstreckung und der Keimblattdifferenzierung ein ausgesprochener Turgor nicht konstatiert werden kann.

IV. Bestimmungen des Volums in verschiedenen Entwicklungsstadien.

In den Untersuchungen von Schaper sind die frühesten Entwicklungsstadien — aus Gründen, die mit seiner Methode zusammenhängen — nicht mit berücksichtigt. Während der frühesten Embryogenese kommt nur ein ganz unbedeutender Zuwachs des Embryos zustande. Rhumbler¹⁾ sowie Morgan²⁾ haben gezeigt, dass der

1) L. Rhumbler, Zur Mechanik des Gastrulationsvorganges insbesondere der Invagination. Arch. f. Entwicklunsm. Bd. 14 S. 401. 1902.

2) T. H. Morgan, Experiments with Frogs Eggs. Biol. Bull. of Woods Holl. vol. 11 p. 71. 1906. — T. H. Morgan, The origin of the Organ forming Materials in the Frogs Embryo. Biol. Bull. of Woods Holl. vol. 11 p. 321. 1906.

Zuwachs während dieser Periode in gar keinem Verhältnis zu der Ausbildung der Blastulahöhle steht. Die eiweisshaltige Flüssigkeit, welche diese Höhle ausfüllt, muss daher als aus den Eizellen herausgepresst oder sezerniert angesprochen werden.

Um zunächst den Prozessen auf die Spur kommen zu können, welche die Entstehung des so weitgehend veränderten osmotischen Druckes bedingen, den wir bei dem befruchteten, sich entwickelnden Froschei gefunden hatten, unternahmen wir es mit Hilfe eines mit Mikrometer ausgerüsteten Mikroskopes, den Durchschnitt von Eiern in verschiedenen Entwicklungsstadien sowie den Durchmesser von befruchteten und unbefruchteten Eiern zu bestimmen, wobei einmal die Werte für den Durchmesser der Eier unmittelbar untereinander verglichen werden, weiterhin aber auch die Werte von Eiern berücksichtigt wurden, die während einer kürzeren oder längeren Zeit in Leitungswasser oder destilliertem Wasser gezüchtet wurden.

Die nachstehende Tabelle gibt den prozentigen Zuwachs des Eidurchmessers vom 64-Zellstadium bis zur vielzelligen Blastula.

Tabelle V.

Stadium vom 64- bis vielzelliger Blastula.

Zuwachs des Eidurchmessers in %	Anzahl der Eier
0	19
1,5	3
2	1
4	1
Durchschnittswert: 0,5	Sa: 24

Die Tabelle zeigt, dass während des ganzen Blastulastadiums eine nur sehr geringe Volumzunahme zustande kommt, durchschnittlich nur 0,5 % von der Grösse des Durchmessers zu Anfang dieses Stadiums. Aber auch während der weiteren Entwicklung, selbst während der beginnenden Gastrulation tritt keine nennenswerte Zunahme des Volums ein. Das Ei behält die ganze Zeit seine Kugelform beinahe unverändert bei ¹⁾. Die Tabelle VI zeigt die Ergebnisse

1) Man findet selten Eier, die vollständige Kugelform mit gleichgrossem Durchmesser in den verschiedenen Richtungen besitzen. Im allgemeinen bieten sie eine mehr oder weniger ausgeprägte, ellipsoide Form dar. In den Fällen,

der Messungen der Zunahme des Durchmessers vom Stadium der vielzelligen Blastula bis zum Stadium des halbmondförmigen Urmundes, d. h. bis zur beginnenden Gastrulation.

Tabelle VI.

Stadium von der vielzelligen Blastula bis zum Stadium des halbmondförmigen Urmundes.

Zuwachs des Eidurchmessers in %	Anzahl der Eier
0	10
5,5	3
Durchschnittswert: 0,4	Sa: 13

Es ergibt sich also, dass die Volumzunahme während dieser Periode eine sehr unbedeutende ist. Der durchschnittliche Wert des Zuwachses beträgt nur 0,4 %. Wenn man aber die Details in der Tabelle berücksichtigt, so ergibt es sich, dass eine geringe Anzahl der Eier doch eine nicht ganz unbeträchtliche Volumzunahme aufweist. Das kann wohl damit in Zusammenhang gebracht werden, dass gerade in diesem Stadium verhältnismässig unerhebliche Veränderungen in der inneren Konstitution der Eizellen zu sehr beträchtlichen Verschiedenheiten in den Bedingungen für die Wasseraufnahme führen können. Wir möchten auch daran erinnern, dass in den Beginn der Gastrulation gerade die Prozesse fallen, die den gesteigerten osmotischen Druck hervorrufen, und demzufolge ist es a priori sehr wahrscheinlich, dass man gerade im Stadium der beginnenden Gastrulation Eier antreffen wird, die ziemlich erhebliche Schwankungen sowohl des osmotischen Druckes als auch des Volums darbieten werden.

Während der späteren Gastrulationszeit, wenn der Urmund geschlossen und der Rusconi'sche Pfropf vollständig eingezogen ist, beginnt, wie schon oben bemerkt, die Längsstreckung. Die Tabelle VII zeigt uns den prozentigen Zuwachs der Längsachse während der Stadien, die im Laufe von 12 Stunden dem Stadium des geschlossenen Urmundes und des eingezogenen Rusconi'schen Pfropfes folgen.

wo eine Ungleichheit in der genannten Hinsicht vorhanden war, haben wir die längste und die kürzeste Achse gemessen und den durchschnittlichen Wert aus diesen beiden Maassen als Durchmesser angegeben.

Tabelle VII.

Stadium vom geschlossenen Urmunde bis zu dem nach 12 Stunden.

Prozentiger Zuwachs der Längsachse	Anzahl der Eier
2,5	3
3	2
4,5	3
5,5	1
7	1
8	3
Durchschnittswert: 4,9	Sa: 13

Aus der Tabelle ersieht man, dass die Eier dieser Periode noch grössere Verschiedenheiten aufweisen. Diese Verschiedenheiten sind offenbar in erster Linie dem während dieser Periode schnell ansteigenden, osmotischen Druck zuzuschreiben, der eben infolge seiner schnellen Steigerung wahrscheinlich ziemlich verschiedene Werte für den osmotischen Druck der einzelnen Embryonen ein- und desselben Entwicklungsstadiums bedingen dürfte. Die Folge hiervon, wie eben dargelegt wurde, wird sein, dass auch die Wasseraufnahme bei den verschiedenen Embryonen ungefähr desselben Stadiums verschieden sein wird, dementsprechend wird auch der Längenzuwachs bei den einzelnen Embryonen verschiedene Werte zeigen. Ob die von uns festgestellte Längenzunahme — durchschnittlicher Wert 4,9 % — auch wirklich von einer Volumzunahme begleitet ist, konnten wir aus technischen Gründen nicht feststellen.

Man darf nun die Frage aufwerfen, ob die Wasseraufnahme während dieses Längenzuwachses eine gleichbedeutende Rolle spielt wie die, die Schaper und Davenport für die späteren Entwicklungsstadien konstatieren konnten. Dass es sich trotz der Ergebnisse, die diese Forscher erzielt zu haben meinen, doch so verhalten könnte, scheint aus einigen Versuchen hervorzugehen, die wir angestellt haben. Wir züchteten Froscheier und -embryonen in Göthlin'scher Serumsalzlösung. In diesen Versuchen trat gar keine Längsstreckung der Embryonen ein, was mit grosser Wahrscheinlichkeit von der Hypertonizität des umgebenden Mediums herzuweisen sein dürfte. Das Embryonalstadium, von dem hier die Rede ist, besitzt je einen osmotischen Druck, der einem Δ von 0,215—0,230 entspricht, während die Göthlin'sche Lösung $\Delta = 0,445$ hatte.

Tabelle VIII.

In der Göthlin'schen Lösung kultivierte Froschembryonen.

Durchmesser der Eier in Mikrometer- teilstreichen	Anzahl der Eier	
	beginnende Gastrulation	Stadium des geschlossenen Urmundes
35	0	1
36	3	3
36,5	2	0
37	6	10
37,5	2	0
38	2	1

Durchschnittlicher Wert des Durchmessers:

Beginnende Gastrulation. 36,93

Stadium des geschlossenen Urmundes. 36,73

Tabelle VIII gibt uns die Werte für den Durchmesser (die Längsachse), in Mikrometerteilstreichen ausgedrückt, sowohl bei den Embryonen im ersten Stadium der Gastrulation, als bei solchen Embryonen, die während der Kultivierung in der Göthlin'schen Lösung sich weiter entwickelt hatten bis zum Stadium mit eingezogenem Rusconi'schem Pfropfe.

Die Tabelle zeigt keinen deutlichen Unterschied zwischen diesen beiden Entwicklungsstadien in bezug auf das Volum oder den Längenzuwachs der Embryonen auf. Ihre Entwicklung ist dennoch normal, wenn auch langsamer als gewöhnlich fortgeschritten. Die Medullarwülste werden in gewöhnlicher Weise an dem gleichwohl noch stets kugelförmigen Ei angelegt und wurden dazu bei vielen einzelnen Embryonen in normaler Weise geschlossen. Bei den letztgenannten Embryonen trat gleichzeitig mit dem Schliessen der Medullarwülste eine unerhebliche Längsstreckung ein, von der man annehmen darf, sie sei von einer aktiven Längenzunahme, wie sie Driesch¹⁾ auffasst, verursacht worden. Mit diesem Ausdruck bezeichnet nämlich der genannte Verfasser einen Längenzuwachs, dem eine Assimilation zugrunde liegt. Auch in unserem Falle können wir an eine Assimilation als die Ursache des Längenzuwachses denken, nämlich an eine Assimilation des Dottermaterials. Denn das Dottermaterial wird während dieser frühen Entwicklungsstadien — wahrscheinlich durch

1) H. Driesch, Analytische Theorie der organischen Entwicklung. Leipzig 1894.

oxydative Prozesse — zersetzt und in leicht transportable Stoffe verwandelt. Während der früheren embryonalen Entwicklung muss also bloss Sauerstoff von aussen aufgenommen werden. Im Gegensatz zu diesem aktiven Zuwachs bezeichnet Driesch als passiven einen solchen, der durch Wasseraufnahme vor sich geht. Nur dieser passiver Zuwachs soll in unserer Arbeit berücksichtigt werden; er steht in engem Zusammenhang mit den Veränderungen des osmotischen Druckes.

Wir haben somit festgestellt, dass die erste Periode des Längenzuwachses mit dem letzten Stadium der Gastrulation beginnt also bereits zu einer Zeit, wo die Embryonen sich noch in den Gallerthüllen befinden. Mit dem Beginn dieses Längenzuwachses wird demgemäss die erste Phase der Entwicklung abgeschlossen, in der keine oder eine nur unbedeutende Veränderung des Volums oder der Konfiguration stattfindet, und die durch einen sehr niedrigen, mit der Umgebung isotonischen, osmotischen Druck gekennzeichnet ist. Nach dieser ersten Entwicklungsphase folgt eine zweite, die mit dem Schliessen des Urmundes beginnt, und selbst wieder in zwei Perioden eingeteilt werden kann: eine erste Periode des Zuwachses, die durch eine im Anfang schnell steigende, später ziemlich konstante Kurve für den osmotischen Druck und eine deutlich konstatierbare Wasseraufnahme sowie einen stark ausgesprochenen, verhältnismässig schnellen Längenzuwachs gekennzeichnet ist. In der zweiten Periode des Zuwachses, gleichzeitig mit dem Auschlüpfen der Embryonen aus den Gallerthüllen, tritt abermals eine Steigerung des osmotischen Druckes, eine stärkere Wasseraufnahme und ein stets fortschreitender Längenzuwachs ein.

Wie schon gesagt, wird der Längenzuwachs der ersten Zuwachperiode durch die Wasseraufnahme bedingt, was aus unseren Versuchen mit Göthlin'scher Lösung hervorging. Das will aber in anderen Worten sagen: der passive Zuwachs geschieht in einer bestimmten Richtung. Das muss wahrscheinlich im Zusammenhang mit einer gewissen, mechanisch ungleichwertigen Beschaffenheit der verschiedenen Zellen des Embryos stehen, die schon in diesem Stadium ausgebildet ist. Darum ist es wahrscheinlich — und es

wird das in der Tat durch Experimente bestätigt, in denen wir versuchten, Froscheier in einer Sauerstoffatmosphäre zu züchten, und die wir im folgenden noch besprechen werden —, dass, wenn dieser Zuwachs, diese Wasseraufnahme in einem früheren Entwicklungsstadium beginnen würde, das Ei nicht in einer bestimmten Richtung zunehmen, sondern nur eine allgemeine Vergrößerung des Volumens erfahren würde.

In diesen Kulturversuchen, die mit Froscheiern im Blastulastadium in reinem Sauerstoff unter einem Druck von 760 mm ausgeführt wurden, gelang es, eine allgemeine Vergrößerung des Durchmessers, die schon im frühesten Gastrulastadium einsetzte, hervorzurufen. Die osmotische Arbeit, die in den späteren Gastrulastadien und mit der dann zutage tretenden Längenzunahme beginnt, war bei den in dieser Weise gezüchteten Eiern schon beendet, ehe das letztgenannte Entwicklungsstadium noch erreicht worden war. Es kann darum diese osmotische Arbeit nicht in der gewöhnlichen Art angefangen haben. Nichtsdestoweniger traten doch bald regulative Prozesse ein, die eine Längsstreckung herbeiführten, aber noch im Stadium der einander sich nähernden Medullarwülste waren die Sauerstoffembryonen (obwohl sie gleich nach dem Anfang der Gastrulation in normale Verhältnisse zurückversetzt worden waren) immer auffallend kurz und breit.

Während die Medullarwülste einander entgegenwachsen, wird der Längenzuwachs immer fortgesetzt. Wenn so die Ränder der Medullarwülste sich unmittelbar aneinander gelegt haben und die Schwanzspitze sich deutlich abzusetzen angefangen hat, wird die Geschwindigkeit des Längenzuwachses etwas grösser. Nach den Untersuchungen Schaper's dürfte in diesem Stadium die Längenzunahme hauptsächlich von einer Materialverschiebung herzuleiten sein. In der untenstehenden Tabelle IX geben wir die Ergebnisse einiger Messungen über den Längenzuwachs in den eben besprochenen Stadien wieder.

Die Längenzunahmen sind in Prozentsätzen der Längsachse des nächst vorhergehenden Stadiums ausgedrückt. Die untersuchten Stadien waren teils das spätere Gastrulastadium mit einander ein wenig genäherten Medullarwülsten, teils das Stadium mit vollständig geschlossener Medullarrinne und Ausbildung der Schwanzknospe und endlich das nach zweitägiger fortgesetzter Entwicklung erreichte Stadium, wo die Embryonen aus der Gallerthülle ausgeschlüpft sind.

Tabelle IX.

- I. Der Längenzuwachs von dem späteren Gastrulastadium an bis zum Stadium der einander genäherten Medullarwülste.
- II. Der Längenzuwachs vom letztgenannten Stadium an bis zu dem der geschlossenen Medullarrinne und der angelegten Schwanzknospe.
- III. Der Längenzuwachs vom letztgenannten Stadium an bis zu dem nach zweitägiger fortgesetzter Entwicklung.

Der Längenzuwachs ist in Prozenten der Längsachse der erstgenannten Stadien der drei Gruppen ausgedrückt:

I.	20	20	27	27	—	—	10,5	22	15,5	15,5	15	28
II.	52	52	42	40,5	37	42	43	22,5	33	66	43	14
III.	66,5	85	85	—	—	—	83	100	100	53	70	—

Der auffallende Längenzuwachs der dritten Gruppe ist von einer deutlich wahrnehmbaren Volumzunahme begleitet. Aus der Tabelle geht ausserdem hervor, dass die Geschwindigkeit des Längenzuwachses für verschiedene Individuen ziemlich verschieden ist. Doch dürfte man aus der Tabelle zu schliessen geneigt sein, dass die einzelnen Embryonen, die in einem früheren Entwicklungsstadium einen langsameren Längenzuwachs dargeboten haben, während der späteren Stadien einen schnelleren Zuwachs als die anderen zeigen und umgekehrt.

Wir haben hervorgehoben, dass die sogenannte Chorionhöhle ausser aus dem umgebenden Medium hineindiffundierter Salze einen hauptsächlich schleimigen Stoff enthält, dessen überwiegender Teil von den schon in einem früheren Stadium vorhandenen sogenannten Saugwarzen stammt, zum geringeren Teil aber auch von der Flüssigkeit, die sofort nach der Befruchtung aus dem Ei ausgepresst wird. Durch unsere physiologischen Versuche haben wir auch zeigen können, dass ein osmotisch wirksamer Stoff in der Chorionhöhle vorhanden ist. Das Volum der Chorionhöhle nimmt nämlich während der fortschreitenden Entwicklung zu, obwohl ihre Wandungen keineswegs dicht dem Embryo anliegen. Die Chorionhöhle ist in Wirklichkeit sehr unbedeutend und die Wandungen der innersten Gallerthülle liegen während der frühesten Entwicklungsperiode sehr dicht dem Embryo an. Unmittelbar vor dem Beginn der Längsstreckung des Froscheies wird die Chorionhöhle aber erweitert, und diese Erweiterung geht in erheblich grösserem Grade vor sich, als wie sie durch die Volumzunahme des Eies verursacht werden könnte. Man wird daher gezwungen als wahrscheinlich anzunehmen, dass diese Erweiterung von einer durch die Hypertonizität des Chorioninhalts

im Verhältnis zum umgebenden Medium verursachten Wasseraufnahme herzuleiten ist. Und diese Annahme wird durch einige Beobachtungen, die wir machen konnten, gewissermaassen bestätigt. Wir konnten nämlich feststellen, dass diese Erweiterung in destilliertem Wasser grösser als im Leitungswasser ist. Ferner können wir nochmals an die Versuche erinnern, bei denen Froscheier in Göthlin'scher Lösung nach vorhergegangener Verdünnung mit gleichem Volum Wasser gezüchtet wurden, wobei die Embryonen nie aus den Gallerthüllen auszuschlüpfen vermochten. Endlich können wir hier Messungen über das Verhalten der Chorionhöhle in Lösungen mitteilen. Sie zeigen, dass die innere Gallerthülle, das sogenannte Chorion, als — jedenfalls bis zu einem gewissen Grade — semipermeabel betrachtet werden kann; sie lässt Wasser leicht durchtreten, verhindert aber bis zu einem gewissen Grade die Diffusion von Salzen. Die Tabelle X zeigt den Durchmesser der Chorionhöhle während der fortschreitenden Einwirkung von ziemlich konzentrierten Salzlösungen.

Tabelle X.

Embryonen 5 Tage alt.

Zeit nach dem Versetzen in die Lösung	Durchmesser der Chorionhöhle in Mikrometer- teilstrichen	
	in $\frac{N}{7}$ NaCl	in Göthlin'scher Lösung, verdünnt mit gleichem Volum Wasser
Nach 0 Stunde 0 Min.	64	85
„ 0 „ 5 „	58	—
„ 0 „ 15 „	58	—
„ 1 „ 35 „	57	—
„ 5 Stunden	58	—
„ 12 „	—	77
„ 18 „	52	—
„ 25 „	52	—

Die Embryonen waren, wie aus der Tabelle ersichtlich, 5 Tage alt und mithin einer Göthlin'schen, mit gleichem Volum Wasser verdünnten Lösung isotonisch. Die Tabelle zeigt, dass die Chorionhöhle stark zusammengezogen wird, wenn sie von $\frac{N}{7}$ NaCl umgeben ist (also von einer Lösung, die mit dem Serum des erwachsenen Frosches etwa isotonisch ist). Daraus darf man schliessen, dass der osmotische Druck der Chorionflüssigkeit hinter demselben des entwickelten Frosches ziemlich erheblich zurückbleibt. Die Höhle zieht

sich auch etwas zusammen, wenn das Chorion von $\frac{\text{Göthlin's Lösung}}{2}$ umgeben ist; das scheint darauf zu deuten, dass der Druck innerhalb des Chorions geringer als der für die genannte Lösung charakteristische sein muss. — Es wäre mithin möglich, dass die Flüssigkeit der Chorionhöhle hypotonisch im Verhältnis zu dem 5 Tage alten Embryo, etwas hypertonisch aber im Verhältnis zu dem umgebenden Süsswasser wäre. Das letztgenannte Verhältnis würde dann von der semipermeablen Natur der Chorionmembran und ihrem mechanischen Widerstand gegen Dehnung abhängig sein.

Der Auffassung, zu der wir durch die in der vorstehenden Tabelle mitgeteilten Messungen gekommen sind, tritt E. Overton¹⁾ entgegen, indem er behauptet: „dass die Eihäute der Amphibieneier eine leichte Durchlässigkeit für alle Lösungen der Kristalloide aufweisen.“ Es wäre gewiss möglich, die Ergebnisse unserer Messungen des Durchmessers der Chorionhöhle auf andere Weise zu erklären, als durch die Annahme einer Semipermeabilität des Chorions; sie könnte z. B. auf einer Schrumpfung beim Versetzen aus dem Süsswasser in die Salzlösung beruhen. Doch schon die oben erwähnten Momente sprachen ganz entschieden dafür, dass ein osmotischer Überdruck in der zwischen dem Embryo und dem Chorion befindlichen Flüssigkeit wirklich vorhanden ist. Derselbe ist möglicherweise durch einen hochmolekularen schwer zu differenzierenden Stoff verursacht. In solchem Falle könnte man sich vorstellen, dass derselbe aus den genannten Saugwarzen sezerniert worden ist.

Eine andere Beobachtung scheint uns noch der Erwähnung wert. Beim Züchten von Froschembryonen in stark konzentrierten Salzlösungen bemerkt man sehr oft, dass die Chorionmembran dem Embryo dicht anliegt; bei seiner weiteren Entwicklung weisen dann diese Embryonen gewisse Abnormitäten auf. Man sieht beispielsweise, dass die Medullarwülste abgeplattet sind und der Embryo sozusagen gekrümmt ist. Das darf man wohl weniger von einer direkten Wirkung des in der Lösung vorhandenen Stoffes, als vielmehr von einer rein mechanischen Einwirkung des auf den Embryo drückenden Chorions herleiten. Diese Erscheinung könnte dann in

1) E. Overton, Über den Mechanismus der Resorption und der Sekretion. Nagel's Handb. d. Physiol. d. Menschen Bd. 2 S. 878. 1907.

zweifacher Weise verursacht sein: entweder dadurch, dass das Hineindiffundieren von Wasser in die Chorionhöhle durch die Hypertonizität der Umgebung im Verhältnis zum osmotischen Druck der Chorionhöhle verhindert wird, oder dadurch, dass Koagulationen in der Gallerthülle vor sich gehen, wodurch diese einen allzu grossen mechanischen Widerstand gegen die Erweiterung setzt, um eine Wasseraufnahme zu gestatten. Welche von diesen beiden Erklärungsweisen die richtige ist, müssen wir vorläufig dahingestellt sein lassen.

V. Die Ursache der Reduktion des osmotischen Druckes.

Durch die schon erwähnten physiologischen Experimente haben wir zu beweisen versucht, dass das befruchtete Froschei während seiner ersten Entwicklung einen osmotischen Druck besitzt, der sehr gering und mit dem umgebenden Medium isotonisch ist. Wir müssen uns nun fragen, erstens, zu welchem Zeitpunkt diese Tatsache in die Erscheinung tritt, und zweitens, von welchen Faktoren dieser niedrige osmotische Druck verursacht wird.

Man kann dabei an verschiedene Momente als die Ursache der Druckreduktion denken. Zunächst sei der Hypothese gedacht, dass das Froschei „aus eigenem Triebe“ seinen osmotischen Druck veräussere; das ist wahrlich a priori als ziemlich unwahrscheinlich zurückzuweisen. Man kann ferner auch daran denken, es werde durch die Befruchtung ein so starker physikalisch-chemischer Reiz hervorgerufen, dass demzufolge eine Verminderung des Druckes entstände. Endlich dürfte man als hypothetische Erklärung behaupten können, es hätte die Hypotonizität des Seewassers eine Wasseraufnahme und ein Herausdiffundieren von Kristalloiden aus dem Ei verursacht, bis endlich der osmotische Druck seinen niedrigen Wert erreichte.

Durch Untersuchungen über das Verhalten befruchteter und unbefruchteter Eier hinsichtlich ihres Volums, wenn sie von einem Medium umgeben sind, das stark hypotonisch im Verhältnis zum erwachsenen Froschei ist, sowie über das Verhalten unbefruchteter Eier hinsichtlich ihres Gefrierpunktes, nachdem sie während einer kürzeren oder längeren Zeit in Wasser gelegen hatten, und endlich über die Art, in welcher die auf dem sogenannten trockenen Wege befruchteten Eier beim Versetzen in destilliertes Wasser ihr Volum möglicherweise verändern, hofften wir diesem Probleme nähertreten zu können.

Vor allem konnten wir feststellen, dass die Ovarialeier des Frosches mit Froschserum wirklich isotonisch sind; sie zeigten nämlich einen Δ von 0,480.

Um die Einwirkung der Hypotonizität des umgebenden Mediums auf den osmotischen Druck des Ovarialeies zu untersuchen, legten wir eine grössere Quantität Eier in Leitungswasser und bestimmten wiederholt nach verschiedenen langen Zeiträumen ihren osmotischen Druck, d. h. den Gefrierpunkt des Eiinhaltes. Die untenstehende Tab. XI zeigt diese Ergebnisse.

Tabelle XI.

Δ -Bestimmungen an in Leitungswasser versetzten Ovarialeiern.

Zeit	Δ
3 Stunden	0,350
25 "	0,197
36 "	0,235
43 "	0,575

Durch gleichzeitige Messungen konnten wir konstatieren, dass schon nach 3 Stunden eine deutliche Verlängerung des Durchmessers eingetreten war. Der osmotische Druck muss daher schon zu diesem Zeitpunkt durch Wasseraufnahme unter den normalen Wert herabgesetzt worden sein. Die Tabelle zeigt eine während der ersten 25 Stunden fortschreitende Abnahme des osmotischen Druckes des Zellinhaltes. Wenn aber eine Δ -Bestimmung nach 36 Stunden abermals vorgenommen wird, findet man den osmotischen Druck wieder höher, um nach 43 Stunden einen Wert zu erreichen, der den des normalen osmotischen Druckes des Frosches noch übertrifft. Als Ursache dieser Steigerung darf mit Sicherheit eine fortschreitende Cytolyse angesehen werden. Die Eier zeigten tatsächlich nach 43stündigem Liegen in Leitungswasser zahlreiche Exovatbilder sowie mehrmals ein Erbleichen des Pigmentes.

Diese Abnahme des osmotischen Druckes in Ovarialeiern, die bis zu 25 Stunden von einem im Verhältnis zu den Eiern stark hypotonischen Medium umgeben waren, ist offenbar vom Druckunterschied zwischen dem äusseren und dem inneren Medium und der von demselben hervorgerufenen Wasserdiffusion verursacht. Der osmotische Druck wird, wie aus der Tabelle hervorgeht, bei keiner von unseren Messungen bis zu dem niedrigen Wert, den wir bei den

Wenn der herabgesetzte osmotische Druck des befruchteten Eies von einer Verdünnung des Zellinhaltes durch eine Wasseraufnahme von aussen verursacht wäre, so müsste das Eivolumen dabei beinahe um das Zehnfache vergrössert worden sein, weil ja der Druck bis zu 0,1 von dem ursprünglichen reduziert wird. Mit anderen Worten: der Durchmesser müsste mehr als verdoppelt sein. Wenn man für die Werte der vorstehenden Tabelle den möglichst grössten, mittleren Fehler in Rechnung bringt, d. h. wenn man den wahrscheinlichen Fehler für die unbefruchteten Eier in negativer, für die befruchteten dagegen in positiver Richtung rechnet, so bekommt man als neue Durchschnittswerte für den Durchmesser:

für die befruchteten Eier = 37,926

für die unbefruchteten Eier = 35,372

Hieraus resultiert eine Zunahme der befruchteten Eier gegenüber den unbefruchteten um 2,544 Teilstriche, d. h. um 6,6 %. Die Zunahme dürfte in der Wirklichkeit noch geringer sein. Wird der wahrscheinliche Fehler der mittleren Werte vice versa gerechnet, so bekommt man eine Zunahme von 4,01 %. Diese Zunahme ist natürlich viel zu gering, um sie für eine Erklärung der erheblichen Druckreduktion in Anspruch nehmen zu können.

Nun war es sehr interessant zu untersuchen, wie Eier, die unmittelbar aus dem Ovidukt herausgenommen und auf trockenem Wege befruchtet worden waren, sich in destilliertem Wasser entwickeln würden. Wir haben einige dahinzielende Experimente ausgeführt, wobei wir die in ein trockenes Uhrglas gebrachten Froscheier mit aus einem Froschtestikel gewonnenem Sperma übergossen. So gelang es uns sehr gut, die Eier auf trockenem Wege zu befruchten. Darauf wurden die Eier in destilliertes Wasser gesetzt. Die hier eintretende und normal verlaufende Zellteilung konnte sehr gut beobachtet werden. Unmittelbar vor dem Versetzen der Eier in das Wasser wurde der Durchmesser der Eier gemessen, ebenso nach 12 Stunden. Die während dieser Zeit eingetretene Zunahme des Durchmessers wurde in Prozenten des ursprünglichen Durchmessers berechnet (s. Tab. XIII, S. 320).

Die trocken befruchteten Eier zeigen also eine ganz geringe Dilatation. Da nun diese Eier sich als in destilliertem Wasser entwicklungsfähig erwiesen haben, und man keine Ursache hat, vorauszusetzen, dass diese Eier in osmotischer Hinsicht sich anders verhielten als die auf natürlichem Wege befruchteten, so wird man

Tabelle XIII.

Trocken befruchtete Eier, nachdem sie 12 Stunden in destilliertem Wasser gelegen hatten.

Zunahme, in Prozenten des ursprünglichen Durchmessers	Anzahl der Eier
0,0	4
1,3	1
5,0	1
5,1	1
5,3	1
7,6	1
7,8	1
Mittlerer Wert der Dilatation: } 3,21	Sa.: 10

genötigt, anzunehmen, dass eben die Befruchtung ihnen wohl die Fähigkeit verliehen hat, in einem stark hypotonischen Medium zu leben. Mit anderen Worten — dass die Befruchtung ihren inneren osmotischen Druck etwa bis zur Isotonizität mit der Umgebung reduziert hat. Wir möchten auch auf die sehr geringe Geschwindigkeit hinweisen, mit der die Volumzunahme des unbefruchteten Eies in süßem Wasser vor sich geht, dagegen ist der osmotische Druck nach 3 Stunden bis auf 0,350 reduziert worden. Wenn die Volumzunahme von 3,21 %, die wir bei den trocken befruchteten Eiern ermittelt haben, wirklich durch ein Hineindiffundieren von Wasser verursacht sein sollte, so müsste ihr eine Reduktion des osmotischen Druckes entsprechen, die gleich wäre dem Absinken des Druckes von 0,7 % NaCl auf 0,64 % NaCl; also eine Abnahme des osmotischen Druckes, auf die die übrigen Gewebszellen des Frosches physiologisch kaum reagieren, und die wohl als eine normale Variation im Froschorganismus zu betrachten ist.

Zum Vergleich seien hier die Ergebnisse von Messungen mitgeteilt, die sich auf den Durchmesser unbefruchteter sowie befruchteter Eier desselben Frosches, welche 12 Stunden in destilliertem Wasser gelegen hatten, beziehen (s. Tab. XIV und XV, S. 321).

Aus den Tabellen geht hervor, dass die trocken befruchteten Eier in destilliertem Wasser in 12 Stunden eine weit geringere Volumzunahme als die unbefruchteten Eier erfahren haben. Der Durchmesser der unbefruchteten Eier übertrifft den durchschnittlichen Durchmesser der trocken befruchteten um 9,6 %. Es folgt daraus, dass die Befruchtung das Ei gegen eine Volumzunahme in einem hypotonischen Medium schützt.

Tabelle XIV.

Trocken befruchtete Eier, die 12 Stunden in destilliertem Wasser gelegen hatten.

Durchmesser in Mikrometerteilstrichen	Anzahl der Eier
37,0	1
37,5	1
38,0	2
39,0	1
40,0	1
41,0	1
Mittlerer Wert: 38,7	Sa.: 7

Tabelle XV.

Unbefruchtete Eier, die 12 Stunden in destilliertem Wasser gelegen hatten.

Durchmesser in Mikrometerteilstrichen	Anzahl der Eier
41,0	2
42,0	2
43,0	1
44,0	2
Mittlerer Wert: 42,4	Sa.: 7

Wie wir in Tabelle XII gezeigt haben, beträgt der Wert für die durchschnittliche Differenz zwischen dem Durchmesser in normaler Weise befruchteter und unbefruchteter Eier höchstens 6,6 %. Da aber wahrscheinlich der Eiinhalt einer NaCl-Lösung von 0,7 % entspricht, so würde der Inhalt nach einer solchen Volumzunahme einer NaCl-Lösung von 0,58 % entsprechen (natürlich immer nur unter der Voraussetzung, dass der Volumzunahme ausschliesslich eine Wasseraufnahme zugrunde liegt). Da somit die Volumzunahme der Eier nur äusserst unbedeutende Werte aufweist und — wie die Berechnungen erwiesen haben — die eingetretene Druckreduktion nicht einmal annäherungsweise erklären kann, so folgt, dass die Annahme, die wir früher als eine mögliche Erklärung der osmotischen Druckreduktion gemacht — die Wasseraufnahme von aussen —, nicht berechtigt ist und durch das Experiment nicht bestätigt wird.

Zum Vergleich sei hier eine Tabelle über die prozentige Volumzunahme unbefruchteter Ovidukteier mitgeteilt, die 12 Stunden in destilliertem Wasser gelegen haben.

Tabelle XVI.

Unbefruchtete Ovidukteier, die während 12 Stunden in destilliertem Wasser gelegen haben.

Verlängerung des Durchmessers in Prozenten des ursprünglichen Durchmessers	Anzahl der Eier
6	2
7	1
8	1
9	3
12	5
15	2
20	1
24	1
26	1
Mittlerer Wert: 12,6	Sa.: 17

Die unbefruchteten Ovidukteier zeigen somit, nachdem sie 12 Stunden in destilliertem Wasser gelegen haben, eine Volumzunahme, die einer Verlängerung des ursprünglichen Durchmessers um 12,6 % entspricht. Es ist sehr interessant, mit diesem Werte die Ergebnisse der Tabellen XIII, XIV und XV zu vergleichen, welche uns zeigen, dass der Durchmesser der unbefruchteten Ovidukteier, nachdem sie 12 Stunden in destilliertem Wasser gelegen haben, den der befruchteten um 9,6 % übertrifft, und dass die befruchteten Eier in derselben Zeit ihren Durchmesser um 3,21 % der ursprünglichen Länge vergrößert hatten. Es hat somit der Durchmesser der unbefruchteten eine Länge erreicht, die die Länge des ursprünglichen Durchmessers der befruchteten Eier um 12,81 % übertrifft. Genau derselbe Wert für die Verlängerung des Durchmessers wie in den beiden Serien, die den Tabellen XV und XVI zugrunde liegen.

In Tabelle XVII (S. 323) sind die Ergebnisse von Messungen der Durchmesserzunahme an den Eiern, die 43 Stunden in destilliertem Wasser gelegen haben, mitgeteilt. Diese Eier weisen eine sehr erhebliche Verlängerung ihres Durchmessers auf.

Es ist somit in destilliertem Wasser der Durchmesser der Eier in 43 Stunden von 33,8 Mikrometerteilstrichen auf 41 angestiegen. Die Verlängerung beträgt somit 24,2 % des ursprünglichen Durchmessers.

Tabelle XVII.

Unbefruchtete Eier, während 43 Stunden in destilliertem Wasser gezüchtet.

Durchmesser in Mikrometer- teilstreichen	Anzahl der Eier	
	zu Beginn des Versuches	nach 43 Stunden
31	1	—
33	5	—
34	11	—
35	1	—
36	1	—
38	—	4
39	—	3
40	—	4
42	—	4
43	—	3
44	—	1
Sa.:	19	19
Durchschnittsw. d. Durchm.	33,8	41

Aus den hier mitgeteilten Tabellen geht somit hervor, dass eine Wasseraufnahme dem niedrigen osmotischen Druck, der nach unseren Feststellungen für das eben befruchtete Ei charakteristisch ist, nicht zugrunde liegen kann. Die Reduktion des osmotischen Druckes muss mit Notwendigkeit als durch den Befruchtungsprozess an und für sich verursacht, durch das Eindringen des Samenfadens hervorgerufen angesehen werden.

Die Möglichkeit, dass die Eizellen schon innerhalb des mütterlichen Tieres oder während des Durchgangs durch den Eileiter aus „eigenem Trieb“ ihren osmotischen Druck veränderten, ist nicht stichhaltig, weil die Oviduktei in destilliertem Wasser in bezug auf die Volumzunahme sich genau so verhalten wie die Ovarialeier und also höchstwahrscheinlich denselben osmotischen Druck wie diese besitzen; auch verhalten sich die trocken befruchteten Oviduktei in destilliertem Wasser genau so, wie die in der Natur vorgefundenen befruchteten Eier im Gegensatz zu den unbefruchteten Ovidukteiern desselben Tieres.

Unbefruchtete Eier, die 3 Stunden in Wasser gelegen haben, zeigen, wie schon hervorgehoben, einen Δ von 0,350. Es dürfte darum von Interesse sein, wie lange die Samenfäden in süßem Wasser bzw. in destilliertem Wasser lebensfähig bleiben. Wir prüften auch die Lebensfähigkeit der Samenfäden in Göthlin'scher Salzlösung für den Frosch, und in Göthlin'scher Lösung für das

Kaninchen. Die Göthlin'sche Salzlösung für das Kaninchen hat folgende Zusammensetzung:

0,65 % NaCl
0,025 % CaCl_2
0,05 % KCl
0,3 % NaHCO_3 1)

Tabelle XVIII.

Experimente mit Froschspermien in verschiedenen Lösungen.

Zeit	Aqua dest.	Leitungswasser	Göthlin's Lösung für den Frosch	Göthlin's Lösung für das Kaninchen
30 "	bewegliche	bewegliche	bewegliche	langsam bewegliche
1 h	einige bewegliche	"	"	paretische
2 h	unbewegliche	einige paretische	"	unbewegliche
3 h	"	unbewegliche	"	"
4 h	"	"	"	"

In der vorstehenden Tabelle sind die Ergebnisse unserer Experimente, die sich auf Froschspermien beziehen, mitgeteilt. Aus der Tabelle geht sehr deutlich hervor, dass die Spermien sich am besten in Göthlin'scher, mit dem erwachsenen Frosche isotonischer Serum-salzlösung erhalten können. Das ist auch von vornherein anzunehmen. In Leitungswasser, das hinsichtlich des osmotischen Druckes dem Süsswasser am nächsten kommt, blieben die Spermien nur während einer Zeit von höchstens 3 Stunden am Leben. Aber schon nach 2 Stunden war ein Teil von ihnen paretisch, und man dürfte daher behaupten, dass ihre Fähigkeit zur Befruchtung schon nach 2 Stunden wesentlich herabgesetzt ist. Die Befruchtung muss also binnen 2 Stunden nach der Eiablage vorgenommen sein, um vonstatten gehen zu können. In Wirklichkeit werden ja die Eier in dem Augenblick, wo sie aus der Kloake austreten, mit dem eben erst entleerten Sperma des Männchens bespritzt, und das Durchdringen der Gallert-hülle nimmt nur etwa 1 Stunde in Anspruch. Hieraus ersehen wir, dass die Befruchtung zu einem Zeitpunkt zustande kommt, wo die Hypotonizität des Wassers eine grössere Verminderung des osmotischen Druckes in den Eiern unmöglich noch hervorgebracht haben kann.

1) F. Zachrisson, Experimentelle Studien über den Wert der intra-venösen und subkutanen Salzwasserinfusion bei akuter Anämie. Diss. Upsala 1902. Upsala Universitets Årsskrift. 1902.

Es könnte sich höchstens um eine Steigerung des Gefrierpunktes von $-0,48^{\circ}$ bis zu $-0,350^{\circ}$ handeln. Auch dieses Moment kann mit als Stütze dafür dienen, dass der eigentliche Befruchtungsprozess als die Ursache der Druckreduktion aufzufassen ist.

VI. Welche zellulären Prozesse bedingen die Reduktion des osmotischen Druckes?

In den vorausgegangenen Abschnitten haben wir mit grösster Wahrscheinlichkeit zeigen können, dass der niedrige osmotische Druck, der in den befruchteten Eiern beobachtet wird, durch die Befruchtung selbst und die mit ihr verknüpften Prozesse hervorgerufen wird. Diese Prozesse müssen offenbar so beschaffen sein, dass sie die Anzahl der in der Eizelle vorhandenen osmotisch wirkenden Moleküle und Ionen, somit — wie in der Einleitung dargestellt — zunächst die Anzahl der starken Elektrolyten, d. h. der anorganischen Salze, vermindern. Dabei wäre man vielleicht geneigt, anzunehmen, dass eine gesteigerte Permeabilität der Zellmembran für Salze, durch die Befruchtung hervorgerufen wird, wenigstens als ein unterstützendes Moment für die Verminderung des osmotischen Druckes zu betrachten ist. Eine solche Annahme stimmt aber nicht gut mit der Vorstellung überein, die man sich allgemein über die Eigenschaften der Zellmembran macht. Ebenso erscheint es nicht gerechtfertigt, ein Herausdiffundieren von Salzen aus dem Ei anzunehmen, wenn man bedenkt, dass gerade die anorganischen Salze für die normale Funktion der Organe des Frosches unentbehrlich sind. Die Annahme, dass ein Herausdiffundieren von Salzen aus der Eizelle stattfindet, wird übrigens durch die Tatsache direkt widerlegt, dass Froscheier in oft erneuertem destilliertem Wasser ihre Entwicklung durchmachen, und dass Froschembryonen in destilliertem Wasser wachsen können. Das in der Eizelle vorhandene, vom mütterlichen Tiere stammende Nahrungsmaterial, der Dotter, ist nämlich schon am 14. Entwicklungstage vollständig verbraucht; nun beginnt die eigentliche Nahrungsaufnahme durch die Embryonen. Ein Herausdiffundieren von Salzen im frühesten Embryonalzustande würde natürlicherweise in destilliertem Wasser nicht ersetzt werden können. Und nichtsdestoweniger wachsen die Embryonen ganz normal während der monatelang fortgesetzten Versuche weiter.

Die Momente, die das Abfallen des osmotischen Druckes beginnen, müssen daher wo anders zu suchen sein. Man könnte sich

vielleicht die Sache so vorstellen, dass die wichtigsten Salze chemisch gebunden werden. Die Eiweissstoffe und die Aminosäuren der Zelle sind schwache Elektrolyten amphoterer Natur. Tatsächlich hat man gefunden, dass eine Veränderung der elektrischen Leitfähigkeit und des Gefrierpunktes eintritt, wenn man in Säure- oder Alkalilösungen Eiweiss bringt. Das Eiweiss reagiert also mit diesen. Wenn dagegen Eiweiss zu Salzlösungen zugesetzt wird und nun eine Prüfung ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften vorgenommen wird, so können Veränderungen nicht nachgewiesen werden, natürlich vorausgesetzt, dass die Salzlösung nicht die fallende Konzentration besitzt. [Sjöquist¹⁾, Bugarsky und Liebermann²⁾]. Die Möglichkeit, dass die Salze des Eies bei der Befruchtung einfach chemisch gebunden werden würden, muss daher zurückgewiesen werden.

Dagegen tritt uns in der Adsorption ein Faktor entgegen, der die Reduktion des osmotischen Druckes im Ei unseres Erachtens leichter erklären konnte.

Unter Adsorption versteht man bekanntlich die Eigenschaft einer dispersen Phase, einen Teil gelöster Stoffe an ihrer Oberfläche festzustellen. Bei diesem Prozess stellt sich ein Gleichgewicht ein, das sowohl von der Volumkonzentration als von der Oberflächenkonzentration des gelösten Stoffes abhängig ist, dagegen von der Menge des Adsorptionsmittels sowie von der der Lösung unabhängig ist. Die Adsorption ist relativ grösser in verdünnten Lösungen, dagegen verhältnismässig geringer bei steigender Konzentration. Das Gleichgewichtsverhältnis wird in der folgenden Formel ausgedrückt:

$$\frac{x}{m} = \alpha \cdot c^{\frac{1}{n}} \text{ 3)}$$

in der sogenannten Adsorptionsisotherme, in welcher α und $\frac{1}{n}$ Konstanten sind, x die Menge des adsorbierten Teiles des gelösten Stoffes in Millimol ausgedrückt, m die Menge des adsorbierenden Stoffes, in Gramm ausgedrückt, und endlich c die Konzentration

1) J. Sjöquist, Physiologisch-chemische Untersuchungen über Salzsäure. Skand. Arch. f. Physiol. Bd. 5 S. 277. 1894.

2) Bugarsky und Liebermann, Über das Bindungsvermögen eiweiss-artiger Körper für Salzsäure, Natriumhydroxyd und Salze. Pflüger's Arch. f. Physiol. Bd. 72 S. 51. 1898.

3) A. Müller, Allgemeine Chemie der Kolloide. Bredig's Handb. d' angew. physik. Chemie Bd. 8 S. 116. A. Barth, Leipzig 1907.

der Lösung sind. Die Konstante $\frac{1}{n}$ variiert nur wenig für verschiedene Adsorptionsprozesse, im allgemeinen nur zwischen 0,1 und 0,5. Im vorliegenden Falle müssen unseres Erachtens die in der Zelle vorhandenen anorganischen Salze die adsorbierten Stoffe ausmachen. Als Adsorbens müssen die kolloiden Zellbestandteile angesprochen werden. Im folgenden gehen wir von der Annahme aus, dass der osmotische Druck im Ei hauptsächlich von NaCl hergestellt wird.

Wir haben schon oben hervorgehoben, dass eine geringe Wasseraufnahme durch die Eizelle bei der Eiablage möglicherweise vor sich gehen könnte, dass aber der Gefrierpunkt des Eiinhaltes dadurch nicht etwa über $0,40^{\circ}$ (s. Tab. XI und XIII) ansteigen dürfte. Diesem Gefrierpunkt entspricht eine NaCl-Konzentration von $0,1180 \frac{\text{Gramm-Mol.}}{\text{Liter}}$.

Die bei der Befruchtung eintretende Reduktion des osmotischen Druckes, eine Abnahme von $\mathcal{A} = 0,40$ zu $\mathcal{A} = 0,05$, würde ihrerseits durch eine Adsorption von NaCl in dazu erforderlichem Grade verursacht sein. Da $\mathcal{A} = 0,05$ eine NaCl-Menge von $0,01761 \frac{\text{Gramm-Mol.}}{\text{Liter}}$

bedeutet, so würde in der Adsorptionsisotherme die c -Konzentration von freier NaCl diesen Wert haben müssen. Durch die angenommene Adsorption dürften somit $0,1004 \frac{\text{Gramm-Mol.}}{\text{Liter}}$ adsorbiert werden. Die

Untersuchungen von Wetzel¹⁾ haben ergeben, dass das unbefruchtete Froschei 0,002 g wiegt; sein Wassergehalt beträgt 52 %, die Trockensubstanz des Frosches hat ein Gewicht von 0,000 901 g. Die Wassermenge jedes Eies beträgt somit 0,0011 ccm. Es lässt sich berechnen, dass die adsorbierte Salzmenge in jedem Ei 0,0 000 001 104 Mole oder 0,0001 104 Millimole ausmacht. Das ist der Wert von x in der Adsorptionsisotherme. Der Wert von m lässt sich dagegen nicht genau ermitteln. Man kann von der Annahme ausgehen, dass die adsorbierende Masse höchstens $\frac{4}{5}$ der Trockensubstanz ausmacht. Nach Hammarsten²⁾ enthält das Eiweiss des Hühnereies 100 bis

1) G. Wetzel, Der Wassergehalt des fertigen Froscheies und der Mechanismus der Bildung seiner Hülle im Eileiter. Arch. f. Entwicklungsm. Bd. 26 S. 651. 1908.

2) O. Hammarsten, Lehrb. d. physiol. Chemie S. 599. Bergmann, Wiesbaden 1910.

130 ‰ Eiweissstoffe, gegenüber bloss 7 ‰ Salzen, während der Rest aus Wasser besteht. Nach Poleck¹⁾ findet man in der Asche des Hühnereidotter 262,6 ‰ Na, K und Ca sowie nicht weniger als 638,1—667,0 ‰ Phosphorsäure; demnach dürfte die Annahme, dass die adsorbierende Masse höchstens $\frac{4}{5}$ oder wenigstens $\frac{1}{3}$ (siehe weiter unten) der Trockensubstanz ausmacht, wohl den tatsächlichen Verhältnissen entsprechen.

$m = \frac{4}{5}$ der Trockensubstanz entsprach 0,0007208 g.

Also

$$\frac{x}{m} = 0,153.$$

Wird die Konstante $\frac{1}{n} = \frac{1}{2}$ gesetzt, so bekommt man als annähernden Wert für die Konstante

$$0,153 = \alpha \cdot 0,01761^{\frac{1}{2}} \\ \alpha = 1,153.$$

Hat aber $\frac{1}{n}$ einen anderen Wert, z. B. 0,2, so erhält man

$$\alpha = 0,3456.$$

Nimmt man wieder an, dass die adsorbierende Masse nur zwei Drittel der Trockensubstanz ausmacht, so bekommt man unter Benutzung der Werte 0,5 und 0,2 für $\frac{1}{n}$ die neuen Werte

$$\alpha = 1,371 \text{ und} \\ \alpha = 0,4083.$$

Wenn schliesslich die adsorbierende Masse nur ein Drittel der Trockensubstanz ausmacht, so erhält man natürlich doppelt so grosse Werte für α .

Die von Hägglund²⁾ gefundenen Werte für die Adsorption von NaCl durch Kohle geben eine weit geringere Konstante als die, welche bei der von uns angenommenen Adsorption möglicherweise gelten könnte. Die Werte für α dagegen liegen innerhalb der Grenzen der Variation der α -Konstanten, die man für andere Adsorptionserscheinungen gefunden hat, wo die Kohle das Adsorbens gewesen ist. Sie sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

1) Poleck, zit. nach Hammarsten, l. c. S. 598.

2) E. Hägglund, Über Adsorption gelöster Stoffe. Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 64 S. 227. 1910.

Tabelle XIX.

Adsorptionskonstante bei Kohle als Adsorbens.

Stoff	α	$\frac{1}{n}$	Autor
Essigsäure	2,006	0,425	H. Freundlich ¹⁾
Propionsäure	3,463	0,454	"
Bernsteinsäure	4,426	0,274	"
Aceton	5,212	0,820	H. Michaelis und Rona ²⁾

Die für eine Erklärung der Reduktion des osmotischen Druckes innerhalb des Eies erforderliche Adsorption übertrifft also nicht die Werte derselben, die man bisher kannte. Man hat gefunden³⁾, dass die Adsorption relativ wenig von der Natur der festen Phase abhängig ist, wenn diese nur eine hinreichend grosse Grenzfläche darbietet. Auch die Veränderung der Flächenspannung zwischen den beiden benachbarten Phasen, die durch den adsorbierten Stoff hervorgerufen wird, ist von grosser Wichtigkeit. Darum gehören die Neutralsalze zu denjenigen Stoffen, die nur in verhältnismässig geringem Grade adsorbiert werden.

Noch einem weiteren Momente haben wir Rechnung zu tragen, dem Adsorptionerscheinungen zugrunde liegen könnten, nämlich „dass disperse Teilchen, welche die Potentialdifferenz zwischen ihrem Dispersionsmittel und einer dritten Phase verringern, die Tendenz haben werden, in die Berührungsschicht der genannten beiden Phasen zu gehen“ [zitiert nach Ostwald⁴⁾]. Diese Einwirkung wird auch von den Neutralsalzen ausgeübt. Diese sogenannte elektrische Adsorption kann nun eine Fällung von Kolloiden veranlassen. Durch die Ausgleichung der Potentialdifferenz wird eine Flächenverminderung der dispersen Teile hervorgerufen, und wenn diese Flächenverminderung einen gewissen Grad erreicht, wird eine Fällung vor sich gehen, wobei ein Teil der fallenden Elektrolyten in der Fällung mitgerissen

1) H. Freundlich, Kapillarchemie. Leipzig 1909.

2) L. Michaelis und P. Rona, Untersuchungen über Adsorption. Biochemische Zeitschr. Bd. 15 S. 196. 1908.

3) L. Michaelis und P. Rona, l. c. — L. Michaelis, Dynamik der Oberflächen. Dresden 1909.

4) W. Ostwald, Die wichtigsten Eigenschaften des kolloiden Zustandes der Stoffe. Handb. d. Biochem. Bd. 1 H. 5. 1909.

wird [Linder und Picton¹⁾]. Diese Adsorptionerscheinung setzt also die Entstehung einer Potentialdifferenz zwischen der dispersen Phase der Kolloide und dem Dispersionsmittel voraus. Bei dem von uns angenommenen Adsorptionsprozess im Ei muss demnach eine Potentialdifferenz zwischen den verschiedenen Lösungsphasen des Eies hervorgerufen oder auch eine schon vorhandene im erheblichen Grade verändert werden.

Man musste darum annehmen, dass gleichzeitig mit der Befruchtung und durch sie hervorgerufen eine elektrische Potentialdifferenz zwischen den dispersen Phasen des Zellinhalts und dem Dispersionsmittel entsteht, die eine Adsorption von Salzen und eine Gelumwandlung von Kolloiden bewirkt, wobei in der Lösung zurückgebliebene, osmotisch wirksame Stoffe in grosser Menge „mitgerissen“ werden. Wir sind jedoch nicht imstande, einen Faktor anzugeben, der in der genannten Weise bei der Befruchtung die Potentialdifferenz zwischen dem Dispersionsmittel und der dispersen Phase verändern könnte, und es kann darum an dieser Annahme nicht festgehalten werden. Es ist natürlich möglich, dass der Samenfaden in das Ei Stoffe hineinbringt, die direkt den Lösungszustand der Kolloide verändern.

Wir möchten mit dieser Diskussion nur auf manche Möglichkeit einer Deutung hingewiesen haben, ohne eine bestimmte Entscheidung in der Frage treffen zu wollen. Es sei bemerkt, dass wir uns die Veränderung des Lösungszustandes der Zellkolloide, von denen oben die Rede war, nicht als eine vollständige Trennung zwischen dem Dispersionsmittel und der dispersen Phase vorstellen, sondern eher als eine Verschiebung im Verhältnis zwischen der wasserarmen und der wasserreichen Phase. Ein solcher Verlauf dürfte reversibel sein.

M. Fischer und W. Ostwald²⁾ haben die Hypothesen aufgestellt, dass alle Stoffe, die normalerweise Koagulation hervorrufen, „mit Erfolg zur Herbeiführung der Befruchtung entweder normalerweise benutzt, oder aber künstlich verwendet werden können“. Diese

1) S. E. Linder und H. Picton, Solution and Pseudosolution. Part. II Some physical properties of arsenious sulphide and other solutions. Journ. of the chem. Soc. London vol. 67 p. 63. 1895.

2) M. Fischer und W. Ostwald, Zur physikalisch-chemischen Theorie der Befruchtung. Pflüger's Arch. f. Physiol. Bd. 106 S. 229. 1905.

Hypothese beruht, wie es scheint, nicht auf direkten Untersuchungen der Natur der Befruchtung; sie ist auf einer von A. Fischer¹⁾ mitgeteilten Beobachtung aufgebaut, dass man mit Sublimatkristallen sowie mit einigen anderen Stoffen bei der von ihnen verursachten Gelumwandlung in einer Albumoselösung Bilder hervorrufen kann, die in höchstem Grade an Astrosphären erinnern. Von Boveri's²⁾ Annahme ausgehend, dass die durch den Eintritt des Samenfadens hervorgerufene Astrosphäre der eigentliche beim Zustandekommen der Eiteilung wirksame Faktor sei, stellten Fischer und Ostwald u. a. die Hypothese auf, dass alle Mittel, die eine Koagulation des Zelliñhaltes herbeiführen, damit auch die Entstehung einer Astrosphäre sowie die Bedingungen für die Zellteilung schaffen. In diesem Sinne nahmen Fischer und Ostwald an, dass die normale Befruchtung in einer Gelatinierung von Eikolloiden besteht. J. Loeb³⁾ hat diese Theorie einer eingehenden Prüfung unterworfen. Er zeigte, dass diese Auffassung über die Natur des Befruchtungsprozesses mit Bezug auf die Eier einiger Salzwassertiere, z. B. des Seeigels, nicht aufrecht erhalten werden kann; namentlich weil das Auftreten der Astrosphären erst einige Stunden nach der auf parthenogenetischem Wege hervorgerufenen Membranbildung vor sich geht. Wir müssen bemerken, dass diesem Einwand kein allzugrosses Gewicht beigelegt werden kann, da es a priori gar nicht unmöglich ist, dass in diesen Eizellen die Bildung der Astrosphären der schon früher stattgehabten Koagulation eben erst nach einiger Zeit folgt. Vielleicht wichtiger scheint uns die Bemerkung zu sein, dass nicht nur diejenigen Stoffe, die geeignet sind, eine Gelumwandlung des Eiñhaltes hervorzurufen, sondern auch alle cytolytisch wirksamen Stoffe entwicklungsregend wirken. Jedenfalls können die Bemerkungen J. Loeb's nur mit Bezug auf diejenigen Tierarten, die von ihm untersucht wurden, geltend gemacht werden. Wenn man bedenkt, unter welchen verschiedenen äusseren Bedingungen die Eier der einzelnen Tierarten ihre Entwicklung durchmachen, so wird man hier allgemein gültige Regeln nicht aufstellen wollen. Namentlich mit Rücksicht auf die gewaltigen Unterschiede, die in der Hyper- oder Hypotonizität des umgebenden Mediums gegenüber der Eizelle gegeben sind.

1) A. Fischer, Bau, Färbung usw. des Protoplasmas S. 206. Jena 1899. Zit. nach M. Fischer und W. Ostwald, l. c. S. 254.

2) T. Boveri, Das Problem der Befruchtung. Jena 1902.

3) J. Loeb, l. c.

Unsere Hypothese ist in ihrem wesentlichen Teil von der von Fischer und Ostwald aufgestellten verschieden. Nach diesen Autoren würde mit dem Verschwinden der Astrosphären auch die Koagulation aufhören, was aber für das Froschei nicht zutrifft. Der osmotische Druck dieses Eies bleibt während einer längeren Zeit dauernd ziemlich niedrig oder mit anderen Worten: wir sind genötigt, für die frühe Embryonalentwicklung einen fortgesetzten Gelzustand der Teilungszellen und demnach eine dauernde Adsorption von Kristalloiden anzunehmen.

VII. Anpassung oder phylogenetische Erscheinung?

Wir haben es in den obigen Ausführungen wahrscheinlich gemacht, dass die beim befruchteten Froschei vorhandene Übereinstimmung zwischen dem äusseren und dem inneren osmotischen Drucke namentlich durch eine bei der Befruchtung eintretende Gelumwandlung des Zellinhalts verursacht wird. Wir haben früher hervorgehoben, dass der Frosch allgemein als ein homoiosmotisches Tier gilt, d. h. dass ihm die Fähigkeit zugesprochen wird, seinen eigenen osmotischen Druck unabhängig von dem der Umgebung auf konstanter Höhe aufrecht zu erhalten. Dagegen nimmt das unbefruchtete Ei als poikilosmotische Zelle in einem hypotonischen Medium an Volum zu, d. h. es fehlt ihm die Fähigkeit, seinen osmotischen Druck unabhängig von dem der Umgebung zu erhalten.

Wir können nun unseren Befund folgendermaassen formulieren: das unbefruchtete, poikilosmotische Ei wird durch die Befruchtung osmotisch normiert, es wird homoiosmotisch gegenüber der Umgebung, in welcher es lebt. Man könnte aber auch behaupten, dass die Eizelle, die im unbefruchteten Zustande poikilosmotische Eigenschaften besitzt, dieselben auch nach der Befruchtung beibehält, obwohl sein osmotischer Druck bis zu einem Grade vermindert und dem der Umgebung gleich wird. Diese Auffassung würde in vollkommener Übereinstimmung mit der von Höber¹⁾, Hamburger²⁾, Bottazzi³⁾ u. a. vorgenommenen Einteilung der Tiere in homoiosmotische und poikilosmotische stehen. Man könnte dann geltend machen, dass die von

1) R. Höber, l. c.

2) H. J. Hamburger, l. c.

3) Fil. Bottazzi, l. c.

uns festgestellte relative Poikilosmose des befruchteten Eies und der frühen Embryonalstadien diese Abnahme des osmotischen Druckes des Eies bis zur Isotonie mit der Umgebung, ein Erbstück von einer phylogenetisch früheren Entwicklungsstufe sei, für die eine Übereinstimmung zwischen dem Druck der Umgebung und dem der Körperzellen charakteristisch war. Wir haben aber früher gezeigt, dass die Vorstellung, es handle sich bei der Homoiosmose und der Poikilosmose um phylogenetische Entwicklungsmomente, nicht aufrecht erhalten werden kann. Die Homoiosmose ist vielmehr mit grosser Wahrscheinlichkeit eine direkte Anpassungserscheinung, die in der Entwicklungsreihe überall da auftritt, wo sie sich als nötig erweist.

Aber man könnte doch behaupten wollen, dass die Erscheinungen, mit denen wir uns hier beschäftigt haben, Erscheinungen der Poikilosmose und Homoiosmose phylogenetische Erbschaften seien, nämlich wenn es sich zeigen sollte, dass die Gattung der Frösche ursprünglich nur in süssem Wasser gelebt und erst später die Lebensgewohnheiten, die sie jetzt besitzt, erworben hätte. Es wäre dann die Poikilosmose des unbefruchteten Eies ein Erbstück des Lebens im Süsswasser, und man wäre dementsprechend genötigt, die Tatsache, dass befruchtete Eier von Fröschen, die nicht im Wasser, sondern auf dem Lande laichen, einen relativ hohen osmotischen Druck aufweisen, vielleicht mit ihrem eigenen Serum isotonisch, mit Notwendigkeit als eine Anpassungserscheinung zu betrachten. Es gibt nämlich Frösche, die ihren Laich auf dem Lande, in Tonerde, in Nester, die in Bäumen hängen, in Taschen der eigenen Haut usw. ablegen [siehe Morgan¹⁾]. Charakteristisch für die Eier aller dieser Arten ist, dass sie zugrunde gehen, wenn sie in einem zu frühen Stadium in süssem Wasser versetzt werden, was mit grösster Wahrscheinlichkeit darauf hinweist, dass diese Eier einen osmotischen Druck besitzen, der grösser ist als der des Süsswassers. Es kann aber auch sein, dass die im Süsswasser laichenden Frösche eine später entstandene Variationsform seien, und dass die Reduktion des osmotischen Druckes des Eies durch die Befruchtung und das Erhalten dieses Druckes während der ersten Entwicklung spezifische Anpassungserscheinungen dieser Form sind.

Man kann nicht mit Sicherheit entscheiden, ob die Reduktion

1) T. H. Morgan, Die Entwicklung des Froscheies. W. Engelmann, Leipzig 1904.

des osmotischen Druckes eine blossе Anpassungserscheinung oder ein phylogenetisches Erbe ist. Wir haben gesehen, dass die Homoiomose in der Tat eine Anpassungserscheinung ist, und es erscheint darum sehr wahrscheinlich, dass auch die Poikilomose, die wir bei den Eiern der von uns untersuchten Froschgattung nach der Befruchtung festgestellt haben, eine von der betreffenden Froschgattung erworbene Anpassungserscheinung ist; ohne diese Eigenschaft aber würden die Eier sich in Süsswasser nicht entwickeln können.

In diesem Zusammenhang sei eine andere Frage aufgeworfen: Sind die geschilderten Prozesse des Froscheies bei der Befruchtung allgemeingültiger Natur, d. h. sind sie die Folgen einer jeden Befruchtung, wenn auch in ihrer Intensität verschieden für die Eier der einzelnen Tierarten gemäss den verschiedenen äusseren Verhältnissen, in denen die Eier leben, und in denen die frühe Embryonalentwicklung vor sich geht? Die früher erwähnten, von Atkins vorgenommenen Untersuchungen scheinen für eine solche Auffassung zu sprechen. Er konnte nämlich zeigen, dass der osmotische Druck in den Eiern der Vogelgattungen, die von ihm untersucht wurden (das Huhn, die Ente, die Gans usw.) niedriger ist als der des Serums des erwachsenen Vogels. Aus seinem Bericht geht aber nicht hervor, ob er mit befruchteten oder mit unbefruchteten Eiern gearbeitet hat. Wir wissen darum nicht, ob diese Abnahme des osmotischen Druckes eine Folge der Befruchtung ist oder nicht. Es erscheint aber wenig wahrscheinlich, dass sie von der Befruchtung verursacht worden wäre. Atkins Untersuchungen sind nämlich an ganzen Eiern vorgenommen, ohne dass das Dottermaterial oder Eiweiss vorher entfernt wurde, und es ist nicht ohne weiteres einzusehen, dass Veränderungen, welche sich in der Keimscheibe des Vogeleies abspielen, auch im Dottermaterial und Eiweiss zu beobachten sind. Die von Atkins selbst gegebene Deutung, dass die Abnahme des osmotischen Druckes durch eine Wasseraufnahme durch das Ei aus der umgebenden Eiweisschicht bedingt ist, hat viel für sich.

In bezug auf die Befruchtung der in Salzwasser laichenden Tiere, wie z. B. bei Seesternen, Seeigeln, Mollusken usw., scheint die Annahme eines Koagulationsprozesses die Erscheinungen nicht erklären zu können; die Befruchtung ist hier vielleicht anderer Natur (Loeb).

Es gibt aber einige Tiergruppen, von denen man mit gutem Recht annehmen kann, dass bei ihnen im Zusammenhang mit der Befruchtung Erscheinungen zutage treten, die denen beim Frosche ähnlich sind. Das sind die übrigen, im Süßwasser laichenden Tiere, z. B. die Süßwasserfische, die Insekten usw., sowie ein Teil der Salzwassertiere, z. B. der Lachs usw.

Von grossem Interesse wäre eine Untersuchung über die Mengenverhältnisse der anorganischen Salze in den Samenfäden verschiedener Tierarten. Eine solche wurde bisher leider nicht ausgeführt, aber man darf annehmen, dass die Mengenverhältnisse dieser Salze verschieden sind, je nachdem die Samenfäden von einem im Salzwasser oder einem im Süßwasser laichenden Tiere stammen. Es ist bemerkenswert, dass der Kopf des Samenfadens vom Lachs — das einzige Tier, das in dieser Hinsicht untersucht worden ist — Ca , SO_4 , PO_4 und Fe enthält [Miescher und Schmiedeberg¹⁾]. Hier sind also, jedenfalls in vorwiegender Menge, zwei- und mehrwertige Kationen vorhanden. Da wir eine Veränderung in dem Lösungszustand der Kolloide als die Ursache der Reduktion des osmotischen Druckes entnehmen — diese Reduktion tritt sicherlich auch beim Lachse in die Erscheinung —, so darf diesen Verhältnissen eine gewisse Bedeutung zugeschrieben werden: die Fähigkeit der Ionen, Koagulation hervorzurufen, hängt ja von ihrer Wertigkeit ab und zwar entsprechend dem Schema

$$\text{C}_1 : \text{C}_2 : \text{C}_3 = \text{K}^1 : \text{K}^2 : \text{K}^3,$$

in dem C_1 , C_2 und C_3 ein-, zwei- und dreiwertige Ionen, K dagegen die zur Koagulation erforderlichen Ionenmengen sind [Hardy und Whetham²⁾].

VIII. Der Zusammenhang zwischen der Parthenogenese und die Reduktion des osmotischen Druckes.

Im Zusammenhang mit den Tatsachen, die wir oben geschildert haben, kann man nun die interessante Frage aufwerfen, ob es möglich

1) F. Miescher, Physiologisch-chemische Untersuchungen über die Lachsmilch. Nach den hinterlassenen Aufzeichnungen und Versuchsprotokollen des Autors bearbeitet und herausgegeben von O. Schmiedeberg, Arch. f. exper. Pathol. Bd. 37 S. 100. 1896.

2) Hardy und Whetham, Coagulation by electricity. Journ. of physiol. vol. 24 p. 288. 1899.

ist, durch äussere Agenzien in der unbefruchteten Eizelle Erscheinungen hervorzurufen, die den durch die Befruchtung hervorgerufenen ähnlich sind, und die in einer verhinderten Volumzunahme der Eizelle in destilliertem Wasser ihren Ausdruck finden. Als ein hierzu geeignetes Mittel hat sich zunächst die Behandlung der Eizelle mit einem hypertonen Medium erwiesen, die eine der vielen Methoden ist, die für die künstliche Parthenogenese in Betracht kommen.

Versuche mit künstlicher Parthenogenese wurden von Bataillon¹⁾ am Frosche ausgeführt, wobei er sich schwach hypertonscher Lösungen bediente. Die Göthlin'sche Lösung für das Kaninchen ist eine Lösung, die den von Bataillon angewendeten recht nahe kommt. In unseren Versuchen wurden die Eier 2 Stunden lang mit einer Lösung behandelt, die für sie hypertonsch war. Nur an vier Eiern wurde die dabei entstehende Schrumpfung gemessen, und diese betrug in Prozenten des ursprünglichen Durchmessers:

1. 4,9 %; 2. 5 %; 3. 2,5 %; 4. 1,2 %.

Mittlerer Wert: 3,4 %.

Unmittelbar nach dieser Behandlung wurden die Eier in destilliertes Wasser übergeführt. Nachdem sie 12 Stunden lang in destilliertem Wasser gelegen hatten, wurde wieder ihr Durchmesser gemessen.

Der Wert für die Zunahme des Durchmessers von im hypertonen Medium behandelten unbefruchteten Eiern stimmt mithin sehr gut mit dem Wert überein, den wir früher (Tab. X) für trocken befruchtete Eier nach zwölfstündigem Liegen in destilliertem Wasser erhalten hatte; er bleibt dagegen weit hinter dem Wert zurück, den wir für die Zunahme des Durchmessers von unbefruchteten Eiern in destilliertem Wasser erhalten hatten (Tab. XIV). Hieraus dürfte es zu schliessen sein, dass die Behandlung der Eier mit hypertonscher Salzlösung die Entstehung der sonst durch destilliertes Wasser bedingten Zunahme verhindert.

1) E. Bataillon, La pression osmotique et les grands problèmes de la Biologie. Arch. f. Entwicklungsm. Bd. 11 S. 149. 1900. — E. Bataillon, Études expérimentales sur l'évolution des Amphibiens. Les degrés de maturation de l'œuf et la morphogénèse. Arch. f. Entwicklungsm. Bd. 12 S. 610. 1901. — E. Bataillon, Nouveaux essais de Parthénogénèse expérimentale chez les vertébrés inférieures. Arch. f. Entwicklungsm. Bd. 18 S. 1. 1904.

Tabelle XX.

Unbefruchtete Eier, die 2 Stunden in einem hypertonischen Medium behandelt werden und dann für 12 Stunden in destilliertes Wasser versetzt wurden.

Zunahme des Eidurchmessers in Prozenten des Eidurchmessers, wie er nach vorheriger 2 stündiger Behandlung im hypertonischen Medium gemessen worden war.	Anzahl der Eier
0	4
1,0	1
1,5	1
2,5	11
4,0	4
5,0	2
5,5	2
6,5	4
9	1
10,5	4
Mittlerer Wert: 4,176 %	Sa.: 34

Tabelle XXI.

Hypertonisch (Tab. XX) behandelte Eier nach 24 stündigem Liegen im destillierten Wasser.

Zunahme des Durchmessers in Prozenten des Durchmessers, wie er nach voriger 2 stündiger Behandlung in hypertonischen Medium und 12 stündigem Liegen in destilliertem Wasser gemessen worden war.	Anzahl der Eier
7,5	3
10,5	1
12,0	1
12,5	1
13,0	1
25,0	1
33,0	1
37,0	2

Nachdem die Eier nach 12 Stunden in destilliertem Wasser gelegen hatten, wurde eine neue Bestimmung des Durchmessers vorgenommen. Es ergab sich nun, dass 11 von 34 Eiern einer vollständigen Cytolyse mit körnigem Zerfall anheimgefallen waren. Bei elf anderen Eiern war die Cytolyse nicht so weit vorgeschritten, doch der Durchmesser war erheblich vergrößert, wie aus Tab. XXI hervorgeht. Von sämtlichen Eiern wiesen nur neun eine geringe oder so gut wie keine Volumzunahme auf, was aus Tab. XXII ersichtlich:

Tabelle XXII.

Hypertonisch (Tab. XX) behandelte Eier nach 24 stündigem Liegen
in destilliertem Wasser.

Zunahme des Durchmessers in Prozenten des Durchmessers, wie er nach vorheriger 2 stündiger Behandlung im hypertonischen Medium und 12 stündigem Liegen in destilliertem Wasser gemessen worden war.	Anzahl der Eier
0	2
1,2	1
1,9	1
2,5	1
3,5	1
5,1	1
6,0	1
6,5	1
Mittlerer Wert: 3,0 %	Sa.: 9

Aus den ausgeführten orientierenden, keineswegs umfassenden Versuchen ergibt sich mit ziemlich grosser Bestimmtheit, dass die hypertonische Salzlösung eine verschiedene Wirkung auf verschiedene Eier hat. Wir fanden, dass diejenigen Eier, die in der ersten Messungsreihe einen hohen Wert für den Durchmesser aufwiesen, also ein deutliches Zeichen der beginnenden Volumzunahme dargeboten hatten, später sämtlich eine vollständige Cytolyse erlitten. In diesen Eiern hatten also die Prozesse, die den Zerfall entweder bedingen oder beschleunigen, erheblich früher als in den übrigen begonnen.

Es ist wirklich bemerkenswert, mit welcher Geschwindigkeit die Cytolyse dieser in hypertonischem Medium behandelten Eier vor sich geht. Dagegen waren bei 75 % von Eiern, die dieser Behandlung nicht unterworfen und so gewissermaassen nicht befruchtet worden waren, die aber 4 Tage lang in destilliertem Wasser gelegen hatten, keine Zeichen einer beginnenden Cytolyse vorhanden. Nach 43 Stunden konnte aber bei ihnen eine erhöhte Permeabilität festgestellt werden, allerdings keine vollkommene Permeabilität, wie das aus den folgenden Versuchen hervorgeht.

Ein Teil dieser Eier wurde in Göthlin'sche Lösung für den Frosch versetzt; nach 24 Stunden konnten wir eine erhebliche Volumverminderung konstatieren (Verkürzung des Durchmessers = 10 %). Die Ursache, die den viel früher eintretenden Zerfall bei den im

hypertonischen Medium behandelten Eiern hervorruft, möchten wir in einer Beschleunigung der Oxydationsprozesse sehen. Eine solche Beschleunigung von Oxydationen ist von Warburg¹⁾ durch direkte Messungen bei im hypertonischen Medium behandelten Echinodermen-eiern konstatiert worden.

Aus dieser vorläufigen Versuchsreihe scheint mit ziemlicher Sicherheit hervorzugehen, dass die Behandlung des unbefruchteten Froscheies im hypertonischen Medium, das nach Bataillon imstande ist, eine normale Embryonalentwicklung (Parthenogenese) einzuleiten, die Volumzunahme der in destilliertem Wasser versetzten Eier verändert. Es ist darum wahrscheinlich, dass durch die Behandlung im hypertonischen Medium im Froschei dieselbe Reduktion des osmotischen Innendruckes des Eies hervorgerufen wird wie durch die normale Befruchtung. Die Annahme, dass durch die Hypertonizität des äusseren Mediums eine Undurchlässigkeit der Eimembran bedingt wird, erscheint im höchsten Grade unwahrscheinlich. Mit Bezug auf diese Frage verweisen wir auf die allgemeinen Argumente, die wir oben gegen eine solche Annahme ins Feld geführt haben.

Nachdem ein Teil der Eier 18 Stunden im hypertonischen Medium gelegen hatte, wurden die Eier in destilliertes Wasser versetzt. Die nachstehende Tabelle XXIII (S. 340) zeigt das Verhalten des Eidurchmessers bei diesen Eiern.

Die Zunahme der Eier, die 18 Stunden im hypertonischen Medium behandelt worden waren, und die dann 12 Stunden in destilliertem Wasser gelegen hatten, stimmten vollauf mit der Zunahme überein, die bei den in Tab. XX niedergelegten Versuchen konstatiert wurde. Diese Eier weisen aber während der langen Behandlung im hypertonischen Medium eine viel erheblichere Volumverminderung auf, wie aus Tab. XXIV ersichtlich. Nach 36-stündigem Liegen in destilliertem Wasser zeigen dieselben Eier eine durchschnittliche Volumzunahme, deren Wert hinter der der unbefruchteten, nicht vorbehandelten Eier, die bloss 12 Stunden in destilliertem Wasser gelegen hatten, zurückbleibt. In dieser Reihe trat Cytolyse

1) O. Warburg, Beobachtungen über die Oxydationsprozesse im Seeigelei. Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 57. 1908.

Tabelle XXIII.

Unbefruchtete Eier, die 18 Stunden im hypertonen Medium gelegen hatten und dann in destilliertes Wasser versetzt wurden. Zunahme des Eidurchmessers in Prozenten des Durchmessers, wie er nach 18 stündiger Behandlung im hypertonen Medium gemessen worden war.

Nach 12 Stunden in dest. Wasser	Nach 16 Stunden in dest. Wasser	Gesamtzunahme nach 36 Stunden
5,4	5,1	10,5
4,1	5,2	9,3
2,7	13,0	15,7
1,3	7,5	8,8
7,2	6,5	13,7
2,6	9,0	11,6
6,9	5,0	11,9
0	5,2	5,2
6,9	5,0	11,9
2,7	5,0	7,7
1,4	9,0	10,4
2,7	7,5	10,2
4,1	4,0	8,1
4,1	7,0	11,1
5,7	5,0	10,7
8,9	11,0	19,9
7,1	7,0	14,1
0	5,0	5,0
8,5	5,0	13,5
4,1	4,0	8,1
Mittl. Wert 4,22	6,50	10,72

ebenso schnell ein wie in der vorigen, ebenso in einer Versuchsreihe, in der die Eier 46 Stunden im hypertonen Medium vorbehandelt waren. Durch Messungen von Eiern, die verschieden lange in der oben erwähnten hypertonen Salzlösung gelegen hatten, konnten wir eine fortschreitende Volumverminderung konstatieren.

Tabelle XXIV.

Dauer der Behandlung im hypertonen Medium	Eidurchmesser in Mikrometerteilstrichen (mittlere Werte)
2 Stunden	38,5
18 "	36,35
46 "	35,55

Wir nehmen an, dass die hypertone Salzlösung wenigstens zum Teil durch ihren stärkeren osmotischen Druck wirkt, wobei ein Herausdiffundieren von Wasser aus der Eizelle stattfindet und die Ionenkonzentration im Ei zunimmt. Dadurch werden die Lösungsverhältnisse und damit auch das Gleichgewicht der Adsorption ver-

ändert. Diese Annahme wird durch die in Tabelle XXIV niedergelegten Ergebnisse bestätigt. Werden die Eier bloss 2 Stunden der Einwirkung der hypertonen Lösung ausgesetzt, so werden die Oxydationsprozesse in der Zelle beschleunigt, wie man das aus dem oft äusserst schnell einsetzenden Zerfallen ersehen kann. Wenn diese beschleunigte Oxydation „in die richtigen Bahnen gelenkt wird“, so kommt eine Parthenogenese zustande, wie die Versuche von Bataillon gezeigt haben.

Um Oxydationsprozesse in der Zelle zustande zu bringen, sind nach Bach und Chodat¹⁾ folgende Stoffe erforderlich: Oxygenasen, die molekularen Sauerstoff aufnehmen und dadurch in Peroxyde verwandelt werden; Peroxydasen, die die oxydierende Wirkung der Peroxyde wesentlich verstärken, und Katalasen, die Sauerstoff aus den Peroxyden abspalten und so stets freien Sauerstoff zur Verfügung stellen. Es ist W. Ostwald gelungen, Katalasen und Peroxyde aus dem Extrakt von Samenfäden und Eizellen des Frosches zu isolieren. Es fragt sich nun, in welcher Weise die hypertone Behandlung die Wirkung dieser Stoffe zu verstärken oder zu beschleunigen vermag. Man kann sich den Prozess so vorstellen, dass bei der hypertonen Behandlung eine Adsorption anorganischer Salze stattfindet und eine durch letztere bewirkte Hemmung von Oxydationsprozessen wegfällt.

Die Einwirkung von anorganischen Salzen auf Katalasen ist unter anderen von Jacobson²⁾ studiert worden, der feststellen konnte, dass sie eine hemmende Wirkung ausüben. In einer Versuchsreihe, in der die Salzkonzentration 0,5 % betrug, erhielt Jacobson eine verschieden starke Wirkung für die verschiedenen Ionen; er konnte sie in eine Reihe ordnen, in welcher die ersten die stärkste, die letzten eine schwächere hemmende Wirkung zeigten: BaCl_2 , CaCl_2 , NH_4Cl , NaCl , KCl . Senter⁴⁾ konstatierte eine hemmende Wirkung auch bei sehr geringen Konzentrationen:

1) H. Bach und R. Chodat, Über den gegenwärtigen Stand der Lehre von den pflanzlichen Oxydationsfermenten. Biochem. Zentralbl. Bd. 1 S. 1. 1903.

2) W. Ostwald, Über das Vorkommen von oxydativen Fermenten in den reifen Geschlechtszellen von Amphibien und über die Rolle dieser Fermente bei den Vorgängen der Entwicklungserregung. Biochem. Zentralbl. Bd. 6 S. 409. 1907.

3) T. Jacobson, Untersuchungen über lösliche Fermente. Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 16 S. 340. 1891.

4) G. Senter, Das Wasserstoffsuperoxyd versetzende Enzym des Blutes. Zeitschr. f. physik. Chemie Bd. 51. 1905.

Ohne Zusatz	war die Oxydationskonstante		0,0280.
Bei Zusatz von $\frac{1}{400}$ Mol. NaCl	war die Oxydationskonstante		0,0055,
" " " $\frac{1}{800}$ " " " "	" " " "		0,0093,
" " " $\frac{1}{400}$ " KCl " "	" " " "		0,0057,
" " " $\frac{1}{800}$ " " " "	" " " "		0,0095,
" " " $\frac{1}{200}$ " CaCl ₂ " "	" " " "		0,0057,
" " " $\frac{1}{400}$ " " " "	" " " "		0,0084.

In dieser Tabelle haben wir nur diejenigen Werte aus Senters Abhandlung angeführt, die von Interesse für unsere Untersuchung zu sein scheinen.

Wenn somit die von uns bei der normalen Befruchtung des Froscheies festgestellte Verminderung des osmotischen Druckes sowie der nach unserer Annahme damit zusammenhängende Adsorptionsprozess der anorganischen Salze usw. auch bei der Behandlung des unbefruchteten Froscheies im hypertonen Medium, d. h. bei der parthenogenetischen Entwicklung, in die Erscheinung treten, so sind, wie wir behaupten möchten, in diesen Momenten die Bedingungen gegeben, die für eine Beschleunigung der Oxydationsprozesse im Ei nötig sind.

IX. Die Ursache der Steigerung des osmotischen Druckes bei den Froschembryonen.

Im vorhergehenden haben wir unter anderen nach den Faktoren geforscht, die die Reduktion des osmotischen Druckes bei der Befruchtung bedingen. Es fragt sich nun, in welcher Weise die im Verlauf der Embryonalentwicklung allmählich vor sich gehende Steigerung des osmotischen Druckes bewirkt wird.

Während der Ausbildung der Blastulahöhle sowie während der ersten Gastrulationsperiode behält — wie wir oben gezeigt haben — der osmotische Druck seinen ursprünglichen, für die ungeteilte befruchtete Eizelle charakteristischen niedrigen Wert bei. Während der weiteren Gastrulation aber, wenn die Längsstreckung und die Differenzierung der Zellen zu den Fruchtblättern beginnen, tritt eine plötzliche Steigerung des osmotischen Druckes ein. Worauf beruht nun diese Steigerung des Druckes?

Wir haben früher einen Versuch besprochen, der uns zeigte, dass die Steigerung des osmotischen Druckes unter gewissen experimentellen Bedingungen in einem früheren Entwicklungsstadium der Embryonen zustande kommen kann. Wir meinen den Versuch, Blastulae in einer Sauerstoffatmosphäre von 760 mm zu zuchten. Nach 12 Stunden hatten die Eier einen Gefrierpunkt von $\Delta = 0,225$.

Dieser Versuch deutet an, dass die oxydative Zersetzung eine Vergrößerung des osmotischen Druckes hervorruft. Bemerkenswert ist, dass wir bei diesem Versuche beinahe denselben Wert erhielten, den man sonst während der ersten Streckungsphase bekommt. Vielleicht darf man daraus schliessen, dass bei der osmotischen Drucksteigerung ein anderer, mehr konstanter Faktor mitwirkt, der vielleicht in der Entbindung der adsorbierten Salze gegeben ist. Wie diese Entbindung in ihren Einzelheiten vor sich geht, lässt sich natürlich nicht sagen. Wenn die Adsorption durch eine Veränderung im Lösungszustand der Zellkolloide verursacht wird, so muss angenommen werden, dass dieser Prozess — wie schon hervorgehoben — reversibel ist.

Die Aufrechterhaltung des osmotischen Druckes auf einer konstanten Höhe während der fortschreitenden Entwicklung innerhalb der Gallerthüllen wird mit grosser Wahrscheinlichkeit zum Teil durch die allmählich eintretende immer zunehmende Veränderung der äussersten Zellschicht, zum Teil durch die fortschreitende, oxydative Zersetzung des Dottermaterials bedingt. Mit dem Ausschlüpfen der Embryonen aus den Gallerthüllen beginnt eine schnellere Erhöhung des osmotischen Druckes, die in der Hauptsache wohl auf eine regere Zersetzung des Dottermaterials zurückzuführen ist. Das Dottermaterial ist aber, wie schon bemerkt, am 14. Tage der Embryonalentwicklung ganz verbraucht. Es beginnt die Nahrungsaufnahme von aussen, und damit ist eine neue Quelle für die Steigerung und Aufrechterhaltung des osmotischen Innendruckes gegeben.

Schapers Kurve über den prozentigen Aschengehalt der Froschembryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien zeigt einen Anstieg am 20.—25. Tage, der eine geringe Verminderung folgt. Nach dem 32. Tage beginnt wieder ein langsamer Anstieg. Der Gehalt an Aschenbestandteilen weist dagegen eine ständig fortschreitende Verminderung¹⁾ vom 8. bis zum 20. Tage auf. Daraus

1) Wahrscheinlich findet auch in den ersten 8 Tagen der Entwicklung eine Verminderung des Aschengehaltes statt. Schapers Bestimmungen beginnen aber erst mit dem achten Tage.

lässt es sich schliessen, dass die Erhöhung des osmotischen Druckes in dieser Zeit wenigstens zum Teil durch eine Zersetzung organischer Komplexe bedingt ist. Da das Dottermaterial schon am 14. Tage aufgebraucht ist, so darf man annehmen, dass zu dieser Zeit eine kurzdauernde Steigerung des osmotischen Druckes, von einer bald einsetzenden Reduktion desselben gefolgt, zustandekommt. Wie es sich damit tatsächlich verhält, wird nur durch fortgesetzte eingehende Untersuchungen festgestellt werden können.

X. Zusammenfassung,

1. *Durch die Befruchtung wird in der Eizelle von Rana temporaria eine erhebliche Reduktion des osmotischen Druckes des Eihaltendes hervorgerufen. Der osmotische Druck wird etwa bis zu einem Zehntel des osmotischen Druckes beim erwachsenen Frosch reduziert. Es herrscht Isotonie zwischen dem eben befruchteten Froschei und dem umgebenden Wasser.*

2. *In der Zeit der frühesten Embryonalentwicklung, im Blastulastadium und in der ersten Periode der Gastrulation, so lange die ursprüngliche kugelige Form des Eies beibehalten wird, besitzt der Embryo einen konstanten, mit dem der Umgebung isotonischen, osmotischen Druck.*

3. *In den späteren Perioden der Gastrulation, wenn die Keimblattendifferenzierung schon fortgeschritten ist und die Längsstreckung begonnen hat, findet eine plötzlich einsetzende Steigerung des osmotischen Druckes des Embryos bis hinauf zur Hälfte des endgültigen osmotischen Druckes statt; während der ganzen weiteren Entwicklung innerhalb der Gallerthüllen bleibt der osmotische Druck auf dieser Höhe.*

4. *Mit der Längsstreckung und der osmotischen Drucksteigerung beginnt eine Ausscheidung von Stoffen in die Chorionhöhle, die osmotisch wirksam sind und durch Wasseraufnahme von aussen eine Erweiterung der Chorionhöhle bedingen. Dadurch erhält der Embryo die Möglichkeit, frei in die Länge zu wachsen.*

5. *Wenn die Embryonen aus den Gallerthüllen ausgeschlüpft sind, beginnt eine neue Steigerung des osmotischen Druckes. Am 20.—25. Tage hat der Embryo den für das erwachsene Tier charakteristischen osmotischen Druck beinahe erreicht.*

6. *Die parthenogenetische Entwicklung des Froscheies, die durch Behandlung im hypertonen Medium hervorgerufen wird, ist mit*

grösster Wahrscheinlichkeit von einer Druckreduktion begleitet, die der unter 1 beschriebenen vollständig gleich ist.

7. *Die Reduktion des osmotischen Innendruckes des Froscheies beruht wahrscheinlich auf einer die Befruchtung sowie die hypertoniische Behandlung begleitenden und durch sie bedingten Gelumwandlung von Eikolloiden und auf einer damit zusammenhängenden Adsorption von Kristalloiden.*

8. *Die osmotische Drucksteigerung während der fortschreitenden Embryonalentwicklung ist wahrscheinlich durch einen Übergang von Gelen in Sole, eine Entbindung von Kristalloiden, eine Zersetzung von Dottermaterial und — vom 14. Tage an — durch eine Nahrungsaufnahme von aussen bedingt.*

9. *Die von uns festgestellte Variabilität des osmotischen Druckes von Rana temporaria während der Embryonalentwicklung ist vielleicht bloss als eine Anpassungserscheinung an die äusseren Verhältnisse, unter denen der Frosch seine Ontogenie durchmacht, zu betrachten.*

10. *Mit grosser Wahrscheinlichkeit ist das Vorhandensein von den oben geschilderten ähnlichen Verhältnissen bei allen oder bei einem grossen Teil der Tiere vorauszusetzen, die im Süsswasser laichen und im Süsswasser ihre Embryonalentwicklung durchmachen.*