

P-99  
N° 8—10 B II OCTOBRE—DÉCEMBRE

1938

BULLETIN INTERNATIONAL  
DE L'ACADÉMIE POLONAISE  
DES SCIENCES ET DES LETTRES

CLASSE DES SCIENCES MATHÉMATIQUES ET NATURELLES  
SÉRIE B: SCIENCES NATURELLES (II)

CRACOVIE  
IMPRIMERIE DE L'UNIVERSITÉ  
1939



Publié, par l'Académie Polonaise des Sciences et des Lettres, sous la direction  
de M. S. Maziarski, Secrétaire de la Classe des Sciences Mathématiques et  
Naturelles (Cracovie, Institut d'Histologie de l'Université, rue Wielopole 15)

Nakładem Polskiej Akademii Umiejętności.  
Drukarnia Uniwersytetu Jagiellońskiego pod zarządem Józefa Filipowskiego

*Unaczynienie grasicy u niektórych płazów ogoniastych.*  
*The Blood Vessels of the Thymus Gland in some of the*  
*Urodela.*

Mémoire

de M. H. SZARSKI,

présenté le 3 Octobre 1938 par M. H. Hoyer m. t.

**Introduction**

Leydig was the first to describe the localisation of the thymus gland in several urodeles (1853). Later his results were confirmed and generalised by Maurer (1888), Bolau (1899), Dustin (1911), Baldwin (1918), Francis (1930) and Klose (1932).

The distribution of the blood vessels in the thymus gland of urodeles is mentioned only in the paper of Dustin. This author in the description of the thymus of axolotl, underlines that the gland is surrounded by a layer of connective tissue, in which a net of blood vessels is spread. The arteries and veins are connected with this net. In the centre of the organ the capillaries are only rarely found, and are very narrow. Dustin does not mention from which vessels the thymic arteries and veins derive. Francis describes the main vessels of the thymus of the salamander, and Klose mentions the thymic veins of the olm (*Proteus*).

The blood vessels of the thymus in other vertebrate groups are also known only superficially, except in mammals where they have been closely examined (Hammar), and in the anurans where it was found (Szarski) that the capillary blood vessels are evenly distributed in the cortex and in the medulla of the gland, and are not influenced by other morphological components of the organ. The thymic arteries which in *Salientia* usually derive from the anastomosis between *A. cutanea magna* and *A. temporalis*, enter

the centre of the gland, while the veins which open into one of the jugulars, in the majority of the investigated species, are spread on the thymus surface.

In the present work the following species of amphibians have been investigated: *Ambystoma mexicanum* (8 sections of unmetamorphosed and 2 of metamorphosed animals), *Salamandra salamandra* (8 sections), *Triturus cristatus* (11 sections), *Triturus alpestris* (6 sections), and *Triturus vulgaris* (11 sections). The blood vessels of the investigated animals were injected with prussian blue, and then the specimens fixed *in toto* in formalin were dissected under a binocular microscope. Thymuses were cut into series of sections of variable thickness.

### The larger blood vessels of the thymus

*Ambystoma mexicanum* Cope. According to the description of Baldwin the thymuses in the axolotls and in metamorphosed animals lie under the skin, in front and in the immediate vicinity of the muscles which move the gill arches (*Mm. levatores arcuum branchialium* Bütschli). Usually three thymuses are situated on each side of the body. The first is found in the connective tissue between *Mm. levatores a. branch.* and the muscles of the neck, the second and the third between the gill muscles, sometimes covered, sometimes immediately under the skin. In two cases (on 10) the mid thymus was divided into two distinct parts, thus on one side of the body four thymuses were found. The shape of the glands is very variable, and can be spherical, oblong, flattened, etc. (see Fig. 1).

In unmetamorphosed specimens thymic arteries run from a vessel which forms branches to the gill muscles and derives from the dorsal aorta (Fig. 2 Ao), between the opening of the first and second of the gill arches. Usually several arteries run to each thymus. The blood from the glands flows to *V. cutanea parva* (Vc), a large vein situated immediately under the skin, and opening into *V. jugularis externa* (Ve) or *V. jugularis interna* (Vi) close to their opening into *D. Cuvieri*. To *V. cutanea parva* also many small vessels open which collect blood from the gill muscles, gills and the skin of the head. Usually from each gland several vessels arise which open into little veins running in the neighbourhood.

The vessel from which thymic arteries run, derives in metamorphosed specimens (Fig. 2) from *D. Botalli* or from the aorta in its vicinity. The veins run in the same manner as in unmetamorphosed animals.

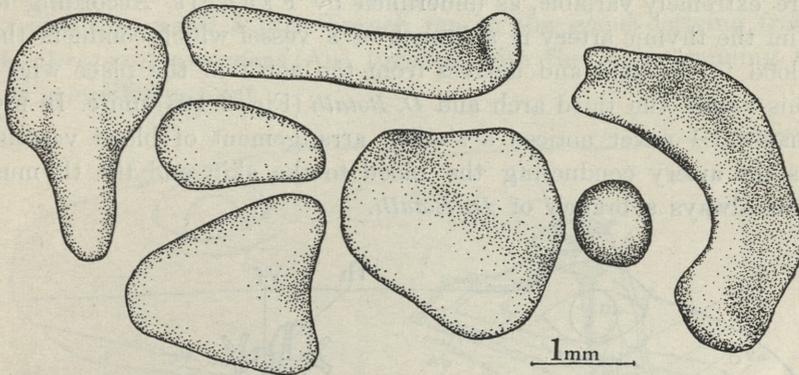


Fig. 1. Outlines of several thymuses of some specimens of *Ambystoma mexicanum*. Drawn with the Abbé camera lucida.

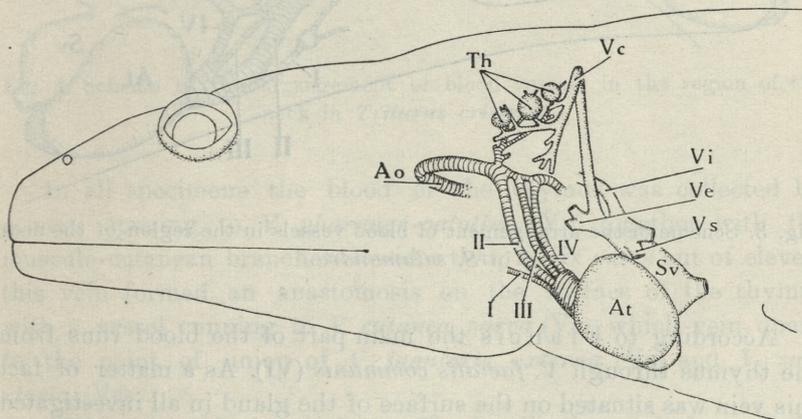


Fig. 2. Scheme of the arrangement of blood vessels in the region of the neck in metamorphosed *Ambystoma mexicanum*.

*Salamandra salamandra* L. As has been described by Maurer, Bolau and Francis, thymus lies in salamanders immediately under the skin, in the region of the posterior margin of the paratoid glands. The shape of the salamander's thymus is irregular, and is divided by partitions of connective tissue into separate lobules.

Sometimes groups of lobules forming larger lobes lie independently in the connective tissue at greater or smaller distances (to 2 mm) from each other (Maurer).

The blood vessels, and in particular the veins, in salamanders are extremely variable, as underlined by Francis. According to him the thymic artery is a branch of a vessel which conducts the blood to the skin and derives from the aorta in the place where this vessel, the third arch and *D. Botalli* (Fig. 3 DB) unite. In my material I never noticed a similar arrangement of blood vessels, as the artery conducting the blood to the skin and the thymus was always a branch of *D. Botalli*.

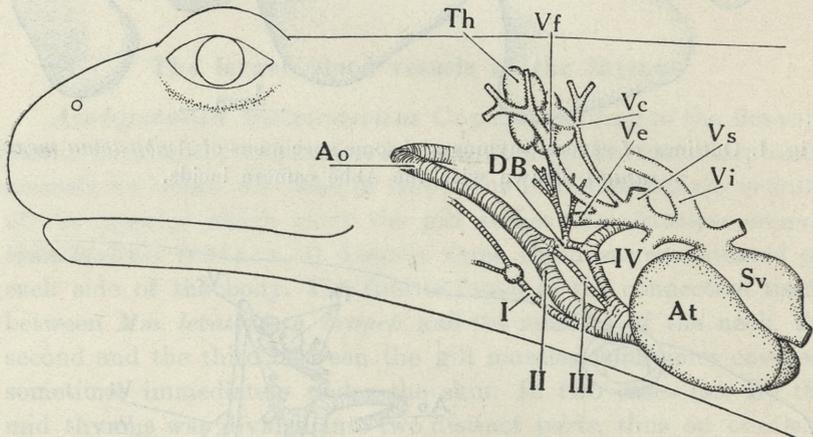


Fig. 3. Scheme of the arrangement of blood vessels in the region of the neck in *S. salamandra*.

According to Francis the main part of the blood runs from the thymus through *V. facialis communis* (Vf). As a matter of fact this vein was situated on the surface of the gland in all investigated animals, and in six cases (on 8) the blood from the gland was also collected by *V. cutanea parva* (Vc), opening to *V. subclavia* (Vs), or, in one case, into *V. jugularis interna* (Vi).

***Triturus cristatus*** Laur. The localisation of the thymus does not differ in any of the investigated species of the genus *Triturus* from that described in salamander (Leydig, Maurer, Bolau). The thymus, namely, lies directly under the skin near the posterior ends of the hyoids, in the form of compact and uniform bodies.

In *Triturus cristatus* the blood flows to the gland through one or several little parallel arteries from *D. Botalli* (Fig. 4 DB), or from the point of union of this vessel with aorta (II) or the pulmonary artery (IV). *Aa. thymicae* run across *M. cephalo-dorso-subpharyngeus* (Francis) supplying it. In one case (on 10 sections) besides this vessel a little branch ran to the gland deriving from *A. pharyngea ascendens* (Ap), together with the artery running to the mandibular joint.

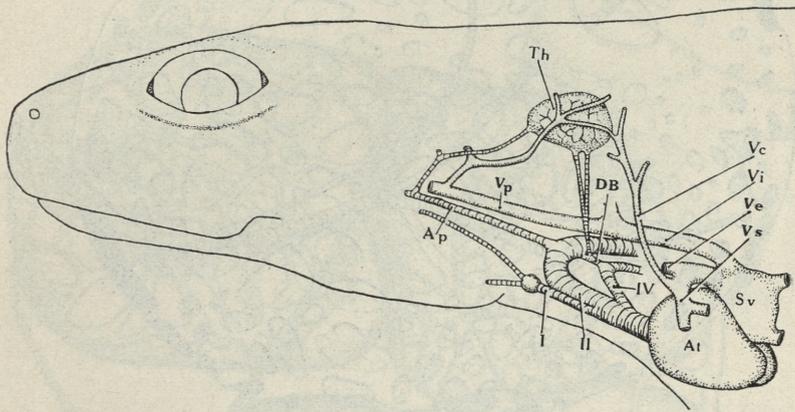


Fig. 4. Scheme of the arrangement of blood vessels in the region of the neck in *Triturus cristatus*.

In all specimens the blood of the thymus was collected by a vein opening to *V. pharyngo-palatina* (Vp) together with the musculo-cutaneous branches. Besides that, in six cases out of eleven, this vein formed an anastomosis on the surface of the thymus with a vessel running to *V. cutanea parva* (Vc), which vein opens to the point of union of *V. jugularis externa* (Ve) and *V. subclavia* (Vs).

***Triturus alpestris* Laur.** The localisation and shape of the gland is identical with *Triturus cristatus*. In one case only the thymus on one side of the body was divided into two lobes. The arrangement of the blood vessels is characterised by the presence, in the full-grown animals, of the third vascular arch (Boas, Maurer), which runs from *A. pulmonalis* to the aorta, in the vicinity of *D. Botalli*. Usually the thymic artery derives from *D. Botalli*; in one case another vessel ran to the thymus from the third vascular

arch. The thymic vein opened, in three cases, to *V. pharyngo-palatina*, and in the remaining three to *V. jugularis externa*. In the last mentioned *V. thymica* was homologous to *V. cutanea parva* of other species non-existing in other cases.

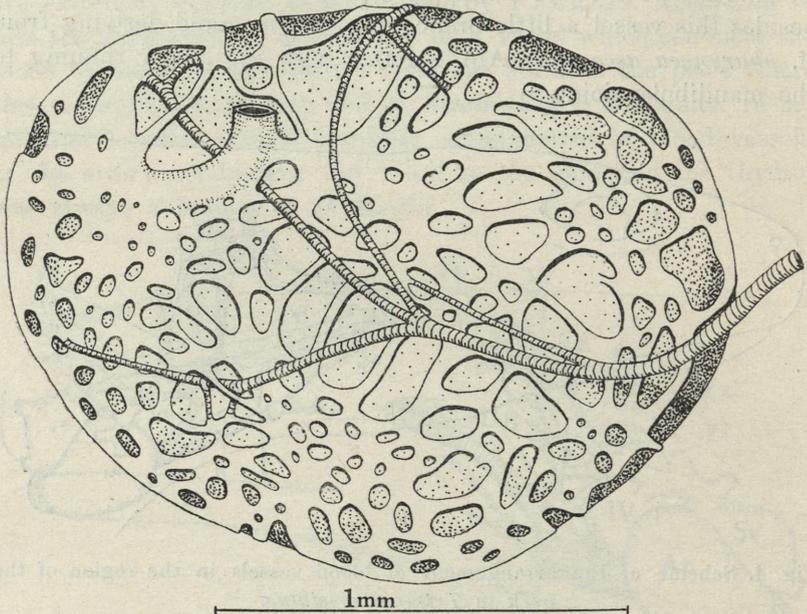


Fig. 5. A thymus of *A. mexicanum*. Showing principal vessels and the superficial net of capillaries. Drawn with the Abbé camera lucida.

***Triturus vulgaris* L.** The thymus in *Triturus vulgaris* is situated identically as in the two species already described. The third vascular arch was found in three sections and non-present in seven. Thymic artery always originates in *D. Botalli*, and sometimes before reaching the gland forms several parallel vessels. Twice, a supplementary artery was found running from *A. pharyngea ascendens*. The blood from the thymus is always collected by *V. cutanea parva*, in seven cases a second vein ran from the gland to *V. pharyngo-palatina*.

#### The distribution of capillaries in the thymus

As has been described by Dustin, a net of blood vessels attaining a diameter of  $200\ \mu$  is spread on the surface of the thymus of *A. mexicanum*. The very small and irregular meshes

of the net measure  $25\ \mu$  to  $300\ \mu$  in diameter. Accordingly the surface of the gland in some places is covered with a nearly continuous blood sinus (Fig. 5). The larger trunks are connected with the superficial net of blood vessels. Through the centre of the gland run very delicate and rare strands of connective tissue along which are situated very narrow capillaries (to  $10\ \mu$  in diameter).

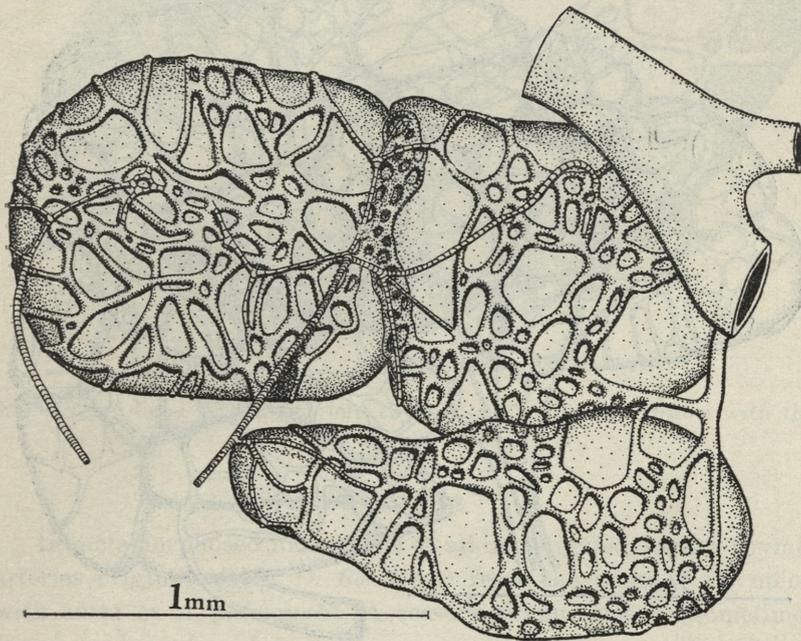


Fig. 6. Three lobules of the thymus of *S. salamandra*. Showing superficial net of capillaries. Drawn with the Abbé camera lucida.

The thymus of the salamander is divided on the lobules by partitions of connective tissue. The blood vessels run only on the surface of the gland or inside the partitions, and do not enter the centre of lobules (Fig. 6). The veins and arteries branch out on the surface of the gland, the arteries usually forming the most superficial layer of vessels. The diameter of the capillaries on the thymus's surface is  $25\ \mu$  to  $40\ \mu$ , and the very irregular meshes of the net of blood vessels are about  $10\text{--}300\ \mu$  in diameter.

The surface of the thymus of *Triturus cristatus* and *Triturus alpestris* is divided by the connective tissue on lobules. This division does not reach the centre of the gland, which remains undivided. Blood vessels are spread mainly on the surface of thymus and inside the partitions, but sometimes they also penetrate into the undivided centre of the organ (Fig. 7). The arteries usually

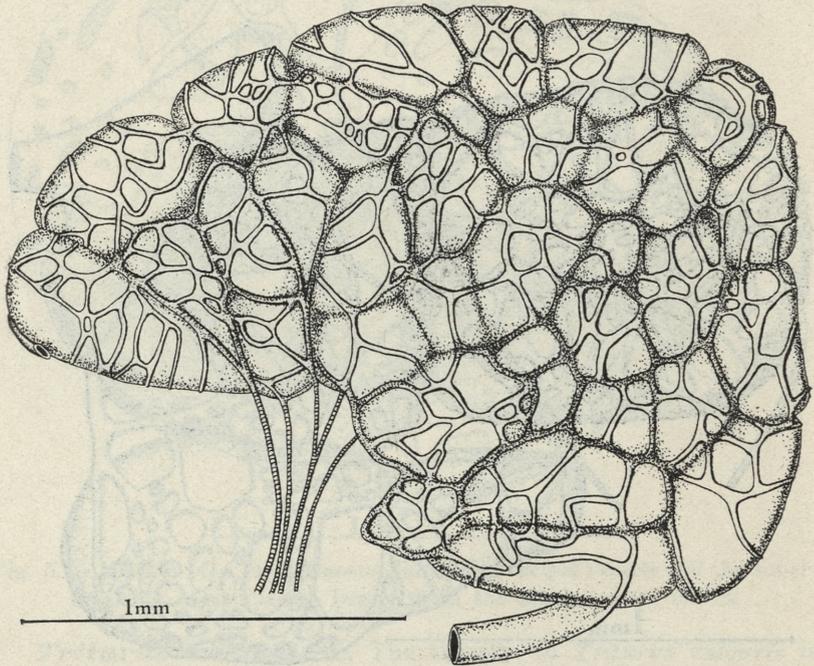


Fig. 7. The proximal side of the right thymus of *T. cristatus*. Drawn with the Abbé camera lucida.

spread in furrows on the surface of the gland directed to the muscles, while the veins branch out on the surface directed to the skin. The meshes of the net of blood vessels are rather regular, their diameter being  $30\mu$  to  $300\mu$ , the diameters of capillaries being about  $16\mu$ .

Neither the connective tissue, nor the blood vessels enter the thymus of *T. vulgaris*. The irregular net of blood vessels is spread only on the surface of the gland (Fig. 8). The diameters of capillaries are  $10\mu$  to  $30\mu$ , and the diameters of the meshes  $10\mu$  to

200  $\mu$ . The arteries are situated on the surface directed to the trunk while the veins collect on the side directed to the skin.

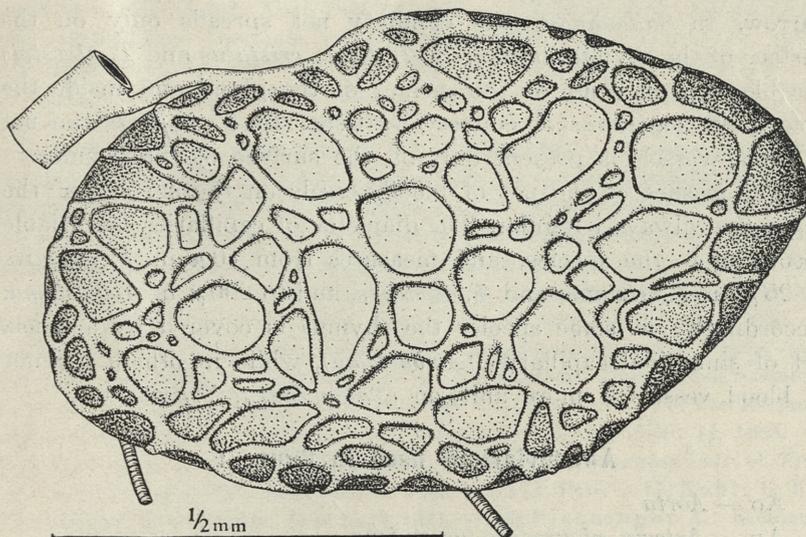


Fig. 8. The distal side of the left thymus of *T. vulgaris*. Drawn with the Abbé camera lucida.

### Summary

In metamorphosed individuals of all investigated species thymic arteries originate from *D. Botalli* or from the point of its union with aorta or *A. pulmonalis*. Accessory thymic arteries, sometimes found, are branches of *A. pharyngea ascendens*. In unmetamorphosed animals belonging to the species *A. mexicanum*, thymic arteries originate from *Aorta dorsalis* between the opening of the first and the second gill vein.

In all investigated animals the main collector of the blood from the thymus is *V. cutanea parva*, accompanied by branches of *V. facialis communis* (*Salamandra*) or *V. pharyngo-palatina* (*Triturus*).

The arteries run to the surface of the gland directed to the muscles, while veins run to that directed to the skin.

In all urodeles a tendency of blood capillaries to spread only on the surface of the thymus is obvious, in contrast to *Salientia* where the blood vessels are distributed regularly in the whole

mass of the gland (Szarski). In *Ambystoma* the superficial net of capillaries is very dense and often similar to blood-sinus, while in the centre of the organ the blood vessels are very scarce and narrow. In *Salamandra* the capillary net spreads only on the surface of the thymic lobules. In *Triturus cristatus* and *T. alpestris* the blood vessels run on the surface of the gland and inside the incomplete partitions of connective tissue. In *T. vulgaris* the net of blood vessels is present only on the surface of the thymus.

The meshes of the net of blood vessels on the surface of the organ are always irregular. The diameter of capillaries is variable according to the species, and measures from  $10\ \mu$  in *T. vulgaris* to  $25\ \mu$  in *T. cristatus* and *T. alpestris*, and to  $200\ \mu$  in *Ambystoma*. Accordingly, in some species the thymus is covered by a dense net of sinusoidal capillaries (*Ambystoma*), while in others the net of blood vessels is more uniform (*Salamandra*, *Triturus*).

#### Abbreviations used in figures:

- Ao — Aorta
- Ap — Arteria pharyngea ascendens
- At — Atrium
- DB — Ductus Botalli
- Sv — Sinus venosus
- Th — Thymus
- Vc — Vena cutanea parva
- Ve — Vena jugularis externa
- Vf — Vena facialis communis
- Vi — Vena jugularis interna
- Vp — Vena pharyngo-palatina
- Vs — Vena subclavia
- I, II, III, IV — Arterial arches.

In conclusion I beg to express my grateful acknowledgement to Prof. Dr Z. Grodziński for his kind guidance in the course of these résearches. Institute of Comparative Anatomy of Jagellonian University, Kraków.

#### Bibliography

- 1) Baldwin F. M.: Pharyngeal derivatives of *Amblystoma*. Journ. Morph. 30, 1918. — 2) Bethge E.: Das Blutgefässsystem von *Salamandra maculata*, *Triton teniatus* und *Spelerpes fuscus*, mit Betrachtungen über den

- Ort der Athmung beim lungenlosen *Spelerpes fuscus*. Z. wiss. Zool. 63, 1898. — 3) Boas J. E. V.: Beiträge zur Angiologie der Amphibien. Morphol. Jahr. 7, 1881. — 4) Bolau H.: *Glandula thyreoides* und *Glandula thymus* der Amphibien. Zool. Jahrb. Anat. Ont. 12, 1899. — 5) Bütschli O.: Vorlesungen über vergleichende Anatomie. Vol. II, Leipzig 1912. — 6) Cortivo B.: Sulla fine vascularizzazione del timo. Monit. Zool. Ital. 43, 1933. — 7) Dustin A. P.: Le thymus de l'axolotl. Arch. Biol. 26, 1911. — 8) Francis E. T. B.: The anatomy of the salamander. Oxford 1934. — 9) Golderen Chr. van.: Venensystem. Handb. vergl. Anat. Wirbelt. Vol. 6, Berlin 1933. — 10) Hammar J. A.: Die normal-morphologische Thymusforschung im letzten Vierteljahrhundert. Leipzig 1936. — 11) Klöse W.: Beiträge zur Morphologie und Histologie der Schilddrüse, der Thymusdrüse und des postbranchialen Körpers von *Proteus anguineus*. Z. Zellforsch. 14, 1932. — 12) Kostowiecki M.: Über die Beziehung der Hassalschen Körperchen zu dem benachbarten Blutgefäßen in der Thymus menschlicher Föten. Bull. Acad. Polon. Sc. Sér. B II. Cracovie 1930. — 13) Leydig F.: Anatomisch-histologische Untersuchungen über Fische und Reptilien. Berlin 1853. — 14) Maurer F.: Schilddrüse, Thymus und Kiemenreste der Amphibien. Morph. Jahr. 13, 1888. — 15) Maurer F.: Die Kiemen und ihre Gefäße bei Amphibien und Teleostiern. Morph. Jahr. 14, 1888. — 16) Michon J.: Les arcs aortiques chez le *Triton marmoratus* Latr. et *Triton cristatus* Laur. Bull. Soc. Zool. d. France LXII, 1937. — 17) Noble G. K.: The biology of amphibia. New York 1931. — 18) Pischinger A.: Kiemenanlagen und ihre Schicksale bei Amnioten. Schilddrüse und epiteliäle Organe der Pharynxwand bei Tetrapoden. Handb. vergl. Anat. Wirbelt. Vol. III. Berlin 1937. — 19) Szarski H.: The blood vessels of the thymus gland in some of the *Salientia*. Bull. Acad. Polon. Sc. Sér. B II. Cracovie 1937. — 20) Taylor S. J.: The vascularity of the frog hypophysis. Tr. R. Soc. Canada. 3 ser. 31, 1937. — 21) Tsusaki T. and Yatabe T.: Über die Blutversorgung der Schilddrüse bei Urodelen. Keijo J. Med. 1931. — 22) Werner F.: *Amphibia*—Lurche. Kükenthal Handb. Zool. 6, II. Berlin 1930.



*Cytologiczne badania żółtka jaja kurzego w zwyczajnych i doświadczalnych warunkach. — Zur Morphologie des Hühnereidotter unter normalen und experimentellen Bedingungen*<sup>1)</sup>.

Mémoire

de M. Z. **GRODZIŃSKI**,

présenté le 7 Novembre 1938 par M. H. Hoyer m. t.

(Planches 6—8).

**Inhaltsverzeichnis.**

Problem und Material. . . . .	317
Die Morphologie der Dotterkugeln. . . . .	319
Die Lecitholyse. . . . .	322
Vitalfärbung. . . . .	328
Einwirkung von Joddämpfen. . . . .	335
Einwirkung von Dioxan. . . . .	338
Einwirkung von Ätherdämpfen. . . . .	341
Diskussion. . . . .	342
Literaturverzeichnis. . . . .	351
Tafelerklärung. . . . .	353

**Problem und Material.**

Der Dotter des frischen Hühnereies besteht aus einer Flüssigkeit, in welcher zahlreiche mikroskopisch feststellbare Tropfen einer anderen Flüssigkeit suspendiert sind; er besitzt also die Eigenschaften einer Emulsion (Abb. 1, Taf. 6). Die einen von diesen Tropfen sind sehr kleine Fettkügelchen, die die Ausmaße von  $1\ \mu$  kaum überschreiten (Abb. 3a), der Durchmesser der anderen, die Dotterkugeln genannt sind, ist viel größer.

<sup>1)</sup> Die Arbeit wurde mit Unterstützung von »Fundusz im. ś.p. Tyszkowskiego« ausgeführt.

Der Bau und die chemische Zusammensetzung der letzteren sind sehr kompliziert. Nach der allgemein herrschenden Anschauung (His, Balfour, Schenk, Dubuisson, Wassermann, Smiechowski, Ridle, Konopaeka, Marza und Mitarbeiter) unterscheidet man gelbe und weiße Dotterkugeln. Der Name der ersten stammt von der gelben Färbung, welche sie dem Xanthophyll und den Spuren des Karotins verdanken (Willstätter & Escher aus Needham). Sie sind auch größer als die weißen, ihr Durchmesser schwankt von 25—100  $\mu$ , der weißen von 5—75  $\mu$ . Beide Arten der Dotterkugeln enthalten stark lichtbrechende Körner, die in den weißen größer und weniger zahlreich als in den gelben sind (Abb. 3, 4). Es läßt sich eine kontinuierliche Reihe der Dotterkugeln aufstellen, in welcher der körnige Inhalt der einen Dotterart der Größe nach allmählich in den der anderen übergeht. Dies gab den Anlaß zur Vermutung, daß die eine Dotterart sich in die andere umwandeln kann (Reichert, Dubuisson).

Die weißen Dotterkugeln nehmen die Mitte des Eidotters ein. Von dort reichen sie in Gestalt eines Zylinders (Latebra) angehäuft bis an die oberflächlich liegende Keimscheibe und breiten sich in einer schmalen Schichte unterhalb der ganzen Dottermembran aus. Die gelben Dotterkugeln stellen die Mehrheit des Dotters dar (Purkinje, Thomson, Balfour, Kölliker).

Die Dotterkugeln bilden den Gegenstand der vorliegenden Arbeit, insbesondere in ihrer Morphologie sowie einiger ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften. Zur Untersuchung wurden ausschließlich die Eier der »Rhode Islands« Hühner benutzt. Der Dotter wurde mit der Tyrode'schen Flüssigkeit immer im Verhältnis 1:100 verdünnt und die Lösung im hängenden Tropfen auf dem Deckglase weiter behandelt. Das Deckglas wurde vermittelt eines Vaselineinges auf dem Objektträger außerhalb der in ihm eigenschliffenen Vertiefung befestigt, was das Präparat vor dem Austrocknen und gleichzeitig vor dem Zusammenkleben mit dem Objektträger schützte. Die Luftkammer, die auf diese Weise zwischen dem Deckglase, Objektträger und dem Vaselineing entstand, erwies sich zum Einführen der verschiedenen Reagentien, deren Dämpfe auf den herunterhängenden Dottertropfen einwirken konnten, sehr praktisch.

Außerdem wurden Kulturen aus der Wand des Dottersackes eines 2—4 Tage bebrüteten Hühnchens angelegt. Das Material für die Kulturen stammte aus den gefäßlosen Bezirken der *Area vitellina interna*, deren entodermale Zellen in dieser Entwicklungsperiode meistens große Dotterkugeln enthalten. Als Nährboden diente die Tyrode'sche Flüssigkeit, in welcher die Explantate sehr gut proliferieren, sobald sie sich in den ersten Stunden nach der Explantation im sitzenden Tropfen befinden. Im hängenden Tropfen ballt sich meistens das explantierte Material zusammen und es findet keine Proliferation statt. Im sitzenden Tropfen senkt sich das Explantat auf das Deckglas und die Zellen finden auf seiner Oberfläche die entsprechende Unterlage zum Wandern. Sie breiten sich weit aus und bilden ein vortreffliches Objekt zur optischen Beobachtung. Die entodermalen Zellen enthalten unversehrte Dotterkugeln, die einer ähnlichen Behandlung unterlagen wie die freien Dotterkugeln. Die üblichen Nährboden, Plasma und Embryoextrakt, wurden nicht angewandt, weil sie bei der experimentellen Behandlung koagulieren und dadurch die Feststellung der mikroskopisch sichtbaren Vorgänge innerhalb der Zellen erschweren.

Photographische Aufnahmen, über 200 an Zahl, dokumentieren samt Protokollen die beobachteten Vorgänge.

### Die Morphologie der Dotterkugeln.

Bei der Zubereitung der Stammlösung des Dotters ist es nicht gleichgültig, woher der Dotter entnommen wird. Führt man die Glaspipette senkrecht durch die Keimscheibe gegen die Mitte des Dotters (Latebra) ein, so füllt sie sich größtenteils mit weißem Dotter, in eine schief eingestochene Pipette gelangt dagegen fast ausschließlich der gelbe Dotter. Schon makroskopisch lassen sich die zwei in der Glaspipette enthaltenen Dotterarten unterscheiden, der weiße Dotter ist dünnflüssig und milchweiß, der gelbe zähflüssig und gelblich.

Unter dem Mikroskope charakterisiert und unterscheidet voneinander die beiden Dotterarten ihre Größe, Farbe und der körnige Inhalt. Die gelben Dotterkugeln sind größer, ihr Durchmesser variiert von 45—120  $\mu$ , das der weißen von 15—45  $\mu$ . Die gelben Dotterkugeln besitzen eine leicht zitronengelbe Farbe und sind mit feinen, stark lichtbrechenden Körnern ganz aus-

gefüllt. In den einen Kugeln sind diese Körner staubartig fein, in den anderen, die meistens aus tieferen Schichten des Dotters stammen, mehr grob (Abb. 3, 9 a, 18, 21 a, 22 a). Die weißen Dotterkugeln erscheinen im Mikroskope in weißlichgrauer Farbe und enthalten ein großes Korn oder mehrere körnerartige Gebilde, deren Zahl sich leicht feststellen läßt und die jedenfalls das Innere der Kugel nicht voll ausfüllen (Abb. 4). Die großen Körner der weißen Dotterkugeln mancher Eier weisen, besonders wenn sie einzeln vorhanden sind, oft kleine rötlich schimmernde Nischen auf. Osmiumsäuredämpfe ( $\text{OsO}_4$ ) schwärzen die Körner beider Dotterarten schon nach 20—30 Sekunden dauernden Einwirkung, was ihren fettartigen Charakter beweist.

Alle Dotterkugeln besitzen runde, scharf umschriebene Konturen. Beim gegenseitigen Berühren fließen sie niemals zusammen, sondern flachen sich an den Berührungsstellen ab. Beim Anpressen mit dem Deckgläschen springen sie an einer Stelle auf und lassen den körnigen Inhalt austreten. Das alles deutet auf die Anwesenheit einer oberflächlichen Hülle hin, die das Austreten und Auseinanderweichen der Körner verhindert. Im Dunkel- feld des Zeiss'schen Epikondensors leuchtet die Oberfläche der Dotterkugel hell auf. Bei entsprechender Einstellung der Mikrometerschraube erscheinen die Kugelgrenzen als deutliche Ringe, die das schwarze Innenfeld umgrenzen. Diese Bilder weisen auf die Anwesenheit fettiger Substanzen in der Dotterkugelmembran hin (Abb. 5).

Durch Anwendung der in der histologischen Technik üblichen Fixierungsmittel wird die Anwesenheit noch einer proteinhaltigen Komponente der Dotterkugeln festgestellt. Nach Zugabe von Perényj'scher Flüssigkeit, von konzentriertem Formol oder eines kleinen Sublimatkristalls zur untersuchten Dotterlösung treten innerhalb der Dotterkugeln Granula auf (Abb. 6 b), die das Licht schwächer brechen als die Fettkörner. Sie füllen in den weißen Dotterkugeln den ganzen zwischen der Hülle und den Fettkugeln vorhandenen Raum aus. In den gelben Dotterkugeln sind sie kaum sichtbar, weil sie durch die stark lichtbrechenden Fettkörner gedeckt sind. Unter Einwirkung von Osmiumsäuredämpfen koaguliert der proteinhaltige Komponent ebenfalls, aber die Granula sind so fein, daß sie unter dem Mikroskope kaum feststellbar sind.

Der fixierte proteinhaltige Komponent der Dotterkugeln färbt sich mit Alaunhämatoxylin nach Ehrlich intensiv violett-blau, reagiert aber mit Eosin gar nicht. Dasselbe läßt sich auch auf Querschnitten durch den Dottersack feststellen, auf welchen die in den entodermalen Zellen enthaltenen Dotterkugeln eine ähnliche Farbe annehmen. Alaunhämatoxylin bildet bekanntlich einen der besten Farbstoffe zur Darstellung der Zellkerne. Die Affinität der beiden erwähnten Gebilde zum gleichen Farbstoffe beruht nicht auf gleicher chemischen Zusammensetzung. Dotterkugeln enthalten Phosphoproteine, die Zellkerne dagegen Nucleoproteine (Bayliss und Plimmer aus Needham). Die Feulgen'sche Nuklealreaktion, welche die Thymonukleinsäure im Zellkerne zu unterscheiden gestattet, gibt in Dotterkugeln Bilder, die gegen die Anwesenheit dieser Komponenten sprechen (V. D. und E. V. Marza) oder ihn wenigstens nicht einwandfrei aufweisen (Thomas).

Außer den beschriebenen Dotterkugelarten existieren in jedem Dotter des frischen Eies noch andere, stark von ihnen abweichende Dottergebilde (Abb. 2). Sie besitzen vor allem keine Membran, ihre Ausmaße sind kleiner (5—25  $\mu$ ) und der Gestalt nach sind sie nicht genau kugelförmig. Innerhalb ihres Körpers treten rötlich schimmernde Nischen auf. Die Zahl und Größe der Nischen variiert beträchtlich, es können nur 1—2 vorkommen, die in kleinen Dotterkugeln nur wenig Platz einnehmen, oder mehrere von ihnen füllen den Körper der größeren vollständig aus. Das zwischen den Nischen vorhandene Material bricht das Licht viel stärker als die Nischen selbst, was den Dotterkugeln das Aussehen eines hellen Netzes verleiht, welches die rötlichen Felder umgibt.

Im Dunkelfelde des Zeiss'schen Epikondensors leuchten die Umrisse dieser Dotterkugel sowie die Ränder der Nischen hell auf. Beim Drehen der Mikrometerschraube läßt sich das Bild nicht grundsätzlich ändern, woraus geschlossen wird, daß die ganze Dotterkugel aus fettähnlicher Substanz besteht und daß sie im Inneren nischenartig ausgehöhlt ist. Diese Substanz muß sehr zähflüssig sein, weil an einigen gespaltenen Kugeln beobachtet wurde, daß sich weder die Ränder der Spalte abrunden, noch das ganze Gebilde auseinanderfließt.

Diese Gebilde treten in jedem Ei auf und zwar fast ausschließlich im weißen Dotter, in welchem sie in manchen Proben an Zahl der Hälfte der weißen Dotterkugeln nahe kommen.

Einige Versuche, die mit Eierstockdotter gemacht wurden, scheinen darauf hinzuweisen, daß sie als unreife gelbe Dotterkugeln aufzufassen sind. Sie werden deshalb der Einfachheit halber mit dem Namen des Übergangsdotters belegt.

### Die Lecitholyse <sup>1)</sup>.

Die Dotterkugeln behalten in der Tyrode'schen Flüssigkeit oder in 1/6 molaren Wasserlösung von NaCl ihre morphologischen Merkmale mehrere Tage hindurch unverändert bei, unter der Bedingung natürlich, daß die Eigenschaften der Verdünnungsflüssigkeit nicht etwa durch Austrocknen oder durch Ansteckung mit Bakterien verändert werden. Erst nach 5—7 Tagen fangen die Dotterkugeln an sich aufzulösen und ihre Fettkörner dem Medium abzugeben. Dieser Prozeß beginnt bei der Temperatur von +38°C etwas rascher als bei +18°C und dauert verschieden lange Zeit an. In einigen Fällen wurden die unversehrten Dotterkugeln in der Tyrode'schen Flüssigkeit noch nach einem Monate festgestellt. Nach mehr als 10-tägigem Aufenthalte in dieser Flüssigkeit verwischt sich optisch die Granulierung der gelben Dotterkugeln. Der Übergangsdotter bleibt ständig unverändert.

Veränderung des osmotischen Druckes in der Verdünnungsflüssigkeit führt zu einer mehr oder weniger starken Umgestaltung der Dotterkugeln. Der osmotische Druck kann gesteigert oder herabgesetzt werden; im ersten Falle spricht man von hypertotonischen, im zweiten von hypotonischen Lösungen.

In hypotonischen Lösungen offenbart sich die Tendenz der Dotterkugeln zum Platzen (Coste), das um so intensiver ist, je tiefer der osmotische Druck der Verdünnungsflüssigkeit sinkt. In 1/8 molarer Lösung von NaCl platzen nach 30 Minuten nur wenige Kugeln, andere bleiben noch nach 24 Stunden unversehrt. In 1/10 molarer Lösung platzen die ersten Dotterkugeln schon nach 4 Minuten und andere folgen ihnen schnell nach. Binnen zwei Stunden platzt weniger als die Hälfte der in der Lösung vorhandenen Dotterkugeln, der Rest behält noch nach 24 Stunden seine charakteristischen morphologischen Merkmale bei. Eine 1/12 molare Lösung veranlaßt das Platzen der Mehrheit der Kugeln

<sup>1)</sup> λέκιδος = Eidotter, λύσις = Auflösung.

schon binnen 5 Minuten, nach 2 Stunden läßt sich keine unversehrte Kugel mehr in der Flüssigkeit feststellen.

Die hypotonischen Flüssigkeiten üben keinen Einfluß auf den Übergangsdotter.

Beim Zubereiten der Dotterlösungen für diese Experimente ist von Wichtigkeit, daß der frische Dotter mittelst kalibrierter Pipette in genau bestimmter Menge (1:100) der gewünschten NaCl Lösung beigemischt wird. Durch das Platzen der Dotterkugeln werden Elektrolyten der proteinhaltigen Komponente befreit, die den osmotischen Druck zur Isotonie bringen und auf diese Weise gute Bedingungen für das Erhalten der anderen Kugeln schaffen. Je mehr Dotterkugeln in der hypotonischen Lösung vorhanden sind, desto mehr bleiben in unversehrtem Zustande bestehen. Auch muß möglichst schnell der Tropfen der Stammlösung in üblicher Weise auf dem Objektträger montiert, zur mikroskopischen Beobachtung kommen. Unter dem Mikroskope wurden platzende Dotterkugeln im Gesichtsfelde gezählt und mit der Anzahl der unversehrten verglichen. Es wurden 3-4 Stellen eines Tropfens auf diese Weise untersucht.

Das Platzen der gelben Dotterkugeln spielt sich folgendermaßen ab. An irgend einer Stelle der Kugel, meistens in der Nähe des Äquators, erscheint eine kleine Spalte, die nur deshalb sichtbar ist, weil durch sie die Fettkörner in das umgebende Medium herausfließen. Den Schlitz passieren ein oder mehrere Körner auf einmal. Die Art und Weise des Ausfließens der Körner hängt von ihrer Größe und dem osmotischen Drucke der Verdünnungsflüssigkeit ab. Die feinsten staubförmigen Körner verlassen die Kugel rasch und scharenweise (Abb. 7), das Austreten jedes einzelnen gröbereren Kornes läßt sich unter dem Mikroskope genau verfolgen. Man sieht, wie dasselbe vom Verbande mit anderen Körnern sich entfernt und dann langsam fließend die Spalte passiert. Sobald es außerhalb der Kugel auftaucht, beginnt es Brown'sche Bewegungen auszuführen. Wenn die Flüssigkeit stark hypotonisch ist, schießen die Körner weit aus der Kugel heraus und zerstreuen sich schnell im Medium. Falls das Medium nicht stark von der Isotonie abweicht, sammeln sich die Fettkörner in der Nähe der geplatzten Dotterkugel und verbleiben noch minuten-, sogar stundenlang als Anhäufungen stark vibrierender Körner bestehen.

Je mehr Körner sich außerhalb der Dotterkugeln befindet, desto mehr Platz bleibt für die innerhalb derselben eingeschlossenen

zurück. Die Körner, die in der unversehrten Dotterkugel durch die Membran zusammengedrängt bewegungslos verharren, beginnen vibrierende Brown'sche Bewegungen auszuführen. Je mehr Platz sie im Inneren haben, desto heftiger bewegen sie sich. Dies Verhalten der Körner spricht dafür, daß auch im Inneren der Dotterkugeln eine homogene Flüssigkeit vorhanden ist, in welcher die Fetttropfen schweben.

Schließlich verlassen alle oder fast alle Fettkörner die Membran der Dotterkugel, die sich jetzt schließt, so daß die Austrittsstelle spurlos verschwindet. Nur ausnahmsweise läßt sie sich längere Zeit als ein offener Riß feststellen. Die Membran behält die kreisrunden Umrisse. Ob sie kugelförmig ist, konnte durch das Einstellen der Mikrometerschraube nicht sicher entschieden werden, weil ihr Lichtbrechungsindex nicht stark genug von dem des Mediums abweicht. Die körnerlose Membran der Dotterkugel schaut wie ein grauer Fleck aus, der dem Schatten der menschlichen Erythrozyten nicht unähnlich ist. Der Durchmesser des Schattens der Dotterkugel verringert sich binnen weniger Minuten um das vielfache. Schließlich fließt die Dotterkugelmembran zu 3—6 winzigen, an der Grenze der Sichtbarkeit bei 200-maliger Vergrößerung stehenden, Tropfen zusammen. Manchmal verharren die Membranen minuten- sogar stundenlang als große Schatten, doch ist ihr Endschiicksal schließlich das gleiche.

Öfters, besonders in stark hypotonischen Lösungen, platzt die Dotterkugelmembran auf großer Strecke, die sogar die Hälfte des Äquatorumfangs ausmachen kann. In diesem Falle ergießt sich der körnige Inhalt der Dotterkugel in einigen Sekunden durch die geräumige Spalte nach außen. Die Membran schließt sich dann momentan, verringert ihren Durchmesser und fließt in der beschriebenen Weise zusammen.

In schwach hypotonischen Lösungen kommt noch eine andere Art des Austretens des körnigen Inhaltes aus der Membran der Dotterkugel vor, wobei sich die Körner passiv verhalten und die ganze Zeit hindurch in ihrer ursprünglichen Lage in einer Kugel zusammengehäuft bleiben. Die Membran hebt sich an einer Stelle von den Körnern ab (Abb. 8 b, c). Auf der entgegengesetzten Seite der Kugel platzt sie schlituartig und gleitet langsam über die Oberfläche der Körner hinweg. Im mikroskopischen Bilde sieht man dann einen kreisförmigen Haufen von Fettkörnern, die kaum merkbare

Brown'sche Bewegungen ausführen, und an seiner Seite eine leere Dotterkugelmembran. Die Durchmesser der beiden Gebilde gleichen anfangs fast vollkommen einander. Früher oder später weichen in üblicher Weise die Fettkörner auseinander und die Membran fließt zusammen. Es ist ziemlich schwierig, die ersten Stadien dieses Prozesses unter dem Mikroskope aufzufangen, doch lassen sich fast in jedem untersuchten Tropfen der Dotteremulsion einige Schatten der Dotterkugeln aufzufinden, die neben ihren zu einem kreisrunden Haufen zusammengedrängten Körnern liegen. Die Ursache der beschriebenen Vorgänge liegt vielleicht in dem Zustande der homogenen Flüssigkeit der Dotterkugel. Tritt sie während des Experimentierens in eine festere Form über (Gelphase), so kleben die Körner zusammen und sind nicht im Stande Brown'sche Bewegungen auszuführen. Sie können nicht einzeln aus der Membran ausgestoßen werden, deshalb gleitet die Membran über ihre Oberfläche hinweg. Am häufigsten kommt diese Erscheinung in den mit Janusgrün vorbehandelten Emulsionen vor (Abb 8).

Der gelbe Farbstoff des Dotters tritt aus der Kugel an ihrer ganzen Oberfläche aus, er dringt also durch die Membran hindurch und entweicht nicht ausschließlich durch den Schlitz. Besonders deutlich läßt sich dies während der zuletzt beschriebenen Art des Austretens der Fettkörner aus der Membran beobachten. Mehrere Sekunden vor dem Abheben der Membran nimmt das die Kugel umgebende Medium eine gelbliche Färbung an, so daß die Dotterkugel wie in einem schmalen Ring eingeschlossen erscheint. Das dauert jedoch nur eine kurze Zeit, da das Xantophyll sich spurlos für das Auge im flüssigen Medium verteilt. An mit Janusgrün vorbehandelten Dotterkugeln, die sich in ähnlicher Weise enthäuten, läßt sich dieser Prozeß nicht beobachten. In den meisten Fällen jedoch, wenn die Dotterkugel platzt und ihren Inhalt ausfließen läßt, tritt nur am Anfange im raschen Strom der Körner eine gelbliche Farbe auf. Wenn die Dotterkugel mehr als  $\frac{2}{3}$  ihres Inhaltes verloren hat, nimmt sie einen grauen Ton an. Das Verfolgen des Austretens des Xantophylls ist dadurch erschwert, daß auch einzelne Fettkörner eine leicht gelbliche Farbe besitzen. Es gelang deshalb nicht zu entscheiden, ob das Xantophyll an die homogene Flüssigkeit oder an die Fettkörner innerhalb der Dotterkugeln gebunden ist

Der weiße Dotter verhält sich in hypotonischen Lösungen etwas anders als der gelbe aus dem Grunde, weil die Dotterkugel mit Fettkörnern niemals völlig ausgefüllt wird und keinen Farbstoff enthält. Das erste Anzeichen der kommenden Vorgänge bildet das Verhalten der Körner. Sie wandern langsam von der Mitte der Kugel gegen die Peripherie zu, berühren die Membran und zwingen sich durch sie nach außen. Die Membran verschließt sofort den Schlitz spurlos und fließt in üblicher Weise in winzige Körner zusammen. Manchmal spielt sich der ganze Vorgang so rasch ab, daß seine einzelnen Etappen sich der Beobachtung entziehen. Der innerhalb der Kugel vorhandene Fettkorn wird kräftig und weit herausgeschleudert, fast gleichzeitig zieht sich die Membran zu einem kleinen Schatten zusammen. Falls mehrere Körner innerhalb der Kugel sich befinden, bildet sich ein breiter Schlitz, durch welchen die Körner schnell herausströmen. Beide Arten des Platzens kommen in derselben Lösung vor und niemals läßt sich voraussagen, in welcher Weise eine bestimmte Kugel springen wird. Jedenfalls ist der weiße Dotter auf die Wirkung der hypotonischen Lösung etwas weniger empfindlich als der gelbe.

Die in den entodermalen Zellen des gezüchteten Dottersackes eingeschlossenen Dotterkugeln verhalten sich in hypotonischen Lösungen im allgemeinen ähnlich wie die freien. Die geringfügigen Unterschiede lassen sich auf die Einwirkung des Zelleibes zurückführen. Die Dotterkugeln nehmen in den auf dem Deckglase ausgespannten Zellen eine abgeflachte und oft in die Länge ausgezogene Gestalt an. Die Zellen ziehen sich in der hypotonischen Lösung zusammen (auf das Verhalten der Zellen wird nicht näher eingegangen — Grossfeld 1936), gleichzeitig runden sich die Dotterkugeln ab. Ein Teil von ihnen platzt (Abb. 9) und schleudert den körnigen Inhalt in den Zelleib oder direkt in das Kulturmedium aus, der Rest bleibt unversehrt. Das Platzen der Dotterkugelmembran und ihr weiteres Schicksal konnte nicht verfolgt werden, weil der Lichtbrechungsindex des Zellplasmas das Unterscheiden der Membran erschwerte. Die weißen Dotterkugeln kommen in gezüchteten Zellen nur selten vor, es gelang deshalb nicht sie in ähnlichen Bedingungen wie die gelben zu beobachten.

Die beschriebenen Beobachtungen weisen darauf hin, daß an der Oberfläche der Dotterkugeln eine dehnbare, halbflüssige Mem-

bran besteht. Sie zieht sich nach dem Ausstoßen der Fettkörner in einige kaum meßbare Tropfen zusammen. In den hypotonischen Lösungen läßt die Membran das Wasser ins Innere der Kugel bis zu dem Grade hinein, daß sie ausgespannt und zerrissen wird; sie verhindert jedoch das Austreten der Elektrolite und Kolloide, was zum Ausgleiche des osmotischen Druckes zwischen der Dotterkugel und dem Medium führen würde. Sie besitzt also die Eigenschaften einer semipermeablen Membran. Eine weitere Eigenschaft der Membran offenbart sich in der Fähigkeit alle Risse und Schlitze spurlos zu schließen; sie muß also äußerst klebrig sein. Ihre Dicke konnte nicht berechnet werden. Da jedoch nicht alle Kugeln auf einmal in bestimmten hypotonischen Lösungen springen, darf angenommen werden, daß sie nicht auf allen Dotterkugeln die gleiche Spannung besitzt. Vielleicht platzen diejenigen Dotterkugeln, die die dünnste Membran haben, schnell, andere später.

Das Auflösen der Dotterkugeln in hypotonischen Lösungen ähnelt stark der Hämolyse der Blutkörperchen; beim Vergleiche muß man natürlich vom morphologischen Werte beider Gebilde absehen, die ersten sind nämlich geformte Nahrungsvorräte, die anderen selbstständige Zellen. In beiden Fällen wird der Farbstoff, wenn vorhanden, dem Medium abgegeben, die oberflächliche Membran kann platzen und die Schatten treten als Überreste beider Gebilde auf. Da aber die Dotterkugeln keine Zellen sind, darf von einer echten Zytolyse nicht gesprochen werden. Ihr Auflösungsvermögen soll als eine spezifische Abart dieser Erscheinung aufgefaßt und mit dem Namen Lecitholyse belegt werden.

Die Botaniker wissen, daß manche Pflanzenzellen in einer nicht sofort letal wirkenden Alkohollösung versenkt explodieren und ihren Inhalt herausschleudern (Brauner). Diese Erscheinung nennen sie Plasmoptyse. Die Dotterkugeln verhalten sich in entsprechenden hypotonischen Lösungen (Abb. 7, 10) ähnlich, sie speien ihren Inhalt aus. Da es sich in diesem Falle nicht um Zellen sondern um Eidotter handelt, wäre vielleicht die Einführung des Namens Lecithoptyse<sup>1)</sup> für diese Erscheinung begründet.

<sup>1)</sup> λέκιδος = Eidotter, πτύειν = ausspucken.

### Vitalfärbung.

Viele parablastischen Gebilde, die unter der Gestalt von Vakuolen und Granulis in den lebenden Wirbeltierzellen vorkommen, zeigen eine chemische Affinität zu manchen basischen Farbstoffen und nehmen »intra vitam« ihre Farbe an. Es wird angenommen, daß die Vitalfarbstoffe sich in Lipoiden der Zellmembran leicht lösen und deshalb ihren Weg schnell und sicher in das Zellinnere finden. Ihre Verankerung an den geformten Plasmateilen hängt von nicht näher bekannten physiko-chemischen Zuständen der beiden miteinander reagierenden Komponenten ab. Im Körper von beschädigten oder absterbenden Zellen breiten sie sich überall diffus aus. Manche saure Farbstoffe gelangen viel langsamer in die lebenden Zellen und werden in ihnen ständig sogar nach ihrem Tode in niederschlagförmigem Zustande aufbewahrt.

Anlässlich meiner Untersuchungen über das Verhalten des Dottersackes in den Gewebekulturen habe ich festgestellt (1930), daß die in den entodermalen Zellen eingeschlossenen Dotterkugeln sich intensiv mit Neutralrot und Brillantcresylblau färben lassen. Ich habe sie damals den sich ähnlich färbenden Degenerations- und Ausscheidungsvakuolen gleichgestellt und als Speichervakuolen bezeichnet. Auch freie Dotterkugeln lassen sich mit denselben und anderen Farbstoffen färben.

Zu diesem Zwecke wurde ein Tropfen der oben benutzten Dotteremulsion mit einem gleich großen Tropfen eines in Tyrode'scher Flüssigkeit gelösten Farbstoffes direkt auf dem Deckglase gemischt. Oder es wurde ein Tropfen des Farbstoffes auf dem Deckglase dünn ausgebreitet, wobei Sudan III in Alkohollösung zur Verwendung kam (Szantoch). Nach dem Austrocknen des Farbstoffes wurde ein Tropfen des Dotters hinzugefügt. In beiden Fällen wurden frischer Dotter sowie frische und sehr dünne Farbstofflösungen benutzt. Das so angelegte Präparat wurde in üblicher Weise als hängender Tropfen tagelang aufbewahrt und periodisch beobachtet. Als Farbstoffe dienten:

1. aus der basischen Reihe — Neutralrot, Brillantcresylblau, Nilblausulfat, Bismarckbraun, Methylenblau nach Ehrlich und Janusgrün,
2. aus der sauren Reihe — Trypanblau und Trypanrot, und
3. von indifferenten Farbstoffen — Sudan III. Die Versuche wurden wenigstens dreimal und jedesmal mit neuem Material wiederholt.

## Protokollauszug:

### I. Freie Dotterkugeln.

#### Nilblausulfat.

4. V. Weiße Dotterkugeln. Sofort hellblau, der körnige Inhalt blau. Nach 10–15 Minuten werden die Fettkörner dunkelblau bis granatblau. In manchen Dotterkugeln treten in homogener Flüssigkeit neugebildete 2–5 kleine blaue Granula auf, die Brown'sche Bewegungen ausführen. Nach Zugabe von destilliertem Wasser Verhalten wie in hypotonischer Lösung. Die ausgestoßenen Fettkörner verlieren ihre Färbung binnen 10 Minuten. Gleichzeitig mit dem Ausstoßen flockt die homogene Flüssigkeit der Dotterkugel in zahlreiche feine Granula aus, die vorübergehend eine helle graugrüne Farbe annehmen. Schließlich lösen sie sich im umgebenden Medium auf.

Gelbe Dotterkugeln sofort einheitlich hellblau, die Granulierung der Kugel gut sichtbar, nach 10–15 Minuten Verdunkelung der Farbe, was mit dem Verwischen der Granula verbunden ist. Nach Zugabe von Wasser platzen die Kugeln, die ausgestoßenen Fettkörner verbleichen binnen 10 Minuten gänzlich.

Übergangsdotter. Die sogar 24 Stunden dauernde Einwirkung ruft keine Reaktion mit dem Farbstoffe hervor.

#### Brillanteresylblau.

5. V. Weiße Dotterkugeln. Sofort hellblau, der körnige Inhalt violett, mit der Zeit an der Intensität zunehmend (Abb. 12). Nicht jede Kugel nimmt jedoch den Farbstoff auf. Nach Zugabe von Wasser platzen die Kugeln, die ausgestoßenen Fettkörner verbleichen erst nach 5–70 Minuten. Die homogene Flüssigkeit der Dotterkugel breitet sich im Medium spurlos aus.

Gelbe Dotterkugeln. Sofort einheitlich blau, die Granula gut sichtbar, ihre Umrisse verwischen sich sogar nach 48 Stunden nicht. Nach Wasserzugabe ähnliches Verhalten wie der weißen Dotterkugeln. Die Dotterkugelmembran ist stets farblos.

Übergangsdotter. Keine Reaktion mit dem Farbstoffe.

#### Neutralrot.

7. V. Weiße Dotterkugeln. Die Fettkörner innerhalb der Dotterkugeln färben sich intensiv ziegelrot. Die homogene Flüssigkeit nimmt einen hell rötlichen Ton an. In manchen Kugeln treten feine Granula auf, die Brown'sche Bewegungen ausführen (Abb. 11). In manchen Fällen nimmt ihre Zahl allmählich zu, bis sie schließlich dicht nebeneinander zusammengedrängt unbeweglich bleiben. Alle nehmen eine hellrote Farbe auf. Nach Wasserzugabe platzen die Dotterkugeln und ihr Inhalt verbleicht binnen einigen Minuten und die neu gebildeten Granula verschwinden spurlos im Medium.

Gelbe Dotterkugeln. Sofort einheitlich rötlich mit sichtbaren Fettgranula. Nach Wasserzugabe ähnliches Verhalten wie der weißen Dotterkugeln.

Übergangsdotter. Keine Reaktion mit dem Farbstoffe.

**Bismarckbraun.**

9. V. Weiße Dotterkugeln. Werden nach 5 Minuten einheitlich zitronengelb, nach 60 Minuten färbt sich in manchen Kugeln der körnige Inhalt intensiver. Nach Wasserzugabe platzen die Kugeln. Die ausgestoßenen Fettkörner und die Dotterkugelmembran behalten einige Minuten ihre hellgelbe Farbe. Die homogene Flüssigkeit flockt dabei nicht aus.

Gelbe Dotterkugeln. Schon nach 5 Minuten zitronengelb. Die Farbe nimmt später an Intensität zu, die Fettgranula der Kugeln bleiben jedoch immer gut sichtbar. Nach Zugabe des Wassers strömen die gelblichen Fettkörner aus der geplatzen Kugel und verlaufen binnen 2—5 Minuten.

Übergangsdotter. Keine Reaktion mit dem Farbstoffe.

**Methylenblau nach Ehrlich.**

7. V. Weiße Dotterkugeln. Erst nach 30 Minuten nehmen sie eine helle blaugrüne Farbe an. Nach 90 Minuten wird der körnige Inhalt etwas dunkler als der Rest der Kugel. Nach Wasserzugabe platzen die Kugeln. Die ausgestoßenen Fettkörner verbleichen binnen 2—4 Minuten vollständig. Es findet keine Granulierung der homogenen Flüssigkeit statt.

Gelbe Dotterkugeln. Nach 30 Minuten zeigen sie eine blaugrüne Farbe mit gut sichtbaren Fettgranula. Sogar nach 20-stündiger Einwirkung des Farbstoffes kommen ungefärbte Dotterkugeln vor. Nach Wasserzugabe Verhalten wie der weißen Dotterkugeln.

Übergangsdotter. Keine Reaktion mit dem Farbstoffe.

**Janusgrün.**

9. V. Weiße Dotterkugeln. Bleiben noch nach 60 Minuten ungefärbt. Nach 20 Stunden nehmen sie eine einheitlich aschgraue Farbe an, nur in wenigen Kugeln sind die Fettkörner intensiver gefärbt. Nach Zugabe von Wasser (hypotonische Lösung) verbleichen die ausgestoßenen Körner nach 2—5 Minuten. Keine Granula treten in der homogenen Flüssigkeit auf, sie wird jedoch wahrscheinlich in gewissem Grade in eine feste Phase übergeführt (sich Lecitholyse S. 322).

Gelbe Dotterkugeln. Verhalten identisch mit den weißen.

Übergangsdotter. Schon nach 5 Minuten alle Kugeln aschgrau, in den Nischen schimmert noch etwas der rötliche Ton durch. Nach 60 Minuten werden alle einheitlich marineblau. Nach Zugabe von Wasser behalten alle Kugeln ihre Struktur und Färbung stundenlang. Nur einige, vielleicht mehr reife zerfallen in kleine Körner, die optisch den Fettkörnern der gelben Dotterkugeln gleichen.

**Trypanblau.**

10. V. Weiße Dotterkugeln. Nach 2—24 Stunden keine Reaktion mit dem Farbstoffe. Nach Wasserzugabe platzen die Kugeln, ihre Fettkörner werden schon nach 5 Minuten hellblau. Eine sichtbare Veränderung der homogenen Flüssigkeit findet nicht statt.

Gelbe Dotterkugeln. Verhalten identisch wie der weißen.

Übergangsdotter. Binnen 5—10 Minuten werden alle Kugeln lazurblau und behalten diese Farbe nach Wasserzugabe noch nach 48 Stunden.

## Trypanrot.

10. V. Weiße Dotterkugeln. Bleiben noch nach 60 Minuten ungefärbt. Nach Zugabe von Wasser platzt die Membran an einer Stelle und das Austreten der homogenen Flüssigkeit samt dem körnigen Inhalte beginnt. Die Flüssigkeit mischt sich jedoch nicht mit dem Medium, sondern geht in eine festere Phase über. Die neu ausströmenden Teile des Inhaltes unterliegen demselben Schicksale. Infolgedessen bildet sich ein kontinuierliches schmales Band (Abb. 10 b, c), das sich vom Medium infolge seiner schlechteren Durchsichtigkeit gut abhebt und in welchem ein oder mehrere Fettkörner unbeweglich gefesselt sind. Am Ursprunge dieses Bandes haftet die leere Dotterkugelmembran. Der ganze Prozeß spielt sich binnen 2—6 Minuten ab. Die Fettkörner nehmen in einigen Minuten die rötliche Farbe an. In 30—60 Minuten zieht sich die Dotterkugelmembran in beschriebener Weise zu winzigen Tropfen zusammen und die in bandförmiger Gestalt ausgezogene homogene Flüssigkeit der Dotterkugel löst sich spurlos im Medium auf. Die Fettkörner bleiben unverändert und behalten ihre rötliche Farbe ständig.

Falls der osmotische Druck durch Wasserzugabe nicht so stark heruntersetzt wird, platzt die Dotterkugelmembran und die homogene Flüssigkeit tritt in Gestalt eines kleinen Zipfels aus der Dotterkugel heraus (Abb. 10 d). Sie geht sofort in eine feste Phase über und das weitere Ausströmen des Inhaltes hört auf. In dem Zipfel treten feine Granula auf; die Granulierung schreitet schnell gegen das Innere der Dotterkugel fort. Die Fettkörner, die sich innerhalb der geplatzen Membran befinden, färben sich rötlich an.

Gelbe Dotterkugeln. Sie verhalten sich identisch wie die weißen. Sie nehmen in unversehrtem Zustande keine Farbe auf. In stark hypotonischer Lösung bilden sie ähnliche Bänder aus der homogenen Flüssigkeit mit den unbeweglich eingeschalteten kleinen Fettkörnern (Abb. 10 a). In schwächer hypotonisch wirkenden Lösung trachtet der Inhalt der Dotterkugel durch den Schlitz in der Membran auszufließen, aber der gleichzeitig stattfindende Übergang der homogenen Flüssigkeit der Dotterkugel in eine festere Phase sistiert jedes Verschieben des Inhaltes. Die Dotterkugel nimmt eine unregelmäßig ovale (Abb. 10 a) oder biskuitförmige Gestalt an. In 2—4 Minuten beginnen die Fettkörner eine rötliche Farbe anzunehmen, die sie beständig behalten.

Übergangsdotter wird in 2—3 Minuten einheitlich rot und verbleicht nicht nach Zugabe des Wassers.

## Sudan III.

15. V. Weiße Dotterkugeln. Sie werden erst nach 20 Minuten zitronengelb; in den folgenden Stunden nimmt die Farbe an Intensität zu. Nach 3-tägigen Einwirkung von diesem Farbstoffe färben sich die meisten Körner innerhalb der Kugel zitronengelb. Nach Zugabe des Wassers platzt die Kugel; die ausgestoßenen Fettkörner nehmen, falls sie noch farblos sind, in 5 Minuten die gelbe Farbe an und behalten sie ständig. Die Dotterkugelmembran weist vorübergehend einen gelblichen Ton auf. In der homo-

genen Flüssigkeit mancher Dotterkugeln treten während dieser Vorgänge Granula auf.

Gelbe Dotterkugeln. Verhalten identisch mit den weißen. Das Erwärmen der Präparate auf  $+[60-70]^{\circ}\text{C}$  ruft ein intensiveres Färben beider Dotterarten.

Übergangsdotter. Erst nach 3-tägigen Einwirkung von Sudan tritt eine hell gelbliche Farbe in dieser Dotterart auf. In den auf  $+[60-70]^{\circ}\text{C}$  erwärmten Präparaten nehmen sie schon nach 20 Minuten die hellgelbliche Farbe an.

## II. Die in den entodermalen Zellen eingeschlossenen Dotterkugeln.

Die Dotterkugeln, die in Gewebekulturen des Dottersackes zum Vorschein gebracht werden, reagieren ähnlich auf die Vitalfarben wie die freien. Da jedoch die weißen Dotterkugeln nur selten in diesen Bedingungen vorkommen und der Übergangsdotter innerhalb der Zellen nicht festgestellt wurde, beschränken sich diese Beobachtungen auf die gelben Dotterkugeln. Die letzteren nehmen innerhalb der unversehrten Zellen diejenigen Farbstoffe auf, die die freien Dotterkugeln rasch färben; es kommen also Nilblausulfat, Brillanteresylblau, Neutralrot, Bismarckbraun und Sudan III in Betracht. Die basischen Farbstoffe verleihen den Dotterkugeln in Gewebekulturen im allgemeinen dieselben Farben wie den freien. In vielen Kugeln treten jedoch dunklere und grellere Flecke auf, die vielleicht mit den stattfindenden Verdauungsprozessen im Zusammenhange stehen. Die saueren Farbstoffe (Trypanblau und Trypanrot) und Methylenblau dringen weder in iso- noch in hypotonischen Kulturmedien in die innerhalb der Zellen sich befindende nicht anverdaute Dotterkugeln. Janusgrün färbt die Kugeln nach dem Absterben der Zellen binnen 4—7 Stunden. Die Zugabe von Wasser zum Kulturmedium ruft durch Herabsetzen des osmotischen Druckes große Veränderungen in den Zellen hervor, die hier nicht besprochen werden (s. Grossfeld 1937). Die in den Zellen eingeschlossenen Dotterkugeln runden sich ab, manche platzen und ergießen ihren Inhalt samt dem Farbstoff in das Medium oder in den Zelleib. Alle nicht vernichteten verbleichen nach gewisser Zeit (20—240 Minuten).

Aus den Auszügen des Protokolls ergibt sich eine große Mannigfaltigkeit der Reaktion, welche die verschiedenen Farbstoffe mit den Komponenten der Dotterkugeln eingehen. Auch die Art der Dotterkugeln spielt dabei eine gewisse Rolle, jedenfalls läßt sich das Verhalten des Übergangsdotters dem der beiden anderen Arten scharf gegenüberstellen.

Die unversehrte Membran der weißen und gelben Dotterkugeln bildet für manche angewandten Farbstoffe ein absolut unüberwindliches Hindernis; das gilt für die beiden saueren Farbstoffe Trypanblau und Trypanrot. Janusgrün, ein basischer Farb-

stoff und Sudan III, ein indifferenten Farbstoff vermögen erst nach längerer Einwirkung ins Innere der Dotterkugel einzudringen. Dabei läßt sich optisch keine Beschädigung der Membran feststellen. Der Rest der untersuchten basischen Farbstoffe passiert mit größter Leichtigkeit die Dotterkugelmembran, nur dem Methylenblau gelingt das etwas schwieriger. Von den Farbstoffen, die die Membran passieren, bleibt nur Sudan III und Bismarckbraun in ihr in geringer Menge verankert und zwar wahrscheinlich in den sie zusammensetzenden Lipoiden gelöst.

Die andere Komponente der unversehrten Dotterkugeln — die homogene Flüssigkeit — kann nur mit denjenigen Farbstoffen reagieren, die in das Innere einzudringen im Stande sind. Alle basischen Farbstoffe verleihen ihr den eigenen Farbton, der bei längerer Einwirkungsdauer und stärkerer Konzentration der färbenden Lösung an Intensität zunimmt. Diese Verbindung des Farbstoffes und der homogenen Flüssigkeit ist nur im Inneren der frischen Dotterkugel haltbar. Falls die Flüssigkeit aus der Kugel austritt oder mit einem histologischen Fixierungsmittel gefällt wird, verbleicht sie binnen kurzer Zeit.

Manche Farbstoffe wie Nilblausulfat und besonders Neutralrot flocken, in entsprechender Konzentration angewandt, homogene Flüssigkeit in Form von kleinen intensiv gefärbten Granula aus (Abb. 11). Diese Beobachtung wirft ein klares Licht auf das strittige Problem über die Gebilde, die mit basischen Vitalfarbstoffen reagieren, nämlich ob sie präformiert oder induziert sind. In unserem Falle ist die Vakuole der Dotterkugel präformiert, aber es können in ihr Granula induziert werden. Die homogene Flüssigkeit wird bei direkter Berührung mit Trypanrot, was nach Beschädigung der Dotterkugelmembran geschieht, in eine festere Phase versetzt (Abb. 10). Das äußert sich in der Bildung von langen Bänden, in welchen die Fetttropfen bewegungslos verharren. Janusgrün übt einen ähnlichen, obzwar quantitativ viel schwächeren Einfluß auf die in der geschlossenen Dotterkugel vorhandene Flüssigkeit aus. Es wird dies aus der Enthäutungsweise der Dotterkugel und aus dem Unterdrücken der Brown'schen Bewegung der Fetttropfen ersichtlich (Abb. 8).

Alle angewandten Farbstoffe tingieren den körnigen Inhalt der Dotterkugeln, wobei sich jedoch große Unterschiede feststellen lassen. Sudan III, Trypanrot und Trypanblau verleihen

ihnen ihre charakteristische Farbe, die konstant sogar außerhalb der Dotterkugelmembran bestehen bleibt. Jedoch nur Sudan III ist im Stande, sich in den innerhalb der unversehrten Kugeln enthaltenen Fettkörnern zu lösen, die zwei anderen sauren Farbstoffe tingieren die Körner erst nach Beschädigung der Membran. Neutralrot, Nilblausulfat, Brillanteresylblau und Bismarckbraun färben sie recht schnell, Methylenblau und Janusgrün erst nach längerer Einwirkung. Dies steht mit der Geschwindigkeit, mit welcher verschiedene Farbstoffe die Dotterkugelmembran passieren, im Zusammenhange. Die Verankerung der letzt aufgezählten Farbstoffe an den Fettkörnern ist nur innerhalb der unbeschädigten Dotterkugeln beständig. In fixierten oder durch Einwirkung der hypotonischen Lösungen zum Platzen gebrachten Dotterkugeln verbleichen die Fettkörner gänzlich. Die basischen Farbstoffe gehen also mit den Fettkörnern in eine labile Verbindung ein.

Daß die Fettkörner auf die basischen Farbstoffe reagieren, ließe sich mit der Annahme erklären, daß dieselben an ihrer Oberfläche mit einer feinen Proteinschicht umgeben sind. Chambers und Ludford konnten nämlich die Anwesenheit einer solchen an der Oberfläche der Fetttropfen in lebenden Zellen mittelst des Mikromanipulators aufweisen. Die basischen Farbstoffe würden also in eine labile Verbindung mit der Proteinhülle der Fettkörner treten, die außerhalb der Dotterkugel abgegeben wird. Der unversehrte Zustand der Dotterkugel ist für das Zustandekommen dieser Färbung eine grundsätzliche Vorbedingung, was sich in Gewebekulturen feststellen läßt. Falls eine lebende Zelle eine Dotterkugel und im Plasma zerstreute Fetttropfen besitzt, tingieren die basischen Farbstoffe nur den körnigen Inhalt der Dotterkugel, die im Zellplasma zerstreuten Fetttropfen, obwohl sie eine proteinhaltige Hülle besitzen, bleiben farblos.

Der Übergangsdotter färbt sich rasch und intensiv mit Janusgrün, Trypanblau und Trypanrot, mit einer Verzögerung mit Sudan III. Diese Verbindungen sind dauerhaft, sie werden sogar nach einem 4-tägigen Aufenthalte in hypotonischer Lösung nicht aufgegeben. Die Affinität zum Janusgrün stellt den Übergangsdotter den Mitochondrien zur Seite. Derselbe kann auch aus »lipoides phosphorés« bestehen, die mit mitochondrialen Färbe-

mitteln reagieren (Mayer, Rathery & Schaeffer). Sein Verhalten dem Trypanblau und Trypanrot gegenüber weist auf eine fetthaltige Natur hin. Das Fett muß jedoch in einem speziellen Zustande auftreten, wenn es sich mit Sudan III so langsam und so schwach färbt. Die Sudanfärbung ist ein physikalischer und kein chemischer Vorgang, der Farbstoff löst sich im Fett auf. Die Substanz des Übergangsdotters ist sehr zäheflüssig, deshalb spielt sich der Lösungsprozeß sehr langsam ab, er kann jedoch durch die Erhöhung der Temperatur der untersuchten Proben auf  $+ [60-70]^{\circ}\text{C}$  beschleunigt werden. Auch die Beobachtungen dieser Dotterart im Dunkelfelde des Zeiss'schen Epikondensors sprechen für seinen fettartigen Charakter.

### **Einwirkung von Joddämpfen.**

Jod wird in den chemischen Untersuchungen des Fettes zur Bestimmung der s. g. Jodzahlen des Fettes gebraucht. Dasselbe flockt auch die Eiweißkörper aus und denaturiert die großen Eiweißmoleküle. In den Untersuchungen wurde ein Bruchteil eines Jodkristalls auf den Boden des Ausschliffes des Objektträgers gelegt und vermittelst des Deckglases hermetisch zugedeckt. Auf diese Weise gelangte der am Deckglase hängende Tropfen der Dotteremulsion in eine geschlossene Kammer, in welcher sich die Joddämpfe allmählich konzentrierten.

Die Kugeln des weißen Dotters, die nur einen großen Fetttropfen enthalten, zeigen unter dem Einfluße der Joddämpfe charakteristische Umwandlungen. Zuerst reagiert der große Fetttropfen, der sich in der Kugel befindet. Er nimmt eine grelle, gelbe Farbe an, die in 20–30 Minuten in eine rötlichbraune, an Dunkelheit stets zunehmende übergeht. Fast gleichzeitig treten in der homogenen Flüssigkeit, die die Dotterkugel ausfüllt, unregelmäßige feine Flocken auf (Abb. 14 a). Sie verflechten sich miteinander zu einer Art dichten Filzes und nehmen eine gelbliche Färbung an. Es kommt also zur Koagulation der proteinhaltigen Bestandteile der Kugel.

Ungefähr nach 30 Minuten der Einwirkung der Joddämpfe beginnt die Membran der Dotterkugel sich ausdehnen. Sie hebt sich allmählich von dem Filzbelag der Kugel ab (Abb. 14 b). In dem Raume, welcher sich zwischen beiden Komponenten der Dotterkugel ausbreitet, kommen keine Granula vor, so daß derselbe mit dem Mikroskope betrachtet leer erscheint. Diese Eigen-

tümlichkeit springt um so stärker in die Augen, da auch außerhalb der Membran viele Granula im flüssigen Medium vorhanden sind. Dieser Zustand dauert 20—40 Minuten; die Membran wird immer schwächer sichtbar, der durch Granula nicht eingenommene Raum dehnt sich weiter aus. Die Oberfläche der ausgedehnten Membran übertrifft mehr als um das zweifache die ursprünglichen Ausmaße. Schließlich verschwindet die Membran, die dem Medium angehörenden Granula füllen den optisch leeren Raum aus. Das spielt sich langsam und ohne jede Erschütterung ab; wäre der erwähnte Raum wirklich leer, so müßte das Schwinden der Membran heftige zentripetale Strömungen verursachen. Der optisch leere Raum wurde wahrscheinlich von einer proteinlosen Flüssigkeit ausgefüllt, die nicht koagulierte und die vom Medium hineindiffundierte.

Das verfälschte Koagulat der Dotterkugel lockert sich nach Verschwinden der Membran teilweise (Abb. 14 c) und seine ursprünglichen, der ehemaligen Dotterkugel entsprechenden Umriss schwinden. Irgend welche weiteren Veränderungen ließen sich während 12 Stunden der weiteren Einwirkung der Joddämpfe nicht feststellen, nur die Farbe aller Bestandteile der Dotterkugel wurde dunkler.

Ganz anders verhalten sich die Kugeln des gelben Dotters. Sie nehmen sehr schnell eine grelle gelbe Farbe an, die allmählich in eine rötlichbraune und schließlich in eine schwarze übergeht. Gleichzeitig mit dem Dunkelwerden der Dotterkugel treten auf ihrer ganzen Oberfläche kleine runde Tropfen auf, die ihr mit eigener Grenzfläche ansitzen (Abb. 13 b, c). Die Farbe dieser Tropfen ist immer greller als die der Dotterkugel selbst. Die Tropfen brechen dabei das Licht stark, was sie noch mehr von der matten Dotterkugel abhebt. Der ganze Prozeß spielt sich in 30—60 Minuten ab. Nach Zugabe von Dioxan im Überschuß, der ein ausgezeichnetes Fettlösungsmittel ist, verflüssigen sich die Tropfen und verschwinden. Die Dotterkugel selbst bleibt dagegen unverändert. Die Tropfen bestehen also aus Fett, das aus der Dotterkugel durch die Einwirkung von Jod ausgeschwitzt wird; die koagulierten Proteine bilden die Masse der Kugel.

Die weißen Dotterkugeln, die mehrere Fettkörner enthalten, nehmen in ihrer Reaktionsweise mit Joddämpfen eine Mittelstellung ein. Einerseits koaguliert die homogene Flüssigkeit und

große Fetttropfen bleiben im Inneren der Dotterkugeln, andererseits treten winzige Fetttropfen auf die Oberfläche der Kugeln und die Membran hebt sich nicht von dem Koagulat ab (Abb. 13 a).

Der Übergangsdotter wird unter Einwirkung von Joddämpfen gelblich, seine Nischen schimmern jedoch rötlich durch. Nach mehreren Stunden wird er gänzlich rötlichbraun. Dabei verändert sich seine Viskosität nicht; Schütteln und Klopfen des Objektträgers führt nicht zu seiner Abrundung.

Die Dotterkugeln und das Medium nehmen allmählich unter Einwirkung der Joddämpfe eine gelbliche ins braune übergehende Farbe an, so daß schließlich das ganze Präparat undurchsichtig wird. Ammoniakdämpfe binden das die Färbung verursachende Jod und lassen das Präparat abbleichen; es kann also bei entsprechend langer Einwirkung der Ammoniakdämpfe das Medium ganz aufgehellt und die Dotterkugeln abgedeckt werden. Auf diese Weise werden sie für die mikroskopische Beobachtung zugänglich gemacht.

In Kulturen des Dottersackes sind die gelben Dotterkugeln gut sichtbar. Unter der Einwirkung der Joddämpfe nehmen nach 2—3 Minuten alle Fetttropfen des Protoplasmas sowie die Dotterkugeln eine gelblichbraune Farbe an, etwas später geschieht das mit dem Zellplasma. Die in den Dotterkugeln enthaltenen Fetttropfen fließen allmählich in 10—30 Minuten in einen großen Tropfen zusammen (Abb. 15).

Die Joddämpfe üben also einen mannigfaltigen Einfluß auf die freien und in den Zellen eingeschlossenen Dotterkugeln aus. Sie flocken die homogene, proteinhaltige Flüssigkeit der Dotterkugel aus und verflüssigen sowie schwitzen in manchen Fällen die Fetttropfen aus. Die letzteren Erscheinungen lassen sich vielleicht auf die Reaktion der Joddämpfe mit dem Eiweiß zurückführen. Jod denaturiert die großen Eiweißmoleküle und macht das Eiweißmaterial porös. Gleichzeitig vernichtet es den eiweißhaltigen Film auf der Oberfläche der Fetttropfen, was zur beträchtlichen Erhöhung der Oberflächenspannung führt. Die beiden erwähnten Momente bedingen das Zusammenfließen und Austreten des fetthaltigen Inhaltes aus den Dotterkugeln.

Die Unterschiede in der Reaktionsweise der freien und in der Zelle geschlossenen gelben Dotterkugeln lassen sich vielleicht damit erklären, daß in der entodermalen Zelle beim Koagulieren des Zellplasmas ein genau durch die Dotterkugelmembran um-

schriebener Raum für die Dotterkugel zurückgelassen wird. Innerhalb dieses Raumes fließen die Fetttropfen unbehindert zusammen und die proteinhaltige Flüssigkeit nimmt eine periphere Lage ein. Bei den freien Dotterkugeln bleibt die Wirkung des Zelleibes aus und die Fetttropfen können auf ihre Oberfläche gelangen.

Die Membran der freien, einkörnigen, weißen Dotterkugeln dehnt sich beträchtlich aus, die der gelben bleibt an der ursprünglichen Stelle bestehen, weil die ausgepressten Fetttropfen sie an dem proteinhaltigen Koagulat der Dotterkugel festhalten. Die Fetttropfen, die in den weißen, vielkörnigen Dotterkugeln auf ihrer Oberfläche auftreten, verhindern auch bei ihnen das Ausdehnen der Dotterkugelmembran.

### Einwirkung von Dioxan.

Dioxan (Diäthylendioxyd) wurde in die histologische Technik unlängst als ein gutes Entwässerungsmittel eingeführt (Graupner & Weissberger), nachher fand es auch als Fixierungsmittel Anwendung (Szarski). Es ist auch ein ausgezeichnetes Lösungsmittel für verschiedene Fette und Fettfarbstoffe. Diese vielseitige Wirkung des Dioxans untersuchte ich auch an den Dotterkugeln. Es wurde entweder eine käufliche Stammlösung oder eine mit Tyrode'scher Flüssigkeit verdünnte tropfenweise dem frischen Präparate auf dem Deckglase zugegeben und die Reaktion sofort unter dem Mikroskope verfolgt. Eine Zugabe von Sudan III zum Dioxan ließ ohne jeden Zweifel die fettige Natur der mit demselben reagierenden Gebilde feststellen.

Ein Teil der weißen Dotterkugeln platzt schnell unter Einwirkung des Dioxans. Die homogene Flüssigkeit mischt sich ohne weiteres mit dem Medium, der körnige Inhalt bleibt unversehrt und nimmt die rötliche Farbe von Sudan III an. Der Rest dieser Dotterkugeln widersetzt sich einige Zeit der Dioxanwirkung und verankert die rötliche Farbe von Sudan III in der Membran, läßt sie jedoch nicht ins Innere hinein. Schließlich platzen alle, manche erst nach 10—12 Stunden, und ihre Membranen ziehen sich zu winzigen Körnern zusammen, die jedoch die rötliche Farbe längere Zeit aufweisen. Dioxan löst also die Membran der weißen Dotterkugeln auf und Sudan III verleiht ihr seine Farbe.

In den gelben Dotterkugeln treten unter der Einwirkung der Stammlösung von Dioxan die Fetttropfen auf ihrer Oberfläche hervor (Abb. 16). Meistens sitzen sie dicht nebeneinander

auf der ganzen Oberfläche der Dotterkugel. Sie besitzen die Gestalt kleiner Kolben, die mit ihrem Halse in der Dotterkugel stecken und mit ihrem geschwellten Leibe nach außen ragen. Oft bildet das Fett einen oder zwei große Tropfen (Abb. 16), die mit der Dotterkugel zusammenhängen. In diesem Falle sind sie kugelrund und stecken mit ihrer Grenzfläche tief in der Dotterkugel. Das in Dioxan gelöste Sudan III verleiht den Fetttropfen eine grellrote Färbung, der proteinhaltige Rest des Dotters bleibt schmutzig grau. Die Einwirkung von Dioxan auf den körnigen Inhalt dieser Dotterkugeln ähnelt der von Joddämpfen.

Anders reagieren die gelben Dotterkugeln, wenn sie mit 10—15-mal verdünntem Dioxan behandelt werden. Die Dotterkugeln koagulieren unter Einwirkung solcher Lösung, auf ihrer Oberfläche treten jedoch keine Fetttropfen auf (Abb. 18 b). Ähnliches läßt sich feststellen, wenn die Dotterkugeln mit irgendeinem Fixierungsmittel z. B. Perényj'schen Flüssigkeit koaguliert und nachher mit unverdünntem Dioxan behandelt werden (Abb. 18 a).

Der Übergangsdotter scheint mit Dioxan nicht zu reagieren.

Parallele Versuche mit Dotterkugeln, die in kultivierten Dottersackzellen gut sichtbar sind, ergaben große Unterschiede im Vergleich mit denen, die mit freien Dotterkugeln erzielt waren.

Die einkörnigen, weißen Dotterkugeln weisen verhältnismäßig kleine Veränderungen bei diesen Untersuchungen auf. Es koaguliert nur ihre homogene, proteinhaltige Flüssigkeit. Die Umrisse der Dotterkugel sowie die im Inneren enthaltenen Fettkörner bleiben unverändert (Abb. 20). Die letzteren lösen sich sogar nicht in im Überschuß angewandtem Dioxan, was sie vom Verhalten der Fetttropfen des Zellplasmas unterscheidet, die spurlos ausgewaschen werden.

Die Körner der gelben Dotterkugeln fließen unter der Einwirkung von Dioxan sehr schnell zusammen (Abb. 20) und bilden einen großen unregelmäßigen Fettklumpen, der oft in der Mitte ein Loch aufweist und dessen Ausmaße kleiner als die der ursprünglichen Dotterkugel sind. Kräftiges Schütteln der Präparate führt nicht zur Abrundung des Fettklumpens. Wenn die angewandte Menge des Dioxans um das 2—3-fache den Umfang der Kultur samt Nährboden übertrifft, springen die frisch zusammengeflossenen Fetttropfen aus der Zelle heraus und fallen in die

die Kultur umgebende Flüssigkeit. Auch andere Fettinkclusionen der Zellen werden gleichzeitig ausgewaschen.

Wird die Kultur mit Perényj'scher Flüssigkeit fixiert und erst nachher mit Dioxan behandelt, so fließt der körnige Inhalt der Dotterkugel zusammen (Abb. 19) und bildet einen regelmäßig abgerundeten Tropfen. Falls mehrere Tropfen sich bilden oder unregelmäßige Umrisse haben, es genügt ein schwaches Schütteln des Präparates, um sie zu einem abgerundeten Tropfen zu vereinigen. Die ursprünglichen Umrisse der Dotterkugel färben sich sehr leicht mit Sudan III und heben sich dadurch von dem umgebenden Zellplasma ab. Vielleicht wird der Farbstoff durch die Dotterkugelmembran aufgenommen.

Diese Experimente deuten darauf hin, daß Dioxan den körnigen Inhalt der Dotterkugeln verflüssigt und gleichzeitig mit Sudan III färbt. Dioxan führt auch zum Verschmelzen der winzigen Körnern in größere Fetttropfen. Gleichzeitig koaguliert es die homogene proteinhaltige Flüssigkeit der Dotterkugel. Falls diese Prozesse, die Verflüssigung des Fettes und das Koagulieren der Proteine sich gleichzeitig und entsprechend schnell abspielen, treten auch die Fetttropfen auf der Oberfläche der Dotterkugel auf. Koagulieren die Proteine langsam oder zeitlich früher, was durch Einwirkung der üblichen Fixierungsmittel oder des verdünnten Dioxans erzielt wird, so bleibt das Austreten der Fettkörner auf der Oberfläche der Dotterkugel aus. Ähnliches läßt sich durch die Einwirkung von Sublimatlösung erzielen. In verdünntem Zustande koaguliert es nur Proteine, die gesättigte Lösung führt zum Austreten von kleinen Fetttropfen auf der Oberfläche der gelben Dotterkugeln (Abb. 6 a). Auch Virchow erzielte ähnliche Bilder beim Behandeln des Dotters mit starkem Alkohol.

Das Zusammenfließen und Austreten der Fetttropfen unter Einwirkung von Dioxan und Sublimat läßt sich ähnlich wie bei Jodbehandlung auf die chemischen Veränderungen des Eiweißes und der damit verbundenen Erhöhung der Oberflächenspannung der Fetttropfen zurückführen. Die Wirkung von Dioxan wird noch dadurch verstärkt, daß dieses Reagens sich in den Fetttropfen löst und sie verflüssigt. Die auf der Oberfläche der Dotterkugeln nach Behandlung mit Dioxan auftretenden Fetttropfen sind deshalb viel größer als die durch Jod- oder Sublimatwirkung hervorgerufenen.

Da Dioxan alle Tiergewebe gründlich entwässert, könnten die damit verbundenen Veränderungen des Volumens der Dotterkugel für die beschriebene Erscheinung verantwortlich gemacht werden. Gegen diese Annahme spricht folgendes Experiment. Die molare Lösung von NaCl wirkt auf die Dotterkugeln als eine stark hypertonische Flüssigkeit, indem sie ihnen Wasser entzieht. Dabei kann sich auch ihre kugelige Gestalt in eine mehr oder weniger spindelförmige verändern. Die Behandlung solcher entwässerter Dotterkugel mit ungelöstem Dioxan ruft das Austreten von Fetttropfen auf ihrer Oberfläche (Abb. 17) hervor. Dieselben unterscheiden sich aber von denen, die auf normalen Dotterkugeln erscheinen durch ihre Gestalt, sie sind nämlich kugelrund (die anderen waren kolbenförmig) und sitzen den Dotterkugeln mit ihrer Oberfläche nur lose auf.

#### Einwirkung von Ätherdämpfen.

Ein kleiner Tropfen von Äther (*Aether sulfuricus*) wird in die Luftkammer zwischen Deckglas und Objektträger gebracht. Die Ätherdämpfe, die sich in ihr sammeln, wirken direkt auf die Dotterkugeln, die vom Objektträger herunterhängen.

Die weißen Dotterkugeln platzen und schleudern ihren Inhalt heraus. Die zurückgebliebene Membran schließt sich zusammen und bildet einen Schatten, der schnell in beschriebener Weise schwindet. Nur in einer geringen Anzahl der Dotterkugeln fließt der körnige Inhalt langsam heraus, anstatt herausgeschleudert zu werden.

Die Kugeln des gelben Dotters platzen an einer schmalen Stelle (Abb. 21 a). Von dort schreitet die Schlitzbildung in beiden Richtungen fort, bis ein Kreis im Äquator umschrieben und in sich geschlossen wird. Gleichzeitig flacht sich die Kugel an der gesprungenen Stelle ab. Die Dotterkugelmembran zieht sich zu einem winzigen grauen Fleck und schwindet im flüssigen Medium unterhalb des körnigen Inhaltes der Dotterkugel. Die Körner hängen eine Weile zusammen, den ursprünglichen abgerundeten Platz der Dotterkugel einnehmend (Abb. 21 b). Nachher strömen sie rasch auseinander und zerstreuen sich im Medium (Abb. 21 c).

Von der Größe des Äthertropfens hängt es ab, wie lange dieser Prozeß währt und wie viel Kugeln ihm unterliegen. Es dauert 2—4 Minuten bis die ersten Tropfen zu platzen beginnen,

die letzten tun das erst ungefähr nach 10—14 Minuten. Die Schlitzbildung in der Dotterkugelmembran nimmt 3—10 Sekunden in Anspruch und in 1—3 Minuten sind die Körner vollständig zerstreut.

Die feinkörnige Kugel des gelben Dotters reagiert in Gewebekulturen auf die Einwirkung der Ätherdämpfe später als die Fetttropfen des Plasmas, die schon nach 2 Minuten zusammenzufließen anfangen. Erst nach 3—5 Minuten schwindet die Dotterkugelmembran (Abb. 22), was sich durch die Umwandlung der glatten Umrisse in ausgefranzte äußert. Die Fettkörner fließen allmählich in immer größere Fetttropfen zusammen und in 20—30 Minuten bildet sich an Stelle der Dotterkugel ein großer oder einige kleinere Tropfen. Das Verhalten der Zellen selbst in diesen Experimenten wurde nicht näher studiert (siehe Rosenfeld).

Ätherdämpfe tragen also zur Vernichtung der Dotterkugelmembranen bei und ermöglichen das Zusammenfließen der Fettkörner oder ihr Auseinanderweichen, je nachdem sie auf die freie oder in Zellen eingeschlossene Dotterkugeln wirken. Das Auftreten der Fetttropfen auf der Oberfläche der freien, gelben Dotterkugeln bleibt aus, weil Äther die Kugelmembran noch vor der Einleitung der chemo-physischen Vorgänge innerhalb derselben vernichtet.

#### Diskussion.

Reichert berichtet in seinen gründlichen Untersuchungen, daß der Dotter des Hühnereies aus mannigfaltigen Kugeln besteht, die eine verschiedene Zahl von Körner enthalten, deren Größe auch recht variabel ist. Dem Aussehen nach ähneln die meisten Körner den Fetttropfen. Eine Membran bedeckt die Oberfläche der Kugel. Durch mechanische Eingriffe kann sie zum Platzen gebracht werden. Die Anwesenheit dieser Membran, welche ehemals als der wichtigste Bestandteil der Zelle betrachtet wurde, führte ihn zu der irrümlichen Meinung, daß die Dotterkugeln Zellen seien. Er glaubte auch in manchen Kugeln Zellkerne zu sehen. Ähnlicher Anschauung waren Coste und His. Aber durch die Untersuchungen von Leukart, Remak, Thomson, Kölliker, Virchow, Balfour und anderen wurde festgestellt, daß die weißen Dotterkugeln keine Zellen, sondern unbelebte hochorganisierte Gebilde sind. In den letzten Jahren verfechten wiederum Lepeschinskaja und Scheinis in wenig über-

zeugender Weise die Ansicht, daß die weißen Dotterkugeln sich in Zellen umwandeln können.

Zur Beurteilung des Wertes ihrer Ergebnisse mögen folgende Bemerkungen genügen: 1. Lepeschinskaja scheint nicht zu wissen, wie die weißen Dotterkugeln, die sich in Zellen umwandeln sollen, ausschauen. Das, was sie abbildet und beschreibt, ist der „Schatten“ der gelben Dotterkugel. 2. Die Granula der nicht fixierten Dotterkugel fließen zusammen und bilden den Kern; wie das chemisch möglich ist, bleibt unerklärt, zumal da die Granula Fetttropfen sind. 3. Die amöboiden Bewegungen der weißen Dotterkugeln (Abb. B. 1—10, 1936) sollen letztere von den gelben unterscheiden. (Identische und noch viel stärkere Bewegungen der Membran aller Dotterkugeln erzielte ich durch Einwirkung einer stark hypertonischen NaCl Lösung. Auch in normaler Emulsion wurden öfters ähnliche Bewegungen beobachtet). Diese Erscheinungen gehören in die Reihe der Myelinfiguren und haben mit „Plasmabewegungen“ nichts gemeinsames. 4. Die Abbildungen, die auf Grund photographischer Aufnahmen hergestellt sind, sind nicht überzeugend. Die Skizze (Abb. 25, Seite 67, 1936) stellt zwei Zellen in der Telophase dar. Die dazu gehörende Photographie (25 a, Seite 67, 1936) stellt zwei sich dicht anliegende gelbe Dotterkugeln dar. Von mitotischen Figuren ist nichts zu sehen. Ähnliches gilt für die Photos 4 und 5, Tafel 6, 1937.

Es wurden von den erwähnten Autoren mit Recht zwei Dotterarten unterschieden, nämlich der weiße und der gelbe, denen jetzt noch der Übergangsdotter hinzugefügt wird. Die wichtigsten morphologischen Komponenten der zwei ersten Dotterarten sind: die homogene eiweißhaltige Flüssigkeit, die sie umgebende Membran und die in ihr schwebenden Fettkugeln.

Die Dotterkugelmembran wurde außer von Reichert noch von Coste, His, Virchow und Schenk beobachtet. Sie stellen ihre Anwesenheit fest, beschäftigen sich aber mit ihren Eigenschaften nicht. Die vorliegenden Untersuchungen weisen auf das analoge Verhalten dieser Membran in verschiedenen experimentellen Zuständen mit dem der Zellmembran hin. Die Anschauungen über die Struktur der Zellmembran könnten also vielleicht auch auf die Dotterkugelmembran angewandt werden. Beim Aufstellen jeder Theorie über den Bau der Zellhaut müssen jedoch einige allgemeine Beobachtungen berücksichtigt werden, nämlich daß sie eine halbdurchlässige Membran ist und daß die Eintrittsgeschwindigkeit verschiedener Substanzen in das Zellinnere durch ihre Lipoidlöslichkeit und ihr Molekularvolumen bedingt sind. Nach langjährigen Forschungen und Diskussionen

kommt man jetzt zu der Überzeugung, daß die tierische Zellmembran aus einem dünnen vielleicht aus einem monomolekularen Lipoidfilm besteht, welchem Eiweißmoleküle beigemischt sind. Dabei ist die Frage noch offen, ob die beiden Komponenten in einer Schichte auf der Zelloberfläche ausgebreitet sind oder ob sie separate sich anliegende Filme bilden. Fraglich ist weiter, ob die Zellhaut einheitlich oder porös ist (Wilbrandt, Lepeschkin, Sławiński).

Die Dotterkugelmembran verhält sich wie eine halbdurchlässige Membran. Sie gestattet das Eintreten von Wasser und mancher basischen vitalen Farbstoffe in das Innere der Dotterkugel, hält jedoch die angewandten saueren Farbstoffe auf. Das Verhalten der basischen Farbstoffe beweist, daß in der Membran Lipoide anwesend sind, in denen sie sich leicht lösen und schnell in das Innere der Dotterkugel eindringen. Dasselbe ist auch aus der Wirkung des Äthers ersichtlich, dessen Dämpfe Lipoide auflösen und auf diese Weise die Dotterkugelmembran zerstören. Der ausgesprochene Fettfarbstoff, das Sudan III, färbt sie in unversehrtem Zustande auch etwas an. Die vorliegenden Untersuchungen liefern keine Beweise, daß in der Membran Eiweißmoleküle an- oder abwesend sind.

Es wird angegeben, daß die Zellmembran  $33 \text{ \AA}$  beträgt, was der Länge des höheren Fettsäuremoleküls entspricht (Fricke aus Wilbrandt). Das Experiment mit Joddämpfen scheint darauf hinzuweisen, daß die Dotterkugelmembran aus mehreren Schichten von Molekülen besteht. Sie dehnt sich nämlich so stark aus, daß ihre ursprüngliche Oberfläche sich mehr als um das zweifache vergrößert. Auch bei Beobachtung der platzenden Membranen unter dem gewöhnlichen Lichtmikroskop hat man den Eindruck, daß ihre Dicke wahrnehmbar, obzwar direkt schwer meßbar ist.

Weitere Eigenschaften, die die Dotterkugelmembran charakterisieren und die auch der tierischen Zellhaut eigen sind, bilden Elastizität, Steifheit, Dehnbarkeit und Viskosität.

Die Membran ist sehr elastisch, was den Dotterkugeln eine zeitliche Deformierung ermöglicht. Falls die Dotterkugeln dicht aneinander rücken, flachen sich diejenigen Stellen ihrer Oberfläche, die sich berühren, ab. In entsprechendem Momente nehmen sie wiederum die kugelige Gestalt an. In den auf dem Deckglase

lang ausgezogenen, entodermalen Zellen eingeschlossen dehnen sie sich in die Breite aus, in den zusammengezogenen Zellen runden sie sich wiederum ab. Es ist eine gewisse Kraft nötig, um die Dotterkugel zu deformieren. Die eigene Schwerkraft genügt nicht dazu; falls die Dotterkugel in isotonischer Salzlösung auf das Deckglas herabsinkt, plattet sie sich nicht ab. Die Dotterkugel weist also eine gewisse Steifheit auf, die im hohen Grade von dem Turgor ihres Inhaltes abhängt. Aber auch die Steifheit der Membran spielt dabei eine gewisse Rolle. Die »Schatten« der Dotterkugeln, d. h. die leeren Membranen, behalten doch mehrere Minuten ihre ursprünglichen Umrisse; erst allmählich fallen sie zusammen und fließen zu einigen winzigen miteinander verbundenen Tropfen zusammen. Die Zellhaut der Erythrozyten der Wirbeltiere und besonders derjenigen von *Cryptobranchus alleghaniensis* ist ebenfalls elastisch und steif, so daß sie in unversehrtem Zustande ihnen eine ovale Gestalt verleiht (Seifriz).

Eine weitere Eigenschaft der Dotterkugelmembran bildet ihre große Dehnbarkeit. Unter Jodeinwirkung dehnt sie sich auf den einkörnigen weißen Dotterkugeln so stark aus, daß sie ihre ursprüngliche Oberfläche mehr als um das Zweifache vergrößert. Diese Eigenschaft der Dotterkugelmembran läßt sich auch noch auf folgende Weise in der Dotteremulsion feststellen. Durch Anlegen eines Löschpapiers werden in dem am Deckglase hängenden Tropfen heftige Strömungen erzeugt, welche die Dotterkugeln mit sich reißen und dem Löschpapier zuführen. Dabei heften sich manche von ihnen an das Deckglas an. Die nächstfolgenden stoßen auf sie und können dort aufgestaut werden. Der andauernde Flüssigkeitsstrom stößt weiter auf sie, preßt sie an die am Deckglase haftenden Dotterkugeln und zieht sie in die Länge aus. Dabei dehnt sich die Membran und platzt schießlich, falls sich die ganze Kugel nicht früher aus dem Verbande mit den anderen löslöst. Die Dehnbarkeit der Zellmembran wurde auch schon nachgewiesen. Fauré-Fremiet zog vermittelst Mikronadeln die Zellhaut der Leukozyten von Polychaeten in lange Fäden aus. Seifriz konnte dasselbe mit den Erythrozyten von *Cryptobranchus* ausführen.

Die Membran der unversehrten Dotterkugel scheint nicht klebrig zu sein. Weder Tuschpartikel noch freie Fetttropfen heften sich an ihrer Oberfläche an. Nach Zugabe von Tusche

zur Dotteremulsion, weisen ihre Partikel heftige Brown'sche Bewegungen auf. Diejenigen von ihnen, die sich in nächster Nachbarschaft der Dotterkugeln befinden, behalten ihre Beweglichkeit nach den Beobachtungen bis zu 48 Stunden bei. Die Tuschpartikel flocken sich in dieser Zeit zu großen Klumpen zusammen, die sich weiter in dem flüssigen Medium bewegen. Sie würden bewegungslos sein, falls sie an die Dotterkugelmembran angeklebt wären.

Wenn jedoch die Membran in der hypotonischen Lösung platzt, so verklebt sich der Schlitz spurlos, nachdem der Inhalt der Kugel ausgestoßen worden ist. Falls die starken, eben erwähnten Flüssigkeitsströmungen eine Dotterkugel zerreißen, so ziehen sie auch Abschnitte ihrer Membran nach sich. Die Membranen werden dabei oft auf dem Deckglase zersmiert und bleiben an ihm minutenlang in Gestalt feiner Ausstriche kleben. Ähnliche Beobachtungen an tierischen Zellmembranen fehlen. Die Zellen mancher Gewebe wachsen in Kulturen, miteinander in Gestalt einer Membran verbunden; ob dieser Verband durch Adhäsion oder durch Verklebung zustande kommt, wurde nicht entschieden. Jedenfalls ist er ganz lose, weil die Beschädigung oder Vernichtung einer Zelle mit der Mikronadel ohne Einfluß auf den Zustand der Nachbarzellen ist (Kredel, Chambers und Ludford).

Es wäre noch die Erscheinung zu erwähnen, welche die Verbindung der Dotterkugelmembran mit dem flüssigen Inhalte der Dotterkugel veranschaulicht. Diese beiden Komponenten können sehr leicht voneinander geschieden werden. Beim Platzen der Kugel verläßt die homogene Flüssigkeit samt Fettkörnern die Membran; unter Umständen kann sich dieser Prozeß wie eine Häutung abspielen und die beiden Bestandteile der Dotterkugel können eine gewisse Zeit als selbstständige Gebilde verharren. Ein analoges Bild bieten die Pflanzenzellen während der Plasmolyse. In diesem Falle wird das steife Skelett der Zellmembran durch den Zellinhalt verlassen. Die tierische Zellmembran läßt sich vom Zelleibe nicht in dieser Weise abheben. Eine notwendige Bedingung, damit sich dieser Prozeß abspielen kann, ist der große Unterschied in der Konsistenz der Membran und des Inhaltes. Die Membran muß steif und der Inhalt im Vergleiche dazu sehr dünnflüssig sein.

Die physiko-chemischen Eigenschaften und die Struktur der Dotterkugelmembran ähneln außerordentlich denen der Zell-

membran. Die sich ergebenden Unterschiede beschränken sich auf die Dicke der Membran und ihre Verbindung mit dem Inhalte der Zelle, beziehungsweise der Dotterkugel. Jedenfalls bietet der Dotter ein neues, leicht zugängliches Material für alle Untersuchungen an halbdurchlässigen Membranen.

Die andere Komponente der Dotterkugel, die homogene Flüssigkeit, besteht hauptsächlich aus Eiweißmaterial. Sie ist schon öfters chemisch und histochemisch untersucht worden. Die diesbezügliche Literatur bespricht *Needham* (1931). Er stellt die Geschichte der chemischen Analysen des Eidotters dar und faßt die Ergebnisse in tabellarischer Form zusammen. Aus ihnen läßt sich leicht ablesen, welche Proteine, Fettarten, Kohlehydrate und anorganische Komponenten im Dotter vorhanden sind. Die quantitativen Verhältnisse dieser Komponenten im weißen und gelben Dotter sind auch berücksichtigt worden. Es werden die Unterschiede zwischen dem Eidotter des Hühnereies und dem der anderen Vögel (Gans, Ente, Perlhuhn, Truthahn und einige Nestflüchter) dargelegt. Von den für uns wichtigeren histochemischen Arbeiten wurden die Untersuchungen von *Riddle*, *Spohn & Riddle* und *Marza* erwähnt. In den letzten Jahren berichten *Marza* und seine Mitarbeiter über die Verteilung von Cholesterin, Lecithin, Glykogen u. a. im unbebrüteten Hühnereie. *Konopacka* war im Stande, vermittelt histochemischer Methoden die verschiedenen chemischen Komponenten im Dotter des in Bildung begriffenen Eies und in Geweben des sich entwickelnden Kükens zu lokalisieren. Unlängst schilderte *Thomas* ausführlich die Verdauung der Dotterkugeln, die er histochemisch in den kultivierten Dottersackzellen untersuchte.

Nach den vorliegenden Beobachtungen mischt sich die homogene Flüssigkeit sehr leicht mit Wasser, welches sie aus dem hypotonischen Medium erhält und mit manchen Salzlösungen, in welche sie nach Platzen der Dotterkugelmembran sich ergießt. Sie ist sehr dünnflüssig, weil die in ihr suspendierten feinen Fetttropfen *Brown'sche* Bewegungen ausführen können. Ähnliche Bewegungen führen die Granula im Inneren der Zellvakuolen aus. Im Zellplasma selbst spielen sich ähnliche Vorgänge nicht ab, man darf also schließen, daß der Inhalt der Dotterkugeln und der Zellvakuolen dünnflüssiger als das Zellplasma ist.

Die homogene Flüssigkeit speichert die basischen vitalen Farbstoffe, wie Neutralrot, Brillanteresylblau, Bismarckbraun, Nilblausulfat, Methylenblau und behält sie zurück, solange die Dotterkugelmembran unversehrt ist. Sie brauchen dabei nicht anverdaut werden, wie das von manchen Forschern behauptet wird (Thomas, Gräper). Ähnlich verhalten sich die Vakuolen des Zellplasmas, die mit denselben Farbstoffen reagieren und die sie beim Absterben abgeben.

Nilblausulfat und Neutralrot flocken in dieser Flüssigkeit sich intensiv färbende Granula aus. Trypanrot setzt die Flüssigkeit, ohne zu färben, aus einer leicht flüssigen in eine festere Phase um, wobei es unter bestimmten Bedingungen das Auftreten von farblosen Granula hervorruft. Auch Janusgrün bringt sie in eine festere Phase, aber in viel schwächerem Grade. Dieser Prozeß ähnelt einer Gelierung und ist reversibel. Die versteifte Substanz löst sich in einem hypotonischen Medium immer auf und verschwindet spurlos für das mit dem Mikroskop bewaffnete Auge. Die in der histologischen Technik zur Fixierung der Eiweißstoffe verwendeten Reagentien fällen diese Flüssigkeit aus. Ob sie dabei homogen bleibt oder Granula erzeugt, hängt von der Art des Fixierungsmittels und von seiner Konzentration ab.

Die homogene Flüssigkeit der Dotterkugeln ähnelt also in einigen Beziehungen mehr dem Inhalte der Zellvakuolen als dem Zellplasma selbst.

Die dritte Komponente der Dotterkugeln bilden die Körner, die in der homogenen Flüssigkeit suspendiert sind. Sie bestehen hauptsächlich aus Fettsubstanz wie dies ihr Verhältnis zum Sudan III, Trypanrot, Trypanblau, Dioxan, Jod und Äther beweist. An ihrer Oberfläche breitet sich ein feiner proteinhaltiger Film aus, dessen Anwesenheit durch seine Affinität zu basischen Vitalfarbstoffen zu Tage tritt. Dieser Film verhindert das Zusammenfließen der dicht einander anliegenden Fetttropfen. Falls er durch Einwirkung von Joddämpfen, von konzentriertem Dioxan oder Sublimat und Äther zerstört wird, nimmt die Oberflächenspannung des Fetttropfens zu und es werden günstige Bedingungen für deren Zusammenfluß geschaffen.

Die Fetttropfen variieren in der Größe von staubförmigen, den Durchmesser von  $1\mu$  kaum überschreitenden Gebilden, bis zu Tropfen von  $25\mu$  Durchmesser. Größere und weniger zahl-

reiche Fettropfen befinden sich in den weißen, die anderen in den gelben Dotterkugeln. Es existiert jedoch keine bestimmte sichere Grenze zwischen der Größe der Fettropfen in beiden Dotterarten. Dies führte zu der Meinung, daß die Vermehrung der Zahl und die Verkleinerung der Dimensionen der Fettropfen die Umwandlung der weißen Dotterkugeln in die gelben ermöglicht (Reichert, Leukart, Coste, His, Dubuisson, Schenk). Riddle nimmt an, daß nicht nur aus dem weißen Dotter der gelbe entsteht, sondern daß auch das umgekehrte normal stattfindet. Konopacka verfolgte den Umwandlungsprozeß des weißen Dotters in den gelben im Eierstockdotter verschiedenen Alters. Die Umwandlung einer Dotterart des frisch gelegten Eies in die andere wurde in den beschriebenen experimentellen Bedingungen nicht beobachtet.

Die weißen und gelben Dotterkugeln, als ganzes betrachtet, wurden schon früher (Grodziński) den Neutralrotvakuolen des Zellplasmas zur Seite gestellt und als Speichervakuolen bezeichnet. Dieser Vergleich findet eine weitere Stütze in der vorliegenden Arbeit. Der Dotterkugelmembran entspricht ein feiner Film auf der Oberfläche der Vakuolen, den Kredel gefunden hat. Er war nämlich im Stande, die Vakuolen vermittelt der Mikronadeln in der Zelle zu verschieben oder aus der lebenden Zelle herauszupräparieren. Die aus dem Verbande mit Zellplasma befreiten Vakuolen schwebten im Medium minutenlang in unversehrtem Zustande. Beim Anstechen mit der Nadel platzten sie heftig. Bei Abwesenheit der Membran an der Oberfläche der Vakuolen hätten die beschriebenen Phänomene nicht stattfinden können.

Der Inhalt der Vakuolen und der Dotterkugeln ist so dünnflüssig, daß die feinen Granula in ihm Brown'sche Bewegungen ausführen können. Die Affinität dieser Flüssigkeiten zu gewissen basischen Vitalfarbstoffen spricht für ihre große Ähnlichkeit. Nur gegen Janusgrün reagieren beide Gebilde verschiedenartig. Die Vakuolen nehmen es niemals an, die Dotterkugeln nach längerer Einwirkung.

Die Fettropfen bilden den spezifischen Bestandteil der Dotterkugeln. Sie dienen neben der homogenen Flüssigkeit als Reservematerial für den sich entwickelnden Embryo. Daher scheint der Name Speichervakuole für die Dotterkugeln berechtigt zu sein.

Die freien Dotterkugeln des Dotters sind morphologisch mit den in entodermalen Zellen des Dottersackes eingeschlossenen identisch, unter der Voraussetzung natürlich, daß sie nicht anverdaut sind. Beide bestehen aus einer Membran, einer homogenen proteinhaltigen Flüssigkeit und Fetttropfen. Sie reagieren in ähnlicher Weise mit denselben vitalen Farbstoffen, mit Dioxan, Äther, Joddämpfen, und dem hypotonischen Medium. Die Unterschiede, die sich dabei ergeben, können auf den Einfluß des Zellleibes zurückgeführt werden.

Es drängt sich nun die Frage auf, woher die Dotterkugeln der Zellen stammen. Es fehlen, wie Thomas richtig bemerkt, direkte Beobachtungen dieser Vorgänge. Einerseits wird behauptet, daß sie durch die Zellen vom Dotter phagozytiert werden (Dubuisson, Remotti), andererseits wird angenommen, daß sie in den Zellen aus verdaulichem und aufgenommenem Dotter synthetisiert werden (Kölliker). Thomas ist der Meinung, daß sie als Sekrete der entodermalen Zellen aufzufassen sind. Dieser Verfasser diskutiert auch die anderen Möglichkeiten und weist sie als unhaltbar ab.

Wenn wir uns, und zwar absichtlich, auf Beobachtungen des Dottersackes während der 30 ersten Bebrütungsstunden beschränken, so müssen wir feststellen, daß in den Kulturen der Dottersackzellen lauter unversehrte große Dotterkugeln auftreten. Sie weisen keine Anzeichen der stattfindenden Verdauungsprozesse auf. Gleichzeitig muß betont werden, daß die Verdauungsprozesse im Dotter kaum angebahnt und die Dotterkugeln unbeschädigt sind. Es muß also die Annahme von der Synthese der Dotterkugel aus verdaulichem und aufgenommenem Dotter abgelehnt werden. Auch die Hypothese ihrer sekretorischen Herkunft ist nicht haltbar, weil in dieser Zeit nur fertige Dotterkugeln in den kultivierten Dottersackzellen auftreten; es sind keine Gebilde wahrnehmbar, die als Bildungsstadien der Dotterkugeln zu deuten wären. Die Phagozytose der ganzen Dotterkugeln ist nicht ausgeschlossen, weil die Dottersackzellen *in vitro* Tusche und Karmin aufzunehmen im Stande sind (Grodziński, Thomas). Die vorliegenden Untersuchungen lassen keine Schlüsse auf die Herkunft der Dotterkugeln in den Dottersackzellen während der drauffolgenden Bebrütungstage zu ziehen.

Die Morphologie und Bedeutung des Übergangsdotters läßt sich auf Grund der vorliegenden Beobachtungen nur ganz allgemein besprechen. Derselbe kommt in jedem Dotter vor. Die Zahl, in der die Dotterkugeln auftreten, und die Ausmaße, die sie erreichen, stehen weit hinter denen des weißen und gelben Dotters zurück. Jedenfalls besitzen sie keine Membran und ihr Körper besteht aus einem Stück einer mit Nischen versehenen, zähflüssigen Substanz. Auf ihren fettigen Charakter weist die starke Färbbarkeit mit Trypanblau und Trypanrot, die schwache mit Sudan III und vielleicht auch die mit Janusgrün, hin. Über den Ursprung dieser Dotterart und ihr Verhältnis zu den anderen Dotterarten werden hoffentlich die Untersuchungen am Eierstockdotter eine Aufklärung bringen.

Institut der vergleichenden Anatomie an der Jagellonischen Universität in Kraków.

### Literaturverzeichnis.

- 1) Baer K. E., Über Entwicklungsgeschichte der Tiere. Königsberg 1828—37. — 2) Balfour F., Handbuch der vergleichenden Embryologie. Jena 1880. — 3) Beutner R., Physical Chemistry of Living Tissues and Life Processes. Baltimore 1933. — 4) Brauner L., Das kleine pflanzenphysiologische Practicum. Jena 1932. — 5) Chambers R. & Ludford R. J. Microdissection Studies on Malignant and Non-malignant Cells. Arch. exper. Zellforsch. 12. 1932. — 6) Coste., Histoire générale et particul. du développement. Paris 1847. — 7) Dubuisson H., Contribution à l'étude du vitellus. Arch. Zool. Expér. Gén. 5. 1906. — 8) Fauré-Fremiet E., Constitution et propriétés physico-chimiques des éléocytes d'Amphitrite Johnstoni (Malmgren). Protop. 5. 1929. — 9) Gage S. H. & Fisch P. A., Fat Digestion and Assimilation in Man and Animals as Determined by the Dark-field Microscope and a Fat-soluble Dye. A. Journ. Anat. 34. 1924. — 10) Graupner H. & Weissberger A., Über die Verwendung des Dioxans beim Einbetten mikroskopischer Objekte. Zool. Anz. 96. 1931. — 11) Gräper L., Erkennung von Stellen besonderer Entwicklungsenergie durch Vitalfärbung (Induktion?). Verh. Anat. Gesel. 43. 1935. — 12) Grodziński Z., Area vitellina of Chick Blastoderm in Tissue Cultures. Contrib. Embryol. 132. 1930. — 13) Grodziński Z., Über die Entwicklung von unterkühlten Hünereiern. Roux' Arch. 129. 1933. — 14) Grossfeld H., Osmotischer Druck, Elektrolyte und Gewebezellen. Protopl. 26. 1936. — 15) Grossfeld H., Osmotischer Druck und Vitalfärbung. ibidem 29. 1937. — 16) His W., Untersuchungen über die erste Anlage des Wirbeltierleibes. Leipzig. 1868. — 17) Konopacka B., Le comportement de la graisse dans le développement

- de la poule. *Bull. Acad. Cracovie* 1931. — 18) Konopacka B., Étude microchimique du comportement de la graisse dans le processus de formation du vitellus et dans le développement de l'embryon de poule. *Arch. Biol.* 1933. — 19) Kölliker A., *Entwicklungsgeschichte des Menschen und der höheren Tiere*. Leipzig, 1879. — 20) Kredel F. E., *The Physical Relation of Cells in Tissue Cultures*. *Bull. J. Hopkins Hosp.* 40. 1927. — 21) Latta J. S. & Busby L. F., *The Reaction of the Chick Embryo and its Membranes to Trypanblue*. *A. Jour. Anat.* 44. 1929. — 22) Lepeschinskaja O. B., *Zur Frage nach der Neubildung von Zellen im tierischen Organismus. I. Bildung von Zellen und Blutinseln aus Dotterkugeln beim Hühnerembryo*. *Cytologia* 7. 1936. — 23) Lepeschinskaja O. B., *Zur Frage nach der Neubildung von Zellen im tierischen Organismus II. Neuere Ergebnisse über die Bildung von Zellen und Blutinseln aus den Dotterkugeln des Hühnerembryos*. *ibidem* 8. 1937. — 24) Lepeschkin W. W., *Zell-Nekrobiose und Protoplasma-Tod*. Berlin 1937. — 25) Leukart R., *Zeugung*. Artikel in R. Wagner's *Handwörterbuch der Physiologie*. 4. 1853. — 26) Levi G., *Explantation, besonders die Struktur und die biologischen Eigenschaften der in vitro gezüchteten Zellen und Gewebe*. *Ergeb. Anat. Entwicklungsgesch.* 31. 1934. — 27) Marza V., Chiosa L. & Feldman N., *Variations histochimiques du globule vitellin. Facteurs exogènes intervenant dans la stratification du vitellus*. *C. R. Soc. Biol. Paris.* 104. 1930. — 28) Marza V. D. & E. V., *Réaction plasmale et réaction nucléaire au cours de la vitellogénèse (oeuf de poule)*. *ibidem* 11. 1934. — 29) Marza V. D. & E. V., *Localisation histochimique du cholestérol dans les ovules en croissance et dans l'oeuf de poule*. *Bull. Histol. Appliq.* 9. 1932. — 30) Mayer A., Rathery F. & Schaeffer G., *Remarques sur l'apparition de la graisse décelable histologiquement dans la cellule du foie. Contribution à l'étude des rapports entre la composition et les propriétés histochimiques*. *Arch. Anat. Micr.* 25. 1929. — 31) Nagel A., *Untersuchungen über die Vitalfärbung in vitro gezüchteter Fibrozyten erwachsener Kaninchen. 2. Beziehungen zwischen Fettablagerungen und Deponierung von Neutralrot und Methylenblau*. *Z. Zellfor. mikr. Anat.* 10. 1930. — 32) Needham J., *Chemical Embryology*. Cambridge 1931. — 33) Purkinje J. E., *Symbolae ad ovi avium historiam ante incubationem. (Gratulationsschrift zum 50-jähr. Doktorjubiläum. J. Fr. Blumenbach's). Vratislaviae 1825*. — 34) Reichert K. B., *Das Entwicklungsleben im Wirbeltier-Reich*. Berlin 1840. — 35) Remak R., *Untersuchungen über die Entwicklung der Wirbeltiere*. Berlin 1850—1855. — 36) Remotti E., *Ricerche fisio-morfologiche sul sacco vitellino del pollo*. *Ricer. Morfol.* 7. 1927. — 37) Riddle O., *On the Formation, Significance and Chemistry of the White and Yellow Yolk of Ova*. *J. Morphol.* 22. 1911. — 38) Rosenfeld M., *The Action of Ether on Cells in Mitosis*. *Arch. Exper. Zellforsch.* 12. 1932. — 39) Scheinis S. A., *Zur Frage nach Formierung von Zellen im Dotter von Vögeleiern*. *Cytologia* 8. 1937. — 40) Schenk S. L., *Ueber die Aufnahme des Nahrungsdotters während des Embryonallebens*. *Sitzber. Akad. Wien*. 1897. — 41) Seifriz W., *The Physical Properties of Erythrocytes*. *Protopl.* 1. 1927. — 42) Sławiński A., *The Erythrocytes as Osmometers*. *Bull. Acad. Cracovie Cl. Med.* 1937. — 43) Smiechowsky A.,

Über die Bedeutung der Megasphären in der Keimscheibe des Hühnchens. Anat. Heft. 1892. — 44) Szantroch Z., Zur Methodik der Fettfärbung in Gewebekulturen. Virchow's Arch. 286. 1932. — 45) Szarski H., Dioxan as a Fixative of Yolk. Science 86. 1937. — 46) Thomas J. A., La culture de la paroi de la vésicule ombilicale chez l'embryon de poulet. Morphologie des premiers stades. C. R. Ass. Anat. 1933. — 47) Thomas J. A., Recherches sur les transformations, la multiplication et la spécificité des cellules hors de l'organisme. Ann. Sc. Natur. 1. 1938. — 48) Thomson A., Ovum Todd's Cyclopaedia. 5. 1859. — 49) Virchow H., Ueber das Epithel des Dottersackes im Hühnerei. Diss. Berlin 1875. — 50) Virchow H., Über die physikalisch zu erklärenden Erscheinungen, welche am Dotter des Hühnereies bei der mikroskopischen Untersuchung sichtbar sind. Sitzber. Akad. Berlin. 1888. — 51) Wassermann F., Über makro- und mikroskopischen Eisennachweis im Dotter des Hühnereies. Anat. Heft. 42. 1911. — 52) Wilbrandt W., Die Permeabilität der Zelle. Ergeb. Physiol. 40. 1938. — 53) Zanoni G., Problemi fisiomorfologici del sacco vitellino degli uccelli studiati con la luce di Wood. Bol. Mus. Labor. Zool. Anat. Comp. Genova 13. 1933.

### Erklärung der Tafel 6—8.

Alle Aufnahmen wurden mit der Zeiss'schen Aufsatzkamera »Miflex« hergestellt. Die Abbildungen, die ähnliche Beobachtungen veranschaulichen, sind unter einer Nummer gruppiert und wenn nötig mit lateinischen Buchstaben belegt. Die Figuren 9, 15, 20, 21, 22 umfassen drauffolgende Reihen-aufnahmen der sich abspielenden Vorgänge.

Die auf den Tafeln eingezeichneten schwarzen Linien entsprechen den Ausmaßen von  $50\mu$  der photographierten Objekte.

Die durch Klammern eingeschlossenen Zahlen in den Erklärungen beziehen sich auf das Protokoll der Aufnahmen.

1. Dotteremulsion mit Tyrode'schen Flüssigkeit im Verhältnis von 1:100 verdünnt. Lauter gelbe Dotterkugeln. (Nr. 107).

2. Übergangsdotter von verschiedener Größe und von verschiedener Dichtigkeit der Nischen. (Nr. 151, 173, 179).

3. Der gelbe Dotter. *a* und *b* — feinkörnige, *c* — grobkörnige Dotterkugel. (Nr. 2, 22, 109).

4. Der weiße Dotter. Die Kugeln enthalten eine verschiedene Anzahl von großen Fettkörnern. (Nr. 16, 44, 110, 111).

5. Gelbe Dotterkugeln im Dunkelfelde des Zeiss'schen Epikondensors beobachtet. (Nr. 108).

6. Sublimatfixierung. *a* — gelbe Dotterkugel mit draufsitzenden Fetttropfen. *b* — weiße D. k. mit Koagulationsgranula. (Nr. 199, 200).

7. Lecithoptyse einer gelben Dotterkugel, die mit Nilblausulfat tingiert und nachher der Wirkung einer hypotonischen Lösung unterworfen war. (Nr. 45).

8. Das Heruntergleiten der Dotterkugelmembran in hypotonischer Lösung. *a* — weißer Dotter, größere Kugel — Dotterkugelmembran, kleinere — ihr Fettkorn, *b* und *c* — gelber Dotter, die Membran hebt sich von den Fettkörnern ab. Vorbehandlung mit Janusgrün. (Nr. 35, 37, 178).

9. Einfluß der hypotonischen Lösung auf die gelben Dotterkugeln in kultivierten entodermalen Zellen des Dottersackes. *a* — drei unversehrte Dotterkugeln (Pfeil eingezeichnet) sichtbar. *b* — eine von ihnen zusammengeschrumpft, zwei andere geplatzt. (Nr. 77, 79).

10. Die Einwirkung von Trypanrot auf die in hypotonischer Lösung platzenden Dotterkugeln. Die eingezeichneten Pfeile gegen die Dotterkugelmembranen gerichtet. *a* — gelbe Dotterkugel, *b* — weiße Dotterkugel mit zahlreichen Fettkörnern, *c* — ähnliche nur mit einem Korne, *d* — weiße und *e* — gelbe Dotterkugel, die einer nicht so tiefen Herabsetzung des osmotischen Druckes unterlagen. (Nr. 202, 203, 207, 208, 209).

11. Weiße Dotterkugeln mit Neutralrot tingiert. Das große Fettkorn dunkelrot. *a* — in der homogenen Flüssigkeit mehrere rötliche Granula ausgeflockt, *b* — die ganze homogene Flüssigkeit fein aufgeflockt. (Nr. 176, 177).

12. Brillantcresylblaufärbung. Weiße Dotterkugel mit zwei dunklen Fettkörnern, in der Mitte feinkörnige, rechts dunklere grobkörnige gelbe Dotterkugel. (Nr. 33).

13. Jodeinwirkung. An der Oberfläche der Dotterkugel treten Fettropfen auf. *a* — weiße vielkörnige Dotterkugel, *b* und *c* — gelbe. (Nr. 48, 152, 155).

14. Jodeinwirkung auf die weiße einkörnige Dotterkugel. *a* — homogene Flüssigkeit ausgeflockt, *b* — die Membran dehnt sich aus, *c* — nach Verschwinden der Membran weicht das Koagulat teilweise auseinander. (Nr. 149, 150, 153).

15) Jodeinwirkung auf die Dotterkugeln in Gewebekulturen. *a* — drei unversehrte Dotterkugeln (Pfeil eingezeichnet), *b* und *c* — die Fettropfen der Dotterkugel vergrößern sich allmählich, *d* — nach 30 Minuten fließen sie in jeder Dotterkugel zu einem großen Tropfen zusammen. (Nr. 122, 123, 124, 126).

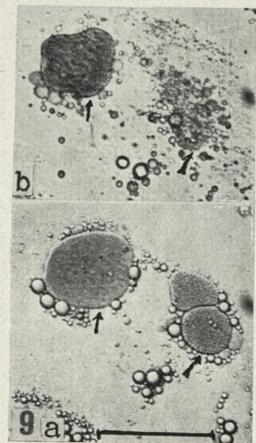
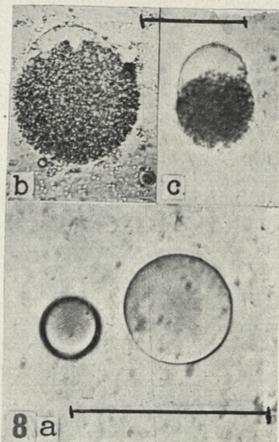
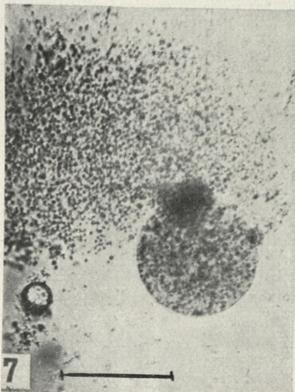
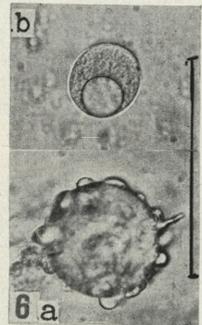
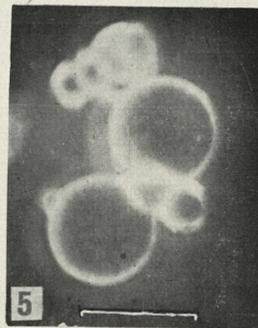
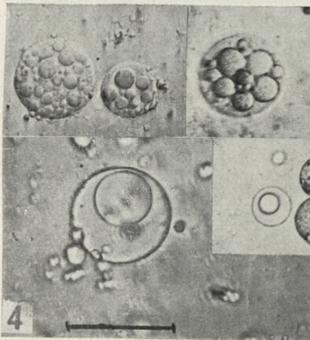
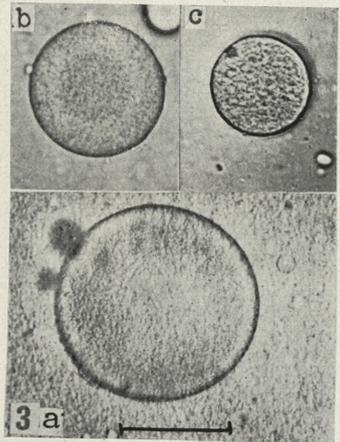
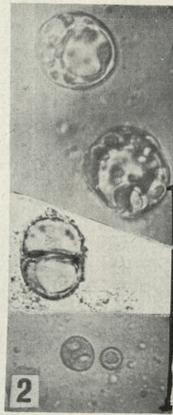
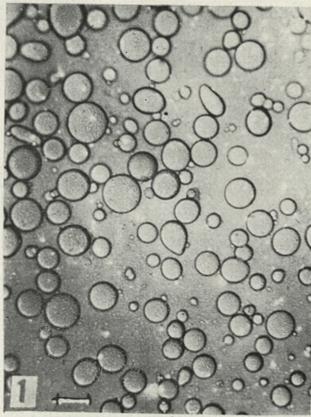
16. Dioxanwirkung. Die Fettropfen werden aus den gelben Dotterkugeln auf die Oberfläche ausgeschiedenen und der proteinhaltige Inhalt koaguliert. (Nr. 49, 50, 61).

17. Dasselbe. Die Dotterkugeln wurden vorher in molarer NaCl Lösung entwässert. (Nr. 100, 101).

18. *a* — gelbe Dotterkugel mit Perényj'scher Flüssigkeit fixiert, nachher mit Stammlösung von Dioxan behandelt. In beiden Fällen kein Ausreten der Fettropfen. (Nr. 59, 60).

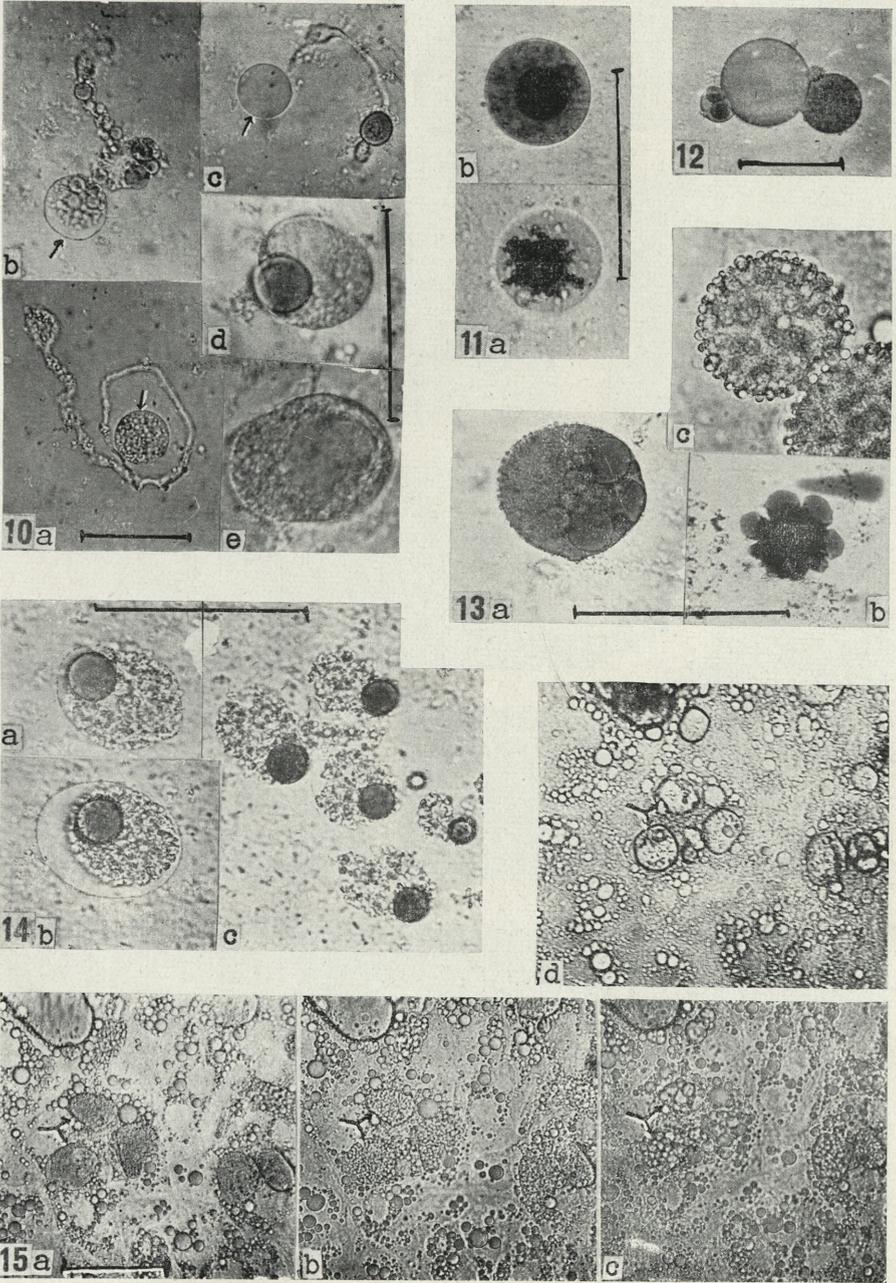
19. Kultur des Dottersackes. Fixierung in Perényj'scher Flüssigkeit, Nachbehandlung mit Dioxan und Sudan III. Fett fließt in den gelben Dotterkugeln zu einem Tropfen zusammen, der ihre Mitte einnimmt. Die Umriss der Dotterkugel werden durch Sudan III schwach angedeutet (Pfeil eingezeichnet). (Nr. 88).

20. Einwirkung von Dioxan mit Sudan III auf die Dotterkugeln in lebendigen Gewebekulturen. *a* — frische Kultur mit weißer (Pfeil einge-

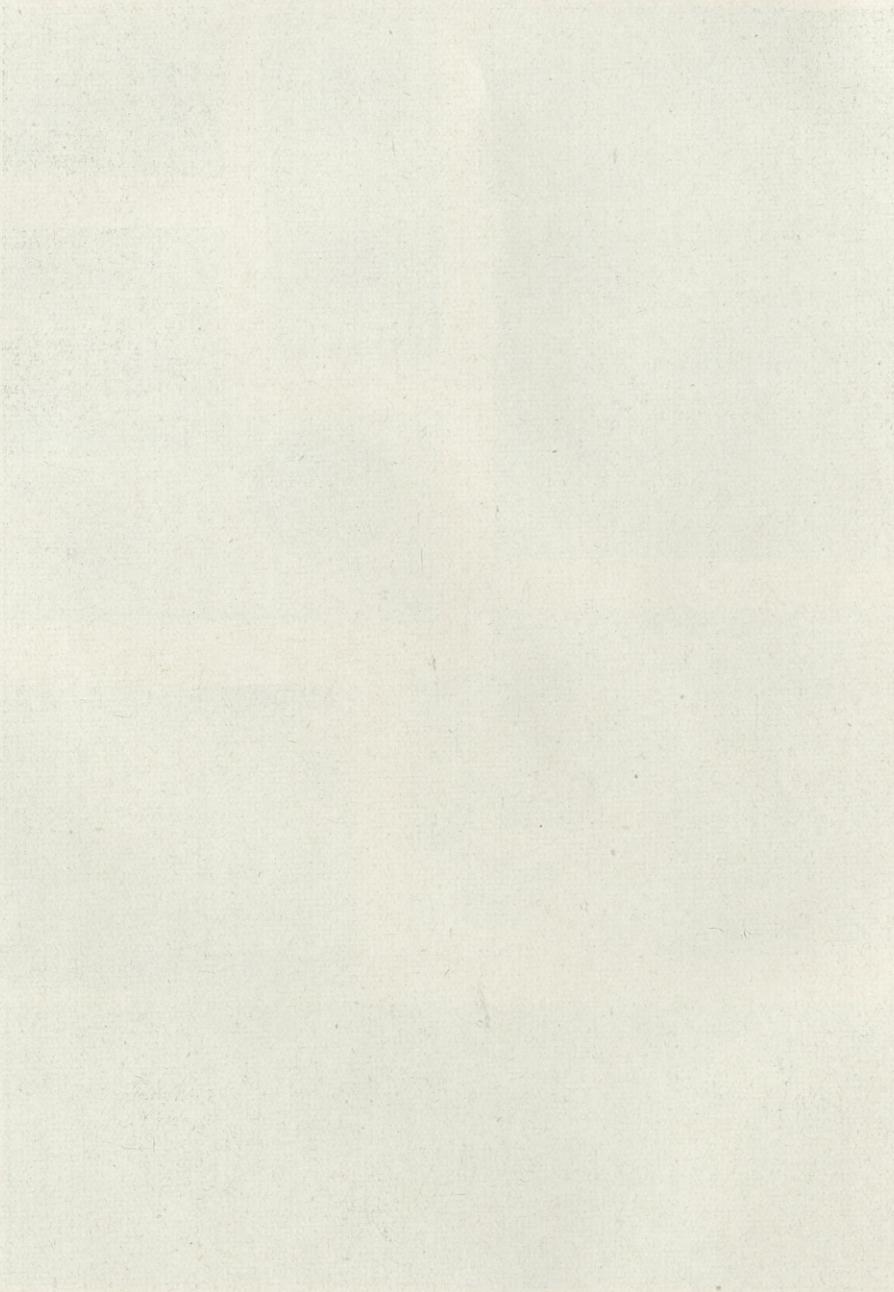


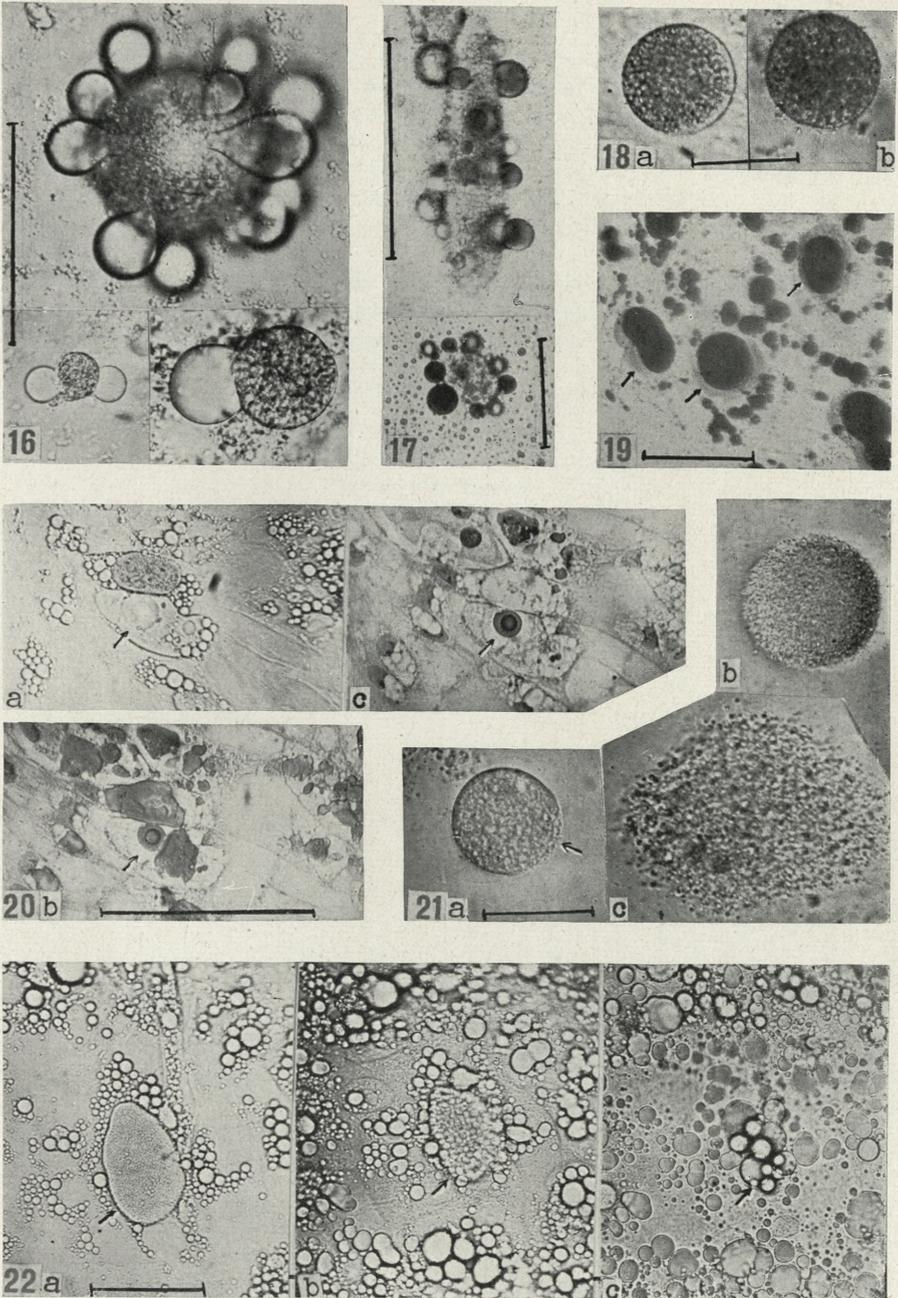
Z. Grodziński phot.





Z. Grodziński phot.





Z. Grodziński phot.







**Wyniki usunięcia grasicy u płazów bezogonowych. —  
The Results of the Thymus Gland Extirpation in Salientia.**

Mémoire

de M. H. SZARSKI,

présenté le 5 Décembre 1938 par M. H. Hoyer m. t.

**Introduction**

The function of the thymus in the body of *Salientia*, is still unknown. Observations are usually contradictory or negative. Abelous and Billard deprived the frogs of the thymuses already in the year 1896. None of the frogs operated by them lived longer than 14 days, Abelous and Billard attributed this fact to the deficiency of the secretion of the thymus in the organism. Many authors (Ver Eecke 1899, Vincent 1903, Pari 1905, Hammar 1905, Agafonow 1927) repeated their experiments in subsequent years, but received results quite the opposite to those of Abelous and Billard. According to them the frogs suffered no injury from the extirpation of the thymuses. Pari supposed that the deaths of frogs in the experiments of Abelous and Billard were caused by postoperative infections, and he expressed the opinion that the frogs, deprived of the thymuses, are less resistant to infection than normal animals. According to those authors the thymus is of no great importance to full-grown amphibians.

Others investigators, like Salkind (1914—16), affirmed that the extirpation of the thymuses in the toad causes a slow emaciation of the organism and leads inevitably to death. Schnitzer (1930) noticed the disappearance of the lime deposits in the vertebral endolymphatic sacs in *Rana temporaria*, after the ex-

tirpation of the thymus and supposed it to be the result of the operation.

All above mentioned authors observed the operated animals only for a short period of time, for instance Schnitzer 65 days, Hammar 60 days, Vincent 36 days, etc. So they could not make any observations on the reproduction of operated animals. This question is, however, worthy of attention, as several investigators supposed that thymus influences the production of egg capsules in lower vertebrates (Riddle 1924, Popoff 1927, Noble 1931). Riddle published experiments according to which the extirpation of the thymus in birds causes the laying of eggs without shells, his results were however contradicted later on (Ackert and Morris 1929—30, Morgan and Grierson 1929—30), and even Riddle himself in a work published in collaboration with Kříženecký (1931) did not confirm his first statements.

#### Material and methods

The thymuses lie, as is well known, in frogs and toads symmetrically in the region of the mandibular joint, immediately under *M. depressor mandibulae*, so that their extirpation according to the methods of Hammar in *R. temporaria* and *Bufo bufo* does not meet with greater difficulties. Only in *Rana esculenta* the operation is more delicate, as the connective tissue in this species is less elastic. The control animals were operated in the same manner as those deprived of the gland, the muscles being displaced, but the skin was sewn without touching the thymus.

Altogether 149 specimens were operated including 66 females and 83 males. After the observations all animals were killed, their blood vessels injected with Prussian blue, and then fixed *in toto* in formalin. The animals were subsequently dissected under a binocular microscope, to ascertain the absence of the thymuses. The section was very easy, the blood vessels on the gland being in sharp contrast to the surroundings. As is well known, the thymus gland regenerates from small fragments, a fact first noticed in mammals by Friedleben (1858) and in birds by Tarulli and Lo Monaco (1894). I noticed it also in several frogs (*R. esculenta*) the thymus of which had been extirpated incompletely, and as a result the normal gland was found.

TABLE I

Series	Species	Date of operation	Narcosis	Quantity of animals				Under the observation days:		Mortality <sup>1)</sup>	
				without thymuses		control				without thymuses	control
				♂	♀	♂	♀				
1.	<i>Rana temporaria</i>	24/III—29/V 1936	ether	8	6	4	2	30	100%	100%	
2.	<i>Rana esculenta</i>	29/IV—5/V 1936	ether	7	13	4	7	60	100%	100%	
3.	<i>Bufo bufo</i>	8/VIII—3/IX 1936	ether	6	8	4	5	250	63%	50%	
4.	<i>Rana esculenta</i>	15/VI—18/IX 1936	ether	12	12	6	6	341	60%	54%	
5.	<i>Rana temporaria</i>	12/X—25/X 1937	ether	5	1	3	1	130	66%	50%	
			chlortone	7	4	6	1	130	—	—	
6.	<i>Rana temporaria</i>	30/III 1938	chlortone	7	—	4	—	100	—	—	

<sup>1)</sup> Mortality was calculated on the basis of the quantity of living specimens on the last day of observations.

In the first and second series of experiments, the animals were kept together in large glass aquariums filled with tap-water. No food was supplied.

After the operation the animals belonging to the third series were put into a large terrarium, standing in the open air. When the first winter frosts came, 31. X 1936 the terrarium containing the toads was buried in the ground at a depth of 1 m. The terrarium was taken out of the ground in the spring of the year 1937 (on the 1<sup>st</sup> March). Except during the winter months the animals were fed weekly with earthworms and insects.

In the fourth series of experiments the operated animals were let loose in a concrete lined pond, 2 m. long and 1 m. wide, situated in the garden of the Institute. During the winter the water in the pond froze, and notwithstanding the holes made in the ice, some of the frogs died of suffocation. Therefore on the 15. XII 1936, all the frogs were taken out of the pond and put into a large aquarium placed in a cellar and filled every day with ice so that the temperature never exceeded 4° C. In the spring, when the ice melted, the frogs were again put into the pond the 22<sup>nd</sup> December 1937. They received no other food, but what they themselves caught in the garden.

The animals belonging to the fifth experimental series were x-rayed the day following the operation<sup>1)</sup>. Then on the basis of the roentgenograms they were divided into 2 groups according to the quantity of lime deposits in the vertebral sacs. Those animals having larger lime deposits were placed in tap-water, and the rest in 0.3% solution of CaCl<sub>2</sub> containing some pieces of CaCO<sub>3</sub> and CaSO<sub>4</sub>. This method was adopted because according to the researches of Krauze (1935) the quantity of lime salts in the vertebral sacs enlarges in frogs living in the solution of CaCl<sub>2</sub>. The aquariums were standing in a dark room, the water and the solution of CaCl<sub>2</sub> were changed weekly. No food was supplied. Eight weeks after the extirpation of the thymuses a second series of x-ray photographs was executed.

Animals of the sixth series of experiments were put together in a large aquarium, filled with tap-water, standing in room temperature. No food was supplied.

<sup>1)</sup> I express my gratitude to Dr. J. Drozdowski for his kind assistance in the preparation of roentgenograms.

**The behaviour of operated animals**

The animals deprived of the thymuses, likewise the control ones did not show any changes in their movements or appetite.

100% of mortality in the first two series of experiments (table I) must be understood as a summation of effects of ether narcosis and of the spawning season, which as is known (Schnitzer 1930) induces a pronounced weakness in frogs during the sum-

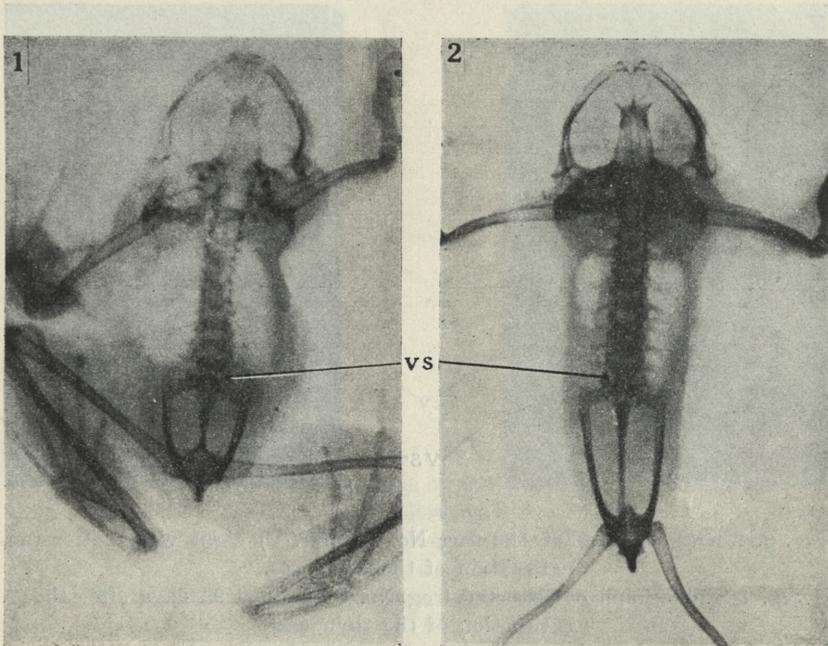


Fig. 1 and 2. Roentgenograms of frog No. 20 (Ser. V).  
Fig. 1 obtained 24. X 1937, the day following the extirpation of the thymuses.  
Fig. 2 obtained 20. XII 1937, eight weeks later.

mer. Only in the last experiments it was remarked that the post-operative mortality diminishes to zero, even in the spawning season by the use of chloretone as narcotic. I did not notice that other conditions of experiments had any influence on the result, naturally except hunger, which produced emaciation after some months. I cannot agree with Salkind in his statement that the extirpation of the thymus inevitably causes death, as animals belonging to the third and fourth series of experiments,

killed on the 250<sup>th</sup> and 341<sup>st</sup> day after the operation showed no signs of any disease. In series 3, 4 and 5 we see a slightly greater mortality in animals deprived of the thymuses than in controls. The difference, however, is too small (about 12%) to justify further arguments. The thymus is therefore not essential to full-grown animals for their normal life.

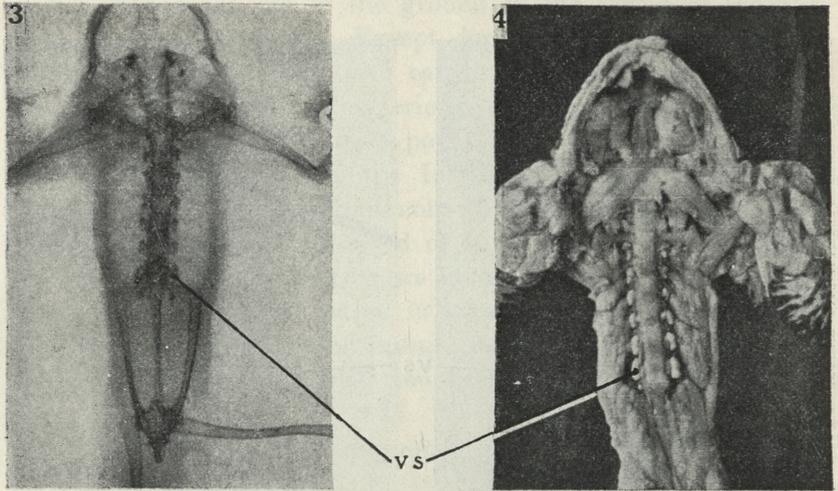


Fig. 3. Roentgenogram of the frog No. 21 (Ser. V) eight weeks after the extirpation of the thymuses.

Fig. 4. Photograph of dissected frog No. 5 obtained 98 days after the extirpation of the thymuses.

vs = endolymphatic vertebral sacs.

The males *B. bufo* belonging to the third series showed a violent sexual desire in the spring of the year 1937 after being taken out of the ground. When placed in small aquariums and paired with freshly captured females, a male, deprived of the thymuses the 2. IX 1936 impregnated the 11. IV 1937 a large spawn, which afterwards developed quite normally. Female toads, control and deprived of the thymuses, belonging to the third series did not spawn, in spite of injections of pituitary extract prepared after Rugh (1934)<sup>1</sup>). The section showed a weak de-

<sup>1</sup>) I am very grateful to Mr J. Szpunar for indicating me Rugh's technique.

velopment of ovaries probably induced by the scarcity of food in captivity.

Female frogs belonging to the fourth series, laid spontaneously or after the injection of pituitary extract, normal spawns during the spawning season. One of the spawns, laid spontaneously was taken under observation and developed into completely

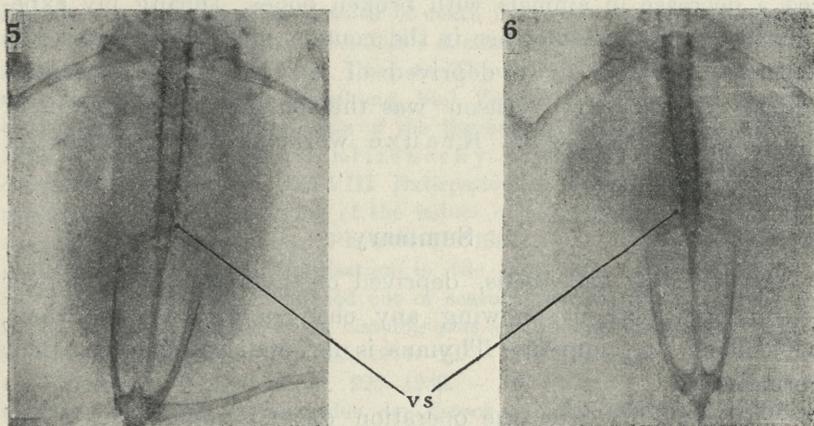


Fig. 5 and 6. Roentgenograms of the frog No. 2 bis (Ser. V).  
 Fig. 5 obtained 15. X 1937, the day following the extirpation of the thymuses.  
 Fig. 6 obtained 16. XII 1937 after eight weeks stay of the frog  
 in 0.3% solution of  $\text{CaCl}_2$ .  
 vs = endolymphatic vertebral sacs.

normal tadpoles. The frog which had laid this spawn was deprived of the thymuses the 25<sup>th</sup> August 1936, and spawned 21. V 1937. The section confirmed the complete absence of thymuses. Consequently the production of egg capsules does not depend on the presence of the thymus gland.

All the animals belonging to the fourth series possessed normal endolymphatic vertebral sacs when the experiments were concluded. Therefore a fifth series of experiments was planned, to verify the results of Schnitzer, who stated that the thymus extirpation induces in frogs a disappearance of the lime deposits in vertebral sacs. In this series the state of the endolymphatic sacs was tested with x-ray photographs. The results were contradictory to Schnitzer's statements, as no diminution of lime

deposits was noticed, regardless of the remaining of frogs in tap-water or in  $\text{CaCl}_2$  solution. Therefore we can suppose that in Schnitzer's experiment the diminution of lime deposits was caused by other factors, which may influence the quantity of salts contained in vertebral sacs.

Krauze (1935) stated that in frogs remaining in solution of  $\text{CaCl}_2$  an increase of lime deposits was apparent, while he noticed a decrease in animals with broken bones. During my experiments no distinct increase in the content of vertebral sacs was apparent either in those deprived of the thymus or in control animals. Possibly the reason was the too low concentration of the solution (0.3% while Krauze worked with a solution, of 0.9%—0.7%  $\text{CaCl}_2$ ).

### Summary

Adult frogs and toads, deprived of thymuses can live over ten months without showing any changes in their behaviour, movements and appetite. Thymus is not indispensable for their normal life.

The mortality after the operation depends upon the kind of narcosis. After chloretone is zero, and after ether 50% in control animals and 62% in those deprived of thymuses.

Males and females deprived of thymuses produce normal sexual products. Spermatozoa are capable of fertilization, and the ova develop into normal tadpoles.

Lime deposits in the vertebral endolymphatics sacs do not decrease in animals deprived of the thymuses. Neither do they increase in animals kept in 0.3% solution of  $\text{CaCl}_2$ .

I owe my cordial thanks to Prof. Dr. Z. Grodziński whose kind guidance and criticism assisted me in the carrying out of above researches.

Institute of Comparative Anatomy of Jagellonian University. Kraków.

### Bibliography

1. Abelous J. E. et Billard. Recherches sur le fonction du thymus chez le grenouille. Arch. physiol. norm. path. Anné 23, Sér. 5. Vol. 8. 1896. —
2. Ackert J. E. and Morris M. H. Studies on the effect of thymectomy on growing chickens. Anat. Rec. 44. 1929—30. —
3. Agafonow R. D. Zur Physiologie der *Glandula thymus*. Pflügers Arch. 216. 1927. —
4. Friedleben A. Die Physiologie der Thymusdrüse in Gesundheit und

- Krankheit. Frankfurt a. M. 1858. — 5. Hammar J. A. Ist die Thymusdrüse beim Frosch ein lebenswichtiges Organ? Pflügers Arch. 110. 1905. — 6. Hammar J. A. Die normalmorphologische Thymusforschung im letzten Vierteljahrhundert. Leipzig 1936. — Krauze D. K. Experimentelle Untersuchungen über die Funktion der Kalksäckchen bei Froschlurchen. Z. vergl. Physiol. 22. 1935. — 8. Morgan A. and Grierson M. Effect of thymectomy in domestic fowl. Anat. Rec. 44. 1929—30. — 9. Noble C. K. The biology of amphibia. New York 1931. — 10. Pari G. A. On diminution of resistance to infections as a cause of death in frogs after the extirpation of the thymus gland. Gaz. d. ospedali e d. cliniche. 1905. (Quoted aft. Hammar 1905). — 11. Popoff M. Über die Thymus in vergleichend-anatomischer und physiologischer Beziehung. Biol. Zentrbl. 47. 1927. — 12. Riddle O. A hitherto unknown function of the thymus. Amer. Journ. Physiol. 68. 1924. — 13. Riddle O. and Kříženecký J. Studies on the physiology of reproduction in birds. XXVIII Extirpation of thymus and bursae in pigeons with a consideration of the failure of thymectomy to reveal thymus functions. Amer. Journ. Physiol. 97. 1931. — 14. Rugh R. Induced ovulation and artificial fertilisation in the frog. Biol. Bull. 66. 1934. — 15. Rugh R. Ovulation induced out of season. Science N. S. 85. 1937. — 16. Salkind J. Contributions histologiques à la biologie comparée du thymus. Arch. Zool. expér. gén. 55. 1914—16. — 17. Schnitzer K. L. Über ein Kalkdepot. Pflügers Arch. 225. 1930. — 18. Sklower A. Das inkretorische System im Lebenscyclus der Frösche. I. Schilddrüse, Hypophyse, Thymus und Keimdrüsen. Z. vergl. Physiol. 2. 1925. — 19. Tarulli L. e Lo Monaco. Sugli effetti della estirpazione del timo. Atti. d. XI cong. med. int. V. 2. Roma 1894. — 20. Ver Eecke A. Nouvelle contribution à l'anatomo-physiologie du thymus chez la grenouille. Ann. soc. Méd. Gand. 78. 1899. — 21. Vincent S. On the results of extirpation of the thymus gland. Journ. Physiol. 30. 1903.
-



## Table des matières par noms d'auteurs

contenues dans le Bulletin International de l'Académie Polonaise des Sciences et des Lettres  
(Classe des Sciences Mathématiques et Naturelles. Série B: Sciences Naturelles (II)).

Année 1938.

Le nombre inscrit à la suite de chaque Mémoire indique la page.

- Ackermann (J).** Experimentelle histo-chemische Untersuchungen über den Lezithinstoffwechsel im Tierkörper. II. Teil. Über den Einfluß der Lezithinfütterung auf den Lipidgehalt der Leber (Planche 1) (1).  
— Histochemische Untersuchungen über den Gehalt an Lipiden und Karotenoiden im Darm des überwinternden Frosches (241).
- Biborski (J).** Über den histologischen Bau der Venen des Dorsches (*Gadus callarias* L., syn.: *G. Morrhua* L.) (285).
- Ferens (B) v. Wojtusiak (R. J).**
- Głowczyński (Zb).** Sur la teneur en vitamine A de la graine d'Alpiste (*Phalaris canariensis*) (Planche 3) (115).
- Grodziński (Z) and Marchlewski (J).** The Influence of the Serum upon the Motility of Spermatozoa of the Domestic Cock (55).
- Grodziński (Z).** Zur Morphologie des Hühnereidotter unter normalen und experimentellen Bedingungen (Planches 6—8) (317).
- Hans M. und Tabencka Z.** Über die Blutgefäße der Haut von *Myxine glutinosa* L. (79).
- Jałowy (B).** Über die heterogene Regeneration von Nervenendigungen in den Tasthaaren (Planche 5) (203).
- Marchlewski (J) v. Grodziński (Z).**
- Mikulski (J, S).** Experimental studies in thermal ecology of developing eggs of some amphibians (*Rana*, *Bufo*, *Pelobates*) (23).
- Monné (L).** Über polychrome Vitalfärbungen verschiedener Gastropoden-Zellen mit Pyroninen (109).  
— Vital staining experiments on *Amoeba proteus* and *A. dubia* (221).
- Pautsch (F).** Die Bedeutung von Nervenrohr und Chorda dorsalis für die Entwicklung des Schwanzes der Larve des Grasfrosches (*Rana temporaria*) (301).
- Skowron (S) und Wiciński (Z).** Über die Lebensdauer der gelben Körper und die sie beeinflussenden Faktoren (47).
- Skowron (S).** Untersuchungen über das endokrine System des Igels (*Erinaceus*). I. Histologische Veränderungen in den Hoden und in den akzessorischen Drüsen des männlichen Genitalapparates, die periodisch oder unter dem Einfluß von endokrinen Reizen auftreten (Planche 4) (129).
- Skrochowska (R).** Über die Abhängigkeit der Gewöhnung bei Vorticellen von der Frequenz wiederholter Reize (89).

- Szarski (H).** Corpus lymphaticum subdermale in the frogs: *Rana esculenta*, *R. temporaria* and *R. terrestris* (Planche 2) (79).  
 — The Blood Vessels of the Thymus Gland in some of the *Urodela* (305).  
 — The Results of the Thymus Gland Extirpation in *Salientia* (357).
- Tabencka (Z)** v. Hans (M).
- Wiciński (Z)** v. Skowron (S).
- Wojtusiak (R. J)** und **Ferens (B).** Untersuchungen über die Orientation und Geschwindigkeit des Fluges bei Vögeln. IV. Heimkehrgeschwindigkeit und Orientierungsart bei den Rauchschnalben (*Hirundo rustica* L.) (173).

BULLETIN INTERNATIONAL  
DE L'ACADÉMIE POLONAISE DES SCIENCES  
ET DES LETTRES  
CLASSE DES SCIENCES MATHÉMATIQUES ET NATURELLES  
SÉRIE B: SCIENCES NATURELLES

DERNIERS MÉMOIRES PARUS

N° 1—5 B I, 1938.

- Skalińska M.** Cytogenetic Studies in Aneuploid types of *Aquilegia* (Planche 2).  
**Szafer Wl.** Eine pliozäne Flora in Krościenko am Dunajec (Planches 9—12).  
**Walas J.** Wanderungen der Gebirgspflanzen längs der Tatra-Flüsse (Planches 3—8).  
**Weiler Fr.** Das Verhalten der Wurzeln unter der Einwirkung von Wuchsstoffen der *Avena*- und der *Zea*-Koleoptilspitzen (Planche 1).

N° 6—10 B I, 1938.

- Kovats J.** Über den Einfluß von Eisen und Molybdän auf die Stickstoffbindung durch Azotobakter in Gegenwart von Humussubstanzen oder von deren Aschen.

N° 4—7 B II, 1938.

- Ackermann J.** Histochemische Untersuchungen über den Gehalt an Lipiden und Karotenoiden im Darm des überwinterten Frosches.  
**Biborski J.** Über den histologischen Bau der Venen des Dorsches (*Gadus callarias* L., syn.: *G. morrhua* L.).  
**Jalowy B.** Über die heterogene Regeneration von Nervenendigungen in den Tasthaaren (Planche 5).  
**Monné L.** Vital Staining Experiments on *Amoeba proteus* and *A. dubia*.  
**Pautsch F.** Die Bedeutung von Nervenrohr und Chorda dorsalis für die Entwicklung des Schwanzes der Larve des Grasfrosches (*Rana temporaria*).  
**Skowron S.** Untersuchungen über das endokrine System des Igels (*Erinaceus*). I. Histologische Veränderungen in den Hoden und in den akzesorischen Drüsen des männlichen Genitalapparates, die periodisch oder unter dem Einfluß von endokrinen Reizen auftreten (Planche 4).  
**Wojtusiak R. J.** und **Ferens B.** Untersuchungen über die Orientation und Geschwindigkeit des Fluges bei Vögeln. IV. Heimkehrgeschwindigkeit und Orientierungsart bei den Rauchschwalben (*Hirundo rustica* L.).

## TABLE DES MATIÈRES.

Octobre—Décembre 1938.

	Page
H. SZARSKI. The Blood Vessels of the Thymus Gland in some of the <i>Urodela</i> . . . . .	305
Z. GRODZIŃSKI. Zur Morphologie des Hühnereidotter unter normalen und experimentellen Bedingungen (Planches 6—8) . . . . .	317
H. SZARSKI. The Results of the Thymus Gland Extirpation in Salientia . . . . .	357

Le »*Bulletin International*« de l'Académie Polonaise des Sciences et des Lettres (Classe des Sciences Mathématiques et Naturelles) paraît en deux séries. La première (A) est consacrée aux travaux sur les Mathématiques, l'Astronomie, la Physique, la Chimie, la Minéralogie, la Géologie etc. La seconde série (B) se divise en deux sous-séries; l'une d'elles »I« contient les mémoires qui se rapportent aux diverses branches de la Botanique (la Systématique, l'Anatomie et la Physiologie des Plantes), l'autre »II« est réservée aux publications qui concernent le vaste domaine des recherches morphologiques et physiologiques sur l'homme et les animaux (Anatomie, Biologie générale, Embryologie, Histologie, Physiologie, Psychologie, Zoologie systématique et expérimentale).

Depuis 1928, le »*Bulletin International*« ne contient que les communications dont l'étendue ne dépasse pas une limite strictement définie; les mémoires de plus vaste envergure sont réunis en un Recueil différent, les »*Mémoires*« de l'Académie Polonaise des Sciences et des Lettres (Classe des Sciences Mathématiques et Naturelles). Les *Mémoires* sont également publiés en deux séries: A et B. Chaque mémoire publié dans les *Mémoires* se vend séparément.

Les abonnements relatifs au »*Bulletin International*« sont annuels et partent de Janvier. Les livraisons de ce Recueil se vendent aussi séparément.

Adresser les demandes à l'Académie ou à la Librairie »Gebethner et Wolff« Rynek Gł., Cracovie (Pologne).