

**Zeitschrift:** Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie suisse des sciences médicales = Bollettino dell' Accademia svizzera delle scienze mediche

**Band:** 22 (1966)

**Artikel:** Die Wirkung bestimmter Substanzen auf die DNS- und Proteinsynthese in der frühen Embryonalentwicklung des Kaninchen

**Autor:** Zimmermann, W. / Gottschewski, G.H.M.

**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-307645>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

**Download PDF:** 19.10.2024

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

Arbeitsgruppe G. H. M. Gottschewski am Max-Planck-Institut für Immunbiologie,  
Freiburg i. Br.

## **Die Wirkung bestimmter Substanzen auf die DNS- und Proteinsynthese in der frühen Embryonalentwicklung des Kaninchens**

W. ZIMMERMANN UND G. H. M. GOTTSCHESKI

Die Anzahl derjenigen Arbeiten, die sich mit dem Einfluß verschiedener Pharmaka auf den Zellstoffwechsel befassen, ist heute kaum mehr zu überblicken. Für bestimmte Stoffwechselprozesse sind Wirkungsmechanismen einzelner Pharmaka durch viele Untersuchungen (HARBERS 1964; KRÖGER 1964; NEUHOFF 1965) aufgeklärt. Dennoch bleibt die Möglichkeit offen, daß die Wirkung verschiedener Substanzen an mehreren Stellen der vielfältigen Stoffwechselprozesse eintreten kann und diese noch nicht bekannt sind. Ferner ist es unseres Erachtens nicht ohne weiteres möglich, Ergebnisse an sehr verschiedenem Material gleichzusetzen. Als Material diente hauptsächlich normales Gewebe und Tumorgewebe erwachsener Individuen in In-vivo- bzw. In-vitro-Kultur, ferner embryonales Gewebe von Echinodermen, Amphibien, Vögeln und Säugetieren. Wir wollen hier nur auf die teratogene Wirkung bestimmter Substanzen auf den Säugetierembryo eingehen und kurz aufzeigen, daß bei zunächst gleichbleibender Applikationsart die Substanz dennoch sehr verschiedene Wege einschlägt.

### *Material und Methodik*

Aufbauend auf unsere Versuche, über die wir (GOTTSCHESKI und ZIMMERMANN) 1963 berichtet haben, unternahmen wir eine neue Versuchsreihe, über die wir hier berichten wollen. Dazu wurden Mischlingskaninchen von unterschiedlicher Größe und Abstammung verwendet. Die Substanzen wurden intravenös 70 Std. (h) bzw. 192 h nach dem Deckakt (p. c.) in die Ohrtrandvene injiziert.

Verwendet wurden:

E 39 (*Bayer*) 2,5 oder 5 mg/kg Körpergewicht (E 39),

Puromycin 5 mg/kg Körpergewicht (PM),

Hydroxylamin 10 mg/kg Körpergewicht (HA),

p-Fluorphenylalanin 10 mg/kg Körpergewicht (p-FA) und Actinomycin (ein Gemisch aus C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> und C<sub>3</sub>) 0,1 bis 0,3 mg/kg Körpergewicht (AM).

Hydroxylamin wurde als Hydrochlorid verwendet, in Aqua bidest. gelöst und mit Natronlauge auf pH 7 eingestellt. Die übrigen Substanzen wurden in Aqua bidest. gelöst. Alle Lösungen wurden vor der Injektion frisch hergestellt. Die verwendeten Weibchen wurden entweder 11 Tage (d) p. c. oder 17 d p. c. getötet, die Uterushörner exstirpiert

und die Fruchtblasen einzeln in kleinen Wachsbecken präpariert. Ein ausführliches Protokoll über den makroskopischen Befund wurde während der Präparation niedergelegt. Anschließend wurden die Feten bzw. Fetenreste mit dem Ultraphot II (Zeiss) photographiert. Alle Messungen wurden an maßstabsgerecht hergestellten Vergrößerungen durchgeführt.

### *Entwicklungszustände zur Zeit der Applikation*

Beim Kaninchen befindet sich 70 h p. c. die Morula (Abb. 1) im unteren isthmischen Teil des Eileiters, kurz vor dem Übertritt in den Uterus. Sie besteht im Mittel aus 172 Zellen und ist von dem stark entwickelten Mucolemma umgeben. Ob bis zu diesem Zeitpunkt überhaupt Stoffe aus der Umgebung aufgenommen werden, ist noch nicht bekannt (GREENWALD and EVERETT 1959). Der Durchmesser der Morula einschließlich des Oolemmas (Zona pellucida) ist noch der gleiche der ursprünglichen Eizelle. Die ursprüngliche Cytoplasmamenge muß also geringer geworden sein, da ja zwischen den vielen Einzelzellen Hohlräume entstanden sind. Das stimmt auch mit Untersuchungen überein, die KAVANAU (1953) am Seeigel durchführte. Eine Proteinneusynthese mit Aufnahme von Stoffen von außen hat demnach nicht stattgefunden. Allerdings muß wohl vor jeder Mitose eine Synthese der für den Spindelapparat und die neu zu bildenden Zellwände benötigten Proteine stattfinden (GROSS und COUSINEAU 1963; MANGAN u. Mitarb. 1965). Die dazu notwendigen Bausteine sind dem Ei während der Oogenese eingebaut worden. Da ferner nach GOTTSCHESKI (1963) in dieser prokogenen Phase wegen der vorrätig vorliegenden Enzyme auch kaum eine Neusynthese von Enzymen benötigt wird, ist also der gesamte Proteinstoffwechsel sehr gering.

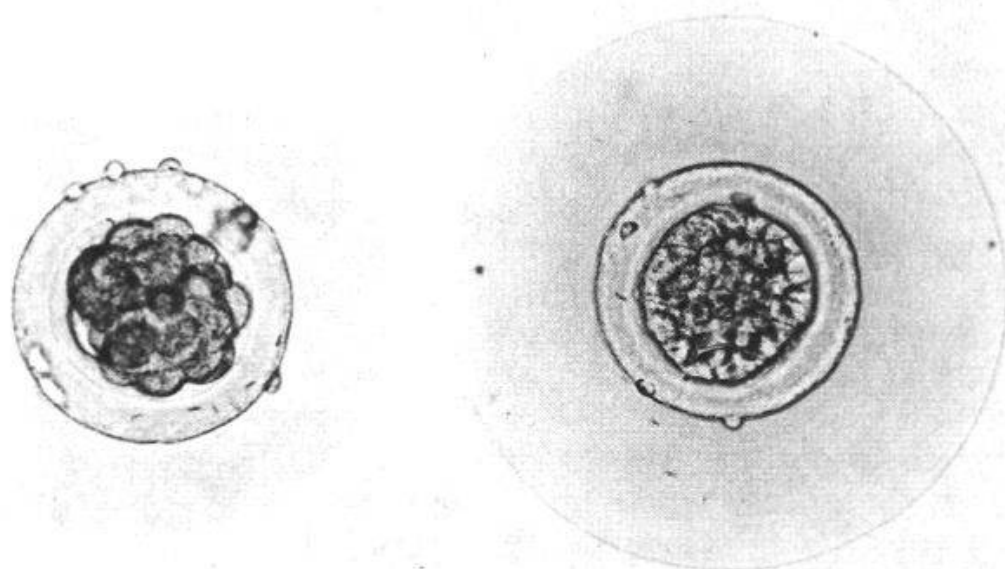


Abb. 1. Aus demselben Uterushorn 70 h p.c. ausgespült: links eine Morula, rechts eine Blastocyste

Bezüglich der DNS-Synthese (HENDLER 1963) können die Verhältnisse anders liegen. Nach BRACHET (1962) bleibt zwar bei Amphibien der DNS-Gehalt während der ersten Teilungsschritte konstant, und das Kernvolumen fällt zwischen der Blastula und der jungen Gastrula auf  $\frac{1}{8}$  des ursprünglichen ab. Ob das aber auch für das Säugetier zutrifft, ist nicht bekannt. Wenn der DNS-Vorrat nicht in den Chromosomen verankert ist, so muß vor jeder Zellteilung eine Verdoppelung der Chromosomen-DNS erfolgen und somit, wenn nicht eine Gesamtsynthese, doch zumindest eine Polymerisation und Anlagerung an die vorhandenen DNS-Matrizen stattfinden. Auch diese Prozesse vollziehen sich aus dem Vorrat im Cytoplasma.

Über die energetische Steuerung der Stoffwechselfvorgänge während der frühen Embryonalentwicklung des Kaninchens ist leider sehr wenig bekannt. Immerhin wissen wir aus den Untersuchungen FRIDHANDLERS (1961), daß mit dem Übergang von der Morula zur Blastocyste, also etwa von 72 h an, eine Umstellung des Glukoseabbaues erfolgt. Während in den 1–2 Tage alten Eiern kein nachweisbarer Glukoseumsatz erfolgt, wird am dritten Tag Hexosemonophosphat oxydiert. Vom Blastocystenstadium an wird dann der EMBDEN-MEYERHOF- und der Tricarbonsäurezyklus besprochen. Dabei verlaufen aerobe Prozesse neben anaeroben. FRIDHANDLER fand, daß etwa 10mal mehr Glukose anaerob zu Milchsäure als aerob zu  $\text{CO}_2$  verarbeitet wurde. Er erörterte die Frage, ob die Trophoblast- bzw. Embryoblastzellen für diese beiden verschiedenen Wege verantwortlich sein könnten. Diese Messung wurde an 6 d alten Blastocysten durchgeführt. Wir (GOTTSCHESKI und ZIMMERMANN 1965) haben an 5 d alten Blastocysten etwa 500 Embryoblastzellen und 5000 Trophoblastzellen gezählt. Wenn man diese Zählung mit FRIDHANDLERS Angaben vergleicht, könnte man die Behauptung aufstellen, daß die Trophoblastzellen die Glukose anaerob zu Milchsäure abbauen, während in den Embryoblastzellen die aerobe Glykolyse abläuft.

70 h p.c. ist eine Differenzierung in Embryoblast- und Trophoblastzellen sicher erfolgt. Innerhalb der Embryoblastzellen können weitere Differenzierungsprozesse in Ektoderm und Entoderm oder etwa in Vorderfeld und Hinterfeld abgelaufen sein. Wir wissen aber z. B. nicht, ob die erste Urentodermzelle wirklich vom Embryoblast stammt, ferner ist noch unbekannt, auf welchen Ursprung die amniogenen Zellen und die Zellen der Area vasculosa und der Area pellucida zurückgehen.

Wenn zu diesem Zeitpunkt ein Pharmakon i.v. appliziert wird, dann durchläuft die Substanz zunächst den mütterlichen Kreislauf, muß schließlich aus den Kapillaren in die Sekretzellen des Eileiterepithels aufgenommen werden und mit den Sekreten an die saure Mukoproteidschicht, deren pH-Wert unter 6,0 liegt (Braden 1952), abgegeben werden und von hier in die Zellen der Morula diffundieren. Stoffwechselempfindliche Substanzen werden daher wahrscheinlich nur in verändertem Zustand zur Wirkung kommen.

Wird dagegen die Injektion 192 h p. c. in gleicher Weise durchgeführt, so ist der Weg vom Applikationsort zum Wirkungsort einfacher: denn zu diesem Zeitpunkt strömt mütterliches Blutplasma direkt in die Frucht-

blasenhöhle ein. Mit diesem physiologischen Plasmaübertritt kann die unveränderte Substanz schon nach weniger als einer Minute mit übertreten. Außerdem muß mit einer später einsetzenden Sekundärwirkung von Abbauprodukten gerechnet werden. 192 h p. c. wird die Konzentration des Pharmakons sicher höher sein als 70 h p. c., das Verhältnis von vorhandenen Molekülen zur Anzahl der Blastocystenzellen aber wahrscheinlich geringer, weil in der Zwischenzeit mindestens  $2^{10}$  Zellteilungen stattgefunden haben. Um solche vergleichenden Untersuchungen richtig interpretieren zu können, wäre es also erforderlich, den Nachweis zu erbringen, wann, in welcher Menge und mit welchen Veränderungen das Pharmakon am Wirkungsort vorliegt.

8 d p.c. ist die Blastocyste im Uterus mit Hilfe der syncytialen Trophoblastsprossen angeheftet oder nidiert. Der Embryo, der die Ausbildung der Körpergrundgestalt beendet hat, liegt noch flach auf der mesometralen Seite auf den mächtig vorgewölbten Placentarwülsten. Der in Abb. 2 gezeigte Keim entspricht etwa der Norm, während Abb. 3 einen Keim aus der gleichen Mutter zeigt, der in seiner Entwicklung schon ein wenig weiter fortgeschritten ist. Das Gehirn zeigt eine deutliche Gliederung in Prosencephalon

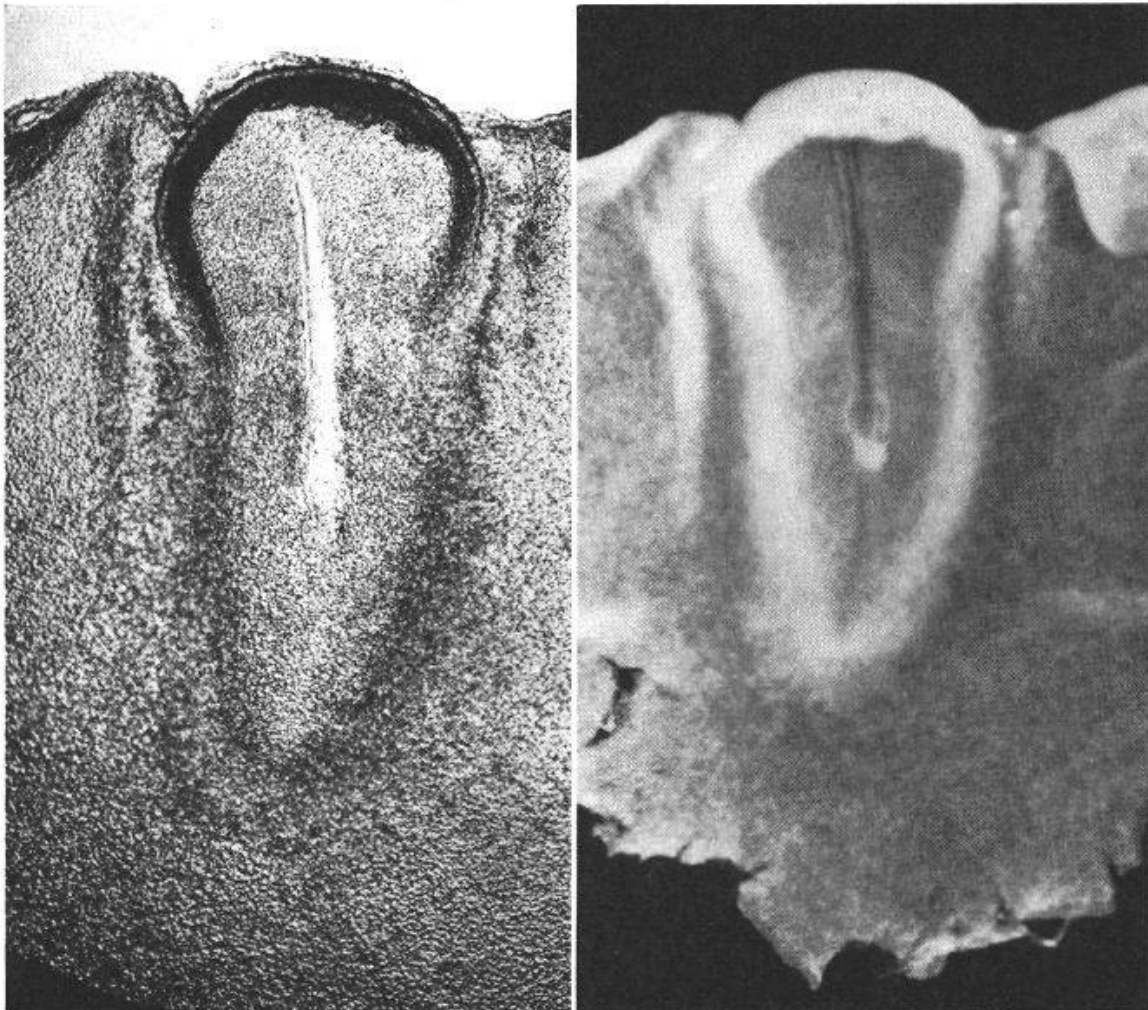


Abb. 2. Kaninchenembryo, Ventralansicht 8 d p.c., normaler Entwicklungszustand; links lebend, rechts fixiert in Bouin.

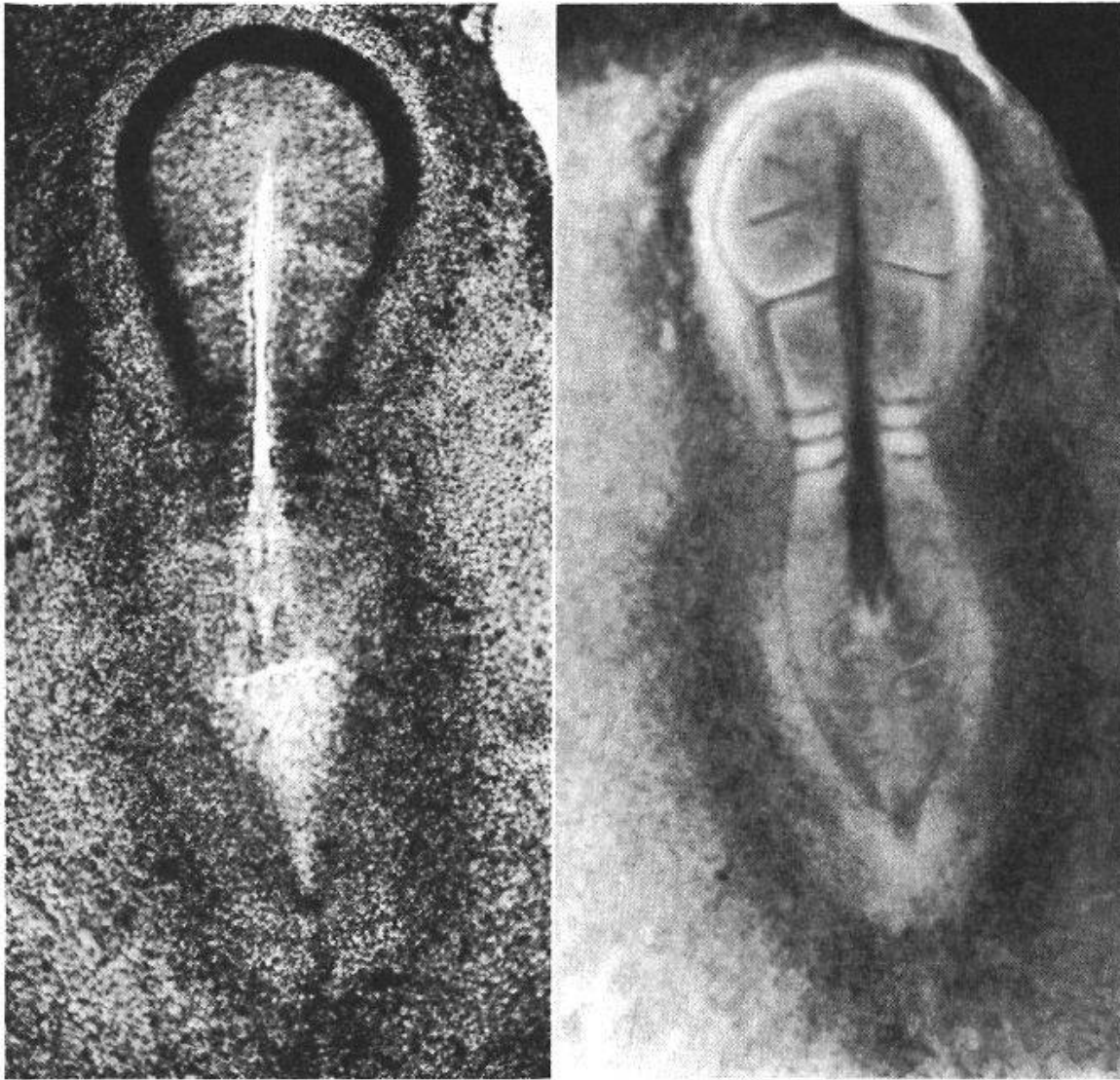


Abb. 3. Kaninchenembryo, Dorsalansicht 8 d p.c. mit 3 Paar Somiten; links lebend, rechts fixiert in Bouin.

und Rhombencephalon, 2 bis 3 Somiten sind bereits abgegliedert, die Amnionbildung hat gerade begonnen. Fast alle Organanlagen sind differenziert, und in der weiteren Entwicklung tritt die histologische Differenzierung der Organsysteme und Organe hervor. Ein großer Eiweißvorrat aus mütterlichem Plasma ist von 7 d 12 h p.c. an vorhanden, aus welchem der Embryo seinen Proteinbedarf decken kann. Ferner steht reichlich Histotrophe aus dem Abbau des Endometriums zur Verfügung. Hierbei bleibt noch eine Frage offen, nämlich ob er jetzt, in der idiogenen Phase, überall schon individualspezifische Proteine aufbaut, oder ob er, zumindest teilweise, die noch speciesspezifischen Proteine verwendet und vielleicht erst nach der Metamorphose, also etwa ab 14 bis 15 d p.c., seine individualspezifischen Proteine synthetisiert. Zu dieser Frage kommen wir auf Grund folgender Tatsachen und Überlegungen: Das mit dem mütterlichen Plasma einströmende Fibrinogen läßt sich bis zum Ende des 8. Tages als Fibrin ausfällen. Mit Beginn des 9. Tages dagegen ist es unmöglich, noch Fibrin nachzuweisen. Das

Fibrinogen muß also in der Dottersackhöhle verändert worden sein. Als stickstoffhaltige Nährstoffe stehen dem Embryo einerseits die Plasmaproteine, andererseits die Bestandteile der Histotrophe zur Verfügung. Vermutlich wird der Embryo hauptsächlich niedermolekulare stickstoffhaltige Bausteine aufnehmen, die vor allem aus der Histotrophe stammen. Dann wäre aber nicht einzusehen, warum die mütterlichen Plasmaproteine in so großer Menge in die Dottersackhöhle übertreten, wenn diesen nicht eine ganz andere Funktion zukäme! Wir arbeiten zurzeit an der Beantwortung dieser Frage auf Grund der Hypothese, daß die maternalen Plasmaproteine den Embryo und seine neu entstandenen Hüllen vor einer Antigenwirkung auf die Mutter maskieren sollen.

Zu dieser Zeit findet also ständig eine intensive Proteinsynthese statt. Parallel zur schnellen Kernvermehrung findet auch eine intensive DNS-Synthese statt.

Der Kohlenhydratstoffwechsel ist zu dieser Zeit weitgehend der gleiche wie in der Blastocyste. Nur wird jetzt, da genügend Sauerstoff zur Verfügung steht, der Embryo die Brenztraubensäure im wesentlichen über den Zitronensäurezyklus aerob zu  $\text{CO}_2$  abbauen.

Über die Wirkungsweise der von uns verwendeten Substanzen ist folgendes bekannt:

*E 39* greift die DNS-Moleküle direkt an den Guaninmolekülen an, so daß es zu Brüchen kommen kann. Dadurch können Mutationen entstehen. Es erniedrigt aber auch die DPN-Konzentration, wodurch die Glykolyse gehemmt wird. Dadurch sinkt der ATP-Spiegel, und dies führt zu einer verminderten Protein-, DNS- und RNS-Synthese. Die Folge ist eine Verminderung der Zellvermehrung.

*Puromycin* greift in die Proteinsynthese ein und vermindert den Zusammenbau der fertigen Proteine (FICQ 1964), so daß nur Bruchstücke gebildet werden. Es unterdrückt die Mitosen in allen Furchungsstadien beim Seeigel (HULTIN 1961).

*Hydroxylamin* verhindert die DNS-, RNS- und Proteinsynthese (ROSENKRANZ und BENDICH 1964). Die DNS wird unter der Einwirkung von Hydroxylamin physikalisch-chemisch nicht verändert. Der Einbau von Aminosäuren in die RNS wird verhindert.

*p-Fluorphenylalanin* ist ein Antimetabolit und kann bei der Proteinsynthese als falsche Aminosäure eingebaut werden, was dann sekundär zu Störungen führt, indem entweder falsche Informationen gegeben oder falsche Strukturproteine gebildet werden.

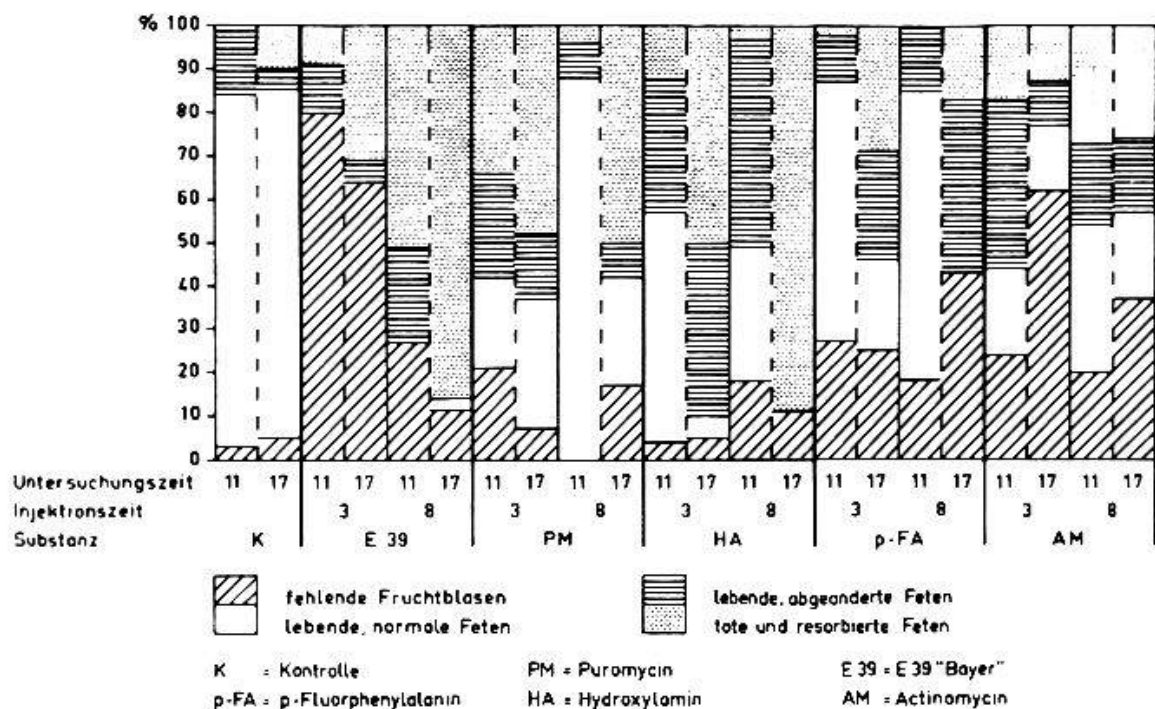
*Actinomycin* blockiert die DNS-abhängige Synthese der m-RNS (FICQ 1964). Damit wird verhindert, daß die Gene ihre Informationen abgeben können. Es tritt wahrscheinlich eine Depolymerisierung der DNS auf. Die DNS-Synthese selbst wird nicht verhindert.

### *Ergebnisse*

Wenn ich nun auf die Ergebnisse unserer Versuche zu sprechen komme, so muß ich vorausschicken, daß unterschiedliche biochemische Schäden oft zu sehr ähnlichen Modifikationen der Normalentwicklung führen können. Mit anderen Worten: Es ist nicht möglich, aus der Untersuchung der makroskopisch sichtbaren Veränderung einen zuverlässigen Schluß auf die Spezifität einer Substanz zu ziehen. Unter Berücksichtigung der spezifischen Entwicklungsphase zur Zeit der Applikation, dem normalerweise zu erwar-







1965

Abb. 4. Anzahl der fehlenden Fruchtblasen, der lebenden normalen und abgeänderten sowie der toten oder resorbierten Feten in % der Gelbkörper. Nähere Erklärungen im Text.

tenden Entwicklungszustand zur Zeit der Untersuchung und dem, was uns bisher über die Wirkung der verwendeten Pharmaka bekannt ist, können Rückschlüsse auf die Ursache der Modifikationen im Zellstoffwechsel des Embryos gezogen werden, die zu den Fehlleistungen geführt haben. In Abb. 4 und Tab. 1 wird zunächst eine Übersicht über die Anzahl der lebenden, toten und mißgebildeten Feten gegeben. Am Untersuchungstag, 11 d oder 17 d p.c., wurden die Gelbkörper eines jeden Weibchens gezählt. Danach wurde die Anzahl der fehlenden Fruchtblasen, die Anzahl der lebenden normalen, lebenden abgeänderten sowie der toten und resorbierten Feten berechnet. In Abb. 4 sind diese Zahlen jeweils in % der Gelbkörper dargestellt. Bei der Besprechung der Ergebnisse werden der Einfachheit halber die Einzelversuche folgendermaßen angegeben: Z. B. bedeutet «HA-8/11» Hydroxylamin wurde 8 d p.c. injiziert und 11 d p.c. wurden die Feten untersucht. Bei den Kontrollen ist zu erwähnen, daß im Gegensatz zu früheren Versuchsgruppen weniger Fruchtblasen fehlen. Werte bis zu etwa 20% fehlende und abgeänderte sowie resorbierte Feten können hier noch als normal angesehen werden.

Die Wirkung von *E 39* ist sehr drastisch. Je früher es appliziert wird, desto mehr Fruchtblasen fehlen. Der zufällige Unterschied in unserer Darstellung zwischen 3/11 und 3/17 bzw. 8/11 und 8/17 ist statistisch nicht gesichert. Nur im Versuch 8/11 wird noch eine nennenswerte Anzahl von abgeänderten lebenden Feten gefunden. Dieser Versuch müßte vielleicht mit geringerer Dosis wiederholt werden, wenn man hier weitere Aussagen machen wollte.

*Puromycin* erhöht die Anzahl der fehlenden Fruchtblasen nicht, denn sonst dürfte der Wert 3/17 nicht kleiner sein als der Wert 3/11. Die Wirkung tritt verhältnismäßig langsam ein, da im Versuch 8/11 keine Abweichung von der Kontrolle zu erkennen ist. In den drei anderen Versuchsgruppen ist die Auswirkung annähernd gleich. Insbesondere die Schäden 3/17 und 8/17 sind fast übereinstimmend. Deshalb kann angenommen werden, daß die Substanz spezifisch in die Proteinsynthese eingreift.

*Hydroxylamin* zeigt einen anderen Wirkungsmechanismus. In keinem Versuch ist die Anzahl der fehlenden Fruchtblasen erhöht. Im Versuch 3/11 sind noch über 50% der Feten normal, 3/17 sind jedoch fast alle abgeändert oder tot. 8/11 ist dem Versuch 3/11 in seiner Auswirkung ähnlich. 8/17 sind alle Feten tot, d. h. daß diese Substanz, gleichgültig wann sie appliziert wurde, erst kurz vor 11 d p.c. in den Stoffwechsel eingreift.

Die Injektion von *p-Fluorphenylalanin*, einem Antimetaboliten, zeigt im Versuch 3/11 nur ein geringes Ansteigen der fehlenden Fruchtblasen; 3/17 ist die Wirkung deutlicher, sowohl im Anstieg der abgeänderten als auch der toten Feten. 8/11 ist keine Wirkung zu erkennen, dagegen aber 8/17. Daraus ist abzuleiten, daß diese Substanz nicht toxisch wirkt, dagegen aber die Proteinsynthese des Embryos stört. Nach einer frühen Injektion (3 d p.c.) sterben zwar einige Blastocysten; die 11 d p.c. noch lebenden Keime enthalten aber falsche Informationen, die dazu führen, daß bis 17 d p.c. noch in vielen Feten Entwicklungsfehleistungen entstehen, die zum Absterben führen. Nach einer späteren Injektion (8 d p.c.) passiert in den ersten drei Tagen nichts, die Substanz wird aber in den Embryo eingebaut, und bis 17 d p.c. werden alle Feten modifiziert.

Beim *Actinomycin* ist auffällig, daß bei 3/17 und 8/17 die Anzahl der fehlenden Fruchtblasen sehr hoch ist. In allen Versuchen, insbesondere bei 8/11, sind aber noch lebende normale Feten vorhanden. D. h. daß das *Actinomycin* in der hier verwendeten Dosis von allen Stoffen nach dem *Puromycin* die geringste Wirkung zeigte.

Aus der bisherigen Darstellung lassen sich nur wenig Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus der einzelnen Substanzen ziehen. Am deutlichsten zeichnet sich die Wirkung des para-Fluorphenylalanins ab. Hier scheint der Antimetabolit in das Eiweiß eingebaut zu sein, und die daraus resultierende Störung der Embryonalentwicklung tritt erst deutlich während der histologischen Differenzierung der Organe in Erscheinung.

Wir haben ferner verschiedene Messungen an den photographierten Feten durchgeführt. Wir wollen hier nur auf die Gesamtkörperlänge etwas ausführlicher eingehen (Abb. 5 und Tab. 2). Nach Injektion von *E 39* 70 h p.c. waren sowohl die 11 d als auch die 17 d alten Feten – statistisch gesichert – kleiner als die Kontrollen. Eine Auswertung der 8 d p.c. erfolgten Injektion war nicht möglich. *Puromycin* zeigte eine merkwürdige Wirkung. Während im Versuch 3/11 die Feten zu klein waren, waren sie im Versuch 3/17 größer als die Kontrollen. Im Versuch *HA* 3/17 waren die Feten ebenfalls größer als die Kontrollen, während die Feten 3/11 und 8/11 wieder zu klein waren.

Tabelle 2

Körperlängen in mm vom tiefsten Punkt zwischen Hyoid- und Unterkieferbogen (11 d) bzw. Übergang zwischen Hals und Kopf (17 d) bis zur Schwanzspitze an normalen Feten und an solchen, deren Mütter zu bestimmten Zeiten mit verschiedenen Substanzen behandelt worden waren. 0 = keine meßbaren Feten.

Behandlungszeit h p. c.	70	192	70	192
Untersuchungszeit d p. c.		11		17
<i>Substanz</i>				
Keine		20.68		49.92
E 39	13.30 ++*	0	39.92 ++* —**	42.5 —*
PM	15.80 +—* ++**	19.75 —*	53.88 +—* —**	48.00 —*
HA	15.94 +—* —**	17.10 ++*	52.44 —*	0
p-FA	16.75 —+* —+**	20.10 —*	50.89 —* —**	51.15 —*
AM	15.34 —+* —**	15.79 ++*	46.00 ++* ++**	51.19 —*

\* Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% (++) oder 5% (+) oder nicht (—) gegenüber der Kontrolle gesichert.

\*\* Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% (++) oder 5% (+) oder nicht (—) ist der Unterschied zwischen den beiden Behandlungszeiten gesichert.

Im Versuch *p-FA* 3/11 waren die Feten zu klein, während sie in den übrigen 3 Versuchen nicht signifikant von den Kontrollen abwichen. Im Versuch *AM* 8/17 waren die Feten gleich denen der Kontrollen, während sie 8/11 und 3/11 – gesichert – zu klein waren. Das Wiedereinholen der Körpergröße (*p-FA* 3/17 und *AM* 8/17) und -überholen (*PM* 3/17 und *HA* 3/17) ist bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 1% sicher kein Zufall. Es wäre zu einfach, irgendwie an einen Regulationsmechanismus zu denken. Vielmehr sind wir der Ansicht, daß hier echte Modifikationen der Entwicklung vorliegen. In der Normalentwicklung haben wir stets bestimmte Verhältnisse von Längen- zu Breitenwachstum, wobei zeitweise das eine oder das andere stärker sein kann. In unseren Versuchen scheint das Längenwachstum einseitig bevorzugt zu sein.

Schließlich sind noch die Entwicklungsmodifikationen zu betrachten, also Anzahl und Art der Veränderungen und Mißbildungen. Wir wollen diese hier nicht in allen Einzelheiten darstellen. Über die Art der auftretenden Mißbildungen wurde schon nach einem früheren Versuch ausführlich berichtet. Die nachstehende Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Lage der wich-

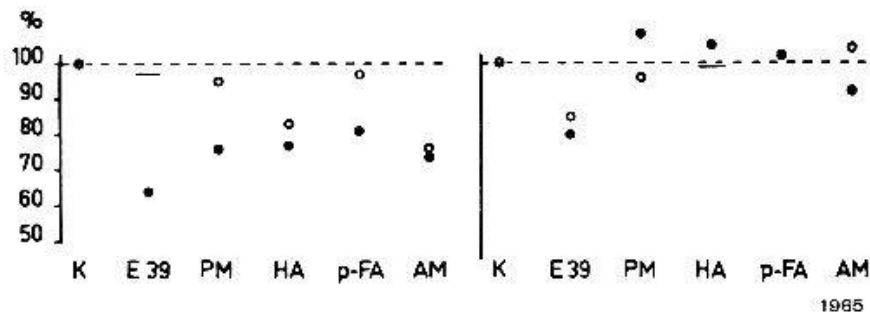


Abb. 5. Körperlängen in % der Kontrollwerte. - Links Untersuchung 11 d p.c., rechts 17 d p. c. - ● Injektion 70 h. ○ Injektion 192 h. - keine meßbaren Feten.

tigsten Veränderungen und deren Häufigkeit. Bei den Feten unbehandelter Mütter fanden wir hauptsächlich Modifikationen in der Körpergröße, der Haut und den Blutgefäßen. Die gleichen Modifikationen traten in allen Versuchsgruppen auf. Dort, wo sie nicht aufgeführt sind, sind die betreffenden Embryonen oder Feten entweder schon früh abgestorben oder bei der Untersuchung soweit resorbiert gewesen, daß diese Modifikationen nicht mehr erkannt werden konnten.

Nach Behandlung mit *E 39* fanden wir Veränderungen am ganzen Körper. Hervorzuheben ist der Anteil der Extremitätenmißbildungen und der der Fruchthüllen. Eine Behandlung mit *Puromycin* und mit *Hydroxylamin* wirkt sich hauptsächlich in Mißbildungen am Kopf aus. Die Modifikationen nach Anwendung von *p-Fluorphenylalanin* weichen kaum von denen in den Kontrollen ab. Nach *Actinomycin*behandlung fanden sich Kopfmißbildungen nach der Behandlung 8 d p. c., und auffälligerweise fanden wir auch hier Veränderungen an den Fruchthüllen bei den Versuchen 3/11 und 8/11.

Auf Grund der Wirkungsweise des *E 39* ist der Befund über Lage und Häufigkeit der Entwicklungsmodifikationen nicht verwunderlich. Diese Substanz verursacht relativ schwere Schäden, die dann noch sehr nachhaltig wirken können. Der Versuch PM-3/11 deutet darauf hin, daß etwa 3 d p.c. das morphogenetische Feld des Kopfkompleses determiniert wird und daher Störungen am Kopf auftreten. Daß im Versuch PM-3/17 keine Kopfstörungen aufgefunden wurden, ist kein Widerspruch, denn diese Störungen sind sicher letal und die entsprechenden Feten zu diesem Zeitpunkt weitgehend resorbiert. Sehr deutlich zeigt sich die Wirkung des *Puromycins* in den Versuchen 8/11 und 8/17. Zu Beginn des 9. Tages (Abb. 3) finden starke Wachstums- und Differenzierungsprozesse im Kopfkomples statt, die zu diesem Zeitpunkt irreversibel gestört werden können. Störungen in anderen Körperregionen sind zu diesem Zeitpunkt noch regulationsfähig.

Ähnlich wie nach *Puromycin* verhalten sich die Entwicklungsstörungen nach *Hydroxylamin*.

Im Gegensatz dazu fanden wir nach Anwendung von *p-Fluorphenylalanin* im Versuch 8/17 hauptsächlich Veränderungen an der Leber. Hieraus wäre zu schließen, daß dieses Pharmakon vor allem zu Stoffwechselstörungen führt. Die übrigen Modifikationen waren denen der Kontrollen vergleichbar.

Tabelle 3

Verteilung der Entwicklungsfehleistungen auf die verschiedenen Bereiche der Fetten

	keine	E 39	PM	HA	p-FA	AM
Substanz .....		70	70	70	70	70
Behandlungszeit h p.c. ....		11 17	11 17	11 17	11 17	11 17
Untersuchungszeit d p.c. ....	-11 17	11 17	11 17	11 17	11 17	11 17
Kopf .....	— +	++ ++	++ ++	++ ++	+ —	+ —
			+ ++	+ ++		+ ++
Rumpf .....	— —	+ +	+ —	+ +	— —	+ +
Extremitäten, Schwanz .....	+ —	+ +	+ —	+ —	— —	— —
Haut, Blutgefäße .....	++ ++	+ +	+ ++	+ ++	++ ++	+ ++
	+ +				+ ++	+ ++
Verkleinerte Fetten .....	++ ++	++ +	+ —	+ +	+ —	++ —
					++ ++	++ —
Fruchthüllen .....	— —	+ +	— —	+ +	— —	+ —
Fehlleistungen in % .....	17 16	100 100	67 68	12 70	18 71	74 61
		100 98	67 68	62 100	18 100	74 61
						57 68

+ = 1-24%, ++ = 25-49%, +++ = 50-74%, ++++ = 75-100%, aller aufgetretenen Störungen in diesem Komplex. — = keine Modifikationen.

Nach der Anwendung von Actinomycin ist besonders bemerkenswert, daß im Versuch 3/11 und 3/17 keine Kopfstörungen, dafür aber Störungen des Rumpfes und, wie bei E 39-3/11, auch hier Störungen der Fruchthüllen auftraten.

### *Zusammenfassung*

Da es bei Versuchen in der frühen Embryonalentwicklung von entscheidender Bedeutung ist, den Entwicklungszustand zur Zeit einer Reizapplikation möglichst genau zu kennen, wurden für unsere Versuche Kaninchen verwendet, weil diese Tierart die einzige im Laboratorium verwendete Art ist, bei der wenigstens der Entwicklungsbeginn mit nur einer sehr geringen Streuung zeitlich festgelegt werden kann. Dementsprechend ist auch die Streuung innerhalb der Embryonalentwicklung nur gering. Die Reizapplikation erfolgte 70 bzw. 192 Std. nach dem Deckakt (p.c.) Die Feten wurden 11 oder 17 Tage p.c. untersucht. Die beiden Entwicklungszustände zur Zeit der Reizapplikation werden ausführlich besprochen, ebenso die Stoffwechselprozesse, die zu diesen Zeiten ablaufen, soweit wir bisher darüber Bescheid wissen. Besonders hervorgehoben wird die Tatsache, daß bei gleicher Applikationsform (i.v. Injektion in die Ohrtrandvene) unterschiedliche Wege und Zeiten zum Wirkungsort zurückzulegen sind.

Verwendet wurden folgende Substanzen: E 39 (Bayer), Puromycin, Hydroxylamin, p-Fluorphenylalanin und Actinomycin (ein Gemisch aus C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> und C<sub>3</sub>).

Die Versuchsergebnisse wurden im Vergleich zu gleichzeitig durchgeführten Kontrollversuchen besprochen. Es wurden die auf Grund der Zählung der Gelbkörper fehlenden Fruchtblasen und die lebenden normalen und abgeänderten sowie die toten oder resorbierten Feten dargestellt. Ferner wurden die Körperlängen gemessen und im statistischen Test (DUNCAN-Test) verglichen. Die gefundenen Entwicklungsfehleistungen wurden im ganzen registriert und in Gruppen zusammengefaßt.

E 39 hatte die stärkste Wirkung. Es wurden fast keine lebenden normalen Feten gefunden und auch nur wenige lebende abgeänderte. Die noch meßbaren Feten waren kleiner als die Kontrollen. Die Entwicklungsfehleistungen verteilten sich über den ganzen Körper, und auch die Fruchthüllen (Amnion und Chorion) wurden betroffen. *Puromycin* hatte keine Wirkung auf die Anzahl der vorhandenen Fruchtblasen. Es verzögerte offenbar zunächst das Längenwachstum, dagegen hatten die 17 Tage p. c. gemessenen Feten die Kontrollen – statistisch gesichert – überholt. Mißbildungen wurden hauptsächlich in der Kopfregion gefunden.

*Hydroxylamin* hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die Anzahl der Fruchtblasen. Die Wirkung dieser Substanz zeigte sich unabhängig von der Zeit der Applikation erst etwa 11 Tage p. c. Dann allerdings wurden fast alle Feten geschädigt. Die Längenmaße verhielten sich wie nach Puromycin. Die Hauptwirkung lag ebenfalls in der Kopfregion, aber auch Fehlentwicklungen der Fruchthüllen traten auf.

*p-Fluorphenylalanin* hatte eine geringe Wirkung auf die Anzahl der vorhandenen Fruchtblasen. Die Substanz wird als Antimetabolit vom Embryo aufgenommen, und es kam dadurch hauptsächlich nach dem 11. Tag zu Fehlleistungen. Die Längenmaße waren am 11. Tag zu klein, später wichen sie nicht von den Kontrollen ab. Die Art der Mißbildung war denen der Kontrolle vergleichbar.

Nach *Actinomycin*behandlung wurden, ähnlich wie nach Puromycinbehandlung, in allen Versuchen noch lebende normale Feten gefunden. Die Anzahl der fehlenden Fruchtblasen war erhöht. Am 11. Tag waren die Feten kleiner als die Kontrollen, während sie am 17. Tag nicht von diesen abwichen. Mißbildungen wurden hauptsächlich in der Kopfregion gefunden, teilweise auch an den Fruchthüllen.

Aus unseren Versuchen läßt sich eine spezifische Wirkung der verwendeten Substanzen auf die DNS- und Proteinsynthese nur in geringem Umfang nachweisen. Autoradiographische Untersuchungen mit markierten Substanzen und frühere Untersuchungszeitpunkte nach den Behandlungszeiten können hier weitere Aufschlüsse bringen.

### *Résumé*

Lors d'expérimentation sur les premières phases de développement embryonnaire, il est de première importance de connaître le degré de développement aussi exactement que possible au moment de l'application de l'excitant; c'est pour cette raison que nous avons choisi le lapin, parce que c'est le seul animal de laboratoire chez qui il soit possible de déterminer avec quelque certitude le début d'une gravidité. Les variations au cours du développement embryonnaire sont aussi très faibles. L'application de l'agent perturbateur a été faite 70 heures, resp. 192 heures post conceptionem. Les fœtus ont été examinés 11, resp. 17 jours p.c. Les degrés de développement au moment de l'application du produit chimique ont été minutieusement décrits, ainsi que les processus métaboliques, qui ont lieu à ces stades, ceci dans la mesure où nous les connaissons. Il faut toutefois souligner le fait que, malgré la même voie d'application (injection intraveineuse dans la veine du bord de l'oreille) des distances et des temps différents sont nécessaire pour que le produit atteigne son lieu d'action. Nous avons utilisé les substances suivantes: E 39-Bayer, Puromycine, Hydroxylamine, *p*-fluorphénylalanine et actinomycine (un mélange de C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub>). Les résultats des expériences sont discutés parallèlement à ceux des animaux témoins. En se basant sur le nombre des corps jaunes, l'on a pu apprécier la quantité d'amnios manquants, le nombre de fœtus vivants normaux et altérés, ainsi que celui des fœtus morts ou résorbés. De plus, nous avons mesuré la longueur des fœtus en les comparant avec les données statistiques (Duncan-Test). Les différents troubles de développement ont été catalogués et répartis en groupes.

E 39 a eu l'action la plus efficace. Après son application, nous n'avons trouvé presque plus de fœtus vivants, et quelques rares altérés. Les fœtus encore

mesurables étaient plus petits que les contrôles. Les troubles de développement se répartissent sur le corps entier, et même les enveloppes embryonnaires (amnion et chorion) ont été altérées.

La *Puromycine* n'a eu aucun effet sur le nombre des amnios. Il semble qu'elle freine d'abord la croissance en longueur, mais 17 jours p.c., les fœtus mesurés étaient – statistiquement parlant – plus longs que les animaux de contrôle. Les malformations se concentrent surtout dans la région de la tête.

L'*hydroxylamine* a eu aussi un effet sur le nombre d'amnios. L'effet de cette substance s'est manifestée vers le 11e jour p. c., quel que soit le moment de son application. Mais tous les fœtus ont été lésés. La longueur des fœtus s'est comportée de la même manière qu'avec la puromycine. L'effet principal s'est aussi concentré sur la région de la tête, accompagnée parfois d'altérations des enveloppes amniotiques.

La *p-fluorphenylalanine* n'a eu qu'une action discrète sur le nombre des amnios présents. Cette substance est absorbée par l'embryon comme un antimétabolite, et c'est surtout après le 11e jour que se produisent des altérations. La mesure de la longueur était trop petite au 11e jour, plus tard elle ne se différencie plus de celle des contrôles. Le type des altérations était tout à fait comparable avec celui des animaux de contrôle.

Après application d'*actinomycine*, l'on a trouvé, comme avec la puromycine, dans toutes les séries d'expériences aussi de nombreux fœtus normaux vivants. Le nombre des amnios manquants était cependant plus élevé. Au 11e jour, les fœtus étaient plus chétifs que les contrôles, n'avaient cependant plus de différence appréciable après le 17e jour. Des malformations sont apparues surtout dans les régions de la tête, parfois aussi dans les enveloppes amniotiques.

Nos expériences n'ont montré qu'un effet relativement minime des substances essayées sur la synthèse du DNA et des protéines. Des recherches autoradiographiques avec des substances de marquage et des contrôles à des moments plus rapprochés de l'application de ces substances pourraient compléter les renseignements que nous avons déjà obtenus.

### *Riassunto*

Dato che per gli esperimenti durante le prime fasi dello sviluppo embrionale è d'importanza capitale conoscere esattamente lo stato dello sviluppo al momento dell'applicazione di uno stimolo, ci siamo serviti nei nostri esperimenti di conigli, perchè è la sola specie usata in laboratorio che permetta almeno di stabilire il momento in cui lo sviluppo inizia senza troppe inesattezze. Di conseguenza anche le inesattezze nello studio dello sviluppo embrionale sono piccole.

Lo stimolo fu applicato 70 ore, rispettivamente 192 ore p.c. (post conceptionem). I feti furono esaminati 11 oppure 17 giorni p.c.

Entrambe le situazioni dello sviluppo al momento dello stimolo vengono



discusse ampiamente, come pure i processi del metabolismo che avvengono in quel momento, almeno per quanto è ora a nostra conoscenza. Si fa risaltare specialmente il fatto che pur usando lo stesso modo di applicazione (iniezione endovenosa in una vena marginale dell'orecchio) devono essere percorse diverse vie con diverso tempo per raggiungere il luogo d'azione.

Si adoperarono le seguenti sostanze: E 39-Bayer, puromicina, idrossilamina, p-fluoro-fenilalanina ed actinomicina (una miscela di C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>).

I risultati degli esperimenti furono discussi confrontandoli con esperimenti di controllo effettuati contemporaneamente. Si descrivono i sacchi amniotici mancanti, calcolati in base al numero dei corpi lutei. Si descrivono inoltre i feti viventi normali ed alterati come pure quelli morti o riassorbiti. Inoltre si misurò la lunghezza dei corpi e la si confrontò in un saggio statistico detto test di Duncan. I difetti constatati nello sviluppo furono registrati in toto ed ordinati in gruppi.

E 39 ebbe l'effetto più potente. Non si trovò quasi nessun feto vivente normale ed anche pochi feti viventi con alterazioni. I feti ancora misurabili erano più piccoli che quelli di controllo. I difetti inerenti lo sviluppo erano distribuiti su tutto il corpo, anche le membrane ovulari ne erano colpite (amnios e corion).

La *puromicina* non ebbe nessun effetto sul numero dei sacchi amniotici presenti. Essa ebbe dapprima un effetto ritardativo sulla crescita in lunghezza mentre i feti misurati 17 giorni p.c. avevano sorpassato quelli di controllo, come fu provato statisticamente. Deformità si trovarono specialmente nella regione della testa.

Neppure l'*idrossilamina* ebbe un effetto sul numero dei sacchi amniotici. L'azione di questa sostanza si manifestò, indipendentemente dal tempo di applicazione, solo circa 11 giorni p.c. poi però quasi tutti i feti mostrarono delle lesioni. La misurazione della lunghezza dei feti diede risultati simili a quelli della puromicina. L'azione principale fu notata anche qui nella regione della testa anche se si constatarono disturbi dello sviluppo delle membrane ovulari.

La *p-fluoro-fenilalanina* ebbe un'azione assai debole sul numero dei sacchi amniotici presenti. La sostanza viene assimilata dall'embrione come metabolita ed in conseguenza i difetti cominciarono specialmente dopo l'undicesimo giorno. Pure all'undicesimo giorno le misure della lunghezza risultarono troppo piccole, più tardi erano circa uguali a quelle dei controlli. Le deformità registrate erano confrontabili con quelle dei controlli.

Dopo trattamento con l'*actinomicina*, come nel caso della puromicina, furono trovati in tutti gli esperimenti dei feti ancora viventi e normali. Il numero dei sacchi amniotici mancanti era aumentato. All'undicesimo giorno i feti erano più piccoli che quelli di controllo mentre al diciassettesimo giorno non si differenziavano dai controlli. Malformazioni furono trovate specialmente nella regione della testa, in parte anche nelle membrane ovulari.

Secondo i nostri esperimenti si constata raramente un'azione specifica delle sostanze adoperate sulla sintesi dell'acido desossiribonucleinico e delle

proteine. Esperimenti autoradiografici con sostanze marcate, come pure esperimenti in fasi più ravvicinate al momento del trattamento potrebbero dare nuovi schiarimenti.

### *Summary*

Since it is of decisive importance in experiments on early embryonal development that the stage of development at the time of giving the stimulus is known as exactly as possible, we used in our experiments rabbits which are the only experimental animals in which the beginning of development can be determined with only a very slight margin. Consequently the scatter within the development is correspondingly very slight. The application of the stimulus was made 70 hrs and 192 hrs p.c. The foetus was examined 11 and 17 days p.c. Both stages of development at the time of stimulus are described in detail, as also the metabolic processes occurring at the time in so far as we have knowledge of them. It is especially noted that with the same mode of application (i.v. injection into the marginal vein of the ear), there is variation in the way and the time of passage to the point of action.

The following substances have been used: E 39 (Bayer), Puromycin, Hydroxylamine, p-Fluorphenal alanine and Actinomycin (a mixture of C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> and C<sub>3</sub>).

The results of the experiments are described in comparison with simultaneously conducted control experiments. The number of yellow body lacking amniotic sacs, and the living normal and changed, or dead or absorbed foetus is given. We also measured the body lengths and compared these by the statistical test (Duncan test). The failures in development so found were registered and collected in groups.

E 39 had the strongest action. There were practically no living normal foetus and only a few living changed ones. Those foetus which were still measurable were found to be smaller than normal controls. The failures in development occurred throughout the entire body and the amnion and chorion were also effected.

*Puromycin* has no action on the number of amniotic sacs present. There is apparently a delay in the length growth, but on the other hand 17-day p.c. foetus measured more—statistically significant—than the controls. Malformations were chiefly found in the head region. *Hydroxylamine* also had no influence on the number of amniotic sacs. The action of this substance is seen to be independent of the time of application as from the 11 day p.c. After this, however, almost all the foetus are damaged. The length measurements were as with Puromycin. The chief action was also in the head region, but failures in development were also seen in the foetal envelopes.

*p-fluorphenyl alanine* had a slight action on the number of amniotic sacs present. The substance is taken up by the embryo as an anti-metabolite, and caused failures mostly after the 11th day. The length measurements were too small on the 11th day and later they did not vary from those of the controls. The type of malformation was comparable with the controls.

*Actinomycin* treatment, similar to Puromycin treatment, resulted in all experiments in the finding of still living normal foetus. The number of lacking amniotic sacs was increased. On the 11th day the foetus were smaller than in the controls, while on the 17th day they did not vary. Malformations were chiefly in the head region, and partly also in the foetal envelopes.

From our experiments, a specific action of the substances used on the DNA and protein synthesis can only be shown to a slight extent. Autoradiographic examinations with marked substances and earlier points of examination after the time of treatment might produce further information.

- BRACHET J.: Nucleic acids in development. *J. cell. comp. Physiol. Suppl.* 60, 1-18 (1962).
- BRADEN A. W. H.: Properties of the membranes of rat and rabbit eggs. *Aust. J. sci. Res. ser. B* 5, 460-471 (1952).
- FIGQ A.: Effets de l'actinomycine D et de la puromycine sur le métabolisme de l'oocyte en croissance. Etude autoradiographique. *Exp. Cell Res.* 31, 581-594 (1964).
- FRIDHANDLER L.: Pathways of glucose metabolism in fertilized rabbit ova at various pre-implantation stages. *Exp. Cell Res.* 22, 303-316 (1961).
- GOTTSCHESKI G. H. M.: Gemeinsame Probleme der Entwicklungs- und Genphysiologie. *Naturwissenschaften* 50, 533-539 (1963).
- GOTTSCHESKI G. H. M. und ZIMMERMANN W.: Nachweis von phänokritischen Phasen verschiedener Organanlagen beim Hauskaninchen *Oryctolagus cuniculus*. *Verh. dtsh. zool. Ges. München* 1963, 144-176.
- GOTTSCHESKI G. H. M. und ZIMMERMANN W.: Ein Beitrag zur differenzierungsgenetischen Analyse der Entwicklung des Hauskaninchens *Oryctolagus cuniculus*. *Z. Naturforsch.* 20 b, 302-306 (1965).
- GREENWALD G. S. und EVERETT N. B.: The incorporation of S<sup>35</sup> methionine by the uterus and ovary of the mouse. *Anat. Rec.* 134, 171-184 (1959).
- GROSS P. R. und COUSINEAU G. H.: Macromolecule synthesis and the influence of actinomycin on early development. *Exp. Cell Res.* 33, 368-395 (1964).
- HARBERS E.: Die Nucleinsäuren. Georg Thieme, Stuttgart 1964.
- HENDLER R. W.: Protein biosynthesis. Some alternative considerations on the current hypothesis. *Science* 142, 402-405 (1963).
- HULTIN T.: The effect of puromycin on protein metabolism and cell division in fertilized sea urchin eggs. *Experientia (Basel)* 17, 410-411 (1961).
- KAVANAU L. J.: Metabolism of free amino acids, peptides and proteins in early sea urchin development. *J. exp. Zool.* 122, 285-337 (1953).
- KRÖGER H.: Wirkungsmechanismus von Carcinostatica. *Naturwiss. Rdsch.* 17, 305-309 (1964).
- MANGAN J., MIKI-NOUMURA T. und GROSS P. R.: Protein-synthesis and mitotic apparatus. *Science* 147, 1575-1578 (1965).
- NEUHOFF V.: Störung der Induktion und Morphogenese durch Pharmaka. *Arzneimittelforschung* 15, 827-835 (1965).
- ROSENKRANZ H. S. und BENDICH A. J.: Studies on the bacteriostatic action of hydroxylamine. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* 87, 40-53 (1964).

Adresse: Dr. W. Zimmermann, Arbeitsgruppe G. H. M. Gottschewski, am Max-Planck-Institut für Immunbiologie, D-78 Freiburg i. Br., Stefan-Meier-Strasse 8.