

Schließlich wurde noch durch die papierchromatographische Untersuchung des Filtrats der „zweiten Ba-Fällung“ bei p_{H} 8 sichergestellt, daß in den Acetabularien das unter unseren Bedingungen mit Ba-Ionen nicht fällbare Trimetaphosphat mit ringförmigem Anion nicht enthalten ist.

Obwohl genaue quantitative Untersuchungen über die mengenmäßige Verteilung des Phosphors in den Acetabularien noch ausstehen, läßt sich sagen, daß in den von uns untersuchten Acetabularien mehr als die Hälfte des Gesamtphosphors als hochmolekulares Polyphosphat vorlag.

Die Tatsache, daß sich in Acetabularien nur anorganisches hochmolekulares Polyphosphat und Mono-

phosphat, nicht aber die dazwischenliegenden Oligophosphate (Di-, Tri-, Tetraphosphat usw.) nachweisen lassen, legt den Schluß nahe, daß der Auf- und Abbau der Polyphosphatgrana des Cytoplasmas in Form von Phosphorylierungen bzw. Dephosphorylierungen an den Kettenenden der Polyphosphatanionen verläuft.

Bereits aus den angeführten Versuchen von St i c h hatte sich ergeben, daß die Polyphosphate von *Acetabularia* eine wesentliche Rolle im Stoffwechsel der Zelle spielen. Danach sind sie aktive Glieder des P-Stoffwechsels, möglicherweise Energiedonatoren sowie Indikatoren der Energieproduktion der Zelle. Bezüglich weiteren Einzelheiten sei auf l. c.^{1b},¹⁰,¹¹ verwiesen.

Auslösung spezifischer Wachstumsvorgänge bei Zahnkarpfen durch ein androgenes Steroidhormon

VON HEINRICH WRBA UND HANS QUERNER

Aus dem Institut für experimentelle Krebsforschung der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. H. L e t t r é)

(Z. Naturforsch. **11 b**, 270—273 [1956]; eingegangen am 30. Januar 1956)

Die beschriebenen Wucherungen an verschiedenen Organen und im lockeren Bindegewebe von *Lebistes reticulatus*, welche nach Anwendung von DIA auftreten, werden als Folge eines Wachstumsreizes dieses Hormons auf das embryonale, gefäßbildende Mesenchym gedeutet. Der unabhängig von der Lokalisation gleichartige Aufbau, die enge Beziehung zum Gefäßsystem, die häufig endothelial ausgekleideten zentralen Lumina sowie die Bindung der Veränderungen an neugeborene Individuen lassen die auftretenden Veränderungen als überschießende Gefäßbildungen erscheinen.

Systematische Untersuchungen über die Wirkung von Steroidhormonen auf neugeborene Zahnkarpfinge (Querner 1956) ergeben für das Dehydro-isoandrosteron-acetat (DIA) den überraschenden Befund, daß Zellwucherungen schon nach kurzer Behandlungszeit auftreten (Querner und Wrba 1953 a, b). Die Bedeutung der Steroidhormone für die Frage der Wachstumsauslösung und -begrenzung sowie die Seltenheit von Neubildungen nach Anwendung von Hormonen der androgenen Reihe im Experiment läßt eine nähere Bearbeitung dieser Befunde notwendig erscheinen.

Material und Methode

Die Versuchsanordnung entsprach der früher angegebenen. 1.2-Propylenglykol diente als Zwischen-Lösungsmittel für das sehr schwer wasserlösliche Steroid. 1 bis

8 Tage alte Exemplare von *Lebistes reticulatus* (lebendgebärend) wurden in 500 ml Wasser, dem 0,1—0,5 mg DIA zugesetzt waren, je nach Verträglichkeit 4—28 Tage gehalten. In einem Versuchsansatz befanden sich stets 10 Tiere. Die längste Beobachtungsdauer nach Absetzen der Hormonbehandlung betrug 100 Tage. Die Schnittserien der Versuchstiere wurden außer mit denen der Kontrolltiere auch mit solchen aus methodisch gleichartigen Versuchen mit folgenden anderen Steroidhormonen verglichen: Methyltestosteron, Testosteronpropionat, Östradiol, Progesteron, Cortisonacetat und Desoxycorticosteron-acetat.

In regelmäßigen Abständen wurden Versuchstiere fixiert, in Paraffin eingebettet und zu Schnittserien verarbeitet. Die Färbung wurde alternierend in Hämatoxylin-Eosin, nach van Gieson, und nach der Methode von McMannus-Hotchkiss vorgenommen. Einige Serien aus diesen Versuchen wurden außerdem nach der Silberimprägnation nach Foot, kombiniert mit van Gieson-Färbung, untersucht.

^{1b} H. St i c h, Chromosoma 7, 693 [1956].

¹¹ J. H ä m m e r l i n g, Congr. Intern. de Botanique, Paris; Rapport, im Druck.

Versuchsergebnisse

Bei insgesamt 15 getrennt angesetzten Versuchsreihen, die sich über einen Zeitraum von drei Jahren verteilen und mit verschiedenen Lieferungen der Substanz ausgeführt wurden, ergaben sich hinsichtlich Verträglichkeit, Überlebenszeit und Dosisabhängigkeit gleiche Befunde. Bei einer Dosierung von 0,25 mg und 0,5 mg pro Tag und Ansatz waren Wucherungen festzustellen, die bei Kontrolltieren, die teilweise nur mit dem Zwischenlösungsmittel behandelt wurden, sowie bei allen Versuchstieren, die unter gleichen Bedingungen mit anderen Hormonen behandelt worden waren, nicht auftraten.

Auch in den neu angesetzten Versuchsreihen fanden sich bei hoher Dosis (0,5 mg) Wucherungen im lockeren Bindegewebe des Kopfes (Abb. 1*, s. auch Querner und Wrba 1953 a) und in der Leber (Abb. 2). Eine mittlere Dosierung von 0,25 mg führt häufig zum Befall des Truncus arteriosus (Abb. 3, s. a. Querner und Wrba 1953 b) der Leber, des Kopfbereiches und des Augenbeckers (Abb. 4). Niedrigere Dosierung hat nur Einfluß auf die Niere und die ableitenden Harnwege (Abb. 5).

In Versuchsreihen mit einer Dosierung von 0,25 bis 0,5 mg sind nach 4-tägiger Behandlung von Tieren, die bei Versuchsbeginn einen Tag alt waren, 50% eingegangen; die Überlebenden zeigen bereits zu diesem Zeitpunkt die Veränderungen im Kopfbereich und in der Leber. Wird die Behandlung beendet und werden die Tiere bis zu 100 Tagen beobachtet, finden sich nach diesem Zeitraum nur noch isolierte Knoten in der Leber, während alle anderen spezifischen Veränderungen schon nach vier Wochen zurückgebildet sind.

Wird die Hormonapplikation im Alter von acht Tagen begonnen, so treten gleichartige Veränderungen ebenfalls nach 4-tägiger Behandlung auf. Die Sterblichkeit der älteren Tiere ist aber im Gegensatz zu 1-tägigen gering.

Die Abb. 1 zeigt die typische Verteilung der Knoten im Bereich des Kopfes nach Behandlung mit 0,5 mg DIA. Regelmäßig sind das lockere Zwischengewebe in der Umgebung der Gefäße, Munddach und Mundboden befallen. Es handelt sich dabei um selten mehr als 100 μ große, kugelige Anhäufungen von Zellen einer Art. Auch innerhalb parenchymatöser Organe, in Leber und Niere, steht das veränderte Gewebe immer im Zusammenhang mit Gefäßmesenchym. Gelegentlich im Epithel auftretende Knoten

lassen bei Untersuchung der Serie ihre Herkunft vom Bindegewebe erkennen.

Es ergibt sich für die Lokalisation der Gewebeknoten eine Bevorzugung des Zwischengewebes im Kopf und in der Leber. Weiterhin findet sich in Abhängigkeit von der Dosis (Querner und Wrba 1953 b) Befall des Truncus arteriosus, der Gefäßschicht des Augenbeckers, der Niere und der ableitenden Harnwege. Sehr selten sind Veränderungen in der quergestreiften Muskulatur und in den gefäßführenden Hüllen des Zentralnervensystems.

Zur histologischen Beschreibung: Die Knoten finden sich, immer deutlich abgegrenzt, innerhalb völlig unveränderter Organe. Eine Infiltration ist nie nachweisbar, gelegentlich zeigen sich Verdrängungserscheinungen, z. B. innerhalb des Augenbeckers und im Lumen des Harnleiters (Abb. 4 und 5). Regelmäßig sind die kugeligen Zellanhäufungen durch zwiebelschalenförmig angeordnete Spindelzellen an ihrer Peripherie abgegrenzt. Häufig finden sich darüber hinaus in der Randzone zirkuläre Fasern, die zur Begrenzung beitragen und einen optisch leer erscheinenden Raum im gefärbten Präparat entstehen lassen (Abb. 6).

Der zentrale Anteil der Knötchen enthält immer ein Lumen. Diese zentralen Hohlräume scheinen manchmal durch Einschmelzung des Gewebes entstanden zu sein. Sie sind auffallend regelmäßig begrenzt und von radiär angeordneten Schichten gleichmäßig orientierter Zellen oder von langgestreckten dünnen Spindelzellen nach Art der Endothelzellen konzentrisch umgeben. Es entsteht der Eindruck, daß diese Lumina eine obligatorische Bildung darstellen. Einzelne Knoten besitzen an Stelle des zentralen ein exzentrisches Lumen.

Der Aufbau der Knötchen ist unabhängig von der Lokalisation immer gleichartig. Es sind in den verschiedenen Körperregionen und Organen die gleichen, beschriebenen Zellen beteiligt. Färberisch sind diese Zellen von denen der Umgebung nicht zu differenzieren. Der Form nach herrschen langgezogene, spindelige Typen mit schwach anfärbbarem Protoplasma und undeutlichen Zellgrenzen vor. Die regelmäßig aufgebauten, ovalen Kerne enthalten deutlich gezeichnete, meist in der Einzahl vorhandene Nucleolen. Die Kernkörperchen dieser Zellen geben gegenüber den Zellen der Umgebung eine etwas betonte PAS-Reaktion. Zentraler gelegene Zellen sind in der Form variabler, Übergangsformen bis zu ku-

* Abb. 1—6 s. Tafel S. 272 a—c.

bischen Zellen im soliden Anteil des Knötchens sind nicht selten.

Die Knoten in der Wandung des Truncus arteriosus sind häufig deutlich mit Endothel ausgekleidet. Die Lumina sind in diesem Bereich, wenn sie mit der Lichtung des Gefäßes in Zusammenhang stehen, mit Erythrocyten angefüllt (Abb. 3). Im Bereich des Truncus arteriosus erscheinen also die beschriebenen Veränderungen als Ausstülpungen des Gefäßrohres.

Besonders auffällig ist, daß trotz der starken Anhäufung von Zellen Zellteilungen nur selten nachweisbar sind.

Besprechung der Ergebnisse

Die Wirkung der Steroidhormone auf Wachstumsbeschränkung und Wachstumsauslösung ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Eine Beziehung zwischen Störung des Hormonhaushaltes und Krebsentstehung kann in manchen Fällen bestehen.

Aus verschiedenen Gründen war die Beurteilung der vorliegenden Befunde schwierig. Eine gesicherte vergleichende Histologie für die niederen Wirbeltiere liegt nicht vor. Bei Zahnkarpfen sind spontane Tumoren beschrieben. Infektionen sollen nach Pflugfelder (1952) und Wurmbach (1951) Wucherungen bei Fischen erzeugen. In der Literatur finden sich außerdem Beschreibungen tumorähnlicher Gebilde bei Zahnkarpfen, die in Beziehung zu den bei dieser Fischfamilie vorkommenden Geschlechtsumwandlungen stehen und sich aus wandernden Eizellen bilden sollen. Diese sogenannten „Restkörper“ zeigen morphologische Ähnlichkeit mit den Veränderungen nach DIA-Applikation.

Die infektiöse Genese erscheint uns ausgeschlossen, da 15 verschiedene Versuchsreihen mit Fischen verschiedener Herkunft z. T. in Köln (1951), z. T. in Heidelberg (1953, 1954) durchgeführt wurden, und die beschriebenen Befunde sich bei Kontrolltieren und parallel laufenden Untersuchungen mit anderen Steroidhormonen nicht fanden. Die Bildung von „Restkörpern“ kann als Erklärung nicht herangezogen werden, weil die Gonade in den ersten Lebensstadien der Tiere nur sehr schwach entwickelt ist und

die Wucherungen bei beiden Geschlechtern auftraten.

Zur Deutung ergaben sich bei allem Vorbehalt zwei Möglichkeiten. Entweder muß man die Auslösung eines Wachstumsreizes oder reaktive Granulome im Sinne von Fremdkörper-Granulomen annehmen. Die Bindung an Mesenchym und lockeres Bindegewebe und die Bildung der zentralen Lumina, die immer optisch leer erscheinen und häufig endothelial ausgekleidet sind, legen nahe, daß es sich um Bildungen des gefäßbildenden Mesenchyms handelt. Man kann vermuten, daß die Wucherungen von wenig differenzierten, multipotenten Zellen ausgehen. Offenbar übt DIA einen spezifischen Wachstumsreiz auf das gefäßbildende Mesenchym aus. Zur Zeit der Geburt sind bei *Lebistes* wenig Gefäße nachweisbar. Die Zwischengewebe werden anscheinend vorwiegend durch Diffusion versorgt. Wahrscheinlich liegen innerhalb der lockeren Gewebe verstreut embryonale Zellen, die die Potenz zur Gefäßbildung haben. Diese Gefäßbildungs-Zellen werden unter der Wirkung des DIA zu überschießendem Wachstum angeregt. Die endothelial ausgekleideten Hohlräume sind wahrscheinlich Gefäßmißbildungen, die keinen Anschluß an das vorhandene Gefäßsystem finden.

Es ist bemerkenswert, daß das verwendete Steroid dem Stoffwechsel der Nebenniere entstammt. Obwohl laufende Versuche am Nagetier eine Wirkung des DIA wahrscheinlich machen, die der des Cortison sehr ähnlich ist, hat sowohl Cortisonacetat als auch Desoxy-corticosteron-acetat bei der angewandten Methode keine vergleichbare Wirkung.

Herrn Prof. Dr. E. Randerath danken wir für die Beurteilung der histologischen Präparate und für seine Hilfe bei der Deutung der aufgetretenen Gewebeveränderungen.

Herrn Prof. Dr. H. Lettré danken wir für die Förderung der Arbeit.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie der Stiftung für Krebs- und Scharlachforschung der Universität Heidelberg haben wir für materielle Unterstützung zu danken.

Herrn Dr. H. E. Voss, Firma F. C. Boehringer & Soehne G.m.b.H. Mannheim, sei für die Überlassung der Substanz gedankt.

¹ H. Querner, Biol. Zbl. 75, 28 [1956].
² H. Querner u. H. Wrba, Naturwissenschaften 40, 466 [1953 a].
³ H. Querner u. H. Wrba, Z. Krebsforsch. 59, 546 [1953 b].

⁴ O. Pflugfelder, Z. Parasitenkunde 15, 321 [1952].

⁵ H. Wurmbach, Roux' Arch. Entwicklungsmechan. Organismen 145, 109 [1951].

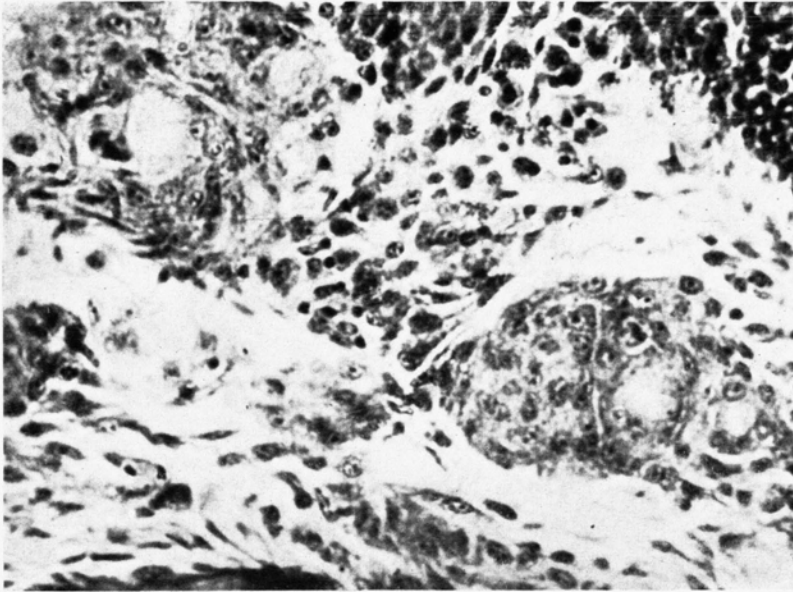


Abb. 1. Knotenbildungen im lockeren Zwischengewebe des Kopfes. Vergrößerung 540-fach. Färbung H.-E.

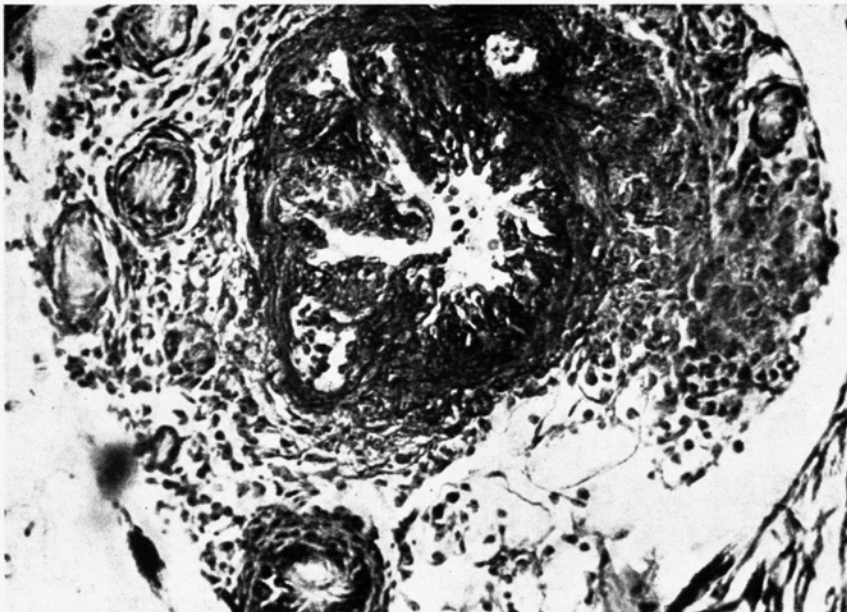
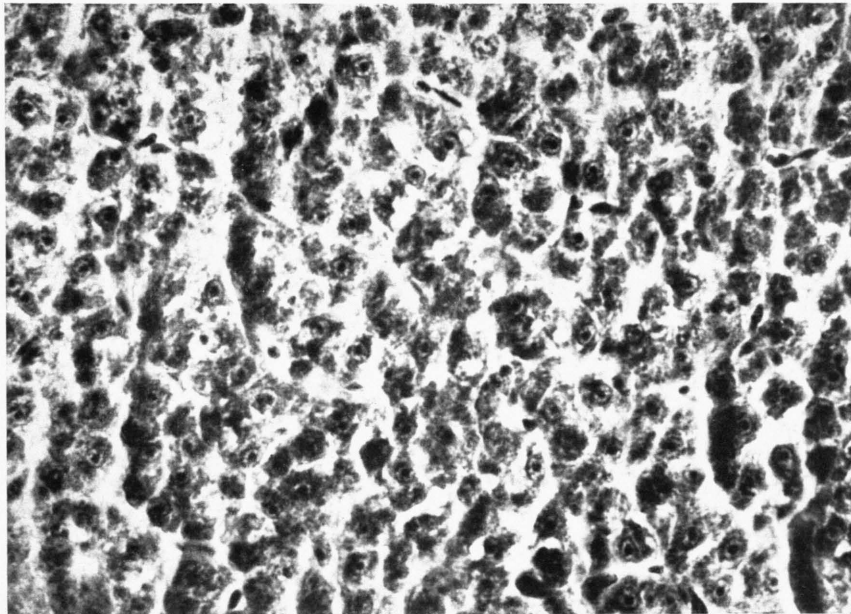
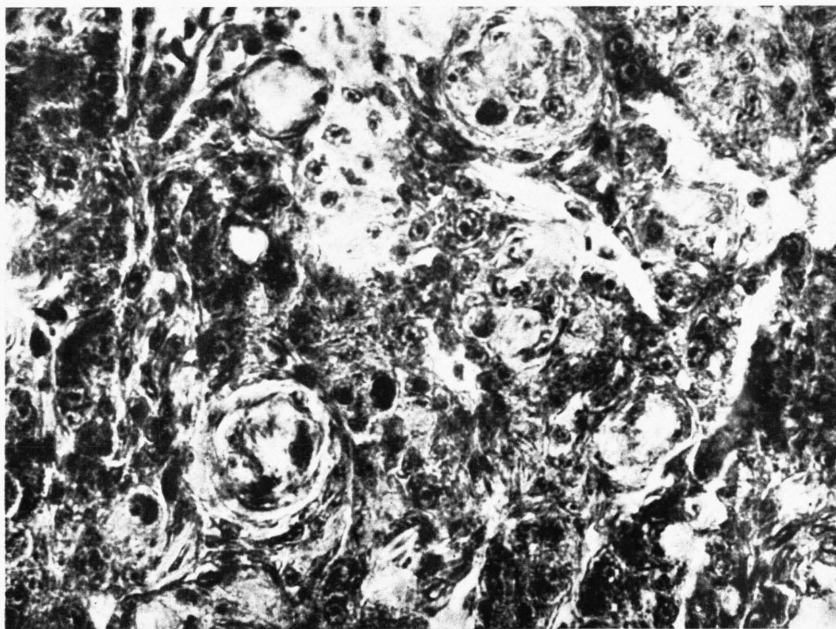


Abb. 3. Querschnitt durch Truncus arteriosus. Sinusartige Ausstülpungen mit Erythrocyten und isolierte Knoten mit zentralen Lichtungen sind zu erkennen. — Silberimprägnation, Vergrößerung 300-fach.



a



b

Abb. 2. Leber a) Kontrolle, b) Versuch.

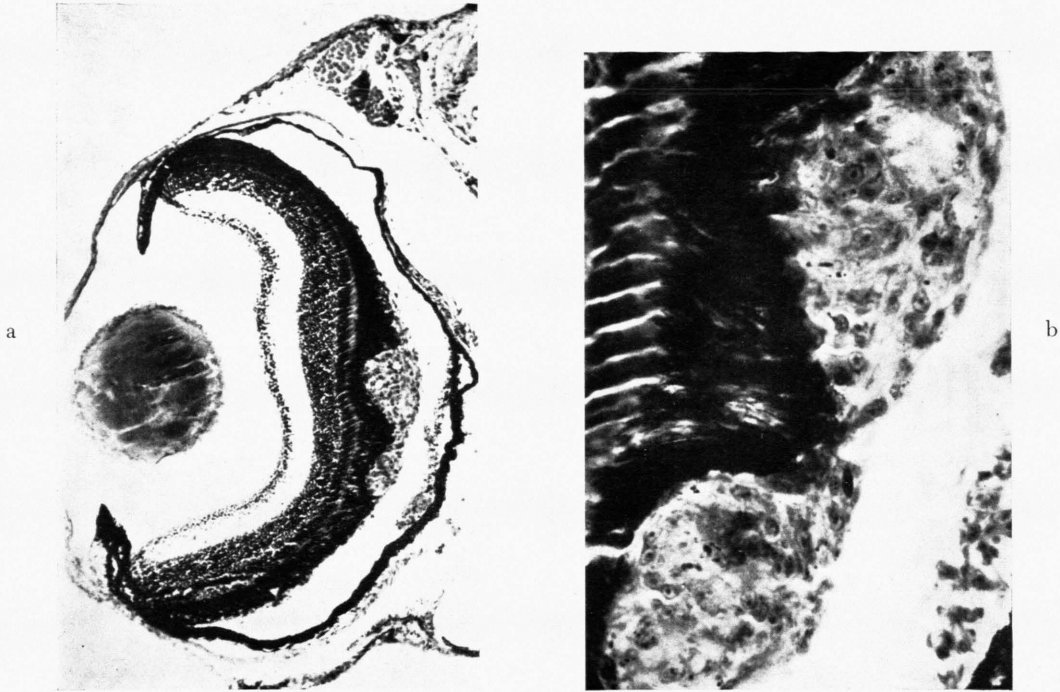


Abb. 4. a) Querschnitt durch den Augenbecher, b) Wucherung stärker vergrößert.

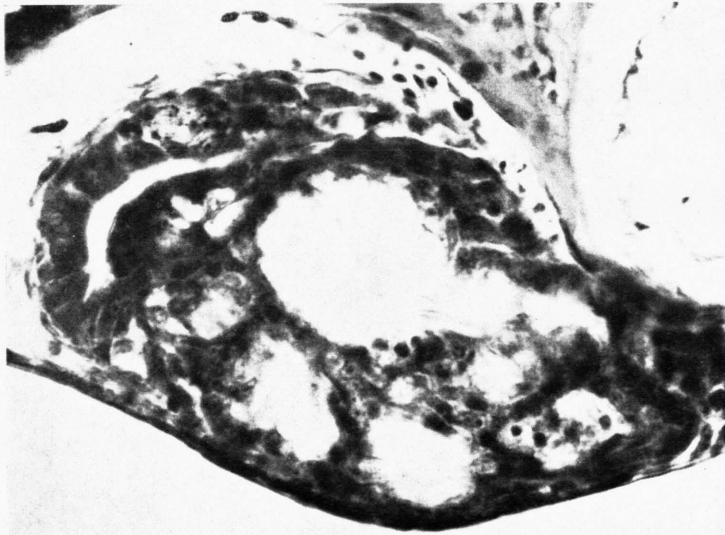


Abb. 5. Durch Zellwucherung verdrängtes Lumen des Ureters.

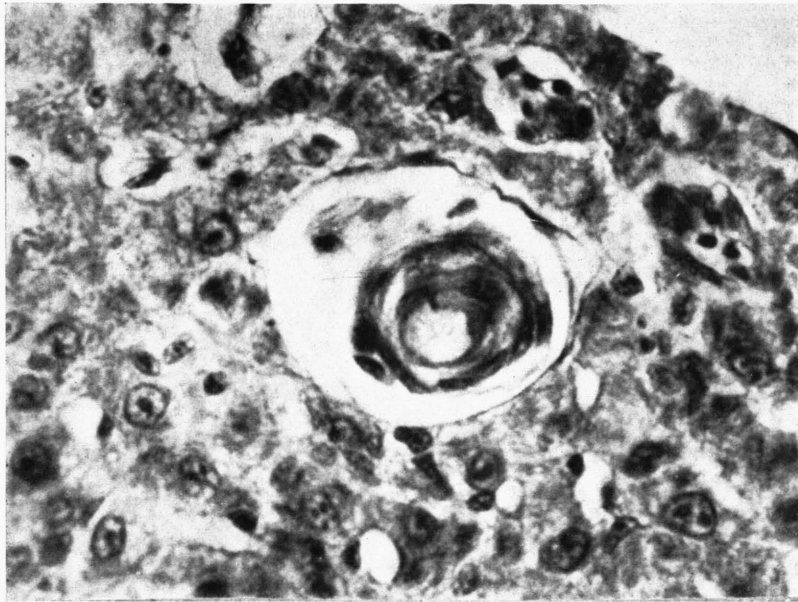


Abb. 6. Isolierter Knoten in der Leber. Vergrößerung 540-fach, 2-mal nachvergrößert.

W. Albrecht und R. Gädke, Weitere chemische, histochemische und histologische Untersuchungen über Veränderungen in Geweben von Säuglingsmäusen nach Virus-Infektion (S. 241)

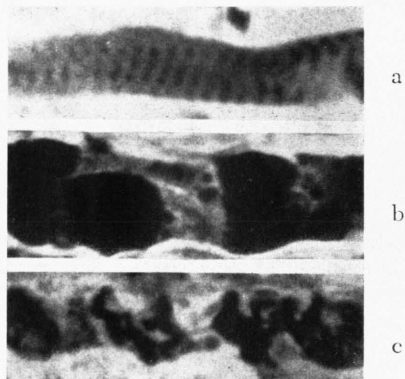


Abb. 3. Myofibrillenfärbung nach Heidenhain in Skelettmuskelfasern von Säuglingsmäusen, die mit Coxsackie-A₁-Virus infiziert waren. a) Normale Muskelfaser (Kontrolltier). b) Völlige Verklumpung im Stadium der „hyalinen Schwellung“. c) Auflösung der Muskelfaser mitsamt der Innenstruktur. Vergrößerung ca. 1 : 1000.

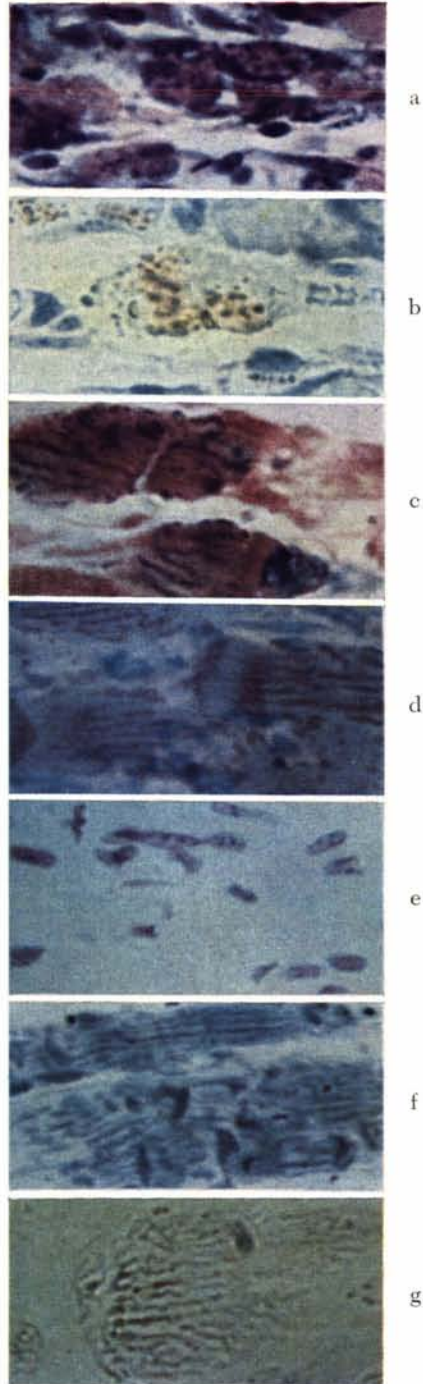


Abb. 2. Histochemische Reaktionen im Skelettmuskelgewebe der Säuglingsmaus nach Coxsackie-A₁, A₂, A₃-Virus-Infektion. a) Übersichtsfärbung (HE). b) Fettfärbung mit Scharlachrot. c) Fe_(III)-Darstellung (Turnbull-Blau-Reaktion). d) Methylgrün-Pyroninfärbung. e) Feulgensche Nuklealreaktion. f) Färbung mit gepufferter Methylenblaulösung bei p_{H} 4,9. g) Behandlung mit Bials Reagens. Agfa-Color-Negativ-Kunstlichtfilm. Vergrößerung ca. 1 : 1000.