

Struktur und Alterung von Gelatine-Gelen

Von WALTER THEIMER

Aus dem Zentrallaboratorium für angewandte Übermikroskopie der Universität Bonn
(Leiter: Dozent Dr. K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN)

(Z. Naturforsch. 15 b, 346—350 [1960]; eingegangen am 10. Februar 1960)

Fünf Gelatine-Gele im Konzentrationsbereich zwischen 1 und 8 Prozent wurden in je drei Altersstufen elektronenmikroskopisch im Dünnschnitt untersucht. Die Gele bestehen aus Netzwerken, deren Dichte der Konzentration proportional ist. Mit dem Altern wird das Netzwerk dichter. In den Netzmaschen der frischen Gele befindet sich Gelatine-Sol, das bei der Alterung in den Gelzustand übergeht. Die Annahme, daß der Alterungsmechanismus in einer Zusammenlagerung von Netzfibrillen bestehe (die sog. Hysteresis-Hypothese), konnte nicht bestätigt werden. Die Alterung ist strukturell binnen zehn Tagen abgeschlossen.

Zweck dieser Untersuchung war, die Struktur der Gelatine-Gele im Elektronenmikroskop darzustellen und den Vorgängen bei der Alterung der Gele nachzugehen. Insbesondere sollte die Hysteresis-Hypothese überprüft werden.

Eine netzartige Struktur haben schon verschiedene Autoren mit anderen Mitteln bei Gelen festgestellt: so KATZ und GERNGROSS¹, dann ABITZ, GERNGROSS und HERRMANN² röntgenographisch, JOLY³ an Hand der Strömungsdoppelbrechung bei der Bildung von Gelatine-Gelen, BOEDTKER und DOTY⁴ auf Grund der Lichtstreuung. FREY-WYSSLING⁵ und MÜHLETHALER⁶ fanden elektronenmikroskopisch fibrilläre Gelstrukturen. Je nach der Stärke der Fibrillen unterschied FREY-WYSSLING⁷ mehrere Fibrillentypen. Bündel von etwa 100 Molekularketten nannte er „Elementarfibrillen“. Unter „Fibrillen“ ist im folgenden stets dieser Typ gemeint, wenn auch die Zahl von 100 Peptidketten je Fibrille hier nur größenordnungsmäßigen Charakter hat.

Bei Vanadinpentoxyd-Gelen fand MÜHLETHALER⁸ im Auftrocknungspräparat ein retikulardisperses Kolloid; gealterte Gele (1 und 5 Jahre) zeigten z. T. dickere Fibrillen. BRETSCHNEIDER⁹ untersuchte Schnitte von 2000 bis 4000 Å Dicke und fand bei biologischen wie synthetischen Gelen vorwiegend Netzstrukturen. Im gelartigen Grundcytoplasma zahlreicher Zellarten wurden im Elektronenmikro-

skop fibrilläre Strukturen festgestellt. Eine Aufzählung solcher Untersuchungen bis 1954 findet sich bei HAAS¹⁰. Im Cytoplasma von *Paramecium* fand SCHNEIDER¹¹ fädige Gebilde mit ein- oder angelagerten granulären Teilchen von durchschnittlich 100 Å Durchmesser.

STAUDINGER¹² faßte die Theorie der Gelatine-Gele dahingehend zusammen, daß die Proteinmoleküle sich primär zu langgestreckten Teilchen zusammenlagern und durch sekundäre Anziehungskräfte zwischen diesen Teilchen ein dreidimensionales Netzwerk gebildet wird.

Material und Technik

Für die Untersuchung wurden die Gelatinekonzentrationen 1, 2, 4, 6 und 8% gewählt. Verwendet wurde Mercksche Blattgelatine (Mercks Präparate für Mikroskopie und Bakteriologie 4070, Paket Nr. 742345). Die Gelatine wurde bei 90 °C in doppelt dest. Wasser zum Sol gelöst. Dann wurde heiß in eine kleine Petrischale abfiltriert; die Rückstände waren minimal. Mit der Deckschale bedeckt, gelierte die Lösung bei Zimmertemperatur. Erstarrungszeiten ab Beendigung des Filtrierens: 1% 18 Stdn., 2% 2 Stdn., 4% 1 Stde., 6% 40 Min., 8% 15 Minuten.

Die frischen („jungen“) Gele wurden sofort nach dem Erstarren eingebettet. Nach Entnahme der Probe blieben die Gele unter der Deckschale zum Altern stehen. Die Alterung erfolgte bei Zimmertemperatur, ausgenommen die Gele 1 und 8%, die bei 4 °C alterten, jedoch

¹ J. R. KATZ u. O. GERNGROSS, Naturwissenschaften 13, 900 [1925].

² W. ABITZ, O. GERNGROSS u. K. HERRMANN, Naturwissenschaften 18, 754 [1930].

³ M. JOLY, Kolloid-Z. 115, 83 [1949]; 146, Heft 1—3 [1956].

⁴ H. BOEDTKER u. P. DOTY, J. phys. Chem. 58, 968 [1954].

⁵ A. FREY-WYSSLING, Exp. Cell. Res. 1947—49, Suppl. 1, 33.

⁶ K. MÜHLETHALER, Vjschr. naturforsch. Ges. Zürich 89, 214 [1944].

⁷ A. FREY-WYSSLING, Submikroskopische Struktur des Cytoplasmas, Protoplasma Bd. II A 2, S. 69, 1955.

⁸ K. MÜHLETHALER, Makromolek. Chem. 2, 143 [1948].

⁹ L. BRETSCHNEIDER, Kgl. Niederl. Akad. Wiss., Vh.-Ber. LIV, Ser. C, 1951.

¹⁰ J. HAAS, Physiologie der Zelle, Verlag Bornträger, Berlin 1955, S. 181, 192, 195.

¹¹ L. SCHNEIDER, Z. Zellforsch. mikroskop. Anatom. 50, 61 [1959].

¹² H. STAUDINGER, Organische Kolloidchemie, Verlag Vieweg, Braunschweig 1950, S. 273.

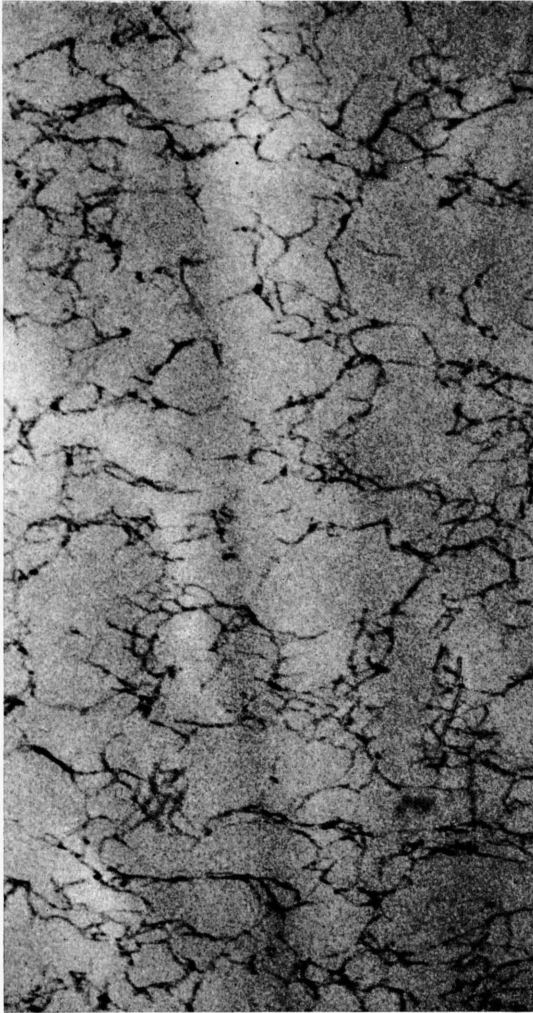


Abb. 1. 2-proz., junges Gelatine-Gel.
Elektronenopt. Vergr. 6500 : 1, Endvergr. 47 500 : 1.

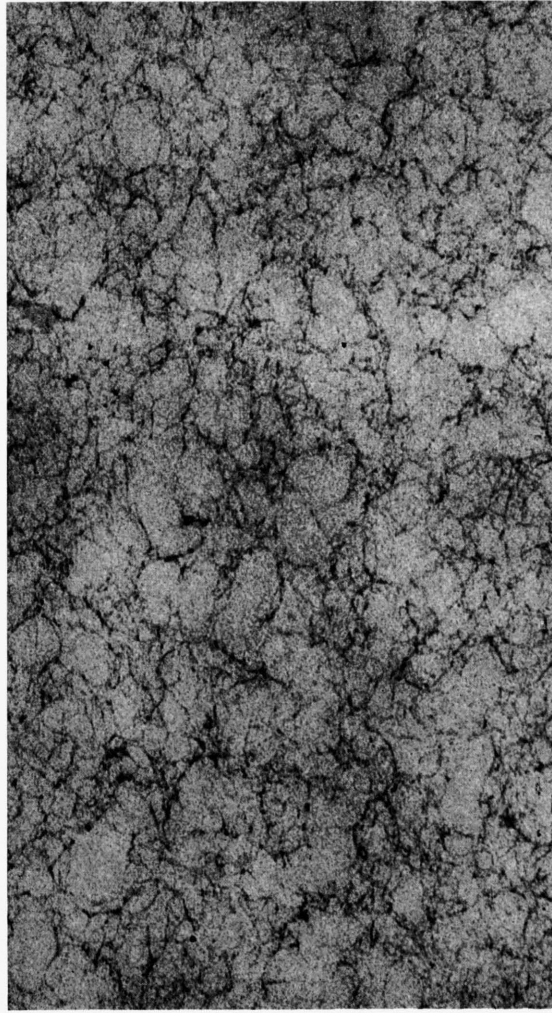


Abb. 2. 2-proz. Gelatine-Gel, 10 Tage alt.
Elektronenopt. Vergr. 6500 : 1, Endvergr. 47 000 : 1.

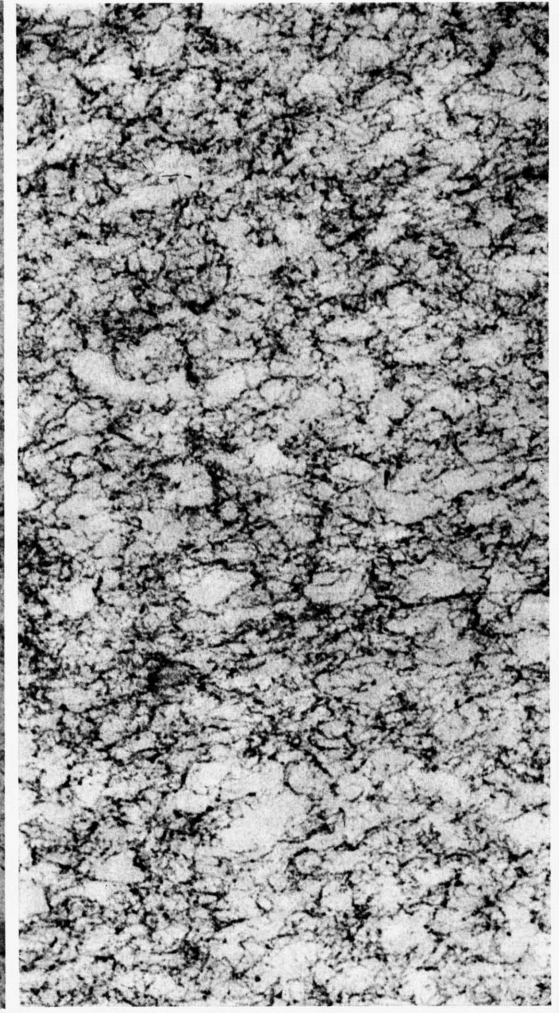


Abb. 3. 2-proz. Gelatine-Gel, 21 Tage alt.
Elektronenopt. Vergr. 6500 : 1, Endvergr. 47 000 : 1.
Fixierung: OsO_4 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ bei pH 7,1–7,2. Kontrastierung:
Phosphorwolframsäure und Uranylacetat. Einbettung:
Vestopal W.

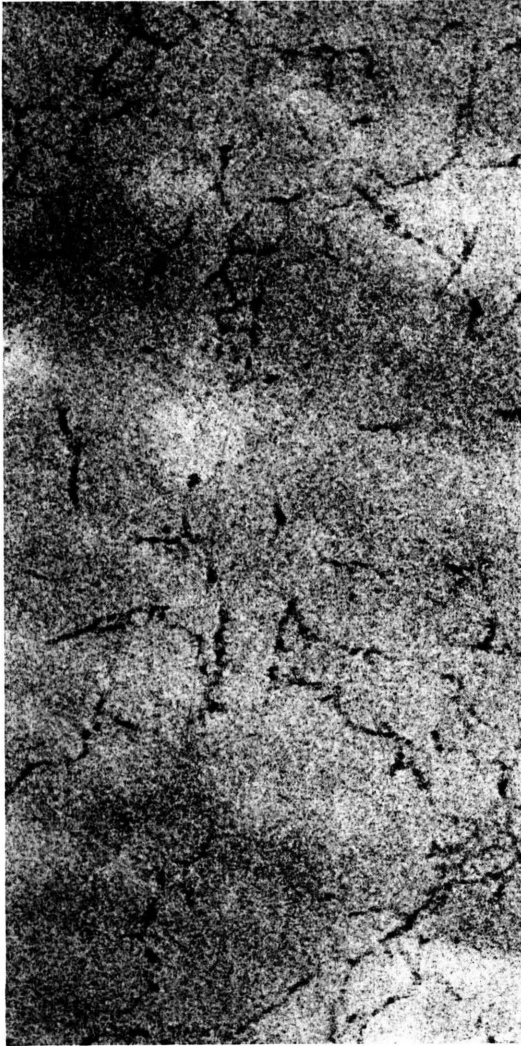


Abb. 4. 1-proz. Gelatine-Gel, 21 Tage alt.
Elektronenopt. Vergr. 14 200 : 1, Endvergr. 103 500 : 1.

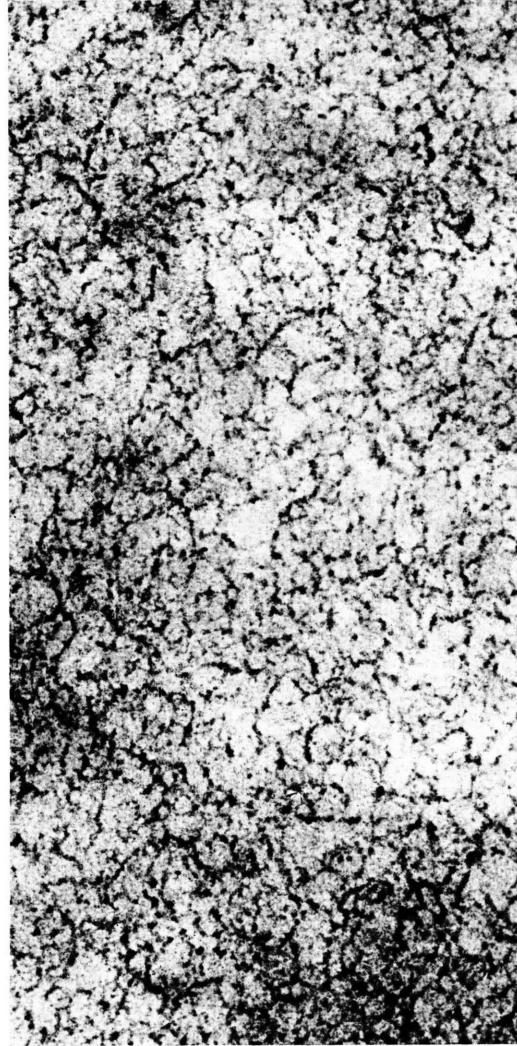


Abb. 5. 6-proz., junges Gelatine-Gel.
Elektronenopt. Vergr. 14 200 : 1, Endvergr. 103 500 : 1.

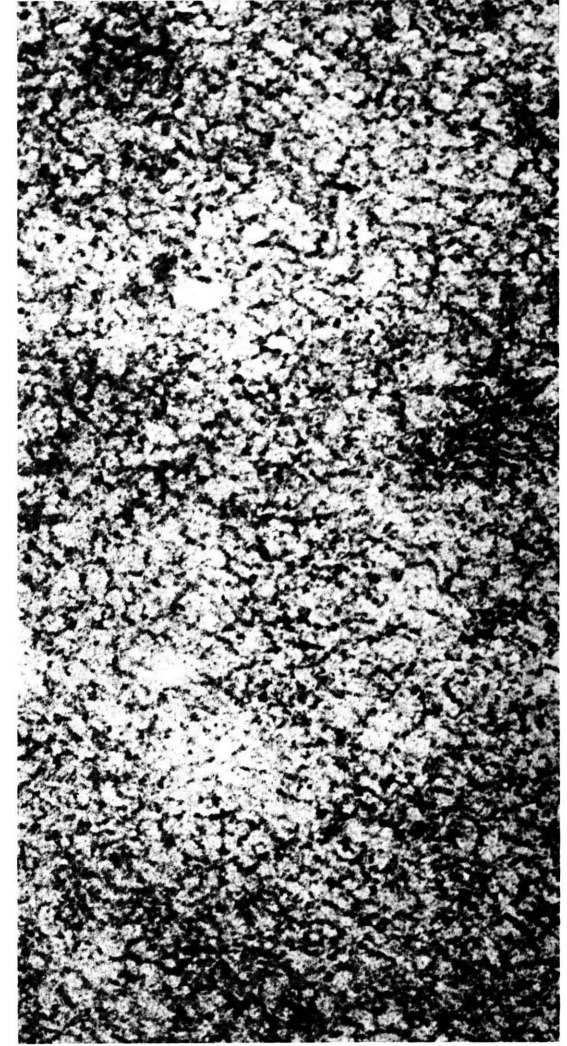


Abb. 6. 6-proz. Gelatine-Gel, 21 Tage alt.
Elektronenopt. Vergr. 13 200 : 1. Endvergr. 99 500 : 1.
Fixierung: OsO_4 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ bei pH 7,1–7,2. Kontrastierung:
Phosphorwolframsäure und Uranylacetat. Einbettung:
Vestopal W.

vor dem Einbetten 16 Stdn. bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden. Proben gealterter Gele wurden jeweils nach 10 und 21 Tagen entnommen und sofort eingebettet.

Alle Proben wurden nahe dem Grunde der Schale (Schichtdicke 1 cm) entnommen und auf einem Objektträger, nach Aufbringen eines Tropfens Fixierlösung zur Verhinderung des Austrocknens, in Stückchen von 0,2 bis 0,5 mm Durchmesser zerschnitten. Die Stückchen wurden schnell in die bereitstehende Fixierschale gebracht. Das Fixiergemisch¹³ enthielt je 1% OsO₄ und K₂Cr₂O₇ bei pH 7,1–7,2. Kontrastiert wurde nach Wohlfarth-Bottermann mit einer Lösung von 1% Phosphorwolframsäure und 0,5% Uranylacetat in 75-proz. Aceton. Eingebettet wurde in Vestopal W nach Kellenberger.

Flüssigkeit	Zeit
Fixierlösung	1 Stde.
Doppelt dest. Wasser (Waschen)	1 Stde.
Aceton (Entwässern):	
30%	30 Min.
50%	30 Min.
75% (mit Kontrastmitteln)	1 Stde.
90%	30 Min.
100% (wasserfrei)	1 Stde.
Vestopal-Aceton-Gemisch:	
1:3	30 Min.
1:1	30 Min.
3:1	30 Min.
Reines Vestopal W mit	
1% Initiator und	
0,5% Aktivator	16 Stdn. (bei 4°C)

Tab. 1. Fixieren und Einbetten.

Am folgenden Morgen wurden die Gelatinestückchen nach zweimaligem Vestopalwechsel in Kapseln eingebettet. Sie waren nun gehärtet und gelb. Polymerisiert wurde 36 bis 48 Stdn. bei 60°C. Insgesamt 255 Schnitte von 300 bis 600 Å Dicke wurden bei 80 bzw. 100 KV in einem Elektronenmikroskop Siemens UM 100 d aufgenommen.

Bei der Auswertung der Bilder ist die bei Vestopaleinbettung auftretende Schrumpfung zu berücksichtigen. Im Elektronenstrahl verdunsteten nach REIMER¹⁴ 13% des Vestopals unter entsprechendem Einschrumpfen. Dieser Effekt läßt die Gele etwas dichter erscheinen, als sie tatsächlich sind. Während des Alterns der Gele in der Schale trat jedoch keine Schrumpfung ein. Die gealterten Gele waren beträchtlich verfestigt und in verschiedenem Grade elastisch.

Die Gelstruktur

a) Befunde

Die Abbildungen zeigen Schnitte durch ein dreidimensionales Netzwerk, das mit zunehmender Konzentration dichter wird, ebenso mit dem Alter. Die

Abstände der Fibrillen sind im Vergleich zu ihrem Durchmesser groß. Die Strukturen sind statistisch isotrop und monoton. Schwachvernetzte, niedrigkonzentrierte Gele zeigen über Nahbereiche gewisse Dichtefluktuationen.

Der Durchmesser der Fibrillen streut in jedem Gel über einen erheblichen Bereich. Man findet Fibrillen von 40 bis 160 Å Durchmesser. In jungen Gelen sind Durchmesser um 100 Å am häufigsten. In den gealterten Gelen treten neue, dünnere Fibrillen, überwiegend um 40 Å, in großer Anzahl hinzu. (Über die Alterung s. noch Abschn. 4.) Die Länge der Fibrillen läßt sich im Dünnschnitt nicht abschätzen.

Im Rahmen dieses Berichts können nur 6 Bilder gezeigt werden. Auf Abb. 1*–3 sieht man die Stufen des Alterungsganges eines 2-proz. Gelatine-Gels. Das junge Gel (Abb. 1) ist noch schwach vernetzt; der Fibrillen-Durchmesser schwankt zwischen 40 und 160 Å. Das 10 Tage alte Gel (Abb. 2) ist bereits vollständig vernetzt; die maximale Dicke der Fibrillen ist auf 125 Å zurückgegangen; alle Größen zwischen 40 Å und diesem Wert sind vertreten. Am häufigsten findet man Fibrillen von 50 und 120 Å. Das 21 Tage alte Gel (Abb. 3), bei dem ein etwas dickerer Schnitt vorliegt, ist bei näherer Betrachtung von dem 10 Tage alten kaum verschieden, eine Feststellung, die für alle Konzentrationen gilt. Auch an der Fibrillenstärke hat sich kaum noch etwas geändert.

Ein 21 Tage altes, 1-proz. Gel zeigt Abb. 4. Die Vernetzung ist noch sehr gering, obwohl dieses gealterte Gel, nach der Zahl der Fibrillen je Flächeneinheit, etwa dreimal so dicht ist wie das (hier nicht gezeigte) junge 1-proz. Gel, das ebenfalls fast unvernetzt erscheint. Die Fibrillenstärke bewegt sich zwischen 75 und 125 Å, mit 100 Å als der häufigsten Größe.

Den Typ der Gele höherer Konzentration zeigen die Abb. 5–6: ein 6-proz. Gel jung und nach 21 Tagen. Die Zunahme der Netzdichte ist ohne weiteres ersichtlich. Die Vernetzung ist hier auch schon im jungen Gel vollständig. Die Fibrillenstärke schwankt zwischen 40 und 100 Å.

b) Diskussion

Der Grad der Vernetzung ist konzentrationsabhängig. Die schwachvernetzten Gele (Abb. 1 und

¹³ K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN, *Naturwissenschaften* **44**, 287 [1957].

¹⁴ L. REIMER, *Z. Naturforsch.* **14b**, 566 [1959].

* Abb. 1–6 s. Tafel S. 346 a u. b.

4) lassen erkennen, daß hier die Eiweißteilchen wohl größtenteils noch der Diffusion durch Brownsche Bewegung unterliegen und dabei gemäß dem II. Hauptsatz einer gleichmäßigen Verteilung zustreben. Auch die örtlichen Dichtefluktuations lassen sich aus der Theorie der Molekularbewegung erklären. Bei stärkerer Vernetzung ist die translatorische Bewegung der Teilchen schon im frischen Gel sistiert.

Dem naheliegenden Einwand, daß es sich bei den Strukturen um Fällungsartefakte handeln könnte, ist entgegenzuhalten, daß dann unerklärlich wäre, warum bei den jungen Gelen nur etwa halb soviel Eiweiß ausgefallen sein soll wie bei den alten. Die Gelatine kommt schon als Gel unter den Einfluß der Fixiermittel. Die Gelstruktur — nach früheren, ohne chemische Fixierung durchgeführten Untersuchungen ein Netzwerk — muß also schon vorher vorhanden sein. Netzstrukturen habe ich auch von Gelen (Metallalginaten) erhalten, die ohne Behandlung mit Fixierungs- und Kontrastierungsmitteln eingebettet wurden. In diesen Alginat-Gelen sorgten chemisch eingebaute Schwermetallatome für Kontrast¹⁵. Die Problematik des Feinbaues der Fibrillen soll an anderer Stelle erörtert werden.

Das Altern der Gele

a) Die Hysteresis-Hypothese

Die alte Auffassung, daß Gele durch Zusammenlagerung kleinerer Teilchen zu größeren altern, hat ihren Ursprung in Beobachtungen an anorganischen Kolloiden. Dort handelt es sich allerdings um Sammelkristallisation. Jedoch haben zahlreiche Autoren die laterale Zulammenlagerung dünnerer Fibrillen zu dickeren — ohne experimentellen Beweis — zur Ursache des kolloiden und sogar des biologischen Alterns erklärt.

Im Jahre 1896 hatte VAN BEMMELEN bei Kieselsäure-Gelen eine Hysteresis der Kurven für Entquellung und Wiederquellung gefunden, die auf eine bei der Entquellung eintretende Teilchenvergrößerung zurückgeführt wurde. Bei gealterten Gelen zeigte sich fast keine Hysteresis, woraus man den

Schluß zog, daß die Zusammenlagerung kleinerer Teilchen zu größeren schon während des Alterns erfolgt sei.

ROUŽIČKA¹⁶ prägte 1917 den analogen Begriff der Protoplasma-Hysteresis, woraus eine Theorie des biologischen Alterns durch Zusammentritt kolloider Teilchen entstand. Ähnliches lehrte 1919 der Neurologe MARINESCO¹⁷. Der Chemiker LUMIÈRE¹⁸ führte 1931 das Altern auf Teilchenvergrößerung und Verringerung der für biochemische Reaktionen verfügbaren Oberfläche zurück. BÜRGER¹⁹ überschreibt 1954 ein Kapitel „Die Hysteresis als allgemeines Alternsprinzip“.

b) Befunde

Auf die wesentlichen Merkmale der gealterten Gele wurde schon im vorigen Abschnitt hingewiesen. Hier ist noch zu vermerken, daß die von der Hysteresis-Hypothese geforderten dickeren Fibrillen nicht zu finden sind. Das Kennzeichen der gealterten Gele ist vielmehr das Auftreten zahlreicher neuer, meist dünnerer Fibrillen, die das in der „Jugend“ entstandene primäre Netzwerk durchsetzen. Dies ist der Grund für das Dichterwerden der Gele mit dem Alter. Die Zahl der Fibrillen vermehrt sich schätzungsweise um den Faktor 2 bis 4.

Beim Altern verloren die Gele in den ersten 10 Tagen bei 20 °C je nach der Konzentration 5,2 bis 10,7% ihres anfänglichen Wassergehalts, vom 10. bis zum 21. Tag weitere 4,3 bis 10,0% desselben. Der Wasserabgang war der Gelkonzentration annähernd umgekehrt proportional. Das Volumen der Gele blieb unverändert. Die Gele 1 und 8% verloren bei 4 °C binnen 21 Tagen nur 5,4 bzw. 5,6% ihres Wassers, d. h. etwa ein Viertel bzw. die Hälfte des Wasserverlustes bei 20 °C.

c) Diskussion

Fragen wir nun, woher die zusätzlichen Fibrillen in den gealterten Gelen kommen, so scheint nur eine Antwort möglich: dieses Material muß im jungen Gel als Sol vorhanden gewesen sein. Im Zuge des Alterns geliert es allmählich. Das Altern der Gele unterscheidet sich nicht grundsätzlich vom ursprüng-

¹⁵ H. THIELE u. E. AFFELDT, Kolloid-Z. **156**, 14 [1958].

¹⁶ V. ROUŽIČKA, Roux' Arch. Entwicklungsmechan. Organismen **42**, 697 [1917]; Pflügers Arch. Physiol. **194**, 135 [1922]; Arch. mikr. Anat. **101**, 4 [1924]; Roux' Arch. Entwicklungsmechan. Organismen **112**, 2 [1927].

¹⁷ G. MARINESCO, Mecanisme chimico-colloidal de la sénilité et le problème de la mort naturelle. Rev. sci. Paris 1919. Bull. Acad. Méd. **1934**, 111.

¹⁸ A. LUMIÈRE, Leben, Krankheit und Tod als Kolloiderscheinungen. Stuttgart 1931.

¹⁹ M. BÜRGER, Altern und Krankheit, 2. Aufl., Verlag G. Thieme, Leipzig 1954, S. 47.

lichen Gelierungsprozeß; es ist dessen Weiter- und Zuendeführung. Die Gelierung ist innerhalb der ersten zehn Tage vollendet; in der Folge verändert sich die Struktur kaum mehr, nur die Entwässerung schreitet, sich allmählich verlangsamen, fort. (Die Untersuchung wurde auf einen Entwässerungsgrad beschränkt, der noch biologische Vergleiche zuläßt.)

Sole als flüssige Phasen von Gelen wurden schon öfter festgestellt. So fanden KEMP und PETERS²⁰ in Kautschuk-Gelen einen Solanteil mit kleinen Teilchen. Auch im Synäreswasser von Gelatine finden sich kleine Solteilchen. Mit der Kleinheit der Solteilchen dürfte das vermehrte Auftreten dünnerer Fibrillen in gealterten Gelen zusammenhängen. Die Kunststofftechnik bedient sich des Solanteils bei den Selbstweichmachern. Im Zellplasma ist das Nebeneinander von Sol und Gel bei ständiger gegenseitiger Umwandlung die Grundlage wichtiger Lebensprozesse.

Abb. 7 zeigt schematisch den Alterungsmechanismus, wie er sich a) aus der Hysteresis-Hypothese er-

geben würde, und wie er sich b) aus der Sol $\rightleftharpoons$ Gel-Umwandlung ergibt. Die elektronenmikroskopischen Bilder entsprechen dem zweiten Vorgang.

Der Solanteil der untersuchten Gelatine-Gele wurde mittels der Biuretprobe bestimmt. Eine gewogene Probe jedes Gels wurde, in kleine Stückchen zerschnitten, 2 Std. in 5 cm³ doppelt dest. Wasser gewässert. Dann wurde das überstehende Wasser abfiltriert und mit 0,2-proz. CuSO₄-Lösung der Biuretprobe auf gelöstes Eiweiß unterzogen. Das Ergebnis war bei den jungen Gelen positiv, bei den alten negativ. Aus den jungen Gelen diffundieren erhebliche, in dieser Form in den alten Gelen nicht mehr vorhandene Eiweißmengen heraus. Sie stellen den Solanteil dar.

Konzentration [%]	Gesamteiweiß in der Probe [mg]	Eiweiß im Diffusat [mg]
1	2,8	2,3
2	3,2	2,4
4	5,7	3,5
6	7,8	3,4
8	11,5	3,0

Tab. 2. Biuretprobe bei jungen Gelen.

Der Sol-Wert für das 1-proz. Gel erscheint etwas überhöht, wohl wegen des leichten Herausdiffundierens von unvernetztem Material. Ein Rest des Solanteils mag in den Netzwerken zurückbleiben und beim Entwässern gelieren oder sich in elektronenoptisch nicht auflösbarer Form niederschlagen.

Das abgeschiedene Wasser konnte durch die Fuge unter dem Deckglas langsam abdunsten. Synäreswasser trat nicht auf. Von Synäresbedingungen wurde Abstand genommen, weil die dabei eintretende Schrumpfung das Erkennen des Alterungsvorganges erschwert hätte; man hätte das Dichterwerden der Gele auf die Schrumpfung zurückgeführt.

Biologische Parallelen

Man kann NETTER²¹ nur beipflichten, wenn er sagt, daß die Ursache des biologischen Alterns nicht in einem derart einfachen Prozeß wie dem Altern der Gele zu suchen ist. Das gilt auch, wenn an die

²⁰ A. R. KEMP u. H. PETERS, Z. physik. Chem., Abt. B 43, 1063 [1939].

²¹ H. NETTER, Theoretische Biochemie, Verlag Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959, S. 356.

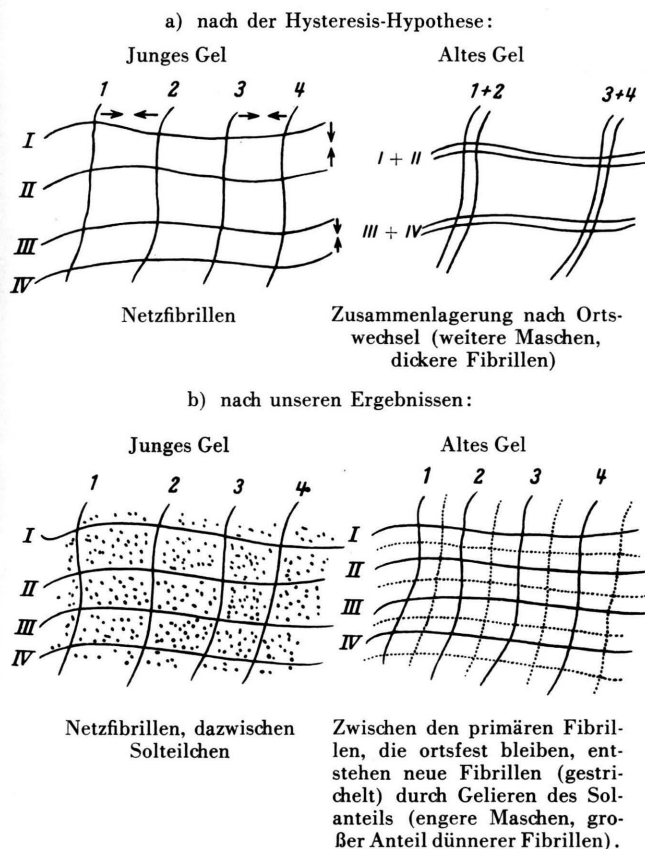


Abb. 7. Schema des Alterungsvorganges.

Stelle der Hysteresis-Hypothese der hier festgestellte Übergang vom Sol zum Gel gesetzt wird, der in neuerer Zeit schon gelegentlich in Betrachtungen von Medizinern als hypothetischer Alterungsmechanismus aufgetaucht ist²². Zwischen einem auf dem Labortisch in Ruhe alternden Gel und den kolloiden Systemen im lebenden Protoplasma bestehen große Unterschiede. Das Labor-Gel ist einfach strukturiert und passiv. Die lebende Zelle dagegen ist ein System komplizierter Strukturen mit intensiver eigener Aktivität. Unablässig vollziehen sich in ihr geregelte chemische und energetische Umsetzungen. Sie verfügt auch über Mittel zur Regelung ihres kolloiden Zustandes. Die rein kolloide Alterungskinetik kann hier nicht ungestört ablaufen wie im Labor-Gel.

Wieweit und auf welchem Wege die Zelle im Laufe des Lebens dennoch kolloid altert, ist noch ungeklärt. Mindestens ein Teil der kolloiden Altersveränderungen ist sekundär und geht auf chemische Umwandlungen zurück, die eine Veränderung der Quellfähigkeit bewirken. Ein Beispiel sind die Kollagen-Elastin-Prozesse²³. Offen ist auch noch die Frage, ob und auf welche Weise die chemischen, kolloiden und sonstigen Alterungsvorgänge im Or-

ganismus einer zentralen Steuerung unterliegen, wie sie etwa EHRENBURG²⁴ im Gehirn vermutet. Daran würde sich die Frage nach einer etwaigen genetischen Festlegung des Alternsschicksals anschließen, wie sie sich auch aus der Artspezifität der Lebensdauer und den Beobachtungen über erbliche Langlebigkeit ergibt. All das führt weit über kolloide Abläufe hinaus. Daraus folgt nicht, daß deren Studium ohne biologisches Interesse wäre; sie können sehr wohl einen gewissen Modellwert auch für biologische Vorgänge besitzen. Zur Anwendung auf das Altern von Organismen jedoch müßten die Ergebnisse kolloider Forschung in einen größeren Rahmen hineingestellt werden, der noch nicht erarbeitet ist.

Die vorliegende Arbeit wurde mir durch die Gastfreundschaft von Herrn Doz. Dr. K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN in Bonn ermöglicht, dem ich hierfür wie auch für Beratung sehr zu Dank verpflichtet bin. Herrn Prof. Dr. K. HEYNS in Hamburg danke ich für verständnisvolle Förderung meiner Arbeit. Herrn Prof. Dr. H. THIELE in Kiel bin ich für Ratschläge und Begutachtung sowie für Überlassung wertvoller Präparate verbunden.

²² Erwähnt bei E. HEINRICH, Hippokrates 30, 843 [1959].

²³ M. BÜRGER, s. l. c. ¹⁹, S. 151; D. A. HALL u. R. E. TUNBRIDGE, Symposium über experimentelle Altersforschung, Basel 1956, Verlag Birkhäuser, Basel 1956, S. 15, 19.

²⁴ R. EHRENBURG, Der Lebensablauf, Verlag L. Schneider, Heidelberg 1946, S. 135; Naturwissenschaften 41, 296 [1954].