

(Aus dem Pathologischen Institut der Friedrich Schiller-Universität Jena
[Direktor: Prof. Dr. W. Gerlach].)

Der Einfluß von Hypophysenvorderlappenextrakten und Colchicin auf Kerngröße und Kernteilung in der Schilddrüse*.

Von
H. Güthert.

Mit 10 Abbildungen, 3 Kurven und 12 Tabellen im Text.

(Eingegangen am 20. August 1940.)

I. Änderung der Kerngrößen der Schilddrüsenepithelien nach Behandlung mit Hypophysenvorderlappen-Hormon.

Die fortschreitende Erkenntnis der Wechselbeziehungen zwischen Vorderlappen der Hypophyse und den Organen innerer Sekretion bringt uns täglich dem erstrebten Ziele, der breiten therapeutischen Anwendung experimenteller Forschungsergebnisse näher. Klar und eindeutig sind die Wechselbeziehungen zwischen Hypophyse und Sexualorganen, insbesondere den weiblichen, erforscht. In ausgedehntem Umfang wird klinisch von zahlreichen standardisierten, auf die Sexualorgane wirkenden HVL-Präparaten Gebrauch gemacht.

Auch die Erforschung des schilddrüsenwirksamen Stoffes des HVL darf als abgeschlossen bezeichnet werden. Die Veränderungen der Schilddrüse am hypophysenlosen Tier, wie sie von *Adler*¹, *Allan*², *Smith*³⁷, *Uhlenhuth* und *Schwarzbach*³⁹ u. a. festgestellt wurden, sind als Anfänge der Erforschung der Wechselbeziehungen zwischen HVL und Schilddrüse zu bezeichnen, wenngleich fast 20 Jahre früher bereits von *Rogowitsch*³² auf solche Beziehungen hingewiesen worden war. *Uhlenhuth* und Mitarbeiter konnten dann als erste an Kaltblütern die Überordnung der Hypophyse über die Schilddrüse sicher feststellen. Diesen biologischen Ergebnissen folgten wenig später die ersten Arbeiten, die sich mit morphologischen Schilddrüsenveränderungen nach Behandlung mit HVL-Extrakten beschäftigten.

Loeb und *Bassel*²⁶ beobachteten an Meerschweinchen erstmalig eine starke Aktivierung der Schilddrüse nach Gaben von HVL-Hormon. In der Folgezeit sind diese Befunde von zahlreichen Untersuchern bestätigt worden**. Nach sehr exakten Untersuchungen zahlreicher Autoren, die sich mit den Veränderungen des histologischen Bildes der Schilddrüse nach Gaben von HVL-Hormon befaßten, haben andere Untersucher auch die zu erwartenden Stoffwechseleränderungen festgestellt. Nach *Verzar*⁴⁰ und *Oehme*²⁸ u. a. tritt nach wenigen Behandlungstagen

* Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. *Hermann Schröder*, Dortmund zum 65. Geburtstag gewidmet.

** *Loeser*: Arch. f. exper. Path. 184, 23 (1937), ausführliche Literaturangabe.

mit thyreotropem Hormon eine deutliche Erhöhung des Stoffwechsels auf. Neben einer Glykogenverarmung der Leber (*Loeser*²⁷, *Eitel* und *Loeser*¹², *Holden*¹⁹) haben andere Untersucher Änderungen im Mineralstoffwechsel (*Pugsley*, *Anderson*, *Collip*³¹, *Schneider* und *Widman*³⁶), gesteigertes Nahrungsbedürfnis, Haarausfall und Tachykardie beobachtet (*Eitel* und *Loeser*¹²). Sowohl beim Tier als auch beim Menschen wurde eine deutliche Grundumsatzerhöhung nach Gaben von thyreotropem Hormon gesehen (*Friedgood*¹⁵, *Anderson* und *Collip*³, *Eitel* und *Loeser*¹³, *Schüthenhelm* und *Eisler*³³).

Nach den letzten Untersuchungen von *Bomskov* und *Sladovic*³⁴ darf es als feststehend bezeichnet werden, daß es nur einen thyreotropen Wirkstoff in der Hypophyse gibt. Bekanntlich hatten *Wiesner* und *Crew*⁴¹, *Krichevski*²⁵ und *Paot*²⁹ ein thermolabiles und ein thermostabiles Prinzip im thyreotropen Hormon unterschieden, von denen das letztere seine Wirksamkeit auch am Kaltblüter beibehält. Selbst durch langes Kochen bleibt nach den Untersuchungen von *Bomskov* und *Sladovic* immer noch eine Restwirkung an thyreotropem Hormon von 10—15% zurück. Diese geringe Menge genügt, um beim Kaltblüter die bekannten Wachstumsveränderungen hervorzurufen.

Für die Wertbestimmung des thyreotropen Hormons sind verschiedene Vorschläge gemacht worden. Gegenüber den Methoden der Gewichtszunahme der Schilddrüse bzw. den sich durch die Thyroxinausschüttung ergebenden funktionellen und Stoffwechselveränderungen haben sich die histologischen Testmethoden durchgesetzt, wenngleich insbesondere von *Bomskov* hervorgehoben wird, daß zur Sicherung des Ergebnisses stets mehrere Methoden nebeneinander angewandt werden sollen.

Die heute gebräuchlichste histologische Methode ist die von *Junkmann* und *Schoeller*²³, die im Jahre 1932 ausgearbeitet wurde und auf folgender Grundlage beruht: Injiziert man einem jungen Meerschweinchen thyreotropes Hormon, so kommt es bereits nach 2—12 Stunden zu einer deutlichen Vergrößerung der Schilddrüse. Das histologische Bild ist außerordentlich typisch. Beim unbehandelten Tier sind die regelmäßig angeordneten Schilddrüsenfollikel ziemlich groß, Kolloid ist reichlich vorhanden. Das Epithel der Follikel ist flach, die Kerne sind zum Teil abgeplattet. Beim behandelten Tier ist dagegen von einem regelmäßigen Aufbau des Organs nichts mehr festzustellen. In den ersten Stadien kommt es zu einer bläschenförmigen Aussparung des Kolloids — eine Beobachtung, die *Aron*⁵ veranlaßte, sie als Grundlage eines Testes vorzuschlagen — in den epithelnahen Bezirken der Follikel. Diese Veränderung beginnt in den zentralen Abschnitten der Schilddrüse und dehnt sich mit Zunahme des Aktivierungsgrades auch auf die Peripherie aus. Neben dieser Kolloidabnahme kommt es zu einer Erhöhung des Epithels, die Kerne der Epithelien werden rund, groß und blasig. Daneben ist eine erhebliche allgemeine Hyperämie festzustellen. Hochgradig aktivierte Drüsen zeigen schließlich Bilder, die der menschlichen Basedowstruma mit Ausnahme der lymphocytären Infiltrate sehr ähnlich sind. In diesen Schilddrüsen ist Kolloid überhaupt nicht mehr vorhanden. Das Epithel zeigt starke Proliferationsneigung und kann schließlich den ganzen, ursprünglich von Kolloid angefüllten Raum einnehmen. Au

diesen Beobachtungen, die, wie ich oben erwähnte, von zahlreichen Untersuchern gemacht worden sind, baut sich die Testmethode nach *Junkmann* und *Schoeller* auf. Eine Meerschweinchen(MS)-Einheit des thyreotropen Hormons ist nach diesen Autoren diejenige Menge, die an 3 aufeinanderfolgenden Tagen zugeführt, am 4. Tage mindestens bei einem von 2 Tieren gerade die ersten deutlichen Zeichen einer Aktivierung im obigen Sinne hervorruft. Verwandt werden zur Auswertung nur junge Tiere von 100—150 g Gewicht, da ältere mitunter eine geringe Aktivierung der Schilddrüse durch das von ihnen selbst produzierte thyreotrope Hormon zeigen. *Junkmann* und *Schoeller*²³ verstehen unter den deutlichen Zeichen einer Aktivierung eine auf einzelne Bezirke beschränkte Wucherung des Epithels mit den charakteristischen kubischen bis zylindrischen Zellen und gelegentlich schon beginnenden Kolloidschwund.

Diese Testmethode ist für die Praxis vollkommen ausreichend; sie hat sich bei allen Untersuchungen sehr gut bewährt. Wir müssen uns aber vor Augen halten, daß sie rein subjektiv und sehr grob ist; denn abgesehen von den bekannten Einflüssen, die das Bild der normalen Schilddrüse schon in der Ruhe erheblich vielgestaltig machen können (Licht, Temperatur, Kost), rechnen *Junkmann* und *Schoeller* selbst schon mit einer Fehlerhöhe von 50 %; nur eines der beiden Testtiere braucht beginnende Aktivierung im obigen Sinne zu zeigen.

Bei der Erforschung des Wechselspiels zwischen Hypophyse und anderen innersekretorischen Organen, bei denen die subjektiv feststellbaren Veränderungen nach Gaben von HVL-Hormon sehr gering sind, hat man zahlenmäßig vergleichende Untersuchungen angestellt. Diese Untersuchungen sind hinsichtlich der Hormonforschung bisher am Pankreas und der Nebennierenrinde von wenigen Forschern ausgeführt worden, weil morphologische Veränderungen an diesen Organen völlig unzuverlässig sind und weil für eine exakte Auswertung der vermutenden Einwirkung des HVL auf diese Organe zahlenmäßig vergleichendes Material anzuführen erforderlich ist.

Eine objektive exakte Methode, die bisher in der Hormonforschung meines Wissens nicht angewendet ist, ist die der Kernmessung. Diese von *Heidenhain*¹⁸ und *Jakob*²⁰ entwickelte Untersuchungsmethode fußt auf der Anschauung *Heidenhains*, daß der tierische Körper aus Teilkörpern besteht, die das Bestreben haben, sich beim Wachstum durch innere und äußere Teilung zu verdoppeln. *Jakob* hält jede einzelne Zelle für ein solches Teilkörpersystem und stellt sich vor, daß die verschiedenen Kernvolumina, die man in einzelnen Organen sieht, dadurch entstehen, daß Zellen und mit ihnen ihre Kerne sich durch innere Teilung verdoppeln. Im funktionierenden Organ werden Zellen und Kerne die einmal durch Wachstum erreichte Größe beibehalten. Wir werden also in einem

Organ Kerne ganz bestimmter Größe antreffen und werden bei Aufstellung einer Variationskurve der Kernvolumina entweder eine einfache Binomialkurve erhalten, wobei das Maximum der Kurve dem am häufigsten vorkommenden Kernvolumen, dem „Regelkernvolumen“, entspricht. Bei Organen mit mehreren Kerngrößen, z. B. der Leber, erhalten wir bei der graphischen Darstellung der Kerninhalte mehrgipfelige Kurven, wobei die den Maxima entsprechenden Kerninhalte sich wie 1:2:4:8 nach der *Heidenhain-Jacobyschen* Theorie verhalten müssen, wie es *Jacoby* an verschiedenen Organen auch tatsächlich nachgewiesen hat. *Jacoby* hat für diese Erscheinung den Begriff des *rhythmischen Wachstums* aufgestellt, das durch das Auftreten verschiedener Kernklassen erklärt wird.

Kernmessungen sind nach *Jacoby* an zahlreichen Organen von Vielen ausgeführt worden und haben zur Aufstellung ganz charakteristischer Kurven für die einzelnen Organe geführt. Auch in die Krebsforschung hat diese Methode Eingang gefunden. Das Bestreben, eindeutige Merkmale zur Trennung normaler Zellen von Krebszellen zu erhalten, ist damit bislang nicht erreicht worden (*Schairer*³³).

Wenn wir die Methode der Kernmessung auf die Hormonforschung angewandt wissen wollen, so haben wir dafür zunächst den Grund, daß von fast allen Untersuchern, die aktivierte Schilddrüsen gesehen haben, beobachtet worden ist, daß die Kerne der Follikelepithelien an Größe zunehmen und blasig werden. Diese Kernveränderungen sind also zweifellos Ausdruck eines veränderten Funktionszustandes jeder einzelnen Zelle und des Organs. Je nach dem Grad der Aktivierung dürfen wir demnach, entsprechend dem histologischen Allgemeinbild, verschiedene Kerngrößen erwarten. Wir haben uns nun gefragt, ob diese theoretisch zu erwartende Kernvergrößerung meßbar ist und ob nach der variationsstatistischen Methode Unterschiede im Kurvenverlauf bei mit thyreotropem Hormon behandelten und bei unbehandelten Schilddrüsen tatsächlich vorhanden sind. Interessant ist es weiterhin, zu wissen, ob die zu erwartende Änderung der Kerngrößen bei behandelten Tieren dadurch zum Ausdruck kommt, daß die Regelkernklasse sich einfach nach oben verschiebt oder daß mehrgipfelige Kurven entstehen, also rhythmisches Wachstum im oben erläuterten Sinne *Jacobys* auftritt.

Methodik.

Zu meinen Untersuchungen benutzte ich junge, 170—190 g schwere, männliche und weibliche Albinoratten aus eigener Zucht. Sie erhielten keine besondere Kost, sondern wurden mit gewöhnlichen Küchenabfällen ernährt. Die Tiere wurden bei mittlerem Tageslicht und einer Temperatur von 18—20° in mehreren Käfigen zusammen gehalten. Der größte Teil der Versuche wurde zwischen Frühjahr und Herbst gemacht.

Wenn ich zu meinen Versuchen Ratten wählte, so hatte dies verschiedene Gründe. Die Erhöhung des Grundumsatzes und die Verminderung des Leberglykogens nach Gaben von thyreotropem Hormon sind sowohl an der Ratte wie auch an anderen Tieren festgestellt, worauf oben bereits hingewiesen wurde. Diesem positiven Stoffwechselergebnis gegenüber besteht jedoch fast Übereinstimmung darin, daß die Ratte für histologische Testmethoden an der Schilddrüse deshalb ungeeignet ist, weil die Schilddrüse schon bei der gewöhnlichen Kost eine bestimmte Aktivierung zeigt. Der Grad der Aktivierung dieser „Ruheschilddrüse“ bei der Ratte ist allerdings nach den Abbildungen im Schrifttum bei den Untersuchern verschieden.

Bei zahlreichen eigenen Ratten haben wir uns deshalb zunächst einmal davon überzeugt, daß bei unseren unter ganz normalen Bedingungen gehaltenen Tieren eine Aktivierung histologisch stets festzustellen war, daß aber wesentliche Unterschiede hinsichtlich des Aktivierungsgrades bei den einzelnen Tieren nicht vorhanden waren. Es kam uns auch nicht darauf an, eine neue Testmethode zu entwickeln. Wir gingen bewußt von der aktiven Rattenschilddrüse aus, um festzustellen, ob mit unserer Methode dort, wo im gewöhnlichen histologischen Test keine eindeutigen Ergebnisse mehr zu erlangen sind, mit der variationsstatistischen Methode der Kernmessung Unterschiede noch festgestellt werden können.

Der Einfluß der Ernährung auf den Aktivitätsgrad der Schilddrüse der Ratte ist von großer Bedeutung. Das ist in speziell darauf gerichteten Untersuchungen sowohl von *Tanabe*³⁸ als auch von *Paal* und *Kleine*³⁰ u. a. festgestellt worden. Danach aktivieren einseitige Fett- oder Eiweißkostformen die Rattenschilddrüse. Diese Tatsache veranlaßte *Paal* und *Kleine* eine Ruhekost anzugeben. Wir haben aus den oben angeführten Gründen, die uns überhaupt bestimmten, die Ratte als Versuchstier zu wählen, auch auf die Kostform keine Rücksicht genommen, weil wir feststellen konnten, daß die gemischte aus Küchenabfällen bestehende Eiweiß-, Fett-, Kohlehydratkost bei den Tieren zu keinen, durch histologische Untersuchung feststellbaren Unterschieden hinsichtlich des Aktivierungsgrades der Schilddrüse führten.

Den HVL-Extrakt stellten wir uns zum Teil selbst aus frisch bereiteten, acetongetrockneten Rinderhypophysen her. Zum Teil benutzten wir von der Firma Hoffmann-La Roche freundlichst zur Verfügung gestelltes „Prägländol“. Wir suspendierten unser eigenes HVL-Pulver in Thyrodelösung, schüttelten die Lösung 2—3 Stunden im Schüttelapparat und filtrierten. Das Filtrat stellte die injizierbare Flüssigkeit dar. Das Präparat von Hoffmann-La Roche ist wasserlöslich und war deshalb nach Lösung in Thyrode, wo es zum Teil etwas klumpte, sofort versuchsfertig. Durchweg erhielt jedes Tier pro Injektion 20—25 mg HVL-Pulver gelöst bzw. extrahiert intraperitoneal injiziert.

Wir teilten unsere Tiere insgesamt in 6 Gruppen ein, die am Ende des Abschnittes über Methodik hintereinander aufgeführt werden. Am Ende des Versuches wurden die Tiere durch Nackenschlag getötet. Die Schilddrüse wurde zusammen mit Kehlkopf und Speiseröhre herauspräpariert und in Susa fixiert. Die Organe wurden in Paraffin eingebettet. Von jedem Organ wurden 30—50 je etwa 10μ dicke, mit Eisenhämatoxylin-Eosin gefärbte Stufenschnitte untersucht. Neben einer histologischen Durchmusterung der Organe standen im Vordergrund Kernmessungen, die an den Kernen der Schilddrüsenfollikel durchgeführt wurden. Wir verwandten dazu das zum Ultraphot (Zeiss) gehörige Zeichengerät. Das histologische Präparat wird dabei auf einen oberhalb des Okulars befindlichen Spiegel projiziert. Von hier aus wird es auf einen größeren, rechts davon fest aufgehängten Spiegel geworfen, der das stark vergrößerte Bild auf einen horizontalen, weißen Gipstisch zur Darstellung bringt, der unmittelbar rechts neben dem Mikroskop steht. Die Größenverhältnisse wurden mit einem Objektmikrometer derart festgelegt, daß durch geeignete Stellung der Spiegel und durch entsprechende Okulare und Objektive 10μ im Präparat 20 mm auf der horizontalen Gipsfläche entsprachen, die Vergrößerung insgesamt also 2000 war. Die Lichtverhältnisse waren bei Benutzung der Bogenlampe vollkommen ausreichend.

Die Kerne wurden scharf eingestellt und dann mit einem harten, fein gespitzten Stift auf weißes Papier abgezeichnet. Bei der Schilddrüse wurden vorhandene Kernteilungsfiguren entweder mit eingezeichnet oder bei der Projektion besonders ausgezählt. Insgesamt wurden auf diese Weise 10—12 verschiedene Gesichtsfelder aus verschiedenen Präparaten aufgezeichnet, was etwa 500 Schilddrüsenkernen entsprach. Die Ausmessung wurde mit einem Rechenschieber auf $\frac{1}{2}$ mm genau ausgeführt. Es wurde die Länge des größten Durchmessers und des auf ihm senkrecht stehenden genommen. Das arithmetische Mittel aus diesen beiden Werten wurde als Durchmesser D einer Kugel angesehen. Das Volumen dieser Kugel wurde als dem Zellvolumen entsprechend angenommen. Für die Kurven wurde D in μ als Abszisse, die Anzahl gleicher Kerngrößen prozentual zur gesamten, ausgemessenen Kernzahl als Ordinate genommen. Als Äquivalent des Kugelinhaltes wurde $D^3 = V$ mitunter angegeben.

Zur Kritik dieser Methode ist zu sagen, daß bei Messungen an Schnittpräparaten es erforderlich ist, auf die Bestimmung des dritten Durchmessers zu verzichten, wenn man nicht an gleichdicken Serienschnitten die dritte Dimension bestimmen will. Dies ist äußerst mühevoll, und ich konnte darauf deshalb verzichten, weil bei der geometrisch einfachen Kugel- oder Ellipsoidform des Kernels der dritte Durchmesser von den gemessenen zwei anderen nicht wesentlich abweicht. An der Schilddrüse habe ich mich stets davon überzeugt, daß die Kerne selbst bei 2000facher Vergrößerung meist nur wenig entrundet waren. Lediglich bei den mit Dijodthyrosin behandelten Tieren waren die Kerne durch Abflachung häufig ellipsoid. Hier wurden die Kerne aufgesucht, die der Kreisform am nächsten kamen. Da, wie

oben schon gesagt, die Kerne bei der Schilddrüse im allgemeinen rund sind, werden wir bei unseren Messungen ziemlich eindeutige Maxima für die einzelnen Kernklassen erwarten dürfen. Die sehr große Zahl der in jedem Fall gemessenen Kerne bietet außerdem die Gewähr, daß die noch vorkommenden Unregelmäßigkeiten ausgeglichen werden.

Die Frage der Fixierung von zu messenden Geweben ist vielfach erörtert und verschieden beantwortet worden. *Haumeder*¹⁶ hält die Messung an unfixierten Geweben für am genauesten. Bei über 15000 ausgemessenen Kernen, auf die sich meine Untersuchungen stützen, wird es einleuchten, daß irgendein Fixierungsmittel angewandt werden muß. *Jacobj*^{20, 21, 22}, dem wir die ersten wesentlichen Arbeiten über Kernmessungen verdanken, hat seine Untersuchungen an in Susa fixierten und in Paraffin eingebetteten Material vorgenommen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind an anders behandelten Geweben bestätigt worden. *Schairer*³³ hat in seiner Arbeit über Kernmessungen an menschlichen Geschwülsten bei in Formalin oder Susa fixierten Geweben innerhalb der Fehlergrenze keine Unterschiede hinsichtlich der Kerngrößen feststellen können, wobei zu betonen ist, daß unter den von *Schairer* gemessenen Kernen Kerne von Krebszellen waren, bei denen durch Fixierung hervorgerufene Schrumpfungsvorgänge bessere Angriffspunkte haben als an einem gewöhnlichen runden Kern. Ich glaube also, daß die hier angewandte Methode der variationsstatistischen Messung der Kerngrößen an Schilddrüsenfollikeln genügend genau ist, um beim behandelten wie beim unbehandelten Tier verlässliche Anhaltspunkte über die am häufigsten vorkommende Kernklasse zu gewinnen. Die Methode scheint mir jedenfalls genauer als jede subjektive Betrachtung. Ich will zunächst nur versuchen, nachzuweisen, ob wir mit dieser Methode in der Lage sind, Änderungen des Funktionszustandes an der Schilddrüse abzulesen. Erst wenn das mit Sicherheit zutrifft, könnte man später daran gehen, sie im Test als Wirkungskriterium auszuarbeiten und zu verwenden.

Neben diesen Kernmessungen wurden, worauf ich im Teil II der Arbeit noch näher eingehen werde, auch Mitosenzählungen in großem Umfang durchgeführt. Bei der Schilddrüse wurde die Zahl der Mitosen auf 500—600 Gesamtzellen festgestellt, darunter insbesondere an Organen, die mit dem mitosestimulierenden Alkaloid Colchicin zusätzlich behandelt worden waren (Näheres s. Teil II!).

Bevor wir zu den Kernmessungen übergehen, seien zunächst die einzelnen Versuchsgruppen angeführt, auf die bei den Messungen und den Zählungen der Mitosen jeweils hingewiesen wird.

Gruppe I (L_{31} — L_{34}): 2 männliche und 2 weibliche Ratten. Gewicht 170—190 g, unbehandelt: Kontrolltiere.

Gruppe II (L_{27} — L_{30}): 4 männliche Ratten, Gewicht 170—190 g. Erhalten täglich 50 mg acetongetrocknetes HVL-Pulver in Thyrodelösung extrahiert. Täglich 2 Dosen zu je 25 mg, 3 Tage lang. Etwa 12 Stunden nach der letzten Injektion am Morgen des 4. Tages durch Nackenschlag getötet.

Gruppe III (L_{21} — L_{26}): 6 männliche Ratten, Gewicht 170—190 g. Täglich erhält jedes Tier 50 mg acetongetrocknetes HVL-Pulver in Thyrodelösung extrahiert. Täglich 2 Dosen zu je 25 mg, 3 Tage hintereinander. Zusammen mit der letzten Injektion erhalten die Tiere je 0,8 ccm einer 0,03%igen Colchicinlösung. 9 Stunden später durch Nackenschlag getötet.

Gruppe IV (L_{35} — L_{39}): 2 weibliche und 3 männliche Tiere. Gewicht 180—200 g. Erhalten täglich 40 mg „Prägländol-Roche“ in 2 Tagesdosen. Zusammen mit der letzten Dosis erhalten die Tiere 0,8 ccm einer 0,03%igen Colchicinlösung. 9 Stunden später durch Nackenschlag getötet.

Gruppe V (L_4 — L_{12}): 3 männliche Ratten. Gewicht 170—190 g. Erhalten eine einmalige Dosis von 0,8 ccm einer 0,03%igen Colchicinlösung. 9 Stunden später durch Nackenschlag getötet.

Gruppe VI (R_1 — R_8): 8 männliche Tiere. Gewicht 170—180 g. Sie werden zunächst mit Dijodthyrosin behandelt, und zwar erhält jedes Tier täglich 0,1 g Dijodthyrosin 8 Tage lang. Nach dieser „Ruhigstellung“ werden 2 Tiere als Kontrolltiere getötet (R_1 , R_2). 2 Tiere (R_3 , R_4) erhalten je 0,8 ccm einer 0,03%igen Colchicinlösung und werden 9 Stunden später durch Nackenschlag getötet. 4 Tiere (R_5 , R_6 , R_7 , R_8) erhalten 2mal täglich je 20 mg „Prägländol-Roche“, 3 Tage hintereinander. R_7 und R_8 werden etwa 12 Stunden später durch Nackenschlag getötet. R_5 und R_6 bekommen zusammen mit der letzten Prägländolinjektion 0,8 ccm einer 0,03%igen Colchicinlösung. 9 Stunden nach dieser Injektion werden R_5 und R_6 durch Nackenschlag getötet.

In einer weiteren Gruppe wurde mit Meerschweinchen gearbeitet, die zum Teil unbehandelt, zum Teil nach Behandlung mit verschiedenen Dosen thyreotropen Hormons getötet wurden. Hier wurden nur Kernmessungen vorgenommen.

Sektionsbefunde.

Bei der Sektion aller Tiere, die mit HVL behandelt worden waren, stellten wir stets eine zum Teil sehr erhebliche Vergrößerung der Schilddrüse gegenüber Kontrolltieren fest. Wir haben uns bei diesen Kontrollen nicht auf die 4 in der Gruppe I zu Kernmessungen herangezogenen Tiere beschränkt, sondern haben an anderen zum Teil auch älteren Ratten immer wieder festgestellt, daß die Schilddrüsen dieser Tiere sichtlich kleiner waren. Deutlich fiel bei manchen Tieren die zum Teil erhebliche Vergrößerung der Nebennieren auf. Bei den männlichen Tieren waren stets die Samenblasen gegenüber den Kontrolltieren vergrößert, während an den Hoden keine Größenunterschiede festgestellt werden konnten. Von den 2 weiblichen Tieren der Gruppe IV war das eine gravide, während beim anderen Tier eine erhebliche Verbreiterung und ödematöse Durchtränkung der Uterushörner und eine Vergrößerung der Ovarien festzustellen war. Die Hypophysen sämtlicher Tiere zeigten keine wahrnehmbaren Veränderungen. Auch hinsichtlich der Größe der anderen innersekretorischen Organe waren bei behandelten und unbehandelten Tieren Unterschiede nicht erkennbar. Alle inneren Organe zeigten keine besonderen Veränderungen.

Kernmessungen.

In der Abb. 1 ist das histologische Bild einer Schilddrüse dargestellt, wie wir sie im Durchschnitt bei allen unseren „Ruhetieren“ gefunden

haben, also bei den Tieren, die nicht mit HVL-Hormon behandelt worden waren. Die Schilddrüsen dieser Kontrolltiere haben wir hinsichtlich des histologischen Befundes nicht nur bei den zu Kernmessungen verwandten Tieren der Gruppe I (L_{31} — L_{34}), sondern an zahlreichen Tieren der Vorversuche nachgeprüft. Wir haben uns davon überzeugt, daß wesentliche Abweichungen von dem in Abb. I dargestellten Befund nicht vorkamen.

Man erkennt histologisch ein ziemlich hohes Epithel, die Kerne sind zum Teil dicht, zum Teil aufgelockert und blasig. Kolloid ist in den

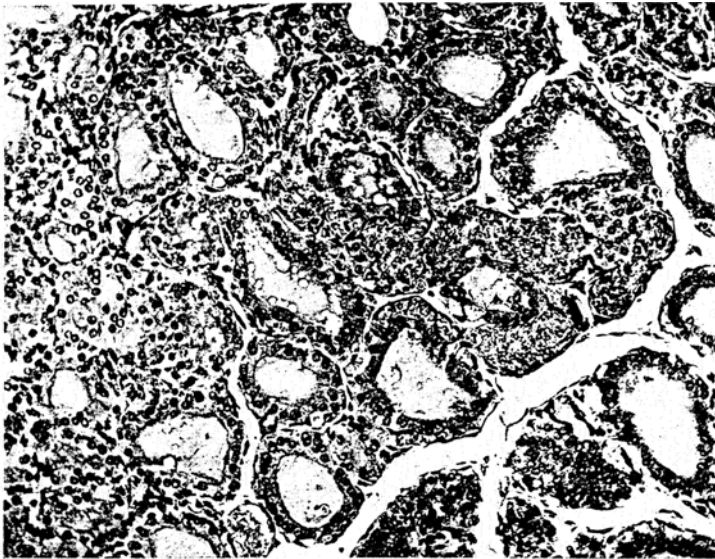


Abb. 1. Histologisches Bild der Schilddrüse einer unbehandelten Kontrollratte (L_{31}). Regelkerngröße $D = 5,9$. Vergr. 170fach.

Follikeln überall vorhanden. Am Rande des Kolloids sieht man jedoch vielfach tröpfchenförmige Aussparungen. Man würde also, ausgehend von einer kolloidreichen Ruheschilddrüse mit niedrigem Epithel hier von einer mittelstarken Aktivierung sprechen. Derartige Tiere als Ausgangstiere für die Testmethode nach *Junkmann-Schoeller*²³ zu verwenden, würde überall und mit Recht auf Ablehnung stoßen.

In der oben angegebenen Weise haben wir nun bei 4 solchen Tieren Kernmessungen vorgenommen (Gruppe I). Dabei ergaben sich die in der Tabelle 1 aufgeführten Werte. In der Tabelle finden sich in der oberen waagerechten Reihe mit $D = 3,75$ — $6,75$ die arithmetischen Mittel der größten Breiten- und Längsdurchmesser der Kerne in μ angegeben. In der linken Längsspalte sind die einzelnen Fälle (L_{31} — L_{34}) untereinander aufgeführt. Die in den Spalten unter den einzelnen Kerngrößen ($3,75$ — $4,0$ — $4,25$ usw.) angegebenen Zahlen sind die Hundertsätze der in

Ta.

Tier	3,75	4,0	4,25	4,5	4,75	5,0	5,25
L ₃₁	—	0,4	2,2	10,2	17,4	23,1	19,9
L ₃₂	0,2	0,6	2,2	14,1	14,1	22,8	17,9
L ₃₃	—	0,4	0,8	3,1	7,6	20,0	22,2
L ₃₄	—	0,8	2,0	4,7	6,1	11,6	26,2

Prozentuale Verteilung der Kerngrößen der Schilddrüsenepithelien bei den
D = 5,0 und 5,25 (V = D³ = 125—144).

der Tabelle ganz rechts aufgeführten Gesamtkernmessungen bei jedem einzelnen Fall.

Wir erschen daraus, daß z. B. bei L₃₁ von 441 Kernen 23,1% unter D = 5,0 fallen. Die „Regelkerngröße“, d. h. die Kerngröße, in der die meisten Kerne unter den ausgemessenen zu finden sind, liegt für L₃₁ also bei D = 5,0. Die entsprechenden Werte für L₃₂—L₃₄ sind D = 5,0—5,25—5,25. Diesen Werten entsprechen Kernvolumina (V = D³), die bei 125 bzw. 144 liegen. Die folgenden Tabellen 2—6 sind nach den gleichen Gesichtspunkten aufgestellt.

Die für L₃₁—L₃₄ gefundenen Werte entsprechen also den Regelkerngrößen bei völlig unbehandelten Kontrolltieren. Daß Größenunterschiede bei den einzelnen Tieren in geringer Breite vorhanden sind, nimmt nicht weiter wunder. Sie können zum Teil daran liegen, daß das eine Tier doch eine etwas stärker aktivierte Schilddrüse hat als das andere, wenngleich das in histologischen Übersichtsbildern nicht zu erkennen ist. Andererseits aber wollen wir daran denken, daß auch diese Methode noch verhältnismäßig grob ist und daß deswegen derartige Fehler vorkommen werden. Diesen Unterschieden brauchen wir große Bedeutung jedoch nicht beizulegen, weil der Abstand zwischen den jeweils gewählten Kernklassen nur D = 0,25 μ beträgt, also außerordentlich klein gewählt ist. Bewußt haben wir die Abstände derart eng gelegt, um möglichst genau feststellen zu können, wie die Methode arbeitet und in welchen kleinsten Zwischenräumen sich die Kernklassen verschieben.

In der Abb. 2 ist das histologische Bild der Schilddrüse eines Tieres dargestellt, das mit HVL-Hormon behandelt worden ist. Es handelt sich um L₂₇ aus der Gruppe II. Vergleichen wir dieses Bild mit der Abb. 1 (L₃₁), so ergeben sich erkennbare Unterschiede. Man sieht, daß die Follikel sehr viel zellreicher geworden sind, daß ein Lumen kaum noch besteht. Kolloid ist nur noch in geringen Mengen zentral in den Follikeln vorhanden, während bei dem unbehandelten Tier L₃₁ (Abb. 1) die Follikel noch sehr kolloidreich waren. Wir können also nach dem histologischen Befund von einer deutlich stärkeren Aktivierung bei L₂₇ sprechen.

Tabelle 2 gibt uns Auskunft über die Kerngrößen bei den Tieren der Gruppe II. Die Regelkernklassen liegen hier bei D = 5,75—6,0—6,0—5,5.

belle 1.

5,5	5,75	6,0	6,25	6,5	6,75	Gemessene Kerne
18,3	4,0	2,7	1,3	—	—	441
12,3	9,4	5,4	1,0	—	—	512
22,1	11,2	8,0	2,6	1,5	0,2	525
24,1	18,4	5,2	1,0	0,3	—	542

Tieren der Gruppe I (unbehandelte Kontrolltiere). Regelkernklassen zwischen Näheres s. Text!

Wir sehen also, insbesondere an den später noch zu besprechenden Kurven, wie die Kerne der Schilddrüsen in eine höhere Kernklasse

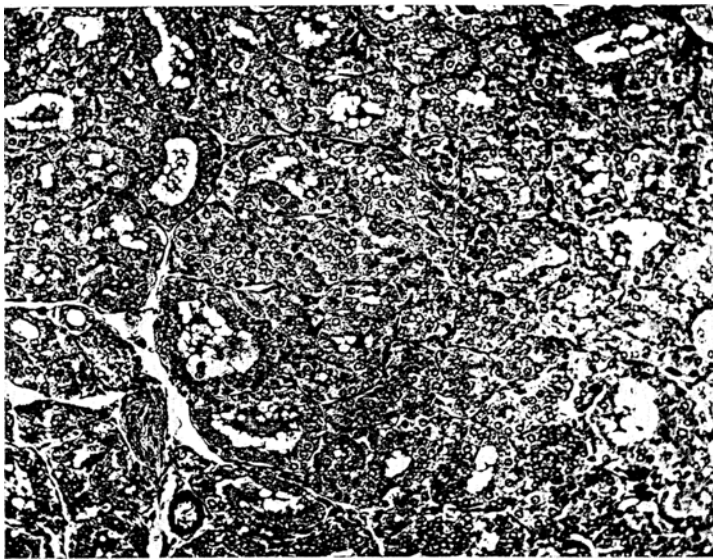


Abb. 2. Histologisches Bild der Schilddrüse einer Ratte, die täglich mit 50 mg HVL-Extrakt, 3 Tage lang, behandelt worden ist (L_{27}). Regelkerngröße $D \approx 5,75$.

hingewachsen sind. Bevor wir die Bedeutung dieser Befunde besprechen, sei zunächst über das Ergebnis der Messungen in den anderen Gruppen berichtet.

Gruppe III (L_{21} — L_{26}) und Gruppe IV (L_{35} — L_{39}) können zusammen besprochen werden, weil hier neben einer durchgeführten HVL-Behandlung auch noch Colchicin gegeben wurde. Wir haben oben erwähnt, daß wir mit Colchicin Kernteilungsstudien anstellen wollten und prüften hiermit gleichfalls, ob Colchicin, in der oben angegebenen Weise von uns angewandt, irgendeinen Einfluß auf die Kerngrößen nach Gaben von HVL-Extrakt ausübt. Wir sehen in den Tabellen 3 und 4 das Ergebnis dieser Messungen zahlenmäßig dargestellt und erkennen, daß *das Colchicin*

Ta-

Tier	3,75	4,0	4,25	4,5	4,75	5,0	5,25	5,5
L ₂₇	—	—	—	0,4	3,0	6,2	10,3	18,8
L ₂₈	—	—	—	—	1,0	2,2	6,8	13,1
L ₂₉	—	—	—	—	0,3	1,2	4,2	8,6
L ₃₀	—	—	—	0,7	2,3	5,4	16,1	27,8

Prozentuale Verteilung der Kerngrößen der Schilddrüsenepithelien bei den
D = 5,5 und 6,0 ($V = D^3 = 166-216$).

Ta-

Tier	3,75	4,0	4,25	4,5	4,75	5,0	5,25	5,5
L ₂₁	—	—	0,9	0,5	0,7	4,8	10,5	18,4
L ₂₂	—	—	—	0,2	—	0,4	3,0	6,3
L ₂₃	—	—	—	—	0,4	2,7	4,0	11,7
L ₂₄	—	—	—	0,2	0,6	6,1	11,0	24,2
L ₂₅	—	—	0,4	0,7	4,9	8,6	13,3	19,4
L ₂₆	—	—	—	0,4	0,6	4,0	7,7	13,7

Prozentuale Verteilung der Kerngrößen der Schilddrüsenepithelien bei den
klassen zwischen D = 5,75 und 6,25

Ta-

Tier	3,75	4,0	4,25	4,5	4,75	5,0	5,25	5,5
L ₃₅	—	—	—	0,6	1,8	3,1	5,3	11,3
L ₃₆	—	—	0,2	0,5	3,3	5,4	8,6	14,4
L ₃₇	—	—	—	—	0,5	4,2	9,2	16,7
L ₃₈	—	—	—	0,7	0,9	5,9	11,6	22,5
L ₃₉	—	—	—	0,1	0,7	2,5	11,0	17,9

Prozentuale Verteilung der Kerngrößen der Schilddrüsenepithelien bei den
kernklassen zwischen D = 5,75

auf die meßbaren Kerngrößen keinen Einfluß hat. Die Regelkernklassen von Gruppe III (L₂₁—L₂₆) liegen, wie aus Tabelle 3 ersichtlich, bei D = 5,75—6,25—6,0—5,75—5,75—6,0. Für Gruppe IV (L₃₅—L₃₉) ergeben sich folgende Regelkerne: D = 6,0—5,75—5,75—5,75—5,75.

Wir stellen fest, daß bei diesen Gruppen III und IV gleichfalls die Regelkernklassen bei höheren Werten liegen. Auch hier schwanken diese insgesamt um $0,5 \mu$ zwischen größtem Wert bei L₂₂ ($D = 6,25 \mu$) und kleinstem bei mehreren Tieren ($D = 5,75 \mu$). In Analogie zu dem bei der Gruppe I Gesagten, dürfen wir annehmen, daß diese Schwankungen die gleichen Ursachen haben. Wir kommen nach diesen Befunden zu dem Ergebnis, daß nach Gaben von HVL-Hormon die Durchmesser der Regelkernklassen der Schilddrüsenepithelien um durchschnittlich $0,75-1 \mu$ höher liegen als die der nicht vorbehandelten Kontrollen. Es ergibt sich

belle 2.

5,75	6,0	6,25	6,5	6,75	7,0	7,25	7,5	Gemessene Kerne
39,2	14,5	9,6	5,3	1,8	—	—	—	472
17,4	24,6	14,3	11,2	6,3	2,1	0,8	0,2	488
15,5	31,0	17,8	14,3	6,4	0,8	0,2	—	512
21,2	11,4	6,3	4,2	3,8	0,9	—	—	496

Tieren der Gruppe II (behandelt mit HVL-Extrakt). Regelkernklassen zwischen Näheres s. Text.

belle 3.

5,75	6,0	6,25	6,5	6,75	7,0	7,25	7,5	Gemessene Kerne
19,5	17,9	13,1	7,9	3,5	1,3	1,2	1,1	532
15,5	20,6	25,5	17,9	8,1	2,0	1,3	—	503
18,5	22,5	18,7	11,3	5,4	2,5	1,8	—	443
26,5	15,6	8,3	4,6	1,7	0,7	0,4	—	408
19,4	17,6	7,3	5,0	1,8	0,2	0,7	—	381
19,0	19,9	18,0	10,5	3,4	1,3	0,4	0,2	466

Tieren der Gruppe III (behandelt mit HVL-Extrakt und Colchicin). Regelkern- ($V = D^3 = 190-244$). Näheres s. Text.

belle 4.

5,75	6,0	6,25	6,5	6,75	7,0	7,25	7,5	Gemessene Kerne
17,6	25,4	16,3	11,2	7,4	3,2	0,6	—	412
22,8	17,8	12,3	6,7	3,1	0,9	—	—	508
26,2	17,8	15,0	6,5	3,2	0,6	—	—	476
23,0	16,8	8,8	4,7	2,4	0,7	1,6	—	421
24,1	21,4	15,0	4,3	0,7	1,0	1,3	1,2	550

Tieren der Gruppe IV (behandelt mit „Prägländol-Roche“ und Colchicin). Regel- und 6,0 ($V = D^3 = 190-216$).

weiterhin, daß das in der oben angegebenen Weise von uns angewandte Colchicin keinen Einfluß auf die Kerngrößen hat, wie aus den Ergebnissen der Gruppe II einerseits und der Gruppen III und IV andererseits zu entnehmen ist. Zur Erhärtung dieser Feststellung behandelten wir in Gruppe V gewöhnliche Kontrollratten ($L_{40}-L_{42}$) mit je 0,8 ccm 0,03% iger Colchicininlösung, töteten die Tiere nach 9 Stunden und fanden, wie aus Tabelle 5 hervorgeht, Regelkernklassen, die denen der unbehandelten Kontrolltiere der Gruppe I ($L_{31}-L_{34}$) entsprachen.

Die bisherigen Befunde zeigen uns also mit großer Deutlichkeit, daß auch nach verhältnismäßig kleinen Dosen von HVL-Hormon Kernveränderungen in den Schilddrüsenepithelien auftreten, die wir im histologischen Bild nicht sicher erkennen können.

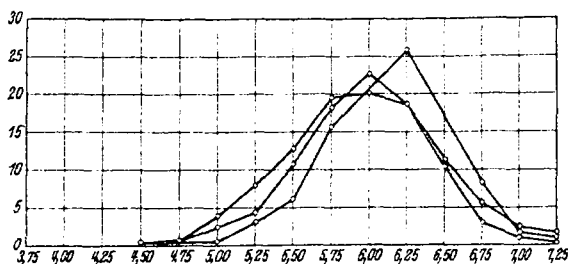
Es ist eine bekannte Tatsache, daß in der aktivierten Schilddrüse die Kerne der Follikelepithelien groß und blasig werden. Diese von uns

Ta-

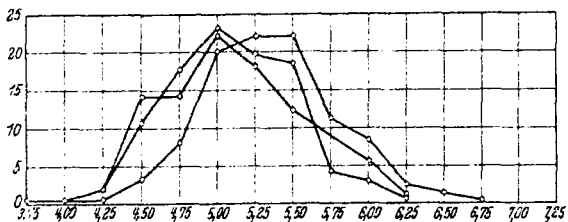
Tier	3,75	4,0	4,25	4,5	4,75	5,0	5,25	5,5
L ₄₀	—	0,3	0,7	5,8	20,5	24,5	17,6	14,3
L ₄₁	—	0,5	3,6	7,2	16,1	25,0	24,1	11,6
L ₄₂	0,6	2,5	6,5	14,4	13,2	27,7	20,7	17,3

Prozentuale Verteilung der Kerngrößen der Schilddrüsenepithelien bei den
($V = D^3 = 125$).

durch Kernmessungen objektiv sichergestellte Beobachtung, das Auftreten höherer Kernklassen bei den mit HVL-Hormon behandelten



Kurve 1. Graphische Darstellung der Kerngrößen der Schilddrüsenepithelien von 3 mit HVL-Hormon behandelten Tieren (L₂₂, L₂₃, L₂₄). Abszisse: Kerndurchmesser D in μ . Ordinate: Anzahl gleicher Kerngrößen, prozentual zur gesamten ausgemessenen Kernzahl. Regelkerngrößen $D = 6,25-6,0-6,0$.



Kurve 2. Graphische Darstellung der Kerngrößen der Schilddrüsenepithelien von 3 unbehandelten Tieren (L₃₁, L₃₂, L₃₃). Regelkerngrößen $D = 5,0-5,0-5,25$.

Tieren, ist als Ausdruck einer Funktionssteigerung jeder einzelnen Zelle anzusehen, wobei besonders zu betonen ist, daß diese Funktionssteigerung aus dem histologischen Schilddrüsenbild nicht sicher abgelesen werden kann.

In den Kurven 1 und 2 bringen wir in graphischer Darstellung die Kerne der Schilddrüsenfollikel von 3 unbehandelten und unmittelbar darunter von 3 mit HVL-Hormon und Colchicin behandelten Tieren. Daneben sehen wir in den Abb. 3 und 4 Kerngrößen von behandelten und unbehandelten Tieren, wo-

bei insbesondere die Größenverhältnisse sehr deutlich zum Ausdruck kommen.

Zu den bisherigen Untersuchungen haben wir als Ausgangstiere Ratten angewandt, die nicht vorbereitet waren. Trotz der gewöhnlichen für Hormonauswertung ungeeigneten Kost haben wir mit der angegebenen Methode der Kernmessung deutliche Aktivierungsunterschiede feststellen können. Nach diesen Versuchen, die die Behauptung früherer Untersucher, daß die Ratte für die Auswertung des thyreotropen Hormons ungeeignet sei, entkräftet, haben wir weitere Untersuchungen angestellt,

Tabelle 5.

5,75	6,0	6,25	6,5	6,75	7,0	7,25	Gemessene Kerne
8,8	2,5	0,5	0,2	—	0,3	—	510
6,3	3,2	0,8	0,8	—	—	—	412
7,3	4,6	1,9	2,1	—	—	0,2	520

Tieren der Gruppe V (behandelt mit Colchicin). Regelkernklassen bei $D = 5,0$
Näheres s. Text!

wobei als Ausgangspunkt die „ruhiggestellte“ Rattenschilddrüse gewählt wurde.

Zu diesem Zwecke behandelten wir eine weitere Gruppe von 8 Tieren (Gruppe VI) täglich mit je 0,1 g Dijodthyrosin, insgesamt 8 Tage lang. Die weitere Behandlung dieser Tiere ist vorne im Abschnitt Methodik genau angegeben.

Abb. 5 zeigt das histologische Bild der Schilddrüse von R_1 . Deutlich erkennt man die Wirkung des Dijodthyrosins. Die Follikel sind, verglichen mit den in Abb. 1 beim Normaltier gezeigten, sehr weit. Das Epithel ist flach, die Kerne sind zum Teil abgeplattet. Überall ist sehr reichlich Kolloid in den Follikeln vorhanden. Daneben sieht man in Abb. 6 das Bild einer Schilddrüse (R_8), die zunächst mit Dijodthyrosin ruhiggestellt und dann in der oben angegebenen Weise mit HVL-Hormon behandelt worden war. Man sieht im histologischen Bild deutlich die erheblichen Unterschiede. Bei R_8 erkennt man fast völligen Kolloidschwund, hohes zum Teil zylindrisches Epithel mit großen, hellen, blasigen Kernen. Gegenüber R_1 ist also ganz deutlich eine Aktivierung festzustellen, die bei histologischer Betrachtung etwa der in Abb. 1 dargestellten Schilddrüse eines normalen Ruhetieres entspricht.

In Tabelle 6 sind die Kerngrößen von R_1 — R_8 angegeben. Man sieht daraus, wie — erwartungsgemäß — die Regelkernklasse der nur mit Dijodthyrosin behandelten Tiere (R_1, R_2) mit $D = 4,75$ — $4,75$ ($D^3 = V = 107$) noch unter der der Kontrolltiere L_{31} — L_{34} liegt. Man erkennt weiter, wie auch in dieser Gruppe das Colchicin keinen Einfluß auf die Kerngrößen hat (R_3, R_4). Schließlich sieht man an der Verschiebung der Regelkernklasse nach oben, daß bei den Tieren R_5 — R_8 eine deutliche Aktivierung der Schilddrüse vorliegt, worauf in Abb. 6 bei Betrachtung der histologischen Übersichtsaufnahme von R_8 bereits hingewiesen wurde. Aufmerksam machen möchte ich noch darauf, daß bei diesen Tieren die Regelkernklassen mit $D = 5,25$ — $5,25$ — $5,25$ — $5,5$ nur um wenig höher liegen als die der Kontrollen der Gruppe I (L_{31} — L_{34}). Auch die histologischen Übersichtsbilder dieser Schilddrüsen (L_{31} : Abb. 1, R_8 : Abb. 6) zeigen ähnliche Bilder, wenngleich festzustellen ist, daß R_8 einen höheren Aktivitätsgrad aufweist als L_{31} . Man erkennt das deutlich an den unterschiedlichen Mengen des Kolloids.

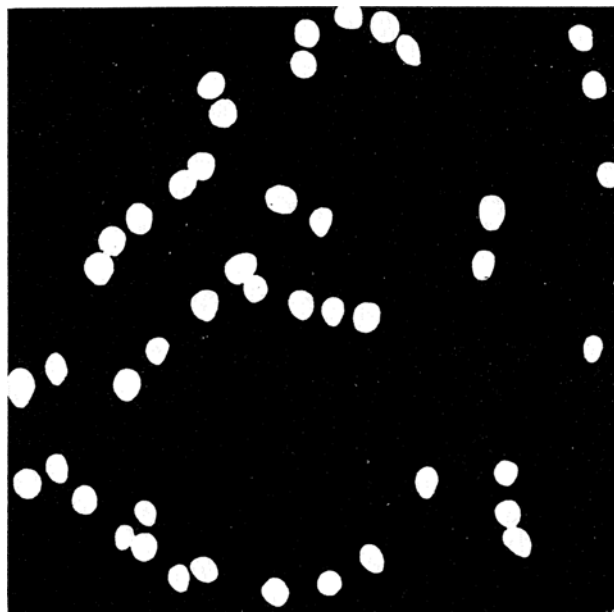


Abb. 3. Kerngrößen der Schilddrüsenepithelien einer unbehandelten Kontrollratte (L_{22}).
Regelkerngröße $D = 5,0$. Kernvolumen = 125.

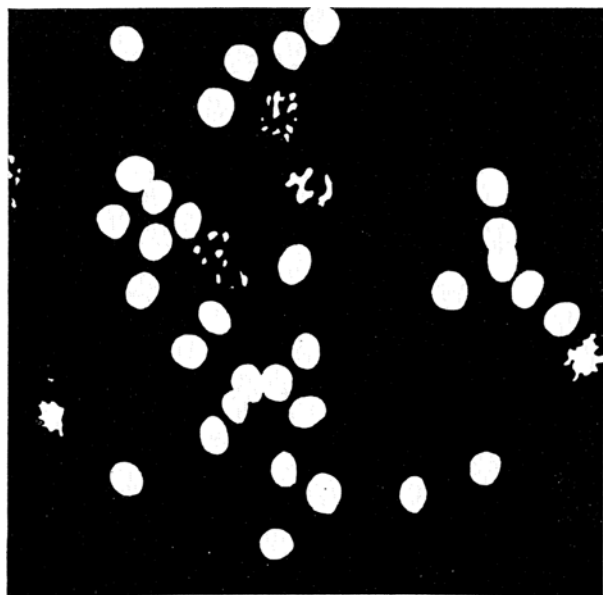


Abb. 4. Kerngrößen einer mit HVL-Hormon und Colchicin behandelten Ratte (L_{22}).
Regelkerngröße $D = 6,25$. Kernvolumen = 244. Unter den stark vergrößerten Kernen
mehrere Mitosen. (Gleiche Vergrößerung wie Abb. 3.)

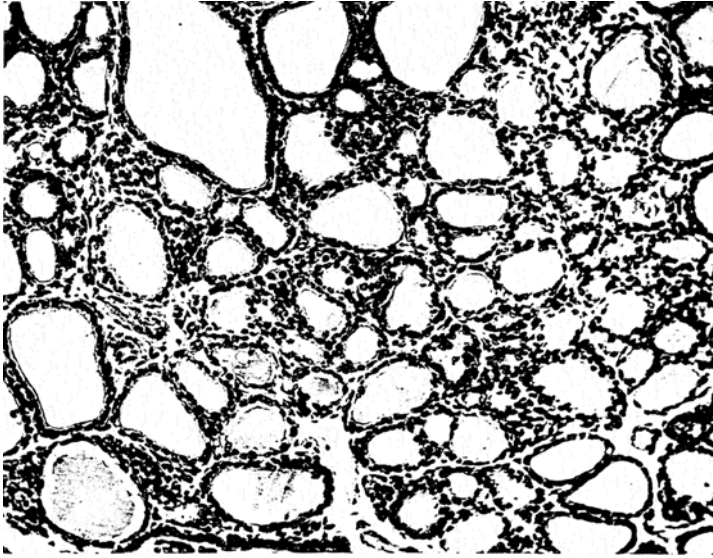


Abb. 5. Histologisches Bild der Schilddrüse einer Ratte, die 8 Tage lang mit täglich 0,1 g Dijodthyrosin behandelt worden ist (R_1). Regelkerngröße $D = 4,75$. Vergr. 170fach.

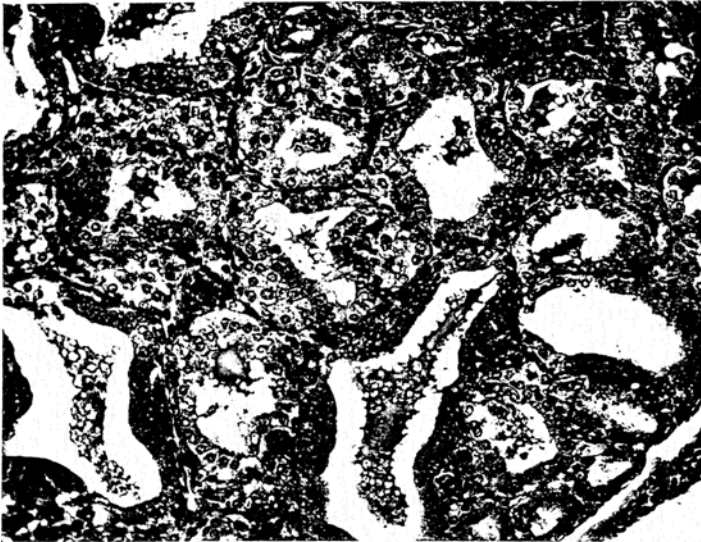


Abb. 6. Histologisches Bild der Schilddrüse einer Ratte, die zunächst 8 Tage lang täglich 0,1 g Dijodthyrosin bekommen hatte. Danach 3 Tage lang täglich 40 mg „Prägländol-Roche“. Regelkerngröße $D = 5,5$.

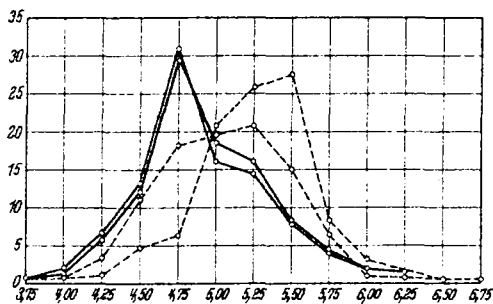
Die Größe der Kernklassen von R_5 — R_8 zeigt uns jedenfalls, daß die höchste Aktivierung, wie wir sie in den Versuchen der Gruppen III und IV

Ta-

Tier	3,75	4,0	4,25	4,5	4,75	5,0	5,25	5,5
R ₁	0,7	1,3	5,9	12,4	29,2	18,3	16,1	7,7
R ₂	0,8	2,1	6,2	13,0	30,8	16,0	14,5	8,0
R ₃	0,8	1,9	6,0	12,6	28,0	16,3	14,0	9,8
R ₄	0,5	1,4	7,1	14,2	25,3	20,6	15,1	6,8
R ₅	—	—	0,9	4,1	11,3	16,6	26,7	19,0
R ₆	—	1,6	8,0	15,8	19,1	19,3	30,4	4,0
R ₇	0,2	1,0	3,4	11,1	18,0	19,4	20,6	15,0
R ₈	0,1	0,6	1,1	4,9	6,3	20,7	25,7	27,4

Prozentuale Verteilung der Kerngrößen der Schilddrüsenepithelien bei den Tieren der Gruppe VI. (Sämtliche vorbehandelt mit Dijodthyrosin, zum Teil danach mit HVL-Extrakt behandelt.) Regelkernklassen der nur mit

gesehen haben, noch nicht erreicht ist. Da die Kernklassen von R₅—R₈ nur wenig höher liegen als die der Kontrollen von L₃₁—L₃₄, haben wir



Kurve 3. Graphische Darstellung der Verschiebung der Regelkernklassen nach Behandlung mit thyreotropem Hormon bei Tieren, deren Schilddrüse vorher mit Dijodthyrosin „ruhiggestellt“ worden war.

— R₁, R₂ behandelt mit Dijodthyrosin D = 4,75—4,75. - - - - R₇, R₈ behandelt mit Dijodthyrosin, anschließend mit HVL-Extrakt D = 5,25—5,5.

zugleich einen Einblick in die Höhe der normalerweise schon vorhandenen Aktivierung bei unseren Kontrollratten (L₃₁—L₃₄).

In der Kurve 3 ist die Verschiebung der Regelkernklasse mit Dijodthyrosin ruhiggestellter Schilddrüsen und anschließender Behandlung mit Hypophysenvorderlappenhormon graphisch dargestellt.

In einem weiteren Versuch wurde an Meerschweinchen ausprobiert, ob bei Gaben von nicht sehr hohen, aber

verschieden großen Dosen HVL-Hormons dies in der Veränderung der Kerngrößen zum Ausdruck kommt.

Wir maßen bei 2 Meerschweinchen von 250 g, die keine besondere Kost bekommen hatten, die Kerne und kamen zu einer Regelkerngröße von D = 5,0 (V = 125) bei beiden Tieren.

In Abb. 7 ist das histologische Übersichtsbild der Schilddrüse des einen Tieres dargestellt. 2 weiteren Tieren (M₃, M₄) gaben wir 0,3 ccm eines selbst hergestellten HVL-Extraktes. In der Abb. 8 ist das histologische Übersichtsbild von M₄ dargestellt. Wir sehen eine deutliche Aktivierung mit Kolloidaussparungen in Randbezirken und hohem Epithel. Die Regelkernklasse dieser beiden Tiere liegt bei D = 5,25. Also auch an den Kerngrößen kommt die Aktivierung zum Ausdruck.

belle 6.

	5,75	6,0	6,25	6,5	6,75	7,0	7,25	Gemessene Kerne
4,0	2,2	1,8	—	—	—	—	—	540
4,8	2,2	1,6	—	—	—	—	—	480
5,1	2,9	2,2	0,4	—	—	—	—	506
4,4	2,6	1,0	0,6	—	—	—	—	496
14,7	4,7	1,8	0,9	0,3	—	0,1	—	530
0,8	0,2	0,4	—	—	—	—	—	472
6,4	2,1	1,2	0,2	0,2	—	—	—	510
7,8	3,6	0,8	0,3	0,3	—	—	—	626

Dijodthyrosin behandelten Tiere (R_1, R_2, R_3, R_4) bei $D = 4,75$ ($V = D^3 = 107$).
 Regelkernklassen der danach mit HVL-Extrakt behandelten Tiere (R_5, R_6, R_7, R_8)
 bei D zwischen 5,25 und 5,5 ($V = D^3 = 144-166$). Näheres s. Text!

Abb. 9 zeigt die Schilddrüse eines Meerschweinchens (M_5), das die doppelte Hormonmenge wie M_3 und M_4 erhalten hat. Wir sehen histo-

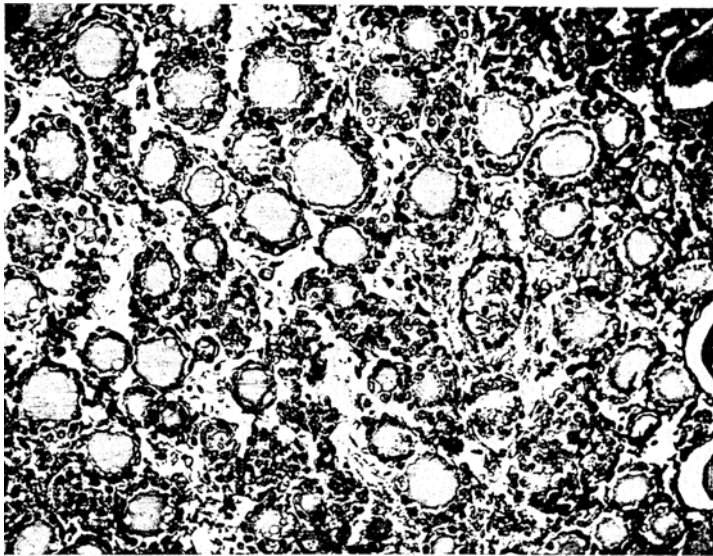


Abb. 7. Histologisches Bild der Schilddrüse eines unbehandelten Meerschweinchens.
 Regelkerngröße $D = 5,0$. Vergr. etwa 160fach.

logisch keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich des Grades der Aktivierung. In den Kerngrößen kommt er jedoch dadurch zum Ausdruck, daß die Regelkernklassen zweier derart behandelter Tiere Werte von $D = 5,5$ erreichten. Wir sehen also, daß auch bei Meerschweinchen ohne vorherige Ruhekost Auswertungen des thyreotropen Hormons möglich sind und wir erkennen weiterhin, daß dort, wo am histologischen Schilddrüsenbild keine oder nur geringe Aktivierungsunterschiede fest-

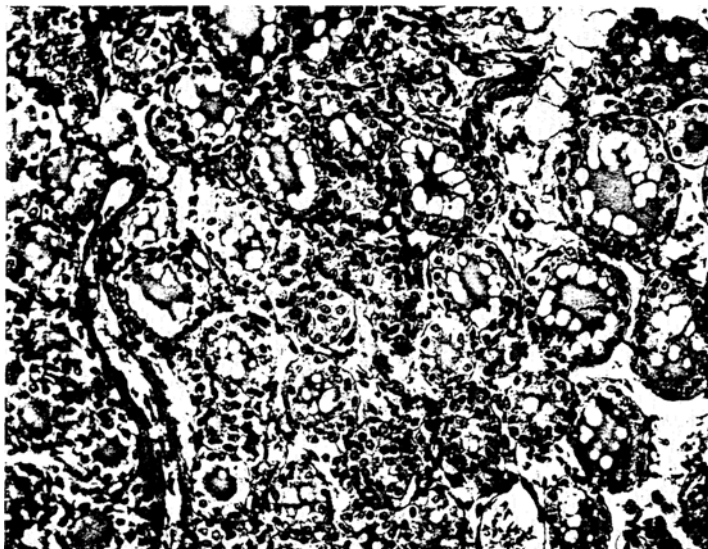


Abb. 8. Histologisches Bild der Schilddrüse eines mit HVL-Hormon behandelten Meer-schweinchens (M_4). Deutliche Aktivierung. Regelkerngröße $D = 5,25$. Vergr. etwa 160fach.

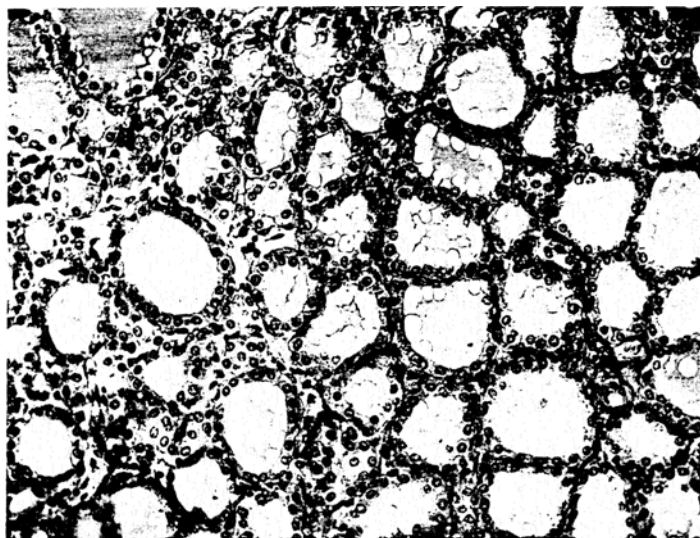


Abb. 9. Histologisches Bild der Schilddrüse eines mit HVL-Hormon behandelten Meer-schweinchens (M_4), das die doppelte Hormonmenge wie M_4 erhalten hat. Regelkerngröße $D = 5,5$. Kein wesentlicher Unterschied im histologischen Bild gegenüber Abb. 8 (M_4).

zustellen sind, sich die Regelkernklassen entsprechend der gegebenen Hormonmenge verschieben.

Abschließend können wir also hierzu bemerken, daß das, was wir bei der Ratte bereits betont haben, auch für das Meerschweinchen zutrifft. Durch Messung der Follikelkerne können wir dort den Aktivierungsgrad der Schilddrüse noch feststellen, wo die histologische Betrachtung von Übersichtsschnitten nicht zu sicheren Ergebnissen kommt.

Ergebnis der Kernmessungen.

Unter anderen Gesichtspunkten als frühere Untersucher haben wir den Versuch gemacht, mit Hilfe der Kernmessung Funktionszustände eines innersekretorischen Organs festzuhalten und aus den gewonnenen Kernveränderungen den Grad des Funktionszustandes des Organs zu bestimmen. Diese Methode ist in der Hormonforschung bisher nicht angewandt worden. Früheren Untersuchern kam es darauf an, mit Hilfe der Kernmessung Gesetzmäßigkeiten des Kern- und Zellenwachstums zu erforschen. Mit gefundenen Unterschieden hinsichtlich des Kernvolumens in normalen Organen einerseits und Geschwülsten andererseits suchte man dem Wesen des Wachstums im allgemeinen, dem der krankhaften Geschwulstzellen im besonderen näher zu kommen.

Daß Veränderungen der Kerngrößen an zahlreichen Organen vorkommen, ist von *Wermel*^{41, 42} und seiner Schule in mehreren Untersuchungen an Leber, Niere und Pankreas nach Vergiftungen experimentell sichergestellt. *Wermel* und Mitarbeiter erklären diese Veränderungen damit, daß dem Körper durch die Giftwirkung die Kraft fehlt, das Wachstum jeder einzelnen Zelle und damit ihres Kernes zu hemmen, wie das unter normalen Umständen der Fall ist. *Wermel* bekräftigt diese Ansicht damit, daß in der Gewebeskultur die nicht mehr unter dem Einfluß des Organismus stehende Zelle ebenfalls weit größere Kernwerte erreicht, weil sie hemmungslos wachsen kann. Ob diese Ansicht richtig ist, können wir nicht beurteilen.

Die von uns gefundenen Kernveränderungen in der aktivierten Schilddrüse müssen wir jedenfalls als eine aktive Leistung jeder einzelnen Zelle auffassen. Die Leistung jeder Zelle bedingt die Organleistung und damit die jeweilige Änderung des Funktionszustandes.

Wir sehen bei unbehandelten Ratten, die keine besondere Ruhekost erhalten haben, Regelkernklassen zwischen $D = 5,0-5,25$. Dies entspricht einem Kernvolumen $V = D^3$ von 125—144. Bei den mit HVL-Extrakt behandelten Tieren tritt eine deutliche Verschiebung nach oben ein, d. h. die Regelkernklasse erreicht Werte zwischen $D = 5,75-6,25$, was einem Regelkernvolumen $V = D^3$ von 190—244 gleichkommt. Wir sehen also neben einer einfachen Rechtsverschiebung zum Teil auch eine Verdoppelung des Regelkernvolumens eintreten und dürfen dementsprechend in diesen Fällen von rhythmischem Wachstum im Sinne *Jacobys* sprechen.

Deutlich sind diese Veränderungen auch bei den Tieren zu erkennen, bei denen die Schilddrüsen zuvor mit Dijodthyrosin „ruhiggestellt“ worden sind (Gruppe IV). War die Regelkerngröße bei diesen Tieren (R_1 — R_4) zunächst $D = 4,75$ ($V = 107$), so war sie nach der Behandlung mit HVL-Extrakt nach 3 Tagen auf $D = 5,25$ — $5,5$ ($V = 144$ — 166) angestiegen. Die Kerne waren etwa $\frac{1}{2}$ mal größer geworden, verglichen mit den Ausgangstieren. Es lag hier also eine deutliche Rechtsverschiebung vor.

Wir haben oben den Begriff des rhythmischen Wachstums (*Jacobj*) definiert und davon gesprochen, daß es mit Hilfe der variationsstatistischen Methode möglich sei festzustellen, auf welche Weise die Kernvergrößerung erfolgt. Aus den beigegebenen Kurven und Tabellen sehen wir, daß jeweils nur ein Gipfel vorliegt und daß bei den Tieren infolge der Hormonbehandlung zum Teil eine deutliche Rechtsverschiebung, zum Teil eine Verdoppelung der Kernvolumina festzustellen ist. Bei den mit Dijodthyrosin vorbehandelten Tieren ist diese Verdoppelung noch nicht nachzuweisen. Bei genügend langer Behandlung bzw. größeren Hormongaben wird aber gerade hier an vorher ruhiggestellten Organen mit größeren Kernvolumina zu rechnen sein.

Nach unseren Untersuchungen können wir feststellen, daß die Ratte ein durchaus geeignetes Tier zur Feststellung der Wirksamkeit thyreotropen Hormons ist. Es gelingt zwar nicht, mit der üblichen histologischen Methode zu eindeutigen Ergebnissen zu kommen, wohl aber kann man bei Kernmessungen auch die Ratte als geeignetes Tier zur Auswertung thyreotropen Hormons bezeichnen. Daß man bei solchen Auswertungen die Rattenschilddrüse durch eine geeignete Kost (*Paal*³⁰) ruhigstellen oder gar mit Dijodthyrosin (*Fremery*¹⁴) vorbehandeln muß, ist selbstverständlich.

Uns kam es hier nicht darauf an, die *Junkmann-Schoellersche* Testmethode umzustürzen. Wir wollten lediglich zeigen, daß bei einer ausgesuchten Auswertungsmethode die Ratte ebenso geeignet ist wie das Meerschweinchen. Weiterhin wollten wir feststellen, daß die Methode unseres Erachtens in mancher Hinsicht empfindlicher arbeitet als die histologischen Methoden. Die an Meerschweinchen gefundenen Kernklassenverschiebungen nach Behandlung mit verschiedenen großen Hormonmengen sind deshalb zunächst vorsichtig aufzunehmen, weil uns den Zeitumständen entsprechend nur wenig Tiere zur Verfügung standen. Die hier gefundenen Ergebnisse müssen auf breiterer Grundlage nachgeprüft werden.

Schon eben habe ich ausgeführt, daß die Kernmessungsmethode zum Nachweis der Wirksamkeit thyreotropen Hormons nicht die histologische Methode von *Junkmann* und *Schoeller* verdrängen soll. Die Auswertung durch Kernmessung beansprucht für das Aufzeichnen von etwa 500 Kernen und das anschließende Ausmessen allein etwa 4—5 Stunden, hinzu

kommt die Zeit zur genauen Einstellung des Zeichengerätes usw. Für die praktische Auswertung hat die Methode der Kernmessung also den sicheren Nachteil, daß sie zeitraubend ist. Die größere Genauigkeit der Kernmessungsmethode wird die histologische Schnellmethode von *Junkmann* und *Schoeller*, die in wenigen Untersuchungsminuten zum Ergebnis führt, nicht verdrängen können.

II. Der Einfluß des Colchicins auf die durch thyreotropes Hormon aktivierte Schilddrüse.

*Aron*⁶ hat 1936 vorgeschlagen, mit 100 MS-Einheiten thyreotropen Hormons diejenige Menge zu bezeichnen, die imstande ist, innerhalb von 24—36 Stunden nach der Injektion das Gewicht der Schilddrüse um 50—100% zu erhöhen. Weiterhin beobachtete *Aron* bei 40—45 Einheiten dieses Testes das Auftreten von Mitosen, und zwar 5—10 Kernteilungsfiguren in einem Längsschnitt durch beide Schilddrüsenlappen, während bei 100 Einheiten Mitosen in jedem Gesichtsfeld vorhanden waren. Da 40—45 Einheiten der mit ziemlicher Beständigkeit auftretende Schwellenwert für das Erscheinen der Mitosen war, maß *Aron* dieser Methode auch praktischen Wert zur Bestimmung der Wirkungshöhe thyreotropen Hormons auf die Schilddrüse bei. Auch *Kippen* und *Loeb*²⁴ und *Bastenie*⁷ haben Untersuchungen in dieser Richtung gemacht. Die ersten beiden Autoren benutzten die Mengen der auftretenden Mitosen ebenfalls als Kriterium der Wirksamkeit thyreotropen Hormons.

Durch die Forschungen *Dustins*^{10, 11} und seiner Schüler *Bastenie* und *Zylberszac*⁸ wurde das Alkaloid Colchicin als eine Substanz bekannt, die in hohem Maße auf Zellen einwirkt, die sich im Zustande der Mitose befinden oder die bereit sind, sich zu teilen. Dabei stellte *Dustin* fest, daß die Kernteilungsfiguren in bestimmten Organen in gehäuftem Maße auftraten und daß sie nicht in der sonst üblichen Weise abliefen, sondern in der Metaphase stehenblieben. Die Chromosomen sind dabei meist knäueiförmig in der Mitte der Zelle zusammengeballt, ohne daß es möglich wäre, diese Kernteilungsfiguren bei einer der bekannten Phasen unterzubringen. *Dustin* nannte dieses Stadium Stathmokinese.

Nach den obenerwähnten Beobachtungen von *Aron*, *Kippen* und *Loeb* lag es nahe, den Einfluß thyreotropen Hormons zusammen mit Colchicin auf die Schilddrüse zu studieren.

Dieser Aufgabe haben sich bisher nur *Bastenie* und *Zylberszac* unterzogen. Sie spritzten 180—200 g schweren Meerschweinchen 3mal täglich je 700 MS-Einheiten thyreotropen Hormons und beobachteten die bekannten Aktivierungserscheinungen. In 100 Follikeln oder interstitiellen Zellhaufen sahen sie durchschnittlich 17 Mitosen. Bei allen mit Colchicin allein behandelten Tieren konnten sie in 100 Follikeln nur 3 Kernteilungsfiguren feststellen. Wurden dagegen beide Methoden kombiniert, so waren durchschnittlich 119 Mitosen in 100 Follikeln vorhanden.

Diese auffallenden Befunde *Bastenies* und *Zylberszacs* lassen es also möglich erscheinen, aus dem Auftreten von Mitosen Rückschlüsse auf

den Funktionszustand der Schilddrüse zu machen. Die Kontrolle dieser Befunde ergab sich daher von selbst, insbesondere aber, um festzustellen, ob die Methoden von *Loeb* und *Aron* bzw. die der belgischen Forscher für quantitative Auswertung des thyreotropen Hormons ausreichend sind.

Wir haben deshalb an den Tieren der Gruppe I—VI, an denen wir unsere Kernmessungen durchgeführt haben, auch Mitosenzählungen vorgenommen.

Das Vorhandensein einzelner Mitosen in der nicht mit thyreotropem Hormon behandelten Rattenschilddrüse ist bekannt (*Tanabe*³⁸, *Aron*⁶ u. a.). *Tanabe* stellte fest, daß es bei besonderen Kostformen zu einer stärkeren Schilddrüsenaktivierung kommt und daß bei diesen aktivierten Schilddrüsen mehr Kernteilungsfiguren zu finden sind als bei anders ernährten Tieren. Uns interessieren hier jedoch vor allem die oben-erwähnten Veränderungen, die die belgischen Forscher *Bastienie* und *Zylberszac* feststellen konnten. Diese Befunde sind folgendermaßen zu erklären: Durch das thyreotrope Hormon kommt es zu einer Aktivierung der Schilddrüse, die ihren morphologischen Ausdruck in den bekannten histologischen Veränderungen findet. Hand in Hand mit der Veränderung jeder einzelnen Epithelzelle sehen wir Kernvergrößerungen, wie wir das im Teil I unserer Arbeit nachweisen konnten. Die Kernvolumina werden dabei zum Teil sogar doppelt so groß wie die der Ausgangstiere. Diese Vergrößerung der Kerne kann nun nicht schrankenlos weitergehen, sondern ein Teil der Kerne wird sich mitotisch teilen. Wir werden dementsprechend in einer aktivierten Schilddrüse mehr Mitosen erwarten dürfen als in einer ruhenden, was von *Aron* und *Loeb* auch nachgewiesen ist. Diese mitotische Kernteilung läuft nun in ganz bestimmten Phasen hintereinander ab. Durch *Dustin* und seine Schule ist festgestellt worden, daß das Colchicin in diesen normalen Ablauf der Mitosen eingreift und die Kernteilung hemmt.

Der Gedanke ist also naheliegend, daß man in aktivierten Schilddrüsen, die sich noch in starkem Wachstum befinden, mit Colchicin in die Kernteilung hemmend eingreift und in Fortsetzung der Gedankengänge *Arons*⁶ aus der Zahl der vorhandenen Mitosen Rückschlüsse auf die Höhe der Aktivierung macht.

Wir stellten uns also die Aufgabe, die Wirkung des Colchicins auf die Schilddrüse nachzuprüfen, um festzustellen, ob sie als Test für die Wirksamkeit thyreotropen Hormons brauchbar ist. Außerdem sind wir durch die vorausgegangenen Kernmessungen in der Lage, festzustellen, ob das stärkere Auftreten von Mitosen tatsächlich abhängig ist von einer Verschiebung der Regelkernklasse nach oben, d. h. ob wir dort, wo stärkeres Wachstum der Kerne vorhanden ist, die zahlreichsten Kernteilungsfiguren beobachten können.

Morphologische Veränderungen an der Schilddrüse nach Gaben von Colchicin.

Spritzt man einer Ratte thyreotropes Hormon und anschließend Colchicin ein, so kann man Schilddrüsenveränderungen sehen, wie sie in Abb. 10 dargestellt sind. Man erkennt dicht aneinanderliegende Follikel, die völlig kolloidfrei sind und ein hohes Epithel haben. In den Epithelien finden sich sehr große, aufgeblasene, blasse Kerne mit deutlich erkennbaren Kernkörperchen. Der auffallendste Befund ist jedoch der, daß außerordentlich zahlreiche Kernteilungsfiguren vorhanden sind. Die in Abb. 10 dargestellten Mitosen sind in ihrer Form und Verteilung über die Zelle ungewöhnlich und sehen auch anders aus als die, die *Bastien* und *Zylbersz* in ihren Abbildungen darstellen.

Es ist bekannt, daß die Kernteilungsfiguren nach Gaben von Colchicin in der Metaphase stehenbleiben. Die Chromosomen sind dabei knäueiförmig, meist verklumpt in der Zellennmitte angeordnet, Spindelbildung, Mutter- und Tochtersterne kommen nicht zur Entwicklung. Ein Teil der Zellen geht, nachdem diese pyknotisch geworden sind, schließlich zugrunde. Ein Teil der Mitosen kann sich jedoch erholen. Es kann wieder eine Spindel auftreten und die Mitose kann weiterhin ihren normalen Verlauf nehmen. In diesem Verlauf kommt es mitunter auch vor, daß eine atypische Telophase mit Bildung eines einzigen Ruhekerns oder mehrerer Kerne in einer Zelle auftreten. Wir sehen also, daß das Colchicin ein sehr abwechslungsreiches Bild in die sonst nach strengen Gesetzmäßigkeiten verlaufende mitotische Tätigkeit der Zellkerne bringen kann. Insbesondere bei der Beeinflussung von Geschwülsten mit Colchicin kann man außerordentlich vielgestaltige Bilder hervorrufen, die so weit gehen können, daß sich aus jedem einzelnen Chromosom ein neuer Kern in der Zelle entwickelt, wie es *Schairer*³⁴ am Ascitescarcinom der Maus nachgewiesen hat.

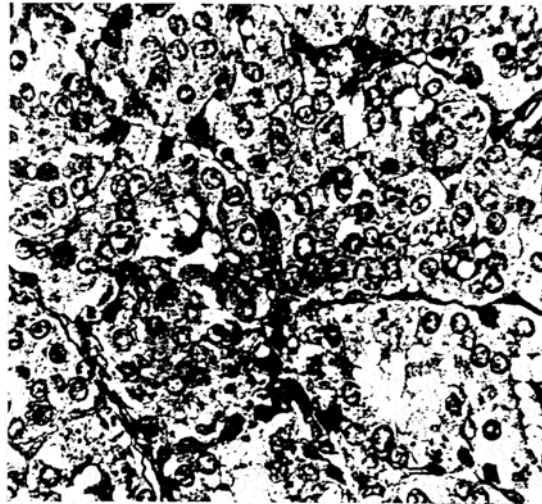


Abb. 10. Sehr zahlreiche Mitosen in einer aktivierten Schilddrüse, die mit Colchicin behandelt worden ist. Die Mitosen bestehen fast ausschließlich aus spritzerartig über die ganze Zelle verteilten Chromosomen bzw. Chromosomenstücken. Vergr. 450fach.

An normalen Organen liegen die Verhältnisse im allgemeinen doch einfacher. So bildet *Bastenie* in der mit thyreotropem Hormon und Colchicin behandelten Schilddrüse fast nur zentrale, knäueiförmig angeordnete Kernteilungsfiguren ab. Nach meinen eigenen Erfahrungen kann ich dazu sagen, daß ich solche Knäueiformen bei hochaktiven Schilddrüsen selten gesehen habe. Sie waren in wenig aktiven Schilddrüsen viel häufiger und in sehr mäßigen Mengen auch in den Schilddrüsen vorhanden, die überhaupt nicht mit HVL-Hormon, sondern nur mit Colchicin behandelt worden waren. Demgegenüber lagen bei hochgradig aktiven Schilddrüsen, die zusätzlich Colchicin bekommen hatten, ganz andere Mitosenformen vor (Abb. 10). Bei der einzelnen Kernteilungsfigur ist die Kernmembran völlig aufgelöst und die Chromosomen liegen gänzlich ungeordnet, voneinander getrennt, spritzerartig über die ganze, stark blasig aufgetriebene Zelle verteilt. Vielfach sind die sehr plumpen, kurzen Chromosomen oder Chromosomenstücke in kleinen Gruppen in der Mitte oder am Rande der Zelle angeordnet.

Im ganzen kann ich also sagen, daß auch in der hochaktivierten Schilddrüse nach Colchicinbehandlung ein erheblicher Formenreichtum der Kernteilungsfiguren vorkommen kann. Nicht die knäueiförmig zentral angeordnete Mitose, wie sie in normalen Organen am häufigsten beobachtet wird, überwiegt, sondern die spritzerartige Aufsplitterung der Chromosomen über die ganze Zelle ist die Regel. Hinsichtlich der Beeinflussung innersekretorischer Organe durch Colchicin ergibt sich noch manche Frage, deren Beantwortung jedoch nicht im Rahmen dieser Arbeit liegen kann.

Methodik.

Zur Methodik ist Neues nicht zu sagen. Wir verwandten zur Zählung der Mitosen die gleichen Tiere der Gruppen I—VI, die bereits zu Kernmessungen herangezogen wurden. Die Mitosen zählten wir entweder am Zeichenapparat aus, und zwar zusammen mit der Aufzeichnung der Kerne, oder aber wir benutzten dazu ein gewöhnliches binokulares Mikroskop.

Mitosenzählungen.

In Tabelle 7 ist die Zahl der Mitosen bei den Kontrolltieren L_{31} — L_{34} (Gruppe I) aufgeführt. In den beiden letzten Spalten haben wir nach den Ergebnissen bei den Kernmessungen die Regelkerngrößen und die Kernvolumina angegeben. Wir führen diese Werte in den folgenden Tabellen mit an, um, wie oben bereits ausgeführt, festzustellen, ob sich irgendwelche Beziehungen zwischen Menge der Mitosen und Kernvolumina ergeben. Aus der Tabelle geht hervor, daß Kernteilungsfiguren bei unseren Kontrolltieren außerordentlich selten sind. Bei 2 Tieren waren unter 441 bzw. 525 Kernen überhaupt keine Mitosen nachweisbar, während in 2 weiteren Fällen die Menge der Mitosen auf 0,2—0,4% berechnet wurde.

Tabelle 7.

Tier	Gesamt-kernzahl	Darunter Mitosen	%	Regelkern-größe = D	V = D ³
L ₃₁	441	—	—	5,0	125
L ₃₂	512	2	0,4	5,0	125
L ₃₃	525	—	—	5,25	144
L ₃₄	542	1	0,2	5,25	144

Anzahl der Mitosen bei den Tieren der Gruppe I (unbehandelte Kontrolltiere). Näheres s. Text!

Bei aktivierten Schilddrüsen steigt die Zahl der Mitosen an (Gruppe II, L₂₇—L₃₀, Tabelle 8). Diese Tatsache ist bereits von Aron festgestellt und

Tabelle 8.

Tier	Gesamt-kernzahl	Darunter Mitosen	%	Regelkern-größe = D	V = D ³
L ₂₇	472	—	—	5,75	190
L ₂₈	497	10	2,0	6,0	216
L ₂₉	524	12	2,2	6,0	216
L ₃₀	504	8	1,5	5,5	166

Anzahl der Mitosen bei den Tieren der Gruppe II (behandelt mit HVL-Extrakt). Näheres s. Text!

als Grundlage eines Testes vorgeschlagen worden. Wir sehen in Tabelle 8 die Mitosenzahlen in nur mit HVL-Hormon behandelten Schilddrüsen zwischen 1,5 und 2,2% schwanken.

In den Tabellen 9 und 10 sind nun die Tiere aufgeführt, die HVL-Hormon und Colchicin erhalten haben (Gruppe III und IV). Wir sehen

Tabelle 9.

Tier	Gesamt-kernzahl	Darunter Mitosen	%	Regelkern-größe = D	V = D ³
L ₂₁	641	109	17,0	5,75	190
L ₂₂	549	17	3,0	6,25	244
L ₂₃	524	81	15,4	6,25	244
L ₂₄	528	120	22,7	5,75	190
L ₂₅	508	127	25,0	5,75	190
L ₂₆	543	77	14,1	6,0	216

Anzahl der Mitosen bei den Tieren der Gruppe III (behandelt mit HVL-Extrakt und Colchicin). Näheres s. Text!

hier im allgemeinen einen außerordentlich starken Anstieg der Mitosen, zum Teil bis zu 25%, d. h. jeder 4. Kern befindet sich in Teilung. Auffallend ist nun das Ergebnis bei L₂₂ und L₃₅ in diesen beiden Gruppen. Hier sind Mitosenzahlen vorhanden, die kaum die bei nur mit thyreo-tropem Hormon behandelten übersteigen.

Tabelle 10.

Tier	Gesamt- kernzahl	Darunter Mitosen	%	Regelkern- größe = D	V = D ³
L ₃₅	494	22	4,4	6,0	216
L ₃₆	610	102	16,7	5,75	190
L ₃₇	542	76	14,0	5,75	190
L ₃₈	497	70	14,0	5,75	190
L ₃₉	631	81	12,8	5,75	190

Anzahl der Mitosen bei den Tieren der Gruppe IV (behandelt mit „Prägländol-Roche“ und Colchicin). Näheres s. Text!

Einen absolut sicheren Grund für diese Tatsache können wir nicht angeben. Immerhin ist folgendes auffallend: In der Gruppe III (Tabelle 9) sehen wir die kleinsten Mitosenzahlen bei den Fällen, die die größte Regelkerngröße, also das größte Kernvolumen, haben. Ganz besonders ist das bei L₂₂ der Fall, wo bei einer Regelkerngröße von 6,25 (V = 244) nur 3% Mitosen unter insgesamt 549 Kernen vorhanden sind. Demgegenüber schwanken die Mitosenmengen bei den Tieren, deren Regelkerngröße 5,75 (V = 190) beträgt, zwischen 17 und 25%. Für diese Unterschiede gibt es zwei Erklärungen. Entweder hat das Colchicin aus Gründen, die wir nicht kennen, seine Wirkung nicht entfalten können. Dieser Erklärungsversuch wird aber damit entkräftet, daß wir am Testorgan für Colchicin (Magen-Darmkanal) immer ausreichende Colchicinwirkung feststellen konnten. Es ist demnach nicht einzusehen, warum gerade die Colchicinwirkung an der hoch aktivierten Schilddrüse ausbleiben soll.

Wir glauben vielmehr, daß die Ursachen dieser eigentümlichen Erscheinung im Kernwachstum selbst liegen. Die Möglichkeit, daß die Schilddrüse nicht genügend stark aktiviert war, ist deshalb nicht gegeben, weil die Regelkerngröße 6,25 (V = 244) beträgt, also verglichen mit Kontrolltieren fast Verdoppelung vorliegt.

Die Tatsache, daß die geringe Zahl der Mitosen bei den Tieren mit hohem Kernvolumen vorhanden ist, läßt die Möglichkeit am nächstliegenden erscheinen, daß hier das Colchicin in eine Aktivierungsphase der Schilddrüse eingegriffen hat, wo die mitotische Tätigkeit bereits länger beendet war oder überhaupt noch nicht begonnen hatte. An die zuletzt genannte Möglichkeit muß besonders gedacht werden, weil gerade bei hoch liegenden Regelkernklassen die Zahl der Kernteilungsfiguren gering ist.

Betrachten wir uns das Ergebnis der Mitosenzählung bei der Gruppe IV, so sehen wir bei L₃₅ einen Fall (Tabelle 10), der ganz ähnlich liegt wie L₂₂ in Gruppe III. Hier beträgt die Gesamtzahl der Mitosen bei 494 Kernen 22, die Regelkerngröße liegt bei 6,0 (V = 216), erreicht also den höchsten Wert in der ganzen Gruppe IV. Wenn man die Kernvolumina der Gruppen III und IV miteinander vergleicht, so kommt man

zu dem Ergebnis, daß die Gesamtaktivierung in Gruppe IV etwas geringer ist als in Gruppe III.

In der Gruppe V sehen wir die Zahl der Mitosen bei nur mit Colchicin behandelten Kontrolltieren (L_{40} — L_{42} , Tabelle 11). Wir stellen fest, daß auch hier in mäßigen Mengen Kernteilungen vorhanden sind. Sie betragen 1,1—2,1%. Die hier beobachteten Mitosen bestehen, worauf oben bereits hingewiesen wurde, in der Mehrzahl aus zentral knäueiförmig angeordneten, verklumpten Chromosomen.

Tabelle 11.

Tier	Gesamt- kernzahl	Darunter Mitosen	%	Regelkern- größe = D	V = D ³
L_{40}	513	7	1,5	5,0	125
L_{41}	421	9	2,1	5,0	125
L_{42}	526	6	1,1	5,0	125

Anzahl der Mitosen bei den Tieren der Gruppe V (behandelt mit Colchicin). Näheres s. Text!

Schließlich sind in der Gruppe VI (Tabelle 12) die Tiere aufgeführt, die zunächst mit Dijodthyrosin behandelt worden waren. R_1 und R_2 zeigen als Kontrollen überhaupt keine Mitosen. R_3 und R_4 auch nach Colchicinbehandlung nicht. Bei R_5 und R_6 (behandelt mit thyreotropem

Tabelle 12.

Tier	Gesamt- kernzahl	Darunter Mitosen	%	Regelkern- größe = D	V = D ³
R_1	540	—	—	4,75	107
R_2	480	—	—	4,75	107
R_3	506	—	—	4,75	107
R_4	496	—	—	4,75	107
R_5	537	7	1,5	5,25	144
R_6	481	11	2,5	5,25	144
R_7	513	3	0,6	5,25	144
R_8	636	10	1,5	5,5	166

Anzahl der Mitosen bei den Tieren der Gruppe VI. Sämtlich zunächst mit Dijodthyrosin behandelt. Im Anschluß daran R_5 , R_6 , R_7 , R_8 mit HVL-Extrakt behandelt. Näheres s. Text!

Hormon + Colchicin) ist bereits eine leichte Wirkung des Colchicins zu bemerken. In ihrer Regelkerngröße entsprechen diese Tiere ja ungefähr den Kontrolltieren der Gruppe I (s. Tabelle 7, vgl. auch Abb. 1 und 8). Dementsprechend verhalten sich auch die Mitosen. Die Colchicinwirkung kann also deshalb nicht groß sein, weil die in dieser Gruppe zunächst mit Dijodthyrosin, dann mit thyreotropem Hormon behandelten Tiere einen kaum stärkeren Aktivierungsgrad der Schilddrüse aufweisen als die der Kontrollen der Gruppe I (L_{31} — L_{34}).

Ergebnis der Mitosenzählungen.

Wir sehen, daß bei völlig ruhiggestellten Rattenschilddrüsen Kernteilungsfiguren überhaupt nicht vorhanden sind (R_1 , R_2) und daß bei solchen Tieren — wie erwartet — eine mitosestimulierende Wirkung nach Colchicinbehandlung auch nicht vorhanden sein kann (R_3 , R_4). Wir haben weiterhin nachweisen können, daß in der normalen, unvorbehandelten, nicht auf eine besondere Kost eingestellten Rattenschilddrüse Mitosen in sehr geringen Mengen vorkommen (L_{31} — L_{34} , Tabelle 7).

Behandelt man dagegen Ratten mit thyreotropem Hormon, so nehmen die Kernteilungsfiguren zweifelsohne zu. Die Werte liegen bei 1,5—2,2% (L_{27} — L_{30} , Tabelle 8). Da diese Werte in sicher aktivierten Schilddrüsen gefunden wurden, können wir ihnen einen Wert als Wirksamkeitstest für thyreotropes Hormon deshalb nicht zusprechen, weil die Mengen der Kernteilungsfiguren viel zu gering sind. Man müßte mindestens mehrere tausend Kerne und die darunter befindlichen Mitosen heranziehen, um einigermaßen verlässliche Werte zu erhalten. Die Beobachtung *Arons*⁶, auf die oben näher eingegangen wurde, können wir also nicht teilen. Seinen Vorschlag, die Auswertung des thyreotropen Hormons an den in den Schilddrüsenepithelien auftretenden Mitosen vorzunehmen, müssen wir nach unseren eigenen Untersuchungen ablehnen.

Spritzten wir dagegen Ratten, die mit thyreotropem Hormon behandelt worden waren Colchicin, so sahen wir außerordentlich zahlreiche Mitosen auftreten. Diese entsprachen in Form und Anordnung allerdings nicht denen, die in normalen Organen beschrieben und von *Bastenie* und *Zylberszac* von der Schilddrüse abgebildet worden sind. Handelte es sich nach diesen Untersuchern vorwiegend um knäuelförmig angeordnete, im Zentrum der Zelle gelegene, verklumpte Chromosomenhaufen, so bestanden in unseren Fällen die Mitosen aus zahlreichen aufgesplitterten, über die blasig aufgetriebene Zelle spritzerartig verteilten Chromosomen bzw. Chromosomentrümmern. Diese Befunde konnten wir stets in aktivierten Schilddrüsen erheben.

In einigen Fällen sahen wir jedoch die Zahl der Mitosen bei den so behandelten Tieren nicht vermehrt. Betont sei, daß wir stets nachprüften, ob das Colchicin tatsächlich gewirkt hat. Nach *Dustin* ist das am besten am Thymus und an der Darmschleimhaut festzustellen. Ergänzend hierzu können wir bemerken, daß der Colchicintest ebenso schön am Oesophagusepithel zu beobachten ist.

Die geringe Zahl der Mitosen bei einzelnen mit thyreotropem Hormon und Colchicin behandelten Tieren erklären wir damit, daß das Colchicin in eine Ruhephase hineinkommt und infolgedessen eine Wirkung nicht entfalten kann. Wie ich bereits ausführte, stellen *Wermel* und Mitarbeiter sich vor, daß jeder Kernteilung ein Wachsen des Kerns vorausgeht und daß mit dem Abschluß dieses Wachstums die Kernteilung beginnt. Wir müssen, wenn diese Anschauung richtig ist, dement-

sprechend bei Messungen erwarten, daß vor dem Beginn der mitotischen Tätigkeit höhere Kerngrößen vorhanden sind, daß mit stärkerem Auftreten der Mitosen diese großen Kerne als Regelkerne verschwinden und, daß an ihre Stelle kleinere Kerne treten, die um in die Teilung eintreten zu können erst wieder eine entsprechende Größe erreicht haben müssen. Betrachten wir unter diesen Gesichtspunkten die in den Tabellen 9 und 10 aufgeführten Befunde, insbesondere bei den Tieren L_{21} und L_{35} , so erscheint die Möglichkeit sehr naheliegend, daß die oben theoretisch. unter besonderer Berücksichtigung der Anschauungen *Wermels* entwickelten Beziehungen zwischen Kerngröße und Kernteilung den Tatsachen entspricht.

Es lag nicht im Rahmen dieser Arbeit, die Beziehungen zwischen Kerngröße und Kernteilung einer Studie zu unterziehen. Ich glaube jedoch meine Beobachtungen mitteilen zu dürfen, damit die mit Vorsicht aufzunehmenden Schlußfolgerungen, wie sie sich aus unseren Befunden ergeben, in speziell darauf gerichteten Untersuchungen an größerem Untersuchungsgut nachgeprüft werden können. Zweckmäßig müßte man von Ruheschilddrüsen ausgehen, um mit steigenden Hormondosen mit Colchicin kombiniert das Verhältnis von Mitosenmenge zum Kernvolumen zu erforschen.

Nach den oben geschilderten Ergebnissen kommen wir zur Beantwortung der Frage, ob die Methode der Mitosenzählung mit oder ohne Beeinflussung durch Colchicin als Testmethode zur Wirksamkeitsbestimmung thyreotropen Hormons verwendbar ist.

Wir haben den Vorschlag *Arons*, die Mitosenzählung bei den nur mit thyreotropem Hormon behandelten Tieren als wirksamen Test zu gebrauchen, deshalb abgelehnt, weil die Zahl der Mitosen zu gering ist, um sicher verwertbare Ergebnisse zu erhalten. Man müßte mehrere tausend Kerne heranziehen, um diese Methodik für den genannten Zweck anwenden zu können.

Bei der Colchicinbehandlung ist die Zahl der auftretenden Mitosen vollkommen ausreichend für Testmethoden. Erreicht sie doch teilweise etwa 25% der Gesamtkerne. Alleine anwendbar ist diese Methode doch ebenfalls nicht, insbesondere wenn man mit größeren Dosen arbeitet. Es kann vorkommen, daß man bei Colchicinbehandlung einer mit thyreotropem Hormon aktivierten Schilddrüse mit dem Colchicin in eine Ruhephase hineinkommt, in der das Colchicin seine Wirkung nicht mehr entfalten kann. Die sichere Aktivierung der Schilddrüse ist jedoch auch in diesen Fällen deutlich an den veränderten Regelkerngrößen und Kernvolumina abzulesen.

Wir müssen also folgerichtig verlangen, daß an der mit HVL-Hormon und Colchicin behandelten Schilddrüse die Mitosenzählung als Test für das thyreotrope Hormon nur dann angewandt werden kann, wenn gleichzeitig Kernmessungen ausgeführt werden, weil man nur dadurch zu sicheren Ergebnissen kommen kann.

Praktisch wird damit der Vorschlag *Arons* endgültig abgelehnt werden müssen. Wie im ersten Teil meiner Arbeit bereits ausgeführt, beansprucht schon die Kernmessung sehr viel Zeit. Durch die Zählung der Mitosen würde die auf die Auswertung verwandte Zeit noch beträchtlich erhöht.

Schlußbetrachtung.

Wir haben in unseren Untersuchungen variationsstatistisch die Änderungen der Kerngrößen der Schilddrüsenfollikel nach Gaben von thyreotropem Hormon untersucht und sind dabei zu befriedigenden Ergebnissen gekommen. Das nach Behandlung von thyreotropem Hormon vergrößerte Regelkernvolumen der Follikelkerne ist als Test für die Wirksamkeit thyreotropen Hormons verwendbar, wobei besonders zu betonen ist, daß der bekannte histologische Test (*Junkmann-Schoeller*) in mancher Hinsicht an Zuverlässigkeit übertroffen wird. Die praktische Anwendung wird dieser Untersuchungsmethode in der Hormonforschung aber trotz ihrer größeren Genauigkeit deshalb versagt bleiben, weil sie zu zeitraubend ist.

Immerhin ergeben sich insofern Ausblicke, als es innersekretorische Organe gibt, deren Beeinflussung durch die Hypophyse weder morphologisch noch in Stoffwechselversuchen sicher nachgewiesen ist. Ich denke hier insbesondere an die Bauchspeicheldrüse, die seit den ersten Arbeiten von *Anselmino*, *Herold* und *Hoffmann*⁴ Gegenstand zahlreicher Untersuchungen in dieser Hinsicht gewesen ist. Vielleicht gelingt es mit dieser Methode der Kernmessung dem Problem des Wechselspiels zwischen Hypophysenvorderlappen und Bauchspeicheldrüse näherzukommen, um die Anwesenheit eines „pankreatropen Hormons“ im Hypophysenvorderlappen, wie es von den obengenannten Autoren gefunden worden ist, sicherzustellen.

Interessante Feststellungen haben wir durch unsere Colchicinuntersuchungen gemacht. Für die Praxis kamen wir zu dem Ergebnis, daß die von *Aron*⁶ vorgeschlagene Testmethode der mitotischen Tätigkeit der Schilddrüsenepithelien nur dann brauchbar ist, wenn Mitosenzählungen und Kernmessungen zusammen vorgenommen werden.

Auch hinsichtlich der durch Colchicin hervorgerufenen Veränderungen am ruhenden und aktiven Schilddrüsenkern ergeben sich hinsichtlich des Kernwachstums einerseits und mitotischer Tätigkeit andererseits interessante Fragestellungen, die wie wir bereits oben ausführten, an größerem Material nachgeprüft und ergänzt werden müssen.

Zusammenfassung.

Angeregt durch die allgemein bekannte Beobachtung, daß in der tätigen Schilddrüse neben anderen sicheren Aktivierungszeichen eine Vergrößerung der Epithelien der Schilddrüsenfollikel vorhanden ist, prüften wir experimentell, vorwiegend an Ratten, diese Beobachtung in

großem Umfange nach. Wir bedienten uns der variationsstatistischen Methode der Kernmessung in der Form wie sie von *Jakobj* u. a. zur Bestimmung der Regelkerngrößen an Organen und bei Geschwülsten angewandt worden ist. Mit Hilfe dieser Methode stellten wir fest, daß die Regelkerngröße bei Ratten, die mit thyreotropem Hormon behandelt worden waren, erheblich höher lag, ja teilweise sogar Verdoppelungen gegenüber den Kerngrößen der Schilddrüsenepithelien bei Ruhetieren zeigte. Wir gingen bei diesen Untersuchungen teilweise von unvorbehandelten Ratten aus und konnten zeigen, daß die Rattenschilddrüse entgegen den Ergebnissen früherer Untersuchungen anderer Forscher durchaus geeignet ist zur Wertbestimmung thyreotropen Hormons. Wir stellten weiterhin fest, daß die objektive Methode der Kernmessung zur Auswertung thyreotropen Hormons in mancher Hinsicht genauer ist als die gebräuchliche subjektive histologische Testmethode nach *Junkmann-Schoeller*. An den mit Dijodthyrosin vorbehandelten und „ruhiggestellten“ Schilddrüsen konnten wir unsere Untersuchungen bestätigen und gleichzeitig erhärten, daß die unvorbehandelte Rattenschilddrüse genügend verlässliche Ergebnisse gibt. Schließlich konnten wir ergänzend hierzu an Meerschweinchen zeigen, daß nach verschiedenen hohen Dosen von HVL-Hormon die Aktivierung der Schilddrüsen auch in verschiedenen Kerngrößen der Follikelepithelien zum Ausdruck kommt.

Aron hat 1936 den Vorschlag gemacht, das gehäufte Auftreten von Mitosen in den Epithelien aktivierter Schilddrüsen als Wirksamkeitskriterium für thyreotropes Hormon anzuwenden.

Wir prüften im Teil II der Arbeit diese Befunde nach und stellten fest, daß die Zahl der in der aktivierten Schilddrüse auftretenden Mitosen viel zu gering ist, als daß damit ein zuverlässiger Test ausgearbeitet werden könnte. Dagegen lag es nahe, mit dem mitosenstimulierenden Alkaloid Colchicin auf diesem Wege weiterzukommen. Wir aktivierten demzufolge Rattenschilddrüsen mit HVL-Hormon und behandelten die Tiere zusätzlich mit Colchicin. Bei den meisten so behandelten Tieren traten außerordentlich zahlreiche Mitosen auf. Bei einigen Tieren stellten wir jedoch ein vollständiges Versagen des Colchicins fest. Hier waren Kernteilungen nur in ganz geringen Mengen zu sehen. Wir deuten dieses Versagen damit, daß das Colchicin in einer Aktivierungsphase der Schilddrüse eingreift, wo zwar nach dem Ergebnis der Kernmessung eine deutliche Aktivierung vorliegt, wo hingegen eine mitotische Tätigkeit noch nicht vorhanden ist. Diese Befunde stehen im Einklang mit den Untersuchungen *Wermels*, der nachweisen konnte, daß der Kern erst dann mit der Teilung beginnt, wenn er eine bestimmte Größe erreicht hat.

Nach den geschilderten Ergebnissen ist es nicht möglich, die Anzahl der Kernteilungsfiguren in aktivierten Schilddrüsen als Test zur Auswertung thyreotropen Hormons zu verwenden, weil, wie oben angeführt, das Colchicin versagen kann. Will man diese Methode als Wirksamkeits-

test anwenden, dann ist es erforderlich, aus den angegebenen Gründen außer Mitosenzählungen Kernmessungen durchzuführen. Da die Kernmessung allein jedoch vollkommen ausreicht, darf man die Methode der Mitosenzählung zur Auswertung thyreotropen Hormons endgültig ablehnen.

Auch die Methode der Kernmessung wird praktisch keine Anwendung finden können, weil sie zu zeitraubend ist und weil die histologische Auswertung nach *Junkmann-Schoeller* für die Praxis vollkommen ausreicht.

Die Methode der Kernmessung kann jedoch als Forschungsmethode zur Feststellung des Einflusses des Hypophysenvorderlappens auf andere innersekretorische Organe Anwendung finden, soweit es sich um morphologische Veränderungen handelt. Die Zuverlässigkeit dieser Methode ist von uns an der Rattenschilddrüse sicher nachgewiesen.

Untersuchungen in dieser Hinsicht zur Feststellung des Einflusses der Hypophyse auf die Bauchspeicheldrüse führen wir zur Zeit aus.

Literaturverzeichnis.

- ¹ *Adler*: Arch. Entw.mechan. **39**, 21 (1914). — ² *Allan*: Science (N. Y.) **44**, 735 (1916). — ³ *Anderson* und *Collip*: Amer. J. Physiol. **82**, 611 (1934). — ⁴ *Anselmino*, K. J., L. Herold und Fr. Hoffmann: Klin. Wschr. **1933 II**, 1245. — ⁵ *Aron*, M.: C. r. Soc. Biol. Paris **102**, 682 (1929). — ⁶ *Aron*, M.: C. r. Soc. Biol. Paris **123**, 250 (1936). — ⁷ *Bastenie*, P.: Rev. franç. Endocrin. **14**, 119 (1936). — ⁸ *Bastenie*, P. et S. Zylberszac: Arch. internat. Méd. expér. **12**, 183 (1938). — ⁹ *Bomskov*, Chr.: Methodik der Hormonforschung. Bd. 1, 1937; Bd. 2, 1939. — ^{9a} *Bomskov* u. *Sladovic*: Klin. Wschr. **1940 I**, 612. — ¹⁰ *Dustin*, M. A. P.: Archives Anat. microsc. **25**, 37 (1929). — ¹¹ *Dustin*, M. A. P.: C. r. Assoc. Anat. **1938**. — ¹² *Eitel* u. *Loeser*: Arch. f. exper. Path. **167**, 381 (1932). — ¹³ *Eitel* u. *Loeser*: Klin. Wschr. **1932 II**, 1748. — ¹⁴ *Fremery*: Zit. nach *Bomskov*: Methodik der Hormonforschung, Bd. 1, S. 157, 1937. — ¹⁵ *Friedgood*: Bull. Hopkins Hosp. **54**, 51 (1934). — ¹⁶ *Haumeder*: Z. Krebsforsch. **40** (1934). — ¹⁷ *Hoffmann*, Fr. u. K. J. *Anselmino*: Klin. Wschr. **1933 II**, 1436. — ¹⁸ *Heidenkain*: Roux' Arch. **49** (1921). — ¹⁹ *Holden*: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **31**, 773 (1934). Zit. nach *Loeser*: Arch. f. exper. Path. **184**, 23 (1937). — ²⁰ *Jakob*: Roux' Arch. **116** (190). — ²¹ *Jakob*: Roux' Arch. **120** (190). — ²² *Jakob*: Z. mikrosk.-anat. Forsch. **38** (1935). — ²³ *Junkmann* u. *Schoeller*: Klin. Wschr. **1932 I**, 1167. — ²⁴ *Kippen* und *Loeb*: Amer. J. Pharmacol. **54**, 246 (1935). — ²⁵ *Krichewski*: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **31**, 600 (1934). — ²⁶ *Loeb*, L. and R. B. *Bassett*: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **26**, 860 (1929). — ²⁷ *Loeser*, A.: Arch. f. exper. Path. **180**, 325 (1936). — ²⁸ *Oehme*, Paul u. *Kleine*: Arch. f. exper. Path. **171**, 61 (1933). — ²⁹ *Paal*: Klin. Wschr. **1931 II**, 2173. — ³⁰ *Paal*, H. u. O. *Kleine*: Beitr. path. Anat. **91**, 322 (1933). — ³¹ *Pugley*, *Anderson*, *Collip*: Biochemic. J. **28**, 754 (1934). — ³² *Rogowitsch*: Beitr. path. Anat. **4**, 455 (1889). — ³³ *Schairer*, E.: Z. Krebsforsch. **43**, 1 (1935). — ³⁴ *Schairer*, E.: Z. Krebsforsch. **50**, 143 (1940). — ³⁵ *Schittenhelm* u. *Eisler*: Klin. Wschr. **1932 I**, 1092. — ³⁶ *Schneider* u. *Widman*: Zit. nach *Loeser*: Arch. f. exper. Path. **184**, 23 (1937). — ³⁷ *Smith*, Ph.: Amer. J. Physiol. **80**, 115 (1927). — ³⁸ *Tanabe*: Beitr. path. Anat. **73**, 415 (1925). — ³⁹ *Uhlenhuth* und *Schwarzbach*: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **26**, 149 (1929). — ⁴⁰ *Verzár* u. *Wahl*: Biochem. Z. **240**, 37 (1931). — ⁴¹ *Wermel* u. *Ignatjew*: Z. Zellforsch. **16** (1932). — ⁴² *Wermel* u. *Scherschulskaja*: Z. Zellforsch. **20** (1934). — ⁴³ *Wiesner* u. *Crew*: Zit. nach *Bomskov*.