(Aus dem anatomischen Institut in Heidelberg.)

Versuche über den Einfluß endokriner Drüsensubstanzen auf die Morphogenie.

Kaulquappenfütterungsversuche mit Epithelkörpern.

Von

Dr. Werner Schulze.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 16. Dezember 1920.)

Seit Gudernatsch die interessanten Beobachtungen über Wirkungen von Schilddrüse und Thymus auf heranwachsende Froschlarven machte, haben eine ganze Reihe von Autoren auf diesem neu erschlossenen experimentellen Gebiet gearbeitet. Die auffälligsten Veränderungen erhielt schon Gudernatsch bei der Fütterung mit Schilddrüsen-substanz und diese Resultate bestätigten seine Nachfolger. So ist es erklärlich, daß sie sich sämtlich zunächst den zahlreichen Fragen zuwandten, die bei den Schilddrüsenversuchen auftraten, und sich erst in zweiter Linie mit Fütterungsversuchen von Substanzen anderer endokriner Drüsen abgaben. Die bei letzteren erhaltenen Versuchsergebnisse sind bisher keineswegs befriedigend. Es erscheint lohnend, an demselben Testobjekt, der heranwachsenden Froschlarve, auf einer enger begrenzten Entwicklungsstufe systematisch die Wirksamkeit endokriner Drüsen im Fütterungsversuche durchzuprobieren.

Auf Anregung von Herrn Prof. Braus habe ich im Frühjahr und Sommer 1920 eine größere Anzahl von Versuchen angestellt, von denen sich 8 mit der Frage beschäftigten, ob Epithelkörperchenfütterung heranwachsender Froschlarven nach Verlassen der Gallerthülle und vor Beginn der Metamorphose diese letztere und das Wachstum der Tiere zu beeinflussen imstande ist.

Wenn man in der älteren Literatur nachschaut, so sieht man, daß die Epithelkörper lange Zeit für sekundär abgetrennte oder anderwärts entstandene Schilddrüsentile gehalten wurden, wozu außer ihrer Lage auch noch ihre histologische Beschaffenheit verführte. Erst nachdem man festgestellt hatte, von wo aus sich die Epithelkörperchen entwickeln, wie sehr sie sich ihrem histologischen Bau nach von der Schilddrüse unterscheiden, und was für wichtige, nicht von der Schilddrüse leistbare, Funktion ihnen im Leben des erwachsenen Organismus zukommt, hat man Schilddrüse und Epithelkörper als etwas mor-

phologisch und physiologisch gänzlich voneinander Verschiedenes anerkannt. Aus zahlreichen Beobachtungen und experimentellen Arbeiten geht hervor, daß bei vollständigem Ausfall der Schilddrüse die Epithelkörperchen nicht in der Lage sind, die ausfallende Drüse funktionell zu ersetzen; nur umgekehrt gibt es Beobachtungen, daß bei ausbrechender Tetanie nach Epithelkörperchenverlust Einpflanzung oder Fütterung von Schilddrüsensubstanz diese wenigstens zeitweise zu beheben imstande ist, so daß also doch eine Korrelation dieser beiden Drüsen angenommen werden muß. (Vgl. Biedl 1913, Guleke 1913.)

Deshalb erschien es lohnend, zu prüfen, welche Wirkung Epithelkörperchenfütterung im Froschlarvenversuch zeitigt. Die Störung der Körper- und auch speziell der Knochenentwicklung nach Thyreoid-ektomie im Tierversuch und bei angeborener Aplasie beim Menschen ist bekannt. Exstirpationsversuche von Iselin und anderen Autoren an jungen Ratten haben gezeigt, daß wahrscheinlich auch den Epithelkörperchen bei der normalen Entwicklung des Skelettes und der Zähne (Schmelz) auf den untersuchten Entwicklungsstadien der Versuchstiere eine Rolle zukommt. Italienische Autoren (Jovane und Vaglio nach Biedl) konnten die Ergebnisse von Iselin allerdings nicht bestätigen.

Schilddrüsenfütterung hat bei den verschiedensten Arten von Froschlarven (zwischen Reduktion der äußeren Kiemen und Beginn der Metamorphose) in mehr oder minder ausgeprägtem Maße überstürzte Metamorphose bei gleichzeitiger Wachstumshemmung zur Folge; bei Epithelkörperfütterung waren die bisherigen Ergebnisse der einzelnen Autoren ganz verschieden. Der Italiener Cotronei (Première Contribution...) erhält bei kombinierter Epithelkörper- und Bindegewebsfütterung gegenüber den Kontrolltieren beschleunigte Entwicklung großer wohldifferenzierter hinterer Extremitäten bei Hemmung des Größenwachstums. Doch läßt er offen, ob sein Versuchserfolg nicht vielleicht durch zufällige Beimischung geringer Schilddrüsenmengen zu erklären ist. Romeis (4. Veröffentl.) stellte Versuche an mit Epithelkörper-Trockensubstanz und mit Freund-Redlichschen Nebenschilddrüsentabletten. *Rana temporaria*-Larven zeigten intensives beschleunigtes Wachstum und vollendeten eher ihre Metamorphose als die Kontrolltiere bei guter Ausbildung der Extremitäten. Romeis führt in seiner 4. Arbeit die von ihm beobachtete Metamorphosenbeschleunigung auf stärkeres Wachstum der Tiere bei Epithelkörperfütterung, nicht auf eine spezifische innersekretorische Drüsensubstanzwirkung zurück, eine Begründung, die mir nicht beweisend erscheint, denn bei guter Pflanzenkost schnell wachsende Froschlarven zeigen deshalb noch keine Beschleunigung der Metamorphose und Romeis selbst bringt in seinen Arbeiten Beweise dafür, daß die beiden Faktoren Wachstum und Entwicklung nicht untrennbar miteinander verbunden sind. In

einer kürzlich erschienenen 7. Arbeit in den Naturwissenschaften konstatiert er nur stark beschleunigtes Wachstum und erwähnt keine Beeinflussung der Metamorphose. Ein italienisches Präparat von Zanoni, das er nachprüfte, zeigte sich seiner Wirkung nach als reines Schilddrüsenpräparat. Ein Amerikaner (Prior) hat neuerdings bei Epithelkörperfütterung an Froschlarven »scheinbar« Hemmung von Wachstum und Metamorphose gefunden. So sind die bisherigen Versuchsergebnisse einerseits Förderung von Wachstum und Entwicklung (Cotronei und Romeis), andererseits Hemmung dieser beiden Vorgänge (Prior), einander widersprechend.

Durch eigene Experimente suchte ich den Widerspruch zu lösen. Es wurden acht Versuchsreihen angesetzt; verwendet wurden *Rana fusca*- und *Bombinator pachypus*-Larven, nachgeprüft wurden getrocknete und frische Epithelkörperchen vom Rind, sowie Freund-Redlich'scher Epithelkörperextrakt und Nebenschilddrüsentabletten derselben Firma. Schließlich wurde auch ein Gemisch von Merckschen Optonen und pulverisierten Redlich'schen Tabletten auf seine Wirksamkeit geprüft.

Versuchsbeschreibung.

Es bot zunächst eine gewisse Schwierigkeit, das Nebenschilddrüsenfutter in genügender Menge zu beschaffen (Fleischbewirtschaftung)¹⁾. Auch mußte man jedesmal absolut sicher sein, es auch wirklich mit Epithelkörperchen zu tun zu haben, die kleinen Lymphdrüsen — makroskopisch — recht ähnlich sehen. Bei näherer Betrachtung zeigen sich Unterschiede. Die Epithelkörper sind auf dem Durchschnitt bei älteren Tieren dunkelbraun, bei jüngeren hellbraun, stark mit Fett durchwachsen und merkwürdig trocken; wohingegen sich die Lymphdrüsen auf dem Durchschnitt durch homogenes graubraunes glasiges Aussehen auszeichnen und stark über den Schnittflächenrand überquellen. Da die inneren Epithelkörperchen beim Rind so eng mit der Schilddrüse verbunden sind oder auch in ihr liegen, daß man sie oft nicht von dem umgebenden Gewebe sicher unterscheiden kann, wurden nur stets die äußeren Epithelkörper zu den Versuchen verwandt. Sie liegen in der Halsgefäßscheide lateral-dorsal von der Vena jugularis, ungefähr in der Höhe der Teilung der Art. carotis communis in externa und interna, doch ist die Lage bei jedem Tier verschieden hoch (Abb. 1). Um sicher zu gehen, habe ich mich bei dem ersten Versuch bei jeder einzelnen Drüse durch Gefrierschnitte davon über-

¹⁾ Herrn Schlachthausdirektor Zahn, sowie Herrn Dr. Sachs bin ich für ihr freundliches Entgegenkommen bei Beschaffung des Futtermaterials zu großem Danke verpflichtet.

Abb. 1. Lageskizze des äußeren Epithelkörperchens beim Rinde. Rechte Halsorgane eines älteren Kalbsfötus. Etwa $\frac{1}{2}$ natürlicher Größe. Das Epithelkörperchen liegt zwischen Vena jugularis und Art. carotis, cranial vom Abhang des N. laryngeus superior. Das Tier ist am Nasenring aufgehängt. Kopf stark gestreckt.

zeugt, daß es sich wirklich um Epithelkörper handelte. Später habe ich nur solches Material verwendet, das schon makroskopisch die oben angegebenen Kennzeichen aufwies und habe mich noch durch Stichproben von der histologischen Beschaffenheit der betreffenden Drüsen überzeugt. Die sofort nach der Tötung der Tiere entnommenen Epithelkörperchen wurden entweder noch an demselben Tage verfüttert oder bis zum Gebrauch (höchstens 2 Tage lang) auf Eis aufbewahrt. Bei dem ersten Versuch wurde getrocknete Substanz verwendet. Dazu waren die Epithelkörperchen nach sorgfältiger Entfernung von Fett und Bindegewebe in dünne Scheiben geschnitten und bei gelinder Wärme im Ofen getrocknet worden. Die *Fusca*-Larven der einzelnen Versuche stammten jedesmal aus demselben Laichballen; bei Versuchsbeginn wurden nur Tiere ganz gleicher Größe und Entwicklungsstufe in den Schalen zusammengestellt. Die *Fusca*-Laichballen wurden Anfang April aus einem Teich bei Dossenheim a. d. Bergstraße genommen, aus dem auch der *Bombinator*-Laich im Mai und Juni geholt wurde. Die Versuchstiere und Kontrollen wurden in flachen braunen Tonschalen von 750 ccm Rauminhalt gehalten. Die Schalen standen im Freien, gegen Regen geschützt, Versuchs- und Kontrollschale unter gleichen Licht- und Temperaturverhältnissen. Das Wasser wurde aus großen Holzbütten geschöpft, in die es mehrere Tage vor Gebrauch eingefüllt wurde. Diese Bütten zeigten eine reichliche Kleinfafauna. Wie die Versuchsschalen standen die Bütten auf einem flachen Dache im Freien. Zu einer bestimmten Zeit wurde jeden Morgen die Lufttemperatur gemessen und die erhaltenen Werte fortlaufend in ein Ordinatensystem eingetragen. Bei den drei ersten Versuchen erhielten die Versuchstiere Epithelkörper als Nahrung, die Kontrollen Rindermuskel; außerdem enthielt das Schalenwasser wenig Algen und Kleinfafauna (Bütte). Das Wasser wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Bei den 5 nächsten Versuchen wurde in jede Schale reichlich Hornkraut, Wasserlinsen und Algen gegeben, das Wasser wurde je nach Bedarf jeden dritten bis achten Tag erneuert. Bei Versuchsbeginn wurden jedesmal eine größere Anzahl von Tieren in leichter Narkose gemessen¹⁾, und ein Teil zur histologischen Untersuchung fixiert. Dasselbe geschah noch mehrmals während des Versuchsverlaufs. Bei dem ersten Versuch (Protokoll Nr. IV) wurden je 50 Stück *Fusca*-Larven auf sehr jugendlicher Entwicklungsstufe verwendet. Die Körperlänge betrug 4–5 mm; die Tiere waren vor 9 Tagen ausgeschlüpft. Es wurde elfmal in den Versuchsschalen getrocknete Rindernebenschilddrüse als Nahrung angeboten, die ich vorher einige Stunden hatte

¹⁾ Bestimmt wurden größte Körperbreite, Körperlänge, Schwanz- und Gesamtlänge.

quellen lassen, während die Kontrolltiere Rindermuskel bekamen. Die Versuchstiere fraßen sehr gierig von der dargebotenen Substanz und waren nach 14 Tagen durchschnittlich $1-1\frac{1}{2}$ mm (Körperlänge) größer als die Kontrollen; in der Gesamtlänge machte die Differenz bis zu 4 mm aus. Die Versuchstiere waren dunkler als die Kontrollen. Diese Differenzen glichen sich in den nächsten 4 Wochen vollständig aus; sowohl im Größenwachstum wie Metamorphosenverlauf und Färbung waren von da an bis zur Entwicklung der kleinen Frösche keine Unterschiede mehr wahrzunehmen. 5 Kontroll- und 4 Versuchstiere vollendeten bis zum Versuchsabbruch am 17. IX. die Metamorphose. Die übrigen Tiere waren größtenteils zu histologischen Zwecken konserviert worden. Einige Tiere waren gestorben (5 Kontrollen). Sobald es bemerkt wurde, wurden sie und die entsprechende Zahl von Versuchstieren entfernt und darauf sofort das Schalenwasser gewechselt.

Im zweiten Versuch (Protokoll Nr. VIII) wurden die Freund-Redlichschen Nebenschilddrüsentabletten auf ihre Wirkung geprüft. Die Tabletten wurden zerstoßen (2 Tabl. auf 700 ccm Schalenwasser), als Nahrung gegeben und von den Tieren gern genommen. Die Kontrollen erhielten Muskelfutter. Nach viermaliger Fütterung in viertägigem Abstand zeigten die Tiere die typischen Veränderungen schilddrüsengefütterter Froschlarven. Dasselbe Ergebnis wurde bei einer Nachprüfung in einem weiteren Versuch (Protokoll Nr. XVI) erhalten. Hier trat das Ergebnis nach fünfmaliger Tablettenfütterung 3 Wochen nach Versuchsbeginn ein. Der Verlauf war folgender: nachdem sie zunächst viel und gern gefressen hatten, wurden die Versuchstiere nach einiger Zeit appetitlos und träge, der Hinterleib verjüngte sich, die Gestalt wurde dadurch eigentümlich keilförmig, gleichzeitig wurde der Schwanzflossensaum schmal, Schwanz- und Körperlänge nahm sehr stark ab, der larvale Mundapparat (Haftzotten, Hornkiefer) wurde abgeworfen, der Unterkiefer stark v-förmig nach unten gebogen, so daß das Maul klaffte, der Kopf wurde breit, die Augen und Nasenlöcher rückten nach vorn, und gleichzeitig begannen die hinteren Extremitäten sehr stark zu wachsen und sich zu differenzieren, während die vorderen das Operkulum stark vorbuckelten. In diesem Stadium zeigten viele Tiere an der Ventralseite ein starkes Ödem und gingen zu grunde. Bei den übrigbleibenden entwickelte sich die bei der bleibenden Form übliche Pigmentierung des Rückens. Gleichzeitig kam es zu einem Durchbruch der vorderen Extremitäten und bei manchen Tieren zu einem Ödem in der Kiemengegend. Die Extremitäten waren ausdifferenziert, sahen aber weißlich aus und waren zu schwach, um gebraucht werden zu können. Die so weit wie möglich aufgezogenen Exemplare konnten nicht dazu gebracht werden ans Land zu gehen

und gingen vor der völligen Resorption des Schwanzes und Vollendung der Metamorphose zugrunde¹⁾.

Die Vorgänge glichen also bei dieser Tablettenfütterung den von Gudernatsch, Romeis, Abderhalden und den anderen Autoren bei ihren Schilddrüsenversuchen beschriebenen (siehe Abb. 2). Ich hatte auch selbst Gelegenheit, bei einer größeren Zahl von Fütterungsversuchen mit Schilddrüse analoge Wirkungen zu sehen. Es wurde auch noch ein Versuch angestellt (Protokoll Nr. II), bei dem der Versuchs-

Abb. 2. Versuch XVI. Parathyreoideatabletten-Fütterung an *Rana fusca*-Larven. Links zwei Kontroll-, rechts zwei Versuchstiere. Bei einem der letzteren ist die rechte vordere Extremität vollständig frei, von der linken ist der Ellenbogen gerade im Perforationsloch im Operculum sichtbar. Beim zweiten Versuchstier ist die v-förmige Ausbiegung des Untersiefers sichtbar. Beide Tiere zeigen mäßig starkes Ödem über der Kiemenregion. Man beachte den im Gegensatz zu den gleichaltrigen Versuchstieren noch völlig larvalen Typ der Kontrollen (Körper-, Kopf-, Form, Farbe, Extremitätenknospen, larvaler Mundapparat, breitere Schwanzflossen).

Etwa 6fache Vergrößerung.

schale sechsmal in viertägigem Intervall je 1 ccm Parathyreoidea-Extrakt von Freund und Redlich zugesetzt wurde bei gleichzeitiger Muskelfütterung der Versuchs- und Kontrolltiere. Es handelte sich dabei um

¹⁾ Unter Vollendung der Metamorphose verstehe ich dabei Ausbildung des fertigen kleinen Frosches mit allen seinen Merkmalen (Form, Pigmentierung, Hautentwicklung, Augenstellung, Ausbildung der endgültigen Form des Kieferapparates und Darmkanals sowie Atmungsapparates, weitgehende Reduktion der Vorniere, Entwicklung der Keimzellenstränge, Fettkörper, Durchbruch und Ausdifferenzierung der Extremitäten und völlige Resorption des Schwanzes, sowie Entwicklung der innersekretorischen Drüsen).

je 50 Stück *Rana fusca*-Larven einer sehr jugendlichen Entwicklungsstufe. (Rumpflänge 4—4,5 mm; Gesamtlänge 11—12 mm; Rumpfbreite 2,3—2,6 mm; Schwanzlänge 7—8 mm). Bei diesem geringen Zusatz von Nebenschilddrüsen-Extrakt (1 : 700) war keinerlei Wirkung zu erreichen; da aus unbekannter Ursache trotz sorgfältiger Pflege nach 3 Wochen ein großer Teil der Kontrolltiere zugrunde ging, wurde der Versuch abgebrochen. Er wird nur der Vollständigkeit halber erwähnt.

Ein weiterer Versuch (Protokoll Nr. XVIII) muß hier noch besprochen werden. Es wurden hierbei je 15 Larven von *Rana fusca* einerseits mit Rindermuskel (Kontrolle), andererseits mit Nebenschilddrüsen-tabletten gefüttert, wobei dem Zuchtschalenwasser dieser letzteren Versuchstiere noch je 2 ccm Thyreoidea-, Testis- und Ovarial-Opton zugefügt wurde. Es war dieser Versuch als Kombinationsfütterung gedacht; er wurde angesetzt, bevor gleichzeitig laufende Versuche ergaben, daß Optonzusatz zum Schalenwasser in der oben angegebenen Konzentration völlig unwirksam ist¹⁾. Die Tablettenfütterung wirkte gleich den Ergebnissen in den beiden anderen Versuchen wie intensiver Schilddrüsenzusatz. Nach viermaligem Zusatz von zerstoßenen Tabletten zum Zuchtwasser in fünftägigem Intervall entwickelten sich die Tiere bei ziemlich kühler Witterung (zwischen 10 und 18° C Temp. morgens 9 Uhr) in 4 Wochen bis zum Durchbruch der beiden vorderen Extremitäten, während sie gleichzeitig sehr klein blieben; sie erwiesen sich jetzt als nicht mehr lebensfähig und mußten fixiert werden. Die Kontrollen waren in dieser Zeit nur etwas gewachsen und hatten vollkommen larvalen Charakter behalten, die hinteren Extremitäten waren als noch undifferenzierte Knöpfe zu sehen. So bestätigt auch dieser Versuch die Ergebnisse der beiden anderen Tablettenversuche: Fütterung von Freund-Redlichschen Parathyreoidea-Tabletten bewirkt Beschleunigung der Metamorphose bei gleichzeitiger Wachstumshemmung.

Die letzten 3 Versuche (XII, XXV, XXVII) wurden angestellt, um nachzuprüfen, ob die Wirkungslosigkeit der Fütterung von frischen Epithelkörpern (Versuch IV) auch bei etwas älteren Larvenstadien zutrifft. Im Versuch XII wurden je 25 *Fusca*-Larven sechsmal in viertägigen Intervallen mit frischer Rindernebenschilddrüse, bzw. Rindermuskel

¹⁾ Die Unwirksamkeit der gebrauchten Merkschen Optone kann entweder an dem Alter der Präparate liegen (sie stammten nach den Angaben der Fabrik aus dem Jahre 1914) oder an den zu geringen Konzentrationsgraden. Ersteres ist wahrscheinlicher. Gley (Die Lehre von der inneren Sekretion) gibt an, daß auch Organextrakte, die er in Form aseptisch hergestellter und sorgfältig getrockneter und pulverisierter Substanz aufbewahrte, schnell ihre Giftigkeit einbüßen (S. 36 Fußnote). Da scheint es mir durchaus möglich, daß bei so langjähriger Aufbewahrung die spezifische Wirkung dieser Organextrakte verschwindet.

und reichlicher Pflanzenkost gefüttert. Die Larven waren größer als bei dem ersten Versuche, auch weiter entwickelt, die Körperlänge schwankte zwischen 7 und 8,2, die Gesamtlänge zwischen 18 und 20,2 mm. Die hinteren Extremitätenanlagen waren als kleine, undifferenzierte Knöpfe eben sichtbar. Bei sechsmaliger Fütterung in den nächsten 4 Wochen nach Versuchsbeginn zeigte sich keinerlei Größen- oder Entwicklungsverschiedenheit zwischen den Versuchstieren und den Kontrollen. 8 Wochen nach Versuchsbeginn vollendeten in beiden Schalen die ersten Frösche die Metamorphose. Bei Abbruch der Ver-

Abb. 3. *Rana fusca*-Larven mit frischer Parathyreoidea gefüttert: Versuch XXV. Links Kontroll-, rechts Versuchstier. Etwa 8fache Vergrößerung.

suche am 17. 9. war in der Kontrollschale bei 2 Tieren die Metamorphose noch nicht vollständig abgeschlossen, während bei dem letzten Versuchstier gerade die zweite vordere Extremität durchgebrochen war. Der einzig wahrnehmbare Unterschied während der ganzen Entwicklungszeit war eine Dunkelfärbung der Versuchstiere gegenüber den Kontrollen, die $3\frac{1}{2}$ Woche nach Versuchsbeginn in Erscheinung trat, sich später aber wieder ausglich, so daß an den metamorphosierten Fröschen keine Unterschiede nachweisbar waren. Diese vorübergehende Dunkelfärbung der mit Epithelkörpern gefütterten Tiere trat auch beim nächsten Versuch auf (Nr. XXV), der mit je 10 *Fusca*-Larven derselben Größe und Entwicklungsstufe wie beim vorigen Ver-

such angestellt wurde. $3\frac{1}{2}$ Wochen nach Versuchsbeginn wurde je ein Tier der Versuchs- und Kontrollschale photographiert, um zu zeigen, daß bei makroskopischer Beobachtung Versuchs- und Kontrolltiere gleich groß und gleich weit entwickelt sind (Abb. 3). 5 Wochen nach Versuchsbeginn waren bei dem ersten Tiere beider Versuchsreihen die beiden vorderen Extremitäten durchgebrochen. In ein Ausschlupf-aquarium gebracht, gingen die Tiere an Land.

Der letzte Versuch mit je 8 gleich großen Larven von *Bombinator* von 8 mm Rumpf- und 17 mm Gesamtlänge, bei sechsmaliger Fütterung von frischer Nebenschilddrüse, bzw. Muskelsubstanz erwies, daß das Ergebnis der *Fusca*-Larvenfütterungsversuche auch auf Unkenlarven zu übertragen ist. Fütterung von Rinderepithelkörpern an Frosch- und Unkenlarven verschiedener Entwicklungsstadien hat keinen Einfluß auf die Größenentwicklung und Metamorphose dieser Tiere.

Im folgenden bleibt noch nachzuprüfen, ob bei dieser makroskopischen Gleichheit der Versuchs- und Kontrolltiere bei Epithelkörperfütterung auch die mikroskopischen Schnittserien keine Differenzen aufweisen, insonderheit, ob die Anlagen der innersekretorischen Drüsen der Größe und Schnittfärbbarkeit nach gleich sind, ferner ob die mikroskopische Untersuchung der Freund-Redlichschen Tablettentiere Verhältnisse zeigt, die denen bei Schilddrüsenfütterung gleichen. Beides ist der Fall.

Zu den histologischen Untersuchungen wurden die Tiere in einem von Petersen angegebenen Fixiergemisch von Pikrinsäure, Sublimat, Formol- und Eisessig je nach Größe 8–24 Stunden fixiert. Nach Wässerung kamen sie in die aufsteigende Alkoholreihe und wurden nach Paraffineinbettung 7,5 bzw. 10 μ dick geschnitten. Die Schnitt-richtung der Serien war senkrecht zur Körperlängsachse. Gefärbt wurde mit Hämatoxylin-Eosin.

Zunächst der Vergleich der Serien eines Versuchstieres (*Fusca*-Larve) von Versuch XII (Parathyr.-Fütterung) mit einem Kontrolltiere des selben Versuches. Beide Tiere wurden am 25. V. 26 Tage nach Versuchsbeginn (30. IV.) fixiert. Haut beider Tiere sowie Nervensystem, Darmkanal mit großen Drüsenanlagen inkl. Kiemen, Lungensäckchen, Herzanlage, Vor- und Urnierenanlage sowie Extremitätenknospen zeigen gleiche und völlig larvale Verhältnisse. Bei Anwendung gleicher Methodik zeigen sich auch keine färberischen Differenzen der einzelnen Gewebe. Die Schilddrüsenanlage vom Auftreten der ersten typischen Zellen und Follikel in der Schnittserie bis zu den letzten hat eine Länge von rechts 0,34, links 0,37 mm beim Versuchs- und je 0,29 mm beim Kontrolltier. Die Zellen erscheinen gleich groß. Die Kolloidbläschen gleichmäßig mit hellroten Kolloidmassen erfüllt. Die Flächenausdehnung der Drüsenanlage auf den einzelnen Schnitten miteinander verglichen, zeigte keine

größeren Differenzen. Länge der Thymusanlage beim Versuchstier r. 0,47 mm, l. 0,48 mm. Bei der Kontrolle r. 0,36, l. 0,41 mm. Im übrigen gleichmäßiges Verhalten wie auch bei Epiphyse und Hypophyse, deren Länge 0,26 mm (Versuchstier) und 0,23 mm (Kontrolle) bzw. 0,26 mm und 0,24 mm beträgt. Die geringeren Unterschiede halte ich durch die Methodik für erklärt. Ebenso bestätigt die mikroskopische Untersuchung die makroskopisch gleiche Größe und Entwicklung bei einem Versuchstier und einer Kontrolle von Versuch XXVII, bei dem es sich um Parathyr. gefütterte *Bombinator*-Larven handelt, die am 10. VIII. 24 Tage nach Versuchsbeginn nach fünfmaliger Fütterung fixiert wurden. Die Länge der Anlage von Epiphyse und Hypophyse beim Versuchs- und Kontrolltier beträgt hier 0,20 und 0,26 mm bzw. 0,22 und 0,23 mm. Die Länge der Thyr. und linken Thymusanlagen zeigt größere Differenzen, die aber ausgeglichen werden durch eine entsprechend größere Flächenausdehnung der einzelnen Anlagen bei dem Versuchstier, bei dem die Drüsenanlagen kürzer sind. Die Maße betragen beim Versuchstier:

Schilddrüse: r.: 0,25, l.: 0,22 mm. Kontrolle 0,32 und 0,30 mm.

Thymus: r.: 0,23, l.: 0,18 mm. Kontrolle 0,24 und 0,23 mm.

Die mikroskopischen Befunde der Serienschnitte der mit Parathyr.-Tabletten (Freund-Redlich) gefütterten Tiere decken sich weitgehend mit denen, die man bei Schilddrüsen gefütterten Larven gefunden hat, und wie sie besonders ausführlich Romeis in seinen Arbeiten gegeben hat. Während die Kontrolltiere typische völlig larvale Verhältnisse zeigen, findet man bei den Tablettentieren hauptsächlich folgende Veränderungen: Die ganzen Gewebe der Versuchstiere erscheinen sehr viel dichter als die der Kontrollen sowie zellreicher (besonders Zentralnervensystem). Die Entwicklung der Haut und ihrer Drüsen ist weit vorgeschritten, große, zellreiche Zungenanlage. Ausdifferenzierung der Unterkiefer-Zungenbeinmuskulatur und der Muskeln am Anfangsteil von Pharynx und Larynx, pralle Füllung der großen Gefäße mit roten Blutkörperchen, dickere Herzschlauchwand, mit deutlicher Ausbildung der Muskelfasern im Kammerabschnitt. Die Querschnitte der vorderen Extremitätenknospen beim Versuchstier zeigen eine ringförmige größere Randschicht und eine zentrale Schicht, in letzterer Knorpelinseln des Oberarmknochens und der beiden Vorderarm- sowie Hand- und Fingerknochen. Gefäßbildung und Nervenanlagen. Entsprechende Befunde an den Anlagen der hinteren Extremitäten. Im Gegensatz dazu bilden die entsprechenden Anlagen der Kontrolltiere solide Mesenchymzellenknospen ohne Knorpel- oder größere Gefäßentwicklung. Die beiden Lungensäckchen der Versuchstiere haben eine Wandung, die aus 2 bis 3 zellreichen Zellagen besteht, während die Lungensäckchen der Kon-

trollen aus einer einfachen endothelartigen Zellschicht bestehen. Die inneren Kiemen zeigen keine weitergehenden Reduktionserscheinungen, nur stellenweise eine Schichtung des Epithels (nach Maurer typisch für beginnende Kiemenreduktion). Am Darmkanal ist im allgemeinen die Wandung beim Versuchstier sehr viel dicker als bei der Kontrolle. Die Drüsenmanschette ist am Magen-Duodenum weiter oral gerückt. Der mittlere Darmteil zeigt hohes Zylinderepithel und unter der Serosa zahlreiche Gefäßschlingen. In vielen Zellen ist das Protoplasma gekörnelt und findet sich Ablagerung von Pigmentkörnchen. Im Enddarm beim Versuchstier zahlreiche Becherzellen. Der Darm zeigt in seiner ganzen Länge einen Inhalt, den man wohl für Nahrungsreste, nicht etwa bloß für abgestoßene Epithelien halten muß. Dies läßt darauf schließen, daß trotz der beobachteten Freßunlust die Tiere nicht etwa unfähig zur Nahrungsaufnahme waren und hierin die Todesursache zu sehen ist. Analog habe ich auch bei »Schilddrüsentieren« Nahrungsreste im Darmkanal gefunden und selbst gesehen, wie ein solches Tier trotz starker Mißbildung des Unterkiefers (U-förmige Ausbiegung des Unterkiefers nach unten und dadurch bedingtes Klaffen des Maules) reichlich Algen im Maul hatte, als ich es aus der Versuchsschale nahm. Die Ursache des Todes der Tiere liegt in der Disharmonie der Entwicklung, wie sie sich besonders in dem Erhaltensein der inneren Kiemen und geringfügigen Ausbildung der Lungensäckchen bei gleichzeitig vorgeschrittener Umwandlung der Körperform, Hautentwicklung, Extremitätenentwicklung und vor allem dem Umbau des Verdauungsapparates äußert. Die Vornierenanlage der Parythyr-Tablettentiere ist in weitgehender Reduktion begriffen. Die Zellen sind z. T. sehr pigmentreich mit körnigem Protoplasma, die Gänge sind vollgestopft mit scholligen Massen, die sich intensiv mit Eosin färben. — Die Urnierenanlage ist sehr groß, die Keimstränge von unausdifferenzierten großen Zellen gebildet. Von einer Anlage der Fettkörper habe ich nichts gesehen. Die Zellen der Anlagen der innersekretaren Drüsen (Thyreoida, Thymus, Epiphyse und Hypophyse) erscheinen näher zusammengedrückt und dunkler gefärbt. Diese stärkere Färbung zeigt auch das die Schilddrüsenfollikel ausfüllende Kolloid. Vergleicht man die Länge der einzelnen Anlagen und ihre Flächenausdehnung auf den einzelnen Schnitten mit der Körperlänge und der Flächengröße der Kontrolltiere in Querschnittsserien, so ergibt sich, daß die Anlagen auf die Größe der Tiere bezogen gleich groß, keinesfalls kleiner sind als bei den Kontrolltieren. Nachstehende Maßangaben werden davon überzeugen. Romeis schließt aus der absolut genommenen kleineren Größe der Thyr.-Anlage beim Versuchs- gegenüber dem Kontrolltier (VI. Arbeit im Pf. Archiv) auf ein Kleinersein der Thyr.-Anlage beim Schilddrüsentier gegenüber der Kontrolle. Die sehr viel größere Kleinheit des gesamten

Körpers der Versuchstiere gegenüber den Kontrollen muß meines Erachtens beim Vergleichen der beiderseitigen Schilddrüsenanlagen berücksichtigt werden, wenn man nicht zu schiefen Resultaten gelangen will.

Versuchstier Vers. XVI.

Fixiert am 15. VI. nach fünfmaliger Tablettenfütterung, 20 Tage nach Versuchsbeginn.

Fixiert: Größte Körperbreite: 3,0 mm.

Körperlänge 5,5 mm

Thyr.-Anlage: r.: 0,18 mm, l.: 0,22 mm $= \frac{1}{31}$ u. $\frac{1}{25}$ der Körperlänge.

Thymus: r.: 0,26 mm, l.: 0,26 mm $= \frac{1}{21}$ der Körperlänge.

Epiphyse: 0,19 mm $= \frac{1}{29}$ der Körperlänge.

Hypophyse: 0,16 mm $= \frac{1}{34}$ der Körperlänge.

Kontrolltier:

Fixiert am 15. VI. nach fünfmaliger Muskelfütterung, 20 Tage nach Versuchsbeginn.

Fixiert: Größte Körperbreite: 5,25 mm.

Körperlänge 8,75 mm.

Thyr.: r.: 0,36 mm $= \frac{1}{24}$ u. $\frac{1}{25}$ der Körperlänge.

l.: 0,35 mm

Thymus: r.: 0,33 mm $= \frac{1}{26}$ u. $\frac{1}{27}$ der Körperlänge.

l.: 0,32 mm

Epiphyse: 0,25 mm $= \frac{1}{35}$ der Körperlänge.

Hypophyse: 0,28 mm $= \frac{1}{31}$ » »

Zusammenfassung und Besprechung der Versuchsergebnisse.

1. Fütterung von Rinderepithelkörpern an Larven verschiedener Entwicklungsstadien von *Rana fusca* und *Bombinator pachypus* hat nach einer anfänglich unspezifischen Wachstumssteigerung keinen Einfluß auf Größenentwicklung und Metamorphose dieser Tiere.

2. Die Fütterung von Freund-Redlichschen Nebenschilddrüsen-tabletten bewirkt Beschleunigung der Metamorphose bei gleichzeitiger Hemmung des Größenwachstums. Ihre Wirkung gleicht der der Fütterung frischer Schilddrüse.

Das Ergebnis des ersten Satzes steht in Widerspruch zu den Ergebnissen der Voruntersucher. Dies scheint mir folgende Gründe zu haben. Der eine Autor, Cotronei, läßt es von vornherein offen, ob seinen verfütterten Nebenschilddrüsen-substanzen nicht Schilddrüsen-spuren beigemischt waren, und die beschleunigte Metamorphose, die er erhielt, spricht dafür. Wie viele andere konnte ich mich bei Gelegenheit anderer Versuche davon überzeugen, daß schon ganz geringe Spuren

von Schilddrüse genügen, um ihre typischen Wirkungen hervorzurufen. Was die Wachstumsbeschleunigung, die Romeis sah, anlangt, so habe ich sie auch bei Epithelkörperfütterung beobachten können. Die Tiere fraßen nämlich die dargereichte Substanz außerordentlich gern, wohingegen sie an das Muskelfleisch erst gern herangingen, wenn es mindestens einige Stunden im Wasser gelegen hatte¹⁾. So kam es nach den ersten Fütterungen zu einer vorübergehenden Wachstumsbeschleunigung der Versuchstiere (»gutes Futter«), die aber stets nur gering war und später wieder verschwand. Wurden sehr junge Larvenstadien gefüttert, so pflegten diese größeren Tiere in der Zeit, in der sie den Kontrollen im Wachstum voraus waren, auch dunkler auszusehen. Kurz vor der Metamorphose oder nach Abschluß derselben waren Pigmentierungsunterschiede sowie Größendifferenzen nicht mehr vorhanden. — Die Hemmung von Metamorphose und Wachstum, die Prior beobachtet haben will, kann ich mir nur so erklären, daß die verfütterten Epithelkörperchen nicht genügend von dem anhaftenden Fettgewebe befreit waren. In diesem Falle pflegen nämlich die Versuchstiere nur zögernd an das Futter heranzugehen oder verschmähen es völlig. Verwendete Prior nun jüngere Kaulquappen, so ist es erklärlich, daß er dabei gegenüber seinen Kontrolltieren Hemmung von Wachstum und Metamorphose fand²⁾. (Hungerwirkung auf junge Larvenstadien.) Andererseits ist von Romeis und anderen eine direkte Wachstumshemmung durch Fette und Fettsäuren beobachtet worden. Die Freund-Redlichschen Tabletten wirkten wie dargereichte Schilddrüse, so daß es für mich feststeht, daß sie Spuren von Schilddrüse enthalten. Für ihre klinische Wirksamkeit bei der Behandlung postoperativer Tetanie hat das keine Bedeutung, da bei dieser auch Schilddrüsendarreichung therapeutisch wirksam ist. (Guleke, Die Chirurgie der Epithelkörperchen. N. D. Chir. Bd. IX.)

Wichtig erscheint mir, daß durch die Versuche festgestellt ist, daß Epithelkörperfütterung an heranwachsende Froschlarven auf deren Entwicklung ohne Einfluß ist, die Epithelkörper für diese Tiere auf bestimmter Entwicklungsstufe also kein Harmozon³⁾ enthalten. Damit ist im biologischen Experiment ein prinzipieller Unterschied gegenüber der Wirkung der Schilddrüse festgestellt.

Ergänzend ist zu bemerken, daß die Epithelkörperanlagen (nach Maurer) sich bei der heranwachsenden Froschlarve zur Zeit der Ent-

¹⁾ Von animalischer Nahrung bevorzugen Froschlarven ganz allgemein Eingeweidedeile sowie leicht angefaulte Substanzen.

²⁾ Die während des Krieges erschienene Arbeit war mir nicht im amerikanischen Original, sondern nur in einem Referat im Zentralblatt für Physiologie zugänglich.

³⁾ Harmozon = morphogenetisch wirksamer innersekretorischer Reizstoff (Gley).

wicklung der inneren Kiemen bilden, später als die Schilddrüse, deren erste Anlage sich schon gleich nach Schluß des Medullarrohres abschnürt. Dieser Umstand spricht an und für sich dafür, daß die Epithelkörper erst später funktionsfähig werden als die Schilddrüse. Man muß einmal den Zeitpunkt des ersten Auftretens »innersekret. Drüsenanlagen« bei der Froschlarve von diesem Gesichtspunkt aus miteinander vergleichen. — Die kürzlich veröffentlichten Beobachtungen des Amerikaners Allen beweisen, daß die Epithelkörperchenanlagen heranwachsender *Bufo*-Larven durch ihr Vorhandensein und eventuelle Funktion nicht die Metamorphose auslösen können. Dieser Forscher entfernte nämlich bei heranwachsenden *Bufo*-Larven die Schilddrüsenanlage, beließ ihnen aber die Epithelkörperchen. Trotzdem bei diesen Tieren die Epithelkörperanlagen hypertrophierten, metamorphosierten sie nicht, sondern entwickelten sich zu neotenischen Riesenquappen. Die übermäßige Größe der Tiere auf die Hypertrophie des Epithelkörperchens zurückzuführen, geht nicht ohne weiteres an, da durch die Entfernung der Schilddrüse der ganze Organismus so stark gestört sein kann, daß auch noch andere Faktoren den Riesenwuchs bewirken können¹⁾.

Literatur.

1. E. Abderhalden: Studien über die von einzelnen Organen hervorgebrachten Substanzen mit spezifischer Wirkung. Pflügers Archiv, 1915. Bd. 162.
- 2. Ders.: Weitere Studien über die von einzelnen Organen hervorgebrachten Substanzen mit spezifischer Wirkung. Pflügers Archiv. Bd. 176. H. 5—6.
3. Bennet, M. Allen: The parathyroid glands of thyroidless bufo larvae. Journ. of Exper. Zool. 1920. Vol. 30. No. 2. Referat: Zentralbl. f. d. ges. Physiol. 1920. Bd. 1.
- 4. A. Biedl: Innere Sekretion. 2. Aufl. Berlin 1913.
- 5. Co-tronei: Primo contributo sperimentale allo studio della relazioni degli organi nell' accrescimento e nella metamorfosi degli Anfibi Anuri. Bios. 1913. Vol. 2.
- 6. Ders.: Première contribution expérimentale à l'étude des rapports des organes dans la croissance et dans la métamorphose des Amphibies anoures. Arch. ital. de biologie. 1915. T. 61. p. 305.
- 7. Ders.: Ulteriori osservazioni sulle relazioni degli organi e sulla nutrizione con tiroide di mammiferi nell' accrescimento larvale e nella metamorfosi degli Anfibi anuri. Rend. R. Accad. Lincei. Cl. Sc. fis. mat. e nat. Vol. 23. Ser. V. Sem. I. Fasc. 6—7.
- 8. Ellenberger: Handbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Haustiere. Berlin, Parey, 1906.
- 9. Ellenberger u. Baum: Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere. Berlin, Hirschwald, 1915.
- 10. E. Gley, Die Lehre von der inneren Sekretion. Deutsche Übersetzung von A. Lipschütz. Bern, Bircher, 1920.
- 11. J. F. Gudernatsch: Fütterungsversuche an Amphibienlarven. Zentralbl. f. Physiol. 1912. (Siehe auch Verhandlungen der anatom. Gesellschaft in München 1912. Fischer, 1912.)
- 12. Ders.: Feeding experiments

¹⁾ Nach Abschluß der Arbeit gelangte ich in den Besitz der neuen einschlägigen italienischen Literatur. Giacomini (Bologna) hat bei Parathyr.-Fütterung von Froschlarven mit Epithelkörperchen erwachsener Frösche ebenfalls keine spezifische Wirkung auf Wachstum und Metamorphose gesehen.

on tadpoles. Arch. f. Entw.-Mech. 1913. Bd. 35. — 13. Ders.: Feeding experiments on tadpoles. II. Americ. Journ. of Anatomy. 1914. Vol. 15. No. 4. — 14. Guleke: Die Chirurgie der Epithelkörperchen. Neue Deutsche Chirurgie. Bd. 9. Stuttgart, Enke, 1913. — 15. Iselin, Wachstumshemmung infolge von Parathyreoidektomie bei Ratten. Deutsche Zeitschr. f. Chirurgie. 1908. Bd. 93. — 16. R. H. Kahn, Zur Frage der Wirkung von Schilddrüse und Thymus auf Froschlarven. Pflügers Archiv. 1916. Bd. 163. — 17. F. Maurer, Schilddrüse, Thymus, Kiemenreste der Amphibien. Morpholog. Jahrbuch. 1888. Bd. 13. — 18. Ders.: Die Kiemen und ihre Gefäße bei anuren und urodelen Amphibien und die Umbildung der beiden ersten Kiemenarterienbogen bei Teleostiern. Morpholog. Jahrbuch. 1888. Bd. 14. — 19. G. P. U. Prior: Some mental cases with endocrine considerations. Journ. of ment. science. Vol. 66. No. 272. Referat: Zentralbl. f. d. ges. Physiol. 1920. Bd. 1. — 20. B. Romeis: Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung innersekretorischer Organe. I. Mitteilung. Archiv f. Entw.-Mech. Bd. 38. S. 183. — 21. Ders.: II. Mitteilung. Ebendort. Bd. 40, H. 4. Bd. 41, H. 1. — 22. Ders.: III. Mitteilung. Zeitschr. f. d. ges. exper. Medizin. Bd. 4, H. 6. — 23. Ders.: IV. Mitteilung. Ebendort. Bd. 5, H. 1—2. — 24. Ders.: V. Mitteilung. Ebendort. Bd. 6, H. 2—4. — 25. Ders.: VI. Mitteilung. Pflügers Archiv. Bd. 173. — 26. Ders.: Der Einfluß innersekretorischer Organe auf Wachstum und Entwicklung von Froschlarven. Die Naturwissenschaften. 1920. 8. Jahrg. H. 44. S. 860.