

(Aus der Universitäts-Augenklinik Bern [Direktor: Prof. A. Siegrist].)

Arbeiten über das E-Vitamin.

III. Mitteilung.

Versuche über die Frage der „ex non usu“.

Von

Alexander Juhász-Schäffer.

(Eingegangen am 23. Dezember 1930.)

Es ist wohlbekannt, daß verschiedene Tiere auf vitaminfreie Ernährung verschieden reagieren. Während z. B. die Tauben die ausgezeichnetsten Versuchstiere für das antineuritische Vitamin darstellen, scheinen sie das antiskorbutische Vitamin vollständig entbehren zu können. Die Ratten sind dagegen für Mangel an antirachitischem Vitaminfaktor sehr empfindlich, für die neuritische Avitaminose nur sehr wenig, für die Skorbutavitaminose überhaupt gar nicht. Das Meerschweinchen ist ein ausgezeichnetes Tier für Versuche über Skorbut. Eine ganze Reihe von Beobachtungen wiesen darauf hin, daß der Vitaminbedarf von Tier zu Tier nach Menge und Art sich ändert.

Da die Vitamine ganz grundlegende Lebensleistungen regeln, ergibt sich die Frage, warum das Vitaminbedürfnis mit der Art und Rasse der Tiere so verschieden ist. Es ist zwar bekannt, daß fast bei allen Tieren das Vitaminbedürfnis in der ersten Lebenszeit viel größer ist, als in den späteren Lebensabschnitten, aber warum diese Abhängigkeit von der Entwicklung besteht, ist noch unbekannt oder wenigstens nicht genügend geklärt. Die Stoffwechselleistungen setzen sich ja auch bei den Erwachsenen fort.

Um alle diese Fragen zu beantworten, stellte *Centanni* eine Lehre auf, die zum Verständnis dieser Probleme eine gute Stütze zu sein schien. Diese Lehre ging von der Beobachtung aus, daß zwischen Vitaminbedürfnis und gewohnter Nahrung gewisse Beziehungen bestehen. Jedes Tier antwortet mit Karenzerscheinungen auf Mangel von solchen Vitaminfaktoren, die in seiner alltäglichen Nahrung in beträchtlichen Mengen vorkommen. Bei den Kornfressern unter den Vögeln ist die Empfindlichkeit gegen Mangel an antiberiberischen Vitamins ausgesprochen, das vor allem im Pflanzenreich, in den Samen des Getreides, aber auch in Rüben und Obst, reichlich enthalten ist. Der antiskorbutische Faktor C ist in frischen Vegetabilien, im Kohl, in Salat, Rüben,

vor allem in der Citrone enthalten. Dementsprechend sind grasfressende Tiere, wie das Meerschweinchen, für C-Avitaminose besonders empfindlich. Der mit gemischter Nahrung lebende Mensch benötigt alle bekannte Vitamine und ist gegenüber Mangel an sämtlichen Vitaminen empfindlich.

Nach *Centanni* wurden diese Erscheinungen folgendermaßen erklärt: „Die Vitamine sind gewöhnliche Stoffwechselhormone, die ursprünglich von jedem Organismus, durch Aktivität eigener Organe gebildet wurden; da aber diese Hormone immer wieder mit der Nahrung zugeführt wurden, mußten die endogenen Produktionsstätten, dem Gesetz des „ex non usu“ folgend atrophieren, und gingen sogar in den extremsten Fällen ganz verloren“.

Diese Annahme konnte durch mannigfache Beobachtungen gestützt werden. Vor allem fand man, daß auch die Drüsen mit innerer Sekretion in Atrophie übergehen, wenn die entsprechenden Hormone von außen ständig zugeführt werden (Schilddrüse, Eierstock). Noch wichtiger scheint die Tatsache zu sein, daß in den Geweben tierischer Organismen, die ein bestimmtes Vitamin entbehren können, dieses Vitamin enthalten ist, auch wenn das Tier es in der Nahrung nicht erhält. So fand z. B. *Parsons*, daß mit skorbuterzeugender Kost gefütterte Ratten in ihrer Leber den antiskorbutischen Faktor enthalten, da 5 g Tagesmengen solcher Leber Kaninchen vor Skorbut schützen konnte. Ähnlicherweise haben *Parsons* und *Hütten*, *Leptowsky* und *Nelson*, *Centanni*, Ratten-Geschlechterfolgen an C-vitaminfreier Kost gehalten; sie wiesen dann nach, daß die Gewebe dieser Tiere den C-Faktor immer noch in unveränderter Menge enthielten. Daß es sich bei diesen Versuchen nicht um Erhaltenbleiben aufgespeicherten Vitamins handelte, erhellt daraus, daß Meerschweinchen, wenn sie bei Skorbutnahrung länger als 3 Wochen am Leben bleiben, alle an Skorbut erkranken.

Eine Atrophie der endogenen Vitaminproduktionszentren ist nach *Centanni* bei den *Abderhaldenschen* Versuchen anzunehmen. *Abderhalden* fütterte Tauben mit frischem Pferde- oder Kalbfleisch, an das die Tauben sich recht bald gewöhnten. Nach etwa 150 Tagen wurden die Tauben auf eine Diät, bestehend aus Reis oder Casein und Salz-mischung gesetzt, worauf die Tiere auffallend rasch zugrunde gingen. Es handelte sich hier keinesfalls um Mangel an B-Faktor, da Bierhefe nicht nur die Tiere nicht retten konnte, sondern sogar den Eintritt des Todes beschleunigte. Es mußte sich also anscheinend um eine erworbene Empfindlichkeit gegenüber dem C-Faktor handeln, die diese Tiere vor der Behandlung nicht hatten. Eine ähnliche Erwerbung der Empfindlichkeit gegenüber dem C-Faktor hat auch *Centanni* beobachtet. Während normalerweise weiße Mäuse in Laboratorien mit Brot und Hafer ernährt werden, fütterte er seine Tiere stets mit Brot, Milch, Samen, evtl. unter Zutat von Lattichblättern. Als diese Tiere auf eine Kost, bestehend

aus Brot und Hafer, gesetzt wurden, starben die meisten von ihnen innerhalb 3—4 Wochen.

Die verkehrte Erscheinung, die Regeneration der endogenen Bildungsstätten der Vitamine, soll auch beobachtet worden sein. Es wurden von mehreren Forschern sog. chronische Beriberifälle beschrieben und auch natürliche Heilungen trotz fortgesetzter Avitaminosekost. Deshalb versuchte *Centanni* bei Tauben die Empfindlichkeit gegenüber B-Vitaminmangel durch langsame und gradmäßige Entwöhnung herabzusetzen, in der Hoffnung, daß der relative Vitaminmangel als Reiz für die Regeneration der endogenen Bildungsstätte wirken wird. Es gelang ihm auch unter 35 Tieren 4 Tiere so lange am Leben zu erhalten, daß bei diesen die im Vorversuch aufgenommenen Vitaminmengen nicht mehr als Schutz gegen Karenzerscheinungen in Betracht kommen konnten. Bei diesen Tieren wurde die Vitaminszufuhr am 40., 43., 37. bzw. am 18. Tag vollständig unterbrochen. Das eine Tier lebte 194 Tage, das zweite wurde am selben Tag, das dritte am 155. Tag, das vierte endlich am 95. Versuchstag getötet; sie lebten also 154, 151, 118 bzw. 77 Tage ohne Vitaminszufuhr und ohne jedes Zeichen einer Erkrankung an Beriberi. In den Organen der Tiere konnte dann *Centanni* die Anwesenheit des B-Vitamins nachweisen; es wurden von den Organen der Tiere Extrakte hergestellt, deren heilende Fähigkeit an beriberikranken Tauben geprüft wurde.

Entsprechend diesen Beobachtungen wollten wir versuchen, ob es uns gelänge, Ratten durch allmähliche Entziehung an E-vitaminfreie Kost zu gewöhnen. Zu diesem Zwecke nahmen wir 14 junge Rattenmännchen und fütterten sie mit unserer Grundkost, bestehend aus

Extrahierte Weizenstärke	65%
Extrahiertes Casein	18%
Schweinefett.	10%
Salzmischung nach <i>Mc Collum</i> und <i>Simmonds</i> . . .	4%
Lebertran	2%
Extrahierte Hefe.	1%

Nach unseren Erfahrungen genügten Tagesgaben von 1 Tropfen Weizenöl als Quelle des E-Vitamins, um die Tiere vor Unfruchtbarkeit zu schützen. Da aber mit Verlorengehen eines Teiles des Futtermittels in den Käfigen gerechnet werden mußte, gaben wir unseren Versuchstieren durchschnittlich 2 Tropfen Weizenöl täglich, das dem Nahrungsgemisch beigemischt wurde. Diese Menge reichte immer aus. Wir gingen also von dieser Gabe aus und verminderten sie gradmäßig, indem wir wöchentlich die zwei entsprechenden Tropfen der Tagesgabe einer größeren Menge Nahrungsmischung beifügten. Zwei Tropfen Weizenöl machen durchschnittlich 50 mg aus. Die Berechnung geschah in der Weise, daß jede Woche die Tagesdosis um 10 mg geringer genommen wurde, so daß innerhalb 10 Wochen die Weizenölgabe auf 0 herabging. Das Einsetzen vitaminfreier Ernährung wurde von dem Tage an gerechnet,

wo überhaupt kein Weizenöl mehr gereicht wurde. Unsere früheren Versuche zeigten, daß nach 120 Tagen E-vitaminfreier Ernährung in den Nebenhoden keine oder nur noch veränderte und spärliche Spermien vorhanden sind. Deshalb untersuchten wir am 120. Tag vitaminfreier Ernährung mit den gewöhnlichen histologischen Methoden die Hoden und Nebenhoden.

Die Untersuchung der Nebenhoden auf ihren Inhalt geschah mit der schon früher beschriebenen Methode. Von den Schnittflächen der Nebenhoden wurden Abstriche gemacht und diese teilweise mit Ringerlösung vermischt, auf die Beweglichkeit der Spermien untersucht, teils wurden Ausstrichpräparate durch Fixierung in Osmiumdämpfen und Färbung in Eisenhämatoxylin oder Gentianaviolett hergestellt, um die morphologischen Veränderungen der Spermien nachzuweisen. Die Hoden wurden in Tellyesnitzkylösung fixiert, mit Hämatoxylin und Eosin im Ganzen gefärbt und in Reihen geschnitten.

Bei 4 Tieren fanden wir in beiden Hoden leere Nebenhodengänge, ohne die geringste Spur von Spermien. Bei einem Tier enthielt der eine Nebenhoden noch degenerierte Spermien (doch nur sehr spärlich und in kleine Klumpen verwandelt), während der andere Nebenhoden sich als leer erwies. Bei den übrigen Tieren waren die Nebenhodengänge mit mehr oder weniger zahlreichen Spermien gefüllt, überall jedoch in stark veränderter Form, wie wir das bei den Tieren gefunden haben, bei denen wir die Vitaminzufuhr plötzlich unterbrochen hatten. Normale, bewegliche Spermien haben wir bei keinem dieser Tiere gefunden, die pathologischen Veränderungen, sowohl in morphologischer als auch in funktioneller Hinsicht, waren vielleicht noch mehr ausgesprochen als bei den Tieren mit plötzlich unterbrochener Vitaminzufuhr.

Wenn wir die praktische Einteilung der durch E-Avitaminose bedingten Hodenatrophie beibehalten wollen, nach welchen in der 1. Phase normale, bewegliche, in der 2. Phase morphologisch normale, jedoch unbewegliche, in der 3. Phase endlich auch morphologisch veränderte Spermien gefunden werden, so lassen sich die Beobachtungen an unseren Versuchstieren dahin zusammenfassen, daß am 120. Tag der E-Avitaminose bei Ratten, die von der E-Vitaminzufuhr allmählich entwöhnt wurden, die Phasen 1 und 2 nicht mehr aufgefunden werden. Die meisten Tiere zeigen eine weit fortgeschrittene Hypobiose ihrer Keimdrüsen, da die Nebenhodenausstriche für die 3. Phase charakteristisch waren: die Spermien sind unbeweglich und zeigen weitgehende morphologische Veränderungen, wie Verklumpung, Riesen- und Zwergspermien. Bei 4 Tieren war auch die 3. Phase überschritten, die Nebenhodengänge waren leer.

In den histologischen Hodenpräparaten konnte der fortgeschrittene unterlebenswertige Vorgang ebenfalls nachgewiesen werden. Die Veränderungen waren die gleichen, die wir in unserer I. Mitteilung schon

beschrieben haben; überall fortgeschrittene Atrophie und Nekrose des Samenepithels, in verschiedenen Graden und Formen des herabgesetzten Lebensvorgangs. Die anfänglichen Phasen, wie die der „architektonischen Zerklüftung“ wurden in jedem Hoden überschritten.

Auf Grund dieser Beobachtungen schien uns also eine Entwöhnung der Tiere von E-Vitaminzufuhr nicht möglich zu sein, wenigstens nicht in einem Zeitraum von 10 Wochen. Wir waren uns wohl bewußt, daß diese negativen Ergebnisse nichts gegen die *Centannische* Theorie aussagen können. Der Verlust der endogenen Vitaminbildung wäre nach *Centanni* allmählich in einer unendlichen Reihe von Geschlechterfolgen eingetreten; es ist dann nicht zu erwarten, daß diese verlorenen Eigenschaften sich in einer so kurzen Zeitspanne wie die des Tierversuches wieder einstellen.

In einer nächsten Versuchsreihe haben wir die Versuchsanordnung umzukehren versucht, indem wir unsere Tiere an hohe Vitamingaben gewöhnten, und nachher plötzlich die Vitaminzufuhr unterbrachen. In einer früheren Versuchsreihe untersuchten wir die Wirkung der hohen Vitamingaben bei an Normalfutter gehaltenen Tieren und fanden, daß Mengen, 0,25—0,5 ccm Weizenöl zweimal wöchentlich unter die Haut gespritzt oder bei synthetischer Ernährung eine tägliche E-Vitamingabe von 2—3 g Weizenöl per os, keine krankhaften Veränderungen hervorrufen. Nur stellte sich heraus, daß das schlechtaufsaugbare Öl im Unterhautgewebe längere Zeit, manchmal auch wochenlang, verweilt und zu Bindegewebswucherungen Veranlassung gibt. Die Einspritzungen waren schmerzhaft und wir setzten sie darum nur in einer einzigen Reihe von Versuchen längere Zeit fort, und ersetzten sie in den übrigen durch perorale Zufuhr. Bei diesen Versuchen stellte sich heraus, daß die hohen E-Vitamingaben die Entwicklung der Hoden bei wachsenden Ratten beschleunigen, die Hodengewichte werden etwas größer (bis um 20%). An den Weibchen konnten durch hohe Weizenölgaben als Quelle des E-Vitamins keine Wirkungen erzielt werden: die Fruchtbarkeit blieb unverändert. Auch wenn Männchen und Weibchen gleichzeitig bei Normalfutter hohe Vitaminzulage erhielten, war die normale Fruchtbarkeit, die Generationsausbeute, nicht größer. Dies trifft jedoch für Familien mit beeinträchtigter Fruchtbarkeit nicht zu. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten *Evans* und *Burr*, als sie versuchten, durch hohe E-Vitamingaben die Fortpflanzungsausbeute bei normalen Ratten zu erhöhen.

Nachdem wir so die Unschädlichkeit der hohen Weizenölgaben erkannt hatten, war es uns möglich ohne unerwartete störende Zwischenfälle den Versuchstieren eine größere Menge E-Vitamin zu reichen.

10 Tiere erhielten unsere Grundkost der ersten Versuchsreihe, mit einer Zutat von 2—3 g Weizenöl auf den Tag. Die Tiere erhielten diese Diät 10 Wochen lang, gleichzeitig mit der ersten Versuchsreihe, wo wir

die Vitaminmenge langsam auf 0 herabsetzten; es wurde die E-Vitaminzufuhr auch gleichzeitig unterbrochen. Im folgenden Zeitabschnitt des Versuches erhielten diese Tiere nur die Grunddiät. Am 120. Tag der E-Avitaminose wurden die Nebenhoden, gleich wie in der ersten Versuchsreihe, untersucht.

Diese Untersuchungen hatten folgendes Ergebnis:

Im Nebenhodenabstrich zweier Tiere fanden wir normale, bewegliche Spermien. Bei der Beweglichkeitsprüfung zeigten die Spermien ausgesprochene Rheotaxis. Bei den entsprechenden fixierten und gefärbten Präparaten waren die Spermien morphologisch unverändert. In einem dritten Fall wurden ebenfalls bewegliche Spermien gefunden, jedoch die Beweglichkeitsversuche auf Rheotaxis fielen stets, trotz wiederholter Versuche, negativ aus. Die histologischen Präparate zeigten normale, morphologisch unveränderte Spermien.

In den übrigen 7 Fällen waren bei den Spermien weder Rheotaxis noch ausgesprochene Beweglichkeit zu erkennen. In der Aufschwemmung unter der Masse der unbeweglichen Fäden erkannte man vereinzelte, noch bewegliche Spermien, die Bewegungen waren jedoch beschränkt und sehr langsam. In den fixierten und gefärbten Präparaten sah man meistens scheinbar normale Spermien, aber auch mehrere unreife Formen. Nur ganz vereinzelt fand man zusammengekoppelte Fäden mit zusammengepreßten Köpfen; ihre Zahl war jedoch gering und es konnten niemals mehr als 4—5 Fäden unterschieden werden. Meistens erschienen sie als doppelt geschwänzte Spermien mit etwas großem Kopf.

Entsprechend der Untersuchung der Spermien zeigten die histologischen Hodenschnitte die Anfangsveränderungen, die wir bei der E-Avitaminose in der 5.—7. Woche zu beobachten gewöhnt waren. In den Hoden der Tiere, in deren Nebenhoden normale Spermien gefunden wurden, erhielten wir fast normale Bilder. Die meisten Kanälchen waren unversehrt mit unveränderter Samenbildung. Nur in einzelnen Kanälchen fand man die anfängliche Erscheinung der „architektonischen Zerklüftung“. In den Schichten des Samenepithels waren ganz enge Spalten zu erkennen, in die die Spermienköpfe herabzusinken anfangen; sie reichten aber nie tiefer als die Schicht der Spermatiden. Aber auch die so gering veränderten Kanälchen waren nur in kleiner Zahl aufzufinden; auch in ihnen war die Spermienbildung allem Anschein nach noch wohl erhalten. Das Lumen war immer noch mit Spermien gefüllt, wenn auch eine Lockerung in ihrer Fülle schon zu erkennen war.

In den übrigen Hodenschnitten waren die Veränderungen viel ausgesprochener. Man fand nur ganz vereinzelt scheinbar normale, jedenfalls wohlerhaltene Kanälchen. Die meisten Kanälchen trugen alle Zeichen der ausgesprochenen architektonischen Zerklüftung, zeigten das charakteristische Bild der sternförmigen Anordnung der Spermien. An vielen

Stellen waren die Spermien zu Zöpfen zusammengekoppelt. Die Spermatidenkerne erschienen in vielen Kanälchen pyknotisch, ihre Anordnung büßte die Regelmäßigkeit ein; einige von ihnen waren gegen das Lumen zu oder in die Zellzwischenräume der Spermatocyten verschoben. Die wandständige Anordnung der Spermatogonien war auch gestört, auch die der Spermatocyten zeigte Veränderungen. Man begegnete öfters absterbenden Kernen. Das ganze Bild ähnelte dem, das wir bei der E-Avitaminose von der 5.—10. Woche zu sehen pflegten.

Nach unseren Erfahrungen schien also, daß bei überschüssiger E-Vitaminzufuhr ein Teil des Vitamins im Organismus aufgespeichert wird, da nach der Unterbrechung der Vitaminzufuhr die Mangelerkrankungen verspätet auftraten, oder sich langsamer entwickelten. Unsere Versuche sagen nichts gegen oder für die Centannische Hypothese, da die erste Versuchsreihe verhältnismäßig kurz war, die zweite aber zeigte, daß reichlich Vitamin aufgespeichert werden kann.

Die Centannische Lehre kann uns gewisse Erscheinungen, auf die wir hingewiesen haben, gut erklären, nur scheint uns der Versuch gewagt zu sein, daraus praktische Folgerungen abzuleiten.

Diese Ergebnisse weisen noch auf eine Tatsache hin. Der Organismus ist fähig, nicht bloß so viel Vitamin aufzunehmen als notwendig ist, um seinen aktuellen Bedarf zu decken; er ist fähig, die überschüssige Vitaminmenge, wenigstens bis zu einem gewissen Grade, in seinen Geweben zu speichern und damit eine Art Rücklage vorrätig zu halten. Die Menge davon muß eine beträchtliche sein, da sie ausreichte, eine Verzögerung von etwa 2 Monaten in der Entwicklung der Mangelerkrankungen zu bedingen.

Zusammenfassung.

Es wurde versucht, Ratten durch allmähliche Entziehung der E-Vitaminrationen an eine E-vitaminfreie Kost zu gewöhnen. Dies gelang nicht, die Mangelerkrankungen traten frühzeitig auf.

Andererseits wurde Ratten längere Zeit das E-Vitamin in Überschuf gereicht, dann die Vitamingabe plötzlich unterbrochen. In diesem Falle wurden die Mangelerkrankungen erst spät offenbar. Daraus geht hervor, daß im Körper der Ratten das überschüssige Vitamin zum Teil gespeichert wurde.

Schrifttum.

Centanni, E.: La vita senza vitamine. Contributi sperimentali alla teoria del „ex non usu“. Modena. Soc. tip. Modenese. 1928. — Mc Collum, E. V. u. N. Simmonds: The newer knowledge of nutrition. Macmillan Co. New York 1929. — Funk, C.: Die Vitamine. München: J. F. Bergmann 1924. — Stepp u. György: Avitaminose und verwandte Krankheitszustände. Berlin: Julius Springer 1927.