

ABHANDLUNGEN DER DEUTSCHEN AKADEMIE
DER WISSENSCHAFTEN ZU BERLIN

Klasse für Medizinische Wissenschaften
Jahrgang 1953 Nr. 1

PROBLEME DER KREBSFORSCHUNG
UND KREBSBEKÄMPFUNG

Sektions-Veröffentlichung Nr. 1
der Klasse für Medizinische Wissenschaften der Akademie
Sektion für Geschwulstkrankheiten

1954

AKADEMIE-VERLAG · BERLIN

ABHANDLUNGEN DER DEUTSCHEN AKADEMIE
DER WISSENSCHAFTEN ZU BERLIN

Klasse für Medizinische Wissenschaften

Jahrgang 1953 Nr. 1

PROBLEME DER KREBSFORSCHUNG
UND KREBSBEKÄMPFUNG

Sektions-Veröffentlichung Nr. 1
der Klasse für Medizinische Wissenschaften der Akademie
Sektion für Geschwulstkrankheiten

1954

AKADEMIE · VERLAG · BERLIN

Erschienen im Akademie-Verlag GmbH., Berlin W 8, Mohrenstraße 39
Veröffentlicht unter der Lizenznummer 1218
des Amtes für Literatur und Verlagswesen der Deutschen Demokratischen Republik
Satz und Druck der Buchdruckerei F. Mitzlaff, Rudolstadt i. Thür. (622) V/14/7
Bestell- und Verlagsnummer 2001/53/II/1
Preis: DM 12,—
Printed in Germany

Inhalt

der zur Veröffentlichung eingereichten Vorträge und Diskussionsbeiträge

I. THEORIE

A. GRAFFI:	Untersuchungen über den Mechanismus der Cancerogenese und die Wirkungsweise cancerogener Reize	1
	<i>Diskussion: W. Felix, A. Graffi</i>	27
W. FISCHER:	Histogenese des Krebses	29
	<i>Diskussion: H. Lax, H. Güthert, A. Fromme, A. Graffi, W. Fischer</i>	30
W. HOHLWEG:	Endokrinologie des Krebses	34
F. H. SCHULZ:	Krebsreaktionen	46
	<i>Diskussion: H. Gummel, A. Graffi, A. Fromme, W. Garn, K. Lühr, H. Przemeczek, F. Jung</i>	56

II. KLINIK

W. FELIX:	Stand der operativen Behandlung des Carcinoms	60
	<i>Diskussion: M. Biebl, A. Ladwig, W. Felix</i>	67
F. GIETZELT:	Die Strahlentherapie der Krebskrankheiten	69
	<i>Diskussion: W. Lahm, H.-J. Eichhorn, H. K. Parchwitz</i>	76
H. KRAATZ:	Chirurgisch-gynäkologische Krebsbehandlung	80
	<i>Diskussion: G. Döderlein, G. Mestwerdt</i>	93
W. MÖBIUS:	Strahlentherapeutisch-gynäkologische Krebsbehandlung	95
	<i>Diskussion: O. Gulbin</i>	105
H. CRAMER:	Krebshemmende Substanzen und Faktoren	107
W. LÜHRS:	Antiwuchsstoffe	119
	Neuere Erkenntnisse über Mesenchym, Gewebsalterung und Krebsgeschehen	123
B. KARITZKY:	Die symptomatische Krebsbehandlung	129

III. STATISTIK

W. FISCHER:	Theorie der Krebs-Statistik	132
R. SCHRÖDER:	Klinische Voraussetzungen für die Statistik	135
G. P. WILDNER:	Beitrag zu einem statistisch auswertbaren Krankenblatt für Geschwulstkranken	139
	<i>Diskussion: H. Schwarz</i>	159
H. REDETZKY:	Sozialhygiene und Gesundheitspolitik bei der Krebsbekämpfung	160
	<i>Diskussion zu Fragen der Krebsstatistik und Krebsbekämpfung:</i> <i>H. Kästner, W. Fischer, H. H. Schmid, G. Mestwerdt, B. Karitzky, A. Krautwald, H. Küstner,</i> <i>W. Oelssner, K. Reifarh, H. Burghardt</i>	163

Untersuchungen über den Mechanismus der Cancerogenese und die Wirkungsweise cancerogener Reize

von Prof. Dr. A. GRAFFI

Leiter der Abteilung für biologische Krebsforschung
des Instituts für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften, Berlin-Buch
(Direktor: Prof. Dr. W. FRIEDRICH)

Schon von FISCHER-WASELS (1) wurde die Geschwulstbildung als ein komplexer Vorgang angesehen, indem er die Bildung einer sogenannten Tumorkeimanlage und deren Realisierung zur manifesten Geschwulst unterschied. Eine wichtige experimentelle Stütze für diese Ansicht erbrachten DEELMAN (2), MCKENZIE und ROUS (3), und RONDONI (4), indem sie feststellten, daß nach einer für sich allein unzureichenden Teerung der Mäusehaut die Geschwulstbildung durch Brandwunden oder Verletzungen ausgelöst werden kann.

In früheren Versuchen (5) erzielten wir bereits durch 3- bis 5malige aufeinanderfolgende Benzpyren-Tropfungen einige Geschwülste und kamen zur Schlußfolgerung, daß an dem komplexen Vorgang der Cancerogenese neben einer eventuell spezifischen irreversiblen Wirkung des Cancerogens auf die Epithelzellen noch eine Superregeneration und bestimmte Veränderungen am Gefäßbindegewebe beteiligt sind. Von entscheidender Bedeutung war jedoch der Nachweis von BERENBLUM und SHUBIK (6), daß man nach kurzdauernder Behandlung der Mäusehaut mit cancerogenen Kohlenwasserstoffen (KWSt) die Geschwulstbildung durch eine lokale Nachbehandlung mit Crotonöl auslösen kann, welches allein praktisch keine geschwulstbildende Wirkung besitzt. Damit wurde am eindeutigsten der Nachweis erbracht, daß sich die Geschwulstbildung mindestens aus zwei voneinander unterschiedlichen Teilvorgängen zusammensetzt:

1. einem spezifischen Initialvorgang, der nur durch ein Cancerogen ausgelöst wird und den wir im folgenden in Anlehnung an FISCHER-WASELS als die Bildung einer Tumorkeimanlage (TKA) bezeichnen wollen;
2. aus einem weniger spezifischen, auch durch nichtcancerogene Reize, z. B. Crotonöl oder Verletzungen, auslösbaren Vorgang, durch den die latente TKA in eine manifeste Geschwulst übergeführt wird.

Krebsforschung und Krebsbekämpfung

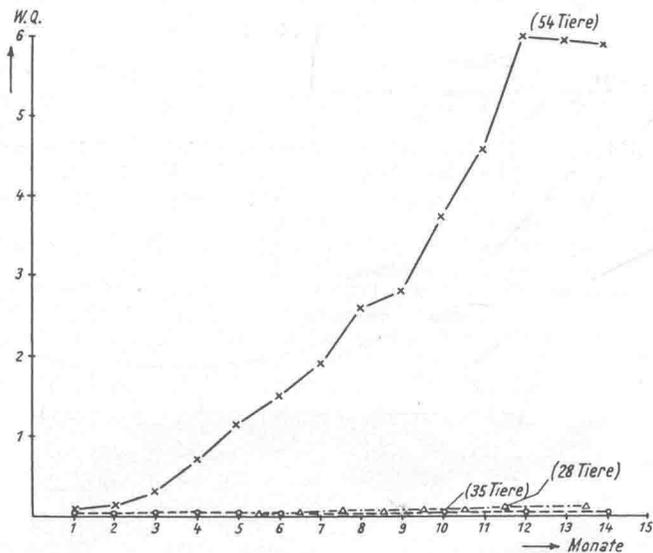


Abb. 1. Vergleich der kombinierten Cancerogen-Crotonölvirkung mit der Wirkung des Cancerogens und des Crotonöls allein.

× = einmalige Tropfung der Mäusehaut mit 100 γ DMBA, 0,2proz. Lösung in Aceton und laufende, einmal wöchentliche Tropfung der gleichen Hautstelle (Rücken) mit 5proz. Crotonöl-Lösung in Paraffinöl.

○ = einmalige Tropfung der Mäusehaut mit 100 γ DMBA ohne Crotonölnachbehandlung.

Δ = laufende, einmal wöchentliche Tropfung mit 5proz. Crotonölvorgang ohne Cancerogenvorbehandlung.

W. Q. = Zahl sämtlicher Geschwülste (gut- und bösartige), dividiert durch Anzahl der überlebenden Tiere.

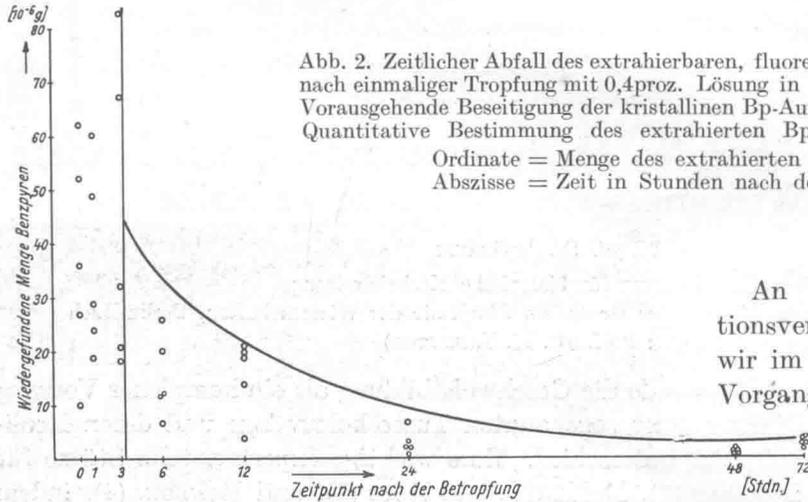


Abb. 2. Zeitlicher Abfall des extrahierbaren, fluoreszenzfähigen Bp der Mäusehaut nach einmaliger Tropfung mit 0,4proz. Lösung in Aceton = ∞ 200 γ Cancerogen. Vorausgehende Beseitigung der kristallinen Bp-Auflagerung nach der Applikation. Quantitative Bestimmung des extrahierten Bp durch Fluoreszenzmessungen.

Ordinate = Menge des extrahierten Bp in γ .
Abszisse = Zeit in Stunden nach der Tropfung.

An Hand solcher Kombinationsversuche mit Crotonöl wollen wir im folgenden versuchen, den Vorgang der Cancerogenese zu

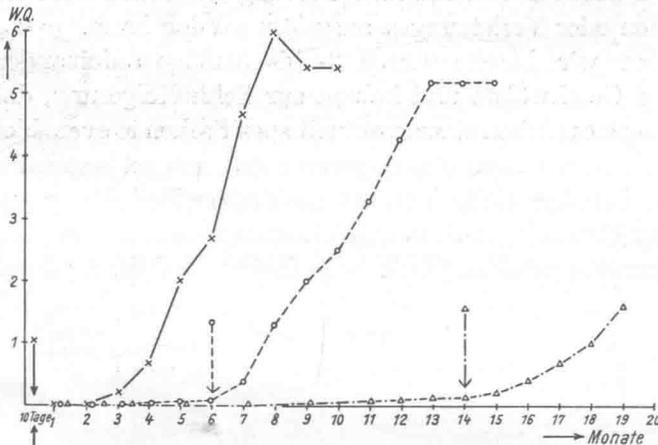


Abb. 3. Crotonölnachbehandlung zu verschiedenen Zeiten nach der einmaligen Tropfung mit DMBA.

— x = einmal 250 γ DMBA und laufende Crotonölnachbehandlung nach 10 Tagen beginnend.
--- o = einmal 250 γ DMBA und Crotonöl, 6 Monate nach der Cancerogen-Applikation beginnend.
- - Δ = einmal 100 γ DMBA und Crotonölnachbehandlung, 14 Monate nach der Cancerogen-Applikation beginnend. Crotonölnachbehandlung bei sämtlichen Versuchen einmal wöchentlich mit 5proz. Lösung. Pfeile geben den Beginn der Crotonölnachbehandlung für jede Versuchsserie an.

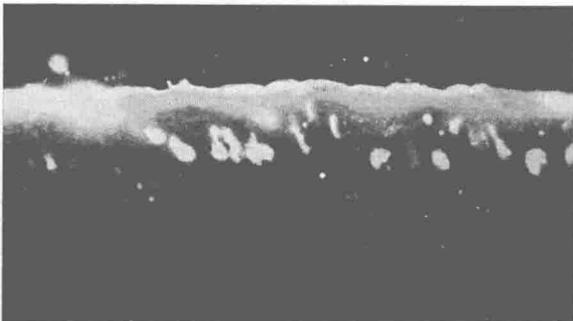


Abb. 4. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Mäusehaut 2 Stunden nach einmaliger Auftropfung einer Benzopyren-Lösung (schwache Vergrößerung). Starke Speicherung des cancerogenen KWSt in der Epidermis und den Haarbälgen, speziell den Talgdrüsen. Relativ geringe Speicherung im Bindegewebe des Coriums und der Subcutis.

analysieren. In der Abb. 1 ist ein derartiger Kombinationsversuch einer einmaligen Tropfung der Mäusehaut mit dem starken cancerogenen KWSt 9, 10-Dimethyl-1,2-Benzanthrazen (DMBA) und nachfolgender Crotonölbehandlung, die laufend einmal wöchentlich mit einer 5proz. Lösung in Paraffinöl erfolgte, dargestellt. Sowohl das Cancerogen allein in der angewandten Dosierung als auch das Crotonöl allein waren praktisch wirkungslos, während die Kombination beider Behandlungsweisen eine große Anzahl von Geschwülsten, und zwar im Durchschnitt 6 Tumoren pro Tier, auslöste¹⁾.

Zunächst wenden wir uns dem Vorgang zu, der der TKA-Bildung zugrunde liegt.

1. Es handelt sich dabei um einen rasch ablaufenden Prozeß in der Haut, da bereits eine einmalige Tropfung mit einem cancerogenen KWSt ausreicht, um ihn auszulösen (MOTTRAM) (7). In unseren Versuchen genügten vom

¹⁾ Eine Auslösung von Hautgeschwülsten gelingt auch durch einmalige iv. oder ip. Injektion des KWSt und nachträgliche Crotonölbehandlung der Haut (GRAFFI u. SCHARSACH).

starken cancerogenen KWSt 9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthrazen bereits weniger als 10 γ bei einmaliger Applikation, um TKA hervorzurufen. Nach einmaliger Tropfung ist der unverändert fluoreszenzfähige cancerogene KWSt nur einige Tage aus der Haut extrahierbar¹ (Abb. 2) oder fluoreszenzmikroskopisch in ihr nachweisbar (8). Bei so geringen Mengen wie 10 γ ist die Cancerogenfluoreszenz in der Haut nach 24 Stunden fast immer erloschen.

2. Es scheint sich dabei, wie schon FISCHER-WASELS vermutete und BERENBLUM (6) und auch wir selber nachweisen konnten (9), um einen irreversiblen Vorgang zu handeln, da selbst eine erst viele Monate später einsetzende Crotonöltropfung zur Tumorbildung führt (Abb. 3), wobei ungefähr die gleiche oder sogar eine etwas höhere Tumorquote erzielt wird wie bei sofort anschließender Crotonölapplikation. Selbst wenn die Crotonöltropfung bei der Maus 14 Monate und beim Kaninchen, bei dem das Crotonöl ebenfalls geschwulstrealisierende Wirkung besitzt (10), 2 Jahre nach der Cancerogenapplikation einsetzt, kam es in unseren Versuchen zur Realisierung latenter TKA. Da 14 Monate der durchschnittlichen Lebenserwartung einer Maus entsprechen, muß die TKA als ein Vorgang betrachtet werden, der während des ganzen Lebens in latenter Form bestehen bleiben kann.

3. Es ergibt sich die wichtige Frage, an welchen Bestandteilen der Haut das Cancerogen bei der Bildung einer TKA angreift. Auf Grund

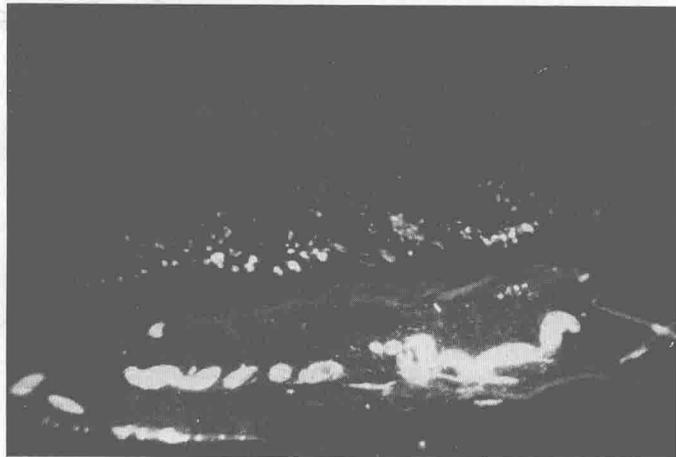


Abb. 5. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Mäusehaut nach einmaliger Applikation des cancerogenen KWSt-Benzpyren in das subcutane Bindegewebe. Starke Anreicherung des Cancerogens in dem subcutanen Bindegewebe, speziell in den markhaltigen Nervenfasern und im Fettgewebe der Subcutis, bei fast fehlender Speicherung in den Haarbalgen und vor allem in den Epithelzellen der Epidermis (schwache Vergrößerung).

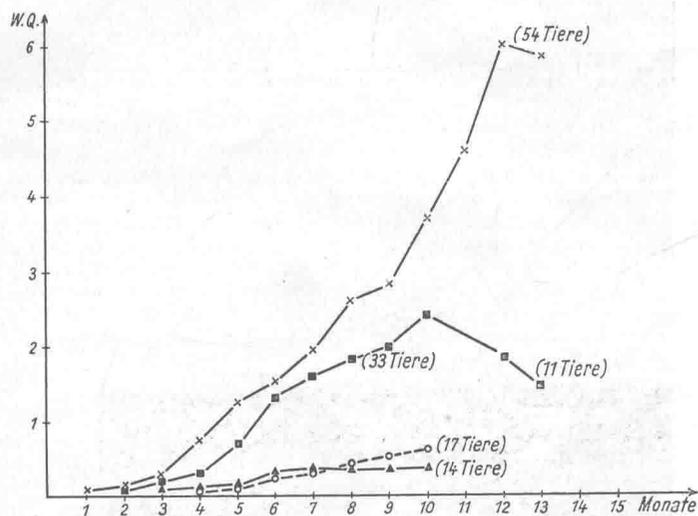


Abb. 6. Geschwulstbildung im Kombinationsversuch mit Crotonöl bei Auftropfung, intra- und subcutaner Injektion des Cancerogens.

- × = einmal 100 γ DMBA auf die Haut aufgetropft und laufende Crotonölbehandlung.
 - = einmal 200 γ DMBA subcutan injiziert und laufende Crotonölbehandlung.
 - ▲ = 5mal 125 γ DMBA subcutan injiziert und laufende Crotonölbehandlung.
 - = einmal 240 γ DMBA intracutan injiziert und laufende Crotonölbehandlung.
- (WQ = Anzahl der Geschwülste pro Tier.)

¹ Untersuchungen gemeinsam mit Dr. L. HERFORTH, E. SCHNEIDER und W. KRISCHKE.

der fluoreszenzmikroskopisch nachweisbaren Speicherung der cancerogenen KWSt in den verschiedenen histologischen Hautbestandteilen (8) kommen in erster Linie in Frage: a) die Epithelzellen der Epidermis und Haarbälge, b) die Gefäße und das Mesenchym der Cutis, c) die Nerven der Haut, die alle das Cancerogen mehr oder weniger stark zu speichern vermögen.

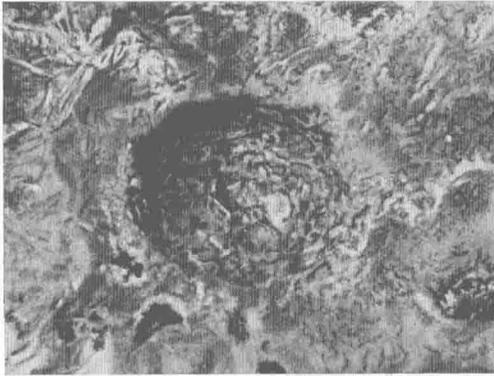


Abb. 7 a. Warzenbildung an der Kaninchenhaut nach Transplantation dünner Thiersch'scher Lappen, die nach vorausgegangener kurzfristiger Tropfung mit DMBA und Zwischenschaltung eines 2 wöchentlichen behandlungsfreien Intervalls entnommen und an entfernter, unbehandelter Körperstelle auf das subcutane Bindegewebe transplantiert wurden.

Bei verschiedenen Applikationsweisen des Cancerogens ist die histologische Verteilung des KWSt stark unterschiedlich. Beim Auftropfen ist die Speicherung in den Epithelzellen (Epidermis, Haarbälge, speziell Talgdrüsen) weitaus am stärksten (Abb. 4). Bei der Injektion in die Haut tritt die Speicherung im Bindegewebe, speziell Fettgewebe und in den markhaltigen Nerven stark hervor bei geringer Anreicherung des Cancerogens im Epithel (Abb. 5). Bei der Applikation ungefähr gleicher Cancerogenmengen entstehen im Tropfungsversuch¹, also derjenigen Applikation, bei der die stärkste Anreicherung des Cancerogens in den Epithelzellen stattfindet, weitaus die meisten Tumoren (Abb. 6). Damit spricht dieser Befund für eine direkte Wirkung des Cancerogens auf die Epithelzelle bei der Bildung einer TKA.

In gleichem Sinne sprechen noch folgende Befunde:

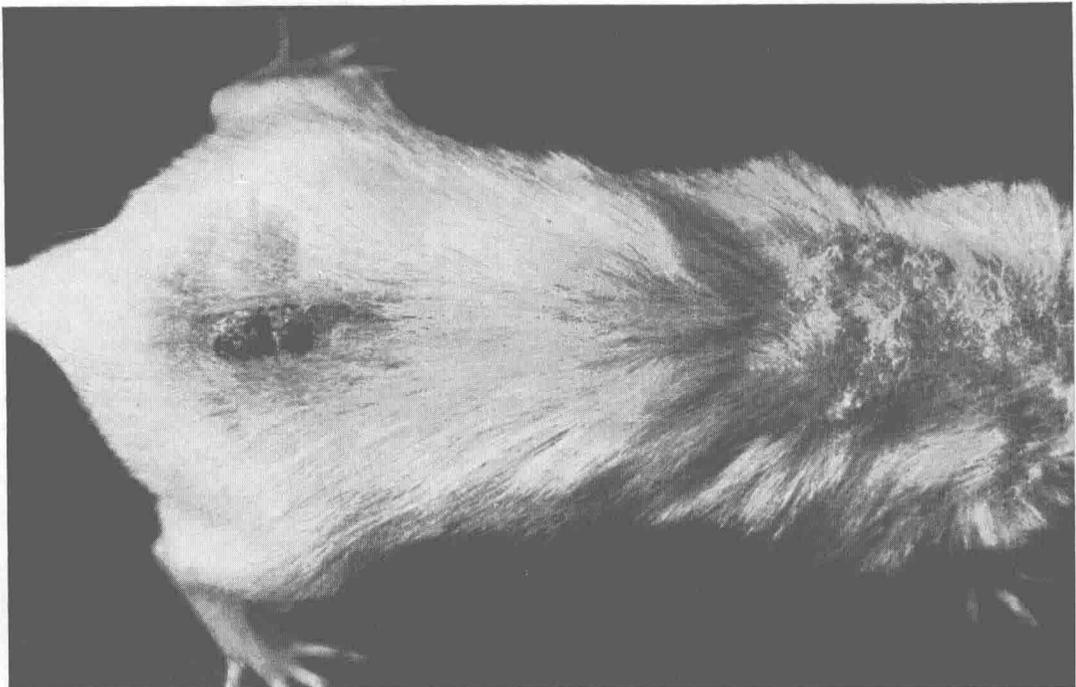


Abb. 7 b. Warzenbildung am Schwanzende des Rückens einer Maus nach Transplantation dünner Thiersch'scher Lappen, die vom kurzfristig mit DMBA (10mal 0,01proz. Lösung in 10 Tagen) getropften Nackenfeld entnommen wurden. Die Transplantation auf das nicht behandelte hintere Rückenfeld erfolgte eine Woche nach der letzten Tropfung.

¹ Untersuchungen gemeinsam mit Dipl.-Biol. W. KRISCHKE.

1. In noch nicht völlig abgeschlossenen Versuchen¹ gelang es uns, sowohl bei der Maus als auch beim Kaninchen eine Geschwulstbildung dadurch zu erzielen, daß wir ganz dünne coriumarme THIERSCH'sche Lappen, die einer kurzdauernd mit einem starken Cancerogen betropften Hautstelle entnommen wurden, auf eine nichtgetropfte, bindegewebige Unterlage (Subcutis) verpflanzten (Abb. 7a u. 7b).

2. In Versuchen an Hauttransplantaten der Maus (11) konnten wir feststellen, daß die Bildung der TKA auch dann erfolgt, wenn die kurzdauernde Tropfung des Transplantates mit dem Cancerogen in jenem Zeitraum nach der Transplantation stattfindet, in welchem auf Grund der morphologischen Untersuchung die nervöse Verbindung des Hautlappens mit dem Zentralnervensystem aufgehoben ist (Abb. 8). Die zentralnervöse Versorgung scheint also für die Bildung einer TKA in der Haut nicht erforderlich zu sein.

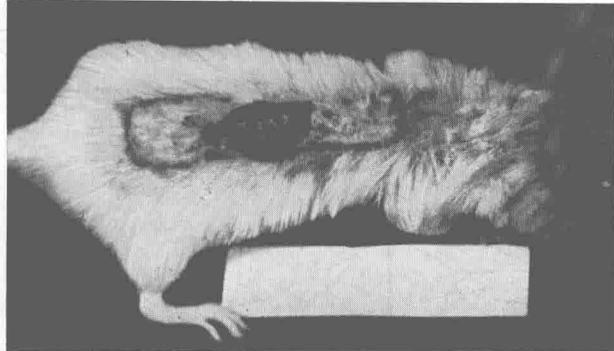


Abb. 8. Carcinombildung bei der Maus auf einem Hauttransplantat. Zustand 7 Monate nach der Transplantation. Tropfung der transplantierten Haut 3mal am 10., 12. und 14. Tage mit 2proz. DMBA-Lösung in Paraffinöl nach der totalen Herausnahme des rechteckigen Hautrückenfeldes und Wiedereinpflanzung nach einer Wendung um 180°. Ab 2 Wochen nach der letzten Cancerogen-Applikation laufende, einmal wöchentliche Crotonöltropfung. Transplantatgrenze durch intracutane Tuscheinjektion markiert.

3. Verschiedene KWSt unterscheiden sich in charakteristischer Weise durch starke quantitative Unterschiede ihrer Fähigkeit, TKA zu bilden (4, 7) (Abb. 9). Es besteht folgende Reihe mit abfallender Wirkung: 9, 10-Dimethyl-1, 2-Benzanthrazen (DMBA), 3, 4-Benzpyren (Bp), Methylcholanthren (MCh), 1, 2, 5, 6-Dibenzanthrazen (DBA), 1, 2-Benzanthrazen (BA). Die durch einmalige Tropfung am Epithel der Mäusehaut ausgelösten cytologischen Veränderungen (Nekrobiose, Riesenzellbildung und Polymorphismus, Mitochondrienvermehrung, Hyperregeneration, Mitosestei-

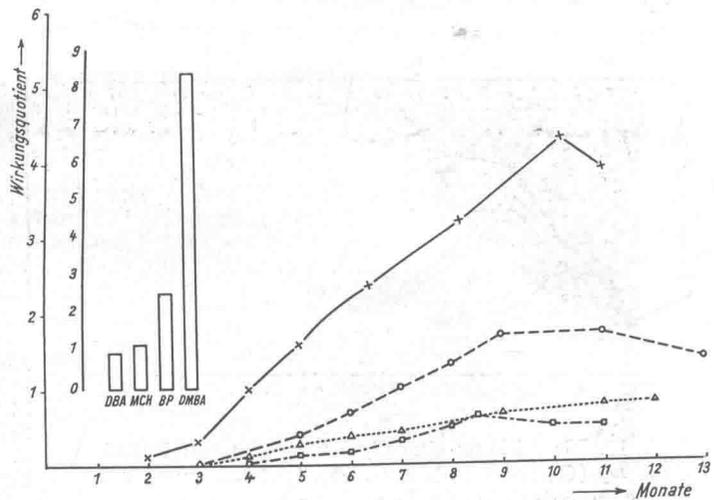


Abb. 9. Anzahl der TKA, die durch konstante Mengen verschiedener cancerogener KWSt hervorgerufen werden.

× = einmalige Tropfung mit 0,5proz. DMBA-Lösung und Crotonölnachbehandlung.

○ = einmalige Tropfung mit 0,5proz. Bp-Lösung und Crotonölnachbehandlung.

Δ = einmalige Tropfung mit 0,5proz. MCh-Lösung und Crotonölnachbehandlung.

□ = einmalige Tropfung mit 0,5proz. DBA-Lösung und Crotonölnachbehandlung.

Säulen links: Verhältnis der Wirkung der verschiedenen Cancerogene zueinander. Wirksamkeit des DBA = 1.

¹ Untersuchungen gemeinsam mit Dr. F. SCHARSACH und Dipl.-Biol. J. GIMMY.

gerung) (Abb. 10) zeigen bei den verschiedenen Cancerogenen die gleiche quantitative Abstufung wie hinsichtlich der Fähigkeit, TKA zu bilden (12, 9 c). Daß es sich bei dieser Schädigung um eine direkte Wirkung auf die Zellen handelt, ergibt sich aus der Tatsache, daß auch in der gefäß- und nervenlosen Gewebekultur, gemessen an der Wachstumshemmung und Nekrose, die gleiche quantitative Abstufung der Schädigungswirkung vorhanden ist (9 c, 13) (Abb. 11). Die Zahl der durch die verschiedenen cancerogenen KWSt erzeugten TKA läuft also der unmittelbaren zellulären Schädigungswirkung parallel, woraus ebenfalls auf eine direkte Wirkung der Cancerogene auf die Zelle beim Prozeß der TKA-Bildung geschlossen werden kann.

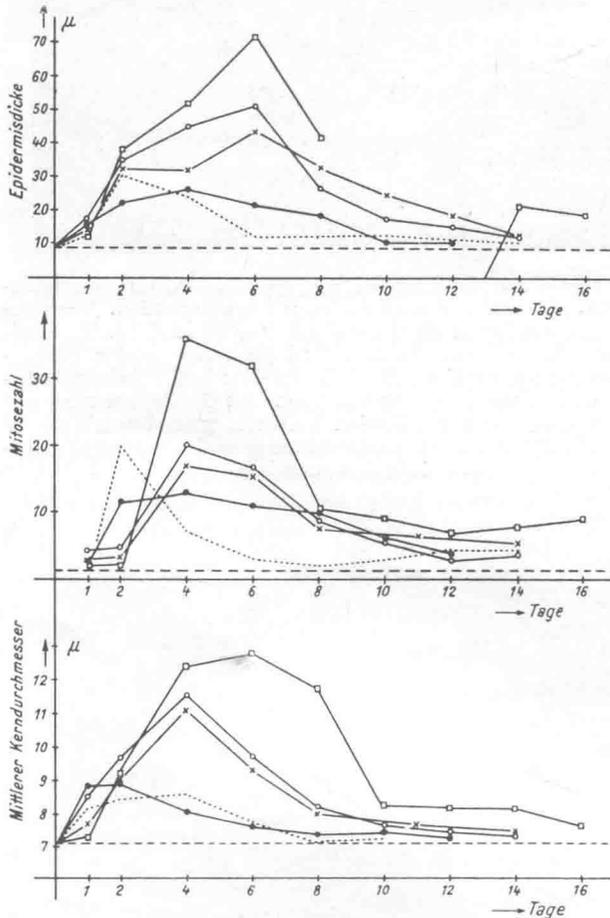


Abb. 10. Die Wirkung einmaliger Tropfung von DMBA (\square), Bp (\circ), MCh (+), DBA (\bullet), Crotonöl (.....) auf

1. die Epidermisdicke (oberes Diagramm),
2. Mitosezahl (mittleres Diagramm) und
3. das Kernvolumen (unteres Diagramm) der Mäusehaut in den ersten Tagen nach der Tropfung.

Ordinate: 1. Epidermisdicke in μ ; 2. Mitosezahl pro 1000 Zellen; 3. mittlerer Kerndurchmesser in μ .

Abszisse: Tage nach der Cancerogen-Applikation.
----- = normale Haut.

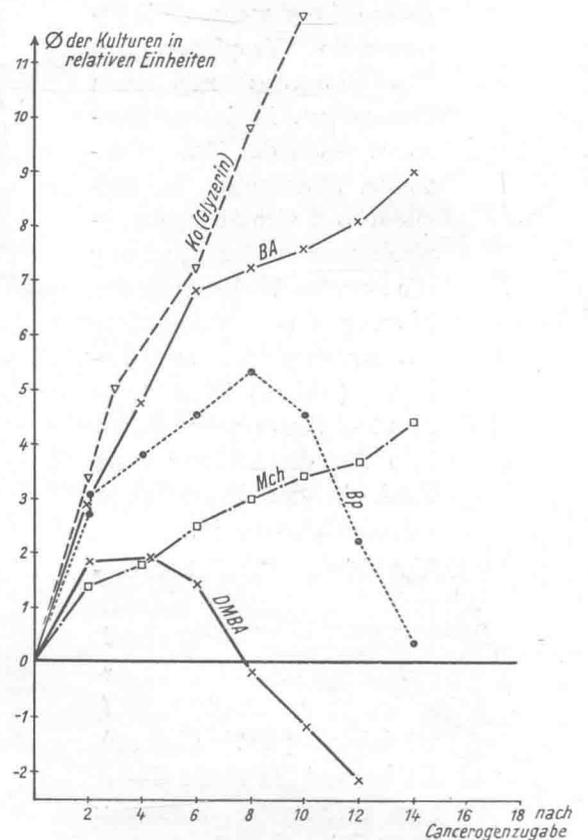


Abb. 11. Wachstumshemmung von Gewebekulturen der Mäusehaut einschließlich der Verkleinerung der Kulturen infolge degenerativen Zellerfalls durch verschiedene cancerogene KWSt. KWSt-Konzentration = 1 : 25 000 in Form von Glycerin-Serumlösung zugesetzt.

—x— = DMBA --□-- = MCh
 ...●...● = Bp x—x = BA
 -----△ = Glycerin-Serum ohne KWSt (Kontrolle).

Ordinate: Durchmesser der Kulturen in willkürlichen Einheiten.

Abszisse: Tage nach Zugabe des Cancerogens.
0-Wert auf der Abszisse: Größe der Kulturen am Tage der Cancerogenzugabe.

Beim Vorgang der Geschwulstbildung interessieren auch die Beziehungen zwischen angewandter Cancerogendosis und cancerogener Wirkung. Diese Fragestellung wurde vor einigen Jahren von DRUCKREY und KÜPFMÜLLER (14) an Hand der Buttergelbwirkung auf die Rattenleber untersucht, wobei allerdings die Cancerogenese als ein einheitlicher Vorgang

betrachtet wurde. Hierbei wurde die Latenzzeit als Maß der cancerogenen Wirkung gewählt. Diese Untersuchungen ergaben, daß für den Cancerisierungsvorgang durch Buttergelb die $c \cdot t$ -Beziehung Gültigkeit hat, d. h. die Krebsbildung dann erfolgt (Latenzzeit), wenn ein bestimmtes minimales Cancerogenquantum verabreicht wurde (ca. 1 g), unabhängig davon, in welcher Zeit die Darreichung erfolgte und wie groß die Partialdosen waren. Es resultierte daraus, daß sich die Wirkungen der Partialdosen bei der Cancerogenese addieren, wie dieses bereits von TEUTSCHLAENDER (40) an Hand von Teerpinselungen der Mäusehaut wahrscheinlich gemacht wurde.

Ähnliche Resultate erzielten auch wir für den Gesamtvorgang der Cancerogenese durch KWSt an der Mäusehaut, wobei wir allerdings nicht die Latenzzeit, sondern die Zahl der Geschwulstbildungen als Maß der cancerogenen Wirkung zugrunde legten. In unserem vergleichenden Versuch (Abb. 12 u. 13) wurde DMBA ohne Crotonölnachbehandlung in Partialdosen von 2 γ bei konstanter Konzentration der Lösung (0,004%) in drei verschiedenen zeitlichen Verteilungen, und zwar jeden 2., 7. und 14. Tag, verabreicht. Die durchschnittliche Anzahl der gutartigen Geschwülste pro Tier, sowie der Prozentsatz an Carcinomtieren war bei gleicher Cancerogenmenge in sämtlichen Versuchen annähernd gleich groß. Vor allem der steile Anstieg der Geschwulstbildung erfolgte sowohl bei den gutartigen Geschwülsten als auch bei den Carcinomen nach der Überschreitung des unge-

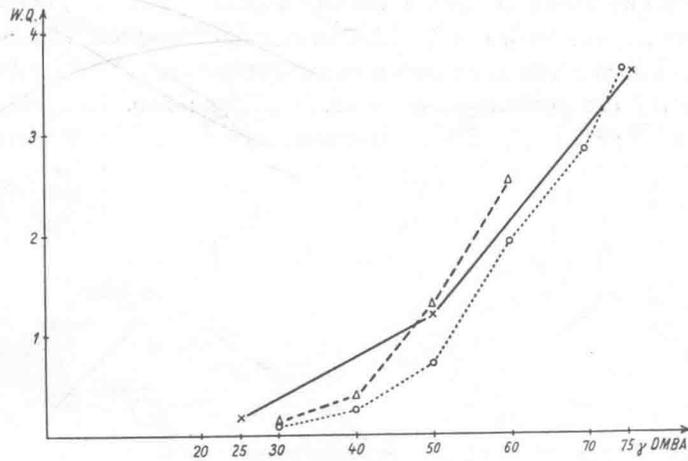


Abb. 12. Bildung gutartiger Geschwülste bei verschiedener zeitlicher Verteilung gleicher Cancerogenmengen ohne Crotonölnachbehandlung.

Cancerogen: DMBA. Partialdosen: 2 γ .
Cancerogen-Konzentration: 0,004% in Aceton.

— x = Tropfung jeden 2. Tag 2 γ .
- - - o = Tropfung jeden 7. Tag 2 γ .
· · · · Δ = Tropfung jeden 14. Tag 2 γ .

Ordinate: WQ (durchschnittliche Tumorzahl pro Tier).
Abszisse: DMBA-Menge in γ .

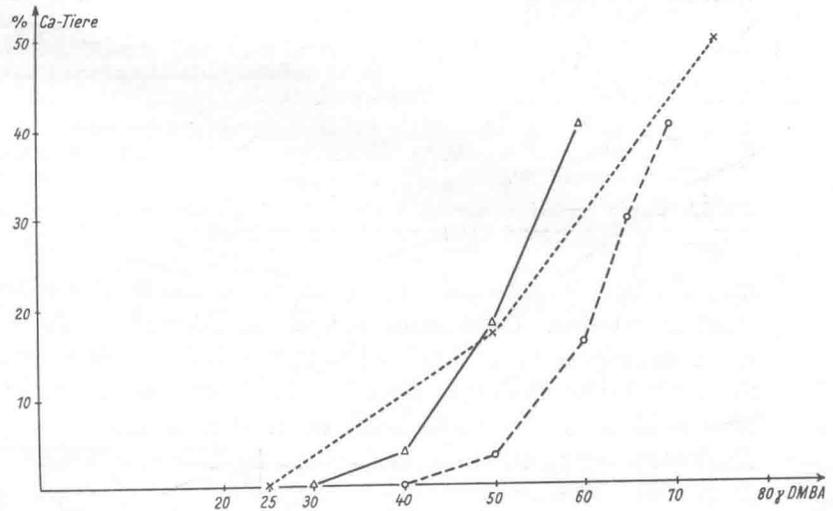


Abb. 13. Carcinombildung bei verschiedener zeitlicher Verteilung gleicher Cancerogenmengen ohne Crotonölnachbehandlung.

Ordinate: Prozentsatz der Carcinom-Tiere.

Cancerogen-Applikation wie für Abb. 12.

· · · · x = Tropfung jeden 2. Tag 2 γ .
- - - o = Tropfung jeden 7. Tag 2 γ .
— Δ = Tropfung jeden 14. Tag 2 γ .

fähr gleichen Schwellenwertes (ca. 40–50 γ), gleichgültig in welcher Zeit (7, 25 oder 50 Wochen) diese Menge verabreicht wurde.

Bei der Anwendung der Latenzzeit als Maß der cancerogenen Wirkung gelangten wir auf Grund unserer Untersuchungen zu Resultaten, die von denen DRUCKREYS etwas abweichen. Nach den Ergebnissen DRUCKREYS wäre für unsere Versuche [es wurde für diese Fragestellung noch eine Versuchsserie hinzugefügt, bei welcher täglich 2 γ DMBA verabreicht wurden], ein Verhältnis der Latenzzeiten von $\sim 1:2:7:14$ zu erwarten gewesen. Die von uns für eine Carcinomquote von 40% ermittelte mittlere Latenzzeit betrug jedoch für die genannten 4 Serien in Tagen: 140, 170, 247, 377 und verhielt sich damit wie 1:1,2:1,7:2,7. Die Latenzzeit erfuhr also in unserem Versuch mit cancerogenen

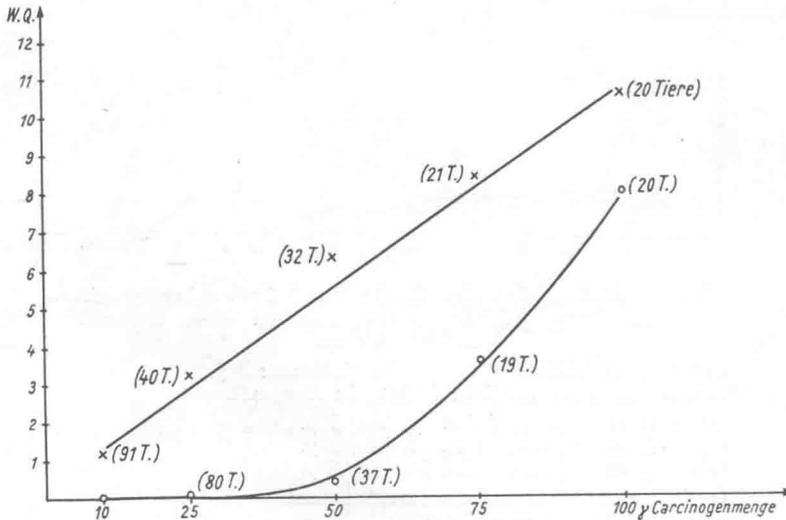


Abb. 14. Beziehung zwischen Cancerogenmenge (10–100 γ DMBA pro Maus) und Wirkung.

— x = Beziehung zwischen Cancerogenmenge und Anzahl der TKA. Applikation von 10, 25, 50, 75 und 100 γ DMBA und anschließende Crotonöltropfung einmal wöchentlich.

— o = Beziehung zwischen Cancerogenmenge und sichtbarer Realisierungswirkung. 10–100 γ DMBA pro Maus ohne Crotonölnachbehandlung.

DMBA wurde in beiden Serien jeden 2. Tag in Partialdosen zu 2 γ appliziert (0,004proz. Lösung in Aceton).

an sich, bzw. bestimmte, im Gewebe ablaufende Prozesse im Sinne einer Förderung beeinflußt zu werden. Dabei kann sowohl an Vorgänge gedacht werden, die mit der Wirkung des Cancerogens ursächlich nichts zu tun haben, wie z. B. die physiologische regenerative Zellvermehrung in der Epidermis beim Ersatz der verhornten abgestoßenen Zellagen oder aber auch an Prozesse, die zwar durch das Cancerogen angeregt werden, aber nach ihrer Auslösung autonom weiterlaufen (4). In Übereinstimmung mit den Buttergelbversuchen DRUCKREYS ergaben auch unsere Experimente mit cancerogenen KWSt, daß eine starke zeitliche Verzettelung des Cancerogens keine Erholung des Gewebes von der Cancerogenschädigung zur Folge hat, mithin die Einzelwirkungen sich verlustlos addieren und irreversibler Natur sind.

Die eben geschilderten Untersuchungen sind deshalb nicht völlig ausreichend für die Klarlegung der Beziehungen zwischen Cancerogendosis und geschwulsterzeugender Wirkung, weil bei ihnen die Cancerogenese als ein einheitlicher Vorgang betrachtet wurde

KWSt an der Mäusehaut mit der Steigerung der zeitlichen Verteilung eine starke relative Verkürzung. Gemessen an der Latenzzeit war also in unseren Versuchen eine stärkere zeitliche Verteilung einer gegebenen Cancerogenmenge relativ wirksamer als die Applikation der gleichen Cancerogenmenge in dichter Aufeinanderfolge, auch wenn, wie in unserem Fall, die Größe der Partialdosen und damit die Konzentration der Cancerogenlösung konstant gehalten wurde. Es scheint also die Geschwindigkeit der Geschwulstbildung (Realisierung) nicht allein durch die Dosis, sondern auch durch einen Zeitfaktor

und unberücksichtigt blieb, daß sich die Geschwulstbildung als komplexer Vorgang aus mindestens zwei, wenigstens teilweise auch qualitativ verschiedenen Prozessen zusammensetzt, die nicht ohne weiteres mit dem gleichen Maßstab und gleichzeitig gemessen werden können. Deshalb wurden von uns Experimente durchgeführt, in denen versucht wurde, die Dosis - Wirkungsbeziehung für die beiden qualitativ unterschiedlichen Phasen der Cancerogenese, nämlich die TKA-Bildung und die Tumorrealisierung, gesondert zu erfassen (9).

In bezug auf den Initialvorgang (TKA-Bildung) der Cancerogenese ergaben diese Untersuchungen folgende Resultate:

1. Die Zahl der TKA ist der applizierten Dosis direkt proportional, so daß bei graphischer Darstellung eine Gerade resultiert (Abb. 14). Die Zahl der durch eine gegebene Dosis erzeugten TKA ist also begrenzt. Unabhängig von der applizierten Gesamtdosis erzeugt eine bestimmte Cancerogenmenge, z. B. 10 γ , stets annähernd die gleiche Zahl an TKA $\left(\frac{\text{Cancerogenmenge}}{\text{Zahl d. TKA}} = \text{konstant} \right)$.

In unseren Versuchen erzeugten 10 γ DMBA ungefähr 1-2 durch Crotonöl realisierbare TKA in der Haut.

2. Die Wirkungen selbst kleinster Einzeldosen addieren sich hinsichtlich der Anzahl der TKA verlustlos.
3. Bei sehr niedrigen Konzentrationen der Lösung und nicht zu dichter Aufeinanderfolge der Applikationen ist die TKA-Zahl ziemlich unabhängig von

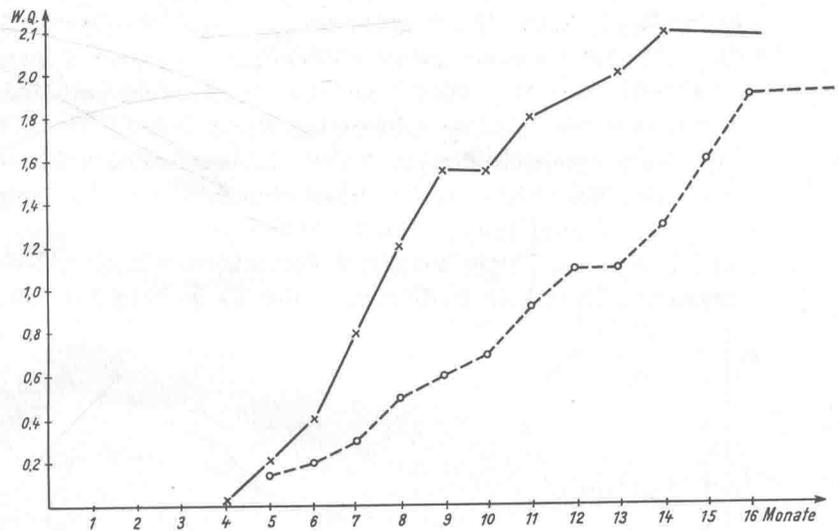


Abb. 15. Unabhängigkeit der TKA-Bildung von der zeitlichen Verteilung bei niederen Cancerogen-Konzentrationen.
 - - - - o = 10 γ DMBA in 2 Partialdosen innerhalb von 24 Std. und anschließende Crotonölbehandlung.
 - - - - x = 10 γ DMBA in 100 Tagen (50malige Tropfung mit 0,0004proz. Lösung jeden 2. Tag) und anschließende Crotonölnachbehandlung.

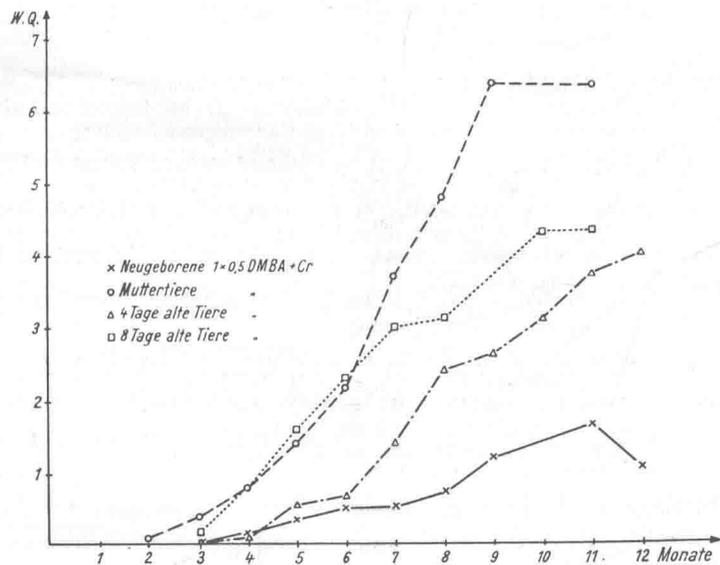


Abb. 16. Abhängigkeit der TKA-Bildung vom Alter der Tiere. Einmalige Tropfung mit 0,5% DMBA-Lösung (ca. 250 γ) pro Tier und laufende Crotonölnachbehandlung einmal wöchentlich.
 - - - - x = neugeborene Mäuse.
 - - - - Δ = 4 Tage alte Mäuse.
 □ = 8 Tage alte Mäuse.
 - - - - o = erwachsene Mäuse.

der zeitlichen Verteilung und der Größe der Partialdosen und nur der Cancerogengesamtdosis proportional (Abb. 15).

4. Ein Schwellenwert ist bei der Bildung einer TKA nicht nachweisbar oder liegt zumindest sehr tief (unter 1γ) (Abb. 14).
5. Die Zahl der TKA ist weitgehend unabhängig von der Größe des Hautfeldes. 100γ DMBA erzeugen auf dem Rückenfeld einer Maus ungefähr die gleiche Anzahl TKA wie $10 \times 10 \gamma$ DMBA auf dem Rückenfeld von 10 Mäusen. Dieses Ergebnis spricht gegen das Vorliegen besonders disponierter Zellen (Mitosen) für den Angriff cancerogener Reize in der Haut, denn in diesem Fall müßte die Zahl der TKA mit der Größe des Hautfeldes, auf welches eine gegebene Cancerogenmenge verteilt wird, proportional zunehmen.

In weiteren Experimenten untersuchten wir die Abhängigkeit der TKA-Bildung von anderen allgemeinen Bedingungen der Tiere, beispielsweise vom Alter (Abb. 16). Es ergab

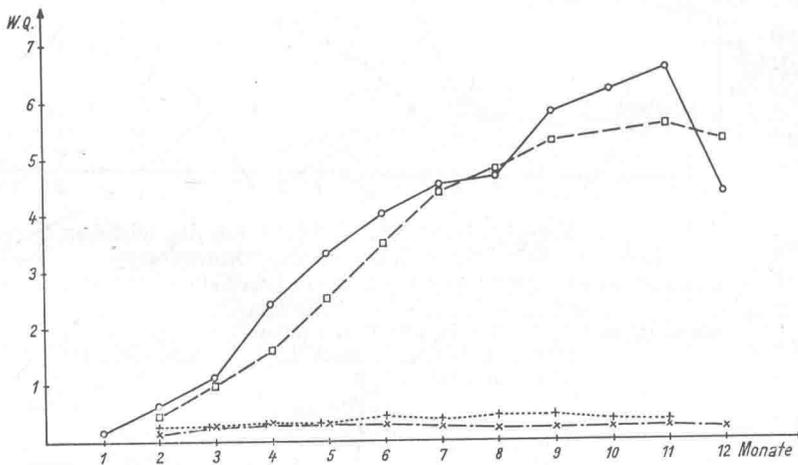


Abb. 17. TKA-Bildung (Serien mit Crotonölnachbehandlung) und Tumorrealisierung (Serien ohne Crotonölnachbehandlung) bei jungen und alten erwachsenen Mäusen bei gleicher Cancerogenbehandlung.

- = 10mal 0,02% DMBA (100 γ Gesamtdosis in 10 Tagen) und Crotonölnachbehandlung bei 1 Jahr alten Tieren.
- = 10mal 0,02% DMBA in 10 Tagen und Crotonölnachbehandlung bei 3 Monate alten Tieren.
- ×— = 10mal 0,02% DMBA ohne Crotonölnachbehandlung bei 1 Jahr alten Tieren.
- +--- = 10mal 0,02% DMBA ohne Crotonölnachbehandlung bei 3 Monate alten Tieren.

Carcinom-Prozentsatz und Latenzzeit in obigen Versuchsserien:

- alte Tiere und Crotonöl = 25% Ca/250 Tage,
- junge Tiere und Crotonöl = 50% Ca/260 Tage,
- alte Tiere ohne Crotonöl = 4% Ca/290 Tage,
- junge Tiere ohne Crotonöl = 7% Ca/290 Tage.

entwickeln als junge erwachsene Mäuse, da ja Krebs im Alter gehäuft vorkommt und man annehmen könnte, daß eine höhere Empfänglichkeit der gealterten Haut den Cancerogenen gegenüber dafür verantwortlich ist. Dies war jedoch nicht der Fall. Unsere Versuche (Abb. 17) ergaben, daß in der Haut alter Tiere nicht mehr TKA durch gleiche Cancerogenbehandlung ausgelöst werden als in der Haut junger erwachsener Tiere. Daraus ergibt sich die Erwägung, daß das gehäufte Krebsvorkommen im hohen Alter weniger auf eine besondere Ansprechbarkeit der gealterten Zelle auf die cancerogenen Reize im Sinne einer gesteigerten Bildung von TKA zu beziehen ist, sondern viel eher darauf beruht, daß bei höherem Alter die zur Realisierung latenter TKA erforderlichen

sich, daß bei neugeborenen Mäusen sehr viel weniger TKA ausgelöst werden als bei erwachsenen. Dieses Ergebnis ist möglicherweise aber darauf zurückzuführen, daß die Haut neugeborener Tiere, die auch histologisch kaum auf eine einmalige Tropfung mit dem Cancerogen reagiert, im Gegensatz zur Haut erwachsener Tiere infolge der noch fehlenden Talgdrüsen und der dadurch bedingten Lipoidarmut geringere Mengen cancerogener Substanz, speziell in der Epidermis aufnimmt als diejenige erwachsener Mäuse. Diesen Eindruck vermittelt auch die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung. Noch wichtiger erschien uns die Untersuchung der Frage, ob alte Tiere bei gleicher Cancerogenbehandlung mehr TKA

Bedingungen und vor allem die dafür benötigte Zeit (Latenzzeit) in einem viel höheren Maße gegeben sind.

Verschiedene genetisch unterschiedliche Mäusestämme zeigten große Unterschiede in der TKA-Bildung bei gleicher Behandlung (10 a), wobei ein Stamm mit sehr hoher Spontan-tumorquote eine viel geringere Tumorfrequenz aufwies als ein unbelasteter Stamm (Abb. 18). Dieser Befund spricht gegen eine allgemeine Tumordisposition als wesentlicher Faktor bei der Bildung einer Hautgeschwulst durch cancerogene KWSt, denn in diesem Falle wäre beim belasteten Mäusestamm die höchste Tumorfrequenz zu erwarten gewesen. Der Versuch unterstreicht die Bedeutung einer erblich bedingten Lokaldisposition für die Geschwulstbildung.

Als wesentliche Befunde über die Natur der TKA ergeben sich also aus diesen Versuchen folgende Resultate: Ihre rasche Bildung, Irreversibilität, ihre wahrscheinliche Entstehung durch

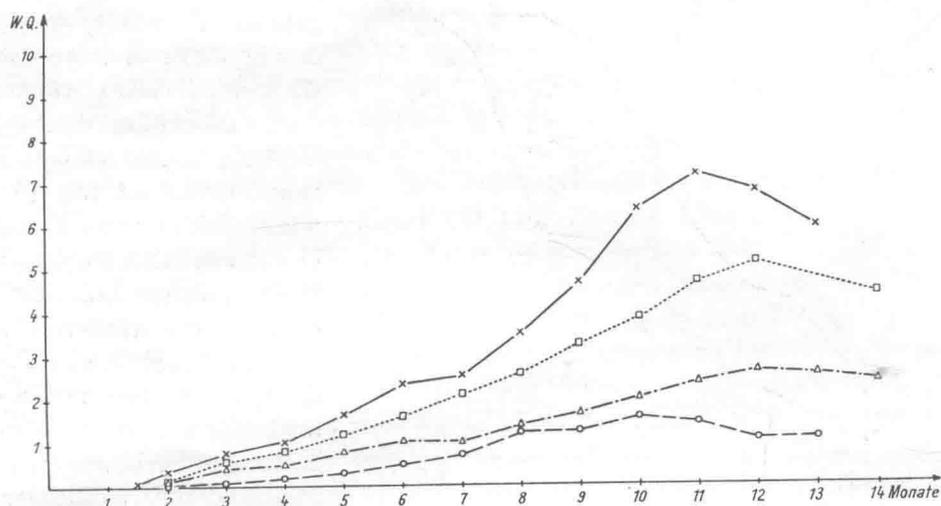


Abb. 18. TKA-Bildung bei verschiedenen Inzuchtstämmen bei gleicher Cancerogen- und Crotonölbehandlung. Cancerogenbehandlung: einmal 100 γ (0,2proz. Lösung) und laufende, einmal wöchentliche Crotonöltropfung.

- × ————— = schwarzer Inzuchtstamm, spontantumorfrei.
- - - - - - = Diluted-Brown-Stamm, belastet 80%, spontane Mamma-Carcinome bei Weibchen.
- △ - - - - - = Agnes-Bloom-Albino-Inzuchtstamm, weiß.
- - - - - - = Stamm 46.

die direkte Wirkung des Cancerogens auf die Epithelzelle, die direkte Proportionalität der TKA-Zahl zur Menge des Cancerogens sprechen in erster Linie für einen Mutationsvorgang an einzelnen Epithelzellen der Haut.

Wir kommen nun zum zweiten Teilvorgang der Cancerogenese, nämlich zur Geschwulstrealisierung. Die qualitative Abgrenzung der Tumorrealisierung von der TKA-Bildung ergibt sich aus der Tatsache, daß sie durch das für sich allein nicht cancerogene Crotonöl bewerkstelligt werden kann. Histologisch bewirkt das Crotonöl in der Haut eine akute Schädigung, an die sich eine starke Superregeneration mit besonders auffälliger Gefäßreaktion anschließt. Außerdem führt das Crotonöl noch zu kleinen oder größeren oberflächlichen Nekrosen, die rasch wieder abheilen, wobei das verlorengegangene Epithel der Epidermis vom Rande her oder aus der Tiefe erhaltengebliebener Haarbälge wieder regeneriert wird. Dieser Prozeß, in welchem herdweise frische, von einigen wenigen Mutter-

zellen abstammende Basalzellen neu gebildet werden, ist für den Vorgang der Tumorrealisierung eventuell von besonderer Wichtigkeit. Er würde nämlich bedingen, daß durch das Cancerogen abgewandelte einzelne Zellen (TKA-Zellen) in sehr schneller Generationsfolge eine rasche flächenhafte Ausbreitung und Vermehrung in der horizontalen Richtung erfahren und damit zu dauernd proliferationsfähigen, gleichzeitig geschwulstmäßig abgewandelten neuen Basalzellen werden. Erst diese flächige Vermehrung der durch das Cancerogen mutativ abgeänderten Zellen stellt evtl. die Voraussetzung für eine Warzenbildung dar, die ja letzten Endes darin besteht, daß speziell die Basalzellen eines begrenzten, aber in jedem Fall vielzelligen Hautbezirkes eine vermehrte Wachstums- und Teilungsgeschwindigkeit besitzen, die sowohl in der Verbreiterung der Epidermis nach oben, vor allem in Form starker Hornauflagerungen, als auch im vermehrten Tiefenwachstum, wenn auch zunächst in Form gut abgegrenzter Epithelzapfen, in Erscheinung tritt. Alle

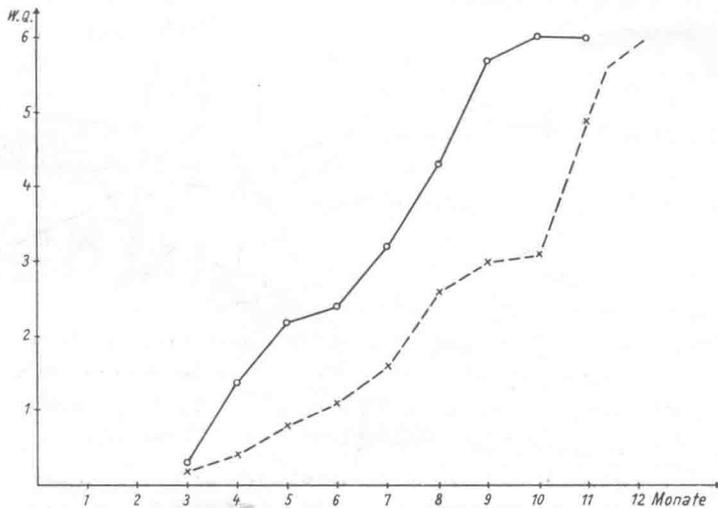


Abb. 19. Abhängigkeit der Crotonolrealisierung (Latenzzeit) von der Dosis und zeitlichen Verteilung des Crotonöls.

- ——— = einmal 0,2% DMBA (100 γ) und Crotonölnachbehandlung zweimal wöchentlich (5proz. Lösung).
 × - - - - = einmal 0,2% DMBA (100 γ) und Crotonölnachbehandlung einmal wöchentlich (5proz. Lösung).

lichen Nekrosen und die starke Gefäßbindegewebsreaktion verantwortlich zu machen. Sowohl dem Crotonöl als auch den Cancerogenen kommt außerdem die gemeinsame Eigenschaft zu, daß ihnen gegenüber die Mäusehaut auch bei laufender Tropfung nur eine geringe, also partielle Gewöhnung aufweist, so daß die gesamten oben angeführten Reaktionen in der Haut während der ganzen Behandlungszeit immer wieder ausgelöst und aufrechterhalten werden. Auch diese Tatsache scheint für den Realisierungsvorgang wesentlich zu sein.

Bei der Crotonolrealisierung entstehen bei laufender Crotonöltropfung nach einer gewissen Latenzzeit zuerst gutartige Geschwülste, von denen ein gewisser Prozentsatz sich nach einer Behandlungsdauer von vielen Monaten (meist über ein Jahr) in echte Carcinome umwandelt. Auch beim Realisierungsvorgang, und zwar auch bei Anwendung von Crotonöl, findet eine Summation der Einzelwirkungen statt, da doppelt so häufige Crotonöltropfung fast in der halben Zeit zur Geschwulstbildung führt [BERENBLUM und eigene Untersuchungen (5, 6)] (Abb. 19). Die Latenzzeit ist also eine Funktion der Tumorrealisierung und nicht der TKA-Bildung. Den cancerogenen KWSt, die bereits allein zur Geschwulstbildung

diese, dem Crotonöl eigene Wirkungen zeigen auch die cancerogenen KWSt schon bei einmaliger Applikation. Letztere lösen jedoch, wie bereits erwähnt, außerdem noch bestimmte cytologische Veränderungen an den Epithelzellen der Haut aus (5, 12, 15), wie die Bildung von Riesenkernen, eine starke Mitochondrienvermehrung u. a., die beim Crotonöl in diesem quantitativen Ausmaß fehlen (12). Es liegt daher nahe, die cytologischen Veränderungen an den Epithelzellen mit der TKA-Bildung in Verbindung zu bringen und für den Realisierungsvorgang die für das Crotonöl und die Cancerogene gemeinsamen Wirkungen, nämlich die Superregeneration, wiederholte „horizontale“ Epithelneubildung nach oberfläch-

führen, kommen also beide Eigenschaften, die zur Geschwulstbildung erforderlich sind, gleichzeitig zu (5).

Eine quantitative Erfassung der Realisierungswirkung einer bestimmten Cancerogendosis und Applikationsweise ist durch den Vergleich der Tumorbildung zweier Serien gleicher Cancerogenbehandlung mit und ohne Crotonölnachbehandlung möglich (Abb. 14). Aus der Differenz der Tumorzahl zwischen beiden Serien ergibt sich die Realisierungswirkung der reinen Cancerogenbehandlung. Wenn wir mit verschiedenen Dosen diesen Versuch durchführen, so resultiert, daß im Gegensatz zur TKA-Bildung die Realisierung makroskopisch sichtbarer Tumoren einen deutlichen Schwellenwert besitzt. Zur Realisierung einer Geschwulst ist also die Summation einer bestimmten Anzahl von Einzelwirkungen des realisierenden Reizes erforderlich. Bei dem Realisierungsprozeß äußert sich also die Summation außer in der Vermehrung der veränderten Zellen vor allem in einer schrittweisen Änderung des qualitativen Zustandes der vorhandenen TKA in der Richtung gesteigerten geschwulstmäßigen Verhaltens der Zellen, während bei der TKA-Bildung gleiche Geschehnisse in ihrer Anzahl vermehrt werden, d. h. der gleiche Initialvorgang in neuen, bis dahin unveränderten Zellen der Haut ausgelöst wird. Auch bei der Tumorrealisierung addieren sich bereits kleinste Einzeldosen in ihrer Wirkung, und zwar — wie bereits erwähnt — auch bei der Crotonölrealisierung. Diese Tatsache spricht dafür, daß die Summationsfähigkeit der Einzelwirkungen cancerogener Reize sowohl im Hinblick auf den Vorgang der Geschwulstrealisierung als auch der TKA-Bildung weniger auf die pharmakologischen Besonderheiten der betreffenden Reize bezogen werden kann, sondern vielmehr auf die biologische Eigenart des Geschwulstbildungsvorganges selber zurückzuführen ist. Die zur Cancerogenese führenden Reize, und zwar auch die reinen, zum Teil sehr unspezifischen Realisierungsreize, wie z. B. Crotonöl oder selbst regenerationsauslösende Verletzungen oder Brandwunden, sind im Hinblick auf das Geschwulstgeschehen deshalb in ihrer Wirkung sich verlustlos addierende sogenannte Summationsreize, weil der Geschwulstbildung eine bestimmte Vielzahl irreversibler, d. h. spontan nicht mehr rückbildungsfähiger Veränderungen der Zellen zugrunde liegt. Diese bestehen zum Teil wahrscheinlich darin (s. spätere Ausführungen), daß mutative Änderungen bestimmter Zellbestandteile ausgelöst werden (TKA-Bildung), teils darin, daß diese mutierten Elemente in den Zellen durch Zellteilungen angereichert und vermehrt werden (Realisierung).

Zur Geschwulstrealisierung durch einen cancerogenen KWSt allein sei noch folgendes ergänzend vermerkt. Schon aus Versuchen, die in den Abb. 12 und 13 dargestellt wurden, geht hervor, daß eine stärkere zeitliche Verteilung einer gegebenen Cancerogenmenge relativ schneller zur Geschwulstbildung führt als die Applikation in dichter Aufeinanderfolge. Da die Latenzzeit in erster Linie die Stärke der Realisierungswirkung widerspiegelt, muß geschlossen werden, daß die Realisierungswirkung mit steigender zeitlicher Verteilung und Zahl der Partialdosen bei konstanter Cancerogendosis zunimmt. Bei extrem dichter Aufeinanderfolge und konstanter Dosis nimmt auch die Zahl der Geschwülste, und zwar sowohl der gutartigen als auch der malignen, ab. So ist beispielsweise die Zahl der gut- und bösartigen Tumoren bei der Applikation von 100 γ DMBA in 10 Partialdosen zu je 10 γ in 10 Tagen (ohne Crotonölnachbehandlung) beträchtlich niedriger als bei der Applikation der gleichen Dosis, gleichfalls in 10 Partialdosen innerhalb von 100 Tagen (Tab. 1). Die TKA-Bildung wird durch diese Änderung der zeitlichen Verteilung viel weniger verändert, da im Kombinationsversuch mit Crotonöl zwischen beiden Applikationsweisen eine geringere zahlenmäßige Differenz auftritt (Tab. 1). Bei der Applikation von 100 γ DMBA in Form von 50 Partialdosen zu je 2 γ ist bei der Darreichung innerhalb von 10 Tagen im Vergleich zu 100 Tagen die gleiche Abnahme der Cancerogenwirkung bei der dicht aufeinanderfolgenden Tropfung nachweisbar (Tab. 1), und zwar in diesem extremen Fall auch