

DNS-, RNS-, und Protein-Stoffwechsel im normalen und im atmungsgestörten Wirbeltierkeim (nach histoautoradiographischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen)

Autor(en): **Büchner, Franz**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie Suisse des Sciences Medicales = Bollettino dell' Accademia Svizzera delle Scienze Mediche**

Band (Jahr): **22 (1966)**

PDF erstellt am: **21.06.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-307638>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

**DNS-, RNS- und Protein-Stoffwechsel im normalen und im
atmungsgestörten Wirbeltierkeim**
(nach histoautoradiographischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen)¹

FRANZ BÜCHNER, FREIBURG I. BR.

In meinem Referat darf ich Ihnen über histoautoradiographische und elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Stoffwechsel der Desoxyribonucleinsäure und der Ribonucleinsäure im normalen und im atmungsgestörten Wirbeltierkeim berichten. Diese Untersuchungen konnte ich in den letzten beiden Jahren mit meinen Mitarbeitern HIROSHI HARA und MASAMICHI SASAKI durchführen². Nach Darstellung unserer Befunde werde ich versuchen, die Ergebnisse in eine allgemeine Pathogenese der Mißbildungen einzuordnen.

1. Im Jahre 1936 hat H. SPEMANN in seinem Buch «Experimentelle Beiträge zu einer Theorie der Entwicklung» seine jahrzehntelangen Forschungen auf dem Gebiete der Entwicklungsphysiologie zusammengefaßt und zu den wichtigsten vorausgehenden und gleichzeitigen Ergebnissen dieser Wissenschaft, wie sie seit deren Begründer WILHELM ROUX erarbeitet worden waren, in Beziehung gesetzt. Die Monographie von SPEMANN ist in erster Linie auf die makroskopisch und histologisch faßbaren Wachstums- und Differenzierungsvorgänge bei der Wirbeltierentwicklung konzentriert. Dabei geht es SPEMANN vor allem darum, die innerorganismischen Wechselbeziehungen der einen Keimregion zu der anderen und die von ihm entdeckten Induktionwirkungen bestimmter Keimbezirke auf ihr Nachbargewebe darzustellen und verständlich zu machen bis hin zu den Experimenten, durch die die Bedeutung des dorsalen Entomesoderms der Gastrula als Organisators der Entwicklung des Zentralnervensystems aus dem dorsalen Ektoderm von ihm selbst und seinen Mitarbeitern bewiesen worden war. Die entwicklungsphysiologische Forschung war also in erster Linie morphologisch-morphogenetisch orientiert.

Parallel mit ihr waren andere Arbeiten schon seit dem Ende des 19. Jahrhunderts mit Problemen der Biochemie und Pathochemie des Wirbeltierkeimes beschäftigt. Sie waren also biochemisch-morphogenetisch ausgerichtet. Ich erinnere hier zunächst an die frühen Untersuchungen von

¹ Herrn Professor Dr. Dr. h. c. Georg von Hevesy zum 80. Geburtstag gewidmet.

² Für die Ermöglichung dieser Arbeiten sage ich dem Bundesministerium für Wissenschaftliche Forschung und der Deutschen Forschungsgemeinschaft besten Dank.

J. LOEB (1894, 1896) über die Empfindlichkeit von Fischembryonen gegen Sauerstoffmangel, in deren Schlußfolgerungen sich unter anderem die weit vorausschauende Bemerkung findet, «daß in gewissen Fällen durch Mangel an Sauerstoff zunächst *molekulare* und weiter morphologische *Änderungen in den Zellen herbeigeführt werden, die ihrerseits erst die Ursache sind, daß die Lebenserscheinungen zum Stillstand kommen*» (von J. LOEB gesperrt!). Ich erinnere ferner an die Forschungen von CHILD über die Gradienten für den Stoffwechsel der Atmung, des Dotterabbaues und des Glykogens am Amphibienkeim (1924ff.), von NEEDHAM über den Dotterstoffwechsel des Hühnchens (1931ff.) und vor allem an die Untersuchungen von J. BRACHET über den Nucleinsäurestoffwechsel im Wirbeltierkeim (1944, 1950, 1960).

Unter dem Einfluß von CHILD wurde die Abhängigkeit des Wirbeltierkeimes von der Stoffwechselintensität schon vor vier Jahrzehnten in Arbeiten von HUXLEY (1927, 1930), GILCHRIST (1928ff.) und W. VOGT (1927ff.) dadurch bewiesen, daß Amphibienkeime an dem einen oder dem anderen Keimpol abgekühlt oder erwärmt wurden: Der abgekühlte Keimpol verlangsamte seine Entwicklung, der erwärmte beschleunigte sie, so daß sich sogenannte Alterschimären entwickelten, d. h. Larven mit unterentwickelter Kopffregion oder verkümmertem Schwanz, je nachdem, welcher Keimpol im Experiment benachteiligt wurde.

Daß die Atmungsenergie für den Wirbeltierkeim eine *Conditio sine qua non* darstellt, hatte freilich schon TH. SCHWANN 1834 in seiner Doktordissertation unter JOHANNES MÜLLER am Berliner Physiologischen Institut gezeigt. Er hat nachgewiesen, daß der Hühnchenkeim in einer reinen Stickstoff-, Wasserstoff- oder Kohlensäureatmosphäre zunächst seine Entwicklung einstellt und nach kurzer Zeit zugrunde geht. BRACHET hat 1934 für den Amphibienkeim am Frosch ergänzend festgestellt, daß unter Sauerstoffabschluß zwar die Bildung der Morula und der Blastula makroskopisch noch normal verläuft, daß dagegen die Gastrulation schon schwer gestört ist und die Neurulation nicht mehr gelingt und der Keim abstirbt.

Daß Zustände des temporären Sauerstoffmangels am Wirbeltierkeim zu Mißbildungen führen können, hatten schon eine Reihe von Arbeiten mit makroskopischer Untersuchung der Keime ergeben, so an Amphibienkeimen SCHULTZE 1898, an Fischkeimen STOCKARD 1921. Um jedoch exaktere Einblicke in die Wirkung eines temporären Sauerstoffmangels am Wirbeltierkeim zu gewinnen, waren systematische histologische Serienuntersuchungen an temporär atmungsgestörten Wirbeltierkeimen in verschiedenen Phasen der Keimentwicklung notwendig. Solche Untersuchungen haben wir seit 1946 an Amphibienkeimen, und zwar an Triturus, seit 1951 gemeinsam mit RÜBSAAMEN und unseren Mitarbeitern an Hühnchenkeimen durchgeführt, an den letzteren mit einem Sauerstoffmangel von nur 3–5 Stunden Dauer. Die hervorgerufenen Mißbildungen entsprachen in ihrem Erscheinungsbild den vom Menschen her bekannten, sie traten phasenspezifisch auf, je nachdem, in welcher Entwicklungsphase die temporäre Atmungsstörung gesetzt wurde, so daß nach Sauerstoffmangel in der Frühentwicklung schwere Mißbildungen des Hirns und des Rückenmarks sowie der Kopf-Sinnesorgane, in der späteren Entwicklung Mißbildungen an den Extremitäten,

besonders auch Amelien und Phokomelien, am Herzen, an der Nierenanlage, am Darm und feinere, nur mikroskopisch faßbare Mißbildungen des Zentralnervensystems nachgewiesen werden konnten (BÜCHNER u. Mitarb. 1946; BÜCHNER 1948, 1950, 1957, 1958, 1964; RÜBSAAMEN 1948, 1950, 1952; MAURATH und REHN 1949; NAUJOKS 1953; MUSHETT 1953; SCHELLONG 1954; F. M. Büchner 1955; DIETSCH 1955). Sehr bald haben unsere Beobachtungen an verschiedenen Arbeitsstätten in Experimenten an Säugern ihre Bestätigung, Ergänzung und Vertiefung gefunden, so in Basel durch WERTHEMANN 1950, in Boston durch INGALLS 1950, 1952, 1957, in Bonn und Münster durch DEGENHARDT 1954, 1955, 1961, in Nagoya durch MURAKAMI 1954, 1963 und ihre Mitarbeiter.

Die Frage, auf welche Weise eine temporäre Atmungsstörung, also z. B. durch Sauerstoffmangel, entwicklungsstörend und teratogenetisch wirksam werden kann, blieb zunächst offen. Untersuchungen von Herrn und Frau TIEDEMANN 1954, 1956 sowie DUSPIVA u. Mitarb., zuletzt von HAGENS u. Mitarb. 1965 konnten aber dann mit biochemischen Methoden die typischen Stoffwechselstörungen an Amphibienkeimen durch temporäre Atmungshemmung mit Blausäure aufklären: Während der Atmungshemmung kommt es am Keim, wie es schon länger für den Erwachsenenorganismus bekannt ist, zur Senkung des Adenosintriphosphats (ATP) und zu einer zunehmenden Anreicherung aerob nicht vorhandener Milchsäure. Nach Auswaschen der Blausäure und Rückkehr zur Normalatmung kehrt in der Regel in kurzer Zeit die ATP-Konzentration auf ihre normale Höhe zurück, und die Milchsäure verschwindet wieder.

Schon BRACHET hat durch seine Untersuchungen zu begründen versucht, daß besonders die Nucleinsäuresynthesen im sich entwickelnden Wirbeltierkeim auf Atmungsprozesse angewiesen sind. In Untersuchungen von LEDER 1955 konnten wir diese Auffassung histologisch cytologisch an Amphibienkeimen stützen. DUSPIVA hat dann 1959 mit biochemischer Methodik gezeigt, daß der Einbau von C^{14} in die Nucleinsäuren und Proteine während der Hemmung der Zellatmung durch Blausäure sehr stark gesenkt wird, daß dagegen nach dem Auswaschen der Blausäure mit der Erholung der Atmung der physikalisch gemessene Einbau von C^{14} in die Nucleinsäuren und Proteine wieder auf normale Werte ansteigt. Auch histoautoradiographisch, vor allem durch Markierung mit C^{14} oder S^{35} , wurde versucht, Einblicke in den Nucleinsäurestoffwechsel normaler Keime zu gewinnen (FICQ 1954; SIRLIN und WADDINGTON 1954, 1956; SIRLIN 1955; TENCER 1958). Doch waren diese ersten Untersuchungen noch unbefriedigend. Bessere Ergebnisse erzielten DUSPIVA und WILLER an normalen und atmungsgestörten Keimen von *Xenopus laevis* (1961, 1962). Aber auch ihre Befunde waren deshalb vieldeutig, weil sie mit C^{14} gearbeitet hatten und deren Einbau nicht elektiv auf eine Komponente des Systems Desoxyribonucleinsäure (DNS), Ribonucleinsäure (RNS) und Protein bezogen werden konnte. Genaue Aussagen waren daher erst durch Zufuhr tritium-markierter Vorstufen des DNS-, RNS- oder Proteinstoffwechsels zu erwarten.

So haben wir mit Herrn HARA den Stoffwechsel des Reproduktionssystems DNS, RNS und Protein systematisch mit tritiummarkierten Vorstufen an Amphibienkeimen, und zwar an *Triturus helveticus* untersucht, zunächst an Normalkeimen, dann an temporär atemungsgestörten Keimen. Im ganzen verfügen wir über mehr als 600 vollständige Schnittserien histoautoradiographisch markierter Keime.

In den Experimenten wurde bei Normalkeimen in der Frühentwicklung ^3H -Thymidin während 3 Std., in der Spätentwicklung während 8 Std. zugeführt, während der Frühentwicklung an Keimen, an denen die Eihüllen entfernt waren. Der Sauerstoffmangel wurde bei atemungsgestörten Keimen durch eine Sauerstoffkonzentration von 8–2% bei 18–23° C herbeigeführt, in den letzten 3 bzw. 8 Std. unter Zusatz von ^3H -Thymidin. Außerdem wurden Keime untersucht, denen unmittelbar oder einige Zeit nach Sauerstoffmangel unter wiedereinsetzender Normalbeatmung ^3H -Thymidin dargeboten wurde.

3. Das erste wichtige Ergebnis unserer Untersuchungen war die Herausarbeitung der Synthesemuster für die DNS-Verdoppelung in den Kernen der verschiedenen Keimregionen während der einzelnen Entwicklungsphasen im Histoautoradiogramm von *Triturus helveticus*. Schon in der Blastula ist im dorsalen Keimbezirk die histoautoradiographisch nachweisbare DNS-Verdoppelung zur Vorbereitung von Mitosen deutlich intensiver als im ventralen Keimbereich. Während der Gastrulation tritt dann vorübergehend die Markierung der in den Keim einwandernden Zellen des künftigen Entomesoderms ganz in die Führung: Ihre Kerne lassen eine intensive Markierung durch ^3H -Thymidin erkennen, während sie sich allmählich dem dorsalen Ektoderm unterlagern. Daraus geht hervor, daß die Materialbewegung während der Gastrulation nicht einfach eine Zellverschiebung, sondern eine intensive Zellvermehrung darstellt, vor allem auch in den Zellen, die bald als Spemannscher Organisator die Entwicklung des Zentralnervensystems induzieren. Dabei taucht die vielfach geäußerte Vermutung auf, ob nicht die Intensität der Nucleinsäurenverdoppelung in dem unterlagernden Zellmaterial die induzierende Wirkung des Organisatorgewebes bewirkt.

Noch ehe das dorsale Ektoderm der Gastrula sich morphologisch von dem übrigen Ektoderm unterscheidet, also während der Entwicklung des präsumptiven Neuralgewebes, zeigt dieser Keimbezirk in der älteren Gastrula besonders lebhaftere DNS-Verdoppelungen. Erst recht sieht man über vielen Kernen der eben vom übrigen Ektoderm abgesetzten Neuralplatte im Histoautoradiogramm eine markante Silberkornschwärzung. Diese konzentriert sich im nächsten Entwicklungsschritt in die inzwischen sich abhebenden und aufeinanderzuwachsenden beiderseitigen Neuralwülste. In einem weiteren Schritt der Neurulation sind dann die Wandzellen des Neuralrohres, also die Anlage des Zentralnervensystems, durch eine lebhaftere Verdoppelung der DNS in Vorbereitung der Zellvermehrung und der Bildung von Neuralzellen und Gliazellen gekennzeichnet (Abb. 1). Nach Abschluß der Neurulation entwickelt sich dann ein zweiter Keimpol, der äußerlich als Schwanzknospe sichtbar wird. Dieser Keimbezirk zeigt jetzt vorübergehend in den

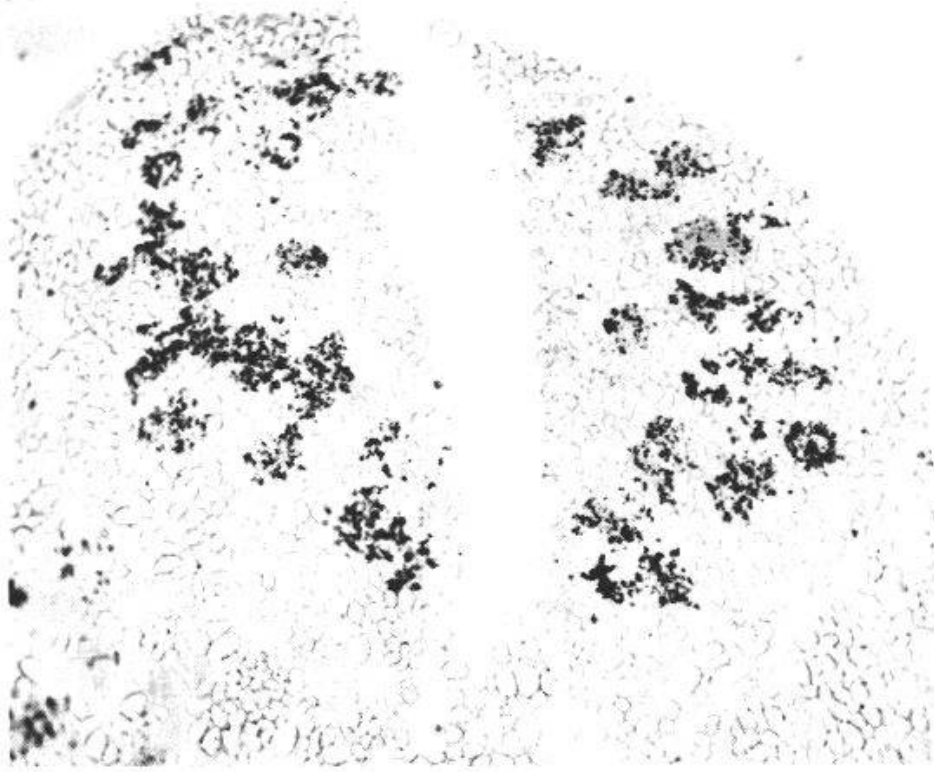


Abb. 1. Normaler Keim von *Triturus helveticus* im älteren Neurulastadium (Harrison-Stadium 22) nach 3stündiger Einwirkung von ³H-Thymidin in Holtfreter-Lösung bei 21° C. Über den Kernen der Neuralzellen des frontal durchschnittenen Neuralrohres zahlreiche Silberkörner durch Einbau von ³H-Thymidin im Histoautoradiogramm (nach BÜCHNER und HARA 1965).



Abb. 2. Keim von *Triturus helveticus* im älteren Neurulastadium (Harrison-Stadium 22) nach 24 Std. O₂-Mangel. Sauerstoffkonzentration 5,9% bei 24,5-25° C. Kein Einbau von Tritium-Thymidin, trotz dessen Einwirkung in den letzten 3 Std. des Sauerstoffmangels, an den Kernen der Neuralzellen des Neuralrohres. Feines schwärzliches Pigment = physiologisches Pigment des Neuralrohres (nach BÜCHNER und HARA 1965).

Histoautoradiogrammen der Schnittserien eine gleich intensive DNS-Verdoppelung wie die Hirnanlage, während die dazwischenliegende Rückenmarksanlage nur spärliche DNS-Verdoppelungen erkennen läßt.

Damit sind die wichtigsten Schritte der normalen Frühentwicklung des Trituruskeimes im Histoautoradiogramm gekennzeichnet. Es war in unseren Experimenten anschließend die Frage zu prüfen: Welche Wirkung übt in der Frühentwicklung ein vorübergehender Sauerstoffmangel des Keimes auf die DNS-Verdoppelungen aus? Nach einem temporären Sauerstoffmangel in der oben angegebenen Konzentration von 24 Std. Dauer waren in den Schnittserien nach Zusatz von ^3H -Thymidin während der letzten 3 Std. des Sauerstoffmangels in der Frühentwicklung DNS-Synthesen überhaupt nicht mehr nachweisbar, und zwar in allen Stadien der Frühentwicklung von *Triturus helveticus* (Abb. 2). Wurden die Keime nach der Sauerstoffmangelphase wieder normal beatmet, so kam in kurzer Zeit die DNS-Synthese wieder lebhaft in Gang, so daß schon nach 10–15 min. in den histoautoradiographischen Serien das für die Entwicklungsphase charakteristische DNS-Synthesemuster wieder sichtbar wurde, wenn auch nicht so markant

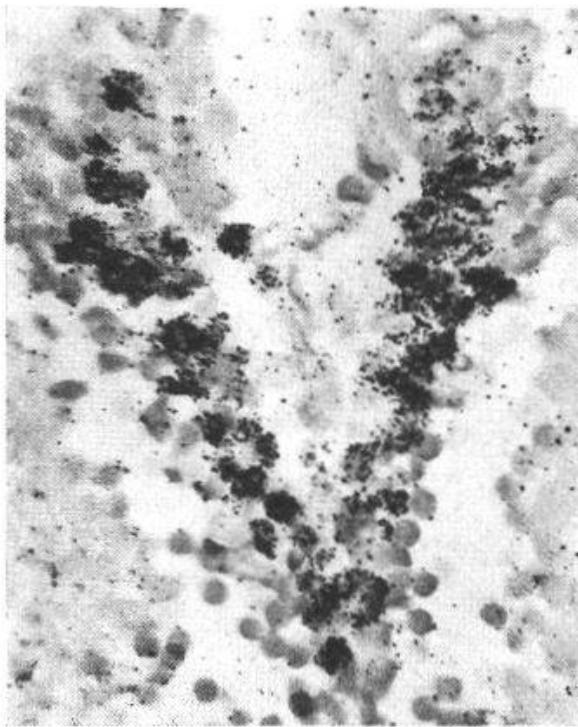


Abb. 3



Abb. 4

Abb. 3. Normale Larve von *Triturus helveticus* 23 Tage nach der Eiablage, von 9,5 mm Länge. Einwirkung von ^3H -Thymidin in Holtfreter-Lösung während 8 Std. bei 21–23° C. Starker Einbau von ^3H -Thymidin in den inneren Zellen der Neuralanlage mit intensiver Silberkornbildung im Histoautoradiogramm. Elektive Markierung der Indifferenzzone (nach HARA 1965).

Abb. 4. Larve von *Triturus helveticus* 26 Tage nach der Eiablage von 9 mm Länge nach 32stündigem O_2 -Mangel. Trotz Einwirkung von ^3H -Thymidin in den letzten 8 Std. des O_2 -Mangels keine Markierung über den Kernen der Neuralanlage (nach HARA 1965).

wie bei Normalkeimen mit 3stündiger Einwirkung von ^3H -Thymidin. Wurden Keime alsbald nach durchgemachtem Sauerstoffmangel 3 Stunden lang ^3H -Thymidin ausgesetzt, so war in der Regel die DNS-Synthese bei ihnen überschießend, also in der Zeiteinheit intensiver als in Normalkeimen.

Bei Keimen nach dem Schlüpfen hat Herr HARA nach 8stündiger Einwirkung von ^3H -Thymidin die DNS-Synthesen während der Organogenese in den histoautoradiographischen Serien erfaßt. An der Anlage von Hirn und Rückenmark zeigte sich eine zunehmende Einschränkung der DNS-Synthesen auf die innerste, den Mittelspalt umgebende Zelllage, also auf die Indifferenzzone des sich entwickelnden Zentralnervensystems (Abb. 3), die auf Grund von Mitosezählungen schon von SCHAPER und COHEN 1905 erkannt wurde. Unter Sauerstoffmangel trat ein völliger Stillstand der DNS-Synthese in dieser Zone auf (Abb. 4). Am Augenbecher war in der Frühentwicklung eine lebhaft markierte Kernverteilung zu beobachten, daß markierte Kerne wahllos über die Augenanlage verstreut waren. Mit der Zeit konzentrierten sich die Kerne mit DNS-Verdoppelungen aber immer mehr auf die innerste Schicht der Augenanlage, und bei fortgeschrittener Entwicklung waren nur noch die Umschlagsfalten zwischen der Anlage der Retina und der Chorioidea beiderseits durch Tritium-Thymidin markiert. Auch an der Augenanlage fehlten in den verschiedenen Entwicklungsstadien nach Sauerstoffmangel die DNS-Verdoppelungen. Ähnlich waren die Befunde an der Riechgrube: Nach zunächst diffuser Verteilung der DNS-Ver-

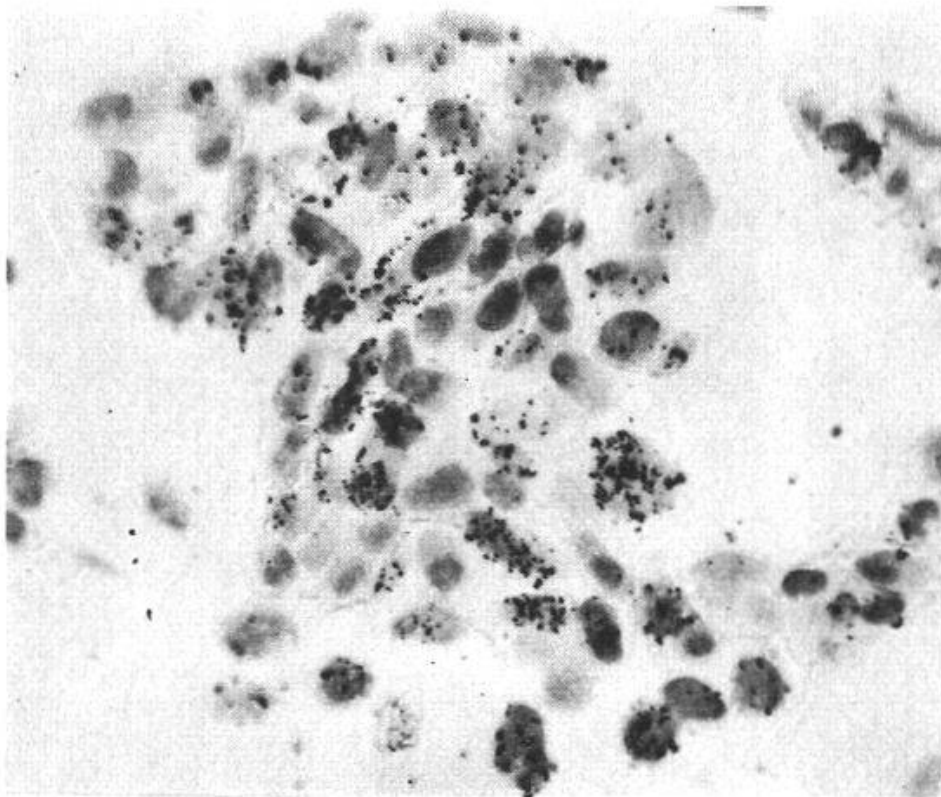


Abb. 5. Herzanlage einer normalen 27 Tage alten Larve von *Triturus helveticus* mit beträchtlichem Einbau von ^3H -Thymidin in vielen Kernen der Herzanlage im Histoautoradiogramm (nach HARA 1965).

doppelungen beschränkten sich diese zunehmend auf die innerste Zellige. Entsprechend waren die Verhältnisse an den inneren Organen, so zeigten der primitive Herzmuskel (Abb. 5) und ebenso die Anlage des Verdauungssystems lebhaft DNS-Verdoppelungen. Auch hier hörten diese unter Sauerstoffmangel auf (Abb. 6). Starke Markierungen waren auch an der Extremitätenknospe, vor allem an den ersten Knorpelzellen, nachweisbar.

Wurden in Untersuchungen von HARA die RNS-Synthesen in der Frühentwicklung durch Tritium-Cytidin markiert, so zeigte sich in der Gastrulation im Früh- und Spätstadium in den verschiedenen Keimbezirken erst nur eine geringe Markierung. Dieser Befund steht in guter Übereinstimmung mit den jüngsten biochemischen Beobachtungen von BROWN und LITTNER 1964, die mit der Methode der Ribonucleinsäuremarkierung und -zentrifugierung in der Gastrula nur einen geringen Umsatz der RNS nachweisen konnten. Mit der Neurulation setzte aber in den autoradiographischen Serien eine deutliche RNS-Synthese in den Zellen des sich entwickelnden Neuralgewebes ein. Diese war auch in weiteren Entwicklungsstadien bei Normalbeatmung der Keime nachweisbar. Wurde dagegen Tritium-Cytidin unter temporärer Atmungsstörung zugeführt, so unterblieb in der Regel die RNS-Synthese, oder sie war stark eingeschränkt. Nach temporärem Sauerstoffmangel kam sie zunächst verzögert, nach einigen Stunden in der Regel überschießend wieder in Gang. Das gleiche konnte HARA einerseits an Normalkeimen, andererseits an Keimen unter Sauerstoffmangel für die Proteinsynthesen durch

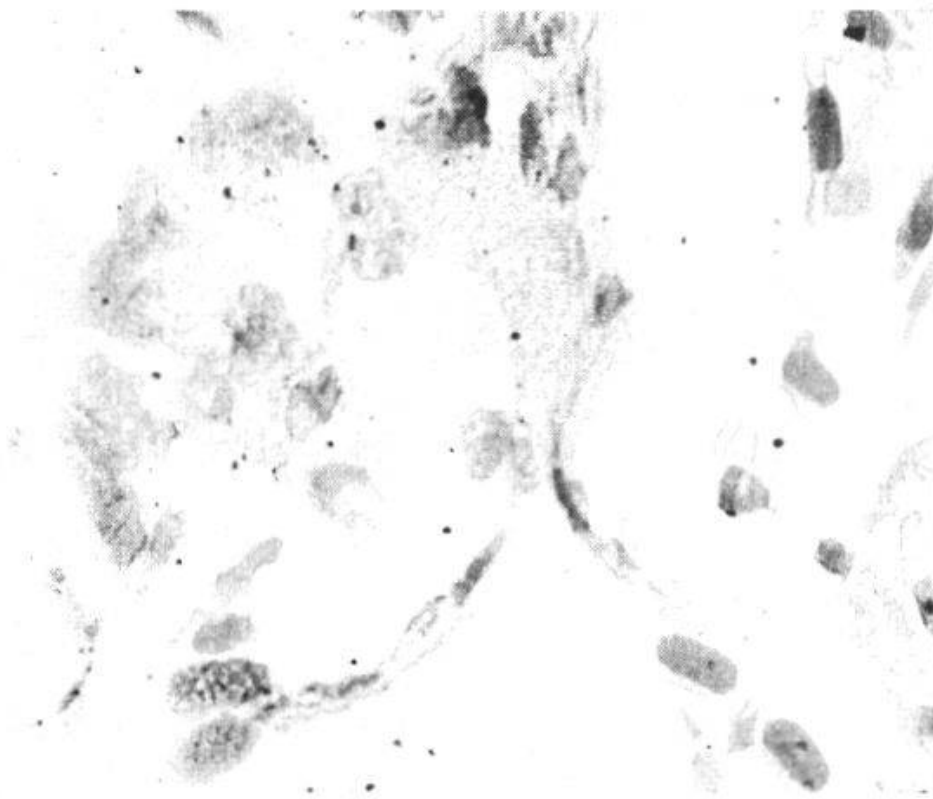


Abb. 6. Herzanlage einer 26 Tage alten Larve von *Triturus helveticus* nach 32stündigem O_2 -Mangel. Trotz Einwirkung von 3H -Thymidin in den letzten 8 Std. des O_2 -Mangels kein Einbau von 3H -Thymidin in Kernen der Herzanlage (nach HARA 1965).

Markierung mit ^3H -Leucin feststellen. Auch hier ergaben die Serienauswertungen eine weitgehende Unterdrückung der Synthesen durch Sauerstoffmangel.

Fassen wir die bisherigen Ergebnisse zusammen, so heben sich die folgenden Tatsachen heraus: Durch ^3H -Thymidin-Markierung der DNS-Synthesen lassen sich im Ablauf der Frühentwicklung von *Triturus helveticus* jeweils diejenigen Keimbezirke lebhaft markiert darstellen, in denen DNS-Verdopplung in größerer Zahl zur Vorbereitung von Mitosen und Zellteilungen im Gange sind. Es stellen sich also durch die DNS-Markierung besonders augenfällig die Brennpunkte der Morphogenese in der Frühentwicklung dar. Das gleiche konnte in der Entwicklung nach dem Schlüpfen für die Organogenese an den verschiedenen Organanlagen beobachtet werden. Was in früheren Untersuchungen nur durch mühsame Mitosezählung erfaßt werden konnte, so in jüngster Zeit durch GOERTTLER u. Mitarb. (GOERTTLER und WEGNER 1963; GROHMANN 1961; KUSE 1962), worüber Herr GOERTTLER auf unserem Symposium Oktober 1963 berichtet hat, wird also hier eindrucksvoll sichtbar, und zwar nicht nur als morphologisches Phänomen, sondern als unmittelbarer Ausdruck des Reproduktionsstoffwechsels in der DNS-Synthese.

Die Untersuchungen haben ferner ergeben, daß in der Früh- und in der Spätentwicklung ein intensiver temporärer Sauerstoffmangel die DNS-Synthesen völlig unterdrückt, während bei Wiederbeatmung mit normaler Atmosphäre in kurzer Zeit in der Regel eine überschießende DNS-Verdopplung sichtbar wird. Die RNS-Synthesen werden nach Markierung durch Tritium-Cytidin während der Neurulation und der ganzen weiteren Entwicklung unter normaler Beatmung deutlich markiert, dagegen durch Sauerstoffmangel unterdrückt und bei Wiederbeatmung in Normalatmosphäre zunächst verzögert, dann nach einigen Stunden überschießend wieder faßbar. Entsprechendes ergibt sich für die Proteinsynthese nach Markierung mit ^3H -Leucin. Nach diesen Untersuchungen erfordert also das Reproduktionssystem des Stoffwechsels, d. h. die Synthese von DNS, RNS und Protein, eine besonders intensive Zellatmung in den sich entwickelnden Keimen. Seine Schädigung durch Aufhören der Synthesen im temporären Sauerstoffmangel und die nachfolgenden überschießenden Übersteigerungen der DNS-, RNS- und Proteinsynthesen mit Strukturverwerfungen sind dann die Grundlage für die Entstehung von Mißbildungen nach temporärer Atmungshemmung.

3. Herr SASAKI und ich konnten in den letzten beiden Jahren elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Entwicklung der Feinstrukturen von *Triturus*-Keimen bei normaler Beatmung und im Sauerstoffmangel durchführen. Dabei interessierte uns in den hier zur Diskussion stehenden Untersuchungen vor allem die allmähliche Differenzierung der Feinstruktur im Ablauf der Gastrulation und der Neurulation bis zum Schlüpfen der Keime und anschließend im Larvenstadium elektiv an den präsumptiven Neuralzellen der Gastrula, also an den neuroektodermalen Zellen, an deren Abkömmlingen in der Neuralplatte, im Neuralwulst und im Neuralrohr sowie an der sich

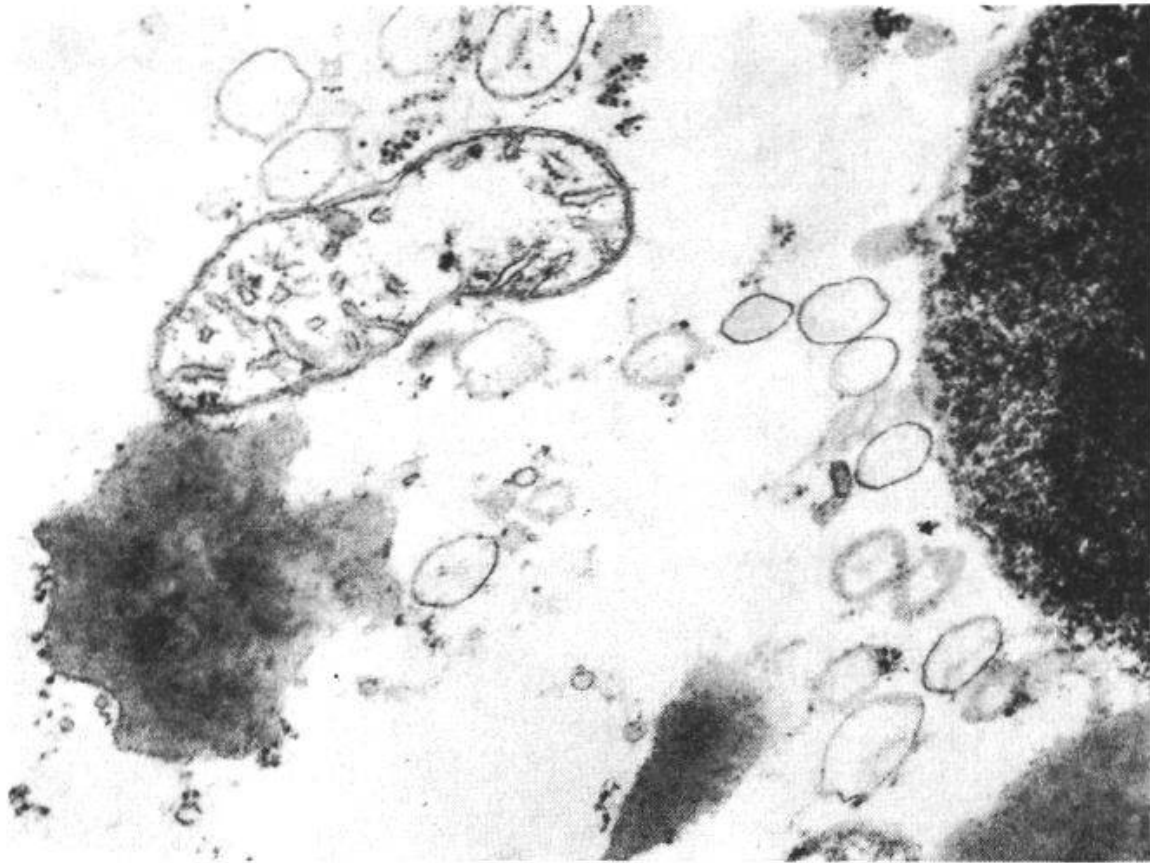


Abb. 7. Ausschnitt aus neuroektodermaler Zelle von normalem *Triturus-helveticus*-Keim im späten Gastrulastadium im elektronenmikroskopischen Bild (1:34 000). Oben Mitochondrium mit noch spärlichen Cristae mitochondriales und auffallend heller Matrix. Darüber und rechts zahlreiche Vesikel des endoplasmatischen Reticulums, noch ohne Anlagerung von Ribosomen. Oben kleine Gruppen von feinen Ribosomen. Rechts angeschnittenes Dotterplättchen. Links und rechts unten Lipidtropfen (nach SASAKI 1965).

differenzierenden Anlage des Zentralnervensystems. Schon KARASAKI hat 1959 allgemein für die Embryonalzelle des Wirbeltierkeims festgestellt, daß an der Gastrula die Feinstrukturen der Mitochondrien sowie des endoplasmatischen Reticulums erst wenig ausgebildet und Ribosomen nur sehr spärlich nachweisbar sind. Für die präsumptiven Neuroektodermzellen konnten wir dies bestätigen (Abb. 7). Dagegen zeigten deren Abkömmlinge während der Neurulation eine deutliche Differenzierung der Mitochondrien: Ihre Cristae mitochondriales werden immer zahlreicher, und die in der Gastrula auffallend helle Matrix wird mehr und mehr osmiophil (Abb. 8). Aus diesen Befunden können wir auf eine zunehmende Intensivierung des in den Mitochondrien lokalisierten Atmungsstoffwechsels an den Neural-epithelien während der Gastrulation schließen. Außerdem unterscheiden sich die Neuralzellen im Stadium der Neurulation von dem präsumptiven Neuroektoderm der Gastrula durch eine zunehmende Ansammlung von Ribosomen in kleineren Gruppen zwischen den Vesikeln des Cytoplasmas, aber nirgends an deren Oberfläche. Diese Veränderungen nehmen besonders nach dem Schlüpfen der Larve intensiv zu, so daß jetzt das ganze

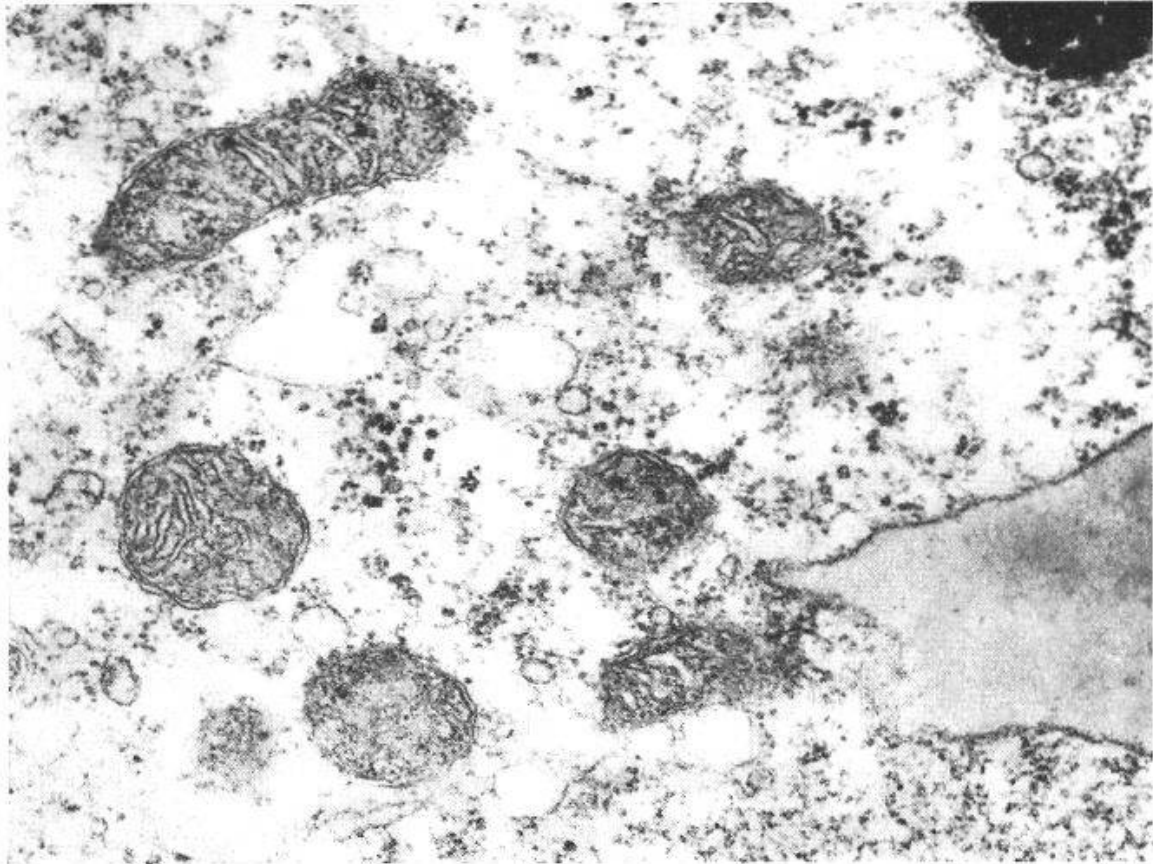


Abb. 8. Ausschnitt aus Neuralzelle der Neuralplatte bei normalem *Triturus-helveticus*-Keim im elektronenmikroskopischen Bild (1:35 000). Mehrere Mitochondrien mit gut entwickelten Cristae mitochondriales und relativ dunkler Matrix. Vesikuläres endoplasmatisches Reticulum. Gruppen freier Ribosomen. Rechts oben Pigmentkörnchen (nach SASAKI 1965).

Cytoplasma dicht von Ribosomen besiedelt ist. Auch entwickeln sich nunmehr mit Ribosomen besetzte Ergastoplasmamembranen (Abb. 9), wie sie für die reife Neuralzelle kennzeichnend sind (NIKLOWITZ 1962 u. a.). Diese starke Ribosomenbesiedlung ist auch in den Dendriten der Neuralzellen deutlich nachweisbar.

Waren Keime temporär einem schweren Sauerstoffmangel ausgesetzt, so konnte im elektronenmikroskopischen Bild ein starker Verlust von Ribosomen im Cytoplasma festgestellt werden. Mit diesem Ribosomenschwund ging an den Mitochondrien ein deutlicher Abbau der Cristae mitochondriales und eine Aufhellung der Matrix einher, also die Strukturveränderungen der Mitochondrien, wie sie am erwachsenen Warmblüter durch eine ganze Reihe von Untersuchungen geläufig sind (vgl. BÜCHNER 1964).

4. Überblicken wir von unseren histoautoradiographischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen aus die bisher in der Literatur zur Biochemie und Pathochemie des Stoffwechsels von Wirbeltierkeimen niedergelegten Befunde und besonders diejenigen Einwirkungen auf den Wirbeltierkeim, für die heute eine mißbildungsverursachende Wirkung allgemein anerkannt ist, so können wir das folgende feststellen: In unseren Experimenten liegt der

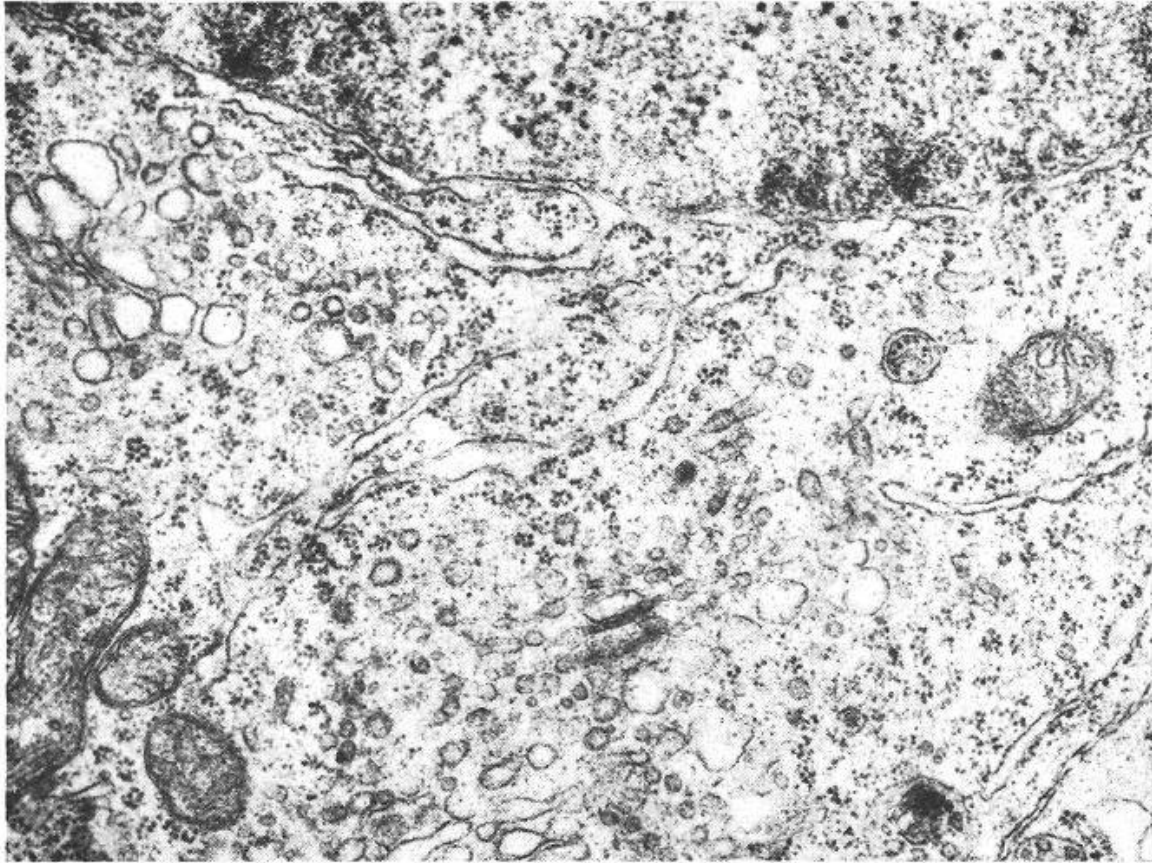


Abb. 9. Ausschnitt aus einer Neuralzelle der Hirnanlage einer normalen Larve von *Triturus helveticus* kurz nach dem Schlüpfen im elektronenmikroskopischen Bild (1:30 000). Oben Anschnitt des Kernes, links Gruppe gut ausdifferenzierter Mitochondrien. Im übrigen Cytoplasma vielfach Ergastoplasmalamellen mit angelagerten Ribosomen und außerdem freie Ribosomen in Gruppen (nach SASAKI 1965).

von uns nachgewiesenen schweren Störung des Reproduktionsstoffwechsels, also der Synthesen von DNS, RNS und Protein, eine temporäre Insuffizienz des Atmungsstoffwechsels zugrunde. Dabei nehmen wir auf Grund der Befunde von DUSPIVA an, daß dabei die Insuffizienz der Atmungsenergie, vor allem die Senkung von ATP und die damit gekoppelte zunehmende Milchsäureanreicherung im Sauerstoffmangel der entscheidende Faktor ist. Im gleichen Sinne verstehen sich unseres Erachtens die Mißbildungen von Amphibienkeimen, wie sie Herr und Frau TIEDEMANN (1954, 1956) sowie DUSPIVA u. Mitarb. (1957–1965) nach vorübergehender Angiftung mit Blausäure erzielt haben. Wir können ferner hier die von LANDAUER u. Mitarb. seit 1945 am Hühnchenkeim hervorgerufenen Mißbildungen einordnen, bei denen nach Einträufelung von Insulin in den Dottersack eine mikrochemisch nachweisbare Senkung des Glukosegehaltes der Hühnchenkeime temporär vorgelegen hat (ZWILLING 1951) und bei denen vor allem die Bilder der Phokomelie nachweisbar waren, weil gerade die entsprechende Phase für die Versuche ausgewählt wurde (vgl. auch unsere Experimente von CHOMETTE 1955 und BRINSMADE 1957 an Kaninchenembryonen mit Mißbildungen durch temporäre schwere Hypoglykämie nach intravenöser Insulininjektion). In diesen

letzteren Experimenten fehlt im Keimstoffwechsel die notwendige Glukose als Substrat für den Atmungsstoffwechsel und für den Spaltungsstoffwechsel. In beiden Versuchsgruppen, bei temporärer Atmungshemmung und bei temporärer Glukosesenkung ist primär der Energiestoffwechsel gestört. Sekundär wirkt sich diese Insuffizienz der Energiebildung in einer Störung des Reproduktionsstoffwechsels aus.

Wir kennen aber auch Mißbildungen, die dadurch zustande kommen, daß primär der Reproduktionsstoffwechsel gestört wird. Solche Mißbildungen sind zuerst an menschlichen Neugeborenen durch GREGG 1941 beschrieben worden, und zwar bei Neugeborenen, deren Mütter in der Frühschwangerschaft eine Rubeoleninfektion durchgemacht hatten. TÖNDURY konnte an abortierten Embryonen rubeolenkranker Mütter morphologisch 1954 Veränderungen nachweisen, die auf eine Störung des Nucleinsäurestoffwechsels der Keime hinweisen. Er folgerte daraus, daß das Rubeolenvirus besonders an den Nucleinsäuren des Keimlings angreift. Die 1962 von TÖNDURY monographisch veröffentlichten pathologisch-histologischen und pathologisch-cytologischen Veränderungen an Keimlingen nach Rubeoleninfektion der Mutter oder anderen Viruskrankheiten der Schwangeren bestätigen, daß sowohl bei den RNS-Viren als auch bei den DNS-Viren die sich vermehrenden Viren mit dem Nucleinsäurestoffwechsel der von ihnen befallenen Zellen interferieren, daß dadurch schwere Störungen des Nucleinsäurestoffwechsels in den Zellen des befallenen Keimes eintreten und daß der Nucleinsäurestoffwechsel in den besonders stoffwechselaktiven Bezirken des Keimes je nach der Entwicklungsphase schließlich zum Erliegen kommt und zu virusbedingten Zellnekrosen in bestimmten Organanlagen führt. Die virusbedingten Mißbildungen sind also Folge von primären Störungen des Nucleinsäurestoffwechsels.

Diese Auffassung wird noch durch Untersuchungen bekräftigt, bei denen bestimmte Stoffe durch unmittelbare Einwirkung auf den DNS- oder den RNS-Stoffwechsel oder durch Einwirkung auf die Katalysatoren dieses Stoffwechsels als Antimetaboliten zur Wirkung kommen. Diese Untersuchungen gingen von den Beobachtungen von GIROUD 1951 aus, der als erster die Entstehung von Mißbildungen durch Folsäuremangel nachweisen konnte. Folsäure bewirkt die Synthese von Thymin und ermöglicht erst dadurch die Synthese von Desoxyribonucleinsäure. Folsäuremangel hemmt also gerade den Vorgang, der, wie wir gesehen haben, in der Entwicklung des Wirbeltierkeimes so entscheidend ist: die DNS-Verdoppelungen in der Vorbereitung von Kern- und Zellteilungen im Dienste des embryonalen Wachstums. EVANS u. Mitarb. haben 1951 die Befunde von GIROUD bestätigt. In einem nächsten Schritt konnte dann NELSON 1952 mit seinen Mitarbeitern zeigen, daß Aminopterin als Antimetabolit von Folsäure in kurzer Frist bei der Injektion am 9.-11. Entwicklungstag an Rattenembryonen in 90% der Fälle Lippenpalten hervorrief. 1963 haben TUCHMANN-DUPLESSIS und MERCIER-PAROT vor unserer Akademie über Mißbildungen durch verschiedenartige Antimetaboliten des DNS-, RNS- und Proteinstoffwechsels

berichtet, neuerdings 1965 in einer Monographie von WILSON und WARKANY auch KARNOFSKY. Da die karzinomzerstörenden Stoffe, also die sogenannten Cystostatica, wie sie in der Karzinomtherapie angewandt werden, in diese Stoffgruppe gehören, ist es nicht verwunderlich, daß nach den zitierten Untersuchern diese Stoffe durchgehend teratogen wirksam sind.

Wichtige weitere Untersuchungen des Reproduktionsstoffwechsels am Wirbeltierkeim mit modernen cytopathologischen Methoden sind also nunmehr notwendig, um noch tiefer in die pathochemischen Voraussetzungen der Mißbildungsentstehung einzudringen.

Zusammenfassung

THEODOR SCHWANN hat 1834 in seiner Dissertation festgestellt, daß Wirbeltierkeime in reiner Stickstoffatmosphäre absterben. BRACHET hat dies 1934 bestätigt und präzisiert. In früheren Untersuchungen haben wir über Mißbildungen an Triturus-Keimen berichtet, die phasenspezifisch durch temporären Sauerstoffmangel während verschiedener Stadien der Entwicklung hervorgerufen wurden (1946–1950). Untersuchungen mit Rüb-saamen und unseren Mitarbeitern am Hühnchenkeim (1951–1956) haben die Empfindlichkeit des Wirbeltierkeimes gegenüber einem temporären Sauerstoffmangel bekräftigt. In diesen Versuchen genügte ein Sauerstoffmangel von drei bis fünf Stunden, um phasenspezifisch die meisten fundamentalen Mißbildungen der menschlichen Teratogenese zu reproduzieren. Diese Feststellungen wurden an verschiedenen Arbeitsstätten, vor allem an Säugerkeimen, bestätigt, erweitert und vertieft. Durch Atmungshemmung mit Blausäureangiftung haben Herr und Frau TIEDEMANN sowie FRANZ DUSPIVA an Amphibienkeimen entsprechende Mißbildungen erzielt.

Für das zellvermehrnde Wachstum und die dadurch eingeleitete Differenzierung von Wirbeltierkeimen stehen im Stoffwechsel die DNS, RNS- und Proteinsynthesen im Vordergrund. Seit Frühjahr 1964 haben mein japanischer Mitarbeiter HARA und ich den Umsatz dieser Stoffe bei der Entwicklung von Keimen von Triturus helveticus untersucht, indem wir die Synthesen der DNS, der RNS oder der Proteine markierten und in lückenlosen Schnittserien im Histoautoradiogramm durcharbeiteten. – 1964 untersuchten wir die Frühentwicklung, 1965 zusätzlich die Entwicklung nach dem Schlüpfen. 1964 waren die Keime durchschnittlich bei 22° C gehalten, 1965 bei 18° C. Im ganzen wurden über 600 Keime untersucht.

Nach Markierung der DNS-Synthesen durch ³H-Thymidin zeigten Normalkeime die folgenden Befunde: Schon in der Blastula ist eine Synthesereiche dorsale, von einer Synthese-armen ventralen Zone zu unterscheiden. In der Gastrula sind die dorsal liegenden neuroektodermalen Zellen sehr bevorzugt markiert, im Neuralstadium die Zellen der Neuralplatte, später des Neuralwulstes, noch später des Neuralrohres. Im Stadium der jungen Schwanzknospe tritt neben der besonderen Markierung der Hirnanlage eine ebenso starke Markierung der Schwanzknospe auf, aus der der Schwanz des Keimes aufgebaut wird.

An geschlüpften Keimen konzentrierte sich in Hirn und Rückenmark die DNS-Markierung zunehmend auf die innerste Zelllage um den Mittelspalt, also auf die Indifferenzzone des ZNS. An der Augenanlage bestand im Frühstadium noch eine diffuse DNS-Markierung des Augenbechers, in späteren Stadien beschränkte diese sich auf die Umschlagsfalte zwischen Retina- und Chorioidea-Anlage. Ricchorgan, Gehörorgan, Anlage des Herzens und des Darmtraktes sowie die Extremitätenknospen zeigten eine besonders starke DNS-Verdoppelung.

Durch diese Untersuchungen ist für die Normalentwicklung eindeutig dokumentiert, daß den für das zellvermehrnde Wachstum notwendigen Mitosen jeweils intensive DNS-Verdoppelungen vorausgehen. Es war zu vermuten, daß diese DNS-Synthesen intensive Atmungsprozesse im Wirbeltierkeim notwendig machen.

Diese Vermutung konnte dadurch bestätigt werden, daß bei temporärem Sauerstoffmangel in einer Atmosphäre von 8-2% O₂ bzw. von 4-2% O₂ nach unseren Untersuchungen die DNS-Markierungen völlig unterdrückt werden. Sobald nach dem Sauerstoffmangel der Keim wieder normal beatmet wird, kommen die DNS-Verdoppelungen in kurzer Zeit wieder in Gang, in der Frühentwicklung bei einem Teil der Keime sogar überschießend. Bei Keimen, die nach dem Schlüpfen einen Sauerstoffmangel durchgemacht hatten, war unmittelbar nach dem Versuch ebenfalls keine Markierung zu beobachten; 8 bzw. 24 Stunden nach dem Sauerstoffmangel war die Markierung immer noch schwächer als bei den Kontrollen, später wurde sie wieder normal.

Nach ³H-Cytidin-Markierung des RNS-Umsatzes waren junge und alte Keime bei Normalbeatmung gut markiert, unmittelbar nach Sauerstoffmangel dagegen wenig oder gar nicht. Einige Stunden nach Sauerstoffmangel war die RNS-Markierung in der Regel stärker als normal. Die gleiche gute Markierung junger und alter Keime war nach Zufuhr von ³H-Leucin für den Proteinumsatz festzustellen. Nach Sauerstoffmangel war dagegen die Proteinmarkierung gering, einige Stunden später in der Regel gesteigert.

Aus diesen histoautoradiographischen Untersuchungen ging hervor, daß durch temporäre stärkere Hemmungen des Atmungsstoffwechsels die für die DNS-Bildung notwendige Energiebildung völlig insuffizient wird, und daß die für die Synthesen von RNS und Protein notwendigen Energien wesentlich eingeschränkt sind.

Die Markierung der DNS war 1964 bei 22 Grad C intensiver als 1965 bei 18 Grad C; sie geht also bei sonst gleichen Bedingungen in der Norm innerhalb physiologischer Breiten mit der Außentemperatur parallel. Das gleiche war für die überschießende DNS-Markierung nach Sauerstoffmangel festzustellen.

In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten Herr SASAKI und ich an Keimen von *Triturus helveticus* das folgende feststellen:

In der frühen Gastrula sind die Mitochondrien und ihre Cristae mito-

chondriales noch wenig differenziert. Vom Beginn der Neurulation an nehmen sie in den Neuralzellen deutlich an Differenzierung zu, vor allem erfolgt der Ausbau der Cristae mitochondriales, und die Matrix der Mitochondrien wird mehr und mehr osmiophil. Im übrigen Cytoplasma enthalten die neuroektodermalen Zellen der frühen Gastrula zahlreiche Vesikel, noch mehr die Neuralzellen der Neurula. Ribosomen sind in der frühen Gastrula nur spärlich nachweisbar, sie nehmen in der weiteren Entwicklung in den Neuralzellen immer mehr zu. An den Neuralzellen treten vom Stadium der jungen Larve an auch die Strukturen des Ergastoplasmas deutlich in Erscheinung.

Nach Sauerstoffmangel bei 22 Grad C beobachteten wir in der späten Neurula und im Schwanzknospenstadium an vielen Mitochondrien eine Schwellung sowie eine Verkürzung und Zerstörung der Cristae und einen Schwund der Matrix. Dabei nahmen die Ribosomen ab. Bei 18 Grad C waren diese Befunde nach Sauerstoffmangel weniger ausgeprägt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen weisen darauf hin, daß akute Atmungsstörungen von Wirbeltierkeimen vor allem über die Hemmung der DNS-, RNS- und Proteinsynthesen teratogenetisch wirksam werden. Die Frage der Mitwirkung von Nekrosen infolge dieser Syntheschemmungen ist noch zu prüfen.

Résumé

C'est en 1834 que THÉODORE SCHWANN a constaté dans sa dissertation que les embryons de vertébrés meurent dans une atmosphère d'azote pur. BRACHET a confirmé ce fait en 1934. Dans des travaux antérieurs, nous avons décrit des malformations dans des embryons de triturus, qui ont été provoquées par manque d'oxygène temporaire lors de divers stades de développement (1946-1950). Des recherches avec Rübsaamen et nos collaborateurs sur des embryons de poulet (1951-1956) ont démontré la sensibilité des embryons de vertébrés à un manque d'oxygène momentané. Dans ces expériences, une déficience d'oxygène durant 3-5 heures a suffi pour reproduire, selon la phase spécifique, toutes les malformations principales rencontrées dans la tératogénèse humaine. Ces constatations ont été confirmées dans d'autres laboratoires, et surtout sur des embryons de mammifères. En bloquant la respiration par des vapeurs d'acide cyanhydrique, Monsieur et Madame TIEDEMANN, ainsi que FRANZ DUSPIVA, ont pu reproduire des malformations analogues sur des embryons d'amphibiens.

Pour l'accroissement numérique cellulaire et par conséquent la différenciation embryonnaire chez les vertébrés, la synthèse des DNA, RNA et la synthèse protéinique jouent un rôle primordial. Dès le printemps de 1964, mon collaborateur japonais HARA et moi-même avons cherché à déterminer la quantité de ces substances dans le développement des embryons du Triturus helveticus, en marquant la synthèse des DNA, RNA et des protéines, puis en faisant des histoautoradiogrammes dans des séries complètes de

coupes histologiques. En 1964, nous avons examiné le développement embryonnaire, en 1965, le développement après l'éclosion de l'œuf. En 1964, nous avons maintenu les embryons à une température moyenne de 22°, en 1965, à 18° C. Nous avons examiné au total plus de 600 embryons.

Après marquage de la synthèse du DNA avec du ³H-Thymidine, nous avons trouvé chez les embryons normaux les résultats suivants: dans la blastula déjà, l'on peut distinguer une zone dorsale riche en synthèse d'une zone ventrale pauvre en synthèse. Dans la gastrula, les cellules neuroectodermales dorsales sont très nettement marquées, dans le stade neural, ce sont les cellules de la plaque neurale, plus tard celles du renflement neural, plus tardivement encore celles du tube neural. Au stade du bourgeon caudal, l'on voit en plus du marquage spécial de la formation cérébrale, un marquage tout aussi intense du bourgeon caudal, à partir duquel la queue de l'embryon se développera.

Après l'éclosion, l'on constate chez les embryons une concentration marquée de DNA du cerveau et de la moelle épinière surtout dans les couches cellulaires médianes autour de la fente centrale, donc dans la zone indifférenciée du système nerveux central. Dans l'ébauche de l'œil, il y avait au stade primitif un marquage diffus de DNA dans la cupule de l'œil, dans un stade postérieur, ce marquage ne se manifeste que dans la fente de plissement de l'ébauche rétino-chorioïdienne. L'organe olfactif, auditif, et l'ébauche du cœur et du tractus digestif, ainsi que les bourgeons des extrémités montrent une concentration tout à fait typique en DNA.

Ces expériences ont montré clairement que dans le développement normal, un redoublement intense de la synthèse du DNA précède les mitoses nombreuses nécessaires pour l'accroissement du nombre des cellules. Ces synthèses du DNA présupposent chez les vertébrés des échanges gazeux importants.

Cette hypothèse a trouvé une confirmation par le fait que des déficiences en oxygène momentanées dans une atmosphère de 8-2% O₂, respectivement 4-2% O₂ ont montré dans nos expériences une carence complète de marquage de DNA. Dès que l'on cesse la carence en oxygène et que l'embryon peut respirer normalement, les synthèses du DNA se remettent en route, et dans les stades primaires chez une partie des embryons dépassent même la norme. Chez les embryons, qui ont subi un manque d'oxygène après l'éclosion, l'on voit aussi une absence de marquage de DNA; 8, respectivement 24 heures après la déficience en oxygène, le marquage est encore faible par rapport aux contrôles, puis il est redevenu normal.

Lors du marquage du ³H-Cytidine du métabolisme du RNA, les embryons jeunes ou âgés et en atmosphère normale sont bien marqués, par contre peu après un manque d'oxygène, ils sont peu ou presque pas marqués du tout. Quelques heures après une carence en oxygène le marquage du RNA est en général plus fort que normalement. Le marquage est tout aussi intense chez les embryons jeunes ou âgés après adjonction de ³H-Leucine, important dans le métabolisme des protéines. Après carence en oxygène, le

marquage des protéines est au contraire plus faible, pour redevenir normal au bout de quelques heures. Ces expériences histoautoradiographiques ont montré que par inhibition temporaire plus ou moins forte du métabolisme respiratoire, l'énergie nécessaire pour la synthèse du DNA devient tout à fait insuffisante, et que les énergies nécessaires pour la synthèse du RNA et des protéines deviennent déficientes.

Le marquage du DNA en 1964 et à 22° C a été nettement plus intense que dans nos essais en 1965 à la température de 18° C. Dans des conditions semblables et dans les marges physiologiques il va donc parallèlement avec la température. La même constatation peut être faite pour le marquage excessif du DNA après carence en oxygène.

L'étude au microscope électronique d'embryons de *Triturus helveticus* nous a permis, à Monsieur SASAKI et à moi, de faire les constatations suivantes:

Dans les premiers stades de la gastrula, les mitochondries et leurs crêtes sont encore peu différenciées. Dès l'amorce de la neurulation, la différenciation s'accroît dans les cellules neurales, surtout le développement de la crête mitochondriale, et la matrice des mitochondries devient de plus en plus osmiophile. Les cellules neuroectodermales de la gastrula primitive contiennent de nombreuses vésicules dans le reste du cytoplasme, qui sont encore plus nombreuses dans les cellules neurales de la neurula. Dans les premiers stades de la gastrula, les ribosomes sont encore rares, leur nombre augmente nettement avec le développement des cellules neurales. Dès le stade de la jeune larve apparaissent nettement dans les cellules neurales les structures de l'ergastoplasme.

En carence d'oxygène et à 22° C, nous avons observé dans les stades avancés de la neurula et stade du bourgeon caudal, qu'un renflement apparaissait dans plusieurs mitochondries, en même temps qu'un raccourcissement et une destruction de la crête et une disparition de la matrice. Les ribosomes deviennent aussi plus rares. A la température de 18° C, ces altérations sont moins marquées après un manque d'oxygène.

Le résultat de ces recherches montre qu'une inhibition respiratoire aiguë chez des embryons de vertébrés agit comme tératogène par le blocage des synthèses du DNA, RNA et des protéines. Il faut encore approfondir la question de savoir si des nécroses à la suite des inhibitions des synthèses jouent aussi un rôle.

Riassunto

TEODORO SCHWANN constatò nella sua dissertazione del 1834 che i germi dei vertebrati in un ambiente con azoto puro, muoiono. BRACHET confermò e precisò tale affermazione nel 1934. In occasione di ricerche anteriori abbiamo riferito sulle deformità dei germi di trituro provocate mediante anossia temporanea durante i differenti stadi dello sviluppo (1946-1950). Le ricerche fatte assieme a Rübsaamen ed ai nostri collaboratori sui germi di pulcino (1951-1956) hanno rafforzato l'ipotesi sulla sensibilità dei germi di

vertebrati alla mancanza temporanea di ossigeno. Durante questi esperimenti bastò un'anossia di tre o cinque ore per riprodurre nelle differenti fasi specifiche la maggior parte delle deformità fondamentali della teratogenesi umana. Tali constatazioni furono confermate, completate ed approfondite da diversi gruppi, specialmente lavorando sui germi dei mammiferi. I goniugi Tiedemann come pure FRANZ DUSPIVA ottennero mediante avvelenamento da acido cianidrico e conseguente blocco respiratorio, delle malformazioni analoghe sui germi degli anfibii.

La sintesi dell'acido desossiribonucleinico, ribonucleinico e delle proteine occupano un posto preponderante nella crescita per moltiplicazione cellulare e conseguente differenziazione dei germi di vertebrati. Sin dalla primavera del 1964 abbiamo sperimentato con il mio collaboratore giapponese HARA il ricambio di tali sostanze durante lo sviluppo dei germi di *triturus helveticus*. Per ottenere ciò furono contrassegnate le sintesi dell'acido desossiribonucleinico e ribonucleinico, come pure quella delle proteine e studiate accuratamente in serie di tagli ininterrotti mediante l'istoautoradiogramma. Nel 1964 furono studiate le prime fasi dello sviluppo, nel 1965 in più lo sviluppo dopo emersione dei germi. Nel 1964 i germi furono tenuti alla temperatura di 22 gradi C. nel 1965 a 18 gradi C. In tutto furono esaminati più di 600 germi.

Dopo aver contrassegnato la sintesi dell'acido desossiribonucleinico con la ^3H -timidina i germi normali diedero i seguenti risultati: già allo stadio di blastula si possono distinguere una zona dorsale con sintesi spiccata ed una zona ventrale con sintesi meno spiccata. Allo stadio di gastrula le cellule neuroectodermali poste dorsalmente sono contrassegnate di preferenza, allo stadio neurale sono le cellule della placca neurale, più tardi quelle della protuberanza neurale, più tardi ancora quelle del tubo midollare. Allo stadio della gemma caudale si constata, oltre al marcamento intensivo dell'abbozzo del cervello, un marcamento altrettanto intensivo della gemma caudale dalla quale si svilupperà poi la coda del germe.

Nei germi emersi, l'acido desossiribonucleinico marcato si concentrò sempre più nello strato cellulare più interno del cervello e del midollo spinale, attorno alla fessura mediana, dunque nella zona cosiddetta indifferente del sistema nervoso centrale. Allo stadio iniziale dell'abbozzo oculare si constatò nella regione dell'occhiera un marcamento ancora diffuso dell'acido desossiribonucleinico che si limitò poi negli stadi successivi alla regione della duplicatura tra l'abbozzo della retina e della coroide. L'organo olfattivo, quello auditivo, l'abbozzo del cuore e del tratto intestinale come pure la gemma delle estremità, mostrarono un raddoppiamento intensivo dell'acido desossiribonucleinico.

Tali esperimenti dimostrano chiaramente che nel caso di uno sviluppo normale, le mitosi necessarie alla crescita per moltiplicazione cellulare sono sempre precedute da intensivi raddoppiamenti dell'acido desossiribonucleinico. Era da prevedersi che tali sintesi di acido desossiribonucleinico rendano necessari processi respiratori intensi nei germi dei vertebrati.

Tale ipotesi potè essere dimostrata dal fatto che, secondo le nostre ricerche, in caso di anossia respiratoria in un ambiente con 8-2%, rispettivamente 4-2% d'ossigeno, il marcamento dell'acido desossiribonucleinico viene represso completamente. A pena che, passata l'anossia, il germe respira di nuovo normalmente, si notano in poco tempo di nuovo dei raddoppiamenti dell'acido desossiribonucleinico, in certi casi allo stadio iniziale dello sviluppo persino in maniera esagerata. Nei germi che dopo essere emersi furono privati di ossigeno, non si constatò subito dopo l'esperimento nessun marcamento; otto, rispettivamente ventiquattro ore dopo, il marcamento era ancora più debole rispetto a quello dei germi di controllo. Più tardi invece, si ottennero risultati normali.

Dopo aver marcato il ricambio dell'acido ribonucleinico con la ^3H -citidina i germi giovani e vecchi, in condizioni di respirazione normali, erano contrassegnati bene; subito dopo anossia invece, poco o niente. Poche ore dopo anossia il marcamento dell'acido ribonucleinico era di regola più forte che normalmente. Lo stesso buon marcamento lo si potè constatare nei germi giovani e vecchi dopo aggiunta di ^3H -leucina per il ricambio delle proteine. Subito dopo anossia invece, il marcamento delle proteine era debole, poche ore dopo di regola aumentato.

Da questi studi istoautoradiografici risulta che, mediante forti inibizioni temporanee del metabolismo respiratorio, la formazione di energia per produrre acido desossiribonucleinico è assolutamente insufficiente e che le energie necessarie per la sintesi dell'acido ribonucleinico e delle proteine sono diminuite sensibilmente.

Nel 1964 il marcamento dell'acido desossiribonucleinico a 22 gradi C era più intenso che nel 1965 a 18 gradi C; tale marcamento dunque, avviene di solito parallelamente alla temperatura esterna nell'ambito di una spettro fisiologico. Lo stesso lo si potè constatare per il marcamento eccedente dell'acido desossiribonucleinico dopo anossia.

Mediante ricerche al microscopio elettronico il signor SASAKI ed io potemmo fare le seguenti constatazioni sui germi di trituro: durante gli stadi iniziali della gastrula, i mitocondri e le loro creste mitocondriali sono ancora poco differenziati. A partire dall'inizio della cosiddetta neurulazione la loro differenziazione nelle cellule neurali aumenta nettamente; in modo particolare si nota uno sviluppo delle creste mitocondriali, mentre la matrice dei mitocondri diventa sempre più osmiofila. Nel resto del citoplasma le cellule neuroectodermali della giovane gastrula contengono numerose vesicole, le cellule neurali della cosiddetta neurula ancora di più. Negli stadi iniziali della gastrula si possono evidenziare solo pochi ribosomi che aumentano poi sempre di più durante lo sviluppo ulteriore nelle cellule neurali. A partire dallo stadio della larva si distinguono le strutture dell'ergastroplasma delle cellule neurali. Dopo anossia a 22 gradi C, potemmo constatare allo stadio della neurula avanzata e della gemma caudale un rigonfiamento di molti mitocondri come pure un raccorciamento e distruzione delle creste e la scomparsa della matrice. A questo punto si osservò una

diminuzione dei ribosomi. Dopo anossia a 18 gradi C i risultati furono meno spiccati.

I risultati di queste ricerche ci indicano che i disturbi acuti della respirazione nei germi dei vertebrati hanno un'azione teratogenetica in quanto causano specialmente un'inibizione della sintesi dell'acido desossiribonucleico, ribonucleinico e delle proteine. La questione di un'eventuale azione sinergica delle necrosi causate in seguito alla inibizione di queste sintesi, deve ancora essere esaminata.

Summary

THEODOR SCHWANN established in his Dissertation in 1834 that vertebrate embryos die in pure nitrogen. BRACHET confirmed and extended this observation in 1934. In earlier investigations we reported malformations in *Triturus* embryos which were phase-specifically produced by temporary lack of oxygen during different stages of development (1946-1950). Investigations with Rübсаamen and our coworkers on chick embryo (1951-1956) confirmed the sensitivity of vertebrate embryo to temporary lack of oxygen. In these experiments, a lack of oxygen of only three to five hours was sufficient to reproduce the most fundamental malformations of human teratogenesis. These observations have been confirmed, extended and worked out in various laboratories, especially on vertebrate embryos. Through inhibition of respiration with hydrocyanic acid poisoning, TIEDEMANN and also DUSPIVA have achieved malformations in amphibian embryos.

For cell-increasing growth and the resulting differentiation of the vertebrate embryo, the main role in the metabolism is played by DNA, RNA and protein synthesis. Since spring 1964, my Japanese coworker HARA and I have investigated the metabolism of these substances in the development of *Triturus helveticus* by marking the synthesis of DNA, RNA or protein and working through the material in unbroken series of sections with histoautoradiogram. In 1964 we examined the early development, in 1965 also the development after hatching; in 1964 the embryos were kept on the average at 22° C and in 1965 at 18° C. In all, over 600 embryos were investigated.

After the marking of DNA synthesis with ³H-thymidin, normal embryos showed the following characteristics: in the blastula, a synthesis-rich dorsal zone can be distinguished from a synthesis-poor ventral zone. In the gastrula, the dorsally lying neuro-ectodermal cells are very especially marked, in the neural state the cells of the neural plate, later of the neural pad, still later of the neural tube. At the stage of the young tail bud, a specially strong marking of the tail bud appears (together with special marking of the brain region) from which the tail of the embryo is formed.

In hatched embryos, the DNA marking is concentrated in the brain and spinal cord increasing in the inner-most layer of the cells along the medial split, that is in the indifferent zone of the CNS. In the eye region, there was in the early developmental stage still a diffuse DNA marking of the optic

cup; in later stages this is limited to the fold between the retina and chorioidea region. The olfactory organ, auditory organ, heart and intestinal tract, as well as the extremities buds, showed a specially strong DNA doubling.

By these investigations, it is clearly documented for normal development that the mitosis necessary for the cell-increasing growth is always preceded by intensive DNA doubling. It is to be supposed that this DNA synthesis necessitates intensive respiratory processes in the vertebrate embryo.

This supposition could be confirmed by the fact that a temporary lack of oxygen in an atmosphere of 8–2% O₂ or 4–2% O₂ completely suppresses the DNA marking in our experiments. As soon as the embryo can breathe normally again after the oxygen lack, the DNA doubling starts again in a short time; in the early development it is even excessive for a part of the embryos. In embryos which had a period of lack of oxygen after hatching, there was no marking to be seen immediately after the experiment; 8 to 12 hours after the oxygen lack the marking was still weaker than in the controls, later it was again normal.

After ³H-Cytidin marking of the RNA metabolism, young and old embryos were well marked with normal respiration, but immediately after oxygen lack they were little or not at all marked. A few hours after oxygen lack, the RNA marking was usually stronger than normal. The same good marking of young and old embryos was found after addition of ³H-leucine for the protein metabolism. After oxygen lack, however, the protein marking was slight, and a few hours later it was usually raised.

From the histoautoradiographic investigations it is seen that temporary, strong inhibition of the respiration produces a complete insufficiency of formation of the energy necessary for DNA production, and that the necessary energy for the synthesis of RNA and protein is greatly reduced.

The marking of DNA was more intensive in 1964 at 22° C than in 1965 at 18° C. It seems therefore to go parallel with the outer temperature under otherwise equal conditions in the norm within physiological limits. The same was seen for the excessive DNA marking after oxygen lack.

In the electron microscopic examinations, SASAKI and I found on the embryo of *Triturus helveticus* the following facts:

In the early gastrula the mitochondria and their cristae mitochondriales are still only slightly differentiated. From the beginning of neurulation on, they increase markedly in differentiation in the neural cells, above all the formation of the cristae mitochondriales progresses and the matrix of the mitochondria becomes more and more osmiophile. In the remaining cytoplasm, the neuro-ectodermal cells of the early gastrula contains numerous vesicles, and still more the neural cells of the neurula. Ribosomes are only sparsely seen in the early gastrula; they increase constantly in the neural cells in the further development. In the neural cells, the structures of ergastoplasm appear clearly from the early larva stage onward.

After oxygen lack at 22° C we observed in the late neurula and in the tail bud stage a swelling on many mitochondria and a shortening and destruction of cristae and disappearance of the matrix. The ribosomes decrease thereby. At 18° C these findings after oxygen lack were less marked.

The results of the investigations show that the acute respiratory disturbances of the vertebrate embryo act teratogenetically above all via the inhibition of the DNA, RNA and protein synthesis. The question of the additional action of necroses as a result of these synthesis inhibition is still to be tested.

BRACHET J.: Arch. Biol. (Liège) 145, 611 (1934); Embryologie chimique. Brüssel 1944; Chemical Embryology. New York 1950; The Biochemistry of Development. Oxford/London/New York/Paris 1960. – BRINSMAD A.: Beitr. path. Anat. 117, 140 (1957). – BROWN D. D. und LITNER E.: J. molec. Biol. 8, 669, 688 (1964). – BÜCHNER F.: Klin. Wschr. 1948, 38; Nervenarzt 1948, 310; Die Pathologie der zellulären und geweblichen Oxydationen. Hdb. Allg. Path. IV/2, 629 (1957); Verh. dtsh. Ges. inn. Med. 1958, 13; Struktur, Stoffwechsel und Funktion in der modernen Pathologie, S. 57, München/Berlin 1964. – BÜCHNER F. und HARA H.: Naturwissenschaften 52, 71 (1965); Beitr. path. Anat. 131 (1966) (im Druck). – BÜCHNER F., MAURATH J. und REHN HJ.: Klin. Wschr. 1946, 137. – BÜCHNER F. und SASAKI M.: Naturwissenschaften 52, 402 (1965). – BÜCHNER F. M.: Beitr. path. Anat. 115, 617 (1955). – CHILD C. M.: Physiological Foundations of Behaviour. New York 1924; Protoplasma (Wien) 5, 447 (1928); Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. 117, 21 (1929). – CHOMETTE G.: Beitr. path. Anat. 115, 439 (1955). – DEGENHARDT K. H.: Z. Naturforsch. 9b, 530 (1954). – DEGENHARDT K. H. und KLADEZKY J.: Z. menschl. Vererb.- u. Konstit.-Lehre 33, 151 (1955). – DIETSCH A.: Beitr. path. Anat. 115, 599 (1955). – DUSPIVA F.: Verh. dtsh. Ges. Path. 1957, 250 (1958); 1958, 411 (1959); Verh. dtsh. Zool. Ges. 1961, 210; 13. Coll. Ges. Physiol. Chem., S. 205. Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1962. – EVANS H. M., NELSON M. M. und ASLING C. W.: Science 114, 479 (1951). – FICQ A.: Experientia (Basel) 10, 20 (1954). – GILCHRIST F. G.: Physiol. Zool. 1, 251 (1928); Anat. Rec. 44, 260 (1929); J. exp. Zool. 66, 15 (1933). – GIROUD A. und LEFEBRES-BOISSELOT J.: C. R. Soc. Biol. (Paris) 115, 526 (1951). – GOERTTLER KL.: Bull. schweiz. Akad. med. Wiss. 20, 336 (1963). – GOERTTLER KL. und WEGNER K.: Z. Zellforsch. 59, 761 (1963). – GREGG N. M.: Trans. ophthalm. Soc. Aust. 3, 35 (1941). – GROHMANN D.: Z. Zellforsch. 55, 104 (1941). – HAGENS H. W., DUSPIVA F. und WILLER W.: Beitr. path. Anat. 132, 129 (1965). – HARA H., Naturwissenschaften 53, 113 (1966); Beitr. path. Anat. 134 (1966) (im Druck). – HUXLEY J. S.: Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. 112, 480 (1927); Naturwissenschaften 18, 265 (1930). – INGALLS TH. H. und CURLEY F. J.: New Engl. J. Med. 257, 1121 (1957). – INGALLS TH. H., CURLEY F. J. und PRINDLE R. A.: Amer. J. Dis. Child. 80, 34 (1950); New Engl. J. Med. 247, 758 (1952). – INGALLS TH. H., TEDESCHI C. G. und HELPERN M. M.: Amer. J. Ophthal. 35, 311 (1952). – KARASAKI S.: Embryologia (Nagoya) 1, 267 (1959). – KARNOFSKY D. A. In: J. WILSON und J. WARKANY: Teratology, Chicago/London 1965. S. 185 u. 194. – KUSE R.: Z. Zellforsch. 56, 728 (1962). – LANDAUER W.: J. exp. Zool. 98, 65 (1945); 105, 145, 317 (1947); Genetics 33, 133 (1948); J. exp. Zool. 120, 469 (1952); 122, 169 (1963); J. cell. comp. Physiol. 43, (Suppl.) (1954); The hatchability of chicken eggs as influenced by environment and heredity. Monogr. Storrs. 1961. – LEDER O.: Beitr. path. Anat. 114, 302 (1955). – LOEB J.: Pflügers Arch. ges. Physiol. 55, 530 (1894); 62, 249 (1896). – MAURATH J. und REHN HJ.: Frankfurt. Z. Path. 60, 495 (1946/49). – MURAKAMI U. und KAMEYAMA Y.: Proc. Jap. Acad. 30, 409, 414 (1954); J. Embryol. exp. Morph. 11, 107 (1963). – MURAKAMI U., KAMEYAMA Y. und KATO T.: Nagoya J. med. Sci. 17, 74 (1954). – MURAKAMI U., KAMEYAMA Y., MAJIMA A. und SAKURAI T.: J. Embryol. exp. Morph. 10, 64 (1962). – MUSHETT C. W.: Beitr. path. Anat. 113,

367 (1953). – NAUJOKS H.: Beitr. path. Anat. *113*, 221 (1953). – NEEDHAM J.: Chemical Embryology. London 1931. – NELSON M. M.: In: Antimetabolits and Cancer, S. 107. Washington 1955. – NELSON M. M., ASLING C. W. und EVANS H. M.: J. Nutr. *48*, 61 (1952). – NIKLOWITZ W.: Beitr. path. Anat. *127*, 424 (1962). – RÜBSAAMEN H.: Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. *143*, 615 (1948); *144*, 301 (1950); Beitr. path. Anat. *112*, 336 (1952). – SASAKI M. und BÜCHNER F.: Beitr. path. Anat. *134* (1966) (im Druck). – SCHAPER A. und COHEN C.: Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. *19*, 348 (1905). – SCHELLONG G.: Beitr. path. Anat. *114*, 212 (1954). – SCHULTZE O.: Verh. phys.-med. Ges. Würzburg N. F. *32*, 191 (1898). – SCHWANN TH.: Diss. Berlin 1834. – SIRLIN J. L.: Experientia (Basel) *11*, 112 (1955). – SIRLIN J. L., BRAHMA S. K. und WADDINGTON C. H.: J. Embryol. exp. Morph. *4*, 248 (1956). – SIRLIN J. L. und Waddington C. H.: Nature (Lond.) *174*, 309 (1954). – SPEMANN H.: Experimentelle Beiträge zu einer Theorie der Entwicklung. Berlin 1936. – SPEMANN H. und MANGOLD H.: Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. *100*, 599 (1924). – STOCKARD CH. R.: Amer. J. Anat. *28*, 115 (1921). – TENCER R.: J. Embryol. exp. Morph. *6*, 117 (1958). – TIEDEMANN H. und TIEDEMANN H.: Z. Naturforsch. *9b*, 371 (1954); *11b*, 666 (1956). – TÖNDURY G.: Naturwissenschaften *42*, 312 (1955); Embryopathien. Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1962; Dtsch. med. Wschr. *87*, 2561 (1962). – TUCHMANN-DUPLESSIS H. und MERCIER-PAROT L.: Bull. schweiz. Akad. med. Wiss. *20*, 490 (1964). – VOGT W.: Anat. Anz. *63*, Ergebn. Hyg. Bakt. *126* (1927); *66*, Ergebn. Hyg. Bakt. *139* (1928); Rev. suisse Zool. *39*, 509 (1952). – WERTHEMANN A. und REINIGER M.: Acta anat. *11*, 329 (1950/51). – WERTHEMANN A., REINIGER M. und THOELLEN H.: Schweiz. Z. Path. *13*, 756 (1950). – ZWILLING E.: J. exp. Zool. *117*, 65 (1951).

Adresse: Prof. Dr. F. Büchner, Katharinenstraße 23, D 78 Freiburg i. Br.