

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Halle a. d. Saale
(Direktor: Prof. Dr. GÜNTHER HERTWIG).

KERNGIFTE UND LICHTSTRAHLUNG.
EINE STUDIE AN FROSCHSPERMIEN ZUR WIRKUNGSANALYSE
DER KERNGIFTE.

Von

KONRAD DREBINGER.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 18. April 1951.)

Inhalt.

Einleitung und Begriffsbestimmung	174
Versuchswege	176
Radiumversuche an Froschspermien	176
Bisher ausgeführte Versuche mit chemischen Agenzien an Froschspermien	177
Problemstellung	178
Eigene Untersuchungen	178
A. Beschreibung der Versuchsanordnung	178
B. Zusammenstellung aller Chemikalien, deren Einfluß untersucht wurde und ihre Formelbilder	181
C. Der Einfluß des UV-Lichtes auf die Samenfäden	183
D. Besprechung und Diskussion der Versuche zur Ergründung des Wirkungsmechanismus (Lichteinfluß)	183
1. Plasmawirkung, studiert an der Beweglichkeit und Befruchtungsfähigkeit der Samenfäden	183
2. Kernwirkung, studiert an der Entwicklungsfähigkeit normaler mit vorbehandelten Spermien befruchteter Eier	186
a) Nicht direkt kernschädigende Substanzen	186
b) Kernschädigende Chemikalien	189
c) Einfluß des UV-Lichtes	199
Schlußbetrachtung	201
Zusammenfassung der Ergebnisse	201
Literatur	204

Einleitung und Begriffsbestimmung.

Das Forschungsgebiet der Kerngifte, das früher mehr oder minder aus rein wissenschaftlichen Gründen betrieben wurde, wird heute fast in allen medizinischen Zeitschriften diskutiert. Die ersten zweckgerichteten Versuche auf diesem Gebiet galten, einen Ersatz für das kostspielige Radium zu finden zwecks Gewinnung haploidkerniger telykaryotischer Larven (19). Heute dagegen ist man bestrebt, in den Kerngiften ein Chemotherapeutikum gegen die bösartigen Gewächse, Leukämien, Hodgkin usw. zu entwickeln, da sich gezeigt hat, daß die malignen Tumoren gerade im Stadium der Zellteilung im Vergleich zu normalen Körperzellen relativ empfindlich sind (5, 10, 15, 51).

Die Entdeckung der Kerngifte geht auf Versuche von A. P. DUSTIN zurück. Er injizierte 1907 Fröschen, später jungen Mäusen zunächst Pyrrolblau, später andere Farbstoffe, namentlich Trypaflavin und beobachtete, daß in der Thymus, aber auch in anderen Organen, in denen Kernteilungen häufig sind, so in den LIEBERKÜHNSCHEN KRYPTEN des Darmes, an dem Stratum germinativum der Epidermis und den Granulosazellen der GRAAFSCHEN FOLLIKEL zahlreiche pyknotische Mitosen als Folge der Giftwirkung der injizierten Pharmaka auftraten.

Als 1934 LITS, ein Schüler DUSTINS, die Wirkung des Colchicins als Kerngift gefunden hatte, unterschied DUSTIN unter den bis dahin bekannten Kerngiften ganz generell 2 Typen, den Colchicintyp und den Trypaflavintyp. Der Colchicintyp zeigt kurze Zeit post injectionem eine starke Kernteilungswelle, der nach einigen Stunden eine ausgedehnte Kernpyknose folgt. Beim Trypaflavintyp dagegen fehlt die primäre Mitosewelle, und es kommt sofort zu ausgedehnten pyknotischen Kerndegenerationen.

Auch an der Zwiebelwurzel lassen sich diese beiden Typen gut unterscheiden (2). Der Colchicintyp zeichnet sich dabei durch die sog. „Keulreaktion“ aus, d. h. die Wurzelspitzen werden kolbig aufgetrieben, wohingegen diese Erscheinung bei den Kerngiften des Trypaflavintypus vermißt wird.

LUDFORD untersuchte diese von DUSTIN als karyoklastische Gifte („Poisons caryoclasiques“) bezeichneten Substanzen erstmals an Gewebekulturen und prägte auf Grund seiner Beobachtungen den Begriff Mitosegifte („Mitotic poisons“). Jedoch sind an Gewebekulturen nicht alle von DUSTIN für Experimente am lebenden Tier angegebenen Substanzen als Kerngifte wirksam.

LETTRÉ will deshalb die karyoklastischen Gifte DUSTINS in 2 Gruppen einteilen, und zwar einmal „eine Gruppe, die nur am lebenden Organismus die Phänomene der Mitosegiftwirkung auslöst, also indirekt wirken“, und zum anderen „eine Gruppe, die im Organismus und an der isolierten Zelle wirksam ist, also eine direkte Zellwirkung besitzt“, und will den von LUDFORD geprägten Namen „Mitotic poisons“ der 2. Gruppe vorbehalten lassen (32), denn er definiert Mitosegifte als „Antibiotika, die durch Reaktion mit Zellbestandteilen oder Verdrängung von Wirkstoffen, die zum System der Kern- und Zellteilung gehören, wirken (34)“.

Es ist für die Anwendung der Mitosegifte in der Medizin von wesentlicher Bedeutung, wo der Hauptangriffspunkt der Stoffe im Zellgefüge liegt bzw. welcher Wirkungsmechanismus ihnen zugrunde liegt. Zur Klärung dieses Fragekomplexes soll die vorliegende Arbeit mit beitragen. Um diese Absicht durchzuführen, ist die Wahl des Versuchsobjektes von ausschlaggebender Bedeutung.

Versuchswege.

Bisher sind folgende Methoden angewandt worden:

1. Injektion der wirksamen Stoffe in das ganze Tier (DUSTIN u. a.).
2. Untersuchung der Mitose an der Hornhaut der Urodelenlarven (POLITZER).
3. Einfluß der Pharmaka auf die Regeneration der Amphibien-schwänze (LEHMANN u. a.).
4. Einfluß auf Gewebekulturen und Ascitestumor (LUDFORD, LETTRÉ u. a.).
5. Untersuchung an verschiedenen Pflanzen, speziell an der Zwiebel-wurzel (OEHLKERS, BAUCH u. a.).
6. Einfluß auf sich bildende und auf fertige Keimzellen (O. u. G. HERTWIG).

Von diesen genannten Methoden sind zur Lösung der von mir ge-stellten Aufgabe die Samenfäden des Frosches das ideale Versuchs-objekt, denn der Kern im Samenfaden ist nur von wenig Zytoplasma umhüllt und so dem schädigenden Einfluß der zugesetzten Giftstoffe fast unmittelbar ausgesetzt. WITSCHI (58) stellte fest, daß in den Köpfen der Samenfäden von *Rana temporaria (fusca)* die Chromosomen im Prophasestadium enthalten sind und einen hohen Thymonukleinsäure-gehalt haben.

Dieses geeignete Testobjekt wurde schon von O. HERTWIG (21, 22, 23) und später von G. HERTWIG (19, 20) und P. HERTWIG (24) bei ihren Radiumversuchen benutzt, wobei sie feststellen konnten, daß die Radium-strahlen ausschließlich den Zellkern schädigen. Später wurden von den genannten Forschern auch auf chemischem Wege die Samenfäden ge-schädigt und von G. HERTWIG 1924 das Trypaflavin als besonders kern-schädigend entdeckt.

Seitdem ist dieses Testobjekt nicht wieder benutzt worden, und es erscheint verlockend, die zahlreichen seither in der Literatur als Kern- und Mitosegifte beschriebenen Chemikalien an diesem Testobjekt auf ihre Kernwirksamkeit nachzuprüfen.

Zum besseren Verständnis der Versuchsanordnung und Versuchs-ergebnisse ist eine kurze zusammenfassende Darstellung der Frosch-samenversuche von O. und G. HERTWIG unerlässlich.

Radiumversuche an Froschspermien.

Nachdem festgestellt worden war, daß die Beweglichkeit der Spermien durch den Einfluß der Radiumstrahlen nicht wesentlich eingeschränkt wurde, wurden von O. und G. HERTWIG in umfangreichen Experimenten 4 verschiedene Versuchs-serien angesetzt.

In der Serie A wurden befruchtete Froscheier auf dem Zweizellenstadium be-strahlt, in der B-Serie nur die Samenfäden vor der Befruchtung; dann wurden umgekehrt nur die unbefruchteten Eier bestrahlt (Serie C), und die letzte Serie D

umfaßt diejenigen Versuche, in denen sowohl die Eier als auch der Samen vor ihrer Vereinigung bestrahlt wurden.

Die dadurch gesetzte Schädigung war in den Versuchen A und D, wie zu erwarten, proportional der Bestrahlungsdauer, d. h. die sich entwickelnden Larven waren schwer mißbildet, oder wie O. HERTWIG es nannte, „radiumkrank“; und zwar um so stärker, je länger der weibliche und männliche Kern der Wirkung der Radiumstrahlen ausgesetzt waren.

Im Versuch B und C lagen die Verhältnisse jedoch anders. Hier war die gestörte Entwicklung nur einer relativ kurzen Bestrahlungsdauer proportional, dagegen bei längerer Bestrahlung der Keimzellen eine steigend bessere Entwicklung der Embryonen resultierte. Die besten der so gewonnenen Larven waren deutlich kürzer als die Kontrolltiere und typisch dickbäuchig. Sie erreichten eine Lebensdauer von 14—16 Tagen und starben dann infolge Bauchwassersucht.

Zur Deutung dieser Versuchsergebnisse wurde damals von O. und G. HERTWIG die Hypothese aufgestellt, daß es sich im letzten Falle um parthenogenetisch bzw. androgenetisch sich entwickelnde Embryonen handelt; mit anderen Worten, daß durch die lange Bestrahlungsdauer das Chromatin entweder des Samenfadens oder des Eikerns, je nach der Versuchsanordnung, so stark geschädigt worden war, daß das radiumkranke Chromatin sich nicht mehr vermehren kann, somit also keinen hemmenden oder störenden Einfluß auf die folgende Embryonalentwicklung ausüben kann.

Die graphische Darstellung der Entwicklungsstörung in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer ergibt also eine Kurve mit einem anfangs ansteigenden und später wieder abfallenden Schenkel. Aus diesem Grunde wurde das Phänomen als das *Gesetz der Kurvenbildung* bezeichnet.

Die Richtigkeit dieser Hypothese fand ihre cytologisch histologische Bestätigung, indem von G. HERTWIG (17) das Schicksal des radiumbestrahlten Spermachromatins im Seeigeelei, von P. HERTWIG (24) im Froschei und von OPPERMANN (42, 43) im Forellenei untersucht und seine Ausschaltung von der Entwicklung durch intensive Bestrahlung cytologisch nachgewiesen wurde.

Die relativ kurze Lebensdauer der auf diese Weise erzeugten haploidkernigen parthenogenetischen Larven sieht G. HERTWIG (18) einmal in einer vielleicht nicht vollständigen Ausschaltung des Radiumchromatins, und zum anderen und hauptsächlichsten in einer „durch die haploide Beschaffenheit des Kernapparates verminderte „Wachstumsenergie der Embryonalzellen“.

Bisher ausgeführte Versuche mit chemischen Agenzien an Froschspermien.

Um entsprechende Veränderungen im Idioplasma der Samenfäden nicht nur auf physikalischem Wege, sondern auch durch chemische Agenzien herbeizuführen, behandelte O. HERTWIG (23) die Samenfäden mit einer Anzahl chemischer Mittel (Eosin, Methylenblau, Rubin [Fuchsin], ferner Atoxyl, Sublimat, Äthyl- und Methylalkohol, Chloralhydrat und Strychninum nitricum). Von all diesen Substanzen konnten nur durch Methylenblau ähnliche Veränderungen an den Embryonen erzielt werden, wie sie in den Radiumversuchen auftraten. Jedoch wurde der Kern auch durch Chloralhydrat und Strychninum nitricum geschädigt.

Auch diese chemischen Substanzen folgten in ihrer Wirkungsweise dem Gesetz der Kurvenbildung, wie G. und P. HERTWIG (20) nachweisen konnten. Strychninum nitricum war in diesen Versuchen unwirksam.

Durch den damals bestwirksamsten Stoff Methylenblau wurde jedoch die Beweglichkeit der Spermatozoen, die ja letzten Endes eine Funktion des Protoplasmas ist, wesentlich eingeschränkt. Außerdem findet man bei Methylenblau noch

eine Eigentümlichkeit. Überließ man nämlich die Spermien der Methylenblauwirkung für eine Zeitdauer von 16—18 Std, wie es bei Versuchen am Seeigel geschah, so waren zu dieser Zeit häufig alle Spermien abgestorben. Aber in 15 Fällen konnte man neben einer großen Anzahl starrer Samenfäden noch einige gut bewegliche Spermatozoen erkennen. Auch war mit dieser Samenflüssigkeit, besonders nach Zusatz einiger Tropfen 5%igen Alkohols, der die Beweglichkeit noch steigert, ein relativ gutes Befruchtungsergebnis möglich.

Es konnte nun die eigenartige Feststellung gemacht werden, daß sich in diesen Versuchen ein bedeutend größerer Teil normaler Tiere entwickelte, als es bei den übrigen Methylenblauversuchen der Fall war. Daß das Spermachromatin nach der Befruchtung wirklich voll funktionstüchtig war, konnte histologisch gesichert werden. Die erste Ei-Furchungsteilung bei den mit Methylenblauspermien befruchteten Eiern nahm jedoch längere Zeit in Anspruch, als es bei den Kontrollen der Fall war. Darum wurde für diese methylenblauresistenten Spermien „die Vermutung ausgesprochen, daß vielleicht eine besondere Schutzhülle das Spermachromatin vor dem schädigenden Eindringen des Methylenblau schützt“, und daß also durch die lange Behandlung eine Selektion aller methylenblauresistenten Spermien stattfand, denn bei allen Methylenblauversuchen waren immer einige völlig normale Tiere beobachtet worden.

Wegen all dieser Nachteile des Methylenblau untersuchte G. HERTWIG (19) die verschiedensten chemischen Verbindungen auf ihre kernschädigende Wirkung den Spermien des Frosches gegenüber. Es galt hierbei, einen Ersatz für das teure und schwierig zu beschaffende Radium zu finden, um die Erforschung der haploidkernigen, tely- oder arrhenokaryotischen Embryonen auf eine breitere Basis zu stellen.

Im Trypaflavin fand er dann einen Stoff, der bei minimaler Bewegungshemmung maximal kernschädigend wirkt. Die Zahl der trypaflavinresistenten Spermien war bei langen Versuchen gleich Null.

Problemstellung.

Der Zweck der vorliegenden Arbeit ist es nun, 1. die Reihe der kernschädigenden Stoffe vom Trypaflavintyp zu ergänzen, und 2. in den Mechanismus der Kerngifte näher vorzudringen. 3. Es ergab sich im Verlaufe der Untersuchungen die Notwendigkeit, die Kernwirkung des UV-Lichtes zu prüfen.

Als Versuchsobjekt diente wiederum der braune Feldfrosch *Rana fusca*.

Zur Untersuchung wurden fast nur Stoffe herangezogen, die bereits in der Literatur als Kerngifte benannt worden sind.

Die Versuche wurden im Anatomischen Institut der Universität Halle a. d. Saale vom 11. 3. bis 12. 4. 49 und vom 14. 3. bis zum 17. 4. 50 durchgeführt.

Eigene Untersuchungen.

A. Beschreibung der Versuchsanordnung.

In Vorversuchen habe ich zuerst die noch gerade mögliche Grenzkonzentration der zu untersuchenden Substanzen, bei der die Spermien noch längere Zeit gut beweglich bleiben, um eine Befruchtung zu ermöglichen, ermittelt.

Der Hoden eines Froschmännchens von *Rana fusca* wurde in Teichwasser, dem 0,3% Kochsalz zugesetzt war, zerzupft. Froschringerlösung erwies sich in bezug auf die Beweglichkeit wesentlich unzweckmäßiger.

Auf diese Weise kann man eine ziemlich konzentrierte Samenmilch herstellen. Zwei Tropfen dieser Samenmilch habe ich nun mit jeweils 5 Tropfen der zu prüfenden Lösung in einem Blockschälchen versetzt und innig miteinander verrührt. Kleine Hodenstückchen wurden sorgfältig entfernt, so daß alle Samenfäden der Giftlösung gleichmäßig ausgesetzt waren.

Eine schon makroskopisch sichtbare Agglutination der Spermaflüssigkeit trat in der Regel in einer Verdünnung 1 : 100 bis 1 : 1000 auf. Die 10fach stärkere Verdünnung der gerade noch agglutinierenden Konzentration war meist die gebrauchte Lösung. Die ausreichende Beweglichkeit wurde unter dem Mikroskop beurteilt.

Die Spermien überließ ich dann in den in obigen Vorversuchen bestimmten Konzentrationen etwa 50—70 min der Einwirkung der Giftlösung. Mit den so behandelten Spermien wurden dann Eier von *Rana fusca* besamt, nachdem ich vorher sicherheitshalber noch jedesmal die Beweglichkeit der Spermien im Mikroskop überprüft hatte.

Die Eier wurden mittels eines Glasstabes aus dem Eileiter eines Weibchens, das durch Dekapitation mit anschließender Rückenmarkerstörung getötet war, entnommen und möglichst einzeln mit dem vegetativen Pol nach unten auf einen gewöhnlichen Objektträger aufgesetzt. Jeden Objektträger beschnitt ich mit etwa 40 Eiern.

Dann wurde die Samenmilch mit Teichwasser, da gewöhnliches Leitungswasser durch seinen Chlorgehalt die Beweglichkeit der Spermien wesentlich einschränkte, auf das etwa 20fache verdünnt. Es sollte damit einmal eine Polyspermie vermieden werden, zum anderen die Giftlösung vor dem Zusammenbringen mit den Eiern möglichst nochmals weitgehendst verdünnt und drittens verhütet werden, daß sich die Eihüllen zu voll mit Spermien saugen, da diese dann im Laufe der Entwicklung faulen würden und so durch Verderben des Wassers sich nachteilig auf den Versuch auswirken könnten.

Die Besamung selbst erfolgte mit einer Glaspipette in einer Petrischale, indem über jedes einzelne Ei einige Tropfen Samenmilch gespritzt wurden.

Jeweils 2 auf diese Weise befruchtete Objektträger mit Eiern wurden nach vorherigem Abspülen in Schalen mit Teichwasser gelegt.

Zu jeder Versuchsserie, die von dem Samen eines Männchens bzw. den Eiern eines Weibchens stammten, setzte ich durch künstliche Besamung mit unbehandelten Spermien eine Kontrolle an.

Diese Methode hat schon G. HERTWIG, der sie in etwas modifizierter und verbesserter Form von O. HERTWIG übernahm, angewandt. Die Vorteile dieser Methode, die sich in jedem Falle sehr bewährt hat, liegen darin, daß sie es ermöglicht, die befruchteten Eier in ihrer Gesamtheit sehr leicht zu handhaben und so eine möglichst genaue Kontrolle der gelungenen Befruchtung, die sich bekanntlich durch Drehung der Eier nach etwa 25—30 min kenntlich macht, der Furchung, Urmundbildung und Streckung der Embryonen gestattet.

In diesem Stadium, das nach 3—4 Tagen je nach Temperatur des Wassers erreicht war, entfernte ich die Embryonen samt ihren Hüllen von dem Objektträger, um dem sauerstoffhaltigen Wasser einen allseitigen Zutritt zu gewähren.

Die Embryonen wurden dann bis zu ihrer völligen Ausdifferenzierung als Larven beobachtet oder der Versuch wurde, wenn er es gestattete, bzw. infolge drohenden Zerfalls der Embryonen erzwang, vorher abgeschlossen.

War der Versuch positiv, d. h. erwies sich das zu prüfende chemische Agens als ein Kerngift im Sinne obiger Definition, so war die Entwicklung der Eier bis

zur Blastula meist noch normal. Die Gastrulation hingegen konnte schon nicht mehr von allen Eiern ausgeführt werden, da viele bereits als Blastulae abstarben. Wurde jedoch auch diese Entwicklungsstufe überwunden und eine Gastrula mit einem Urmund angelegt, so war dies ein Stadium, wo die durch geschädigte Spermien zur Entwicklung gebrachten Eier besonders gut von normalen Eiern unterschieden werden konnten. In diesem Falle ist nämlich der Urmund immer deutlich weiter als bei den zur Kontrolle angesetzten Eiern, ja zum Teil ragt, als Riesensproß bezeichnet, der Dotter wie ein großer Klumpen aus dem Urmund heraus.

Entwickeln sich die Embryonen noch weiter, so resultieren entweder grotesk mißbildete Larven, „spinae bifidae“, oder dickbäuchige, verkürzte Embryonen (s. 16, 21, 22).

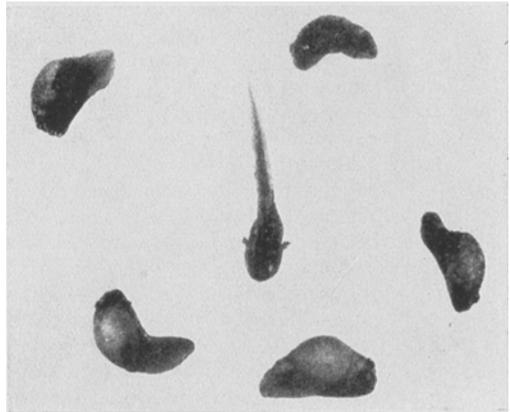


Abb. 1. Larven aus Versuch 7 (1949) und 1 Tier aus der entsprechenden Kontrolle. Spermien wurden vor ihrer Befruchtung 55 min in einer Acridinorangelösung 1:50000 gebracht. Alter der Tiere: 14 Tage.

Abb. 2. 5 Larven aus Versuch 54 (1950) und 1 Tier aus der entsprechenden Kontrolle. In diesem Versuch wurden die Spermien 4 Std 40 min der Einwirkung von Dichloren 1:20000 ausgesetzt. Alter der Tiere: 11 Tage. Durch Dichloren wurden die „besten“ dickbäuchigen, haploidkernigen Embryonen erzielt. Auch konnte ich nie dichlorenresistente Spermien beobachten.

Die Mißbildungen wurden vor ihrem Zerfall in Bouvinscher Lösung fixiert und in 80%igem Alkohol konserviert.

Bei diesen Versuchen konnte wieder das Gesetz der Kurvenbildung bestätigt werden, d. h. bei starker Kernschädigung war die Entwicklung der Embryonen eine bessere als bei weniger starker.

Hier war also das Spermachromatin so stark geschädigt, daß der väterliche Kern ganz ausgeschaltet wurde, der Samenfaden also nur noch als Entwicklungsreiz wirkt, sich das Ei jedoch *parthenogenetisch entwickelt*.

Auch der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die kernschädigende Wirkung der verschiedenen Lösungen, die G. HERTWIG (19) erstmals bei seinen Trypflavinversuchen beschrieben hat, konnte von mir erneut bestätigt werden.

Es zeigt sich nämlich, daß im alkalischen Milieu sowohl die Besamung eine schlechtere als auch die kernschädigende Wirkung eine größere war im Gegensatz zu neutralem und saurem Milieu.

Als Puffergemisch dienten primäres Kaliumphosphat und sekundäres Natriumphosphat. Das p_H wurde nach einer Tabelle aus dem Buch von G. LEHMANN (30) im sauren Bereich auf $p_H = 5,59$, im neutralen auf $p_H = 6,92$ und im alkalischen auf $p_H = 8,04$ eingestellt.

Die untersuchten Substanzen sind aus nachfolgender Zusammenstellung ersichtlich und die wichtigsten formelmäßig wiedergegeben.

B. Zusammenstellung aller Chemikalien, deren Einfluß untersucht wurde und ihre Formelbilder.

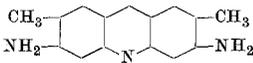
	Ermittelte Konzentration	Kernschädigende Wirkung	
		1949	1950
Acridingelb	1: 10000	—	++
Acridinorange	1: 50000	+++	+++
Acridinrot	1: 10000	++	—
Trypaflavin	1: 10000	+++	+++
Neutralrot	1: 20000	++	+++
Methylenblau	1: 20000	+++	+++
Rivanol	1: 10000	?	++
Atebrin	1: 10000	?	++
Auramin	1:100000	—	+
Thioflavin	1: 10000	—	+
Dichloren	1: 20000	—	++++

+ Mißbildungen leichten Grades; ++ Mißbildungen schweren Grades, zum Teil als Blastulae zerfallen; +++ Auftreten von haploidkernigen Embryonen; ++++ Nur noch haploidkernige Embryonen; ? Befund fraglich; — Substanz wurde nicht untersucht.

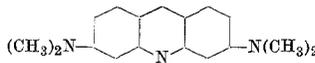
Weiterhin wurden untersucht und als nicht spezifisch kernschädigend festgestellt.

Methylgrün	1: 10000	Theophyllin	1: 10000
Malachitgrün	1: 100000	Coffein	1: 1000
Nilblausulfat	1: 10000	Nicotin	1: 1000
(kernschädigende Wirkung bei Nilblau noch unklar; s.u.)		Pervitin	1: 1000
Thiazolgelb	1: 2000	Novocain	1: 1000
Eosin	1: 2000	Hydrochinon	1: 10000
Trypanblau	1: 200	Pyrogallol	1: 10000
Aurantia	1/100 ges.	Digitalis	1: 100
Äthylurethan	1: 200	Codein	1: 1000
Phenylurethan	1/10 ges.	Suprarenin	1: 10000
Colchicin	1: 1000	Äthylglykol	1: 100
p-Dichlorbenzol	1/1000 ges.	Targesin	1: 20
Benzochinon	1/1000 ges.	Globucid	1: 10
Plasmochin	1: 100	Eubasin	1 Tabl. je 5 cm ³ H ₂ O

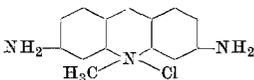
Formelbilder der kernschädigenden chemischen Substanzen.



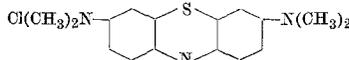
Acridingelb



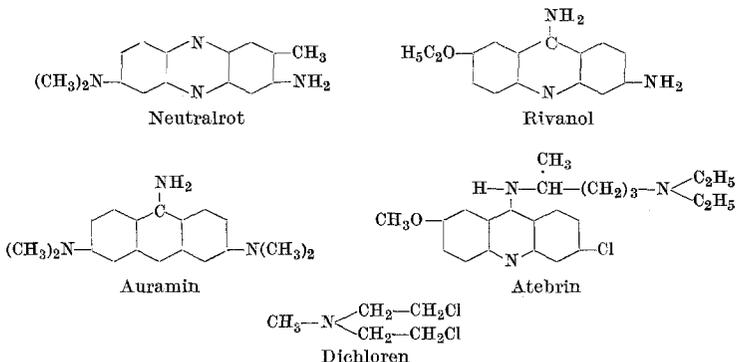
Acridinorange



Trypaflavin

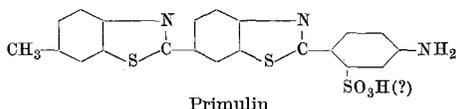


Methylenblau

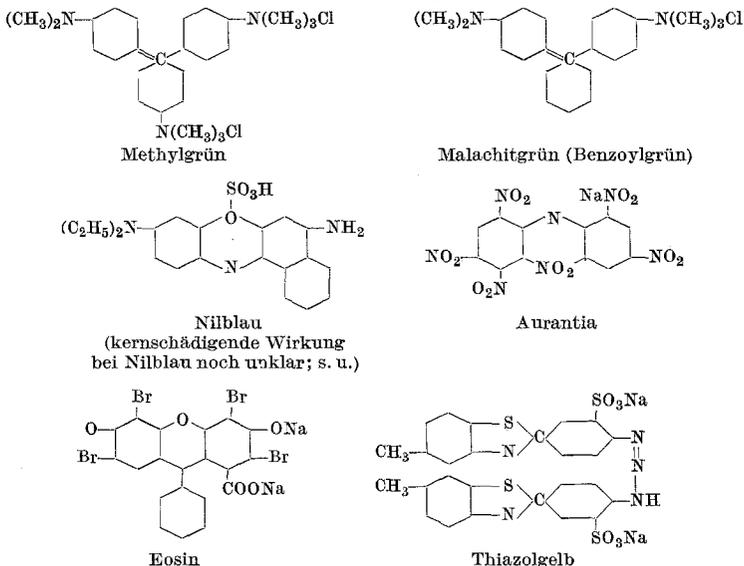


Schwieriger ist die Wiedergabe eines Formelbildes für Thioflavin S. Das Thioflavin S ist nach der Literaturangabe das Produkt der Methylierung und anschließenden Sulfierung (oder umgekehrt in der Reihenfolge) von Primulinbasen. Die Primulinbase ist nun wiederum Bis-Dehydrothio-p-toluidin, das Primulin selbst eine sulfierte Primulinbase im Sinne nachstehender Formel. Das Fragezeichen in dieser soll heißen, daß die Stellung der Sulfosäuregruppe SO_3H nicht ganz gesichert ist.

Nach der oben angegebenen Definition werden bei der Herstellung von Thioflavin S noch weitere Methyl- und sulfosaure Gruppen eingeführt. Das Thioflavin S besitzt also ebenfalls wenigstens 2 basische Gruppen.



Formelbilder der nichtkernschädigenden Substanzen.



C. Der Einfluß des UV-Lichtes auf die Samenfäden.

Außer den obengenannten chemischen Agenzien wurde auch ultraviolettes Licht auf seinen kernschädigenden Einfluß untersucht.

Als UV-Quelle diente in diesen Versuchen ein bogenförmiger S 100-Brenner der Firma Zeiß, wie er von dieser Firma zum Zwecke der UV-Mikroskopie geliefert wird.

Leider hatte diese Einrichtung einen Uviolglaskondensator, der von dem UV-Spektralanteil fast ausschließlich UV-A-Strahlen und in schon stark abgeschwächter Form UV-B-Strahlen durchließ, jedoch die besonders wirksamen UV-C-Strahlen ganz absorbierte, wie nebenstehendes Diagramm zeigt.

Die Spermiumsuspension wurde auf einem hohlen Objektträger, etwa 15 cm von der Lichtquelle entfernt, bestrahlt. Der Objektträger lag in einer mit nassem Fließpapier beschickten Petrischale, um das Verdunsten der Suspensionsflüssigkeit soweit wie irgend möglich einzuschränken.

Auch durch die UV-Bestrahlung konnte eine deutliche Kernschädigung beobachtet werden. In einem Falle traten sogar typisch dickbauchige, parthenogenetische Embryonen auf.

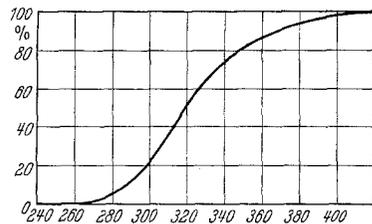


Abb. 3. Spektrales Durchlassungsvermögen des SCHOTT'schen Uviolglases, bezogen auf das Durchlassungsvermögen des Quarzglases. (AUS MEYER-SEITZ: Ultraviolette Strahlen.)

D. Besprechung und Diskussion der Versuche zur Ergründung des Wirkungsmechanismus (Lichteinfluß).

1. Plasmawirkung, studiert an der Beweglichkeit und Befruchtungsfähigkeit der Samenfäden.

Bei der Auswahl der Stoffe, die einer Prüfung unterworfen wurden und die in der obigen Zusammenstellung aufgezählt sind, ließ ich mich von dem Gesichtspunkt ihrer angeblich spezifisch kernschädigenden Eigenschaft leiten; dennoch haben natürlich auch alle eine plasmahädigende Komponente, wenn diese auch weitgehend in den Hintergrund tritt.

In meinen Versuchen dokumentiert sich die protoplasmaschädigende Wirkung in einer Beeinträchtigung der Beweglichkeit und der Befruchtungsfähigkeit, die, wie aus den folgenden Versuchen ersichtlich ist, bei den Amphibien nicht immer Hand in Hand gehen.

Besonders stark eingeschränkt wurde die Beweglichkeit durch den Triphenylmethanfarbstoff Malachitgrün. Wie aus der Tabelle hervorgeht, mußte der Farbstoff bis auf 1: 100 000 verdünnt werden, um die Beweglichkeit der zugesetzten Spermien nach einem Zeitraum von etwa 45 min

nicht so stark einzuschränken, daß eine Befruchtung von vornherein ausichtslos war.

Hier steht also, obwohl es ein basischer, also ein Kernfarbstoff ist, die Protoplasmaschädigung im Vordergrund. Ähnlich verhält es sich mit Methylgrün, das auch ein Triphenylmethanfarbstoff ist und in der Histologie als *der* Kernfarbstoff, ja z. T. als spezifisch färbend für das Chromatin, das im wesentlichen aus Nucleinsäure besteht, bekannt ist.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß die bakterizide Wirksamkeit dieser Farbstoffe durch Zusatz von Serum und anderen Eiweißkörpern wesentlich herabgesetzt wird, wogegen z. B. die bakterizide Wirkung von Rivanol und Trypaflavin durch Serum auf das etwa 10fache gesteigert wird (11).

Wie aus obiger Zusammenstellung weiterhin ersichtlich, hatte auch Eosin keinerlei Einfluß auf den Chromatinapparat des Samenfadens. Sie vertrugen vom Eosin noch eine Konzentration von 1:2000.

Die Beweglichkeit der Spermien ist jedoch wesentlich von den Beleuchtungsverhältnissen, in der die Spermien-Eosin-Suspension aufgehoben wird, abhängig. Hält man die Spermien suspension in einer Eosinlösung 1:2000 möglichst lichtgeschützt (im beschriebenen Versuch wurde sie in einen Tischkasten gestellt), so hat die Beweglichkeit nach 30 min noch nicht gelitten. Wurde jedoch zur gleichen Zeit eine Probe dieser Suspension einer intensiven Lichtbestrahlung mit der oben beschriebenen Hg-Lampe ausgesetzt, so ist die Beweglichkeit nach 15 min schon deutlich eingeschränkt und nach Verlauf von 30 min restlos erloschen.

Noch eher leidet die Befruchtungsfähigkeit. Hierzu einige Beispiele: Eosin 1:2000.

Versuch 2 (1950). Spermien 30 min möglichst lichtgeschützt (Tischkasten) in der Lösung belassen. Befruchtungsergebnis: alle etwa 80 Eier bis auf 4 normal 2-geteilt.

Versuch 8 (1950). Spermienaufschwemmung in der Eosinlösung 3 min der Lichtbestrahlung mit obengenannter Lichtquelle ausgesetzt. Es wurden von den etwa 80 Eiern im ganzen nur 5 Eier besamt.

Versuch 9 (1950). Die Bestrahlung wurde auf 6 min ausgedehnt, in diesem Versuche wurde gar nichts besamt.

In allen 3 Fällen wurde vorher, wie immer, die Beweglichkeit der Spermien unter dem Mikroskop überprüft und es konnte in allen 3 Versuchen keine Änderung der Beweglichkeit im Vergleich zu unbehandelten Spermien festgestellt werden.

Ähnliche lichtabhängige Befruchtungsergebnisse konnten auch in den übrigen Versuchen konstatiert werden. Es kommt dabei nicht auf den UV-Anteil des Spektrums an, sondern schon gewöhnliches, diffuses Tageslicht bewirkt diese Herabminderung in der Befruchtungsfähigkeit.

Die Befruchtungen der Kontrollen wurden alle bei Tageslicht vorgenommen. Im Laufe der Versuche wurde es notwendig, einige Objektträger mit Eiern in einer Dunkelkammer bei schwachem, rotem Licht zu befruchten (s. unten).

Bei den letztgenannten Versuchen war das Befruchtungsergebnis fast immer bedeutend besser als bei den Kontrollen oder den entsprechenden Versuchen im Hellen.

Besonders kraß war der Befund beim Methylenblau. Auch hierzu einige Beispiele:

Methylenblau 1: 20 000.

Versuch 74 (1950). Spermien 47 min bei gewöhnlichem Tageslicht in der Lösung. Von den üblichen 70—80 Eiern wurde nur 1 Ei befruchtet.

Versuch 75 (1950). Die Spermien wurden erst in der Dunkelkammer in die gleiche Lösung gebracht und daselbst auch besamt, es kamen von den etwa 80 Eiern 63 Eier zur Entwicklung.

Acridinorange 1: 50 000.

Versuch 42 (1950). Bei Tageslicht wurden die Spermien 4 min vor der Besamung in der Lösung gelassen. Von 80 Eiern wurden 10 nicht befruchtet.

Versuch 45 (1950). 3 min im Dunkeln (Dunkelkammer) in der Lösung. 100%ige Befruchtung der etwa 80 Eier.

Noch deutlicher wird die Lichtabhängigkeit durch eine Lichtbestrahlung mit der genannten Quecksilberhochdrucklampe. In der gleichen Akridinorangelösung wurden die Spermien im

Versuch 43 (1950) 3 min der Bestrahlung ausgesetzt. Es wurden von etwa 70 Eiern im ganzen nur 3 befruchtet.

Versuch 44 (1950): 5 min Bestrahlungsdauer, von etwa 80 Eiern waren nur 6 befruchtet.

Als weiteres Beispiel dieser Reihe:

Neutralrot 1: 20 000.

Versuch 55a (1950). Spermien in der Farblösung 3 min der Bestrahlung ausgesetzt — es wurde nichts befruchtet.

Versuch 55b (1950). $1\frac{1}{2}$ min Lichtbestrahlung, in diesem Versuch kamen von etwa 80 Eiern 17 zur Entwicklung.

Versuch 58 (1950). Der gleichen Lösung wurden die Spermien 3 min in der Dunkelkammer überlassen, hier wurden alle etwa 80 Eier bis auf 3 besamt.

Analoge Verhältnisse zeigen die übrigen Helldunkelversuche.

Auch in den Methylenblau, Acridinorange und Neutralrotversuchen war die Beweglichkeit der Spermien durch die Lichtexposition nicht merklich verändert worden. Im Dunkeln konnte die Beweglichkeit der Spermien durch das Mikroskop natürlich nicht beurteilt werden.

Das schlechte Befruchtungsergebnis kann also nicht an einem Mangel an Eindringungsvermögen infolge schlechter Beweglichkeit liegen, sondern ein anderer Mechanismus muß gestört worden sein.

Seit KUHN, MOEVUS und HARTMANN (14) ist bekannt, daß die Gamone, die an dem Vorgang der Befruchtung einen wesentlichen Anteil haben, sehr photosensible Körper sind. Wenn solche Gamone für die Anuren bisher auch noch nicht nachgewiesen wurden, so bin ich doch geneigt, die obigen Befunde dahingehend zu deuten, daß hier ein photodynamischer Vorgang zugrunde liegt, der diese Gamone zerstört.

Wer das Laichgeschäft von *Rana fusca* in der freien Natur beobachtet, wird hier leicht feststellen können, daß es fast ausschließlich zur Nachtzeit, also auch möglichst lichtgeschützt, vollzogen wird.

2. Wirkung karyoklastischer Substanzen, studiert an der Entwicklungsfähigkeit der mit vorbehandelten Spermien befruchteten Eier.

a) *Nicht direkt kernschädigende Substanzen.* Hier ist besonders auffallend, daß Urethan, das in der praktischen Medizin als das Kerngift bei der Behandlung sowohl der Leukämien als auch der Tumoren angewandt wird, bei meinen Versuchen wiederholt wirkungslos war, sowohl das Äthyl- als auch das angeblich 150mal giftigere Phenylurethan.

OEHLKERS (38, 39) beobachtete, daß durch Einwirkung von Äthylurethan und Kaliumchlorid auf die Inffluoreszenzen von der Bastardpflanze *Oenothera flavens* × *Hookeri* ähnliche Chromosomenmutationen auftraten, wie sie innerhalb der Grenzen einer kräftigen Röntgendosis liegen.

P. DUSTIN jun. (10) untersuchte die Wirkung des Urethans auf die LIEBERKÜHNschen Krypten der Maus und konnte auch hier feststellen, daß er die gleichen Bilder bekam wie nach Röntgenstrahlen; er bezeichnet deshalb die Urethanwirkung als „radiomimetisch“.

HEILMEYER (15), der mehrere Leukämien und Redothelsarkome erfolgreich mit Urethan behandeln konnte, kommt zu dem Schluß, daß das Urethan wahrscheinlich seinen Angriffspunkt an den Nukleoproteiden des Zellkernes habe. Jedoch wenn diese Vermutung zu recht bestünde, hätte Urethan auch in meiner Versuchsanordnung eine Schädigung herbeiführen müssen.

Zu einer anderen Vorstellung über den Wirkungsmechanismus des Urethans kommen E. SCHULZE, E. FRITZE und H. H. MÜLLER (51). Auch sie behandelten verschiedene Leukämien erfolgreich mit Urethan und untersuchten die Wirkungsweise des Urethans durch Knochenmarkstudien. Die Reifungs- und Teilungsvorgänge im Mark wurden unter der Urethanbehandlung stark verändert. Es heißt dann: „Glauben wir somit dargetan zu haben, daß die entscheidende Wirkung des Urethans bei myeloischen Leukämien am Mitoseapparat faßbar wird, so ist eine weitere Frage, ob diese Wirkung primär oder vermittelt erfolgt. Der Nachweis eines pathologischen Stoffwechsels der Leukämiezelle, der sie

besonders angreifbar macht, die Feststellung, daß Urethan eine besondere Affinität zu den Fermentsystemen der Gewebeatmung besitzt, und daß intakte innere Atmung und normale Mitosis zusammengehören scheinen, läßt uns, ausgehend von Vorstellungen von POLITZER, vermuten, daß die von uns geschilderte mitosehemmende Wirkung des Urethans primär wie eine Narkose durch Eingriff in das Atmungsfermentsystem der Zelle beginnt, indem das Narkotikum die ruhende Zelle hindert, in die Mitose einzutreten. Dieser Prozeß ist bei Absetzen des Mittels reversibel und hinterläßt keine Dauerschäden. Erst bei längerer Fortsetzung der Narkose kommt es zu den von uns gesehenen, auch morphologisch faßbaren Veränderungen des Chromosomengefüges als Ausdruck der geschädigten inneren Atmung; und diese Chromosomenschäden bestimmen nun den weiteren Verlauf selbständig, je nach dem Grade der erfolgten Kernschädigung aus sich heraus, indem sie den ursprünglichen Vorgang der Narkose ablösen.“

Eine ähnliche Vorstellung vertritt wohl auch H. E. BOCK (5). Wenn auch er dem Urethan hauptsächlich einen Kernangriffspunkt zuschreibt, so meint er damit nicht, wie ich den Begriff Kerngifte definierte, einen Angriff an dem Chromatin, sondern es heißt: „Wir kommen also zu dem Schluß, daß Urethan ein in schwachen Konzentrationen vor allem auf den Kernstoffwechsel wirkendes Gift ist, dessen Wirkungen unter anderem auch am Mitoseablauf erkannt werden können.“

Daß Urethan nicht im Sinne der Kerngifte vom Trypafflavintyp wirkt, geht auch daraus hervor, daß anfangs, genau wie nach Colchicin, erst eine Kernteilungswelle auftritt und dann der Kernuntergang, was sich unter anderem bei der Leukämiebehandlung gut in der Harnsäureausscheidung dokumentiert, die zuerst zurückgeht, entsprechend dem Mitosestopp der Gifte des Colchicintyps und dann erst ansteigt als Ausdruck des Kernunterganges (15, 51). Es gehört also zur Klasse der stathmokinischen Gifte.

Bei dieser Deutung des Wirkungsmodus war es deshalb gar nicht zu erwarten, daß Urethan in meiner Versuchsanordnung irgend eine Schädigung des Zellkerns hervorrufen würde.

Ähnliches läßt sich über das *Colchicin* sagen, das ebenfalls nicht direkt über die Chromatinsubstanz den Kern schädigt, sondern am Spindelapparat angreift, was dieser ganzen Gruppe den Namen „Spindelgifte“ eingetragen hat. Wenn dennoch in einer Arbeit von T. S. HALL¹ die Ansicht vertreten wird, daß Colchicin einen kernschädigenden Einfluß auf die Samenfäden ausübt, so ist mir dies unverständlich. Leider war mir die Arbeit nicht zugänglich.

¹HALL, T. S.: Abnormalities of amphibian development following exposure of sperm to colchicin. Proc. Soc. exper. biol. Med. 62, 193 (1946).

Sowohl G. HERTWIG als ich haben wiederholt Versuche mit Colchicin angestellt und immer negative Resultate bekommen. Als Beispiel sei der Versuch 44 angeführt.

Colchicin 1:1000.

Versuch 44 (1949). Die Spermien wurden 178 min der Einwirkung des Colchicins ausgesetzt. Sie wurden nach dieser langen Zeit erst auf Verdünnung mit Teichwasser wieder einigermaßen beweglich, jedoch konnte trotzdem eine fast 100%ige Befruchtung erzielt werden. Nach 15 Tagen hatten sich 1 Mißbildung und etwa 80 normale Larven entwickelt. Die Kontrolle hierzu war ebenfalls 100%ig befruchtet und hatte sich völlig normal entwickelt.

Weiterhin sind nach meinen Befunden *Trypanblau* und *Eosin* keine kernschädigenden Farbstoffe. Wenn DUSTIN auch am Trypanblau (7) erst die Wirkung der „karyoklastischen“ Substanzen entdeckt hat, so ist die beobachtete Kernpyknose wohl im Sinne eines indirekten Kerngiftes nach der Definition von LETTRE (32) zu deuten. Auch von E. RIES (47) u. a. ist gezeigt worden, daß Trypanblau, Isaminblau und Eosin an der isolierten Zelle keinerlei Kernschädigung erkennen lassen.

Ich möchte daher als Regel aufstellen, daß ein Farbstoff nur dann als Kerngift in Betracht kommt, wenn er basischen Charakter hat.

Aber das ist nur eine der Voraussetzungen, denn nicht alle basischen Farbstoffe sind Kerngifte, wie aus meiner Aufstellung ebenfalls hervorgeht, und wie ich bei der Besprechung des Methylgrün dort besonders hervorgehoben habe, obwohl von FEULGEN und von v. MÖLLENDORF (36) nachgewiesen wurde, daß alle von ihnen untersuchten basischen Farbstoffe mit Nukleinsäuren salzartige Verbindungen eingehen und mit diesen unlösliche Niederschläge bilden.

Besonders auffallend unter den basischen Farbstoffen ist der negative Befund beim *Nilblau*, einem Vertreter der Oxazinfarbstoffe, die formelmäßig den Thiazinen, also z. B. dem Methylenblau, sehr nahe stehen.

Leider sind die Oxazinfarbstoffe offenbar stark gamonschädigend, also mein Versuchsobjekt zur Prüfung ihrer Kerngiftigkeit relativ ungeeignet.

Im *Versuch 48 (1949)* z. B. wurden Spermien 60 min in Nilblausulfatlösung 1:10000 gelassen. Durch die Besamung von etwa 70 bis 80 Eiern mit diesen Spermien wurden jedoch nur 8 Eier befruchtet. Es entwickelte sich hieraus nur 1 normaler Embryo, die übrigen 7 zerfielen im Beginn der Gastrulation.

Da jedoch dieses geringe Befruchtungsergebnis zur positiven Wertung dieses Versuches zu gering war, wurde der Versuch wiederholt.

Versuch 61 (1949). Nilblausulfatlösung 1:20000. Die Spermien wurden 45 min in der Lösung gelassen und dann die Befruchtung voll-

zogen. Es wurden diesmal von wieder etwa 80 Eiern 45 befruchtet, die sich alle zu völlig normalen Larven entwickelten.

G. HERTWIG (unveröffentlicht) hatte schon früher Capriblau, was ebenfalls ein Oxazinfarbstoff ist, auf seine kernschädigende Wirkung untersucht. Auch diese Versuche waren damals nicht positiv.

b) *Kernschädigende Chemikalien.* Ich wende mich nun der speziellen Besprechung der karyoklastisch wirksamen Chemikalien zu, die schon oft in ganz geringen Konzentrationen auf den Kern giftig einwirkten.

Um die noch gerade eben wirksame kernschädigende Grenzkonzentration zu ermitteln, beschreibt G. HERTWIG (19), daß er Spermien 22 Std in einer Trypaflavinverdünnung von 1:1 Mill. gelassen hat und dann noch eine deutliche Schädigung festzustellen war.

Um das auch für die anderen kernschädigenden Stoffe zu ermitteln, setzte ich am 25. 3. 49 eine Versuchsreihe von schwächsten Konzentrationen an, und zwar:

Versuch 70 (1949). Trypaflavin 1:1 Million,

Versuch 66 (1949). Acridinorange 1:500 000,

Versuch 67 (1949). Acridinrot 1:500 000,

Versuch 68 (1949). Methylenblau 1:500 000,

Versuch 71 (1949). Neutralrot 1:500 000

und ließ die Spermien vom 25. 3. 49, 14.30 Uhr, bis zum 26. 3. 49, 7.45 Uhr (etwa 17 Std) in der Lösung. Um zu verhindern, daß die Konzentration durch Wasserverdunstung anstieg, wurden die Blockschälchen unter eine braune Glasglocke gestellt.

Erstaunlicherweise hatte in diesen Versuchen außer Neutralrot kein Farbstoff den Spermakern geschädigt. Die Versuche unterschieden sich in nichts von der Kontrolle.

Leider konnte der Versuch im Jahre 1949 nicht wiederholt werden, da die Laichzeit von *Rana fusca* zu Ende war.

Durch die Versuche von JODLBAUER, TAPPEINER (57) und POLITZER (45, 46) ist bekannt, daß Neutralrot und andere fluoreszierende Substanzen unter Lichteinfluß ihre Giftigkeit auch auf die Zellteilung verstärken. Da es sich in unserem Falle bei den wirksamen Substanzen ausschließlich um Fluoreszenzfarbstoffe handelte, führte ich mein negatives Ergebnis ebenfalls auf den mangelnden Lichtzutritt infolge der braunen Glasglocke zurück.

Zur Bestätigung dieser Annahme wurden die Versuche im folgenden Jahre unter Berücksichtigung der Lichtverhältnisse wiederholt.

Zuerst wurde der Samen in den von mir schon als kernschädigend erkannten Farbstofflösungen einmal im Tischkasten, also im „Dunkeln“, und zum anderen auf dem Tisch im diffusen Tageslicht aufgestellt. Beide Versuche wurden dann bei Tageslicht besamt. Es waren hier

wohl Unterschiede zu konstatieren, jedoch nicht so überzeugend, daß der völlig negative Befund des Vorjahres hätte erklärt werden können.

Um ganz reine Versuchsbedingungen zu schaffen, wurde der Samen erst in der Dunkelkammer mit der Farbstofflösung zusammengebracht und daselbst auch besamt. Als einzige Lichtquelle diente hier eine rote Lampe, wie sie für photographische Zwecke Verwendung findet.

Die Spermien wurden jedoch möglichst auch vor diesem Licht geschützt.

Hier seien 3 dieser Versuche angeführt:

1. Acridinorgane 1: 50 000.

Die Spermien wurden in obiger Verdünnung im

Versuch 42 (1950). 4 min bei Tageslicht,

Versuch 45 (1950). 3 min. im Dunkeln,

Versuch 46 (1950). 80 min im Dunkeln,

Versuch 47 (1950). 78 min. bei Tageslicht gelassen.

An allen bei Licht ausgeführten Versuchen waren die Spermien gut beweglich. Im Dunkeln konnte die Beweglichkeit nicht überprüft werden.

Im *Versuch 42 (1950)* (4 min. bei Tageslicht) waren alle Eier von den üblichen etwa 80 bis auf 10 befruchtet. Es entwickelten sich daraus 9 zum Teil stark mißbildete Embryonen und 1 typisch dickbäuchiger, der Rest ist als Blastulae oder Spinae bifidae zerfallen.

Versuch 45 (1950) (3 min im Dunkeln). 100%ige Befruchtung (83 Eier), die sich alle zu völlig normalen Embryonen entwickelten.

Versuch 46 (1950) (80 min im Dunkeln). 9 unbefruchtete Eier. Alle befruchteten Eier — in diesem Versuche waren die Objektträger besonders dicht besetzt, so daß 110 Eier befruchtet wurden — bildeten völlig normale Larven.

Versuch 47 (1950) (78 min bei Tageslicht). Es waren wiederum von 70 nur 15 Eier befruchtet, es entwickelte sich nicht ein normaler Embryo! 6 zerfielen im Laufe der Entwicklung und die restlichen 9 waren stark mißbildet, zum Teil wieder typisch dickbäuchig.

In der Kontrolle zu dieser Versuchsserie waren eine schwache Mißbildung und 68 normale Embryonen.

2. Trypaflavin 1: 10 000.

In der üblichen Verdünnung für Trypaflavin 1: 10 000 wurden die Spermien im

Versuch 32 (1950) 3 min bei Tageslicht,

Versuch 34 (1950) 3 min im Dunkeln,

Versuch 35 (1950) 80 min bei Tageslicht,

Versuch 36 (1950) 70 min im Dunkeln gelassen.

Im *Versuch 32 (1950)* (3 min bei Tageslicht) waren 11 Eier nicht befruchtet. Nach 11 Tagen hatten sich von 67 befruchteten Eiern 11 Mißbildungen und 35 normale Larven entwickelt, 10 Eier waren im Laufe der Entwicklung zerfallen.

Versuch 34 (1950) (3 min im Dunkeln). 18 Eier waren nicht befruchtet, nach 11 Tagen hatten sich etwa 80 normale Larven entwickelt.

Im *Versuch 35 (1950)* (80 min bei Tageslicht) waren nur 2 Eier nicht befruchtet, jedoch mußte der Versuch schon nach 7 Tagen abgebrochen und die Embryonen fixiert werden, da sich keine normale Larve entwickelt hatte, sondern nur 17 typisch dickbäuchige haploid-kernige, deren Zerfall drohte. Der Rest von etwa 60 Embryonen war bereits zerfallen.

Versuch 36 (1950) (70 min im Dunkeln) hatte 15 unbefruchtete Eier. Es hatten sich nach 11 Tagen etwa 80 normale Larven und 2 schwache Mißbildungen entwickelt.

Die Kontrolle zu diesen Versuchen war 100%ig befruchtet. Nach 11 Tagen hatten sich neben 3 schwachen Mißbildungen etwa 80 normale Larven entwickelt.

3. Neutralrot 1 : 20000.

Die Spermien wurden hier im

Versuch 57 (1950) 85 min bei Tageslicht,

Versuch 59 (1950) 70 min im Dunkeln

in der Farbstofflösung gelassen.

Dabei wurden

im *Versuch 57 (1950)* (85 min bei Tageslicht) trotz sehr guter Beweglichkeit der Spermien von etwa 85 Eiern nur 19 Eier befruchtet; nach 9 Tagen waren nur mehr 5 dickbäuchige Embryonen und 1 *Spinæ bifidae* am Leben, der Rest war zerfallen;

im *Versuch 59 (1950)* (70 min im Dunkeln) 5 Eier nicht befruchtet. Hier hatten sich nach 9 Tagen alle 70—80 Eier zu normalen Larven entwickelt.

Aus diesen Versuchen geht wohl mit aller Deutlichkeit hervor, welchen entscheidenden Einfluß das Licht auf die Kerngiftigkeit der Fluoreszenzfarbstoffe ausübt.

Es ist zunächst daran zu denken, daß durch den Lichteinfluß die Farblösungen eine chemische Umsetzung erfahren und so die offenbar vom Lichte abhängige Giftwirkung zustande kommt.

Ich bestrahlte deshalb eine Trypaffavinlösung 1 : 10000 etwa 100 min intensiv mit der Quecksilberhochdrucklampe und brachte in diese Lösung in der Dunkelkammer die Spermien [*Versuch 50 (1950)*].

Auch hier entwickelten sich nur normale Embryonen bei einem Befruchtungsergebnis von etwa 95% (4 Eier nicht befruchtet).

Desgleichen zeigte Eosin nach der Bestrahlung mit UV-Licht ein gutes Befruchtungsergebnis von ungefähr 90% [*Versuch 11 (1950)*].

Weiterhin wäre zu überlegen, ob nicht durch den Lichteinfluß die Durchlässigkeit der Zell- oder Kernmembran der Spermien für die Giftlösung besonders heraufgesetzt wird.

Im *Versuch 48 (1950)* wurde deshalb der Samen 3 min mit ultraviolettem Licht bestrahlt und dann wiederum erst in der Dunkelkammer mit einer Trypaflavinlösung 1:10000 zusammengebracht und dann besamt. Es waren 19 Eier nicht befruchtet, es entwickelten sich 6 Mißbildungen und etwa 60 normale Larven.

Im *Versuch 53 a (1950)*, wo der Samen vom gleichen Männchen nur 3 min lichtbestrahlt und dann damit besamt wurde, traten ebenfalls 5 leichte Mißbildungen auf, 7 waren vorher zerfallen und außerdem entwickelten sich noch etwa 60 normale Larven.

Die Kontrolle hatte 1 Mißbildung und 50 normale Larven.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß wohl durch eine kurze UV-Bestrahlung ein geringer Schaden gesetzt worden war, jedoch daß die Bestrahlung auf die Trypaflavinwirkung ohne Einfluß blieb.

Auch die unklaren Befunde beim Rivanol und Atebrin in der vorjährigen Untersuchungsperiode (s. Zusammenstellung S. 181) konnten durch den Lichteinfluß erklärt werden. Zur Wirksamkeit des Rivanols und Atebrins sind nämlich offenbar größere Lichtintensitäten notwendig als bei den übrigen fluoreszierenden Giften. In der diesjährigen Untersuchungsperiode konnte sowohl durch Rivanol als auch durch Atebrin eine deutliche Schädigung beobachtet werden.

Als Beispiel

Rivanol 1:10000.

Versuch 64 (1950). Bei Tageslicht wurden die Spermien 85 min in der Lösung gelassen. Schon nach 4 Tagen war trotz 100%iger Befruchtung kein Embryo mehr am Leben, sie waren alle als Blastulae bzw. Spinae bifidae zerfallen.

Versuch 65 (1950). Die Spermien waren 87 min in der Dunkelkammer in der Lösung. Es entwickelten sich im Verlauf von 13 Tagen etwa 80 normale Larven.

Als Beispiel für die Wirksamkeit des Atebrins sei noch der Versuch 76 angeführt.

Versuch 76 (1950). Die Spermien wurden 55 min der Lösung ausgesetzt und waren an einer Stelle aufgestellt, wo die Strahlen der untergehenden Sonne hinfielen. In diesem Versuch wurden 27 Eier nicht befruchtet, der größte Teil (etwa 50 Eier) zerfiel als Bastulae, nur 2 Eier gastrulierten und bildeten 2 Riesenpfröpfe, die jedoch am nächsten Tag schon zerfallen waren. Die Kontrolle hatte nur eine leichte Mißbildung und sonst etwa 70 normale Larven.

Durch all diese Versuche und Überlegungen bin ich zu dem Schluß gekommen, daß *der kernschädigende Einfluß der basischen Fluoreszenzfarbstoffe unmittelbar an das Licht gebunden ist*. Die bis jetzt als „Kerngifte vom Trypaflavintypus“ bezeichneten Substanzen sind vielleicht gar keine chemischen Gifte, wie es beispielsweise das Dichloren (s. unten)

auf den Kern darstellt, sondern nur Katalysatoren oder Sensibilisatoren (TAPPEINER, JODLBAUER), unter deren Einfluß bei Lichtzutritt ein kernschädigender Prozeß eingeleitet oder beschleunigt wird.

Auf Grund der lichtabhängigen Wirksamkeit der „Trypaflavinkerngifte“ ist es verlockend, die Ähnlichkeit der Radiumversuche einerseits und der Methylenblau und Trypaflavinversuche andererseits (wie von O. und G. HERTWIG erstmals beschrieben), da sie beide zu dem gleichen Endzustand der gestörten Entwicklungsfähigkeit führen, durch eine analoge Wirkungsweise zu deuten, nämlich dem physikalischen Phänomen der strahlenden Energie, zumal auch reines UV-Licht ohne Zusatz von Fluoreszenzfarbstoffen, wie die vorliegende Arbeit gezeigt hat, auf die Spermien des Frosches kernschädigend wirkt.

Es ist aber auch möglich, daß in jedem einzelnen Falle, d. h. durch Radium und Röntgenstrahlen, durch UV-Licht, durch basische Fluoreszenzfarbstoffe plus Tageslicht und durch Dichloren im Spermachromatin physikalisch-chemisch ganz verschiedene Reaktionen ablaufen, die nur das gemeinsam haben, daß sie alle eine Vermehrungsunfähigkeit bzw. zumindest Vermehrungshemmung des Chromatins nach sich ziehen.

Man kann hier vielleicht einen Vergleich zum Ergosterin ziehen.

Bekanntlich wird Ergosterin durch UV-Bestrahlung von einer Wellenlänge $280 \mu\mu$ zum antirachitischen Vitamin D 2 aktiviert (26).

Es wurde auch hier versucht, durch Bestrahlung des Ergosterins mit sichtbarem Licht nach Zusatz von Sensibilisatoren (Eosin, Erythrosin, Hämatoporphyrin, Methylenblau) als „Energietransformatoren“ zum Vitamin D 2 zu gelangen.

Wohl wurde in diesen Versuchen das Ergosterin verändert, jedoch nicht im Sinne von Vitamin D 2.

Unter O_2 -Zutritt fand eine Photooxydation statt, bei der antirachitisch unwirksame Peroxyde entstanden und unter Luftabschluß eine Photodehydrierung, bei der die Farbstoffe in ihre Leukoverbindung und das Ergosterin wahrscheinlich zu Ketonen, die sich mit anderen Ergosterinmolekülen zu Pinakon kondensierten, überführt wurden. Auch aus der Photodehydrierung entstanden also antirachitisch unwirksame Produkte.

Ergosterin wurde sowohl durch Tageslicht mittels Sensibilisatoren bzw. Katalysatoren als auch durch UV-Licht verändert, jedoch resultierten in beiden Fällen unterschiedliche Endprodukte.

POLITZER (45, 46) untersuchte an seinem Versuchsobjekt (Hornhaut der Urodelenlarven) ebenfalls den Einfluß des Lichtes unter Neutralroteinwirkung. Er kommt zu dem Ergebnis, daß auch im „Dunkeln“ die gleichen Schädigungen durch Neutralrot gesetzt werden, wenn auch in etwas abgeschwächter Form, und schließt daraus, daß Neutralrot kein rein photodynamisch wirksamer Farbstoff sei.

Der Dunkelversuch von POLITZER ist jedoch nach meinen Feststellungen nicht als solcher zu bezeichnen, denn es genügen besonders beim Neutralrot schon geringste Lichtintensitäten, um die typischen Kernveränderungen hervorzurufen. Wenn also, wie bei POLITZER, der

Farbstoff „in einer dunklen Zimmerecke, 4 m von einem nach NO gerichteten Fenster“ auf die Zellkerne einwirken kann, so genügt dieses Licht eben schon, um die Pseudoamitosen hervorzurufen. (Man vergleiche dazu meine Tischkastenversuche, die ja ebenfalls unter möglichstem Lichtabschluß durchgeführt wurden und dennoch nur unwesentliche Unterschiede gegenüber den Hellversuchen zeigten.)

Ferner hebt STRUGGER (53, 56) im Gegensatz zu meinen Ergebnissen die relative Ungiftigkeit des Acridinorange hervor. STRUGGER stellte fest, daß sich totes und lebendes Gewebe nach Färbung mit Acridinorange auf Grund ihrer unterschiedlichen Farbstoffspeicherung im Fluoreszenzbild exakt unterscheiden lassen, indem das Plasma des toten Gewebes kupferrot fluoresziert, wogegen lebendes hellgrün bis grünlichgelb leuchtet. Den gleichen Farbumschlag habe auch ich an den Spermien und den kernhaltigen Froscherythrozyten beobachtet. Weiterhin konnte STRUGGER mit der Fluoreszenzmethode Chromosomen von Pflanzenzellen während der Mitose bis zur Ruhekernbildung beobachten, ohne daß irgendwelche Zellschädigungen auftraten.

Auch Spermien wurden von STRUGGER in Zusammenarbeit mit ROSENBERGER (49, 55) der Einwirkung von Acridinorange ausgesetzt, und zwar Ziegenspermatozoen vor der künstlichen Befruchtung. Das Acridinorange wurde hierbei mit einem Glukose-Phosphatverdünner nach MILOVANOW auf 1 : 70000 bis 1 : 80000 verdünnt und die Spermien bis zu 5 Std in der Lösung gelassen. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung ergab, daß die Spermien gleich nach der langsam erfolgten Mischung mit der AcridinorangeLösung 100%ig angefärbt waren. Es wurden 27 Mutterziegen besamt, 21 wurden tragend. Es trat keine Fehlgeburt oder krankhafte Geburt auf; die Tiere unterschieden sich in nichts von den Kontrolltieren.

Es heißt in seiner Arbeit: „Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß das Acridinorange der bisher unschädlichste Vitalfarbstoff ist, mit dessen Hilfe in der lebenden Zelle alle lebenswichtigen Strukturelemente gefärbt werden können.“

Leider sind in dieser Arbeit keine Angaben über die Lichtverhältnisse gemacht, durch die vielleicht die Diskrepanz der Befunde zu meinen Ergebnissen erklärt werden könnte. ROSENBERGER hebt für die Aufbewahrung und den Transport von Ziegen- sowohl wie Rindersperma ganz generell unter anderem eine „Fernhaltung von grellem Licht, insbesondere unmittelbarer Sonnenbestrahlung“ hervor. Ferner schreibt er, daß die künstliche Besamung entweder mit Spritzen aus Glas oder mit Spritzen mit langem Hartgummiansatz durchgeführt werden. Wenn im Falle der Besamung mit fluorochromierten Spermien eine Spritze letzterer Art genommen worden wäre, wäre so auch im Falle des künst-

lichen Befruchtungsaktes selbst, der ja unter Sicht bei Beleuchtung vorgenommen wurde, kein Licht an die Spermien gelangt.

Daß bei stärkeren Verdünnungsgraden, wie sie hier vorlagen, eine längere Belichtung nötig ist, kann aus meinem beschriebenen *Versuch 66 (1949)* (s. S. 189) geschlossen werden, der bei einer Verdünnung 1 : 500000 ja im Tageslicht angesetzt wurde und von diesem dann nach Verlauf mehrerer Minuten nur in einer braunen Glaskammer geschützt wurde und dennoch keinerlei Schädigung gesetzt hatte.

Ein ganz anderer Wirkungsmodus, offenbar ein rein chemisches Geschehen, liegt der Kerngiftigkeit der Senfgase zugrunde.

Wie ich feststellen konnte, ist *Dichloren* der einzige von den von mir verwandten Stoffen, der seine kernschädigende Wirkung auch im Dunkeln entfaltet.

Dichloren 1 : 20000.

Versuch 40 (1950). 65 min wurden die Spermien bei Tageslicht der Einwirkung der Giftlösung überlassen und dann zur künstlichen Befruchtung benutzt. Es wurde von 84 Eiern nur 1 Ei nicht befruchtet. Nach 8 Tagen hatten sich 33 dickbäuchige Embryonen entwickelt, der Rest von 50 Eiern war zerfallen. Nach weiteren 3 Tagen waren nur mehr 16 typisch dickbäuchige Embryonen am Leben, die in Bouin eingelegt wurden. In der Kontrolle hierzu waren von 75 Eiern 2 nicht befruchtet. Nach 8 Tagen waren noch 48 normale Embryonen und 5 leichte Mißbildungen am Leben.

Versuch 60 (1950). Spermien 3 min im Dunkeln in der Lösung. Es wurde eine 100%ige Befruchtung erreicht. Nach 6 Tagen bereits war alles zerfallen.

Versuch 61 (1950). 85 min im Dunkeln die Spermien in der Lösung. 100%ige Befruchtung. Von 83 Eiern wurden nach 11 Tagen 16 verkürzte, dickbäuchige Embryonen in Bouinscher Lösung fixiert, der Rest war zerfallen.

Versuch 62 (1950). Bei Tageslicht die Spermien 3 min in der Lösung. Es wurde alles befruchtet. Nach 6 Tagen war aber auch hier bereits alles zerfallen. Die Kontrolle zu Versuch 60—62 zeigte ebenfalls eine 100%ige Befruchtung. Nach 11 Tagen hatten sich 1 Mißbildung und etwa 70 normale Larven entwickelt.

In diesen Versuchen kommt wieder besonders deutlich das Gesetz der Kurvenbildung von O. und G. HERTWIG zum Ausdruck. Bei kürzerer Einwirkungsdauer der Giftlösung auf die Spermienkerne resultiert eine stärkere Schädigung der Eientwicklung als bei längerer Einwirkung.

A. GILMAN und F. S. PHILIPS deuten in ihrem Buch „Approaches to Tumor Chemotherapy“, erschienen in Washington 1947, die Wirkungsweise der Senfgase [angeführt bei (12)]. Die Senfgase sollen Verbindungen mit noch unbekanntem, aber lebenswichtigen Bestandteilen

eingehen. Leider war mir auch diese Arbeit im Original nicht zugänglich. Daß diese „lebenswichtigen noch unbekanntem Stoffe“ aber im Zellkern lokalisiert sein müssen, kann aus meinen Ergebnissen wohl geschlossen werden; denn noch nach 12 Std waren die Spermien gut beweglich, obwohl schon nach 3 min eine sehr starke Kernschädigung feststellbar war.

BOYLAND 1948 [angeführt bei (12)] vermutet eine Verbindung des Dichlors mit den Nukleinsäuren, zumal an isolierter Kernsubstanz mit Lost eine irreversible Präzipitation zu erzielen ist. Er fand nur solche Verwandte des Lostes wirksam, die zwei $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ -Gruppen besaßen. „Das bedeutet aber, daß die eine Cl-Abspaltung zur Verankerung in der Kernsubstanz im Sinne von ELMORE und Mitarbeitern, die andere Gruppe aber reaktiv ein angrenzendes Plasmaelement stört, so daß in einem Molekül zwei Bindungen vereinigt sind.“

Auch aus dem chemischen Strukturbild des Dichlors, das im Gegensatz zu allen anderen kernschädigenden Substanzen steht, läßt sich ein besonderer Wirkungsmodus des Dichlors vermuten.

Außer dem Dichlor sind alle bisher bekannten direkt kernschädigenden chemischen Agenzien, wie schon öfter hervorgehoben, Fluoreszenzfarbstoffe. Aber nicht nur in der Eigenschaft der Fluoreszenz, sondern auch in ihrem Formelbild weisen fast alle eine auffallende Ähnlichkeit auf. Offenbar muß ein bestimmtes fluoreszenzfähiges Ringsystem mit mindestens 2 basischen Gruppen vorhanden sein, um eine Wirksamkeit zu entfalten. Sowohl das Ringsystem allein als auch nur die basischen Gruppen allein scheinen noch nicht zur Kernschädigung zu genügen, wie einige Formeln der nicht wirksamen Substanzen zeigen.

Die Wirksamkeit dieser Substanzen brachte schon OESTERLIN (40, 41) mit ihrer Fluoreszenz in Zusammenhang. Er schreibt: „Die Feststellung, daß bei allen metallfreien Präparaten des Cholins und Acridins, unabhängig davon, ob es sich um malariazide, trypanozide oder beispielsweise piroplasmozide Wirkung handelt, immer Fluoreszenz vorhanden ist, hat dazu geführt, diese physikalische Erscheinung in Zusammenhang mit der Wirksamkeit zu bringen.“ Auch chemisch ganz ähnliche Körper haben keine Wirksamkeit, wenn sie nicht gleichzeitig fluoreszierende Körper sind. Ja, es konnte die Feststellung gemacht werden, daß diese Stoffe sogar die fluoreszierenden primär wirksamen Agenzien in ihrer Wirksamkeit unterdrücken.

Die Deutung dieser chemotherapeutischen Interferenz sieht OESTERLIN in „einer Besetzung maßgeblicher Haptophore durch unwirksame, nichtfluoreszierende Verbindungen mit nahe verwandter chemischer Struktur“.

Aber auch mit chemisch ganz anders gebauten Körpern konnte OESTERLIN eine chemotherapeutische Interferenz herbeiführen. Parafuchsin hebt z. B. die Wirkung des Trypaflavins, ja aller jener grün-

fluoreszierenden, trypanoziden Stoffe auf. Aus Versuchen über die Arzneifestigkeit ist aber bekannt, daß Parafuchsin andere haptophore Gruppen wie Acridine oder Styrylchinoline, die es in der Wirksamkeit unterdrückt, hat.

Jedoch ist das Absorptionsspektrum des Parafuchsins mit dem Emissionsspektrum der Acridine weitgehend identisch.

Es sind also nach OESTERLIN zwei Bedingungen notwendig, einmal eine chemische Bindung, die durch Verschiebung der Fluoreszenzbanden in jedem Falle bestätigt werden konnte und zum anderen eine nicht gleich zur Absorption gelangende Chemilumineszenz, die ihrerseits eine Aktivierung von Sauerstoff auslösen könnte oder aber nur als grober Ausdruck eines anregungsfähigen Moleküls einen Teil der freiwerdenden Zellenergie abfängt „und ohne Strahlung in andere Wege leitet, um vielleicht auf diese Weise für die Zelle ungünstige Reaktionen zu veranlassen“.

Eine ähnliche Wirkungsweise wird von den cancerogenen Stoffen, besonders von ADERSON und K. H. BAUER (4), angenommen. Es ist nämlich auch hier beobachtet worden, daß „bei allen bisher untersuchten, chemisch noch so verschiedenen Cancerogenen eine mit der Oxydation zusammenhängende Strahlung gefunden werden konnte“. Und diese Chemilumineszenz, die durch Reaktion eines Kanzerogenmoleküls mit einem hydroxylierenden System innerhalb der Zelle auftritt, könnte man, wie K. H. BAUER schreibt, als direkten Faktor, der die Karzinogenese einleitet, betrachten, indem die ausgesandte Strahlung dann störend auf die stabile Ökonomie der Zelle wirkt.

Es ist ja schon lange bekannt, daß die Lichtsensibilisatoren bei der Lichtkrebsgenese der UV-Strahlung keine unbedeutende Rolle spielen, d. h. daß die UV-Strahlenempfindlichkeit durch photodynamische Farbstoffe, wie z. B. Eosin und Trypaflavin, gesteigert werden kann.

Bei Kranken mit Gesichtskrebs findet man häufig Hämatorporphyrin, der ebenfalls ein fluoreszierender Körper ist, im Urin, und diesen macht man nun seinerseits für die Entstehung des Krebses verantwortlich. Die lichtsensibilisierende Wirksamkeit des Hämatorporphyrins bei der Ca-Entstehung konnte von BÜNGELER [angeführt bei (4)] im Tierversuch bestätigt werden.

Ebenso spielt bei der experimentellen Erzeugung von Tumoren durch Bestreichen mit Methylcholanthren das Licht und besonders das UV-Licht eine maßgebliche Rolle, wie GUMMEL [angeführt bei (4)] 1942 an Mäusen gezeigt hat.

In einem gewissen Widerspruch gegen die hier vorgetragene Hypothese steht die Tatsache, daß die Kerngifte vom Trypaflavintyp auch auf Zellen innerhalb des Körpers, z. B. dem Mäuseascitestumor, wirksam sind. Hier können die Farbstoffe nicht unter Einfluß des Tageslichtes

auf den Zellkern einwirken. Ferner untersuchte ich in einem Nebenversuch die wachstumshemmende Wirkung des Trypaflavin auf die Zwiebelwurzel bei Tageslicht und im Dunkeln.

An der Zwiebelwurzel war fast kein Unterschied zwischen dem Hellversuch und dem Dunkelversuch feststellbar.

Entweder hat das Trypaflavin neben seiner lichtabhängigen chromatinschädigenden Komponente auf sich teilende Zellen noch einen anderen schädigenden lichtunabhängigen Wirkungsmodus oder aber es müssen andere „Strahlen“ bei diesem Prozeß auftreten.

In diesem Zusammenhang wäre vielleicht an die mitogenetischen Strahlen zu denken.

ALTENBURG [(1) 1933] der mit UV-Strahlen Mutationen erzeugte, machte die mitogenetischen Strahlen zum Teil für Spontanmutationen in der Natur verantwortlich, es heißt: „Moreover, it seems probable from the studies of Gurwitsch and others that growing and dividing cells give off ‘mitogenetic’ rays, which are in the ultraviolet region of the spectrum. It therefore seemed desirable to test the effect of ultraviolet light on the mutation rate”.

Heute wird aber vielfach an dem Vorhandensein der mitogenetischen Strahlen gezweifelt (35). Man ist darum vielleicht genötigt, an eine Chemilumineszenz oder an eine andere Energieform, die zugeführt wird, zu denken. Daß diese Energieform ziemlich schwach ist, ist vielleicht der Grund, daß Rivanol, das ja für seine Wirksamkeit auch bei mir eine stärkere Belichtung brauchte, am Mäuseascitestumor im Gegensatz zur Zwiebelwurzel und anderen Versuchsobjekten unwirksam ist. Von anderer Seite wird die Lumineszenzeigenschaft der Kerngifte vom Trypaflavintyp für völlig bedeutungslos angesehen.

BAUCH (2) fand an der Zwiebelwurzel nach Behandlung mit Trypaflavin die üblichen Kernpyknosen und Pseudoamitosen, wie Trypaflavin sie überall hervorruft. Er konnte nun durch Zusatz von Natrium nucleonicum aus Hefe diese Trypaflavinwirkung vollkommen unterdrücken (3). Nukleinsäure erwies sich als ein außerordentlicher Löscher der Lumineszenz des Farbstoffes. Jedoch wird diese Lumineszenzlöschung auch durch Pepton und besonders auch durch Colchicinzusatz erreicht. BAUCH schreibt dann: „Daß diese Löscherscheinung mit den chemischen Reaktionen nichts zu tun haben, ergibt sich am besten aus der Tatsache, daß das Pseudoamitosenbild in den Zellen der Zwiebelwurzel bei gleichzeitiger Darreichung von Trypaflavin und Colchicin in entsprechender Dosierung nicht gestört wird.“

BAUCH sieht den Antagonismus zwischen Trypaflavin und Nukleinsäure in einer extrazellulären chemischen Reaktion zwischen beiden Substanzen, wodurch ein toxikologisch inaktives Trypaflavinnukleat entsteht. Durch die Untersuchungen verschiedener Forscher ist bekannt,

daß Nukleinsäure mit Farbstoffen, speziell auch mit Acridinderivaten, salzartige Verbindungen eingehen. Die chemotherapeutische Wirksamkeit und die Mitosegiftwirkung dieser Substanzen wird von manchen Autoren in einer solchen Salzbildung mit den Nukleinsäuren gesehen. Die Lumineszenz wird dabei ganz außer acht gelassen. Jedoch ist diese Eigenschaft der Salzbildung mit Nukleinsäuren allein zur Erklärung des Wirkungsmechanismus sicher unzureichend, denn wie v. MÖLLENDORF (36) nachwies und wie ich schon erwähnte, haben alle basischen „Kernfarbstoffe“ die Eigenschaft der Präzipitation mit Nukleinsäure, wogegen sie aber keinesfalls alle spezifische Kerngifte sind.

Solche oben beschriebenen Lichtsensibilisatoren sind bei der Krebsentstehung keine Condition sine qua non. Zum Beispiel konnte von HOLTZ und PUTSCHER [angeführt bei (4)] gezeigt werden, daß auch reines UV-Licht bei genügend langer Einwirkung in der Lage ist, bei Tieren einen 100%igen Hautkrebs hervorzurufen.

c) *Einfluß des UV-Lichtes.* Auch durch die S. 183 geschilderten Versuche kann die gleiche Tatsache bestätigt werden, denn durch Bestrahlung mit UV-Licht ohne Zusatz einer Farbstofflösung kann ebenfalls eine deutliche Kernschädigung hervorgerufen werden.

Waren die Spermien vorher mit fluoreszierenden „Kerngiften“ sensibilisiert worden, so war schon normales diffuses Tageslicht sehr stark wirksam. Ohne solche Fluoreszenzfarbstoffe ist der kernschädigende Einfluß des Tageslichtes bisher nicht beschrieben worden.

Da jedoch das UV-Licht in seinen einzelnen Lichtquanten eine bedeutend größere Energie im Vergleich zu niederer Wellenlänge aus dem sichtbaren Bereich des Spektrums hat, untersuchte ich dieses in bezug auf seine Wirksamkeit auf das Spermachromatin.

Wurde die Bestrahlung in der Versuchsanordnung, wie auf S. 183 beschrieben, mit den dazugehörigen Filtern und einer Kuvette mit 4%iger Kupfersulfatlösung durchgeführt (jetzt kam ausschließlich nur noch die Linie 366 μ zur Anwendung), so ergab selbst eine 67 min lange durchgeführte Bestrahlung [*Versuch 1* (1950)] eine nur ganz geringgradige Schädigung. Werden dagegen die Filter und die Kuvette weggelassen, so ergibt eine 72 min [*Versuch 41* (1950)] und eine 68 min [*Versuch 63* (1950)] dauernde Bestrahlung deutliche Schädigungen. Im *Versuch 41* (1950) traten sogar 2 dickbäuchige, d. h. haploide Embryonen auf. Viel länger darf jedoch die Bestrahlung nicht ausgedehnt werden, denn nach 86 min [*Versuch 53b* (1950)] waren die Spermien schon nicht mehr befruchtungsfähig, obwohl sie noch beweglich waren. Außerdem ist eine so lange durchgeführte Bestrahlung auch technisch recht schwierig, da trotz der feuchten Kammer die Spermien suspension deutlich eintrocknet und sich eine Erwärmung mäßigen Grades nicht verhindern läßt.

Eine geringgradige Schädigung tritt, wie ich oben beschrieb, schon bei einer kurzen Bestrahlung von 3 min auf, jedoch bei längerer Bestrahlung steigt die Schädigung nicht linear an, sondern scheint einer Exponentialfunktion zu folgen. Diese Erscheinung bedarf jedoch noch einer eingehenden Untersuchung, ehe man sie im Sinne der Treffertheorie deuten könnte.

Die Angabe in der Literatur über die Bestrahlungsdauer mit UV-Licht, um eine Zellschädigung zu erreichen, ist sehr unterschiedlich. So berichtet SEIDE (52) über eine Verzögerung der Zellteilung des Askariseies nach einer Bestrahlungsdauer von $\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{25}$ sec!! Nach einer Bestrahlungszeit von 15 min bei 5 cm Abstand sah er eine fast 100%ige Zellschädigung. RUPPERT (48) sieht nach einer Bestrahlungszeit von 30 sec des Askariseies auf dem Vorkernstadium dieses außerstande, sich zu teilen. Ja, auf dem Gastrulastadium wird schon nach $\frac{1}{5}$ sec Bestrahlungsdauer eine abnorme Entwicklung beschrieben (ich bestrahlte einige Froschgastrulae 15 min lang und hatten keinerlei Schädigung). Ähnliche Zeiten geben SCHLEIP und DÜRKEN (9) an. STEVENS (54) dagegen bestrahlte Blastomeren von *Ascaris megalocephala* 6—8 Std! Abstand 10 cm vom Tubus. Nach dieser Zeit sind die Zellen nicht etwa immer tot, jedoch wird eine Weiterentwicklung verhindert, obgleich angefangene Mitosen zu Ende geführt werden.

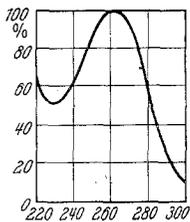


Abb. 4: Absorptionskurve der Thymonucleinsäure, Absorptionsmaximum = 100 gesetzt. (Aus MEYER-SEITZ: Ultraviolette Strahlen.)

Die Ursache liegt nicht nur in den verschiedenen Versuchsobjekten, sondern besonders in der unterschiedlichen UV-Quelle, und so sind die Versuche schwer vergleichbar.

Die Ursache liegt nicht nur in den verschiedenen Versuchsobjekten, sondern besonders in der unterschiedlichen UV-Quelle, und so sind die Versuche schwer vergleichbar.

Ich brachte Spermien unter eine HANAUSCHE Höhensonne S 300 etwa 25 cm von der Lichtquelle entfernt und hier waren die Spermien bereits nach 2 min völlig bewegungslos.

Nach dem GROTTUS-DRAPPERSCHEN Gesetz sind nur die Strahlen wirksam, die absorbiert werden. Während der Mitose ist der Zellkern besonders reich an Thymonucleinsäure, die im Ruhekern oft nur in geringer Menge vorhanden ist. Das Absorptionsmaximum dieser Nucleinsäure liegt bei $263 \mu\mu$ (s. Abb. 4).

Diese Linie war aber in meiner Lichtquelle gar nicht enthalten. Es ist daher nicht verwunderlich, daß meine UV-Versuche nur eine relativ geringe Schädigung zeigten. Bei einem Überblick in der Literatur über die wirksamen Wellenlängen tritt fast ausschließlich Licht der Wellenlängen des UV C in Erscheinung.

Hierzu einige Beispiele [angeführt bei (50)]. Abtötung von Hefe konnte R. H. OSTER mit einer Wellenlänge von 302 — $222 \mu\mu$ erreichen.

Ein Anstieg war bei 302 $\mu\mu$, das Maximum lag bei 265 $\mu\mu$. Die gleichen Wellenlängen fanden O. EHRISMANN und W. NOETHLING für Bakterien und Hefeabtötung. Das Maximum für die Abtötung und die Mutation der Sporen von *Trichophyton mentagraphytaes* lag bei 254 $\mu\mu$ bzw. 265 $\mu\mu$ (C. W. EMMONS, A. HOLLAENDER). Auch die Virusabtötung hat hier (265 $\mu\mu$) ihr Maximum, wie B. M. DRUGGAR und A. HOLLAENDER zeigten. A. C. GIESE beschreibt auch für die Spermien vom Seeigel (*Strongylocentotus purpuratus*) ein Maximum der Strahlenempfindlichkeit bei 265 $\mu\mu$.

Schlußbetrachtung.

Ich komme also zu dem Schluß, daß durch meine Arbeit erstmals festgestellt wird, daß die Wirkung der Kerngifte vom Trypaflavintyp auf die Spermien des Frosches ein rein photodynamischer Vorgang ist, und daß das Licht bei allen fluoreszierenden kernschädigenden Farbstoffen eine *Conditio sine qua non* für die Kernschädigung ist.

Es soll natürlich keineswegs damit behauptet werden, daß Trypaflavin und seine Verwandten im Dunkeln völlig unwirksam seien (31). Nur die spezifisch kernschädigende Wirkung ist ans Licht oder an die Einwirkung einer anderen zusätzlichen Strahlungsenergie gebunden.

Abschließend ergreife ich gern die Gelegenheit, Herrn Prof. Dr. med. GÜNTHER HERTWIG für die Anregung zu den vorliegenden Untersuchungen sowie für die wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der Versuche meinen aufrichtigen Dank auszusprechen.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. 38 verschiedene chemische Substanzen, von denen die meisten in der Literatur als Kerngifte genannt sind, wurden an den Samenfäden des Frosches auf ihre kernschädigende Wirkung geprüft, indem mit den chemisch vorbehandelten Samenfäden normale Eier besamt wurden und aus der normalen bzw. gestörten Entwicklung die Wirksamkeit gefolgert wurde.

2. Dabei zeigte es sich, daß alle geprüften sauren Farbstoffe, aber auch einige basische Farbstoffe wie Methylgrün, vor allem aber auch die als Mitosegifte katexochen beschriebenen chemischen Verbindungen wie Urethan und Colchicin die Kerne der Froschspermien ganz unverändert lassen.

3. Dagegen gelingt es mit den Kerngiften des Trypaflavintypus (Acridine, Thiazine usw.), Kernschädigungen zu erzielen.

4. Alle Kerngifte des Trypaflavintypus sind Fluoreszenzfarbstoffe und haben basischen Charakter.

5. Die kernschädigende Wirksamkeit der basischen Fluoreszenzfarbstoffe ist unmittelbar an das Tageslicht gebunden, d. h. im Dunkeln

sind die Kerngifte des Trypaflavintyps auch bei sehr langer Exposition auf die Kerne der Froschspermien indifferent, es handelt sich also um ein rein photodynamisches Geschehen.

6. Außerdem haben alle diese fluoreszierenden Farbstoffe einen schädigenden Einfluß auf das Protoplasma, kenntlich an der Abnahme der Beweglichkeit der Spermatozoen; auch diese Erscheinung ist an das Licht gebunden.

7. Noch eher als die Beweglichkeit leidet durch diese Gifte unter Lichtzutritt die Befruchtungsfähigkeit der Spermien. Es wird damit auch für die Anuren das Vorhandensein von Gamonen wahrscheinlich gemacht, die als lichtsensible Körper, sensibilisiert durch die Fluoreszenzfarbstoffe, bei Tageslicht rasch zerstört werden.

8. Auf die Beweglichkeit und Befruchtungsfähigkeit (Gamone) wirken neben den basischen Fluoreszenzfarbstoffen auch saure Fluoreszenzfarbstoffe (z. B. Eosin) in Verbindung mit Tageslicht.

9. Eine Sonderstellung unter den untersuchten Kerngiften nimmt das Dichloren (Senfgas bzw. Stickstofflost) ein. Es ist die einzige von den 38 untersuchten Substanzen, die sowohl im Hellen wie im Dunkeln kernschädigend wirkt. Hier liegt der Wirksamkeit offenbar ein rein chemisches Geschehen zugrunde. Ein Vergleich der Formelbilder der wirksamen Substanzen zeigt ebenfalls das unterschiedliche Verhalten des Dichlorens.

10. Durch Bestrahlung der Spermien suspension ohne Zusatz irgendwelcher Chemikalien mit UV-Licht wird ebenfalls eine Kernschädigung hervorgerufen.

Literatur.

1. ALTENBURG, E.: The Produktion of Mutation by Ultra-Violet Light. *Science* (Lancaster, Pa.) **78**, 587 (1933). — 2. BAUCH, R.: Irreversible Chromosomenschäden durch Trypaflavin. *Planta Berl.* **35**, 536 (1948). — 3. BAUCH, R.: Selektive Speicherung von Trypaflavin durch die Nukleoproteide der Chromosomen. *Biol. Zbl.* **68**, 113 (1949). — 4. BAUER, K. H.: Das Krebsproblem. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1949. — 5. BOCK, H. E.: Behandlung auch nicht-leukämischer Erkrankungen, insbesondere der Lymphogranulomatose, mit Urethan nebst Bemerkungen über den Mechanismus der Urethanwirkung. *Klin. Wschr.* **1948**, Nr 25/26, 390. — 6. BROCK, N., H. DRUCKREY u. H. HERKEN: Über Kerngifte und Cytoplasmagifte. *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **193**, 679. — 7. BRODERSEN, H.: Mitosegifte und ionisierende Strahlung. *Strahlenther.* **73** (1943). — 8. DOETSCH, H.: Experimentelle Untersuchung über den Einfluß des Lichtes und der ultravioletten Strahlen auf Wachstum und Entwicklung der Amphibienlarven. *Arch. Entw.-mech.* **144**, 25 (1949). — 9. DÜRKEN, B.: Versuche über Bestrahlung der Amphibienblastula mit Ultraviolett. *Z. Zool.* **154** (1941). — 10. DUSTIN, P.: The cytological action of ethylcarbamate (urethane) and other carbamic esters in normal and leukaemic mice and in rabbits. *Brit. J. Canc.* **1**, 48 (1947). *Ref. Klin. Wschr.* **1948**, Nr 9/10, 156. — 11. EICHHOLTZ, F.: Lehrbuch der Pharmakologie. Berlin-Heidelberg: Springer 1947. — 12. ETCHLER, O.: Prinzipien des Lebendigen. Stuttgart: Georg Thieme 1949. — 13. HAAS, H. T. A.: Über die Beeinflussung des

- Zellkernes durch Pharmaka. Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **197**, 284. — 14. HARTMANN, M.: Die Sexualität. Jena: Gustav Fischer 1943. — 15. HEILMEYER, L.: Zur Chemotherapie neoplastischer Erkrankungen. Naturwiss. **1950**, H. 3. — 16. HERTWIG, G.: Radiumbestrahlung unbefruchteter Froscheier und ihre Entwicklung nach Befruchtung mit normalem Samen. Arch. mikrosk. Anat., 2. Abtl. **77** (1911). — 17. HERTWIG, G.: Das Schicksal des mit radiumbestrahlten Spermachromatins im Seeigeli. Eine experimentell-cytologische Untersuchung. Arch. mikrosk. Anat., 2. Abtl. **79** (1912). — 18. HERTWIG, G.: Parthenogenese bei Wirbeltieren, hervorgerufen durch artfremden, radiumbestrahlten Samen. Arch. mikrosk. Anat., 2. Abtl. **81** (1913). — 19. HERTWIG, G.: Trypaflavin als Radiumersatz zur Gewinnung haploidkerniger Froschlarven. Anat. Anz. Erg.-H. **58** (1924). — 20. HERTWIG, G., u. P.: Beeinflussung der männlichen Keimzellen durch chemische Stoffe. Arch. mikrosk. Anat. 2. Abt. **83** (1913). — 21. HERTWIG, O.: Die Radiumkrankheit tierischer Keimzellen. Ein Beitrag zur experimentellen Zeugungs- und Vererbungslehre. Arch. mikrosk. Anat., 2. Abt. **27** (1911). — 22. HERTWIG, O.: Die Radiumkrankheit tierischer Keimzellen. Ein Beitrag zur experimentellen Zeugungs- und Vererbungslehre. Arch. mikrosk. Anat., 2. Abt. **77** (1911). — 23. HERTWIG, O.: Veränderung der idioplasmatischen Beschaffenheit der Samenfäden durch physikalische und durch chemische Eingriffe. Sitzgsber. der königl.-preuß. Akad. der Wiss. 20. Juni 1912 und 12. Juni 1913. — 24. HERTWIG, P.: Das Verhalten des mit Radium bestrahlten Spermachromatins im Froschei. Ein cytologischer Beweis für die parthenogenetische Entwicklung der Radiumlarven. Arch. mikrosk. Anat., 2. Abt. **81** (1913). — 25. HOHL, K.: Elf Untersuchungen über Röntgeneffekte und chem. Effekte auf die pflanzlichen Mitosen. Stuttgart: Georg Thieme 1949. — 26. HOLTZ, F.: Die Photoaktivierung des Ergosterins zum antirachitischen Vitamin D. Strahlenenergie **28** (1928). — 27. KNAPP, E., A. REUSS, O. RISSE u. H. SCHREIBER: Quantitative Analyse der mutationsauslösenden Wirkung monochromatischen UV-Lichtes. Naturwiss. **27**, H. 18 (1939). — 28. LEHMANN, F. E., W. BERNHARD, H. HADORN u. M. LÖSCHER: Zur entwicklungsphysiologischen Wirkungsanalyse von antimitotischen Stoffen. Experientia **1**, 1 (1945). — 29. LEHMANN, F. E.: Chemische Beeinflussung der Zellteilung. Experientia **3**, 1 (1947). — 30. LEHMANN, G.: Die Wasserstoffionemessung. Leipzig: Johann Ambrosius Barth 1928. — 31. LENZ, E.: Untersuchungen über die pharmakologischen Elementarwirkungen in der Akridin- und Akridiniumgruppe. Z. exper. Med. **12** (1921). — 32. LETTRÉ, H.: Ergebnisse und Probleme der Mitosegiftforschung. Naturwiss. **1946**, H. 3. — 33. LETTRÉ, H., u. R.: Aufhebung der Wirkung von Mitosegiften durch chemische Faktoren. Naturwiss. **1946**, H. 9. — 34. LETTRÉ, H.: Zum Problem der krebspezifischen Mitosegifte. Z. Krebsforschg **56**, H. 3, 297. — 35. MEYER, A. E. H., u. E. O. SEITZ: Ultraviolette Strahlen. Berlin: Walter de Gruyter & Co. 1949. — 36. MÖLLENDORF, W., v.: Untersuchungen zur Theorie der Färbung fixierter Präparate. Erg. Anat. **25**, (1924). — 37. MUSSGUG, G.: Über cytostatische Stoffe. Pharmazie **1949**, H. 5. — 38. OEHLKERS, F.: Die Auslösung von Chromosomenmutationen in der Meiose durch Einwirkung von Chemikalien. Z. Abstammgslehre **81**, 313. — 39. OEHLKERS, F.: Weitere Versuche zur Mutationsauslösung durch Chemikalien. Biol. Zbl. **65** (1946). — 40. OESTERLIN, M.: Deduktive Chemotherapie. Klin. Wschr. **1936**, 957. — 41. OESTERLIN, M.: Chemotherapie, Fluoreszenz und Krebs. Klin. Wschr. **1936**, 1719. — 42. OPPERMANN, K.: Die Entwicklung von Forelleneiern nach Befruchtung mit radiumbestrahlten Samenfäden. Arch. mikrosk. Anat., 2. Abt., **83** (1913). — 43. OPPERMANN, K.: Die Entwicklung von Forelleneiern nach Befruchtung mit radiumbestrahlten Samenfäden. Teil 2. Arch. mikrosk. Anat., 2. Abt. **83** (1913). — 44. POLITZER, G.: Pathologie der Mitose. Protokollmonographien, Bd. 7. — 45. POLITZER, G.: Versuche über den Einfluß

des Neutralrotes auf die Zellteilung. Z. Zellenlehre 1, 644. — 46. POLITZER, G.: Über die Giftwirkung des Neutralrotes. Biochem. Z. 151, 43. — 47. RIES, E.: Die Bedeutung spezifischer Mitosegifte für allgemeinere biologische Probleme. Naturwiss. 1939, H. 30, 505. — 48. RUPPERT, W.: Empfindlichkeitsänderung des Ascariseies auf verschiedene Stadien der Entwicklung gegenüber der Einwirkung ultravioletter Strahlen. Z. Zool. 123 (1924). — 49. ROSENBERGER, G.: Durchführung der künstlichen Besamung bei Ziegen. Dtsch. tierärztl. Wschr. Tierärztl. Rdsch. 1944, 121. — 50. SCHREIBER, H.: Die Wellenlängenabhängigkeit des lichtbiologischen Effektes. Strahlenther. 77. — 51. SCHULZE, E., E. FRITZE u. H. H. MÜLLER: Die Wirkung des Urethans bei Leukämien. Dtsch. med. Wschr. 1947, 371. — 52. SEIDE, J.: Zur Kenntnis der biologischen Strahlenwirkung. Untersuchungen am Ascarisei mit ultravioletten, Röntgen- und Radiumstrahlen. Z. Zool. 124 (1925). — 53. STAUDENMAYER, T.: Fluorochromierung von Antropodengewebe. Naturwiss. 1950, H. 3. — 54. STEVENS, N. M.: The Effect of Ultra-Violet-Light upon the Developing Eggs of *Ascaris megalocephala*. Arch. Entw.-mech. 27 (1909). — 55. STRUGGER, S., u. G. ROSENBERGER: Vitalfärbung der Ziegenspermatozoen mit Akridinorange. Dtsch. tierärztl. Wschr. u. Tierärztl. Rdsch. 1944, 357. — 56. STRUGGER, S.: Vitalfluorochromierung des Protoplasmas. Naturwiss. 1947, H. 9, 267. — 57. TAPPEINER, H., u. A. JODLBAUER: Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. Leipzig: F. C. W. Vogel 1907. — 58. WITSCHI, E.: Die Entwicklung der Keimzellen der *Rana temporaria*. Teil 1: Urkeimzellen und Spermatogenese. Z. Zellenlehre 1 (1924).

Dr. KONRAD DREBINGER, (1) Berlin-Tempelhof,
Tempelhofer Damm 111.
