Aus dem anatomisch-biologischen Institut zu Berlin.

Zentrifugerversuche an unbefruchteten Eiern von *Rana fusca*.

Von
G. Wetzel.

Hierzu 6 Textfiguren.

Im Wintersemester 1903 teilte mir Herr Professor O. Hertwig mit, dass er die Absicht habe, eine Reihe von Versuchen über die Wirkung der Zentrifugalkraft auf die ersten Entwicklungsstadien von Eiern verschiedener Tiere auszuführen und forderte mich auf, von diesen Versuchen diejenigen an *Rana fusca* mit ihm gemeinsam anzustellen. Herr Professor O. Hertwig, welcher bekanntlich schon 1897 derartige Experimente am Froschei vorgenommen hatte, hegte diesmal die Absicht, den Einfluss der Zentrifugalkraft auf unbefruchtete Froscheier zu studieren, da sich 1897 die Versuche nur auf die Zeit nach der Befruchtung erstreckt hatten.

Zur Ausführung derartiger Arbeiten hatte Herr Professor Hertwig von der Firma Leppin und Masche (Berlin) einen Zentrifugierapparat mit elektrischem Betrieb konstruieren lassen, dessen Beschreibung an anderer Stelle erfolgen wird. Da Herr Professor Hertwig gleichzeitig noch eine andere Art von Experimentaluntersuchung, deren Veröffentlichung demnächst bevorsteht, an den Froscheiern begonnen hatte und sich durch dieselben mehr als er erwartet hatte, in Anspruch genommen sah, gestattete er mir, die Zentrifugerversuche, bald nachdem sie begonnen worden waren, einstweilen ohne seine Mitwirkung fortzuführen und die hierbei gewonnenen Ergebnisse zum Gegenstand einer selbständigen Mitteilung zu machen.

Zu Beginn der Untersuchungen wurden neben den unbefruchteten Eiern auch befruchtete zentrifugiert. Über diese sei nur kurz bemerkt, dass sie überwiegend zu Missbildungen führten, welche man unter die Klasse der von O. Hertwig als *Spina bifida* (*Asyntaxia medullaris* Roux) bezeichneten Abnormitäten zu rechnen hat.

Bei den Versuchen an unbefruchteten Eiern habe ich anfangs mit beliebig orientiertem Eimaterial gearbeitet. Sodann

versuchte ich, um genauer kontrollierbare Bedingungen zu haben, wie die Objekte sich verhalten würden, wenn man sie einmal in normaler Richtung (weisses Feld zentrifugal), ein andermal in umgekehrter (weisses Feld zentripetal) zentrifugieren würde. Späterhin ist nur noch mit solchen, genau orientierten Eiern gearbeitet worden.

Für den Zweck einer genauen Orientierung erwies sich mir nach einigem Ausprobieren die nebenstehende Vorrichtung (Figur 1—3) als sehr geeignet.

Fig. 1.

Fig. 2.

Fig. 3.

Die Grundlage dieser Vorrichtung ist der von O. Hertwig zu den Versuchen an befruchteten Eiern benutzte mit einem Kork verschlossene Glaszylinder, welcher mit seiner Achse tangential an den Radien des Zentrifugiergerüsts angebracht wird. Für den besonderen Zweck der vorliegenden Arbeit traf ich innerhalb dieses Zylinders folgende Anordnung:

Die Eier werden auf einen Objektträger (englisches Format) aufgesetzt. Der Glaszylinder erhält unten eine Korkeinlage. Diese sowohl wie der Stopfen werden in der Mitte mit einer Rinne

versehen, welche so breit ist, dass der Objektträger dadurch an seinen beiden Enden unter einer geringen Reibung festgehalten wird. Auf diese Weise ist eine unveränderliche Stellung des Objektträgers und damit der Eier erreicht.

Diejenige Seite des Objektträgers, auf welcher die Eier aufgesetzt sind, ist der Achse des Rotationsapparates zugekehrt und der Objektträger wird (durch Drehen des Glaszylinders in seinem Lager) genau senkrecht gestellt. Der Pfeil in Figur 3 deutet die Richtung an, in welcher die Zentrifugalkraft wirkt. Die Innenseite des Zylinders ist mit feuchtem Fliesspapier belegt, um dem Eintrocknen der Eier vorzubeugen.

Auf der Versuchsanordnung beruhen noch folgende Besonderheiten:

1. Da die Eier gegen die Glasplatten gepresst werden, so nehmen sie eine, bei grosser Umdrehungszahl sehr beträchtliche Abplattung an und werden linsenförmig. Fig. 4 zeigt einen Schnitt durch ein solches Ei, welches nach ca. $3\frac{1}{2}$ stündigem Zentrifugieren bei 300 Umdrehungen (40 cm Radius) konserviert wurde. — Die Einziehung zu beiden Seiten des animalen Poles ist vielleicht auf die Wirkung der Konservierung zurückzuführen. Ich muss dies noch dahingestellt sein lassen. — Nach Aufhören der Rotationen muss sich natürlich ein Bestreben geltend machen, das Ei wieder mehr der Kugelform zu nähern. Welche neuen Komplikationen hierdurch entstehen, lässt sich noch nicht sagen. Ein gewisser Grad der Abplattung bleibt aber dauernd bestehen.

Fig. 4.

2. Ausser der Zentrifugalkraft wirkt natürlich immer noch die Schwerkraft auf die Objekte ein. Sie wirkt senkrecht auf die Zentrifugalkraft. Es kommt also eine schräge Resultante zustande, welche von zentral oben nach peripher unten gerichtet

ist. Eigentlich müssten die Eier inbezug auf diese Resultante orientiert werden. Dieselbe wechselt mit der Zahl der Umdrehungen. Man müsste der Platte eine schräge Stellung geben. Dieser Umstand wirkt sowohl auf die gegenseitige Lagerung der verschieden schweren Substanzen innerhalb des Eies ein, wie auch, besonders bei umgekehrter Anordnung auf die Lage des ganzen Eies. Hier liegt der Schwerpunkt weit von der Unterlage, bzw. Anheftungsstelle entfernt. Ich habe das hier gesagte bisher praktisch nicht berücksichtigt, sondern bei senkrecht stehender Platte gearbeitet.

3. Die bisher schon bekannten Veränderungen, welche die zentrifugierten Eier in ihrer Entwicklung zeigen, beruhen zum grossen Teil auf einem veränderten Lageverhältnis der verschieden schweren Substanzen. Neben diesem Endresultat müssen aber noch die Schädigungen bedacht werden, welche das Ei-plasma durch den Vorgang der Umlagerung erleidet. Alle diese Umstände zeigen die ungemein grosse Kompliziertheit der Erscheinungen, welche durch das Zentrifugieren hervorgerufen werden.

Ich gebe nun in kurzer Darstellung eine Übersicht über die hauptsächlichsten bisher erhaltenen Resultate:

Es ergab sich zunächst, dass die Eier auch nach achtstündigem Zentrifugieren (Länge des Radius bis zu 40 cm, Umdrehungszahl 300 in der Minute) sich noch mit Erfolg befruchten liessen und sich entwickelten.

Bei normaler Anordnung lieferten die Objekte bisher in einer einzigen Versuchsreihe Embryonen mit *Spina bifida*, in allen andern normale Embryonen. Jedoch sind immer nur wenige Eier in normaler Richtung zentrifugiert worden, die meisten in umgekehrter. Möglicherweise werden wir, um bei normaler Orientierung *Spina bifida* sicher zu erhalten, eine höhere Umdrehungsgeschwindigkeit anwenden müssen. Einen gewissen Ersatz für das hier fehlende Material liefern die Beobachtungen an befruchteten, aber noch ungefurcht zentrifugierten Eiern, welche sich ja dann stets in normaler Lagerung befinden. Diese haben, wie schon oben bemerkt, in Übereinstimmung mit den früheren Versuchen von O. Hertwig stets *Spina-bifida*-Bildung gezeitigt.

Für die in umgekehrter Lage zentrifugierten Eier ist hervorzuheben, dass auch sie, auf der Glasplatte nach der Be-

fruchtung in Wasser übertragen, ihre Lage, mit nach oben gerichtetem weissen Felde, ausser geringen Verschiebungen, unverändert beibehalten. Äusserlich findet sich sehr oft eine graue Sichel, welche von dem etwas schattiger gewordenen weissen Felde durch einen dunklen Streif getrennt ist; zuweilen sind andere Figuren, zuweilen wenig charakteristische Veränderungen vorhanden. Auf den Schnitten zeigen sich interessante Verlagerungen des schwarzen und weissen Dotters, wie sie ähnlich früher Born unter anderen Bedingungen gesehen hat, deren Einzelheiten aber erst später mitgeteilt werden sollen.

Fig. 5 A.

Ein unbefruchtetes zentrifugiertes Ei von der Seite des weissen Feldes gesehen.

I—I = erste Furche,

II—II = zweite Furche.

Die gestrichelte Linie gibt die Lage des weissen Feldes an.

Fig. 5 B.

Dasselbe Ei wie A, die gleichzeitige Beschaffenheit der schwarzen Seite zeigend.

I—I = erste Furche.

Die erste Furche beginnt auf dem weissen Pol, ebenso die zweite. Wenn diese schon vorhanden ist, hat die erste auf der schwarzen Seite noch nicht völlig durchgeschnitten. Dieselbe Tatsache zeigt sich später darin, dass bei weiterem Verlauf der Furchung, die weisse Hälfte fein gefurcht, die schwarze grob gefurcht ist. Hier kommen je nach der Zahl der Umdrehungen usw. alle möglichen Abstufungen vor. Zu Beginn der Furchung zeigt sich der Faltenkranz besonders gut ausgeprägt.

Dem Furchungsverlauf, also einem organbildenden Mittel gerade entgegengesetzt, verhält sich nun die Organbildung selbst. Die Gastrulation findet unverändert auf der weissen Eiseite statt. Da die Eier in vielen Fällen ihre Lage mit dem weissen Pol nach oben ganz unverändert beibehalten, so lässt sich die

Gastrulation sehr bequem von Anfang bis zu Ende verfolgen. Der vom normalen bedeutend abweichende Verlauf soll erst später eingehend geschildert werden. Nur sei noch bemerkt, dass sich gleichzeitig eine breite, seichte Rinne ausbildet, welche in ihrer Länge wechselt, aber allmählich zunimmt und in den meisten Fällen am Ende der Gastrulation mindestens das halbe Ei umgreift. Diese Rinne scheidet später den Embryo, d. h. die weisse Eihälfte von der schwarzen, welche in den bisher beobachteten Fällen nicht einen Teil der eigentlichen Embryonalanlage bildete. Der Schluss der Medullarwülste scheint im allgemeinen die Grenze zu sein, bis zu welcher die Entwicklung vor sich geht. Eine mässige Längsstreckung der Neurula wurde stets, in einem Falle sogar eine sehr bedeutende beobachtet. Hier überragte das hintere Ende des Embryo den Rand der schwarzen, nicht in den Embryo aufgenommenen Masse um ein beträchtliches Stück. Dieser Umstand weist erstens darauf hin, dass unter günstigen Bedingungen vielleicht eine noch weiter gehende Entwicklung möglich ist. Zweitens zeigt er ein Verhalten des Embryo zum nicht in den Embryo aufgenommenen Teil des Eies, wie es sich bei den meroblastischen Eiern mit Keimscheibe findet. Dies bestätigt für ein späteres Stadium die von O. Hertwig gemachte Bemerkung, wonach die zentrifugierten Eier von *Rana* auf dem Furchungsstadium das Bild eines meroblastischen Eies mit Keimscheibe aufweisen.

Figur 6 gibt eine Vorstellung von dem Aussehen unserer Objekte auf dem Stadium der Medullarwülste. Die Embryonen

Fig. 6.

sind naturgemäss bedeutend kleiner als normale. Auf Schnittserien konnte ich bisher noch nicht untersuchen, so dass ich

insbesondere das Verhalten des Darmes noch offen lassen muss. Die zahlreichen Schlüsse, welche aus den Beobachtungen auf die Organbildung und die Lokalisation der Anlagen im Einzelnen sich ziehen lassen, müssen später folgen, da sie nur bei gleichzeitiger ausführlicher Berücksichtigung der Literatur darstellbar sind. Jedoch lautet das allgemeine Resultat der Versuche, dass durch das Zentrifugieren die Lokalisation der spezifischen gestaltbildenden Herde keine Verschiebung oder gar Umkehrung erleidet. Wo die Grenzen zwischen dem, was durch Zentrifugieren abänderlich ist, und dem unabänderlichen liegen, kann erst durch eingehende Untersuchung der Schnittserien und durch weitere Experimente entschieden werden.