

(Aus dem pathologischen Institut der Friedrich-Schiller-Universität Jena
[Stellv. Direktor: Prof. Dr. E. Schairer].)

Die Entstehung von Benzpyrentumoren bei Ratten und ihre Beeinflussung durch d,l-Leucylglyzin sowie saure und alkalische Kost^{1, 2}.

Von

E. Schairer.

(Mit 7 Abb. und 1 Tabelle im Text.)

(Eingegangen am 5. März 1943.)

Das Untersuchungsmaterial für die vorliegende Arbeit wurde gewonnen anlässlich von Nachprüfungen der Versuche von *Waldschmidt-Leitz*²⁴ über die Beeinflussung des Tumorwachstums durch d,l-Peptide — als kurze wissenschaftliche Mitteilung von *Schairer* und *Rechenberger*²¹ bereits veröffentlicht — und von Versuchen über die Beeinflussung des Tumorwachstums durch verschiedene Kostformen, die zusammen mit *Laage*¹² durchgeführt wurden. Bei der Auswertung dieser Versuche, vor allem auch bei der histologischen Untersuchung, waren einige Ergebnisse zu verzeichnen, die wir für mitteilenswert halten.

Insgesamt benutzten wir in unseren Versuchen 180 Ratten eigener Zucht, die am Versuchsbeginn ein Gewicht von 100—200 g, meist etwa 150 g aufwiesen. Sie erhielten sämtlich 1 ccm einer 1,5%igen Benzpyrenlösung in Olivenöl in die Oberschenkelmuskulatur eingespritzt. 20 von diesen Tieren (Gruppe II der Tabelle) dienten als Kontrollen und erhielten keinerlei sonstige Behandlung. Eine weitere Gruppe (III) von 20 Tieren wurde 3mal wöchentlich mit je 1,25 ccm *Ringer*-Lösung intraperitoneal gespritzt, während die Tiere der Gruppen I und IV (je 20 Tiere) 3mal wöchentlich 1,25 ccm einer 1,6%igen Lösung von d,l-Leucyl-Glyzin (hergestellt nach den Vorschriften von *E. Fischer*) in *Ringer*-Lösung intraperitoneal bekamen. Sämtliche 80 Tiere der Gruppen I—IV erhielten die gewöhnliche, vor allem aus Küchenabfällen, daneben Getreideschrot bestehende Nahrung, bei der sie gut gediehen.

Zwei Gruppen von je 20 Tieren (Gruppe V und VI der Tabelle), die ebenfalls mit 1 ccm einer 1,5%igen Benzpyrenlösung einmal intramuskulär gespritzt worden waren, erhielten nicht die gewöhnliche Kost, sondern vom Zeitpunkt der Einspritzung ab eine saure Kostform, bestehend aus rohem Fleisch und Haferschrot. Außerdem wurde der Nahrung täglich pro Tier 0,05 g Calciumchlorid in Lösung zugefügt. Der Harn dieser Tiere wies bei einer Messung ein p_H von 6,4 auf.

Die restlichen Tiere erhielten eine alkalische Kartoffel- und Milchkost, der pro Tier und Tag 0,1 g Calciumcarbonat zugefügt wurde. Der p_H des Urins dieser Tiere betrug bei einer Messung 7,3.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, starben von den Gruppen I—VI nur wenige Tiere während des Versuches. Dagegen kam es bei den

¹ Herrn Professor Dr. A. Dietrich zum 70. Geburtstag gewidmet.

² Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung durch die Köhlerstiftung durchgeführt.

alkalisch ernährten Tieren der Gruppe VII zu größeren Ausfällen, da die Tiere aus ernährungstechnischen Gründen auf dem Lande untergebracht wurden. Dort wurden sie zuerst mit gekochten Kartoffeln und pasteurisierter Magermilch ohne Zusätze ernährt und erwarben eine Avitaminose B. Ein größerer Teil der Tiere verstarb vorzeitig unter Lähmungserscheinungen. In dieser Gruppe konnten somit nur 13 Versuche abgeschlossen werden. Späterhin waren die Tiere dann vollwertig ernährt worden.

Tabelle 1.

Gruppen	I	IV	II	III	V	VI	VII
Art der Behandlung	d,l-Leucyl-Glycin in Ringer-Lösung	unbehandelt	Ringer-Lösung		sauere Nahrung		basische Nahrung
Geschlecht	♂	♀	♀	♂	♂	♀	gemischt
Gesamtzahl der abgeschlossenen Versuche	19	18	15	16 (8)	18	19	13
Zahl der tumorpositiven Versuche	18	18	15	15 (8)	16	19	11
Durchschnittsgewicht der Tiere am Versuchsbeginn in g .	198	142	152	132	140	129	139
Durchschnittsgewicht der Tiere am Versuchsende in g .	222	172	189	217	196	168	177
Durchschnittliche Gewichtszunahme in %	12	21	24	—	40	26	27
Maximale Gewichtszunahme in %	17	24	24	—	61	30	—
Durchschnittliches Tumorgewicht in g	26	24	32	42	45	37	30
Beginn der Tumorbildung nach Tagen	132	126	131	133	132	123	136
Abschluß des Versuches nach Tagen	163	152	157	165	161	152	184
Wachstumsdauer der Geschwülste in Tagen . . .	31	26	26	32	29	29	48
Metastasen							
in den Leistenlymphknoten	2	2	0	0	2	1	2
in den Aortenlymphknoten	3	6	0	3	6	4	2
in anderen Lymphknoten .	1	0	0	0	1	0	1
in der Lunge	1	1	0	0	0	0	1
insgesamt bei Tieren . . .	3	6	0	3	7	4	2

Die Tiere erhielten sämtlich die beschriebene Behandlung bis zu ihrem Tode. Während des Versuches wurde regelmäßig das Gewicht kontrolliert, außerdem die Einspritzungsstellen nachgesehen. Als Zeitpunkt des Beginns der Tumorbildung wurde der Augenblick angesehen, wenn sich in der vorhandenen meist fühlbaren Ölcyste eine umschriebene Verhärtung bildete, die schnell wuchs. Die Tiere starben entweder spontan oder wurden getötet, wenn nach der Größe des Tumors der Tod in Kürze zu erwarten war. Nur die letzten Tiere wurden zeitiger getötet, um die Versuche abzuschließen. Außerdem starben von Gruppe III 8 Tiere durch einen Unglücksfall eher (115 Tage nach Versuchsbeginn).

7 davon hatten aber schon, wenn auch kleine, Geschwülste. Bei jedem Tier wurde eine ausführliche Sektion vorgenommen, das Gewicht des Tumors festgestellt, nach Metastasen in den Lymphknoten und in den inneren Organen, vor allem der Lunge, gesucht. Die Geschwülste wurden fast sämtlich mikroskopisch untersucht, meist auch mit dem Lumineszenzmikroskop. Jeder verdächtige Lymphknoten und fast sämtliche Lungen wurden ebenfalls mikroskopiert.

Infolge des vorzeitigen Todes mehrerer Versuchstiere, besonders in der Gruppe VII, waren wir in der Lage, zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Einspritzung des Benzpyren-Olivenöldepots Tiere makroskopisch und mikroskopisch zu untersuchen. Wir haben ein Tier 12 Tage, ein anderes 17 Tage, 4 Tiere 37 Tage, ein Tier 42 Tage, 6 Tiere 61 Tage, ein Tier 75 Tage und ein Tier 125 Tage nach der Benzpyreneinspritzung untersucht, ohne schon Tumor zu finden. 7 weitere Tiere (aus Gruppe III) wurden 115 Tage nach der Einspritzung untersucht, wiesen aber schon sichere kleine Geschwülste auf.

Es folgen nunmehr zunächst die Untersuchungsbefunde der Tiere, die vor Entwicklung eines Tumors starben. Da die Latenzzeit in der Gruppe VII, aus der diese Tiere hervorgingen, nicht länger und die Tumorbildung nicht seltener war als in den übrigen Gruppen, ist nicht anzunehmen, daß durch die anfängliche Avitaminose eine wesentliche Beeinflussung des histologischen Befundes entstand, so daß dieser wohl auch für die normalen Tiere gilt.

Bei den Tieren, die 12 bzw. 17 Tage nach der Einspritzung des Öls starben, findet man in der Oberschenkelmuskulatur eine Ölyste mit glatter Wand. Das Öl fluoresziert deutlich blau. Zeichen von Entzündung sind nicht nachweisbar. Die mikroskopische Untersuchung ergibt einen mit Öl gefüllten Hohlräum. Die Wand besteht aus quergestreifter Muskulatur, die keine Veränderungen zeigt, sondern ganz regelmäßig angeordnet ist. Der Hohlräum der Cyste ist von ihr nur durch eine dünne, zellarme Bindegewebssmembran geschieden, von der aus einzelne, faser- und zellarme Ausläufer sich in die Cyste hinein erstrecken, die sich zum Teil girlandenartig schließen, so daß am Cystenrande mehrfache kleinere und größere Hohlräume abgetrennt werden, die von Öl erfüllt und von spärlichem Bindegewebe abgegrenzt sind.

Die Tiere, die 37—42 Tage nach der Einspritzung des Öls starben, zeigten durchweg dasselbe Bild (s. Abb. 1). Auch hier Abgrenzung der Muskulatur durch einen dünnen, zellarmen Bindegewebsssaum mit Bildung einzelner, kleiner Cysten. In der umgebenden Muskulatur, vor allem im Bindegewebe um Gefäße und Nerven, spärliche Rundzelleninfiltrate. Keine Zeichen stärkerer Reizung.

Das makroskopische Bild bei den Tieren, die 61, 75 Tage und noch später nach der Einspritzung untersucht wurden, war von dem bisher beschriebenen nicht wesentlich verschieden. In einigen Cysten ist das Öl etwas eingedickt und auskrystallisiert. Im übrigen zeigt es noch deutliche Fluoreszenz. Die mikroskopische Untersuchung ergibt aber erhebliche Unterschiede gegenüber den früheren Bildern: Die Cystenwand ist, meist an umschriebenen Stellen, dicker und vor allem zellreicher geworden. Es finden sich Rundzelleninfiltrate, besonders in der Umgebung der Gefäße. Daneben aber sieht man eine größere Anzahl spindeliger Zellen mit ovalen bis länglichen Kernen und undeutlich abgegrenztem Protoplasmaleib. Auch die

am Rande der großen Cyste gebildeten kleineren Cystchen sind vermehrt, wobei man den Eindruck gewinnt, daß aus größeren Cystchen mehrere kleinere entstanden sind. Die Membranen, die diese Hohlräume voneinander trennen, sind breiter, saftiger, zellreicher geworden. In der an die Cyste grenzenden Muskulatur treten ebenfalls Wucherungen von spindeligen Zellen in umschriebenen Bezirken auf neben



Abb. 1. Wand einer Ölyste, 37 Tage nach der Einspritzung. Fehlende Gewebsreaktion. H.E. Mittlere Vergr.

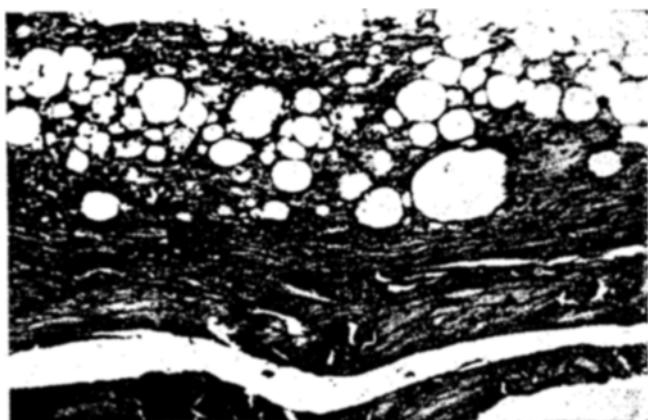


Abb. 2. Wand einer Ölyste, 125 Tage nach der Einspritzung. Vorwiegend spindelzellige Reaktion mit Einbeziehung der innersten Muskellagen. H.E. Mittlere Vergr.

mäßigen Rundzelleninfiltraten. Bei der Fettfärbung sieht man im Gewebe am Cystenrande häufig Fettröpfchen im Zellprotoplasma, die bei der Untersuchung mit dem Lumineszenzmikroskop zum Teil blau, zum Teil mehr grünlich aufleuchten.

Bei einigen der Tiere, die nach 61 Tagen starben, vor allem aber bei dem Tier, das 125 Tage nach der Einspritzung des Benzypyrens untersucht wurde und noch keine Geschwulstbildung zeigte, war das Gewebe am Rande der Cyste noch etwas unruhiger. Die Zellen waren polymorph, teils spindelig, teils oval und von verschiedener Größe. Die Wucherung erstreckte sich vor allem entlang den Gefäßen

tiefer in die Muskulatur hinein, war aber auch in diesen Fällen auf umschriebene Stellen der Cystenwand beschränkt (s. Abb. 2 und 3).

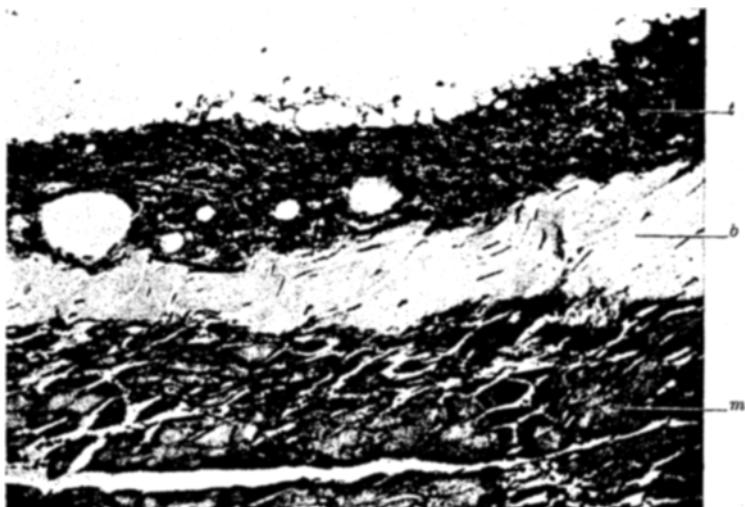


Abb. 3. Andere Stelle der Wand derselben Cyste wie in Abb. 2. Dichte Wucherung von unreifen Zellen. Beginnender Tumor? (t). Muskulatur m, Bindegewebe b. H.E. Starke Vergr.



Abb. 4. Kleiner Tumor (t) in einer Cystenwand 115 Tage nach der Einspritzung. Infiltrierendes Einwachsen in die Muskulatur (m). H.E. Schwache Vergr.

Bei den 7 Tieren der Gruppe III, die vorzeitig nach 115 Tagen gestorben waren, war im Gegensatz zu den bisher geschilderten Befunden eine Geschwulst nachzuweisen. Bei der Untersuchung mit bloßem Auge fand sich in der Wand der immer noch völlig erhaltenen Ölcyste meist ein umschriebenes, grauweißes, etwas nach der Lichtung, besonders aber gegen die Muskulatur vorspringendes Knötchen (s. Abb. 4). Bei einigen Tieren waren die Knoten schon etwas größer, umfaßten

die Cyste in einem größeren Anteil und waren schon weit in die Muskulatur vorgewachsen. Die mikroskopische Untersuchung ergab das Bild eines teils mehr spindelzelligen, teils mehr polymorphzelligen Sarkoms mit zahlreichen Mitosen, das sich knotenförmig am Rande der Cyste entwickelt hatte und sich nun entlang der Cystenwand sowie in den Bindegewebssepten der Muskulatur ausbreitete. Lumineszenzmikroskopisch findet man in den Tumorzellen, die nahe am Rande der Cyste liegen, noch Fettropfen mit blauer und grünlicher Fluorescenz. Diese fehlt dagegen völlig in den weiter davon entfernten Tumorzellen, vor allem auch in den großen Geschwülsten.

Zusammengefaßt verläuft also die Tumorentstehung bei unseren mit 1,0 ccm einer 1,5%igen Benzpyrenlösung intramuskulär am Oberschenkel gespritzten Ratten folgendermaßen: Zunächst bildet sich eine einfache Ölcyste mit so gut wie reaktionsloser, bindegewebig-muskulärer Wand. Selbst 40 Tage nach der Einspritzung sind noch keinerlei erhebliche reaktive Erscheinungen nachzuweisen. Erst nach 60 Tagen tritt ein dünner Wall vor allem von Rundzellen und Spindelzellen auf, der sich auch auf die Muskulatur in ihren oberflächlichsten Schichten ausdehnt. Im Verlaufe der anschließenden 1—2 Monate kommt es im allgemeinen an einer umschriebenen Stelle der Cystenwand zur Tumorbildung, die dann schnell auf die übrige Wand und die anliegende Muskulatur übergreift. Nach 120—130 Tagen sind die Geschwülste gewöhnlich so groß, daß sie mit der Hand getastet werden können.

Von 118 Tieren, bei denen der Versuch als abgeschlossen gelten konnte, bekamen 112 Geschwülste, also 95%. Dies entspricht der häufiger im Schrifttum getroffenen Feststellung, daß bei Anwendung von carcinogenen Substanzen an geeigneten Orten und in genügend hohen Dosen Geschwülste in einem sehr hohen Prozentsatz, ja bis zu 100% auftreten (s. z. B. Oberling, Guérin et Guérin¹⁷). Den frühesten Tumor erhielten wir in Gruppe I 77 Tage nach der Einspritzung des Benzpyrens. Im Durchschnitt begann die Tumorbildung in den einzelnen Gruppen nach 123—136 Tagen (s. Tabelle). Dies entspricht etwa den Angaben im Schrifttum. Selbst 190 Tage nach der Einspritzung des Benzpyrens trat in unserer Gruppe V noch ein Tumor auf. Natürlich geben diese Zeiten nicht den eigentlichen Beginn der Tumorbildung an, sondern nur die erste Möglichkeit, ihn zu tasten. Der Beginn des geschwulstartigen Wachstums muß früher angenommen werden.

Wenn die Geschwülste einmal fühlbar geworden waren, wuchsen sie meist sehr rasch weiter und waren gewöhnlich im Verlauf von einem, höchstens von 2 Monaten so groß geworden (s. Tabelle), daß sie den Tod der Versuchstiere herbeiführten. Dies läßt darauf schließen, daß die Zeit zwischen dem eigentlichen Beginn der Tumorbildung und dem von uns durch Tasten festgestellten Anfang nicht allzu lang sein wird.

Die Gewebsart der durch unsere intramuskuläre Einspritzung von Benzpyrenlösung entstandenen Geschwülste haben wir in den meisten Fällen festgestellt. Im ganzen wurden 109 Geschwülste histologisch

untersucht. Davon war eine ein Rundzellensarkom, 14 waren einfache Spindelzellsarkome. Die übrigen 94 (86%) waren polymorphzellige Sarkome mit Riesenzellen (s. Abb. 5). Man fand darin ovale und spindelige Zellen, aber auch zahlreiche, zum Teil bandförmige Riesenzellen, die sehr an Muskelzellen erinnerten, manchmal auch Fibrillen im Protoplasma aufwiesen. Da die Geschwülste in der Muskulatur entstanden und weitergewachsen waren, war es im Primärtumor sehr schwer, festzustellen, ob es sich um neugebildete, unreife Muskelzellen oder um

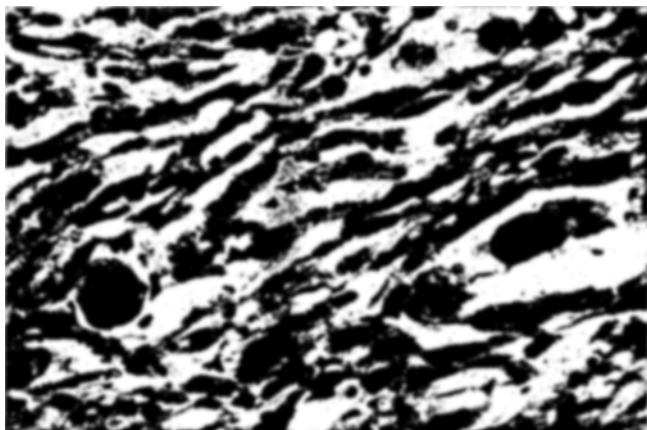


Abb. 5. Rhabdomyosarkom mit Riesenzellen und Spindelzellen (unreife Myoblasten).
Primärtumor. H.E. Starke Vergr.

untergehende, vielleicht zum Teil regenerierende Fasern (Muskelknospen) handelte. In einigen Fällen waren jedoch auch in den Metastasen in den Lymphknoten, also an Stellen, an denen sicher vorher keine Muskelfasern gewesen waren, solche Riesenzellen zu finden (s. Abb. 6 und 7). Auch die Spindelzellen dieser Tumoren schienen in ihrer breiten und kurzen Form mit ihren an den Ecken abgerundeten Kernen eher Myoblasten als Fibroblasten zu entsprechen. Daher ist der Schluß wohl erlaubt, daß die meisten der gefundenen Sarksome Rhabdomyosarkome sind, die aus der Muskulatur hervorgingen. Wie weit auch die Spindelzellsarkome und Rundzellensarkome nur entdifferenzierte Myosarkome sind, ist nicht mit Sicherheit festzustellen. Sie könnten natürlich auch aus dem Muskelbindegewebe hervorgegangen sein.

Im Schrifttum bestehen über die Histologie der durch Einspritzung von carcinogenen Substanzen in die Muskulatur entstandenen Geschwülste gewisse Widersprüche. *Klinke*¹¹ betont, daß bei seinen Untersuchungen an Mäusen und Ratten, denen ein- oder mehrmals eine 1%ige Lösung von Benzpyren in einer Olivenöl-Schweinefettmischung intramuskulär gespritzt worden war, nur vom Bindegewebe ausgehende Tumoren entstanden. Dabei hat *Klinke* 79 Mäusetumoren und

156 Rattengeschwüste untersucht, also eine recht große Anzahl. *Klinke* schließt, daß die Muskulatur viel weniger zur Tumorbildung neige als das Bindegewebe.

Anderen Untersuchern ist es jedoch gelungen, durch Gaben von Benzpyren, Methylcholanthren und Dibenzanthrazen Rhabdomyosarkome zu erzeugen. *Dittmar*⁶

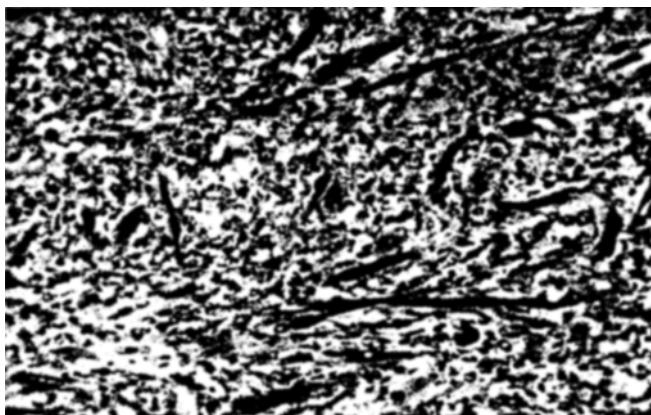


Abb. 6. Lymphknotenmetastase desselben Tumors wie in Abb. 5. Bandförmige Muskelriesenzellen. H.E. Mittlere Vergr.

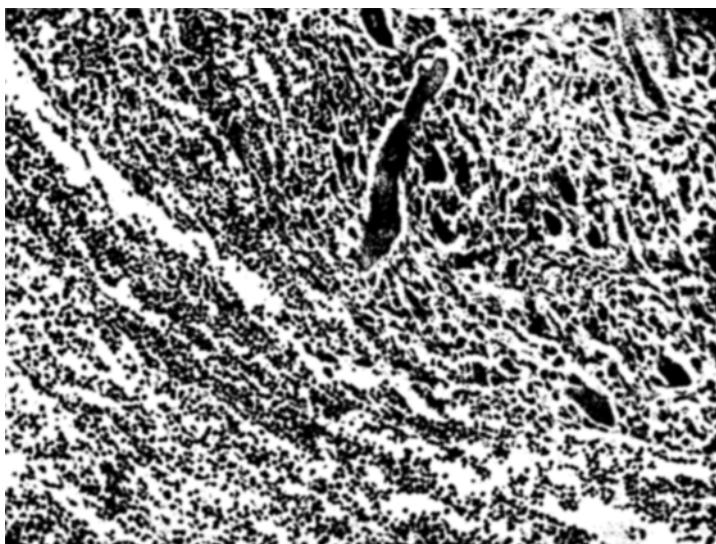


Abb. 7. Lymphknotenmetastase eines weiteren Rhabdomyosarkoms. *Heidenhains Eisenhämatoxylin.* Starke Vergr.

glückte es, durch subcutane Einspritzung von Benzpyren in öliger Lösung bei 2 Mäusen Rhabdomyosarkome zu erhalten. *Woglam*²⁶ fand unter 16 subcutanen Tumoren, die durch mit Benzpyren getränkte Fäden erzeugt waren, 8 Myosarkome. Vielleicht sind auch die von *Benecke* und *Schröder*^{2a} durch Einspritzung von Benz-

pyren in die Parotis von Ratten erzielten riesenzellhaltigen Geschwülste hierher zu rechnen.

*Strong*²³ erzeugte durch subcutane Injektion von 1,0 mg Methylcholanthren in 0,1 ccm Sesamöl, bei Mäusen neben Spindelzellsarkomen, Plattenepithelcarcinomen und Adenocarcinomen der Brustdrüse auch Rhabdomyosarkome. *Chahovitch*⁵ gelang es, bei einer Ratte durch intramuskuläre Injektion von Methylcholanthren in die Rückenmuskulatur ein Rhabdomyosarkom zur Entstehung zu bringen. Unter den von *Roussy* und *Guérin*²⁰ durch Einspritzung carcinogener Substanzen erzeugten Geschwülsten waren ebenfalls Myosarkome. *Lewis*¹⁵ erhielt bei Mäusen nach Einspritzung von 0,8 mg Dibenzanthrazen, in Schmalz oder Olivenöl gelöst, 28 Spindelzellsarkome und 22 Geschwülste, bei denen neben Spindelzellen modifizierte Skeletmuskelfasern, Muskelriesenzellen und Myoblasten nachzuweisen waren. Die Geschwülste wurden auf Mäuse desselben Stammes transplantiert, wobei in den späteren Generationen die Muskelemente bis auf wenige Fälle verschwanden. Ähnliche Beobachtungen machte übrigens auch *Dittmar*⁶. *Lewis*¹⁵ glaubt, daß die Muskelemente in den späteren Generationen aus Myoblasten entstanden sein könnten und er diskutiert die Möglichkeit, daß die Spindelzellsarkome Myosarkome mit fehlender Weiterdifferenzierung sein könnten.

Diese Auffassung hat nach unseren Beobachtungen viel Wahrscheinlichkeit für sich. Wir untersuchten bei unseren Geschwülsten zahlreiche Lymphknoten- und Lungenmetastasen. Auch hier fehlten meist die Muskelriesenzellen, während sie im Primärtumor vorhanden waren. Die Rhabdomyosarkome waren also in den Metastasen in reine Spindelzellsarkome übergegangen. Nur in einzelnen Fällen kam es zur Bildung von Muskelriesenzellen auch in den Metastasen (s. Abb. 6 und 7). Es ist anzunehmen, daß die Spindelzellen in unseren Geschwülsten und Metastasen nicht Fibroblasten, sondern Myoblasten waren, wofür auch ihre Morphologie spricht (breite Fasern, breite Kerne mit abgerundeten Ecken).

Wir kommen zu dem Schluß, daß bei intramuskulärer Injektion carcinogener Stoffe wie Benzpyren usw. in einem sehr hohen Prozentsatz Rhabdomyosarkome entstehen können. Selbst bei Einspritzung unter die Haut gehen nicht selten derartige Geschwülste wahrscheinlich von der angrenzenden quergestreiften Muskulatur aus. Der Grund, warum *Klinke*¹¹ bei seinen Versuchen keine Myosarkome, sondern nur vom Bindegewebe ausgehende Tumoren beobachten konnte, ist uns nicht klar. Man könnte an Rassenunterschiede der Versuchstiere denken.

Die Tatsache, daß auch von der quergestreiften Muskulatur nach Einbringung carcinogener Stoffe häufig Geschwülste ausgehen, scheint uns nicht unwichtig zu sein, weil Spontantumoren bei den Versuchstieren ebenso wie beim Menschen für recht selten gelten. Dies dürfte hiernach weniger daran liegen, daß die Muskulatur nicht die Fähigkeit besitzt, geschwulstartig zu wachsen, sondern daran, daß die Bedingungen und Voraussetzungen für eine Geschwulstbildung im allgemeinen nicht erfüllt werden, die man neuerdings vielleicht in der Entstehung carcinogener Stoffe an Ort und Stelle suchen möchte. Immerhin sind die von der Skelettmuskulatur ausgehenden Spontangeschwülste wohl doch nicht so

selten, wie es zunächst scheint. Es ist denkbar, daß sie sich beim Menschen ebenso leicht entdifferenzieren wie beim Versuchstier, so daß unter Umständen ein Teil der unreifen Weichteilsarkome polymorph-zelligen, spindelzelligen und rundzelligen Charakters ebenfalls myogenen Ursprungs ist.

In diesem Zusammenhang mag interessieren, daß nach subcutaner Injektion carcinogener Substanzen auch lipoplastische Sarkome häufiger gefunden wurden (*Woglom*²⁶, *Levine* und *Bergmann*¹⁴), die ebenfalls spontan recht selten vorkommen. *Levine* und *Bergmann*¹⁴ hatten ein Fibrosarkom 7mal transplantiert. Erst in der 7. Generation traten Fettzellen auf, die dann in den späteren Übertragungen wieder verschwanden. Dieser Befund entspricht dem oben erwähnten Auftreten und Verschwinden von ausdifferenzierten Muskelzellen in myogenen Spindelzellsarkomen und zeigt deutlich, daß oft verborgene Potenzen in den unreifen Tumorzel len schlummern, die nur durch besondere, noch unbekannte Umstände geweckt und realisiert werden können.

Die Eigenschaft des Benzpyrens zu fluoreszieren, ergab bei unseren Tieren die Möglichkeit, das Schicksal dieses Stoffes weiter zu verfolgen. Bei der Sektion von vor kurzem eingespritzten Tieren findet man das schon im Tageslicht blau fluoreszierende Öl in einer glattwandigen Höhle in der Muskulatur. Später sieht man des öfteren, vor allem am Rande der Höhle, auskrystallisiertes Fett. Aber selbst im Stadium der Geschwulstbildung und oft mitten in großen Tumoren ist die Höhle erhalten, die noch reichlich fluoreszierendes Öl enthält. Die Flüssigkeit in dieser Höhle ist manchmal durch erweichtes Tumormaterial vermehrt.

Die lumineszenzmikroskopische Untersuchung der Tiere zeigt, daß das Benzpyren, das sich durch eine leuchtend blaue Fluorescenz auszeichnet (*Graffi*⁸), nur in der Höhle in der Muskulatur nachzuweisen ist. Hier findet man Fluorescenz im eigentlichen Höhleninhalt sowie in spärlichen Zellen der Höhlenwand. Wird diese zellreicher, so wird das Benzpyren auch von zahlreichen dieser Zellen aufgenommen und ist dort in Fetttröpfchen im Protoplasma enthalten. Auch nach Entstehung einer Geschwulst findet man es in den Tumorzel len in der engeren Umgebung der Cyste, nicht dagegen in Geschwulstzellen, die weiter davon entfernt sind. Übrigens kann man dabei neben der blauen Fluorescenz in manchen Zellen eine grüne nachweisen, die nach den Untersuchungen von *Weigert* und *Mottram*²⁵ ebenfalls auf Benzpyren zurückzuführen ist.

Außer in der Cyste und ihrer unmittelbaren Umgebung ist das Benzpyren in seiner fluoreszierenden Form nur noch gelegentlich in den Sinus der regionären Lymphknoten zu finden, in denen aber nie ein Primärtumor entstand. Im übrigen Körper, vor allem in der Lunge, dem retikulo-endothelialen System der Milz und der Leber, in der Niere ist keine Fluorescenz nachweisbar. Dies ist zwar kein ganz sicherer Beweis dafür, daß nicht doch kleine Mengen des Benzpyrens in die Organe abgewandert sind, da nach *Brock*, *Druckrey* und *Hamperl*³ dieser Stoff auch in nicht fluoreszierendem Zustande vorkommen kann. Aber auch

die Tatsache, daß oft große Mengen des immer noch stark fluoreszierenden Öles im Zentrum des Tumors nachzuweisen sind, spricht dagegen, daß nennenswerte Mengen erst im Tierkörper verbreitet werden müssen, um Tumor zu erzeugen. Es genügt die örtliche Einwirkung.

In seltenen Fällen scheint das Oldepot aus ungeklärten Gründen allerdings schneller resorbiert und das Benzpyren zerstört und ausgeschieden zu werden. Man findet bei der Sektion solcher Tiere kein fluoreszierendes Öl mehr. Ist ein Tumor entstanden, so kann man in ihm gewöhnlich noch Reste des Fettes und des Benzpyrens histologisch nachweisen. In einigen Fällen war aber weder ein Tumor noch ein Rest des Benzpyrens zu finden. Das Ausbleiben der Tumorbildung scheint in diesen Fällen auf der Wegschaffung und Zerstörung des Benzpyrendepots zu beruhen. Über ähnliche Beobachtungen haben auch *Benecke* und *Schröder*^{2a} berichtet. Bemerkenswert ist aber, daß weder in diesen Fällen noch bei den Tieren, die Tumoren bekamen, eine Geschwulst jemals an anderer Stelle als am Orte der Injektion auftrat, außer bei Metastasenbildung. Auch diese Beobachtung spricht für die streng ortsgebundene Wirkung des Benzpyrens.

Eine weitere Feststellung, die wir bei unseren Untersuchungen machten, war uns nicht unwichtig: Die Einspritzung des in Olivenöl gelösten Benzpyrens führt nach den oben besprochenen Befunden in den ersten 6—8 Wochen zu keinerlei erheblicher Gewebsreaktion, obwohl es in engem Kontakt mit dem Gewebe ist. Erst nach dieser Zeit setzt eine Zellwucherung ein, die vor allem aus unreifen Spindel- und Rundzellen besteht. Auch Lymphocyten und Leukocyten kommen zwar vor, treten aber an Menge ganz gegen die örtlich entstandenen Zellen zurück. Ob diese Spindel- und Rundzellen bereits Tumorzellen sind oder ob aus ihnen erst noch Tumor entsteht, ist fraglich und vorläufig nicht mit Sicherheit zu entscheiden. Immerhin sind diese Zellwucherungen auch im letzteren Falle nicht den im Schrifttum als Ursache der Geschwulstbildung vielgenannten chronisch gestörten Regeneraten (*Fischer-Wasels*⁷) gleichzusetzen, sondern eher als präblastomatöse Wucherungen anzusehen und zu bezeichnen. Wir selbst neigen dazu, diese Zellwucherungen schon als beginnende Geschwulst aufzufassen und die Einwanderung von Lymphocyten und Leukocyten sowie den Zellzerfall, der in fortgeschritteneren Stadien manchmal nachzuweisen ist, als reaktive, mit der Abwehr gegen die Geschwulst zusammenhängende Vorgänge.

Eine chronische örtliche Entzündung mit gestörter Regeneration war hiernach bei unseren Tieren nicht nachweisbar. Trotzdem kam es in einem sehr hohen Prozentsatz zur Tumorbildung. Wir schließen daraus, daß die Tumorentstehung nichts mit der primären, unspezifisch-entzündlichen Gewebsreaktion zu tun hat, die auch bei der Anwendung carcinogener Stoffe so oft beschrieben wurde, vor allem wenn sie in krystalliner

Form oder in festen Fettarten gelöst verabreicht wurden (s. Arbeiten von *Rondoni*¹⁸, *Hval*¹⁰ u. a.).

Auch *Brock*, *Druckrey* und *Hamperl*³ bekamen um ihre Kollodiumzäckchen mit Benzpyren herum derartige unspezifische Reaktionen. Sie schließen jedoch auf Grund ihrer Beobachtungen, daß die lokale Zellschädigung und die resorptive Allgemeinschädigung unspezifisch seien und zwar die Geschwulstentstehung begünstigten, aber keine notwendige Voraussetzung dafür bildeten.

Bei unseren Versuchen ist eine schädigende Allgemeinwirkung des Benzpyrens ebenfalls auszuschließen. Wie schon oben ausgeführt, ist die Hauptmenge des Stoffes noch örtlich in der Cyste nachzuweisen; dagegen ist Benzpyren nirgends in den Organen des Körpers aufzufinden. Außerdem fehlen alle Allgemeinwirkungen: Die Gewichtszunahme der Tiere geht stetig weiter, bis die Geschwülste so groß sind, daß dadurch Störungen entstehen. Eine Atrophie der Hoden und Ovarien oder eine Beeinflussung der anderen Drüsen mit innerer Sekretion, wie sie von vielen Seiten als wichtig für die Entstehung der Geschwülste angesehen wird, ist nicht nachweisbar. Auch das Benehmen und das Fell der Tiere zeigen keine Veränderungen.

Wir stellen fest: Weder eine chronische örtliche Entzündung mit gestörter Regeneration noch eine Veränderung der Allgemeindisposition war bei unseren Tieren nachweisbar. Die Tumorbildung ist hier vielmehr ein ganz umschriebener, örtlicher Prozeß, dessen Einzelheiten wir noch nicht kennen und der durch kleinste Mengen des carcinogenen Stoffes, hier des Benzpyrens, hervorgerufen wird. Gerade die Tatsache, daß nur kleinste Mengen nötig sind, um Geschwülste hervorzurufen (nach *Oberling*, *Guerin* und *Guerin* genügen 0,05 mg Benzpyren), spricht ebenfalls für die rein örtliche Wirkung. Damit soll die Bedeutung der chronisch gestörten Regeneration und der Allgemeindisposition für die Geschwulstentstehung besonders beim Menschen nicht bestritten werden. Es ist vielmehr zu erwägen, ob diese Faktoren nicht wenigstens zum Teil so wirken, daß durch sie die Entstehung körpereigener, carcinogener Stoffe begünstigt wird, die dann ihrerseits wieder Geschwülste verursachen.

Aus der Tabelle 1 geht hervor, daß die Latenzzeit der Geschwülste in unseren Versuchen 123—136 Tage betrug. Als Latenzzeit bezeichnet man bekanntlich den Zeitraum zwischen Einführung des carcinogenen Stoffes und Beginn der Tumorbildung. Da wir als Zeichen des Anfangs der Tumorbildung die Tastbarkeit nahmen, ist klar, daß die eigentliche Latenzzeit kürzer sein muß als die genannte Zeitspanne.

*Stewart*²² versuchte, die eigentliche Latenzzeit so festzustellen, daß er bei Mäusen Kügelchen aus Cholesterin mit 5% Methylcholanthren implantierte und zu verschiedenen Zeiten hiernach das Granulationsgewebe, das sich um die Kügelchen herum gebildet hatte, zum Teil

histologisch untersuchte und zum Teil Mäusen des gleichen Stammes implantierte. Er erhielt die ersten Geschwülste 42 Tage nach der Einführung des Methylcholanthrens und konnte so ungefähr den Beginn der Tumorbildung nach Zufuhr dieses Stoffes festlegen. Allerdings sind 2 nicht völlig zu widerlegende Einwände zu machen: 1. könnten Teilchen von Methylcholanthren mit den Granulationen verpflanzt werden und Ursache einer primären Tumorbildung im neuen Wirt sein. 2. wäre es möglich, daß die ersten Stadien des Tumors noch nicht übertragbar sind; ersteres würde eine zu kurze, letzteres eine zu lange Latenzzeit vortäuschen.

Von *Brues, Weiner und Andervont*⁴ wurde sogar auf Grund ihrer Untersuchungen und Überlegungen angenommen, daß eine echte Latenzperiode überhaupt nicht existiert. Sie wandten bei Mäusen verschiedener Stämme carcinogene Stoffe in Fett oder Cholesterin gelöst einmalig an. Sie verglichen dann Latenzzeit, Wachstumsgeschwindigkeit und Anzahl der Mitosen in der Geschwulst bei der Tötung. Bei kurzen Latenzzeiten ergab sich eine große Wachstumsgeschwindigkeit und eine große Mitosenzahl und umgekehrt. Unter der Voraussetzung einer konstanten Mitosenzahl in der Geschwulst von ihrem Beginn an und bei der Annahme einer Mitosendauer von 1 Stunde konnten die Autoren errechnen, daß die Latenzzeit der Wachstumszeit entspricht, die der Tumor braucht, um von einer einzigen Zelle bis zu der tastbaren Größe von $1/10$ ccm zu wachsen. Hiernach bestünde also keine eigentliche Latenzzeit.

Gegen die Folgerungen von *Brues* und Mitarbeiter ist einzuwenden, daß ihre Voraussetzungen keineswegs sicher sind, vor allem nicht die Annahme einer gleichmäßigen Mitosenzahl während des gesamten Tumorwachstums. Daher sind ihre Schlußfolgerungen nicht überzeugend. Sie waren jedoch bisher nicht schlagend zu widerlegen, da die unspezifische Reaktion auf das carcinogene Agens, die gewöhnlich sofort einsetzte, den eigentlichen Tumorbeginn verschleierte. In unseren Versuchen dagegen haben wir in den ersten 40—60 Tagen keinerlei Reaktionen des Gewebes feststellen können. Erst von diesem Zeitpunkt ab setzte eine Gewebswucherung ein, die unter Umständen schon als Beginn der Tumorbildung zu werten war. Dies entspräche auch den Beobachtungen von *Stewart*²². Hiernach besteht also in unseren Fällen eine echte Latenzzeit von mindestens 40 Tagen. Wir können somit der Ansicht von *Brues* und Mitarbeiter nicht beipflichten, da wir in diesem Falle auch in den jüngsten Cysten an umschriebener Stelle eine tumorartige Zellwucherung, den Beginn des Tumors, hätten nachweisen müssen.

Nach der Erörterung der im Vorausgehenden angeschnittenen mehr allgemeinen Fragen, soll noch kurz auf die speziellen Versuchsergebnisse eingegangen werden. Wir (*Schairer und Rechenberger*²¹) haben schon in unserer Mitteilung in der Klinischen Wochenschrift betont, daß es uns nicht gelang, durch intraperitoneale Einspritzung von d,L-Leucyl-Glycin die Entstehung von Benzpyrentumoren zu verhindern, den Beginn der Geschwulstbildung zu verzögern oder die Wachstumsgeschwindigkeit

der Geschwülste zu beeinflussen. Nur in den Metastasenbildungen fanden sich erhebliche Unterschiede bei den Gruppen I—IV (Tabelle). In der Gruppe II (unbehandelte Tiere) waren überhaupt keine Metastasen nachzuweisen, während bei den mit d,L-Leucyl-Glycin behandelten Tieren der Gruppen I und IV bei 3 bzw. 6 Tieren Metastasen aufgetreten waren. Allerdings fanden sich Tochtergeschwülste auch bei 3 Tieren der Gruppe III, die nur mit *Ringer*-Lösung intraperitoneal gespritzt worden war. Es lag nahe anzunehmen, daß die Metastasenbildung durch die Manipulation der Einspritzung an und für sich bzw. durch die *Ringer*-Lösung, nicht aber durch das d,L-Leucylglycin gefördert worden war. Aber auch diese Annahme wird unwahrscheinlich, wenn wir zum Vergleich die Tiergruppen V—VII heranziehen, die nur mit saurer bzw. alkalischer Kost ernährt wurden. Bei diesen Tieren fanden sich ebenfalls reichliche Metastasen, obgleich keine Injektionen vorgenommen worden waren.

Die Mitteilungen von *Waldschmidt-Leitz*²⁴ über die Beeinflussung des Krebses durch racemische Peptide konnte somit von uns nicht bestätigt werden. Entsprechende negative Ergebnisse erbrachten die Untersuchungen von *Rothein* und *Gehlen*¹⁹ an Mäusen sowie von *R. Abderhalden*¹ und von *Bayerle* und *Podloucky*². Auch *Hackmann*⁹ konnte weder beim *Ehrlich*-Carcinom der Maus noch beim Benzpyrensarkom der Ratte eine Beeinflussung des Tumorwachstums durch subcutane bzw. intravenöse Injektionen von d,L-Leucylglycin nachweisen. Die geringere Tumogröße, die bei seinen intravenös gespritzten Ratten auftrat, war durch das schlechtere Gedeihen dieser Tiere zu erklären und nicht durch die Wirkung des Peptids.

Unsere Versuche mit der Anwendung saurer (Gruppe V und VI) bzw. basischer Nahrung (Gruppe VII) ergaben eine ebenso hohe Tumorausbeute wie bei den Kontrollen (Gruppe II und III). Auch begann die Tumorbildung etwa zur selben Zeit (nach 123—136 Tagen) wie bei den Kontrollen (131—133 Tage). Allerdings war das durchschnittliche Gewicht der Geschwülste am Ende des Versuches bei der sauren Ernährung etwas größer als bei den Kontrollen und bei basischer Nahrung. Dies mag damit zusammenhängen, daß die Tiere bei der sauren Fleischkost überhaupt besser gedeihen als bei der gewöhnlichen oder der basischen Kost, was aus dem Vergleich der durchschnittlichen Gewichtszunahmen hervorgeht. Die durchschnittliche Wachstumsdauer der Geschwülste war nur bei der basischen Nahrung wesentlich länger (48 Tage) als bei saurer und normaler Ernährung (etwa 30 Tage). Man bekommt also den Eindruck, daß die basische Ernährung die Wachstumsgeschwindigkeit der Geschwülste beeinträchtigt hat. Allerdings ist die Anzahl der durchgeführten Versuche zu gering, um daraus sichere Schlüsse ziehen zu können.

Es wurde schon oben erwähnt, daß die basisch ernährten Tiere am Anfang des Versuches zum Teil einen Zustand von Avitaminose B durchmachten. Dies kann jedoch auf die Wachstumszeit der Geschwülste keinen Einfluß gehabt haben, da die Avitaminose im Anfang der Latenzzeit entstanden und längst wieder behoben war, als das Tumorwachstum einsetzte. Eine wesentliche Hinauszögerung des Beginns der Tumorbildung ist nicht eingetreten. Auf die Metastasenbildung hatte, wie schon oben erwähnt, die Kost keinen merkbaren Einfluß.

Ob die aufgezeigten Wirkungen unserer basischen Kost auf das Tumorwachstum wirklich eine Folge des veränderten Ionenhaushaltes ist oder ob hier antiplastische Substanzen im Sinne von *Maisin*¹⁶ wirkten, muß dahingestellt bleiben. Auf die Dissertation von *Laage*¹², die eine Besprechung des diesbezüglichen Schrifttums bringt, sei hier hingewiesen.

Zusammenfassung.

1. Zur Nachprüfung der Angaben von *Waldschmidt-Leitz* über die Wirkung von racemischen Peptiden auf die Tumorbildung und zur Prüfung der Einwirkung saurer und basischer Kost auf die Geschwulstentstehung waren 180 Ratten mit 1 ccm einer 1,5%igen Benzpyrenlösung in Olivenöl intramuskulär gespritzt worden.

2. Bei 112 Tieren entwickelten sich Sarkome an der Einspritzungsstelle in der Oberschenkelmuskulatur, d. h. in 95% der als abgeschlossen anzusehenden 118 Versuche.

3. Die histologische Untersuchung von 109 Geschwülsten ergab neben einem Rundzellensarkom und 14 Spindelzellsarkomen 94 (86%) Rhabdomyosarkome. Auch in den Tumormetastasen, die in 22,7% der Fälle auftraten, waren manchmal Muskelemente nachweisbar.

4. Die Entwicklung der Geschwülste wurde verfolgt. Auf eine 40 bis 60 Tage währende Latenzzeit mit fehlender Gewebsreaktion folgt eine Periode mit Wucherung wahrscheinlich myogener Zellen am Rande der Benzpyrenölzysten, die mit Tumorbildung endet und wahrscheinlich schon ihren Beginn darstellt. Im vorliegenden Versuch scheint die Geschwulstbildung ein rein örtlicher Prozeß zu sein. Eine wesentliche Mitwirkung chronisch-regeneratorischer Prozesse bei der Geschwulstentstehung ist unwahrscheinlich.

5. Eine Beeinflussung der Tumorentstehung oder des Tumorwachstums durch d,L-Leucyl-Glycin war nicht nachweisbar.

6. Die Geschwulstentstehung wurde weder durch saure noch durch basische Kost beeinflußt. Die Geschwülste wuchsen aber bei der sauren Fleischkost etwas stärker als bei normaler Kost, entsprechend dem allgemein besseren Gedeihen der Fleischtiere. Durch basische Kost scheint das Tumorwachstum etwas gehemmt zu werden.

Schrifttum.

- ¹ Abderhalden, R.: Hoppe-Seylers Z. **270**, 9 (1941). — ² Bayerle u. Podloucky: Hoppe-Seylers Z. **264**, 189 (1940). — ^{2a} Benecke u. Schröder: Z. Krebsforsch. **49**, 505 (1939). — ³ Brock, Druckrey u. Hamperl: Arch. exper. Pathol. **189**, 709 (1938). — Arch. klin. Chir. **194**, 250 (1939). — ⁴ Brues, Weiner and Andervont: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **42**, 374 (1939). — ⁵ Chahovich: Acta path. (Belgrad) **4**, 31 (1940); zit. nach Z. Krebsforsch. **51**, 390 (1941). — ⁶ Dittmar: Z. Krebsforsch. **52**, 17 (1941). — ⁷ Fischer-Wasels: Verh. dtsch. path. Ges. **28**, 47 (1935). — ⁸ Graffi: Z. Krebsforsch. **49**, 477 (1939). — ⁹ Hackmann: Mschr. Krebsbekämpfung **10**, 26 (1942). — ¹⁰ Hval: Zur Entstehung der 1,2,5,6 Dibenzanthrazensarkome. Bergen 1937; zit. nach Z. Krebsforsch. **47**, 206 (1938). — ¹¹ Klinke: Z. Krebsforsch. **47**, 348 (1938). — ¹² Laage: Inaug.-Diss. Jena 1943. — ¹³ Larionow: Amer. J. Canc. **38**, 492 (1940). — ¹⁴ Levine and Bergmann: Amer. J. Canc. **39**, 504 (1940); zit. nach Z. Krebsforsch. **52**, 154 (1941). — ¹⁵ Lewis: Amer. J. Canc. **37**, 521 (1939). — ¹⁶ Maisin: C. r. Soc. Biol. Paris **134**, 209 (1940). — ¹⁷ Oberling, Guérin et Guérin: Bull. Assoc. franc. Etude Canc. **28**, 198 (1939). — ¹⁸ Rondoni: Z. Krebsforsch. **47**, 59 (1939). — ¹⁹ Rothlin u. Gehlen: Schweiz. med. Wschr. **1941 II**, 327. — ²⁰ Roussy et Guérin: Presse méd. **1941 I**, 329; zit. nach Z. Krebsforsch. **52**, 80 (1941). — ²¹ Schairer u. Rechenberger: Klin. Wschr. **1942 I**, 64. — ²² Stewart: Amer. J. Pathol. **15**, 707 (1939). — ²³ Strong: Amer. J. Canc. **39**, 347 (1940). — ²⁴ Waldschmidt-Leitz, Mayer u. Hatschek: Hoppe-Seylers Z. **263**, 1 (1940). — ²⁵ Weigert and Mottram: Nature (Lond.) **1940**, 895; zit. nach Z. Krebsforsch. **52**, 82 (1941). — ²⁶ Woglom: Amer. J. Canc. **32**, 447 (1938).
-