

Aus der Abteilung für Gewebeforschung (Prof. Dr. med. ELSE KNAKE) Max-Planck-Institut für vergleichende Erbbiologie und Erbpathologie, Berlin-Dahlem.

Über „krebsähnliche“ Bilder in der Gewebekultur von Mäuseprostata.

Von

EBERHARD SAUERTEIG.

Mit 13 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. Januar 1955.)

Zahlreiche Untersucher haben die Methode der Gewebezüchtung benutzt, um den Vorgang der Krebsentstehung zu studieren. Sie ließen solche Stoffe oder bestimmte Bedingungen auf Gewebekulturen einwirken, die auch in der experimentellen Krebsforschung am Tier angewendet werden.

Darüber hinaus haben aber angesehene Forscher auch dann „krebsähnliche“ Umwandlungen normaler Gewebestücke im Explantat beschrieben, wenn keinerlei cancerogene Faktoren zur Anwendung gelangten. Die „krebsähnliche“ Umwandlung soll allein durch die Explantation in vitro, also lediglich durch die Befreiung des Gewebsfragmentes aus den regulierenden Korrelationen des Organismus, bewirkt worden sein.

Wir interessierten uns für beide Fragestellungen, d. h. sowohl für eine etwaige Cancerisierung mit Hilfe krebserzeugender chemischer Substanzen wie auch für die so oft behauptete „krebsähnliche“ Umwandlung normaler Organstrukturen allein durch den Fortfall der Körperregulation. Insbesondere wollten wir klären, ob diese „krebsähnlichen“ Gewebe als Krebse im pathologisch-anatomischen Sinne zu bezeichnen sind.

Als Versuchsobjekte dienten uns die Prostatae 6—8 Wochen alter Mäuse, als cancerogene Substanz Methylcholanthren.

Material und Methodik.

Von Mäusen eines Inzuchtstammes, der nur sehr selten Geschwülste und noch nie Prostataspontantumoren hervorgebracht hatte, wurden die hinteren Prostatalappen entnommen, in kleine Stücke von etwa 2 mm Kantenlänge geteilt und als Rollkulturen gezüchtet. Bei der Exstirpation der Prostatalappen ließ sich gelegentlich die Mitnahme von periprostatischem Fettgewebe nicht vermeiden. Jeder Prostatalappen ergab 2 Kulturen, von denen eine in Medium mit Zusatz von gelöstem Methylcholanthren, die andere als Kontrolle mit dem Lösungsmittel des Methylcholanthrens allein gezüchtet wurde. Die restlichen beiden kamen in normalem Medium zur Explantation. Insgesamt pflanzten wir 125 Kulturen in 27 Rollröhrchen aus. Das Nährmedium setzte sich je Röhrchen aus 7 Tropfen Rattenserum, 7 Tropfen Tyrodelösung und 4 Tropfen Hühnerembryonalextrakt zusammen. Dazu kamen die Versuchs- bzw. Kontrollzusätze. Es wurden also

3 Kulturgruppen angesetzt und zwar die erste in der genannten Mediummischung mit Zusatz von Methylcholanthren in Aceton, die zweite nur mit Zugabe von Aceton ohne Methylcholanthren und die dritte mit Zusatz des gleichen Volumens Tyrodelösung. Die Herstellung der Methylcholanthrenlösung geschah wie folgt: 100 mg Methylcholanthren werden in 100 cm³ Aceton gelöst; davon wird 1 cm³ in 10 cm³ heißes Aqua dest. unter ständigem Rühren eingetropft; 1 cm³ dieser kolloidalen Lösung wird mit 4 cm³ menschlichem Männerserum vermischt. Dem Kulturmedium wurden von dieser Lösung 2 Tropfen zugesetzt; so ergab sich eine Endkonzentration von ungefähr 2 γ Methylcholanthren je Kubikzentimeter Nährflüssigkeit. Die Kontrollkulturen erhielten nur Serum mit Aceton.

Die Kulturen wurden während des Versuches zweimal wöchentlich in Tyrode gewaschen und mit frischem Nährmedium versehen. Sie wurden nicht umgesetzt. Die Reinigung des benötigten Glasgerätes von dem sehr fest anhaftenden Methylcholanthren erfolgte mit Chromschwefelsäure, während die Messer in absolutem Alkohol davon befreit wurden.

Die Kulturen wurden nach 5, 10, 15, 20 und 25 Tagen in Paraffinschnitten histologisch untersucht (Carnoy, Paraffin, Hämatoxylin-Eosin, Azan). Weitere 50 Prostataexplantate konnten nach 35tägiger Züchtungsdauer auf die gleichen Mäuse retransplantiert werden, denen sie entstammten. Während den zur histologischen Untersuchung bestimmten Kulturen das Methylcholanthren oder die Acetonkontrolllösung in der gesamten Züchtungsperiode zugesetzt wurde, setzten wir diese Substanzen bei den zur Reimplantation vorgesehenen Kulturen nach dem 25. Züchtungstage ab, um das ihnen anhaftende Cancerogen möglichst zu eliminieren. Das erschien uns besonders im Hinblick auf die Ergebnisse SHEARS von Wichtigkeit, der bei einer Maus 14 Monate nach subcutaner Implantation von nur 0,4 γ Dibenzantracen die Entstehung eines Sarkoms beobachtete.

Die Züchtungsdauer von 25 Tagen vertrugen die meisten Gewebestücke gut, wie es schon PRICE und LASNITZKI feststellen konnten. Bereits nach 2—3 Tagen hatten die Kulturen deutliche Säume aus Epithel- und Bindegewebszellen. Dabei wiesen in den ersten 10 Tagen die Methylcholanthrenkulturen besonders dichte Epithelmembranen auf, während die Acetonkontrollkulturen und noch mehr die Normalkulturen geringeres Epithelwachstum zeigten. Epithelsprossen entstanden immer an den Stellen angeschnittener Drüsenschläuche. Nach 10 Tagen traten in sämtlichen Kulturgruppen Mediumverflüssigungen auf, die auch durch Verkleben dieser Stellen mit Plasma nicht zu beherrschen waren. Von diesem Zeitpunkt an umgaben zahlreiche Makrophagen die Wachstumszone als schmaler Saum. Die Mutterstücke der Acetonkontroll- und Normalkulturen wiesen bereits nach wenigen Tagen Nekrosen auf, während solche bei den Methylcholanthrenkulturen erst nach dem 10. Züchtungstag auftraten.

Histologische Untersuchungen.

Die *normale Mäuseprostate* (Abb. 1) besteht aus dicht nebeneinanderliegenden Drüsenschläuchen, die von einem einschichtigen hohen Zylinderepithel ausgekleidet werden, welches einer Basalmembran aufsitzt. Das Epithel springt oft in Form kleiner Leisten in die Drüsenlichtungen vor. Letztere sind verschieden weit und enthalten Sekret, das durch

Eosin stark anfärbbar ist. Um die Drüsen ist ein schmaler Bindegewebssaum nach Art eines Mantels angeordnet, der weiter nach außen in ein lockeres Stützgewebe übergeht, in welchem sich Gefäßgruppen befinden.

a) *Kulturen ohne Zusatz (Volumenausgleich durch Tyrodelösung).* Bereits nach 5tägiger Züchtung in vitro ist das Prostatagewebe deutlich umgebaut. Die Drüsen sind erweitert, das Zylinderepithel ist in seiner ursprünglichen Form nur noch an einzelnen Drüsenabschnitten vor-



Abb. 1. Normale Mäuseprostata. Weite Drüsen mit einschichtigem Zylinderepithel ausgekleidet. Das Epithel ragt in Form kleiner Leisten in die Drüsenlichtungen vor. Lockeres interstitielles Bindegewebe, schmaler, dichter Mantelbindegewebssaum. In den Drüsenlichtungen homogenes Sekret. H.E. 90mal.

handen. Dagegen stößt man überall auf knospenförmige Epithelsprossen, die sich aus mosaikartig aneinanderliegenden Zellen zusammensetzen, wodurch das Epithel mehrschichtigem Plattenepithel ähnlich wird. Die Epithelien wuchern entweder in die Lichtung der Drüsen vor oder dringen in das umgebende Bindegewebe ein. Im letzteren Falle wird die Basalmembran von den Epithelien durchbrochen, ihre Bruchstücke liegen regellos zwischen den Epithelzellen. Vereinzelt stößt man in diesen Proliferationszonen auf Mitosen. In den Drüsenlichtungen befindet sich homogenes Sekret, welchem abgeschilferte Epithelzellen und Zelltrümmer beigemischt sind. Durch das Fehlen der Ausführungsgänge ist eine Sekretstauung vorhanden, die die Drüsen erweitert. Dabei werden benachbarte erweiterte Drüsen aneinandergedrängt, wobei durch

Zerfall ihrer gewucherten Epithelien an der Berührungsstelle größere Hohlräumen entstehen. Auf diese Weise vermindert sich die Anzahl der ursprünglich vorhandenen Drüsen. An den Kernen vieler Epithelzellen ist bereits jetzt Karyolyse und Pyknose zu beobachten. Das Bindegewebe zeigt im Mutterstück wenig Proliferation, dagegen eine starke Faserbildung und Hypertrophie der Fibroblasten sowie Hyalinose der Grundsubstanz. Außen wird das Mutterstück von einer schmalen Wachstumszone umgeben, die, wie bereits bei der mikroskopischen



Abb. 2. Zehntägige Normalkultur im Schnitt. Starke Epithelwucherungen, die mehrschichtigem Plattenepithel ähnlich sehen und sich in Form kompakter Zellnester im umgebenden Bindegewebe ausbreiten. Drüsen zum Teil verengt, in den Lichtungen Sekret und spärliche Zelltrümmer. Bindegewebe etwas dichter als in der unbehandelten Prostata. Vereinzelte Mitosen, unter ihnen auch atypische (s. Bildausschnitt *a* bei stärkerer Vergrößerung in Abb. 3). Kultur $110 \times \times 2$, H.E. 105mal.

Betrachtung *in vitro* zu sehen war, hauptsächlich von Epithelzellen gebildet wird. Letztere umkleiden als schmaler Saum die Oberfläche des Mutterstückes und zeigen ebenso wie die Drüsenepithelien knospenförmige Proliferationszonen, in welchen die mosaikartige Lagerung der Epithelien deutlich erkennbar ist. Das Hervorgehen dieser Zellen aus den im Mutterstück vorhandenen DrüsenSchläuchen ist an vielen Stellen nachweisbar. Innerhalb der Wachstumszone tritt das Bindegewebe gegenüber dem Epithel zurück; es besteht aus sich locker verflechtenden Fibroblasten, die nur vereinzelt den Epithelsaum durchbrechen.

Die 10tägigen Kulturen (Abb. 2) zeigen im Mutterstück erhebliche Epithelproliferationen, die sich sowohl in die Drüsenlichtungen als auch

in das umgebende Bindegewebe ausdehnen. Immer zeigt das Epithel die Tendenz, die Oberfläche der Kultur zu umkleiden und das Bindegewebe zu durchwachsen. Mitosen sind verschiedentlich im Epithel anzutreffen, unter ihnen auch vereinzelt atypische Teilungsfiguren. In der Hauptsache handelt es sich dabei um Verklumpung oder Absprengung von Chromosomen, während tripolare Mitosen (Abb. 3) seltener anzutreffen sind. Andererseits sieht man viele direkte Kernteilungsfiguren. Erweiterte Drüsen liegen neben anderen, die durch Epithelproliferationen

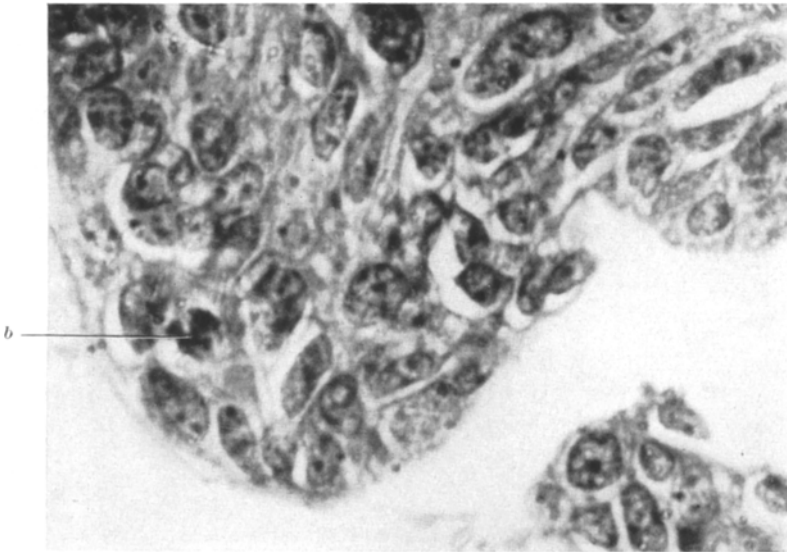


Abb. 3. Ausschnitt *a* aus der in Abb. 2 dargestellten Kultur bei starker Vergrößerung. Plattenepithelähnliche, mosaikartige Lagerung der Epithelien. Bei *b* eine tripolare Mitose. Kerne variieren leicht in bezug auf Kerngröße und Chromatingehalt. Nucleolen oft multipel und verschieden groß. Kultur $110 \times \times 2$, H.E. 990mal.

verengt werden. Das Bindegewebe der Mutterstücke weist gegenüber den 5tägigen Kulturen keine Veränderungen auf, dagegen besteht die Wachstumszone fast ausschließlich aus Fibroblasten. Von dem ursprünglichen kräftigen Epithelsaum finden sich nur noch Reste.

Bei den 15tägigen Kulturen nehmen die Nekrosen der Mutterstücke größeren Umfang an. Infolgedessen ist der Zustand der Epithelien nur in den Randabschnitten beurteilbar. Kleinere und größere mosaikartig aufgebaute Epithelknospen liegen in einem faserreichen hyalinen Bindegewebe, das die Epithelinseln zu erdrücken scheint. Dabei sind die dem Epithel unmittelbar angrenzenden Bindegewebsabschnitte reicher an Zellen als die weiter entfernt liegenden. Die Drüsen sind vielfach zerfallen, ihre Lichtungen werden von Zelltrümmern ausgefüllt. Sekret ist

nur noch in erhaltenen Drüsen vorhanden. Die Wachstumszonen bestehen ausschließlich aus Fibroblasten.

Die 20tägigen Kulturen weisen keine neuen Befunde auf. Zelltrümmer in den Drüsenschläuchen demonstrieren den Epitheluntergang. Das Bindegewebe ist etwas gewuchert und in Hyalinisierung begriffen, jedoch werden Mitosen in Fibroblasten nur selten gefunden. Auch die 25tägigen Kulturen zeigen ein gleiches Aussehen. Einzelne Epithelknospen weisen eine konzentrische Schichtung der Zellen mit starker

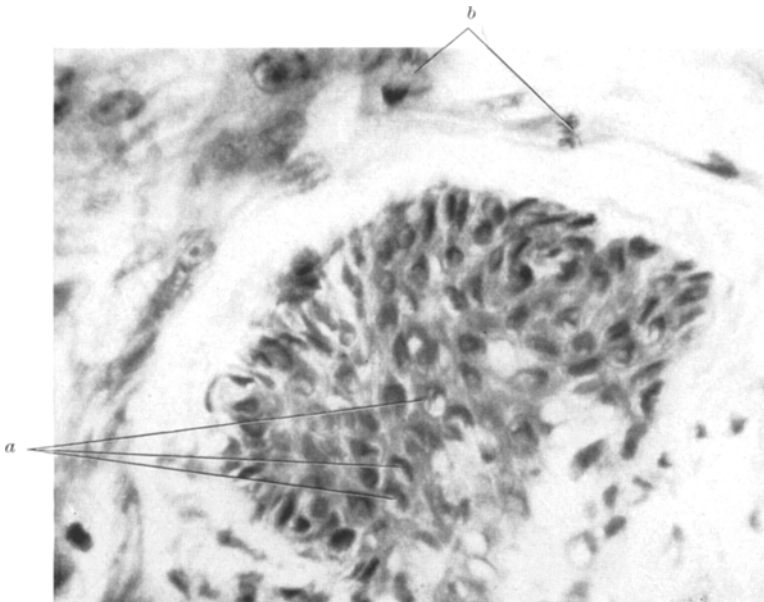


Abb. 4. Epithelknospe aus 25tägiger Normalkultur. Beginnende konzentrische Lagerung der Epithelien mit Verdichtung und starker Eosinophilie des Cytoplasmas, letztere im Zentrum der Epithelknospe zunehmend. Viele Kernvacuolen (a), deutliche Kernpolymorphie. Im umgebenden Bindegewebe 2 Mitosen (b). Kultur 143/2, H.E. 630mal.

Eosinophilie des Protoplasmas auf, während sich in den Kernen Vacuolen ausbilden (Abb. 4). Epithelmitosen sind nur noch selten erkennbar. Die Wachstumszone wird ausschließlich von Fibroblastensäumen gebildet, zwischen denen vereinzelt Epithelmembranreste vorkommen.

b) *Mit Methylcholanthren behandelte Kulturen.* Fünftägige Kulturen (Abb. 5) zeigen erhebliche knospige Epithelproliferationen mit zahlreichen Mitosen (Abb. 6). Unter letzteren findet man relativ häufig Chromosomenabspaltungen. Zum Teil sind die Drüsen erweitert und enthalten Sekret, das bereits mit Zelltrümmern vermischt ist. Der Epithelsaum der Drüsen ist oft mehrschichtig. Dabei besteht die innere Epithellage aus typischen Zylinderzellen, während die äußeren neugebildeten Zellen



Abb. 5. Fünftägige Methylcholanthrenkultur im Schnitt. Starker Umbau des Prostata-gewebes mit plattenepithelähnlichen Epithelproliferationen. Starke Auflockerung des Stützbindegewebes, Mantelbindegewebe etwas dichter (a). Stärkere Vergrößerung der als b bezeichneten Epithelknospe s. in Abb. 6. Kultur 149 ×, H.E. 126mal.

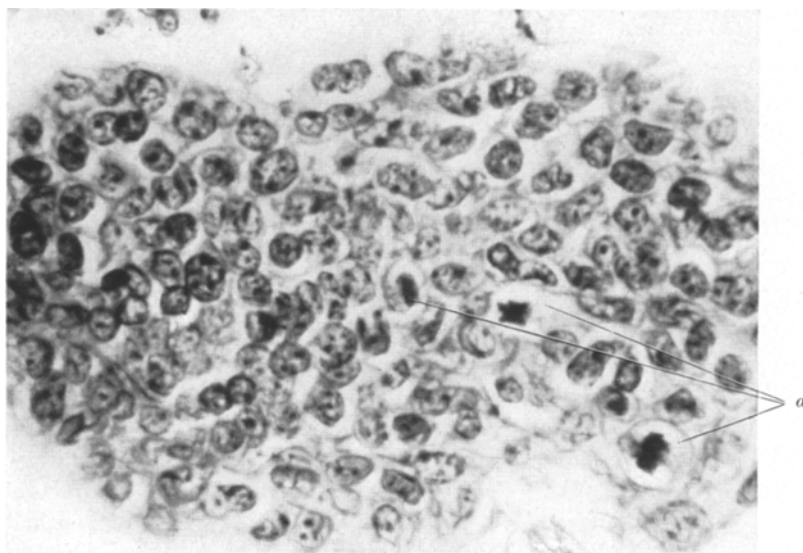


Abb. 6. Ausschnitt aus proliferiertem Epithelbezirk der in Abb. 5 dargestellten Methylcholanthrenkultur. Mosaikartige Anordnung der Epithelzellen mit mehreren Mitosen (a). Kerne unterschiedlich groß, mehrere hyperchromatisch. Nucleolen oft multipel. Kultur 149 ×, H.E. 774mal.

ein flacheres Aussehen haben. Die Basalmembran wird von den gewucherten Epithelien an vielen Stellen durchbrochen. An den isoliert zwischen den Fibroblasten liegenden Epithelinseln ist keine Basalmembran oder der Rest einer solchen vorhanden.

Den auffälligsten Befund gegenüber den Normalkulturen bildet neben den zahlreichen Epithelmitosen das Verhalten des Bindegewebes. Es ist sehr spärlich ausgebildet. Die einzelnen Fibroblasten durchflechten sich netzartig. Zwischen ihnen findet sich schwach mit Eosin



Abb. 7. 20tägige Methylcholanthrenkultur. Neben cystisch erweiterten Drüsen solche mit plattenepithelartigen Epithelwucherungen, die die Drüsenlichtungen ausfüllen. Weitere Auflockerung des Bindegewebes. Kultur 90 \times , H.E. 105mal.

anfärbbare Flüssigkeit. Nur in unmittelbarer Umgebung der Drüsen sind die Fibroblasten entsprechend dem früheren Mantelbindegewebe dichter gelagert. Fibroblastenmitosen sind im Mutterstück nicht vorhanden. Die Wachstumszone besteht ausschließlich aus Epithelmembranen, unter welchen die Fibroblasten dichter zusammenliegen als in den zentralen Mutterstückabschnitten. Gelegentlich im Mutterstück aufzufindende solide Epithelzellhaufen sind durch tangentielle Drüsenanschnitte bedingt. Auch in späteren Stadien finden sich gleichartige Bilder (Abb. 7). Allerdings vermindert sich die Zahl der Epithelmitosen. Das Bindegewebe bleibt spärlich und behält seine netzartige Anordnung. Vom 10. Züchtungstage an beginnen sich Nekrosen auszubilden, wobei die Kerntümmer sich in den Drüsenlichtungen anhäufen. Durch das Ineinandergreifen der nekrotisierenden und proliferierenden Vorgänge

entstehen bunte Bilder, zumal die knospenförmigen Epithelsprossen nicht immer deutlich vom Bindegewebe abzugrenzen sind. Nur die Azanfärbung läßt in solchen Fällen eine Unterscheidung beider Zellarten zu. Auffallend ist bei den älteren Kulturen die Lagerung und das Aussehen der Epithelien. Während in früheren Züchtungsabschnitten große Regelmäßigkeit in bezug auf Größe und Anordnung der Epithelzellen zu beobachten war, treten jetzt solche mit unregelmäßig geformten, verschieden großen, oft pyknotischen Kernen auf, die sich uneinheitlich

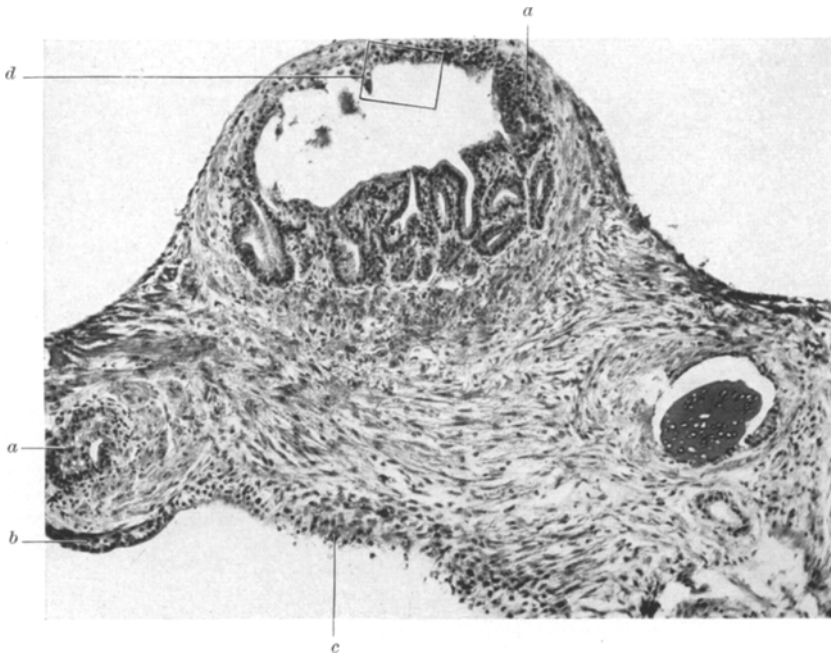


Abb. 8. Zehntägige Acetonkontrollkultur. Sehr dichtes Bindegewebe, Drüsen zum Teil cystisch umgewandelt. Epithel zylindrisch, bei *a* mehrschichtig, plattenepithelartig. An der Wachstumszone mehrschichtige Epithelmembran (*b*), die bei *c* von Fibroblasten durchbrochen wird. Bildausschnitt *d* bei stärkerer Vergrößerung in Abb. 9. Kultur 109 a $\times \times \times$ 1, H.E. 90mal.

um die Drüsenlichtungen anordnen. Derartige Kerne stellen Ruhekerne dar. Die Fibroblasten, an denen bereits seit dem 15. Züchtungstag tropfige Verfettungen nachzuweisen waren, zeigen jetzt verschiedentlich Kernvacuolen, die eine Schädigung der Zellen ausdrücken. In der Umgebung mehrerer Kulturen trifft man auf Fettgewebe, das bei der Exstirpation der Prostatae mitentfernt und mitexplantiert wurde.

c) Kontrollen mit Aceton. In ihrem Aufbau gleichen die Kontrollkulturen weitgehend den Normalkulturen. Auffallend ist bereits in den ersten Stadien der Züchtung das Auftreten zahlreicher Epithelmitosen (Abb. 8 und 9), die an Zahl die in den Methylcholanthrenkulturen

vorkommenden übertreffen. Die neugebildeten Epithelzellen dringen in die Lichtung der erweiterten Drüsen ein und sprossen auch in das angrenzende Bindegewebe vor (Abb. 10). Dieses ist sehr dicht, hyalinisiert, stellenweise durch Flüssigkeitseinlagerung aufgelockert. Fibroblastenmitosen sind in größerer Anzahl als in den Normalkulturen anzutreffen. Die Wachstumszone der 5- und 10tägigen Kulturen besteht fast ausschließlich aus Epithelzellen. In späteren Stadien zerfallen die Epithelsäume und werden durch Fibroblasten ersetzt. Eine fibroblastenschädi-

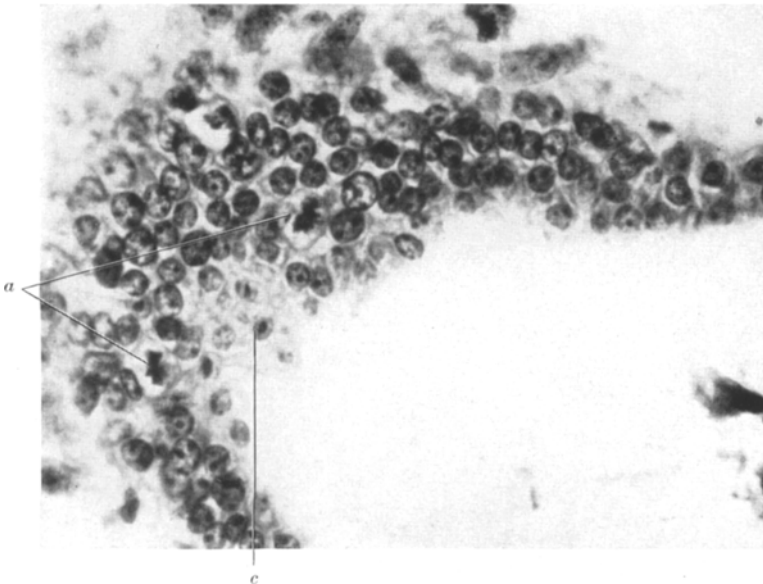


Abb. 9. Randgebiet einer Drüse aus einer 10tägigen Acetonkontrollkultur (Bildausschnitt *a* aus der Abb. 8). Plattenepithelartiges Epithel mit Mitosen (*a*), das sich an den Berührungspunkten mit dem Bindegewebe zwischen den Fibroblasten verliert. Einzelne der Drüsenlichtung anliegende Epithelzellen (*c*) sind bereits in Untergang begriffen. Kultur 109 a $\times \times \times 1$, H.E. 674mal.

gende Wirkung des Acetons geht aus dem Auftreten von Kernvacuolen hervor, die in 20- und 25tägigen Kulturen gefunden werden.

Man kann somit feststellen, daß in allen Kulturgruppen ein völliger Umbau des normalen Prostatagewebes erfolgt. Die dabei zu beobachtenden Epithelproliferationen setzen sich aus großen plattenepithelartigen Zellen zusammen, welche viele Mitosen und auch Amitosen aufweisen. Das normale Verhältnis von Epithel zum Bindegewebe ist aufgehoben; die Epithelzellen dringen unter Zerstörung der Basalmembran der Drüsen in das umgebende Bindegewebe ein, um hier vereinzelt Zellnester zu bilden, in deren Zentren die Epithelien Kernvacuolen und starke Eosinophilie des Protoplasmas zeigen. Eine Ähnlichkeit mit Zellnestern vom Typ des Plattenepithelkrebses ist unverkennbar. Zwischen

diesen sehr stark krebsähnlichen Bildern finden sich die verschiedensten Übergangsformen, bei denen nur das eine oder andere Merkmal der Krebsähnlichkeit ausgeprägt ist. Die Anzahl der Epithelmitosen ist in den Methylcholanthren- und Acetonkontrollkulturen gegenüber den Normalkulturen stark vermehrt. Deutliche Unterschiede sind im Verhalten des Bindegewebes erkennbar, das sich bei den Normal- und Kontrollkulturen verdichtet, während es in den Methylcholanthrenkulturen locker verbleibt.

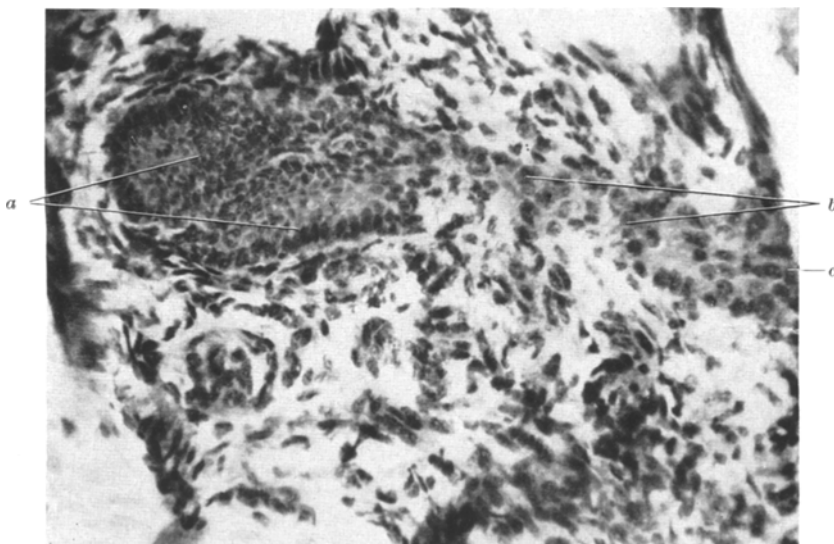


Abb. 10. Randbezirk einer 20tägigen Acetonkontrollkultur. Zwei Drüsen (a) mit gewuchertem abgeflachtem Epithel ausgefüllt. Fibroblasten dicht gelagert mit großen, teils hyperchromatischen, teils pyknotischen Kernen. Bei b drängen die Epithelzellen in das umgebende Bindegewebe vor und erreichen bei c die Oberfläche der Kultur, um hier eine Epithelmembran zu bilden. Kultur 155a, H.E. 370mal.

Genaueren Einblick in das Verhalten und die Zahl der Epithelmitosen in den einzelnen Zeitintervallen der drei angesetzten Kulturgruppen vermitteln beigefügte Tabelle und Kurve. Bei der Zählung wurde die Anzahl der Mitosen unter je 5000 Epithelzellen in den verschiedenen

Tabelle 1.

Züchtungs- dauer Tage	Normal- kulturen	Mitosen ‰	Kontroll- kulturen	Mitosen ‰	Methyl- cholanthren- kulturen	Mitosen ‰
5	9	1,8	37	7,4	33	6,6
10	15	3,0	19	3,8	32	6,4
15	14	2,8	5	1,0	21	4,2
20	7	1,4	8	1,6	16	3,2
25	12	2,4	4	0,8	8	1,6

Züchtungsstadien jeder Versuchsserie bestimmt. Um gute Durchschnittswerte zu erhalten, wurden dabei Schnitte aller zu einer Versuchsserie gehörenden Kulturen wahllos zur Beurteilung herangezogen.

Noch anschaulicher ist das Verhalten und die Zahl der Epithelmitosen aus beigefügter Kurve abzulesen.

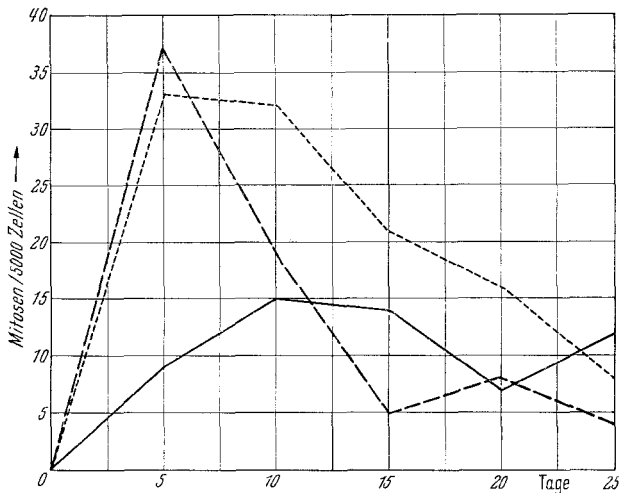


Abb. 11. Steiler Anstieg der Zellteilungsfiguren bei den Methylcholanthren- und Acetonkontrollkulturen, Abfall derselben nach dem 5. bzw. 10. Tag. Annähernd gleichbleibende Mitosenanzahl in allen Züchtungsstadien bei den Normalkulturen. — Normalkulturen; — — — Acetonkontrollkulturen; ····· Methylcholanthrenkulturen.

Ergebnisse der Autoretransplantation in vitro gezüchteter Prostatakulturen.

Um eine möglicherweise unter der Einwirkung von Methylcholanthren entstandene maligne Umwandlung der Kulturen zu erfassen, wurden 25 Methylcholanthren- und entsprechend 25 Acetonkontrollkulturen den gleichen Mäusen retransplantiert, denen sie entnommen worden waren.

Technik. Die aus dem Nährmedium herausgeschnittenen Kulturen wurden von einem kleinen Hautschnitt aus in eine stumpf gebahnte Tasche in der Subcutis der Flankenregion möglichst weit vorgeschoben und die Wunde mit einigen Nähten verschlossen. Dabei erfolgte die Retransplantation der Methylcholanthrenkulturen immer in die rechte Flankengegend, während die Kontrollkulturen auf der linken Seite implantiert wurden. Von den 25 Mäusen starben 13 interkurrent.

Die Sektion ergab in 11 Fällen Ektromelie, einmal eine durch Steinverschluß des Ureters hervorgerufene Hydronephrose und in einem Fall eine Bronchopneumonie. Die schon eingetretene starke Fäulnis verhinderte hier die Wiederauffindung der Transplantate.

Die 12 überlebenden Mäuse wurden 43—65 Tage nach erfolgter Reimplantation der Kulturen getötet. Bei 4 Mäusen konnten sowohl die Methylcholanthren- als auch die entsprechenden Kontrollkulturen wieder aufgefunden werden. Sie waren grauweiß und etwa stecknadelkopfgroß. Bei den restlichen 8 Tieren fanden sich nur vergrößerte Lymphknoten.

Die *histologische Untersuchung* (Carnoy, Paraffin, H.E., Azan) der reimplantierten Methylcholanthrenkulturen (Abb. 12) zeigt mehrere dicht

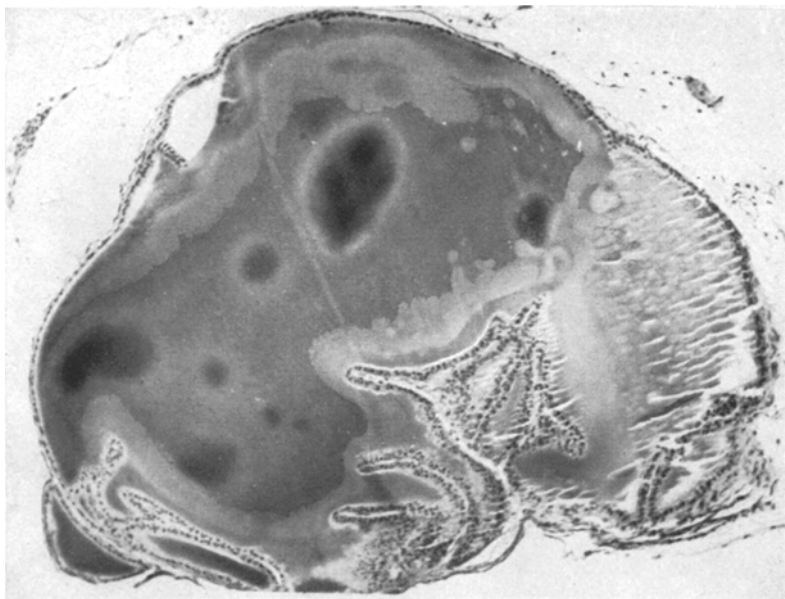


Abb. 12. Autoretransplantat einer 35 Tage in vitro gezüchteten, davon 25 Tage mit Methylcholanthrenzusatz behandelten Prostatakultur nach 6wöchigem Aufenthalt in vivo. Normalisierung der Epithel-Bindegewebskorrelation. Drüsenepithel infolge Sekretstauung kubisch bis flachzylindrisch, einschichtig. Bindegewebe locker, aber bereits dichter als in den Explantaten. Mantelbindegewebe noch nicht deutlich wiedergebildet.

Transplantat 147, H.E. 124mal.

nebeneinanderliegende Prostataadrüsen, die teilweise cystisch erweitert sind und mit Eosin stark angefärbtes Sekret enthalten. Das die Drüsen auskleidende Epithel ist kubisch bis zylindrisch gestaltet und meist einschichtig angeordnet. Die äußere Begrenzung wird durch eine Basalmembran gebildet. Nur an einzelnen Stellen sind kleine knospenförmige Epithelleisten, wie sie bereits in der normalen Prostata zu sehen waren, oder ein streckenweise zwei- oder mehrzeiliges Drüsenepithel vorhanden. Die Zellkerne der Epithelien sind alle von gleicher Größe und weisen nur vereinzelt Mitosen auf. Unterschiede der Kernform und Kerngröße, wie sie in den älteren Methylcholanthrenkulturen zu beobachten waren, bestehen nicht mehr.

Die Drüsen haben also unter den regulierenden Einflüssen des Organismus ihre ursprüngliche Gestalt wieder angenommen. Nur die durch das Fehlen der Ausführungsgänge hervorgerufene cystische Erweiterung der Drüsen unterscheidet die Transplantate von normalem Prostatagewebe. Die Fibroblasten umspinnen als Mantel- und Stützgewebe die Drüsen. Vom Rande des Explantates her sind Gefäße in das Bindegewebe eingesproßt. In einem Transplantat findet sich neben einer Drüse eine

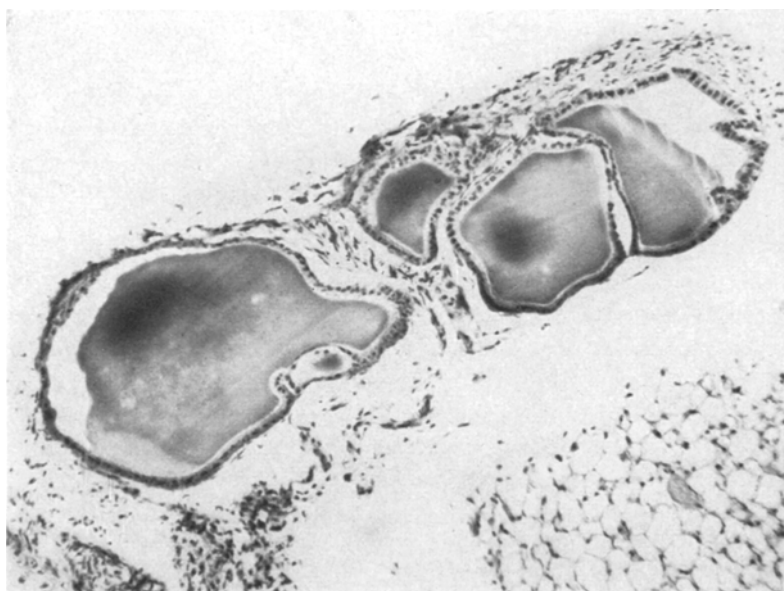


Abb. 13. Autoretransplantat einer 35 Tage in vitro gezüchteten, davon 25 Tage mit Acetonzusatz behandelten Prostatakultur nach 6wöchigem Aufenthalt in vivo. Außer der starken, durch Sekretstauung bedingten cystischen Erweiterung der Drüsen kein Unterschied gegenüber dem mit Methylcholanthren behandelten Transplantat. Auch hier Normalisierung des Verhältnisses von Epithel und Bindegewebe. Transplantat 147a, H.E. 105mal.

Bindegewebswucherung, die sich durch großen Zellreichtum auszeichnet. Dabei entstehen wirbelartige Figuren, wie man sie gewöhnlich in Fibromen beobachten kann.

Die Kontrollkulturen weisen gleiches Aussehen auf (Abb. 13). Drüsen und Bindegewebe haben ihr natürliches Verhältnis zueinander wiedererlangt und unterscheiden sich nicht von den Methylcholanthrentransplantaten. An manchen Stellen ist zwar noch eine dichtere Lagerung von Fibroblasten vorhanden, doch entspricht die Masse des Bindegewebes dem der normalen Prostata.

Die in Nachbarschaft der Transplantate gelegenen Lymphknoten weisen einen chronischen Sinuskatarrh auf.

Ergebnisse.

Faßt man die Resultate unserer Explantationsversuche zusammen, so ist festzustellen, daß in allen Kulturgruppen bereits nach wenigen Tagen ein deutlicher Umbau des Prostatagewebes erkennbar ist. Erhebliche Proliferationen des Epithels bilden das Hauptmerkmal am Mutterstück und in der Wachstumszone. Dabei sind die Epithelien mosaikartig aneinandergelagert und gleichen im Aussehen nichtverhorntem Plattenepithel. Epithelmitosen sind in allen Kulturgruppen, besonders aber bei den mit Methylcholanthren und Aceton behandelten, zu beobachten.

Eine spezifische Wirkung entfaltet das Methylcholanthren in unseren Versuchen nur auf das Bindegewebe. Während in den Normal- und Kontrollkulturen eine Vermehrung, starke Faserbildung und Hypertrophie der Fibroblasten erkennbar ist, verbleibt das Bindegewebe in den Methylcholanthrenkulturen zart und aufgelockert, ganz entsprechend den Verhältnissen in der normalen Prostata. Diese Anordnung gilt sowohl für die Mutterstücke als auch in späteren Züchtungsabschnitten für die Wachstumszone.

Die geschilderten Veränderungen, insbesondere das Verhalten des Epithels, veranlaßten uns, die in der Literatur erschienenen Berichte über das Wachstum von Organkulturen nachzulesen, dabei insbesondere das Verhalten von Epithel- und Bindegewebe zu studieren und mit unseren Ergebnissen zu vergleichen.

Bereits MITSUDA konnte an explantiertem Speicheldrüsengewebe erwachsener Kaninchen Epithelproliferationen mit Mitosen beobachten und fand eine gewisse Übereinstimmung mit epithelialen Blastomen. Dabei zeigten die Epithelien die Tendenz, das Bindegewebe zu durchwachsen und einzuschließen, eine Beobachtung, die wir auf Grund unserer Ergebnisse bestätigen können.

Zu gleichen Ergebnissen gelangte CHLOPIN bei der Züchtung von Speicheldrüsengewebe und Harnblasenschleimhaut des Kaninchens. Auch MAXIMOW berichtet über „krebssähnliche Verwandlung der Milchdrüse von Kaninchen in Gewebekulturen“. Die zu beobachtenden Veränderungen bestanden in starker Wucherung und Hypertrophie des Epithels der Ausführungsgänge mit Aufhebung der normalen Beziehungen zwischen Epithel und Bindegewebe. Mehrpolige Mitosen und Amitosen traten häufig auf. Als wichtigstes Merkmal des krebartigen Charakters des Epithels bezeichnet er dessen infiltratives Wachstum in das umgebende Bindegewebe in Form von kompakten Zellnestern mit Hornperlen. Diese „carcinomatösen“ Veränderungen entstanden stets polyzentrisch und tauchten gleichzeitig an verschiedenen Stellen auf.

Auch LANG sah „carcinomähnliche“ Bilder bei der Züchtung von Lungengewebe junger oder erwachsener Kaninchen. Bereits nach dem 4. Tag fand sich im Mutterstück ein epitheliales Zellwachstum in Form kompakter, runder, schlauchförmiger Epithelzapfen, die „krebssähnlich“ in das Lungengewebe vordrangen und häufig Mitosen aufwiesen.

O. KAPPEL gelangte bei Züchtung von Leber, Pankreas, Darm und Magen von Hühnerembryonen zu gleichen Resultaten. Transplantationen solcher Kulturen

auf verschieden alte Hühner ließen jedoch niemals Tumoren entstehen. Weitere Beobachtungen gleicher Art wurden von A. FISCHER an Irisepithelkulturen und von CHAMPY und COCA bei Züchtung eines gutartigen Adenoms gemacht.

An dieser Stelle seien auch die Ergebnisse von I. LASNITZKI erwähnt, die bei ihren mit Methylcholanthren behandelten Prostatakulturen Epithelwachstum und das Auftreten von anaplastischen Zellkomplexen mit abnormen Mitosefiguren beobachtete.

Alle Forscher sprechen von „krebsähnlichem“ Wachstum des Epithels in ihren Organkulturen und begründen die Krebsähnlichkeit mit der starken Wucherungsfähigkeit des Epithels, dem Auftreten verschieden großer plattenepithelartiger Zellen, teilweise mit Übergang in Verhornung, ihrer Fähigkeit zur Infiltration und der Sprengung der für das betreffende Organ normalen Epithel-Bindegewebskorrelation. Als weiteres wichtiges Zeichen wird das Erscheinen zahlreicher Mitosen und Amitosen hervorgehoben, wobei den pluripolaren Mitosen besondere Bedeutung beigemessen wird.

Auch in unseren Versuchen konnten wir alle diese Veränderungen vorfinden, die, ohne Kenntnis ihres Ursprungs, als krebsverdächtig anzusprechen sind. Würde der Pathologe an der Prostata in situ derartige Veränderungen und Proliferationen am Epithel mit den vielen Mitosen und Amitosen zu Gesicht bekommen, so müßte er sie als präcancerös bezeichnen, obgleich gerade an der menschlichen Prostata in höherem Alter solide und drüsige Epithelwucherungen auftreten, die trotz morphologischer Ähnlichkeit mit einem Krebs gutartige atypische Neubildungen darstellen (OBERNDORFER, NELLER und NEUBÜRGER, WALT-HARD). MAXIMOW bezeichnet das infiltrative Wachstum des Epithels in seinen Kulturen als das hauptsächliche Merkmal der krebsartigen Verwandlung. Wir konnten in unseren Kulturen an keiner Stelle Zeichen echter Infiltration beobachten, sondern lediglich eine Durchdringung des Bindegewebes mit gewucherten Epithelzellen, ein Vorgang, der nach SANTESSON als Invasion zu bezeichnen ist. Bereits 1942 wurde von E. KNAKE bezweifelt, daß es sich bei den von MAXIMOW beobachteten Infiltrationsvorgängen an normalem Gewebe in vitro um echte Infiltration gehandelt hat, zumal dieser Befund an Hand der gegebenen Abbildungen (es handelt sich fast ausnahmslos um Zeichnungen), kaum zu beurteilen ist. Der echte Infiltrationsvorgang ist immer mit Destruktion verbunden und stellt nach E. KNAKE die einzige physiologische Eigenschaft dar, die maligne Zellen in vitro von allen normalen Zellen unterscheidet.

Die von vielen Gewebezüchtern in vitro beobachteten „krebsähnlichen“ Veränderungen an verschiedenartigen Organgeweben sehen wegen der verwirrenden Buntheit des Epithels in bezug auf Zellgröße, Mitosenreichtum und Sprengung der normalen Korrelation zwischen Epithel und Bindegewebe zwar oft einem Krebs ähnlich, niemals war jedoch eine

mit Destruktion einhergehende Infiltration erkennbar. Am krebsähnlichsten sind die Befunde MAXIMOWS an Brustdrüsen von Kaninchen zu nennen, doch auch hier fehlt die Destruktion.

Nach dem Gesagten ergibt sich, daß organisierte Gewebe, wie Lunge, Brustdrüse, Leber, Darm, Pankreas usw. nach Züchtung einer gewissen Zeit *in vitro* ihre typische Architektonik verlieren. Die auswachsenden Zellen weisen nicht die für das betreffende Organ als regulär geltende Strukturierung auf und verlieren ihre typischen Merkmale. Während man früher auf Grund der Versuche CHAMPYS annahm, daß alle Zellen in der Gewebekultur zu einem gemeinsamen indifferenten Zelltyp sich hinentwickeln, weiß man seit langem, daß Epithel und Bindegewebe selbst nach jahrelanger Züchtung außerhalb des Organismus ihre besonderen Merkmale beibehalten. *In vitro* wächst das Bindegewebe in lockeren Zellsträngen aus, wobei sich die einzelnen Fibroblasten grasartig verflechten. Das Epithel dagegen bildet zusammenhängende Membranen, die durch mosaikartige Aneinanderlagerung der Zellen entstehen. Gleichgültig welche Epithelart, ob Platten-, Zylinder- oder kubisches Epithel explantiert wird, immer entsteht ein morphologisch einheitlicher Epithelzelltyp, ebenso wie in der Kultur aus den verschiedenen mesenchymalen Zellelementen nur Fibroblasten hervorgehen.

In der älteren Histologie, welche die Zellen als statische Systeme betrachtete, wurden derartige Strukturen als Entdifferenzierungsvorgänge gedeutet und daran Hypothesen über eine Potenserweiterung oder -verminderung geknüpft.

Durch zahlreiche Transplantationen von Gewebekulturen auf Wirtstiere wurde aber immer wieder der Beweis erbracht, daß die Grundeigenschaften der verschiedenen Zellarten erhalten blieben und diese sich genau wie normalerweise *in vivo* anordneten (C. CHAMPY, I. TÖRÖ), eine Beobachtung, die auch wir bei unseren *Autoretransplantaten* machen konnten. Es ist daher nicht anzunehmen, daß der an Geweben nach der Explantation beobachtete Verlust morphologischer und funktioneller Eigenschaften auf einer Entdifferenzierung beruht.

Die Retransplantation liefert somit den sicheren Beweis, daß explantiertes Gewebe anderen Gesetzen gehorcht als sie im Organismus bestehen. Als Ausdruck dieser Abhängigkeit entsteht ein neues Gewebsbild, das, verglichen mit dem *in situ*, vom gewohnten Aussehen abweicht. Es dürfen daher die *in vitro* auftretenden Gewebsveränderungen nicht mit den *in vivo* bekannten verglichen werden. So besitzt eine *in vitro* auftretende Störung der Epithel-Bindegewebekorrelation nicht dieselbe Bedeutung wie *in vivo*, und Gewebsveränderungen, die *in vivo* als krebsverdächtig anzusprechen sind, liefern *in vitro* keinen Hinweis auf eine etwa eingetretene Umwandlung in bösartiges Gewebe.

In der Gewebekultur sind die Gewebe sehr gleichmäßigen äußeren Bedingungen unterworfen, während sie in vivo von den verschiedensten hormonellen, nervösen und anderen Einflüssen abhängig sind. Diese Tatsache leitet zu der Frage über, ob die Gleichförmigkeit explantierten Gewebes durch die Konstanz des Milieus der Gewebekultur hervorgerufen wird. Dann wären die besonderen in vitro zu beobachtenden Gewebeveränderungen als Anpassungsvorgänge zu deuten. Allerdings sind derartige Akkommodationsformen nur in wachsenden Geweben zu beobachten. Wenn im Medium keine wachstumsfördernde Substanzen vorhanden sind, also Wachstumsruhe herrscht, so bewahren die Gewebekulturen auch in vitro ihre spezifischen Merkmale.

Die Ernährung der Zellen in vitro erfolgt nur durch Diffusion. Aus der Anatomie und Pathologie wissen wir, daß das mehrschichtige Plattenepithel bis auf seine basale Zellschicht ebenfalls durch Diffusion ernährt wird. Wenn daher die verschiedenen Epithelarten beim Wachstum in vitro nur einen einzigen Epithelzelltyp hervorbringen, der morphologisch mehrschichtigem Plattenepithel gleicht, so darf angenommen werden, daß dieser Typ Ausdruck einer Anpassung an die speziellen in vitro herrschenden Ernährungsverhältnisse und mechanischen Bedingungen darstellt. Die in unseren Versuchen beobachteten Epithelveränderungen im explantierten Prostatagewebe sind demnach als normales Epithelwachstum anzusehen.

Wir haben nun zu untersuchen, wie das Verhalten des Epithels in vitro begrifflich einzuordnen ist und ob die in der pathologischen Anatomie für ähnliche Gewebsveränderungen geltenden Bezeichnungen auch für unsere Versuchsergebnisse anwendbar sind.

Eine *direkte Metaplasie* ist von vornherein abzulehnen, da sie im Widerspruch zum Grundgesetz der Spezifität der Gewebe steht, wonach beim Menschen und bei höheren Tieren die ausdifferenzierten Zellen stets nur Zellen der gleichen Art bilden.

Von vielen Gewebezüchtern und Pathologen (A. FISCHER, Gg. HERZOG, O. LUBARSCH und E. WOLFF u. a.) wurde eine Gleichartigkeit des Geschehens in der Gewebekultur und im Organismus angenommen. Infolgedessen wurde das Wachstum einer Kultur als *regeneratorischer Vorgang* aufgefaßt und die dabei auftretenden morphologischen Veränderungen der Zellen als regeneratorische Umdifferenzierungen gedeutet.

Der pathologisch-anatomische Begriff der Regeneration erfaßt den Wiederersatz eines Zell- oder Gewebsdefektes aus unverändert gebliebenen Zellen der Umgebung. Ein Defekt ist jedoch in einer normalen Gewebekultur nicht vorhanden. Deshalb dürfen die in Gewebekulturen am Epithel und Bindegewebe zu beobachtenden Zellwucherungen nicht als Regenerationsvorgänge gedeutet werden. Aus dem gleichen Grunde

ist die mit der Zellwucherung einhergehende Strukturveränderung der Zellen nicht Ausdruck einer indirekten Metaplasie, d. h. also einer regeneratorschen Umdifferenzierung. Jedem Pathologen ist die im Gefolge chronischer Entzündung auftretende Umdifferenzierung von Epithelzellen bekannt, aus denen sich häufig Geschwülste entwickeln. Besonders am Respirationstrakt, der Haut und dem weiblichen Genitalapparat erfolgen Geschwulstbildungen oft auf dem Boden chronischer Entzündungen. Die morphologische Ähnlichkeit der bei derartigen Prozessen in vivo auftretenden Gewebsveränderungen mit den in vitro zu beobachtenden veranlaßte viele Gewebezüchter und Pathologen, Parallelen zu ziehen und beide Vorgänge miteinander zu vergleichen. Tatsächlich handelt es sich bei den in vitro und in situ zu beobachtenden Gewebsveränderungen um gänzlich differente Vorgänge, die demnach verschieden zu beurteilen sind.

An der Portio, der Cervix, der Lunge und anderen Organen würden derartige Epithelveränderungen die Bedeutung einer regeneratorschen Umdifferenzierung haben, die bei entsprechender Mitosevermehrung, dem Auftreten pathologischer Mitoseformen und Zeichen von Infiltration als krebbsverdächtig angesprochen zu werden verdienten.

In der Kultur dagegen tragen derartige Epithelveränderungen nur den Charakter einer *milieubedingten Anpassung*. Da hierbei echtes Zellwachstum auftritt, also das Epithel aktiv an der Vermehrung in vitro beteiligt ist, möchten wir für diesen Vorgang die Bezeichnung *aktive Akkommodation* vorschlagen und ihn so von der passiven Akkommodation, Pseudometaplasie (LUBARSCH), Allo- oder Dymorphie (ORTH), histologische Akkommodation (BORST) abtrennen, Begriffe, die nur eine passive Formveränderung der Zellen kennzeichnen.

Die Frage, ob die in vitro entstandenen Gewebsveränderungen tatsächlich irreversibel sind und ob eine Umwandlung in bösartiges Gewebe erfolgte, kann allein durch die Retransplantation der Kulturen auf das Tier beantwortet werden, wobei im Falle der Bösartigkeit hier maligne Tumoren entstehen müßten. Eine solche Beweisführung wurde bisher nur von KAPEL und zwar mit negativem Ergebnis versucht.

Daß die Zusammenhänge von uns richtig aufgefaßt sind, können wir durch die Rückverpflanzung der Prostatakulturen beweisen. Bereits nach wenigen Wochen in vivo hatten die ehemaligen Kulturen ihr für Mäuseprostata typisches Aussehen wiedergewonnen, wobei Epithel- und Bindegewebe ihr „normales“ Verhältnis zueinander wiedererlangten.

Wir haben weiterhin die Frage zu beantworten, ob dem von uns verwendeten Methylcholanthren ein besonderer Einfluß auf das Wachstum der Prostatakulturen zukommt. Während I. LASNITZKI eine Vermehrung der Epithelmitosen in ihren Kulturen auf die Wirkung des

Methylcholanthren zurückführt, konnten wir uns davon nicht überzeugen. Vielmehr scheint die Mitosevermehrung, die am ausgesprochensten in den ersten Züchtungsstadien erkennbar war, nur auf einer Acetonwirkung zu beruhen. Dagegen erwies sich das Methylcholanthren als zellschädigend, was besonders an dem Auftreten von Mitosestörungen deutlich wurde. Zwar konnten derartige Störungen in allen Kulturgruppen beobachtet werden, jedoch am stärksten bei den mit Methylcholanthren behandelten.

Diese Befunde gleichen denjenigen von MAUER, v. MÖLLENDORFF, BENEVOLENSKAJA, MORIGAMI, LEWIS und HEARNE-CREECH. Letztere sah eigentümliche Schlingen- und Knotenbildungen an den Chromosomen bei mit Dibenzanthracen und Methylcholanthren behandelten Zellen, während die übrigen Untersucher abirrende Chromosomen, Kernfragmentation, Auftreten mehrkerniger Zellen und tripolare Mitosen beobachteten. H. LETTRÉ fand bei Einwirkung von Atmungsgiften und cancerogenen Kohlenwasserstoffen auf Fibroblasten Plasmabewegungen, Plasmaabschnürungen und Abstoßung von Zellteilen, während EARLE bei Methylcholanthrenanwendung an Fibroblasten Zellverbreiterungen mit Einziehung der Ausläufer und Aneinanderlagerung der Zellen feststellen konnte.

v. MÖLLENDORFF und MAXIMOW beobachteten aber auch in normalen Fibroblastenkulturen Kernanomalien und Mitosestörungen. Deshalb warnt ersterer davor, derartige Störungen ohne weiteres auf den Einfluß cancerogener Kohlenwasserstoffe zu beziehen.

Eine besonders ins Auge fallende Wirkung entfaltete das Methylcholanthren in unseren Versuchen auf das Bindegewebe. Während an den Acetonkontroll- und Normalkulturen eine Verdichtung desselben zu beobachten war, blieb es in den Methylcholanthrenkulturen spärlich und locker. LASNITZKI sah ein gleichartiges Verhalten in ihren Versuchen und diskutiert die Frage, ob die Dürtigkeit des Bindegewebes in den Methylcholanthrenkulturen Folge des gesteigerten Epithelwachstums oder eine Methylcholanthrenwirkung ist. Auf Grund ihrer Ergebnisse und derjenigen von EARLE und VOEGTLIN wird das Methylcholanthren für die Bindegewebsverminderung in ihren Kulturen verantwortlich gemacht. Wir stimmen dem zu, da wir uns ebenfalls von einer Hemmung des Fibroblastenwachstums überzeugen konnten. Eine Steigerung des Epithelwachstums ist schon deshalb nicht für die Dürtigkeit des Bindegewebes verantwortlich zu machen, weil es sich in allen Versuchsgruppen gleichartig verhielt. Überdies wissen wir aus den Untersuchungen von E. KNAKE über die Epithel-Bindegewebskorrelation, daß physikalisch-chemische Faktoren (1940a) und chemische Substanzen (1951) Epithel und Bindegewebe auf eine voneinander verschiedene Weise beeinflussen können.

Schließlich ist die Frage zu erörtern, ob cancerogene Kohlenwasserstoffe, insbesondere Methylcholanthren, *in vitro* normale Zellen in maligne umwandeln können.

Von fast allen Forschern wurden bei diesen Versuchen Reinkulturen *mesenchymalen* Gewebes, insbesondere Fibroblasten verwendet, welche cancerogenen Kohlenwasserstoffen und anderen *in vivo* sicher krebs-erzeugenden Agentien in verschiedenster Konzentration ausgesetzt wurden.

1935 berichtete DES LIGNERIS, daß es ihm in einem von 6 Fällen gelungen sei, normale embryonale Hühnerfibroblasten mit Hilfe von Dibenzanthracen in Geschwulstzellen zu verwandeln. Nach 4wöchiger Züchtung mit dem Carcinogen und einer weiteren Woche ohne dasselbe wurden die Kulturen 6 Leghornhühnern in die Brustmuskulatur injiziert. Bei einem Tier bildete sich nach 6 Wochen ein Myxosarkom. Mehrere Nachuntersucher (BISCEGLIE und DI GRACIA, LARIONOW, IVACHENTZOVA und TSCHERTKOVA) konnten mit gleicher Methodik nur negative Ergebnisse aufweisen; die verimpften Kulturen brachten keine Geschwülste hervor. Weiterhin bewiesen AMIES, CARR und PURDY eindeutig, daß der Des Ligneris-Tumor engste Beziehungen zum Rous-Sarkom Nr. 1 hat. Es dürfte sich bei diesen Versuchen also um eine Verunreinigung der Kulturen mit dem Rous-Virus gehandelt haben, wie es in vorausgehenden Experimenten von CARREL, FISCHER und dessen Schüler LASER bei Arsenanwendung anscheinend auch der Fall war, da eine Reproduktion ihrer Ergebnisse nicht glückte (DEFRISE, CALÒ und HOSONO).

In den folgenden Jahren versuchten VOEGTLIN und EARLE, Fibroblastenkulturen *in vitro* mit Hilfe von Methylcholanthren zu cancerisieren. 1 γ je Kubikzentimeter Medium rief Degenerationen hervor und führte zum Tode der Kultur, während 0,2 γ je Kubikzentimeter Medium Wachstumsstörungen verursachten und nach 225 Tagen den Tod der Kultur zur Folge hatten. Ein Übergang in Malignität trat nicht ein.

Auch GEY und GEY versuchten wiederholt Fibroblasten *in vitro* zu cancerisieren, was jedoch in keinem Falle gelang. RUFFILLI verwendete Benzpyren in Konzentrationen von 1:150000 bis 1:7500000, um embryonale Hühnerherzfibroblasten und Chondroblasten *in vitro* zu cancerisieren, jedoch trat Übergang in Malignität nicht ein. LARIONOW, IVACHENTZOVA und TSCHERTKOVA sahen leichte Wachstumsanregung ihrer Fibroblastenkulturen bei Benzpyren- und Dibenzanthracenanwendung in den ersten 4–5 Tagen. Es fanden sich jedoch keine morphologischen Zellveränderungen, die auf beginnende bösartige Entartung hindeuteten. Auch Transplantationen der 1–2 Monate *in vitro* gezüchteten Kulturen auf Hühner führten nicht zur Tumorbildung.

Weitere Untersuchungen von MORIGAMI über die Einwirkung von Dimethylaminoazobenzol auf Hühnerherzfibroblasten blieben erfolglos, da nach Verimpfung niemals Sarkome entstanden. Allerdings wurden die Transplantationen bereits nach wenigen Passagen *in vitro* durchgeführt. Ebenfalls negative Ergebnisse werden von BENEVOLENSKAJA, TIMOFEEVSKI und BENEVOLENSKAJA und FURTADO DIAS beschrieben. In ihren Versuchen wurden Hühnerherzfibroblasten und embryonales Rattengewebe den verschiedensten Konzentrationen cancerogener Kohlenwasserstoffe ausgesetzt. Die Züchtungsdauer betrug bis zu 150 Tagen. Transplantationen derartiger Kulturen führten nicht zur Ausbildung eines Tumors. MAGATH züchtete Mäuse- und Hühnerherzfibroblasten wenige Tage mit Zusatz cancerogener Kohlenwasserstoffe im Medium. Anschließend wurden die Kulturen

mehrere Wochen in normaler Nährflüssigkeit gezüchtet. Nach etwa 4 Wochen wuchsen die so behandelten Kulturen schneller als die entsprechenden Kontrollen, wiesen stärkere Verflüssigungszonen auf und infiltrierten beigegebenes Muskelgewebe. Eine Überimpfung derartiger Kulturen auf Mäuse führte nicht zur Bildung von Geschwülsten. LEWIS und WOLBACH berichten ebenfalls über die Einwirkung cancerogener Kohlenwasserstoffe auf Gewebekulturen. Eine gegenüber den Kontrollen nachweisbare Wachstumssteigerung der Kulturen wurde nicht beobachtet. Allerdings betrug die Einwirkungszeit in den Versuchen von LEWIS nur 24—48 Std.

Eine besondere Bedeutung haben nun aber die neueren Untersuchungen von EARLE, dem es gelang, normale Mäusefibroblasten in der Gewebekultur durch Methylcholanthreneinwirkung in bösartige zu verwandeln. Verimpfungen auf Mäuse führten zur Bildung von weiter verimpfbaren Sarkomen. Da aber auch die Kontrollen gleiche Ergebnisse zeigten, wobei die Möglichkeit einer Verunreinigung mit Methylcholanthren negiert wird, kann die maligne Umwandlung der Zellen nicht dem Methylcholanthren zugeschrieben werden, sondern muß andere Gründe haben. GEY beobachtete sogar eine spontane Umwandlung normaler Zellen in maligne ohne Zusatz eines cancerogenen Stoffes und nimmt an, daß ein derartiges Ereignis häufiger vorkommt als man es allgemein vermutet.

In neuester Zeit haben GOLDBLATT und G. CAMERON, sowie LANDSCHÜTZ über gelungene Malignisierung normaler Körperzellen in vitro ohne Verwendung cancerogener Kohlenwasserstoffe berichtet.

Angeregt durch die Untersuchungen WARBURGS über die anaerobe Glykolyse der Tumoren versuchten erstere durch Einschaltung anaerober Phasen während $2\frac{1}{2}$ jähriger Züchtungsdauer, Herzfibroblasten 5 Tage alter Ratten in Sarkomzellen umzuwandeln. Bei den angesetzten 6 Stammkulturen konnte in 2 Versuchsreihen neoplastisches Gewebe beobachtet werden, das nach subcutaner oder intraoculärer Verimpfung auf Ratten verschiedener Stämme spindel- oder polymorphzellige Sarkome entstehen ließ. Die Kontrollen erbrachten niemals Tumoren.

LANDSCHÜTZ züchtete Hühnerherzfibroblasten in dialysiertem Plasma, Embryonalextrakt und menschlichem Nabelschnurserum 6—8 Wochen lang. Wurden derartige Kulturen erwachsenen Hähnen unter die Haut transplantiert, so bildeten sich „Bindegewebstumoren“. In anderen Versuchen konnten mit nur 3 Wochen alten Kulturen nach Verimpfung Tumoren beobachtet werden, die mikroskopisch als Geschwülste von reticulo-sarkomatöser Natur imponierten. Der Grund zur Umwandlung wird in der Verarmung des Mediums an den für das normale Wachstum notwendigen niedermolekularen wasserlöslichen Substanzen gesehen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß bisher in keinem Fall Malignität in vitro erzeugt wurde, wobei eine der aus dem Tierversuch bekannten *cancerogenen Substanzen* eine unbestreitbar ursächliche Rolle gespielt hätte, eine Feststellung, die bereits im Jahre 1940(b) von E. KNAKE gemacht wurde. Auch in unserem Falle trat eine Umwandlung normaler Zellen in bösartige nicht ein, obwohl Methylcholanthren längere Zeit dem Nährmedium zugesetzt worden war.

Als Tatsachen sind die zuletzt aufgeführten Untersuchungen für das gesamte Problem der experimentellen Geschwulstforschung sehr wichtig. Sie zeigen, daß eine Cancerisierung mesenchymaler Elemente in vitro

möglich ist, während eine krebsige Umwandlung epithelialer Zellen noch nicht gelang. Die genannten Ergebnisse bringen jedoch in den *Vorgang* der Geschwulstentstehung ebenso wenig Licht wie die Versuche von EARLE.

Wie unsere Darstellung zeigt, liegt jetzt schon eine stattliche Zahl von Experimenten vor, Gewebekulturen zu cancerisieren. Umwandlungen normaler Gewebe in maligne sind in vitro mehrfach gelungen, aber bisher niemals in eindeutiger Abhängigkeit von Substanzen, die aus dem Tierversuch als cancerogen bekannt sind. So liegt die Vermutung nahe, daß diese Stoffe auf die Mitwirkung des Organismus angewiesen sind. Vielleicht ist ihr Angriffspunkt nicht die Zelle selbst. Dem widerspricht jedoch, daß sie in Krebszellen nachgewiesen werden konnten (GRAFFI). Wahrscheinlicher ist, daß sie nicht in ihrer ursprünglichen Form, wie sie dem Körper zugesetzt wurden, krebserzeugend wirken, sondern erst nach einer chemischen Umwandlung, die vom Organismus bewirkt wird. In diesem Fall wäre es verständlich, daß bisher niemals krebsige Umwandlungen in vitro aufgetreten sind, bei denen die Ursache mit Sicherheit eine sog. cancerogene Substanz war.

Zusammenfassung.

Prostatagewebe 6—8 Wochen alter Inzuchtmäuse wurde in 75 Rollkulturen mit und ohne Methylcholanthrenzusatz 25 Tage lang gezüchtet und nach 5, 10, 15, 20 und 25 Tagen im Totalpräparat und in Paraffinschnitten histologisch untersucht. Weitere 50 Prostatakulturen konnten nach 35tägiger Züchtung in vitro den gleichen Mäusen retransplantiert werden, denen sie entstammten.

Bereits nach wenigen Tagen war das Prostatagewebe in allen Kulturgruppen deutlich umgebaut, wobei die Epithel-Bindegewebskorrelation völlig gesprengt wurde. Das Epithel wies erhebliche Proliferationen auf, die sich aus mosaikartig gelagerten Zellen zusammensetzten, so daß plattenepithelartige Formationen entstanden. Gegenüber den Normalkulturen enthielten die Methylcholanthren- und Acetonkontrollkulturen in größerer Zahl Epithelmitosen. Atypische Teilungsfiguren wurden in allen Kulturgruppen, jedoch in besonderer Anzahl bei den mit Methylcholanthren behandelten Kulturen beobachtet.

Das Bindegewebe wies in den Normal- und Acetonkontrollkulturen eine Verdichtung mit Hypertrophie und starker Faserbildung der Zellen auf, während es in den Methylcholanthrenexplantaten spärlich und aufgelockert blieb.

In den späteren Züchtungsstadien traten an den Fibroblasten der Methylcholanthren- und Acetonkontrollkulturen degenerative Verfettung und Kernvacuolen auf.

Die gefundenen Epithelveränderungen, die von vielen Forschern an anderen Organexplantaten als „krebsähnlich“ angesehen wurden, werden durch die besonderen in vitro herrschenden Verhältnisse erklärt und die dadurch bedingten Strukturveränderungen der Epithelien als „aktive Akkommodation“ bezeichnet.

Als Beweis für die Richtigkeit dieser Auffassung sind die Ergebnisse der Autoretransplantation von Kulturen zu werten. Die in vitro vollkommen gesprengte Epithel-Bindegewebskorrelation des Prostatagewebes war bereits wenige Wochen nach dem Aufenthalt der Kulturen in vivo wieder normalisiert, wobei das Epithel sein ursprüngliches Aussehen wiedergewann. Ein Übergang in Bösartigkeit im Sinne der pathologischen Anatomie war bei keinem Transplantat zu beobachten.

Literatur.

- AMIES, C. R., J. G. CARR and W. J. PURDY: Amer. J. Canc. **35**, 72 (1939). — BENEVOLENSKAJA, S. V.: Arch. biol. nauk. **57**, 94 (1940). Ref. Ber. Biol. **55**, 519 (1941). — BISCEGLIE, V., u. A. DI GRACIA: Acta cancerol. (Ung.) **2**, 417 (1936). — CALÒ, A.: Boll. ital. Leg. p. l. Lotta c. i. cancro **9**, 3 (1935). Zit. nach KNAKE. 1940b. — CARREL, A.: C. r. Soc. Biol. Paris **93**, 1083 (1925); **96**, 1121 (1927). — CHAMPY, C.: Bibliogr. anat. **33** (1913). Zit. nach I. FISCHER, Grundriß der Gewebezüchtung. Jena: Gustav Fischer 1942. — Archives de Zool. **55** (1914). Zit. nach I. FISCHER. — CHAMPY, C., et F. COCA: C. r. Soc. Biol. Paris **77**, 238 (1914). — CHLOPIN, N.: Virchows Arch. **243**, 373 (1923); **252**, 748 (1924). — DEFRISE: Z. Krebsforsch. **30**, 165 (1930). — DES LIGNERIS, M.: C. r. Soc. Biol. Paris **120**, 777 (1935); **121**, 1579 (1936). — EARLE, W. R.: A.A.A.S. Res. Conf. on Canc. 1943, 139. — J. Nat. Canc. Inst. **10**, 865, 1067, 1105 (1950); **11**, 351, 817 (1950/51). — EARLE, W. R., and C. VORGTIN: Amer. J. Canc. **34**, 373 (1939). — FISCHER, A.: J. of Exper. Med. **35**, 367 (1922). — C. r. Soc. Biol. Paris **94**, 1217 (1926). — Verh. dtsch. path. Ges. **1931**. — FURTADO DIAS, M. T.: Arqu. Pat. **13**, 452 (1941). Ref. Z. Krebsforsch. **54**, 17 (1943). — GEY, F. O.: Zit. nach LETTRÉ. — GEY, G. O., and M. K. GEY: Amer. J. Canc. **27**, 45 (1936). — GOLDBLATT, H., and G. CAMERON: J. of Exper. Med. **97**, 524 (1953). — GRAFFI, A.: Z. Krebsforsch. **52**, 165, 234, 254 (1941). — HEARNE-CREECH, E. M.: Amer. J. Canc. **35**, 191 (1939); **39**, 149 (1940). — HERZOG, GG.: Zbl. Path. **57**, 353 (1933). — HOSONO, SH.: Mitt. path. Inst. Niigata **1936**. Ref. Ber. Biol. **43**, 100 (1937). — KAPEL, O.: Arch. exper. Zellforsch. **8**, 35 (1929). — KNAKE, E.: Virchows Arch. **306**, 88 (1940a). — Klin. Wschr. **1940b**, 673. — Z. Krebsforsch. **52**, 269 (1942). — Virchows Arch. **319**, 551 (1951). — LANDSCHÜTZ, CH.: Naturwiss. **40**, 444 (1953). — LANG, F. J.: Arch. exper. Zellforsch. **2**, 93 (1926). — LARIONOW, L. TH., N. G. IVACHENTZOVA i M. A. TSCHERTKOVA: Bull. Biol. et Méd. expér. USSR. **6**, 113 (1938). Ref. Ber. Biol. **50**, 452 (1939). — LASER, H.: Arch. exper. Zellforsch. **6**, 142 (1928). — Klin. Wschr. **1927**, 698. — LASNITZKI, I.: Brit. J. Canc. **5**, 345 (1951). — LETTRÉ, H.: Naturwiss. **39**, 90 (1952). — LEWIS, M. R.: Amer. J. Canc. **25**, 305 (1935). — LUBARSH, O., u. E. WOLFF: Jkurse ärztl. Fortbildg **1925**, 2. — MAGATH, M. A.: Acta med. USSR. **2**, 53 (1939). Ref. Z. Krebsforsch. **51**, 16 (1941). — MAUER, G.: Arch. exper. Zellforsch. **21**, 191 (1938). — MAXIMOW, A.: Virchows Arch. **256**, 813 (1925). — MITSUDA, T.: Virchows Arch. **242**, 310 (1923). — MÖLLENDORFF, W. v.: Z.

Zellforsch. **29**, 706 (1939). — MORIGAMI, SH.: Gann **33**, 281 (1939). Ref. Z. Krebsforsch. **51**, 149 (1941). — NELLER, K., u. K. NEUBÜRGER: Münch. med. Wschr. **1926**, 57. — OBERNDORFER, S.: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie, Bd. VI/3, S. 457. 1931. — PRICE, D.: Ann. Rep. Strangways. Res. Lab. Cambridge. Zit. nach LASNITZKI. — RUFFILLI, D.: Ric. Sci. **2**, 508 (1936). Ref. Z. Krebsforsch. **46**, 24 (1937). — SANTESSON, L.: Zit. nach KNAKE 1942. — SHEAR, M. J.: Amer. J. Canc. **26**, 322 (1936). — TIMOFEJEWSKI, A. D., u. S. V. BENEVOLENSKAJA: Arch. biol. Nauk. **56**, 23 (1939). Ref. Ber. Biol. **55**, 15 (1941). — TÖRÖ, I.: Arch. exper. Zellforsch. **14** (1933); **20** (1937). — VOEGTLIN, C.: Science (Lancaster, Pa.) **88**, 41 (1938). — WALTARD, B.: Zit. nach E. KAUFMANN, Lehrbuch der speziellen Pathologie und Anatomie, Bd. II, S. 1441. Berlin 1941. — WOLBACH, S. B.: Amer. J. Path. **13**, 662 (1937).

Dr. med. EBERHARD SAUERTEIG, Oberarzt am Pathologisch-Anatomischen Institut des Städt. Wenckebach-Krankenhauses, Berlin-Tempelhof, Moltkestr. 23.
