

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Greifswald. — Direktor:
Prof. Dr. E. Leupold.)

Untersuchungen über die Bestandteile des embryonalen Gewebesaftes und seine Bedeutung für wachsende Gewebe¹.

Von
Dr. H. Guillery,
Privatdozent.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. Juni 1929.)

Die neueren Arbeiten über die zum Wachstum des ausgepflanzten Gewebestückes notwendige Beschaffenheit der Nährböden versuchen mehr und mehr zu zeigen, daß dem Embryonalextrakt eine Sonderstellung unter den Bestandteilen des Nährbodens nicht zukommt. Dieses Ergebnis ist schon teilweise in älteren Arbeiten (*Kuczynski* u. a.) gewonnen, später besonders von *Baker* und *Carrel* in eingehenden Untersuchungen gesichert worden. In Anlehnung an einen von *A. Fischer* stammenden Bericht über diese Veröffentlichungen läßt sich zusammenfassend sagen, daß die „Proteine“ des Embryonalextraktes, gewonnen durch Eiweißfällung, die für das Wachstum wesentlichen Stoffe darstellen. Die Vermutung entsteht, daß die Stickstoffmengen der „Proteine“ maßgebend sind für das erfolgende Wachstum, denn die messende Untersuchung lehrt, daß die Stickstoffkonzentration solcher Lösungen in bestimmtem Verhältnis steht zum Ausmaß des Wachstums. Die weitere Trennung verschiedener Bestandteile der „Protein-Fraktion“ durch Ultrafiltration und Dialyse ergibt Stoffe verschiedener Wirksamkeit. Die einen von diesen scheinen nur die Wanderungsfähigkeit, vielleicht auch die Teilungsfähigkeit der Zellen zu unterhalten, ein anderer Teil von ihnen ergibt mit den erstgenannten zusammen wirklichen Zuwachs an lebendiger Substanz. Zu den zum Aufbau geeigneten, aus dem „Protein“ stammenden Stoffen gehören die „Proteosen“. Diesen „Proteosen“ des Embryonalextraktes gleichwertige wurden gewonnen aus Eiereiweiß, käuflichem Fibrin, Witte-Pepton und anderem. Daß mit dieser Auffassung die Bedeutung des Embryonalextraktes für das Wachstum erschöpfend gewürdigt ist, kann wahrscheinlich gemacht

¹ Die Arbeit wurde ausgeführt mit Unterstützung durch die Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft.

werden; denn peptisch verdautes Fibrin fördert das Wachstum des ausgepflanzten Gewebstückes sogar stärker als Embryonalextrakt.

Gleichzeitig mit diesen Feststellungen hat sich aber ein bemerkenswerter Unterschied zwischen den Ersatzstoffen und dem Embryonalextrakt gezeigt. Dieser enthält nämlich so wenig wie die vorgenannten unzerlegten Ausgangsstoffe (Fibrin, Eiereiweiß usw.) unmittelbar zum Aufbau verwendbare Stoffe. Vielmehr erfolgt die Zerlegung des Extraktes in solche Stoffe nachweisbar erst in Gegenwart lebender Zellen und wahrscheinlich durch ein Enzym, das als regelmäßiger Bestandteil im Extrakt vermutet wird.

Aus diesen Arbeitsergebnissen geht also hervor, daß nur scheinbar die besondere Bedeutung embryonaler Säfte für das Wachstum zweifelhaft geworden ist, wenn auch die Aufbaustoffe in Form künstlich zerlegter Eiweißabkömmlinge zugeführt werden können. Unverändert bleibt trotzdem der embryonale Gewebesaft dadurch ausgezeichnet, daß er in besonderer und auf die Fähigkeiten der lebenden wachsenden Zellen abgestimmter Weise dem Stoffbedarf der wachsenden Teile entspricht. Der embryonale Gewebesaft versorgt diese Teile mit Stoffen, die während des Wachstums vom Gewebe selbst aufgeschlossen und in unmittelbar geeignete Aufbaustoffe verwandelt werden. Alle Ersatzstoffe, wie Fibrin u. a., können unmittelbar dem Wachstum nicht nutzbar gemacht, können nicht von den wachsenden Geweben aufgeschlossen werden, bedürfen vielmehr der vorhergehenden künstlichen Zerlegung.

Dieser Sachverhalt findet sich zwar nicht in solcher Schilderung in den zuständigen Veröffentlichungen, ergibt sich aber aus deren Inhalt als zwingende Schlußfolgerung. Und damit gleichzeitig entstehen folgende Fragen.

Läßt sich das vermutete Enzym als Bestandteil des embryonalen Gewebesaftes nachweisen?

Läßt sich zeigen, daß die Wirksamkeit dieses Enzyms an die Anwesenheit lebender Zellen gebunden ist?

Löst schlechthin die Anwesenheit von Zellen die Enzymwirkung aus, oder eine bestimmte nachweisbare Zelltätigkeit?

Unter Verzicht auf eine weitere Erörterung der möglichen Folgerungen aus der Beantwortung dieser Fragen läßt sich im voraus aus diesen Antworten eine Bereicherung unserer Kenntnisse vom Wachstumsvorgang erwarten.

Für die Herstellungsweise des Embryonalextraktes, die verschiedene Aufschlüsse über dessen Beschaffenheit enthält, bestehen mehrere Vorschriften. Als der wirksamste wird solcher Extrakt bezeichnet, der gewonnen wird aus Embryonen durch Zerkleinerung bis zu Brei mit der Schere, anschließendes Ausschleudern und Absaugen der erhaltenen Flüssigkeit. Bei einem anderen Verfahren wird die Verwandlung des

Embryo in Brei erreicht mit Hilfe eines Latapie-Apparates, bei dem ein Metallstempel den Embryo durch ein feines Sieb preßt. Die Vorschrift für die dritte und älteste Arbeitsweise sagt, daß der Embryo nach grober Zerstückelung mit der Schere im Mörser mit Sand oder Kieselgur zerrieben werden soll. Aus der vergleichenden Untersuchung dieser Verfahren läßt sich ermitteln, ob das, was als Embryonalextrakt bezeichnet wird, Gewebesaft ist oder Saft von zerstörten Zellen (Abb. 1). Die Angabe von *A. Fischer*, daß solcher Extrakt am wirksamsten ist, der nach dem erstbeschriebenen Verfahren hergestellt wurde, läßt sich leicht bestätigen: Verwendet man in Vergleichsversuchen gleichaltrige Extrakte

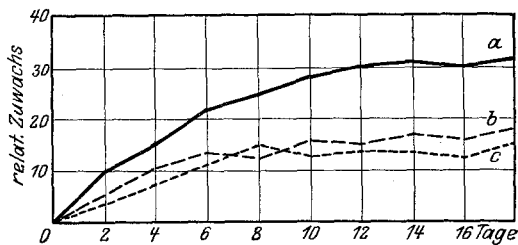


Abb. 1. Wachstumsverlauf bei Extrakten verschiedener Herstellung. Bei *a* Herstellung durch Zerkleinern mit der Schere; bei *b* durch Latapie-Apparat; bei *c* durch Zerkleinern im Mörser mit Sand. Hühnerembryonen vom 7. Bebrütungstag.

gleichaltriger Embryonen, gewonnen durch die 3 verschiedenen Arbeitsweisen, so zeigt sich deutlich, daß die Wachstumsförderung am größten ist bei solchem Saft, der ausschließlich durch Zerkleinerung mit der Schere gewonnen war, vor allem deutlich größer als nach dem Zerreiben im Mörser.

Außer dieser Beobachtung läßt sich für die Frage nach der Herkunft der im Extrakt wirksamen Stoffe noch etwas anderes anführen: unsere Kenntnisse von der Möglichkeit und Schwierigkeit der mechanischen Zerstörung lebender Zellen. Es ist bekannt und leicht nachzuprüfen, daß auch von solchen Geweben, die ausgiebig in der Reibschale bearbeitet wurden, noch reichlich Zellen erhalten bleiben, die nach dem Ausschleudern in Ausstrichen des Bodensatzes gefunden werden, die gelegentlich sogar als unerwünschte Bestandteile bei der Züchtung im Nährboden wieder erscheinen. Auch aus anderen Arbeitsgebieten, z. B. aus Arbeiten über den *Roustumor*, ist bekannt, daß es geradezu schwierig sein kann, die Zellen in solchem mechanischen Verfahren zu zerstören.

Was sich aus diesen Überlegungen und sehr einfachen und eindeutigen Versuchen ergibt, scheint für die gestellten Fragen von nennenswerter Wichtigkeit zu sein. Folgendes darf als erwiesen gelten: Die Zerstörung der Zellen bei der Extraktbereitung gelingt nur unvollkommen. Am

wirksamsten sind solche Extrakte, bei denen die Zellzerstörung am unvollkommensten sein muß. Also ist die Wirkung des beim Gewebezüchten verwendeten zellfreien Extraktes auf embryonalen Gewebesaft zu beziehen. Nicht dagegen dürfen diese Wirkungen auf die Anwesenheit von Stoffen bezogen werden, die aus der Zerstörung von Zellen stammen könnten.

Die Festlegung dieses Sachverhaltes bedeutet eine wesentliche Voraussetzung zu den folgenden Arbeiten. Sollte sich nämlich nachweisen lassen — und diese Frage entsteht nun — daß der Extrakt wirksam ist, weil er zum Aufbau verwendbare Stoffe enthält, so ergäbe sich, daß diese Stoffe nicht aus Zellzerfall oder -zerstörung stammen, sondern „echtes“, im Gewebesaft des Embryo vorhandenes Aufbaumaterial darstellen.

Der Versuch, diese Frage zu klären, d. h. festzustellen, ob im embryonalen Gewebe das Wirksame etwa vorhandene Aufbaustoffe sind oder ein Enzym oder beides, wurde folgendermaßen durchgeführt: Es ist bekannt, daß die Filtration des Gewebesaftes durch Ton- und Porzellanfilter, durch *Chamberland*- und *Berkefeld*-Kerzen die Wirksamkeit herabsetzt. Wie man vermuten muß, ist diese Veränderung teils zu erklären als Adsorptionsfolge, teils unmittelbar bedingt durch die Porengröße der Filter, die den Durchtritt wirksamer Bestandteile verhindert. Daß tatsächlich beide Möglichkeiten der Veränderung des Filtrates durch das Filter verwirklicht sind, läßt sich nachweisen. Prüft man nämlich vergleichend die Wirkung solchen Gewebesaftes, der durch die *Berkefeld*-Kerze geschickt worden war und die Wirkung solchen Saftes, der durch Membranfilter geeigneter Porengröße ging, so zeigt sich ein Unterschied. Der membranfiltrierte Saft ist der wirksamere.

Zu diesem Filtrationsverfahren ist kurz zu bemerken, daß dabei der sog. „Buwa“-Apparat und de Haën'sche Membranfilter verwendet wurden. Der Apparat kann im strömenden Dampf keimfrei gemacht werden und wird nachträglich mit der Filtermembran versehen, die in Formalinlösung keimfrei aufgehoben wird. Das Formalin wird zu Beginn der Filtration mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Die verwendeten Filter waren z. T. solche, deren größte Porenweite in μ die Gewißheit gab, daß ein keimfreies Filtrat auch dann gewährleistet war, wenn oberhalb des Filters nicht keimfrei gearbeitet wurde. Das Arbeiten mit solchen Filtern hat indessen den Nachteil, daß bei ihnen die mittlere Porenweite sehr viel kleiner ist als die größte. So beträgt beispielsweise bei einer größten Porenweite von 2μ die mittlere nur etwa $0,1\mu$. Da man ferner schlecht bestimmen kann, wie zahlreich die Poren größter Weite sind, und da diese keinesfalls zahlreich sind, so haben die geachteten keimdichten Filter Nachteile, die es ratsam machen, solche Filter

vorzuziehen, bei denen die mittlere Porenweite größer und im übrigen ungefähr bekannt ist. Das trifft zu für die sog. Membranfilter „grob“, „mittel“ und „fein“, die bei den genannten und noch zu nennenden Arbeiten deshalb vorgezogen wurden, soweit es die Versuchsanordnung gestattete. Allerdings muß dann auch oberhalb des Filters keimfrei gearbeitet werden. Den genannten Filtern wird nachgesagt, daß sie sich im Gebrauch wenig ändern, und daß sie leicht durch einfache Reinigung ihre ursprüngliche Beschaffenheit wieder erhalten. Im Gegensatz dazu wurde beobachtet, daß die Filter meist schnell verstopft waren und auch durch die Reinigung nicht wieder die alte Filtrationsgeschwindigkeit herzustellen war. Deshalb wurde bei Vergleichsversuchen darauf geachtet, daß durch die vorhergehende Filtration von destilliertem Wasser die Tropfenzahl in der Minute festgestellt war und in allen zum Vergleich gehörenden Einzelversuchen unverändert blieb. So ließ sich vermeiden, daß Flüssigkeiten miteinander verglichen wurden, die auf Grund verschiedenartiger Filtration unvergleichbar geworden waren.

Wenn auch der membranfiltrierte Gewebesaft wirksamer ist, als der durch die Kerze filtrierte, so ist doch seine Wirksamkeit kleiner als die des unfiltrierten Saftes. Auch dieser Befund scheint eindeutig zu sein und zu lehren, daß die Porengröße bei dieser Filtration eine Rolle spielt. Sie muß für die durch Membranfiltration verminderte Leistungsfähigkeit verantwortlich gemacht werden. Und daß unabhängig davon auch die Adsorption Einfluß hat, lehrt die noch mehr herabgesetzte Leistung solchen Saftes, der durch Kerzen filtriert war (Abb. 2).

Der durch die Membran filtrierte Saft, dessen Wirksamkeit zwar kleiner geworden, aber immer noch deutlich ist, hat im übrigen zahlreiche der Eigenschaften behalten, die vor der Filtration nachweisbar waren: Die Eignung als wachstumsfördernder Zusatz zur Kultur bleibt in den ersten 8 Tagen etwa unverändert und nimmt dann wechselnd schnell ab (Abb. 3). Im Brutschrank bei 37° aufgehoben, verschlechtert sich das Filtrat (genau wie der unbehandelte Saft) innerhalb weniger Stunden bis zur Unbrauchbarkeit (Abb. 4). Bei 60° erfolgt sofortige völlige Zerstörung. Alles das weist darauf hin, daß bei der Membranfiltration eine enzymhaltige Flüssigkeit erhalten wurde, deren Wirksamkeit auf ihrem Enzymgehalt beruht.

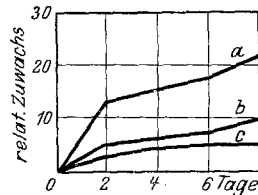


Abb. 2. Wachstumsverlauf bei Embryonalsaft nach verschiedener Filtration; a unfiltriert; b membranfiltriert; c kerzenfiltriert; Hühnerembryonen vom 7. Bebrütungstag.

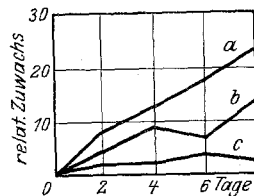


Abb. 3. Einfluß des Alters auf die Wirksamkeit des Embryonalsaftes. Dieser ist bei a = 2 Std., bei b = 48 Std., bei c = 10 Tg. alt. Hühnerembryonen vom 6. Bebrütungstag.

Das geschilderte Verhalten erinnert an die Leukocytenwirkung auf das Wachstum in der Kultur. Auch hierbei scheinen nach den Ergebnissen *Carrels* (Leukocyten)-Fermente wirksam zu sein und die vorhandenen aber nicht ohne weiteres zugänglichen Aufbaustoffe zu erschließen. Entsprechend den Veränderungen, die von den Leukocyten auf einem Nährboden hinterlassen werden, auf dem dann andere Kulturen wachsen können, dürfen auch die Eigenschaften des filtrierten Embryonalsaftes als Fermentwirkungen aufgefaßt werden. Während aber so teilweise Übereinstimmung mit älteren Untersuchungen zu bestehen scheint, zeigt sich an anderer Stelle ein Widerspruch.

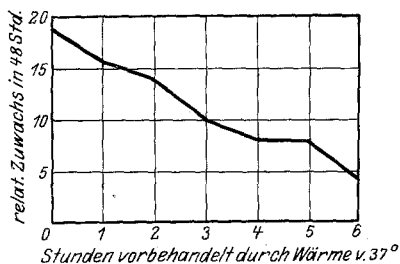


Abb. 4. Einfluß des Alters in der Wärme (37°) auf den Embryonalsaft. Hühnerembryonen vom 6. Bebrütungstag.

Das Verhalten der künstlich verdauten Eiweißlösungen, die als Ersatzmittel an Stelle des embryonalen Gewebesafte verwendet werden, ist nämlich schlecht mit den genannten Eigenschaften des filtrierten Saftes zu vergleichen und zu vereinigen. Diese Ersatzlösungen verändern sich weder bei Zimmertemperatur noch in der Wärme

(70°) in bezug auf ihre Wirksamkeit und lassen auch sonst nicht auf Fermentgehalt schließen. Eine Vermutung, wie dieser Widerspruch zu verstehen sein könnte, ergab bei der Prüfung den erwünschten Aufschluß: Wird nach der Filtration des Gewebesafte das Filter ausgewaschen (mit Locke-Lösung) und bei keimfreiem Arbeiten sodann mit umgekehrter Filtermembran weiterfiltriert und gewaschen, so wird der Filtrerrückstand in der Waschflüssigkeit als Lösungsmittel erhalten. Diese Lösung wurde, nachdem sie auf dem Wasserbad auf geeignetes Volumen gebracht war, nach den Verfahren behandelt, die zur Herstellung sog. „Proteosen“ von *Baker* und *Carrel* angegeben worden sind.

Zur Ausführung dieser Arbeiten gehört eine größere Menge von embryonalem Gewebesaft, dessen Verarbeitung kurz folgendermaßen verläuft: Durch Pepsinverdauung des Filtrerrückstandes in $\frac{n}{20}$ Salzsäurelösung unter Toluol, anschließende Filtration und Neutralisieren mit $\frac{n}{1}$ Natronlauge wird eine Flüssigkeit erhalten, die auf p_H 7,0 eingestellt wird. Durch weitere Filtration, durch Ausschleudern und Eindampfen, läßt sich schließlich eine klare Lösung gewinnen, an der eine Gefrierpunktsbestimmung ergibt, wieviel Wasser oder 10fach konzentrierte Ringerlösung zugesetzt werden muß, damit eine isotonische Flüssigkeit erhalten wird. Diese Bestimmung gestattet, zusammen mit den folgenden, eine Einstellung der Flüssigkeit auf gewünschte Bedingungen, vor allem auf gewünschte Konzentrationen auch bei den hier

verwendeten Ausgangsstoffen, deren Menge und Lösungsgrad im voraus ja nicht genauer bestimmt werden können. Nach Stickstoffsbestimmungen wird auf p_H 7,5 eingestellt und durch Zusatz von Ringerlösung die Konzentration des Gesamtstickstoffes auf 0,6% oder weniger gebracht. (Die ausführliche Schilderung dieser Arbeitsweise findet sich bei *Baker* und *Carrel*, Journ. of exp. Med. 44, 391 und 509, 1926 und bei *A. Fischer*, Gewebezüchtung, Müller u. Steinicke München, 1927 62/63).

Man erhält aus dem Filtrerrückstand bei diesem Verfahren eine Lösung, die in ihren wachstumsfördernden Fähigkeiten den „Proteosen“ von *Baker* und *Carrel* weitgehend ähnlich ist. Das darf gesagt werden zunächst hinsichtlich der Wirkung auf das wachsende Gewebestück. Dessen Wachstum wird nämlich, wie von den künstlich hergestellten „Proteosen“, so auch von diesem künstlich verdauten Filtrerrückstand des embryonalen Gewebesafte mehr gefördert, als von dem unbehandelten Gewebesaft (Abb. 5). Außerdem besitzt auch der künstlich verdaute Rückstand des Gewebesafte eine hohe Festigkeit gegen schädigende Einflüsse. Die Wärme von 70° schwächt seine Wirkung nicht ab, tagelanges Verweilen im Brutschrank bei 37° bringt keine Verschlechterung, und ebensowenig ist eine Veränderung der Wirksamkeit zu finden, nachdem die Flüssigkeit 3 Wochen lang bei Zimmertemperatur aufgehoben war. Auch die Filtration durch Berkefeld-Kerzen hat keine Veränderung mehr zur Folge.

Als Ergebnis dieser Versuche läßt sich also feststellen, daß durch die Membranfiltration zwei Bestandteile des embryonalen Gewebesafte voneinander getrennt werden, die beide zum Wachstum Beziehung haben, aber in verschiedener Weise. Das Filtrat zeigt Enzymwirkungen, soweit man auf diese aus den biologischen Wirkungen und im Vergleich mit den allgemeinen Eigenschaften der Fermente schließen darf. Der Filtrerrückstand enthält Stoffe, die ohne weitere Verarbeitung keine Beeinflussung des Wachstums zeigen, die nach der künstlichen Eiweißspaltung aber das Wachstum stark fördern. Die Vermutung, daß im embryonalen Gewebesaft Eiweißarten vorhanden sind, die weiterer Zerlegung bedürfen, um als Aufbaustoffe brauchbar zu sein, ist damit bestätigt. Und daß es sich bei diesen Stoffen wirklich um solche handelt, die dem Aufbau dienen, darf aus dem Enderfolg, d. h. aus der Vermehrung der organischen, also eiweißhaltigen Substanz erschlossen werden, die als Größenzuwachs durch die Flächenmessung festgestellt wird.

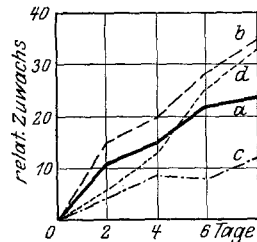


Abb. 5. Beeinflussung des Wachstums durch Embryonalsaft (a), verdautes Fibrin (b), Filtrat (c) und verdauten Filtrerrückstand (d) des Embryonalsafte. Hühnerembryonen vom 7. Bebrütungstag.

In diesem Zusammenhang ist zu dem flächenmessenden Untersuchungsverfahren einiges zu bemerken. Man muß es als nachteilig bezeichnen, daß die Gewebezüchtung allzusehr als Sondergebiet gilt und daß die Beurteilung ihrer Arbeitsergebnisse nicht immer unter den nötigen Voraussetzungen erfolgt. So gilt z. B. für die Flächenmessung des Gewebestückes und ihre Auswertung, daß sie weitgehend unbekannt zu sein scheint. Dadurch entstehen Einwände, die so alt wie das Verfahren selbst, die längst bekannt und in der Berechnung der Fehlerquellen und -grenzen längst berücksichtigt sind, Einwände also, die der Erneuerung nicht bedürfen. So entstehen ferner wiederholte Vorschläge zur Wägung der Gewebestücke, die offenbar von irrigen oder fehlenden Vorstellungen von dem ausgehen, was mit einem Gewebestück und dem ihm anhaftenden Plasma während der Übertragung sinngemäß vorgenommen werden kann und was unterbleiben muß. Zur Klärung dieser Mißverständnisse darf vielleicht gesagt werden, daß die Flächenmessung unter den Untersuchungsarten künstlich gezüchteter Gewebe hinsichtlich der damit erzielten Erfolge an erster Stelle steht. Das gilt trotz des unvermeidbaren Fehlers, den man durch die ausschließliche Berücksichtigung der Fläche und die Vernachlässigung der Schichtdicke begeht. Seine Erklärung findet das in der Möglichkeit, den entstehenden Fehler durch die Art der Einpflanzung und Züchtung möglichst klein zu machen und ihn bei der Auswertung der Versuchsergebnisse zahlenmäßig zu erfassen und zu beachten. Gewiß ist eine Verbesserung des Verfahrens höchst wünschenswert, aber sie ist keineswegs unerlässlich. Erwähnt sei endlich, daß neuerdings *A. Fischer* erneut Verbesserungen der messenden Untersuchung vorgeschlagen hat, die sich aus der mathematischen Behandlung einzelner Erscheinungen am wachsenden Gewebestück und ihrer Zahlenwerte ergeben. Dadurch wird die Genauigkeit der Messung, die sich ohnehin durch ihre Ergebnisse als brauchbar ausgewiesen hat, weiter verfeinert.

Die Bedeutung des Gewebesaffiltrates bleibt nach dem Mitgeteilten noch mehrdeutig. Der Einfluß des Filtrates auf das wachsende Gewebestück darf verstanden werden als Wirkung des vorhandenen Enzyms. Zu denken wäre daran, daß von diesem Stoffe zerlegt und dem Wachstum nutzbar gemacht werden, die sich in der Kultur vorfinden, etwa im Plasma oder in den untergehenden Teilen des wachsenden Gewebestückes. Denkbar wäre aber auch, daß die im Filtrat mutmaßlich vorhandenen Eiweißstoffe in der Kultur erst fermentativ gespalten und verwendbar gemacht werden. Daß dieses letztere zutrifft, läßt sich zeigen. Macht man das Filtrat durch Erwärmen auf 60° unwirksam und unterwirft es dann der künstlichen Pepsinverdauung nach dem Verfahren von *Baker* und *Carrel*, so wird es wieder wirksam (Abb. 6). Daraus darf geschlossen werden, daß die Wirksamkeit des Filtrates

beruht auf einer Zerlegung der in ihm vorhandenen Eiweißstoffe durch das gleichzeitig vorhandene Ferment, und zwar einer Zerlegung, die erst in der Kultur erfolgt.

Ein naheliegender Einwand gegen diesen Schluß muß dabei beachtet werden: Die geschilderte künstliche Verdauung mit Pepsin kann nicht bedeuten, daß dieses an die Stelle des zerstörten, vorher vorhandenen Fermentes gesetzt und in der Kultur wirksam wird, denn bei dem angewendeten Verfahren wird nach der Verdauung das Pepsin zerstört, die verdauten Stoffe gelangen also sicher ohne Beimengung von Pepsin in die Kultur.

Unentschieden bleibt dagegen durch diese Versuche, ob das Ferment des unbehandelten Filtrates auch Bestandteile des Plasma oder untergehender Gewebeteile abbaut und verwendbar macht. Bei der geschilderten Versuchsanordnung müßte sich das der Beobachtung entziehen, und man darf nur feststellen, daß aus dem Abbau organisierter Teile höchstens unbedeutende Mengen der Aufbaustoffe stammen könnten.

Mit diesen Feststellungen ergibt sich eine Abwandlung unserer Vorstellungen von den Trepheonen und Hormonen, die für das Wachstum des ausgepflanzten Gewebestückes eine Rolle spielen. Es ist nämlich nicht statthaft, zur grundsätzlichen Unterscheidung im embryonalen Gewebesaft Trepheon anzunehmen, den stofflichen Wachstumsbedarf von hier aus gewährleistet zu denken, und die Hormone, die treibenden Kräfte der Wachstumskinetik in das Serum d. h. zugleich auch in das Plasma zu verlegen. Diese Gegenüberstellung wäre nur berechtigt, wenn der embryonale Saft ausschließlich Baustoffe zum Wachstum lieferte und nicht, wie es sich nachweisen läßt, gleichzeitig durch seinen Enzymgehalt beteiligt wäre. Vielmehr muß gesagt werden, daß von den Körperflüssigkeiten, die als Bestandteil der Gewebekultur Verwendung finden, der embryonale Gewebesaft ausgezeichnet ist vor den übrigen durch seine zweifache Bedeutung, durch seine Beteiligung an zwei für das Wachstum wichtigen Ereignissen. Deren eines ist das Angebot notwendiger Stoffe, das unseres Wissens nie in unmittelbar verwendbarer Form erfolgt. Das zweite ist das Angebot solcher Kräfte (Enzyme), die durch Abbau unmittelbar verwendbare Stoffarten entstehen lassen.

Daß im embryonalen Gewebesaft die Eiweißspaltung nicht anders ausgelöst werden kann, als durch das wachsende Gewebestück, bedarf kaum des Beweises. Frisch bereiteter Saft hat keine schlechtere Wirkung als älterer, sondern eher umgekehrt, und auch durch Einwirkung höherer, nicht zerstörender Temperatur wird keine Verbesserung er-

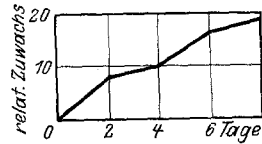


Abb. 6. Wirkung von filtriertem und erhitztem (60°) Embryonalsaft nach der Pepsinverdauung. Hühnerembryonen vom 7. Bebrütungstag.

zielt. Daraus entsteht die Frage, welcher Art die Einwirkung unbekannter Bestandteile der Gewebekultur auf die eiweißspaltende Fähigkeit des Embryonalsaftes sein könnte.

Bringt man bei Zimmertemperatur im Reagensglas kleine Stücke frischen Embryonalgewebes in Lockesche Lösung, so findet man nach 24 Stunden in der membranfiltrierten Lösung keine Anzeichen des Eiweißabbaues mit Hilfe der qualitativen Eiweißproben. Das besagt, die Gewebestücke sind nicht oder nicht in nennenswertem Maße zerfallen, was auch die mikroskopische Untersuchung bestätigt. Bringt man dagegen Gewebestücke unter sonst gleichen Bedingungen in embryonalen Gewebesaft, so zeigt sich nach 24 Stunden ein deutlicher, wenn auch nicht starker Abbau. Nichts spricht dafür, daß sich die Gewebestücke in dieser Flüssigkeit schlechter gehalten hätten, stärker zerstört worden wären, auch dem mikroskopischen Befund nach nicht. Vielmehr scheint der Versuch zu lehren, daß die Gegenwart lebender Gewebeteile den Gewebesaft zu einer Umwandlung veranlaßt hat, die sonst ausbleibt und also auf die aktivierende Einwirkung der Gewebeteile bezogen werden muß. Dieser Versuch und sein Ergebnis finden eine Bestätigung in einer Angabe von *A. Fischer*, betreffend die Herstellung von Extrakt. Nach dem Zerkleinern der Embryonen mit der Schere und dem Ausschleudern des hergestellten Breies soll die obenstehende Flüssigkeit abgesaugt werden, da sie sich sonst nicht hält, sondern bei längerer Berührung mit dem Bodensatz an Wirksamkeit verliert und sich ihre Reaktion nach der sauren Seite verschiebt. Auch hier darf eine gleichartige Einwirkung überlebender Zellen vermutet werden.

Wenn dadurch sichergestellt ist, daß erst die Gegenwart von Zellen den Gewebesaft wirksam macht, so fragt sich weiter, welche Bedeutung die Zellen dabei haben. Anzunehmen ist, daß kein regelrechtes Wachstum zustande kommt, weil bei der genannten Versuchsanordnung Plasma nicht verwendet wird und weil auch sonst nicht irgendeiner der zum Wachstum nötigen Gerüststoffe zugegeben wurde. Aber die Zellen werden bei der geschilderten Anordnung und Temperatur überleben. Das läßt sich beweisen aus Züchtungen, zu denen man nach Ablauf des 24 Stunden lang währenden Versuches diese Gewebestücke verwendet. Sie wachsen in der Deckglaskultur regelrecht. Demnach beruht die Auslösung der verdauenden Kraft des Embryonalsaftes auf einer Einwirkung der lebenden Zellen. Durch die Verwendung verschiedenartiger Zellen sollte genaueres darüber in Erfahrung gebracht werden. Benutzt man in einer Versuchsreihe embryonales Gewebe als Zusatz zum Gewebesaft und in einer anderen Gewebe vom erwachsenen Tier (Muskel vom ausgewachsenen Huhn), so zeigt sich ein Unterschied. Die Menge nachweisbarer Eiweißabbaustoffe ist bei Verwendung er-

wachsenen Gewebes kleiner als bei embryonalem, oder, vorsichtiger gesagt, scheint kleiner zu sein. Aus den genannten Eiweißprüfungen, die ja zu quantitativen Untersuchungen untauglich sind, lassen sich natürlich nur von ungefähr Aufschlüsse der gesuchten Art erhalten. Indessen waren die Verschiedenheiten groß genug, um solche Unterschiede vermuten zu lassen. Aus diesen würde sich ergeben, daß das embryonale, d. h. besser wachsende Gewebe, den Saft in seiner Wirksamkeit mehr fördert, als das schlechter wachsende Gewebe des älteren Körpers. Ebenfalls nur vermutungsweise darf dabei erinnert werden an die optischen Einflüsse, die von wachsenden Teilen ausgehen und im End-erfolg das Wachstum oder nach Meinung von *Gurwitsch* die Zellteilung fördern. Untersuchungen darüber und über die angedeuteten quantitativen Verhältnisse lagen nicht im Plane der hier mitgeteilten Arbeiten. Sie werden nur genannt, um zu zeigen, wie sie sich aus diesen unmittelbar ergeben, und an welcher Stelle des Wachstumsvorganges etwa Strahlungswirkungen in das Gesamtgeschehen eingefügt sein könnten.

Überblickt man die Ergebnisse des hier Mitgeteilten, so muß obenan gestellt werden, daß die im sog. Embryonalextrakt wirksamen Bestandteile nicht aus der Zellzerstörung stammen, sondern aus den in der Gewebeflüssigkeit des Embryo vorhandenen Stoffen. Durch verschiedenartige Filtrationsverfahren gelingt es, zwei wesentlich verschiedene Anteile des embryonalen Gewebesaftes voneinander zu trennen. Deren einer, der leichter filtrierbare, enthält ein Enzym, von dem gezeigt werden kann, daß es die übrigen Bestandteile z. T. zu verwendbaren Aufbaustoffen abzubauen vermag. Der zweite Anteil enthält Eiweißstoffe, die durch die ebengenannte Einwirkung zu Aufbaustoffen werden. Der auch künstlich mögliche Abbau des Filtrerrückstandes beweist die Richtigkeit dieser Annahme durch den Wachstumserfolg, der mit solchen Lösungen am Gewebestück erzielt wird. Die zweifache Bedeutung des Embryonalsaftes für das Wachstum gezüchteter Gewebe ergibt eine Sonderstellung dieser Flüssigkeit unter den übrigen, das Wachstum fördernden Stoffen. Auch die Wechselwirkung zwischen Gewebesaft und wachsenden Teilen läßt sich genauer verfolgen, indem sich der aktivierende Einfluß lebender Zellen auf die abbauende Fermenttätigkeit des Embryonalsaftes nachweisen läßt. Die Wirksamkeit der Zellen bei diesem Geschehen hängt scheinbar von ihrem Wachstum oder doch von ihrer Wachstumsfähigkeit ab.

Schrifttum.

Baker, L. E. and Carrel, A., Action on fibroblasts of the protein fraction of embryonic tissue extract. J. of exper. Med. 44, 387—395 (1926) — Effect of the aminoacids and dialysable constituents of embryonic tissue juice on the growth

of fibroblasts. J. of exper. Med. **44**, 397—407 (1926) — Effect of leber and pituitary digerts on the proliferation of sarcomatous fibroblasts of the rat. J. of exper. Med. **47**, 371 (1928). — *Carrel, A.*, Rôle des trèphones leucocytaires. C. r. Soc. Biol. Paris **1**, 29—31 (1924) — The method of tissue culture and its bearing on pathological problem. Studies from the Rockefeller Institute **53**, 253—275 (1925). — *Carrel, A.* and *L. E. Baker*, The chemical nature of substances required for cell multiplication. J. of exper. Med. **44**, 503—521 (1926). — *Demuth, F.* und *I. v. Riesen*, N-Stoffwechsel in vitro gezüchteter Gewebe. Arch. exper. Zellforschg. **6**, 146 (1928). — *Fischer, A.*, Gewebezüchtung; Müller und Steinicke, München, 1927. — *Fischer, A.* und *Buch-Andersen*, Über die Wachstums- und Hemmungsfunktion bei Gewebekulturen in vitro. Arch. Entw.meehan. **114**, 26 (1928). — *Kimura, R.*, Über Einflüsse der Zellstoffwechselprodukte auf das Gewebewachstum in vitro. Arch. exper. Zellforschg. **7**, 98 (1928). — Vgl. im übrigen das Literaturverzeichnis meiner Arbeit Virchows Arch. **270**, 355 (1928).
