

(Aus der Universitäts-Augenklinik Bern, [Direktor: Professor *A. Siegrist*.])

Arbeiten über das E-Vitamin.

II. Mitteilung.

Wirkung des E-Vitamins auf Explantate *in vitro*.

Von

Dr. A. Juhász-Schäffer.

Mit 2 Abbildungen im Text.

(*Ein gegangen am 23. Dezember 1930.*)

Zwei Tatsachen haben auf einen Charakter des E-Vitamins hingewiesen, der wahrscheinlich nicht bloß dem E-Faktor der Vitaminreihe zukommen wird, sondern den meisten, oder allen Vitaminen mehr oder weniger ausgesprochen gemeinsam ist. Der Nachweis dieses Charakters für das E-Vitamin scheint jedoch eine besondere Beachtung zu verdienen. Man fand nämlich, daß — wie ich gegenüber den Angaben *Bisceglies* und in Übereinstimmung mit den amerikanischen Forschern (*Evans* und *Burr*, *Sure* usw.) auch gefunden habe — während bei einer E-vitaminfreien synthetischen Kost das Samenepithel des Hodens zugrunde geht, die E-Avitaminose bei weiblichen Tieren auf die Ovulation und Eieinpflanzung keinen Einfluß hat. Die Mangelerscheinungen werden erst an den sich entwickelnden Embryonen oder an den Neugeborenen und heranwachsenden Jungen offenbar. Es lag der Gedanke schon von vornherein nahe, daß das Absterben der Embryonen und der Neugeborenen eigentlich nicht durch Störungen im mütterlichen Organismus bedingt wird, sondern eher durch die Vitaminnot des neuen, heranwachsenden Organismus. Wie wir das in einer anderen Versuchsreihe zeigen werden, gelang es uns, die Jungen durch das Muttertier heranzuziehen, trotz E-Avitaminose, wenn wir das Vitamin den jungen Tieren direkt verabreichen. Ähnlicherweise gelang es *Sure* trotz Mangel an B-Vitamin bei den Muttertieren die Jungen aufziehen zu lassen.

Diese große Übereinstimmung in der Empfindlichkeit des Hoden-gewebes, der Gewebe des Embryos und der Neugeborenen gegenüber Mangel an E-Vitamin ließ vermuten, daß das E-Vitamin in dem charakteristischsten Lebensvorgang dieser Gewebe eine bedeutende Rolle spielen müsse, nämlich in der Zellvermehrung. Es ergab sich also die Frage, ob das E-Vitamin für Zellen einen die Wucherung fördernden Faktor

darstelle. Zur Beantwortung dieser Frage wählte ich die Methode der Gewebezüchtung, da sie die unmittelbare Erforschung der Wachstumsfaktoren an isolierten Zellkolonien ermöglicht, und da diese Methode zur Beantwortung ähnlicher Probleme sich schon bewährt hatte.

Es gelang durch die Methode der Gewebszüchtung eine ganze Reihe von Faktoren kennen zu lernen, welche die organische Entwicklung beeinflussen und zur Erklärung verschiedener, bis dahin nicht gut verstandener Erscheinungen vieles beitrugen. Mit dieser Methode war die Möglichkeit gegeben, die Zellen, ohne ihre Lebensfähigkeit zu stören, in eine Umwelt zu versetzen, dessen Faktoren willkürlich zu bestimmen sind. Die Umwelt stellt ein mehr oder weniger streng bestimmtes, totes, nach seiner physikalisch-chemischen Beschaffenheit isoliertes System dar; durch Änderungen im Zusammenhang und Menge der Faktoren können die Art- bzw. Mengenwerte der betreffenden Faktoren bestimmt werden. Über diese Probleme ist in unserer Monographie¹ das Nähere nachzulesen; somit können wir uns beschränken, die nur uns interessierenden Ergebnisse hier kurz zu erwähnen.

Faktoren, die für die Zellvermehrung die günstigsten Bedingungen darstellen, sind in den Extrakten der embryonalen Gewebe enthalten; diese Faktoren stellen, wie das von *Carrel* und seinen Mitarbeitern nachgewiesen wurde, von den Zellen direkt assimilierbare Zellbausteine dar und ermöglichen einer Zellkultur ein unbeschränktes Wachstum. Diese Faktoren nannte *Carrel* Tropheine; es gelang ihm mit diesen Stoffen eine aus einem embryonalem Hühnerherz stammende Zellkultur seit über 16 Jahren am Leben zu erhalten. Neben den Tropheinen gibt es eine ganze Reihe von physikalischen und chemischen Faktoren, deren Einfluß auf die Gewebekulturen schon Objekt der Forschung gewesen ist, unter anderem Temperatur, osmotischer Druck, Wasserstoffionenkonzentration in der Nährflüssigkeit, Strahlen, chemische Substanzen, Gewebeextrakte, Hormone, Vitamine usw.

Es haben eine lange Reihe von Untersuchungen nachgewiesen, daß, wenn auch das ganze Leben hindurch die Vitaminfaktoren unentbehrlich sind, und ihr Fehlen in der Nahrung Störungen hervorrufen kann, doch im jugendlichen Alter dieser Vitaminbedarf viel ausgesprochener ist. Der das Wachstum und die normale Entwicklung regelnde Einfluß der Vitamine ist immer noch nicht in allen Punkten klargelegt; soviel scheint jedoch wahrscheinlich zu sein, daß die Vitamine im Zellstoffwechsel eine außerordentlich wichtige Rolle spielen und daß je schneller die Lebensvorgänge in einem Organismus ablaufen, um so größer auch sein Vitaminbedarf ist. Es erscheint also gut möglich, daß in Zellen mit höherem Stoffumsatz, wie das in Embryonalgeweben und in Gewächs-

¹ Bisceglie und Juhász-Schäffer: Die Gewebszüchtung in vitro. Monographien aus dem Gesamtgebiet der Pflanzen und Tiere. Bd. 14. Berlin: Julius Springer 1928.

geweben der Fall ist, auch der Vitaminumsatz ein erhöhter sein wird. Während aber der erhöhte Vitaminbedarf und damit auch die höhere Empfindlichkeit jugendlicher, herangewachsener Körper gegen Vitaminmangel bekannt war, lenkten *Burrows*, *Bisceglie*, *Rh. Erdmann* die Aufmerksamkeit auf die Bedeutung der Vitamine für die Gewächse.

In einer Versuchsreihe untersuchte *Bisceglie* die Wirkung der Vitaminfaktoren A und B auf das Wachstum von Milz und Leberexplantate neugeborener Meerschweinchen, indem er dem Kulturmedium eine kleine Menge der vitaminhaltigen Substanz zusetzte. Er fand, daß das A-Vitamin einen Wachstumsreiz vermittelt, der bei den Leberkulturen speziell epithelialer Natur ist. Auch der B-Faktor unterstützt die Wucherung, jedoch sein Wachstumsreiz ist viel geringeren Grades. *Bisceglie* war der Meinung, die Vitamine begünstigen die Assimilationsvorgänge der ausgesplanten Teile und reizen dadurch diese direkt zur Wucherung.

Burrows kommt dagegen zu anderen Ergebnissen. In seinen früheren Arbeiten über Gewebekulturen nahm er das Vorhandensein zweier entgegengesetzter Stoffe im Nährmedium, das Embryonalextrakte enthält, an, deren eine, genannt „*Archusia*“, die Zellen zur lebhaften Wanderung und Wachstum anregt, während die andere, „*Ergusia*“, die Wucherung hemmt. Er stellt in späteren Versuchen die *Archusia* dem Vitamin B gleich und findet, daß es in schwacher Konzentration im Kulturmedium ohne Wirkung ist, in höherer Konzentration das Wachstum beschleunigt. Die *Ergusia* sei dagegen dem A-Faktor gleich; ihre Anwesenheit im Kulturmedium hindere das Wachstum und könne die das Wachstum beschleunigende Wirkung des B-Vitamins aufheben. Die Zellen hätten die Fähigkeit des unbegrenzten Wachstums, nur durch die hemmende Wirkung des A-Vitamins würden sie in Zellverbänden zusammengehalten. Die Geschwulst entstehe durch eine unbalanzierte Vitaminzufuhr: ein lokales Übergewicht des B-Vitamins, oder Schwund des A-Vitamins verursache das unbegrenzte Wachstum des Geschwulstgewebes. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangte auch *Rh. Erdmann*.

In einer früheren Versuchsreihe gelang es auch uns diese Angaben soweit zu bestätigen, daß wir durch das B-Vitamin eine Beschleunigung des Kulturwachstums feststellen konnten; dagegen war uns nicht gut möglich, im A-Vitamin einen das Wachstum hindernden Faktor zu erkennen. Die Entscheidung solcher Fragen ist auf Grund unserer Kenntnisse über die Vitamine noch nicht gut möglich, da uns streng isolierte Vitaminstoffe nicht zur Verfügung stehen. Bei ihrer Zutat in die Kulturmedien ist nicht mit Sicherheit zu entscheiden, wieviel vom Wirkungskomplex auf die Rechnung des Lösungsmittels der betreffenden Vitamine zu setzen ist. Diesen Einwand erhoben wir selbst gegen unsere Versuche. Wir suchten jedoch unsere Versuche so zu gestalten, daß auch auf diese Frage eine entsprechende Antwort sich ergebe.

Ohne an die kritische Würdigung der erwähnten Arbeiten heranzutreten, war uns — auf Grund unserer Kenntnisse und eigener Erfahrungen über das E-Vitamin — im voraus wahrscheinlich, daß auch dieses Vitamin auf Auspflanzungen *in vitro* nicht ohne Wirkung sein werde und wir stellen uns die Aufgabe, diese Wirkung in einer Versuchsreihe zu untersuchen.

Versuchstechnik.

Als Versuchsobjekt verwendeten wir Leber, Milz, Herz- und Periostgewebe von 5—15 Tage alten Hühnerembryonen und züchteten ihre Stücke im Hühnerplasma von etwa 1 Jahre alten Hühnern ohne Zutat von Embryonalextrakten. Die Organe wurden zu kleinen Bruchstücken zerschnitten, indem man erst dünne Scheibchen abschnitt und diese in kleine Quadrate mit einer Seitenlänge von etwa 0,5 mm aufteilte. Jedoch war die Größe des entstandenen Wachstumshofes unabhängig von der Form, Dicke und Breite des Stückchens, deren Maße trotz der beabsichtigten Gleichmäßigkeit sehr wechselnd sein mußten. Eine Zutat von Embryonalextrakt zum Nährmedium war abzulehnen, da jenes eine ganze Reihe von Faktoren der Zellwucherung enthält, insbesondere Vitamine und eine nähere Analyse eines einzigen Faktors dadurch unmöglich machen würde. Die Versuchsbedingungen wurden also möglichst einfach gestaltet. Das Kulturmedium bestand aus einer Mischung von Hühnerplasma und Lockelösung 1:1. Bruchteile eines Tropfens von Weizenöl, als Quelle des E-Vitamins, wurden mittels einer Capillarpipette dem Medium zugesetzt. Die auf Objektträgern angelegten Kulturen wurden in Petrischalen gelegt, die mit Uhrgläser überdeckt und mittels Paraffin luftdicht verschlossen wurden. Die Kulturen konnten teils lebendig beobachtet werden, zum Teil wurden sie in Formol-Lockelösung fixiert und mit *Heidenhains* Hämatoxylin gefärbt. Die Messung der Wachstumsgeschwindigkeit geschah durch 24 stündliche Messung der entstandenen Wachstumshöfe, und zwar mit der graphischen Methode, indem man mit einem vertikalen Projektionsapparate jeden Tag die Umrisse des neu entstandenen Zellhofes auf einen Bogen Papier projizierte und aufzeichnete, um dann den Flächeninhalt planimetrisch anzugeben.

Ein Teil der Kulturen wurde nach Fixation in Formol-Lockelösung mit Scharlach R und Hämatoxylin gefärbt. Dies geschah, um das bei Zutat von Weizenöl in den Zellen vorhandene Fett nachzuweisen. Um die Aufnahme des Fettes in den Zellen zu prüfen, wiederholten wir teilweise auch die Versuche von *Donley* und *Hewell*, indem wir zu einer Reihe von Kulturen anstatt Weizenöl Olivenöl zusetzten. So konnte ich feststellen, ob man im Weizenöl das Vorhandensein eines spezifischen, das Wachstum der Kultur beeinflussenden Faktors annehmen darf, oder ob ein das Wachstum beeinflussender Faktor auch in anderen Ölen, die sich

im Tierversuche als inaktiv erwiesen haben, wie z. B. das Olivenöl, vorhanden ist. Schon auf Grund der Versuche von *Donley* und *Hewell* war dies nicht zu erwarten, da diese Forscherinnen durch Zutat von Olivenöl überhaupt keine Beeinflussung der Wachstumsneigung nachweisen konnten. Unsere Beobachtungen können diese Feststellungen vollauf bestätigen, und wir wollen bei dieser Frage nicht weiter verweilen. Was den spezifischen Faktor im Weizenöl anbelangt, mußte in der letzten Zeit mit einiger Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß im Weizenöl außer dem E-Vitaminfaktor auch andere Faktoren vorhanden seien, vor allem auch das B-Vitamin; ihre Vernachlässigung wird jedoch praktisch nicht zu groben Fehlschlüssen führen.

Das verwendete Weizenöl, die Quelle des E-Vitamins, war ein frischer Ätherextrakt, dessen Aktivität bei anderen Versuchen vielfach erwiesen wurde. Gegenüber diesem aktiven Extrakt verwendeten wir zum Vergleich den gleichen Ätherextrakt, der aber im Autoklaven inaktiviert worden war und bei welchem der Mangel an Aktivität ebenfalls Objekt der Forschung wurde.

Die Beobachtung der Kulturen dauerte 1—5 Tage. Während dieser Zeit wurden die Kulturschalen nicht geöffnet. Eine kleine Zahl von Kulturen wurde zum Zwecke der histologischen Untersuchung jeden Tag fixiert und gefärbt.

Gegenüber unserer Methode wollen wir voraus bemerken, daß die Anwendung von Reinkulturen einige Vorteile hätte haben können; allein es stand uns eine solche nicht zur Verfügung und unsere Laboratorien waren für solche Versuche nicht eingerichtet. Der Vorteil der Reinkulturen ist die Möglichkeit, die erzielten Wirkungen an einem einzigen Zelltyp zu untersuchen, was von großem Interesse wäre, da man dadurch die spezifischen Gewebsreaktionen feststellen konnte. Die unbegrenzt weiter gezüchteten Reinkulturen weisen einen gleichmäßigen Wachstumsrhythmus auf, die Zunahme in der Zeiteinheit bleibt innerhalb sehr enger Grenzen gleich. Dazu ist aber die Ernährung der Kulturen mit Embryonalextrakten nötig, was wir vermeiden wollten. Aber auch in diesem Falle wäre die Untersuchung der Wirkung von Weizenöl auf Reinkulturen ein bemerkenswertes Forschungsproblem, über das wir noch Versuche vorzunehmen beabsichtigen.

Ergebnisse.

Unsere Versuche betrafen den entwickelten Grundsätzen gemäß zwei Reihen, von welchen die eine aus Kulturen bestand, die eine Zutat von frischem Weizenöl als Quelle des E-Vitamins erhielten, während die andere Reihe das im Autoklav inaktivierte Weizenöl bekam. Außer den zwei Versuchsreihen wurde noch eine Reihe von Kulturen angelegt, die keinen Ölzusatz erhielt und die als Vergleich diente.

Bei allen diesen Kulturen waren die morphologischen Verhältnisse unabhängig davon, ob aktives, inaktiviertes, oder überhaupt kein Weizenöl dem Plasmamedium zugesetzt wurde. Die Wucherung war stets gemischter Natur, vorzugsweise aus bindegewebigen Zellen bestehend, welchen aber auch andere Zellen beigemischt waren, je nach dem Organe, von welchem das Stück herstammte, insbesondere epitheliale und endotheliale Gebilde. Die morphologischen Charaktere der Teile der Invasionszone zeigte keinen Abweichungen von denen der Vergleichskulturen, somit war eine Bevorzugung gewisser Zellen in der Reizwirkung

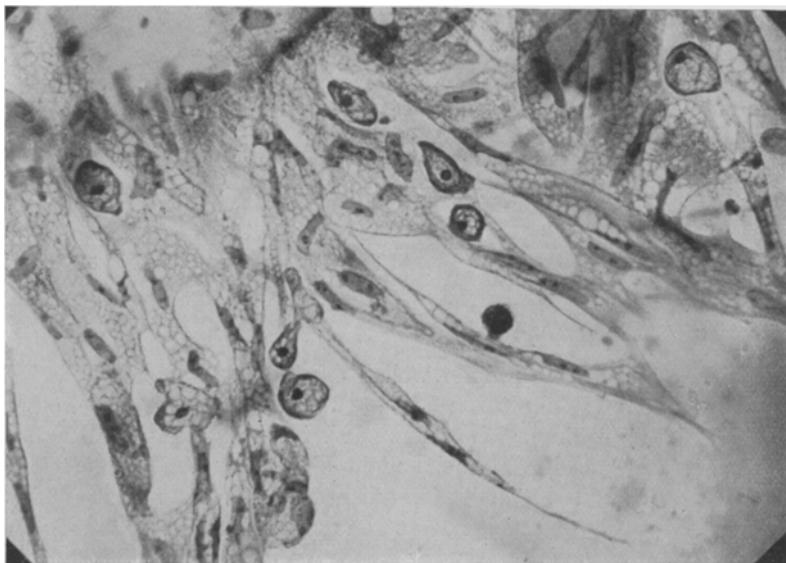


Abb. 1. Wachstumszone einer mit Weizenöl behandelten Kultur am 4. Tage des Kulturlebens. Obj. Zeiß Apochr. 20. Okul. Homal I. Vergr. 378fach.

mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen. Wir haben aber schon erwähnt, daß die Anwendung von nicht Reinkulturen gewisse Nachteile hat. Die Frage des Verhaltens verschiedener Gewebezteile dem Vitaminreiz gegenüber könnte mit einer annähernden Sicherheit bloß an Reinkulturen beantwortet werden. Ein verschiedenes Verhalten wäre um so eher möglich, als nach den Untersuchungen von *Bisceglie* ein solches bei Versuchen mit A und B-Vitamin beschrieben worden ist. Auch unsere Kenntnisse über die Rolle verschiedener Bestandteile im Krebsgewebe könnte die Vermutung unterstützen, daß Zellen epithelialen und bindegewebigen Ursprungs auf den Vitaminreiz nicht gleichmäßig reagieren. Jedoch nur im Falle, daß die Angaben *Burrows* und *Erdmanns* über die ursächliche Bedeutung der Vitamine bei der Krebsentstehung sich bestätigen sollten; sie sind aber bisher nicht im geringsten bewiesen.

In unseren gemischten und nur einige Tage gezüchteten Kulturen war ein derartiger Unterschied in der Gewebsreaktion nicht zu erkennen, was jedoch nicht aussagt, daß unter günstigen Versuchsbedingungen, wie z. B. in ununterbrochen weitergezüchteten Reinkulturen, eine Spezifität der Reaktion für gewisse Elemente sich doch noch herausstellen könnte.

Die Wucherungshöfe bilden um die Stückchen nie eine gleichmäßige Zone, sie sind an einigen Stellen, speziell wo nachweisbar das Stückchen der Vitaminquelle unmittelbar anliegt, zu ganz breiten Höfen ausgebrettet; die Zellen wuchern dort mit einer ganz merkwürdigen Üppigkeit.

Aus den Tabellen geht klar hervor, daß normalerweise innerhalb 24 Stunden ein Bezirk des Wachstumshofes von 2,2 qcm entstand, der in den nächsten 24 Stunden 4,7 qcm zunahm, um in den darauffolgenden 24 Stunden auf etwa 4,9—5 qcm weiterzuwachsen. Die weitere Zunahme des Bezirks ist nur ganz gering. In den Kulturen, die mit Weizenöl behandelt waren, war in den ersten 24 Stunden ein Bezirk von 3,2 qcm, in 48 Stunden 9,1 qcm und bis zur 72. Stunde 10,3 qcm zu vermerken. Am 4. und oft sogar am 5. Tag war noch eine weitere Zunahme bis zu 11,8 qcm festzustellen. Bei den mit inaktiviertem Weizenöl behandelten Kulturen zeigte der Bezirk in den drei aufeinanderfolgenden Tagen folgende Maße: 2,3, 4,5 und 4,7 qcm. Dies sind Durchschnittszahlen, die aus der Gesamtheit der Versuche gewonnen wurden.

Aus diesen Messungen gehen folgende Tatsachen hervor. Eine Zutat von frischem Weizenöl zum Plasmamedium verlängert die Wucherungsfähigkeit und das Leben der Kulturen um 24—48 Stunden. Der aktive Faktor des Weizenöles verleiht den Zellen einen Wachstumsreiz, durch welchen die entstandenen Wachstumshöfe in den ersten 24 Stunden einen um 48% größeren Flächeninhalt einnehmen, als die der Vergleichskulturen. In den folgenden 24 Stunden steigt dieser Unterschied auf 120%. Während die Vergleichskulturen in den folgenden 24 Stunden kaum noch etwas zunehmen, ist in den mit Weizenöl behandelten Kulturen eine weitere Zunahme zu bemerken, wodurch der Unterschied auf 140—150% weiter steigt.

Die Wachstumshöfe der mit inaktiviertem Weizenöl behandelten Kulturen unterscheiden sich nicht von denen der Vergleichskulturen; ein ganz geringer Unterschied ist nur zugunsten der Vergleichskulturen zu bemerken. Der

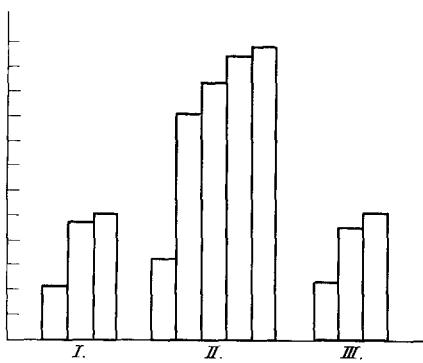


Abb. 2. Tägliche Zunahme der Wachstumshöfe. I. Vergleichskulturen. II. Mit aktivem Weizenöl behandelten Kulturen. III. Mit inaktiviertem Weizenöl behandelten Kulturen.

Unterschied ist jedoch so gering, daß er innerhalb der Fehlerngrenzen liegt. Diese Tatsache zeigt, daß das Öl an und für sich mehr oder weniger ohne Belang für die Kulturen ist, es hat weder eine hemmende, noch eine begünstigende Wirkung auf die Zellwucherung. Demnach ist die die Zellvermehrung begünstigende Wirkung des frischen, aktiven Weizenöles seinem Gehalt an Vitaminfaktoren zuzuschreiben. Ob auch andere Faktoren in Betracht kommen dürften, die beim Erhitzen vernichtet werden, steht außerhalb unserer Kenntnisse; sie können jedenfalls mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Die Behandlung mehrerer Kulturen mit Scharlachrot diente zum Nachweis der Fettaufnahme, ohne an die Frage der Entstehung des intracellulären Fettes heranzutreten. Wir haben in unserer Monographie (S. 66—68) die Anschauungen über das Auftreten von Fett innerhalb von Zellen bei rückschrittlichen Zellveränderungen berichtet. Aus den Arbeiten von *Donley* und *Hewell* geht klar hervor, daß Fett in den Zellen zwar anscheinend zum Teil in den Zellen entsteht, bei Fettzusatz zu den Kulturen wird jedoch ein großer Teil des Fettes direkt aufgenommen, insofern es sich um assimilierbare Fette handelt. Die genannten Forscher fanden nämlich, daß während Olivenöl in großen Mengen assimiliert wird, dies bei Mineralöl nicht der Fall ist. Wir haben in einem Vorversuch einige Kulturen mit Olivenöl behandelt und ähnliche Ergebnisse erhalten; wir können somit die Angaben von *Donley* und *Hewell* bestätigen. Innerhalb von 2—3 Tagen erscheinen im Zelleib stark lichtbrechende Tropfen, die zerstreut, aber neben den zwei Polen des Kernes gehäuft auftreten; bei Behandlung der fixierten Kulturen mit Scharlach R erscheinen diese Tropfen als rote Einschlußkörper. Ihre Zahl nimmt bis zum 2.—3. Tag des Kulturlebens zu, bis der ganze Zelleib voll gefüllt ist, ohne jedoch dadurch im Wachstum eine merkliche Hemmung erkennen zu lassen. Nach diesem Zeitabschnitt geht die Kultur bald in Zerfall über.

Aus unseren Versuchen, die mit frischem und mit inaktiviertem Weizenöl ausgeführt wurden, ergab sich, daß nach 24 Stunden in beiden Reihen gleichmäßig die Fetteinschlüsse im Zelleib auftreten. Sie sind anfangs nur spärlich vorhanden, meistens nur um die Kerne herum, speziell an den beiden Enden der Kerne gruppiert, was bei den spindelförmigen Zellen schon aus räumlichen Gründen zu erklären ist. Der Kern bleibt unverändert. Die Einschlüsse sind stark lichtbrechend und erscheinen nach Färbung als runde, ziemlich große rote Kugeln, die in das wabige Cytoplasma eingebettet sind. Die meisten mit Öl beladenen Zellen findet man in der Wachstumszone, jedoch meist nicht gleichmäßig verteilt, sondern an einer Seite des Stückes stärker ausgesprochen, was dadurch bedingt ist, daß der Fetttropfen dieser Seite anliegt. Zwischen beiden Reihen ist ein merkbarer, jedoch kein grundsätzlicher Unterschied zu erkennen. In den Kulturen beider Reihen wird

zwar das Auftreten der Fetteinschlüsse beobachtet; da aber die Kulturen, welche mit frischem, aktivem Weizenöl behandelt worden sind, ein üppigeres Wachstum aufweisen, ist auch ihre Wucherungszone eine größere. So findet man mehr fettbeladene Zellen in diesen Kulturen und die lichtbrechenden Tropfen scheinen auch in viel größerer Zahl vorhanden zu sein; der Unterschied an Fettgehalt ist jedoch nur vorgetäuscht.

In den folgenden Tagen nimmt die Zahl und Größe der intracellulären Fetttropfen fortschreitend zu, der Zelleib füllt sich immer mehr mit durch Scharlach R färbbaren Einschlüssen. Währenddessen scheint das Wachstum nicht nennenswert beeinträchtigt zu sein; man findet in großer Zahl Mitosen. Während aber in den mit aktivem Öl behandelten Kulturen am 3. Tag die Zahl der Mitosen nicht merklich abnimmt, ist dies bei den mit inaktiviertem Weizenöl behandelten Kulturen der Fall. In dieser Zeit sind die Zellen beider Kulturreihen mit Fett überfüllt; doch nur in der mit inaktiviertem Weizenöl behandelten Reihe ist eine Wachstumshemmung eingetreten, was aber nicht nur der Fettfüllung der Zellen, sondern eher dem Altern der Kulturen zuzuschreiben ist. Eine Zunahme des Wachstumshofes wird in diesen Kulturen nicht bemerkt. Diese Kulturen erinnern an Explantate, die nach anfänglicher Wucherung sich selbst überlassen wurden; sie sind auf dem Wege zum Absterben. Die kleinen lichtbrechenden Körnchen zwischen den Chondriokonten des Zelleibs fließen zu größeren Tropfen zusammen, die Zellen runden sich ab, indem die Fortsätze zurückgezogen werden, sich verkürzen; im Zellinneren geht eine Pyknose des Kernes und des Cytoplasmas vor sich. Die Zellen gehen Auflösungsvorgängen entgegen und um den kugeligen, nekrotisierenden Zellen herum erscheinen hyaline Tropfen.

Während also vom 3. Tage ab die mit dem inaktivierten Weizenöl behandelten Kulturen Zerfallsvorgängen entgegengehen, zeigen die mit aktivem Öl behandelten Kulturen noch eine beträchtliche Wachstumskraft. Mitosen werden in großer Zahl gefunden und von Zerfallsvorgängen sind noch keine ausgesprochene Zeichen zu erkennen. Erst vom 5. Tage an treten diese auf, um dann ebenso rasch wie die Kulturen der zweiten Reihe, dem Absterben entgegenzugehen.

Diese Beobachtungen zeigen also, daß bei der wachstumsfördernden Wirkung des E-Vitamins nicht die Fettassimilation das Wirksame ist. Das inaktivierte Weizenöl wird ebenso aufgenommen, ohne den Wachstumsgrad zu steigern. Das in den Zellen liegende Fett hindert die Wucherung nicht beträchtlich und wir können die Angaben Levis bestätigen, nach welchen die Anwesenheit von Fetttropfen in den Zellen die mitotische Teilung nicht hindert.

Für unsere Betrachtungen ergibt sich aus diesen Versuchen die erwartete Tatsache, daß trotz gleichmäßiger Aufnahme von aktivem und

inaktiviertem Weizenöl nur dasjenige die Wachstumskraft steigern mag, das in den Fütterungsversuchen als E-vitaminhaltig sich erwies. Somit könnte man den Wachstumsreiz dem E-Vitamin gleichstellen. Dies ist jedoch keinesfalls angängig, da Weizenkeimlinge auch andere Vitamine enthalten. Wieviel von den übrigen Faktoren im Weizenöl enthalten ist, war uns nicht bekannt; soviel jedoch haben sämtliche Beobachtungen erkennen lassen, daß die Menge der in Frage kommenden Vitaminfaktoren, das E-Vitamin abgerechnet, nicht eine beträchtliche ist und bei der erwiesenen, wachstumsfördernden Wirkung des Weizenöls in erster Linie das E-Vitamin in Betracht kommen muß. Zur endgültigen Beantwortung unserer Frage wäre die Isolierung des E-Vitamins unbedingt erforderlich oder eine Reindarstellung, bei welcher die Anwesenheit anderer Vitaminfaktoren mit Sicherheit ausgeschlossen werden könnten.

Die an Gewebskulturen erhaltenen Ergebnisse haben wir schon nach den Ergebnissen der Fütterungsversuche vermutet. Es stellte sich nämlich bei den Fütterungsversuchen heraus, daß, während der Hoden bei Mangel an E-Vitamin Zerfallsvorgängen entgegengeht, unter gleichen Versuchsbedingungen der Eierstock unverändert und scheinbar funktionstüchtig bleibt. Demgegenüber könnten wir, in Übereinstimmung mit *Evans, Sure usw.* nachweisen, daß die heranwachsenden Embryonen das E-Vitamin bedürfen, da sie bei seinem Mangel absterben. Das abweichende Verhalten beider Keimdrüsen wurde schon von Anfang an dadurch erklärt, daß der Hoden ein Organ ist, in dem ein viel höherer Stoffumsatz stattfindet, als im Eierstock. Es scheint, daß dieser Unterschied vor allem in der hohen Wucherungskraft des Samenepithels in die Erscheinung tritt. Ebenso, wie der Hoden, weist auch das embryonale Gewebe eine starke Wachstumsneigung auf und mit dieser Fähigkeit beider Gewebe in Übereinstimmung ist ihr E-Vitaminbedarf sehr ausgesprochen. Wenn wir diese Tatsachen unseren an Gewebskulturen erhaltenen Ergebnissen gegenüberstellen, so ergibt sich ungezwungen, daß das E-Vitamin einen Faktor darstellt, den die in Vermehrung begriffene Zelle in größerer Menge bedarf. Der E-Faktor scheint somit einen blastotropischen Reiz zu vermitteln, dessen Bedeutung für die Zellvermehrung eine ausschlaggebende zu sein scheint. Sollte sich diese Vermutung im weiteren bestätigen, so ist die Benennung des E-Vitaminfaktors, als des antisterilisierenden oder Fortpflanzungsvitamins nicht ganz zutreffend, da als seine primäre Aufgabe eventuell überhaupt die Unterstützung der Wucherung zu betrachten wäre. Unbeantwortet bleibt indessen die Frage, ob die wachstumsfördernde Wirkung des E-Vitamins nicht durch Unterstützung der Assimilationsvorgänge in den Zellen bedingt sei und es so nur an Lebensvorgängen der Zelle beteiligt ist, die nur mittelbar mit der Mitose in Zusammenhang stehen.

Gegen die Benennung des E-Vitamins ergibt sich außer den erwähnten noch ein schwerwiegender Gegengrund, nämlich, daß bei den Weibchen

eigentlich überhaupt keine Unfruchtbarkeit entsteht. Man kann letzten Endes doch nicht Unfruchtbarkeit den Fall nennen, wo normale Ovulation und Befruchtung stattfindet. Wo eine Befruchtung möglich ist, kann die Fruchtbarkeit keinesfalls bezweifelt werden. Da der Begriff der Sterilität höherer Tiere in strenger Fassung mit Befruchtungsunfähigkeit zu bestimmen ist, kann er in unserem Falle nur auf die Männchen angewendet werden.

Zusammenfassung.

1. Gewebekulturen *in vitro* erhalten durch Weizenöl als Quelle des E-Vitamins einen starken Wachstumsreiz. Die Wucherungshöfe werden bedeutend größer als bei den Vergleichskulturen. Bei Anwendung von inaktiviertem Weizenöl bleibt diese Wirkung aus.

2. Das Öl, aktives oder inaktiviertes, erscheint gleichmäßig im Zellinneren als Assimilationsprodukt. Nicht das Öl ist für die Steigerung der Wachstumskraft verantwortlich, sondern der darin enthaltene Vitaminfaktor, der aller Wahrscheinlichkeit nach dem E-Vitamin gleich ist.

Schrifttum.

Bisceglie, V.: W. Roux Arch. **108**, 463 (1926). — *Bisceglie, V. u. A. Juhász-Schäffer:* Die Gewebszüchtung *in vitro*. Monographien Physiol. **14**. Berlin: Julius Springer 1928. — *Donley, E. D. u. A. Hewell:* Amer. J. Anat. **45**, 189 (1930). — *Funk, C.:* Die Vitamine. München: J. F. Bergmann 1924. — *Juhász-Schäffer, A.:* Biol. generalis (Wien) **3**, 67 (1927). — *Levi, G.:* Vita autonoma di parti dell'organismo. La coltivazione dei tessuti. N. Zanichelli Bologna, 1922. — *Stepp u. György:* Avitaminosen und verwandte Krankheitszustände. Berlin: Julius Springer 1927.
