

Zur Kenntnis der Wirkung der Sexualhormone auf die embryonale Entwicklung

Von

GIAN TÖNDURY, Zürich

(mit 11 Abbildungen im Text)

Aus dem anatomischen Institut der Universität Zürich

Die Bedeutung der Sexualhormone für die Entwicklung des Körpers ist schon seit langem bekannt und auf Grund von Kastrations- und Transplantationsversuchen erhärtet worden. Dank den Forschungen von BUTENANDT, MARRIAN, RUZICKA gelang auch die Isolierung, Strukturaufklärung und chemische Synthese der verschiedenen geschlechtsspezifischen männlichen und weiblichen Sexualhormone. Alle in den Geschlechtsdrüsen entstehenden

Sexualhormone stehen zu den Sterinen in Beziehung und lassen sich sogar aus Sterinen und Sterinderivaten synthetisch herstellen. Untersuchungen über die Wirkung der Sexualhormone auf nicht geschlechtsspezifisch beeinflussbare Zellen haben zur Auffindung von Wirkungen geführt, die diese Hormone normalerweise während des Lebens vielleicht gar nicht ausüben, aber von grossem biologischem Interesse sind. Die Versuche, über die hier berichtet wird, zeigen, dass männliche und weibliche Sexualhormone und zahlreiche ihrer Derivate das Wachstum durch Schädigung des Mitosemechanismus in typischer Weise beeinflussen. Sie wurden an Fibrozytenkulturen und Tritoneiern durchgeführt, wobei es sich herausstellte, dass die Wirkung der Hormone auf sich entwickelnde Amphibieneier viel komplexer ist als auf wachsende Fibrozytenkulturen. Ganz ähnliche Einflüsse sind auch bei pflanzlichen Objekten beschrieben worden, so dass sie für gewisse Steroide spezifisch sein müssen.

Unter den wirksamen Stoffen finden sich neben weiblichen und männlichen Sexualhormonen wie Oestradiol und Testosteron, auch cancerogene Kohlenwasserstoffe wie Dibenzanthracen, Benzpyren, Methylcholantren und Hormone der Nebennierenrinde und des Corpus luteum.

In meinen Ausführungen möchte ich besonders auf Untersuchungsergebnisse eingehen, die in den letzten Jahren am anatomischen Institut in Zürich durchgeführt wurden und sowohl in bezug auf den Wirkungseffekt der verwendeten Hormone, als auch auf ihren Wirkungsmechanismus interessante Einblicke gewähren.

v. MÖLLENDORFF, 1939, war wohl einer der ersten, der im Zusammenhang mit Studien über den Mitosemechanismus die Wirkung männlicher und weiblicher Sexualhormone auf Kulturen von Kaninchenfibrozyten untersuchte. Unter sorgfältiger Beachtung der pH- und der osmotischen Konzentration verwendete er die zu überprüfenden Substanzen zur Ausfüllung eines kleinen Hohlsliffobjektträgers. Die Mitosen wurden in Abständen von 1—2 Stunden gezählt. Nach 9—10 Stunden wurden die Kulturen fixiert und nach FEULGEN gefärbt.

Seine Untersuchungen ergaben, dass die Wirkung der verwendeten Hormone streng konzentrationsgebunden ist, wobei der Wirkungsbereich bei Konzentrationen zwischen 1:20 000 und 1:500 000 lag. Die Wirkung der weiblichen Sexualhormone war viel intensiver als diejenige der männlichen. Bei stärkeren Konzentrationen war die Schädigung so stark, dass sehr bald Rundzellen entstanden, die die Tendenz hatten zu zerfallen. Mitosen wurden dann keine mehr beobachtet. Bei schwächeren Konzentrationen fand v. MÖLLENDORFF weder Steigerung noch Abschwächung des Wachstums. Es kam zwar zu einer Schwankung des mitotischen Koeffizienten, aber nicht zu einer eigentlichen Wachstumshemmung.

Die Zellschädigung äusserte sich in einer charakteristischen Veränderung des Zellteilungsmechanismus. Der Teilungsrhythmus war nicht wesentlich verschieden von demjenigen unbehandelter Kulturen. Die Abweichung vom normalen Mitosebild beruhte auf einer Vermehrung von abnormen

Äquatorialplatten, welche mit steigenden Konzentrationen immer deutlicher hervortrat. Die Störung betraf die Anordnung der Chromosomen und trat graduell verschieden stark in Erscheinung. Bei sonst normal ausgebildeten Äquatorialplatten lag bei leichten Störungen ein einzelnes Chromosom ausserhalb des Teilungsraumes, bei schwereren Störungen hatte ein grosser Teil der Chromosomen den Anschluss an die Spindel nicht gefunden. Diese abnormen Metaphasen konnten sich weiter teilen. Es entstanden aber in den Tochterzellen abnorme Chromosomensätze. Bei Anwendung von männlichen Hormonen wie Testosteron oder Methyltestosteron waren am Schluss des Versuches 16—44 %, bei Anwendung weiblicher Hormone wie Oestradiol bis 82 % der Äquatorialplatten abnorm.

Die beobachteten Metaphasenstörungen sind keine spezifische Folgeerscheinung der Hormonwirkung. Gleiche Störungen können bei allen möglichen inneren und äusseren Einwirkungen in embryonalem, aber auch ausgewachsenem, fertig differenziertem Gewebe auftreten.

Anders waren die Schädigungen, die durch die verwendeten Hormone im entwicklungsphysiologischen Versuch hervorgerufen wurden. Dabei zeigte es sich wiederum, dass die weiblichen Sexualhormone eine viel toxischere Wirkung haben als die männlichen. Sie wirken vor allem auch in bedeutend schwächeren Konzentrationen. Während die Wirkung der weiblichen Hormone, wie Oestradiol, schon nach 6—15 Stunden sichtbar wurde, kamen Störungen durch männliche Hormone, wie Testosteron, erst in fortgeschrittenen Entwicklungsstadien zum Ausdruck.

Wir beschäftigen uns im folgenden zunächst nur mit der Wirkung der weiblichen Hormone und berichten, wenn nichts anderes gesagt wird, ausschliesslich über die Wirkung von Oestradiol und Stilboestrol. Es kamen Hormonkonzentrationen von 1:100 000 bis 1:1 000 000 zur Anwendung, wobei wir von einer einprozentigen alkoholischen Stammlösung ausgingen und nur gesättigte Lösungen brauchten.

1. Beeinflussung der Furchungsteilungen des Tritoneies

Die Entwicklung des befruchteten Tritoneies wird mit einer Reihe aufeinanderfolgender Zellteilungen eingeleitet, die normalerweise synchron ablaufen, so dass man in demselben Keim die Zellkerne immer in derselben Phase findet. Diese Synchronie lockert sich im 32-Zellenstadium, und es erfolgt hierauf der allmähliche Übergang von der synchronen in die asynchrone Furchung. Die Zellteilungen der animalen eilen denen der vegetativen Keimhälfte voraus. Bei jungen Blastulae verschwindet auch die zeitliche Übereinstimmung innerhalb der beiden Eikalotten. In jeder Keimhälfte kann man jetzt alle Mitosephasen finden.

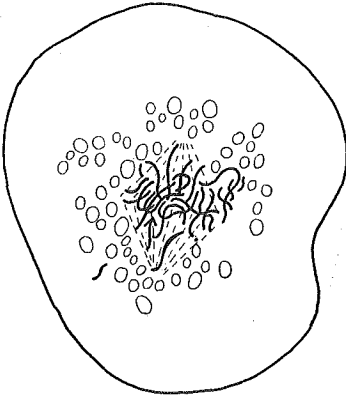
Unter dem Einfluss des Oestradiol war dieser Furchungsrhythmus von Anfang an gestört (TÖNDURY 1943). Bei schwachen Konzentrationen (1:1 000 000 bis 1:500 000) verlief die Furchung zwar äusserlich meist normal; bei Konzentrationen von über 1:500 000 aber wurden zunehmende Stö-

rungen festgestellt, die gleichmässig das ganze Ei betrafen oder einzelne Blastomeren bevorzugten. Wir haben Keime beobachtet, die sich überhaupt nicht teilten oder schon nach den ersten Teilungsschritten abnorm wurden. Bei andern Eiern wurde die Störung erst im Anschluss an den ersten oder zweiten Teilungsschritt sichtbar. Das Oestradiol entfaltet seine Wirkung rasch und frühzeitig.

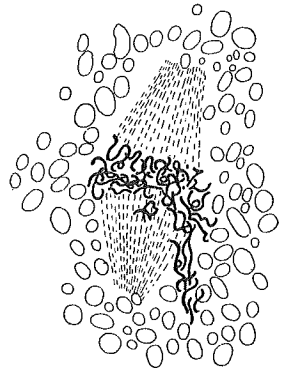
Die Schnittuntersuchung zeigte, dass das Oestradiol nicht nur die Furchungsmitosen stört, sondern auch eine starke Wirkung auf das Zytoplasma hat.

a) Mitosestörungen. Es fiel auf, dass die Prophasen nie gestört, während die Meta- und Anaphasen z. T. hochgradig abnorm waren.

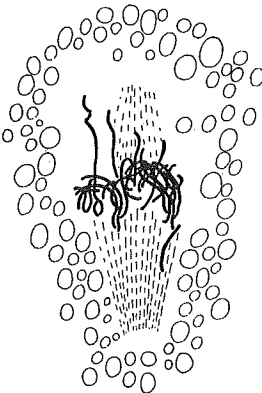
Unter den gestörten Metaphasen konnten wir vier verschiedene Typen unterscheiden, die in Abbildung 1 zusammengestellt sind.



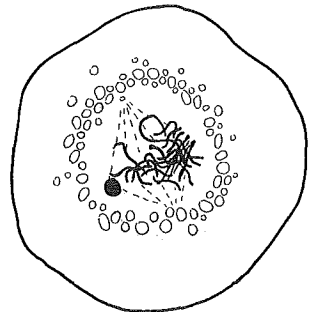
a unregelmässige Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialplatte.



b Chromosomenabsprengung, d. h. Verlagerung einzelner Chromosomen aus dem Teilungsraum.



c zu schmal geratene Teilungsspindel und Chromosomenabsprengung.

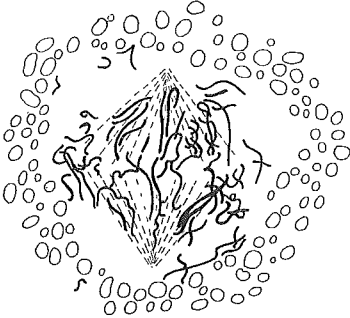


d unvollständige Heraussonderung der Chromosomen.

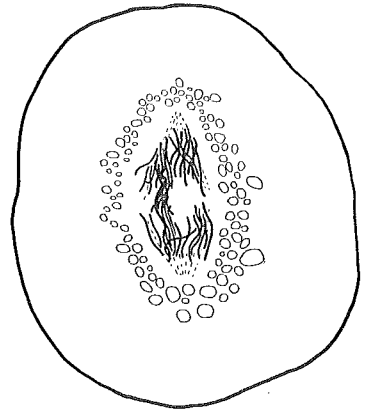
Abb. 1 Metaphasenstörungen in Furchungszellen von *Triton alpestris*.

Die Ana-Telophasen waren ebenso häufig gestört wie die Metaphasen (Abb. 2). Im einfachsten Fall beobachteten wir ein verspätetes und ganz unregelmässiges Auseinanderrücken der Tochterchromosomen, die mit ihren Enden verklebt sein konnten, eine Störung, die als Vorstufe von Chromatinbrücken zwischen den Tochterspiremen anzusehen ist. Entweder wurden diese durch ein einzelnes oder bei schweren Störungen durch mehrere Chromosomen, die eine breite Brücke bildeten, miteinander verbunden. Diese Brücken lagen in der Mitte oder exzentrisch nach der einen Seite verschoben.

Bei starken Schädigungen waren die Chromatinbrücken so breit, dass ein Auseinanderweichen der Tochterspireme unmöglich war. Nach einiger Zeit wurde der ganze Teilungsvorgang rückgängig gemacht: Es bestand das Bild der Pseudoamitose.



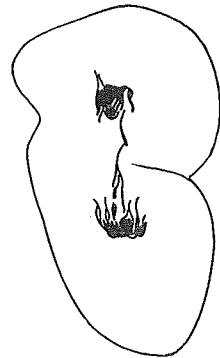
a unregelmässige Verlagerung der Tochterchromosomen gegen die Zellpole, Chromosomenabsprengung und abnorme Verklebung einzelner Chromosomen in der Äquatorialplatte.



b Anaphase mit Chromatinbrücke zwischen den Tochterspiremen.



c Dasselbe. Chromatinbrücke exzentrisch gelegen.



d Telophase, beginnende Zelldurchschnürung, Chromatinbrücke zwischen den Tochterspiremen.

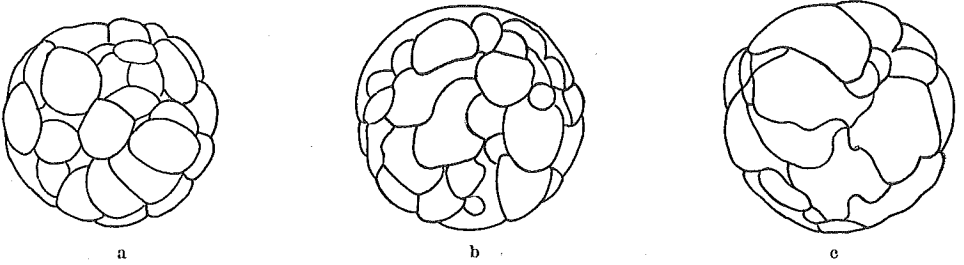


Abb. 3 Furchungsstörungen unter dem Einfluss von Oestradiol. Ausgangsstadium grosszellige Morula (a), sekundäre Auflösung von Zellgrenzen (b, c).

Dass auch die Ruhekerne Abnormitäten wie Verdichtung, zipfelartige Fortsätze aufwiesen, steht mit den gestörten Mitosen in Zusammenhang.

Die quantitative Erfassung der Mitosestörungen ergab, dass die Wirkung konzentrationsgebunden ist. Die Verträglichkeitsgrenze lag bei 1:200 000. Höhere Konzentrationen schädigten so stark, dass mit einer längeren Entwicklung der Keime gar nicht zu rechnen war. Andererseits fanden wir starke individuelle Schwankungen, die von der verschiedenen Widerstandskraft der verwendeten Keime abhängig waren.

b) Zytoplasmatische Störungen. Neben den Kernstörungen waren die Durchschnürungsstörungen am auffallendsten. Die Furchung stiess offenbar auf Schwierigkeiten und unterblieb im Extremfall ganz. Besonders ausgesprochen waren sie bei Anwendung von Stilboestrol, einem im Körper nicht vorkommenden, aber stark oestrogen wirkenden Präparat, das weit giftiger ist als Oestradiol.

Stilboestrol wirkte schon nach 4 bis maximal 8 Stunden (TÖNDURY 1947). Neben primären Furchungsstörungen beobachteten wir auch sekundäre Auflösung von Zellgrenzen, so dass ganze Territorien der Eioberfläche zu einer zusammenhängenden vielkernigen Plasmamasse zusammenflossen (Abb. 3). In diesen mehrkernigen Zellen konnten Kernteilungen weiter auftreten. Der Rhythmus war aber so weitgehend gestört, dass neben Kernteilungsfiguren verschiedener Stadien auch Ruhekerne in ein und derselben Zelle vorkommen konnten. Es entstand so ein sehr polymorphkerniges Bild. Weiter waren schon äusserlich Pigmentverschiebungen zu sehen, so dass die Eioberfläche stellenweise ganz entfärbt sein konnte. Starke Pigmentverschiebungen in das Zellinnere begleiteten die Vorgänge, die zu sekundärer Auflösung der Zellgrenzen führten.

Schon bei den weniger stark geschädigten Keimen war die Teilungsspindel häufig aufgelockert, die Spindelfasern waren wirr angeordnet, so dass eine schöne Äquatorialplatte gar nicht entstehen konnte. Bei stark geschädigten Keimen waren die Spindelfasern fragmentiert oder überhaupt nicht zu sehen; die Chromosomen lagen mitten in den Dotterplättchen.

Ähnlich war die Wirkungsweise des Stilboestrol auf das Tubifexei. Nach LÜSCHER 1948 dringt es sehr rasch in die Zellen ein, so dass es genügte, das

Ei zu Beginn der Metaphase in die Lösung zu bringen, um den Zerfall des ganzen Kernapparates herbeizuführen. In der Prophase waren keine Änderungen sichtbar. Die Spindel wurde gebildet, war aber fragmentiert und konnte sich häufig auch nicht strecken. Die Chromosomen lagen oft unregelmässig zerstreut im Teilungsraum drin. Schon während der Anaphase wurden die Spindelfasern aufgelöst und die Chromosomen ballten sich zu Körnern zusammen.

2. Wirkung der Hormone auf Wachstum und Differenzierung

Die Furchung, deren Ablauf unter der Einwirkung der Sexualhormone beschrieben wurde, ist kein Wachstumsvorgang. Während der Furchung wird das Eimaterial aufgeteilt. Es entstehen neue Zellkerne und Zellen, die selbst nicht zur Grösse der Ausgangszellen heranwachsen. Es ist Zellvermehrung ohne Wachstum, ein Vorbereitungsstadium, dem sich als erster Formbildungsvorgang die Gastrulation anschliesst. Auch hier handelt es sich nicht um Wachstumsvorgänge. Es treten zwar während der Gastrulation Zellteilungen auf; die Gastrulation ist aber ein Gestaltungsvorgang, welcher die präsumptiven Organanlagen an ihren endgültigen Platz bringt. Gastrulation bedeutet Umordnung des während der Furchung bereitgestellten Aufbaumaterials für den Embryo.

Beide Vorgänge — Furchung und Gastrulation — scheinen relativ unempfindlich gegen die durch die Hormone gesetzten Störungen zu sein. Wir beobachteten die Einleitung der Gastrulation auch bei stark gestörten Keimen. Sie kam aber dann zum Stillstand, wenn infolge fehlenden Blastocoels mechanisch die Materialverlagerung unmöglich war.

Erst die Neurulation, d. h. die Heraussonderung der Primitivorgane des Embryo, verlangt Wachstum. In diesem Stadium wirken sich auch stärkere Störungen des Mitosemechanismus auf die Weiterentwicklung aus. Ausser einer starken Verlangsamung der Entwicklung fiel hier die häufig sehr mangelhafte Anlage der Medullarplatte auf.

Während der Neurulation entsteht die Medullarplatte, die sich unter Aufaltung der Medullarwülste zum Rohr schliesst, während sich gleichzeitig im Innern die Chordamesodermplatte in Chorda und Mesodermflügel sondert. Keime, die mit Testosteron behandelt wurden (TÖNDURY 1941), zeigten in diesem Stadium eigenartige asymmetrische Störungen (Abb. 4): Die Me-



Abb. 4 Neurulationsstörungen bei Tritoneiern, die mit Testosteron 1:250 000 behandelt worden waren. Beachte das vollständige Fehlen des rechten Medullarwulstes.

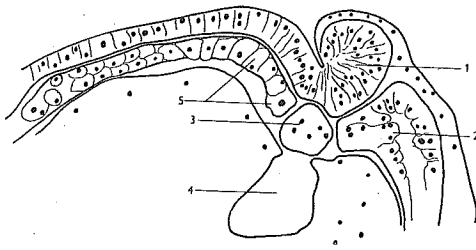


Abb. 5 Querschnitt durch einen Halbembryo. 1 Medullarwulst, 2 Ursegment, 3 Chorda, 4 Urdarmrinne, 5 Unorganisiert gebliebene Zellen des Mesoderm der defekten Seite.

dullaranlagen waren entweder nur hinten oder dann nur auf der einen Seite defekt, so dass Embryonen entstanden, die nur einen Medullarwulst aufwiesen. Dieser vollzog die normalen Konvergenzbewegungen ohne Störungen; es entstand so ein eigentlicher Halbembryo (Abb. 5), dessen eine Hälfte den typischen Bau einer Neurula nach beendeter Medullarrohrbildung zeigte, während die andere Hälfte im Stadium der beendeten Gastrulation stehen geblieben war. Die Berücksichtigung der Mitoseverteilung zeigte, dass die Halbseitenstörung auf einen asymmetrischen Wachstumsrückstand zurückzuführen war, indem auf der unentwickelt gebliebenen Seite nur vereinzelt Mitosen zu finden waren. Diese Defektbildung wurde bei Übertragung der Keime in Wasser häufig ausgeglichen, blieb aber in vielen Fällen erhalten.

Neurulae, die mit weiblichen Sexualhormonen behandelt wurden, zeigten selten solche asymmetrische Störungen. Meistens war der ganze Keim abnorm, die Medullarplatte schmal, die Wülste klein. Die histologische Untersuchung solcher Neurulae ergab eine weder bei Blastulae noch bei Gastrulae beobachtete Mitosestörung: Innerhalb der ganzen Medullarplatte, besonders aber im Bereiche der Hirnplatten, fanden sich massenhaft Mitosen, die sich, wie der Vergleich verschiedener Stadien zeigte, nicht auf die ventrikuläre Schicht beschränkten, sondern über die ganze Dicke des Medullarrohres verteilten. Alle Mitosen befanden sich im Stadium der frühen Metaphase und konnten augenscheinlich nicht zu Ende geführt werden (Abb. 6). Darauf wiesen die zahlreichen Degenerationen hin, die schliesslich zu Kern- und Zellauf-

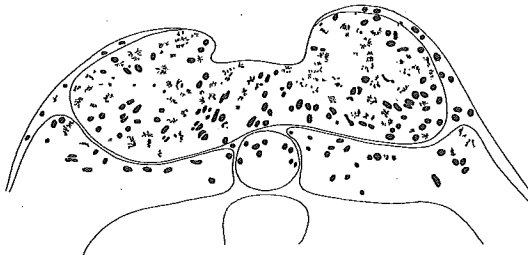


Abb. 6 Querschnitt durch die Nachhirnregion eines mit Stilboestrol behandelten Tritoneies. Beachte die unregelmässig gelagerten zahlreichen Mitosen.

lösung führen mussten. Die Entwicklung wurde also in einem Embryonalorgan, welches sehr intensive Wachstumsvorgänge zeigt, durch Mitosestop zum Stillstand gebracht.

Alle Versuche, über die bisher berichtet wurde, waren Dauerversuche, bei welchen die Keime zu Beginn oder im Verlaufe der Furchung in die Hormonlösung eingelegt worden waren. Für die folgenden Versuche, über die ich noch berichten möchte, wurde ein Stadium gewählt, in welchem die Heraussonderung der larvalen Organe bereits vollendet war (SCHENK 1950) und das sich besonders gut zum Studium des Einflusses der weiblichen Sexualhormone auf Wachstum und Differenzierung einzelner Organe eignete. Die zum Versuch verwendeten Larven hatten bereits eine Schwanzknospe gebildet und waren resistenter als junge Embryonalstadien derselben Art.

Da anzunehmen war, dass Organe mit starker Mitoseätigkeit gegenüber der Hormonwirkung besonders empfindlich sind, wählte SCHENK als Testobjekt Augen und Extremitätenanlagen von *Triton alpestris*. Die Larven wurden 48, 96 und 150 Stunden nach Beginn der Behandlung fixiert.

Augenbecher und Linse sind bei den verwendeten Stadien zu Beginn des Versuches in ihrer Entwicklung schon ziemlich weit fortgeschritten (Abb. 7). Der Augenbecher baut sich aus der mehrschichtigen Retina auf, die sich nach vorne verschmälert und im Pupillarrand in das Pigmentepithel übergeht. In den zentralen Anteilen der Retina findet man 7—8 übereinander angeordnete Kernreihen, von denen die dem Pigmentepithel (äussere) und dem Glaskörperraum (innere) zugekehrten Zellkerne runde Form haben. In den mittleren Abschnitten, die einen breiten Streifen einnehmen, sind die Kerne länglich und liegen in der optischen Achse. Nach vorn nimmt dieser Kernstreifen einen immer grösseren Teil der Retina ein. In der Gegend des Pupillarrandes fehlen innere und äussere Rundkerne ganz. Diese Sonderung der Retina in drei verschiedene Kernlagen ist der Ausdruck für die bereits in Gang befindlichen Differenzierungsvorgänge. Mitosen kommen nur in der äusseren

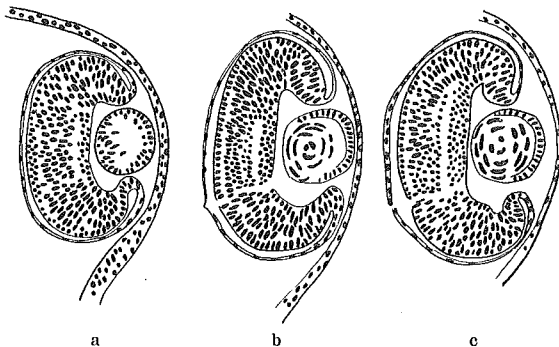


Abb. 7 Drei verschiedene Stadien der Ausdifferenzierung der Retina im larvalen Triton-auge. Vgl. Text. 1 Pigmentepithel, 2 Sinnesepithel der Retina (nach SCHENK, 1951),

Zone der Rundkerne vor, weshalb diese als *Matrix* bezeichnet wird. Von den bei den Mitosen entstehenden zwei Zellen rückt die eine in die mittlere Schicht, die *Mantelzone*, vor. Hier machen sich die ersten Differenzierungsvorgänge bemerkbar: Die Zellen verlieren ihre Teilungsfähigkeit und werden zu *Neuro-* beziehungsweise *Spongioblasten*. Zu innerst entstehen, immer zuerst in den zentralen Teilen der *Retina*, die ersten *Nervenfasern*, die in den *Augenbecherstiel* vorwachsen. Nach 150 Stunden ist die *Gliederung* der *Retina* vollendet. Gegen den *Augenbecher*rand schliesst sich aber immer noch eine *ausgedehnte Zone* *undifferenzierter, langgestreckter Zellen* an. Diese *peripheren Teile* der *Retina* bilden die *Zuwachszone*, *Mitosen* sind nur noch in ihr zu finden.

Unter dem Einfluss der *Hormonlösungen* wurden diese *Vorgänge* in *charakteristischer Weise* *gestört* (Abb. 8). Zu *Beginn* des *Versuches* lagen *Mitosen* wie bei den *Kontrollarven* nur in der *Matrix*. Unter der *Wirkung* einer *Oestradiollösung* von 1:100 000 wurden alle neu *hinzukommenden Mitosen* in der *frühen Metaphase* *blockiert*. Es kam zu einer *solchen Häufung*, dass 48 Stunden nach *Versuchsbeginn* *gestoppte Mitosen* über die *Matrix* hinaus auch in der *Mantelzone* *zahlreich* zu finden waren. Daneben fanden sich aber auch *Interphasenkerne*. 96 Stunden nach *Versuchsbeginn* war die *Retina* *vollkommen desorganisiert*. Am *Rand* waren zwar immer noch *gestoppte Mitosen* zu sehen, in den *zentralen Teilen* hatte aber ein *ausgedehnter Zerfall* um sich *gegriffen*, so dass besonders in den *äusseren Teilen* ganze *Trümmerfelder* von *Zellen* zu sehen waren. Daneben fanden sich aber immer noch *Inseln* von *normaler Struktur*. Nach 150 Stunden war die *Abweichung* besonders *ausgeprägt*. Die *Differenzierung* zu *Sinnes- und Nervenzellen* *beschränkte* sich auf *umschriebene Bezirke*. Die *übrigen Teile* bildeten ein *Mosaik* aus *erhalten gebliebenen Zellen* und *mehr oder weniger grossen Lücken*, die nur noch *Zelldetritus* enthielten. Das *Pigmentepithel* war *verdickt*. Zu *äusserst* im *Augenbecher*rand fanden sich noch *vereinzelte Mitosen*, die in der *Metaphase* *blockiert* waren.

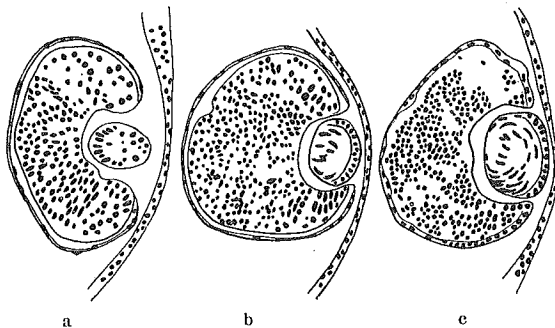


Abb. 8 Verhalten der gleichen in Abb 7 dargestellten Stadien der *Retinadifferenzierung* nach 48 (a), 96 (b) und 150 Stunden (c) dauernder *Oestradiolwirkung*. Beachte die *verschiedene Kerngrösse*, die *Desorganisation* und den *Zelluntergang* im *Sinnesepithel* der *Retina*. Vgl. Text (nach SCHENK, 1950).

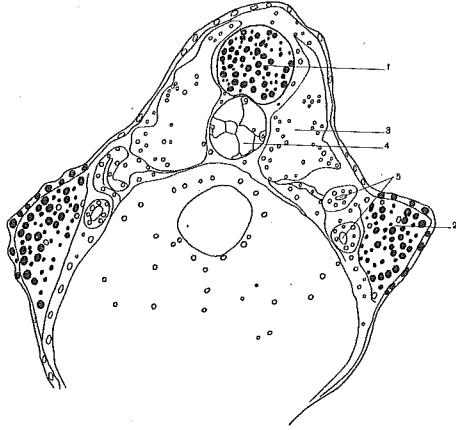


Abb. 9 Querschnitt durch den Rumpf einer Molchlarve auf Höhe der vorderen Extremitätenknospen. Vgl. Text. Schwarz: gestoppte abnorme Metaphasen in Neuralrohr (1) und Extremitätenknospen (2), Myotome (3), Chorda (4) und Vornieren (5) normal.

Stilboestrol wirkte schon in Konzentrationen von 1:300 000 stärker als Oestradiol 1:100 000. Die Störungen waren aber dieselben.

Aus diesen Beobachtungen ergibt sich folgendes Bild: In der Retinaanlage waren zu Beginn des Versuches offenbar zwei Zelltypen enthalten, die sich auf verschiedener Entwicklungsstufe befanden. Die einen Zellen befanden sich noch im Proliferationsstadium und wurden in vollem Umfang von der Hormonschädigung betroffen. Der Eintritt in die Mitose wurde zwar nicht unterdrückt, die Mitose selbst aber in der frühen Metaphase blockiert. Daneben hatten Zellen der Mantelzone ihre Vermehrungsphase offenbar bereits abgeschlossen und konnten ihre Differenzierungsvorgänge ohne sichtbare Störung durchführen. Zellen, die selbst nicht mehr teilungsfähig sind, werden also von der Hormonschädigung nicht betroffen und können die einmal eingeleitete Differenzierung störungslos beenden.

Das angeführte Beispiel könnte noch erweitert werden durch ganz gleiche Beobachtungen am Neuralrohr. Der Querschnitt einer Molchlarve, die etwa 120 Stunden lang mit Stilboestrol 1:300 000 behandelt worden war, zeigt im Medullarrohr, das sich wie die Retinaanlage durch intensive Zellvermehrung auszeichnet, eine weitgehende Desorganisation, während wenig aktive Organe wie Myotome, Chorda und Vornierenanlagen ganz normal differenziert sind (Abb. 9).

Diese enorme Empfindlichkeit proliferierender Zellen gegenüber Hormonlösungen soll noch an zwei weiteren Beispielen gezeigt werden:

Bei der Extremitätenentwicklung bildet sich ein zellreiches Blastem mit zahlreichen gleichmässig verteilten Mitosen. Wurde die Extremitäten-

tätenknospe der Wirkung von Oestradiol oder Stilboestrol ausgesetzt, dann kam die typische Schädigung in vollem Ausmass zustande: Die Extremitätenknospe zeigte eine deutliche Wachstumshemmung. Alle Mitosen waren in der frühen Metaphase gestoppt oder befanden sich schon 48 Stunden nach Versuchsbeginn in voller Auflösung (Abb. 9).

In diesem Zusammenhang soll noch darauf hingewiesen werden, dass diese schweren Störungen auch dann auftreten, wenn jüngere Stadien der Hormonwirkung ausgesetzt sind. Es zeigte sich, dass die Entwicklung bis zu dem Stadium störungslos abläuft, in welchem die Proliferation einsetzt. Auf der andern Seite haben ältere Extremitätenanlagen Aussicht, ihre Entwicklung, wenn auch mit Defekten, weiterzuführen. Es handelt sich also nicht um eine primäre Unterdrückung der Organanlage.

Noch imponanter ist die schädigende Wirkung der weiblichen Sexualhormone in Regenerationsversuchen nachzuweisen. Die Schwanzanlage von Amphibienlarven zeichnet sich durch eine ausgezeichnete Regenerationsfähigkeit aus. Wird nun eine Larve nach Schwanzamputation und Wundheilung in eine Hormonlösung gebracht, dann unterbleibt die Regeneration praktisch ganz, da alle Zellen, die in Teilung begriffen sind, in der frühen Metaphase gestoppt werden und dann zugrunde gehen.

Aus allen beschriebenen Versuchsergebnissen ergibt sich also die überaus starke Empfindlichkeit embryonaler Zellen gegenüber der Wirkung männlicher und weiblicher Sexualhormone. Die weiblichen Hormone sind dabei weitaus wirksamer als die männlichen. Solange sich alle Zellen des Keimes in einer Phase der Vermehrung befinden, wird der Keim gleichmässig befallen. Es machen sich aber schon während der Furchung besondere Prädilektionsstellen geltend. In der Blastula häufen sich die abnormen Mitosen im animalen Dachbereich, also dort, wo schon normalerweise Zellteilungsfiguren am zahlreichsten sind. Bei der jungen Neurula ist es die Medullarplatte, besonders im späteren Hirnbereich, die zahlreiche pathologische Mitosen aufweist. Nach Heraussonderung der Primitivorgane beginnt das Wachstum. An diesem beteiligt sich zuerst die überwiegende Mehrzahl der Zellen; mit der Zeit beschränkt sich das Wachstum auf umschriebene Zellareale, die als Matrix bezeichnet werden. Zellen, die die Vermehrungsphase durchlaufen haben, beginnen sich zu differenzieren. Nur die in Proliferation befindlichen Zellen werden von der Störung befallen. Interessant ist auch festzuhalten, dass die Mitosen bei Blastulae und Gastrulae andere Störungsbilder aufwiesen als bei vorgerückteren Stadien.

3. Zum Wirkungsmechanismus der Hormone

Die Sexualhormone gehören chemisch mit Ausnahme des Stilboestrol zur Gruppe der Steroide. Die beobachteten Störungen müssen als spezifische Schädigungsform durch die Vertreter dieser Stoffgruppe angesehen werden.

Wir haben zuerst zu prüfen, ob ein Zusammenhang zwischen Mitoseschädi-

gung und chemischer Strukturformel der angewandten Steroide besteht. Nach Untersuchungen von v. MÖLLENDORFF zeigte es sich wenigstens für die männlichen Sexualhormone, dass die ungesättigten Verbindungen ausnahmslos wirksam sind, während die gesättigten Parallelverbindungen die Mitosen ebenso ausnahmslos nicht schädigen. Als Ursache für die typischen Mitosestörungen ist das Vorkommen einer oder mehrerer Doppelbindungen verantwortlich zu machen.

Unsere Untersuchungen haben weiter ergeben, dass hormon-spezifische Wirkung und Mitoseschädigung völlig unabhängig voneinander sind. Stoffe höchster geschlechtsspezifischer Wirksamkeit schädigen zwar die Mitosen besonders stark, die hydrierten Verbindungen dieser Stoffe haben ebenso ausnahmslos keine schädigende Wirkung, büssen aber ihre Hormonwirksamkeit nicht ein.

GRAFFI 1941 hat in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen nachgewiesen, dass cancerogene Kohlenwasserstoffe, die die gleiche Mitosestörung hervorrufen wie die Sexualhormone, in gewissen lipophilen Zellstrukturen angehäuft werden. BRACHET 1944 hat gezeigt, dass diese Strukturen, die in der lebenden Zelle in Form von Granula vorkommen, durch Zentrifugieren von den übrigen Zellbestandteilen getrennt werden können und auch so noch elektiv Benzpyren zu bilden vermögen. Die chemische Analyse dieser Granula, die mit den Mitochondrien identisch sein dürften, ergibt, dass sie in der Hauptsache SH-Gruppen, Ribonukleotide und verschiedene Fermentsysteme enthalten, wie Zytochromoxydase, Succinodehydrase u. a. m. In der Arbeitsstruktur des Protoplasmas eingebaut, scheinen sie wichtige Stoffwechselzentren zu sein, deren Umsatz wahrscheinlich mit dem Kernstoffwechsel in Wechselbeziehung steht. Dass sie auch für die Entwicklung von Wichtigkeit sind, dafür spricht ihre starke Vermehrung im Verlaufe der Morpho- und Histogenese, ebenso wie ihre dem morphogenetischen Potential entsprechende Verteilung während dieser entwicklungsphysiologisch bedeutsamen Phase der Ontogenese.

Das gehäufte Vorkommen von SH-Proteinen und Ribonukleoproteiden in den beschriebenen Zellstrukturen lässt die Möglichkeit einer direkten Beeinflussung dieser chemischen Verbindungen durch die wirksamen Steroide vermuten.

Kernteilungsvorgänge sind verbunden mit einem Auf- und Abbau von Desoxyribonukleinsäure. Die Bedeutung der Nukleoproteide für die Morpho- und Histogenese, bei welcher Kernteilung eine grosse Rolle spielt, ist zuerst von BRACHET erkannt und beschrieben worden. Unsere eigenen Ergebnisse an Normalkeimen von Triton alpestris stimmen mit seinen Angaben völlig überein (CAGIANUT, 1949).

Nukleinsäuren kommen dort gehäuft vor, wo morphogenetische und histogenetische Höchstleistungen verlangt werden. Sie kommen in zwei Formen vor. Als Ribosenukleinsäure lassen sie sich im Zytoplasma, als Desoxyribonukleinsäure oder Thymonukleinsäure im Kern nach-

weisen. Wir besitzen spezifische Nachweismethoden, und zwar die FEULGEN-Reaktion auf Thymonukleinsäure und die Pyronin-Methylgrün- oder Toluidinblaufärbung für Ribosenukleinsäure. Um Fehler auszuschliessen, werden die Präparate mit einer Ribonuklease behandelt, welche die Ribonukleinsäure herauslöst, so dass die Färbung dann negativ ausfällt.

Beide Säuren wurden im befruchteten Amphibienei nachgewiesen. Während der Furchung erfolgt *keine* Zunahme der Nukleinsäuren gesamthaft, hingegen eine Abnahme des Gehaltes an Ribosenukleinsäure um 10—15 %, ein Hinweis darauf, dass Ribosenukleinsäure in Thymonukleinsäure transformiert wird (BRACHET).

In der Gastrula häuft sich die Ribosenukleinsäure dorsal in der Randzone bis zum Umschlagsrand der dorsalen Urmundlippe, aber auch das eingerollte Material zeigt eine positive Reaktion. Es lässt sich ein deutliches Gefälle nachweisen, das sein Maximum in der dorsalen Urmundlippe hat und sowohl cranio-caudal, also auch dorso-ventral abnimmt.

Bei der *Neurula* zeigt die Medullarplatte eine starke Reaktion mit Maximum im Hirnteil. Auch hier lässt sich das cranio-caudale und das dorso-ventrale Gefälle nachweisen. Die Chordamesodermplatte zeigt eine schwächere Reaktion mit Maximum im dorsalen Zentrum. Bei der *Neurula* beträgt der Gehalt dorsal 100 % mehr als ventral.

In der einzelnen *Ruhezelle* lokalisiert sich die Ribosenukleinsäure in Form von feinen Fäden um den Kern, zwischen den Dotterplättchen und an den Zellgrenzen (Abb. 10). In den sich teilenden Zellen treten diese fädigen Strukturen zurück, die Spindel ist deutlich rot angefärbt.

Unter dem Einfluss der Sexualhormone treten nun deutliche Abweichungen auf (TÖNDURY und CAGIANUT, 1951). Die Färbung verliert zunächst allgemein an Intensität, wird stellenweise unregelmässig. Das cranio-caudale und das dorso-ventrale Gefälle ist schwieriger nachzuweisen. Auch die Einzelzelle zeigt eine Störung der Verteilung der Ribosenukleinsäure. Es verschwindet teilweise die charakteristische Anfärbung der Zellgrenzen und die rote Zone um die Arbeitskerne. Dafür findet man oft den ganzen mit Pyronin anfärbbaren Bestand der Zelle an einer Stelle im Zytoplasma zusammengeballt (Abb. 11). Die Spindeln der sich teilenden Zellen verlieren z. T. ihre Anfärbbarkeit, die einzelnen Spindelfasern sind teils fragmentiert, teils unregelmässig verteilt. Von Wichtigkeit ist der Umstand, dass die *Entwicklungsfehleistungen dem Störungsgrad in der Verteilung der Nukleoproteide entsprechen*. Diesen Feststellungen liess sich vorerst nur entnehmen, dass Entwicklungsleistungen und normaler Nukleoproteidstoffwechsel eng zusammengehören.

In dieser Richtung weisen auch Untersuchungen über die Verteilung der Ribosenukleinsäure in der Medullaranlage von Tritonkeimen mit Halbseitenentwicklung hin (Abb. 4, 5). Diese Keime liessen auf der unentwickelt gebliebenen Seite eine deutliche Verminderung der pyroninaffinen Strukturen erkennen. Während diese auf der normal entwickelten Seite gleichmässig ver-

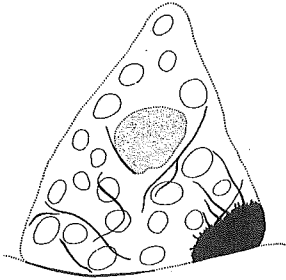


Abb. 10 Verteilung der Ribosenukleinsäure in der Ruhezelle des Neuralrohres von *Triton alpestris*.

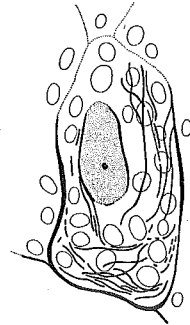


Abb. 11 Verteilung der Ribosenukleinsäure in durch Stilboestrol geschädigter Zelle des Neuralrohres von *Triton alpestris*.

teilt waren, erschienen sie auf der unentwickelten Seite nicht nur mengenmässig vermindert, sondern auch unordentlich angeordnet.

Besonders eindrücklich waren in dieser Beziehung Untersuchungen über das Verhalten der Nucleinsäuren in der Augenentwicklung von Amphibien (RICKENBACHER, 1951): Die Augenblase zeigt eine noch schwache Pyroninreaktion. Mit der Umbildung der Augenblase in den Augenbecher und der damit auftretenden starken Zellproliferation wird auch die Pyroninreaktion zunehmend stärker. Dies äussert sich in einer starken Zunahme der roten Granula hauptsächlich an den Zellenden. Mit Einsetzen der Histogenese nehmen die Granula in den zentralen Teilen der Retina mehr und mehr ab und beschränken sich schliesslich auf die Randteile des Augenbechers, die nunmehr als Zuwachszone funktionieren. In einem Stadium, in welchem in den hintern Teilen der Retina die Gliederung beendet ist, lässt sich nur noch im Augenbecherrand eine positive Pyroninreaktion nachweisen.

In den Augenanlagen von Keimen, die mit Hormonlösungen behandelt wurden (Abb. 8), war die Pyroninreaktion deutlich schwächer als in unbehandelten Augen. Die roten Granula waren zwar vorhanden, stellenweise aber zu groben Haufen zusammengeballt, die Teilungsspindeln — wenn überhaupt nachweisbar — unregelmässig und fragmentiert. Diese Störungen waren um so auffälliger, je grösser die Zahl der Zellen war, die sich im Moment der Hormonbehandlung noch in der Vermehrungsphase befanden.

Für eine direkte Beziehung von Hormonwirkung und Nucleinsäureumsatz spricht, dass Zugabe von Nucleinsäure zu den schädigenden Hormonen deren Wirksamkeit ganz oder teilweise aufzuheben vermag. Dieser Schutz erstreckt sich ebenfalls auf die für Sexualhormone spezifische Störung der Kernteilung. Es bestehen bei Hormonkontrollen und zusätzlich mit Nucleinsäure behandelten Keimen statistisch gesicherte Unterschiede in den Prozentsätzen abnormer Mitosen (CAGIANUT, 1949). Die Beeinflussung der Mitoseverhältnisse hat zur Folge, dass alle jene Entwicklungs-

leistungen, die direkt durch Kernfaktoren gesteuert sind, gebessert werden. Es wurden also nachträglich vorzüglich jene Keimbezirke vor Untergang und Desorganisation geschützt, die gegen abnorme Chromosomensätze besonders empfindlich sind.

Nach den bisher vorliegenden Untersuchungen glaubten wir annehmen zu können, dass sich die Sexualhormone an die weiter oben erwähnten lipophilen Zellgranula anhäufen und die Synthese der Ribonukleinsäure behindern. Dies hätte natürlich auch eine Störung der Thymonukleinsäuresynthese zur Folge. Mit dem Nachweis einer abnormen Verteilung der pyroninaffinen Granula allein lässt sich aber unsere Annahme nicht beweisen. RICKENBACHER hat deshalb versucht, durch quantitative Bestimmungen die Nukleinsäuren nachzuweisen. Über die Ergebnisse dieser quantitativen Bestimmungen wird an anderer Stelle eingehend berichtet werden. Sie weisen darauf hin, dass die Synthese von Ribonukleinsäure bei mit Hormon behandelten Keimen weiterhin möglich ist. Nur die qualitative Verteilung der pyroninaffinen Granula im ganzen Keim und in der einzelnen Zelle wird gestört. Nehmen wir mit BRACHET an, dass die im Zytoplasma gebildete Ribosenukleinsäure für den Aufbau der Desoxyribonukleinsäure verwendet wird, dann müssen wir die Störung in der Behinderung dieses Prozesses suchen.

In Berücksichtigung der beschriebenen Befunde neigen wir zur Annahme, dass die beobachteten Mitosestörungen nicht als primäre Schädigungen, sondern als sekundäre Folgen des gestörten Nukleinsäurestoffwechsels anzusehen sind. Mitosen können zwar noch eingeleitet werden, kommen aber im Stadium der frühen Metaphase wohl infolge der Unmöglichkeit, Desoxyribonukleinsäure aufzubauen, zum Stillstand. Der Umstand, dass die Mitosen während der Furchung und Gastrulation zwar geschädigt werden, aber doch ablaufen, weist darauf hin, dass der Mechanismus in diesen frühen Stadien offenbar ein anderer ist. Wahrscheinlich kommt der Thymonukleinsäure im Mitoseablauf beim Furchungstyp eine weniger grosse Bedeutung zu als in späteren Stadien.

Untersuchungen über die Wirkung von Röntgenstrahlen auf den Nukleinsäurestoffwechsel von Hodenzellen von *Asellus aquaticus* (DE NICOLA, 1950) haben zu ganz ähnlichen Vermutungen geführt: Röntgenstrahlen bedingen einen Stillstand der Synthese von Desoxyribonukleinsäure und der Umwandlung von Ribose- in Desoxyribosenukleinsäure. Röntgenstrahlen scheinen also auch zunächst den Nukleinsäurestoffwechsel zu beeinträchtigen; die Mitosestörungen wären dann wahrscheinlich sekundäre Folgeerscheinungen der Strahlenwirkung.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Wirkungen der männlichen und weiblichen Sexualhormone auf die Entwicklung und speziell das Wachstum embryonaler Organe haben auch praktisch-medizinisches Interesse.

In den letzten Jahren haben Sexualhormone auch therapeutische Verwendung gefunden. Unter den Wirkstoffen mit oestrogenen Wirkung besitzt das Stilboestrol besondere Bedeutung. Es wird wegen seiner destruierenden Wirkung auf stark proliferierende Zellen z. B. in der Hormonbehandlung des

Brustdrüsen- und Prostatakrebses mit Erfolg verwendet. In 90 % der Fälle kommt es unter seiner Wirkung z. B. beim Prostatakrebs zu Gewichtszunahme und Verbesserung des Allgemeinbefindens des Patienten. Die Prostata wird weicher, vergrößerte Lymphknoten verkleinern sich und Lymphödeme verschwinden ebenso wie Schmerzen, die von Knochenmetastasen herrühren. Diese günstige Wirkung, die schon kurze Zeit nach Einleitung der Behandlung eintritt, muss auf die Mitosewirkung des Stilboestrols zurückgeführt werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass der Effekt auf sich teilende Zellen im Tumor im Vordergrund steht. Wie beim Tritonkeim sind die Prophasen unverändert, während die Metaphasen Störungen zeigen. Die Spindelbildung ist verzögert oder ganz unterdrückt; die Chromosomen werden fragmentiert und es folgt schliesslich der Zellerfall.

Literaturangaben

- BARIGOZZI, C., BRACHET, J. u. a. *Acidi nucleici proteine e Differenziamento normale e patologico*. Torino 1949.
- BRACHET, J., 1944. *Embryologie chimique*. Paris.
- CAGIANUT, B., 1948. *Schweiz. Z. Path. Bakt. II*, 598
 — 1949 a. *Rev. suisse Zool.* 52, 1.
 — 1949 b. *Z. Zellforsch.* 34, 471.
- GRAFFI, A., 1941. *Z. Krebsforsch.* 52, 234.
- HADDOW, A., HARRIS, R. J. C., KON, G. A. R. (1945), *Biochem. Journ.* 39, 1.
- LÜSCHER, M., 1945. *Rev. suisse Zool.* 52, 349.
- VON MÖLLENDORFF, WILH., 1939. *Z. Zellforsch.* 29, 706.
 — 1943. *Z. Zellforsch.* 32, 35.
- DE NICOLA, M., 1950. *Experientia VI*, 432.
- RICKENBACHER, J., 1951. *Rev. suisse Zool.* 58, 456.
- SCHENK, ROB., 1950. *Roux' Archiv* 144, 448.
- TÖNDURY, G., 1940. *Rev. suisse Zool.* 47, 1.
 — 1941. *Roux' Archiv.* 141, 58.
 — 1943. *Roux' Archiv.* 142, 1.
 — 1947. *Acta Anat.* IV, 269.
- TÖNDURY, G. u. CAGIANUT, B., 1951. *Biol. Rev.* 26, 28.
-