

ing the expected inhibition of complex formation after blocking the his residues on the surface of Hb, or the tyr residues on the surface of Hp. The fact that the inverse combination does not cause major changes in the complex reaction gives this interpretation even stronger support: In the direct inhibition (Hb + DHT, Hp + NAI), conformational changes upon chemical modification might be responsible for the inhibitory effect; in the inverse combination,

however, (e. g. after the Hp-DHT reaction) this possibility is clearly ruled out.

Acknowledgements

We wish to thank Professor J. STAUFF for encouragement and hospitality. Work was supported by a fellowship from the Deutscher Akademischer Austausch Dienst for Z. P., and by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft and the Verband der Chemischen Industrie.

Der Einfluß von partiellen Hepatektomien auf die Hepatomrate nach Diäthylnitrosamin-Gaben

D. GRÜNTAL, D. O. HELLENBROICH, P. SÄNGER und H. MAASS

Universitäts-Frauenklinik Hamburg-Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. med. K. THOMSEN)

(Z. Naturforsch. **25 b**, 1277—1281 [1970]; eingegangen am 10. April 1970)

Rats were hepatectomised and subsequently diethylnitrosamine was applied orally (2 mg DENA/kg/d). Compared with a non-treated control group the mean survival time was lowered from 225 to 158 days. In a second experiment repeated hepatectomies were performed. All these rats were killed after 40 weeks and after a total DENA dose of 351 mg/kg. By histological examination of the livers a higher rate of hepatomas was found in the hepatectomised group.

Thus the proliferating processes during liver regeneration seem to favour the hepatocarcinogenesis under DENA treatment.

Wir untersuchten in zwei Versuchsserien, ob die Regenerationsvorgänge nach partieller Hepatektomie zu einer Erhöhung der Hepatomrate nach Nitrosamingaben führen. Einmal wurde nach einer $\frac{2}{3}$ Resektion der Rattenleber bei kontinuierlicher Nitrosamingabe die Überlebenszeit beobachtet, zum anderen wurde 5-mal eine Teilresektion der Leber durchgeführt, die Tiere nach diskontinuierlicher Nitrosaminfütterung nach 40 Wochen getötet und die Leber histologisch und enzymatisch untersucht.

Material und Methode

1. Versuchsserie: 30 ca. 200 g schwere weibliche Wistar-Ratten aus eigener Zucht erhielten bis zu ihrem Tode pro Tag 2 mg Diäthylnitrosamin (DENA) pro kg Körpergewicht im Trinkwasser gelöst. Bei einem Drittel der Tiere (Gruppe A) wurde zu Beginn der Nitrosaminfütterung eine typische $\frac{2}{3}$ Resektion der Leber (HIGGINS und ANDERSON)⁶ durchgeführt, bei 10

weiteren Tieren wurde auf gleiche Weise 86 Tage nach Nitrosamingabe operiert (Gruppe B), das restliche Drittel erhielt nur Nitrosamin im Trinkwasser (Gruppe C). Nach dem Tode der Tiere wurde die Leber nach Färbung mit Hämatoxylin-Eosin und Toluidinblau histologisch untersucht.

2. Versuchsserie: 60 weibliche Wistar-AF-Ratten (Zentral-Institut für Versuchstierzucht, Hannover), ca. 200 g schwer, wurden in zwei Gruppen D und E von je 24 Tieren und in eine Kontrollgruppe F von 12 Tieren eingeteilt. Den Tieren der Gruppe D wurde sofort nach einer partiellen Hepatektomie, denen der Gruppe E eine Woche später 3 Tage lang 9 mg DENA pro kg Körpergewicht pro Tag im Trinkwasser gegeben. Während dieser Zeit wurden die Tiere einzeln im Käfig gehalten. Die Trinkmenge wurde anfangs auf 5%, als die Tiere weniger tranken, auf 3% des Körpergewichtes festgelegt. Operiert wurde im Abstand von 14 Tagen, nach der dritten Operation wurde jedoch eine Pause von 4 Wochen eingelegt. Die erste Hepatektomie betraf den vorderen linken, die zweite den mittleren cranialen, die dritte den vorderen rechten, die vierte und fünfte Hepatektomie den hinteren Leberlappen. Die excidier-

Sonderdruckanforderungen an Dr. D. GRÜNTAL, Universitäts-Frauenklinik Düsseldorf, D-4000 Düsseldorf, Moorenstraße.

¹ P. N. MAGEE, Alkylation of Nucleic Acids and Carcinogenesis, in Molekulare Biologie des malignen Wachstums. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1966.

² P. RONS u. J. G. KIDD, J. Exptl. Med. **73**, 365 [1941].

³ J. BERENBLUM and P. SHUBIK, Brit. J. Cancer **1**, 383 [1947].

⁴ K. H. JACOBSEN, H. J. WHEELWRIGHT, JR., J. H. CLEM u. R. N. SHANNON, A. M. A. Arch. ind. Health **12**, 617 [1955].

⁵ E. GRUNDMANN u. H. SIEBURG, Beitr. pathol. Anat. allg. Pathol. **126**, 57 [1962].

⁶ G. M. HIGGINS u. R. M. ANDERSON, Arch. Pathol. **12**, 186 [1931].

ten Leberstücke hatten ein Gewicht zwischen 0,6 und 1,8 g; die Gesamtmenge lag zwischen 4,1 und 6,7 g. DENA wurde auch nach den Operationen im gleichen Rhythmus (3,9 mg/kg/d in Abständen von 14 Tagen) 28 Wochen bis zu einer Gesamtmenge von 351 mg/kg Körpergewicht gegeben. Den Tieren der Kontrollgruppe wurde DENA unter gleichen Bedingungen verabreicht. Nach jeder Operation wurde am zweiten Tag der DENA-Gabe je ein Tier aus den Versuchsgruppen D und E getötet und die Mitoserate der Leber nach Auszählen von jeweils 5000 Zellen bestimmt. Zur Versuchskontrolle wurden zusätzlich nach der 6., 10., 11., 18., 20., 22., 24., 26. und 28. Woche histologische Präparate durch Probeexcisionen nach Laparotomie oder von der Leber verstorbener Tiere angefertigt. 8 Tiere kamen während der Operation ad exitum, weitere starben unabhängig von den Operationen. Die restlichen 20 Tiere wurden nach 40-wöchiger Versuchsdauer innerhalb 1 Woche getötet, ein Teil der Leber histologisch untersucht, der Rest für enzymatische Untersuchungen verwandt. Gefärbt wurde mit Hämatoxylin-Eosin, Toluidinblau und Elastika-van-Gieson. Die histologischen Befunde wurden anhand der Stadieneinteilung von GRUNDMANN und SIEBURG⁵ — I, II, III (Microcarcinom), IV (Carcinom) — beurteilt.

Für enzymatische Bestimmungen blieben aus der Gruppe D 4, aus der Gruppe E 8 und aus der Kontrollgruppe F 6 Tiere übrig, da mehrere Ratten während der letzten Versuchswoche starben und ihre Leber nur noch für histologische Untersuchungen verwandt werden konnte. Ausgangswerte wurden von 4–11 weiblichen Tieren gleicher Zucht und gleichen Alters gewonnen (Gruppe G). Die Enzymbestimmungen wurden im Gesamthomogenat nach den von SHONK et al.⁷ angegebenen Methoden durchgeführt. Sämtliche Enzyme, Coenzyme und Substrate waren Produkte von C. F. Boehringer & Soehne. Die Substrate wurden in Form ihrer wasserlöslichen Salze verwandt. Alle Enzymbestimmungen wurden bei 25 °C in 0,05 M Triäthanolaminpuffer, pH 7,6, mit dem Eppendorf-Photometer bei 366 nm durchgeführt. Homogenisiert wurde mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator mit Teflon-Pistill. Sämtliche Arbeitsprozesse wurden in eiskühlten Gefäßen durchgeführt. Pipettiert wurde mit Marburg-Micropipetten. Die Enzymaktivitäten wurden in μMol Substratumsatz pro Min. bezogen auf 1 g Frischgewicht ausgedrückt.

Ergebnisse

1. *Versuchsserie:* Aus der Gruppe A starben 2, aus der Gruppe B 1 Tier vor dem Auftreten von Lebercarcinomen. Bei allen anderen Tieren ließen sich stecknadelkopf- bis kastaniengroße Tumoren nachweisen, die sich histologisch als Adenocarcinome oder mehr oder weniger entdifferenzierte hepatozelluläre Carcinome erwiesen (Tab. 1).

Gruppe	Mittlere Überlebenszeit in Tagen mit Standardabweichung	Zahl der Tiere
Hepatektomie Beginn der Fütterung (A)	158 \pm 20,3	8
Hepatektomie nach 86 Tagen (B)	206 \pm 12,7	9
Kontrollen (C)	225 \pm 14,8	10

Tab. 1. Mittlere Überlebenszeit von Ratten nach DENA-Fütterung (2 mg/kg/d).

Die Unterschiede mit dem t-Test nach Student berechnet, waren zwischen allen Gruppen signifikant ($p < 0,01$).

2. *Versuchsserie:* Das Gewicht der resezierten Leberlappen lag zwischen 0,6 und 1,8 g, die Gesamtmenge zwischen 4,1 und 6,7 g. Die effektiv entfernte Menge war jedoch 20–50% höher, da kleinere Leberbröckel und zerdrücktes Gewebe nicht gewonnen wurden. Die Mitoserate in der Gruppe D betrug im Mittel $M_D = 1,16\%$ ($s = 0,61$) und lag um 70% höher als in der Gruppe E ($M_E = 0,72$, $s = 0,49$). Die Unterschiede waren nicht signifikant. Die histologische Untersuchung der Präparate aus resezierten Leberlappen und aus der Leber verstorbener Tiere ergab, daß sie bis zur 6. Woche dem Stadium I nach Grundmann und Sieburg, ab der 10.–18. Woche dem Stadium IIa und vor der 20.–28. Woche dem Stadium IIa–IIb zuzuordnen waren.

In der 40. Versuchswoche nach 351 mg DENA/kg Körpergewicht ließen sich in der Gruppe D 3 entdifferenzierte Carcinome und Microcarcinome, in der Gruppe E 1 teilweise entdifferenziertes Carcinom und 9 Microcarcinome, in der Kontrollgruppe F dagegen nur ein hepatozelluläres Adenocarcinom und ein Microcarcinom nachweisen. Die restlichen Tiere gehörten der Gruppe IIa–IIb an.

Gruppe	Tiere mit Carcinomen und Microcarcinomen	Tiere mit dem Stadium IIa–IIb	Zahl der Tiere
DENA-Fütterung sofort nach der Hepatektomie (D)	7	2	9
DENA-Fütterung 1 Woche nach der Hepatektomie (E)	10	3	13
Kontrolle (F)	2	5	7
(D + E)	17	5	22

Tab. 2. Anzahl der Tiere mit histologischer Veränderung nach der Einteilung von Grundmann und Sieburg nach DENA-Fütterung und mehrfacher partieller Hepatektomie (Einzelheiten s. Text).

⁷ C. E. SHONK, H. P. MORRIS u. G. E. BOXER, Cancer Res. 25, 671 [1965].

Die Unterschiede wurden nach Zusammenfassung der Merkmale Carcinom und Microcarcinom zu einer Gruppe mit Fishers exaktem Wahrscheinlichkeitstest berechnet (WEBER⁸). Dabei fand sich beim gemeinsamen Vergleich der Versuchsgruppe D+E mit der Kontrolle F ein signifikanter Unterschied ($p=0,03$).

Die beiden Versuchsgruppen unterschieden sich nicht voneinander ($p=0,78$). Ebenso ließ sich zwischen den einzelnen Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe F kein Unterschied feststellen ($p_{D/F}=0,07$; $p_{E/F}=0,052$).

Für die Enzymuntersuchungen wurden die drei Versuchsgruppen zusammengefaßt und gemeinsam mit der Gruppe G verglichen.

Die meisten Enzymaktivitäten unterschieden sich nicht von denen in normaler Leber. Von den drei phosphorylierenden Enzymen waren die Aktivitäten von Glucokinase und Phosphofructokinase gegenüber normaler Leber signifikant ($p<0,01$) erniedrigt, bei der Pyruvatkinase dagegen ließen sich

keine Unterschiede feststellen. Ebenfalls signifikant erniedrigt war die α -Glycerophosphatdehydrogenase. Erhöhungen fanden sich bei der Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase, Phosphoglyceratmutase und der Fructosediphosphatase ($p<0,01$) (Tab. 3).

Wurden die Aktivitäten dieser sechs Enzyme in den Gruppen D+E gemeinsam mit denen in der Kontrollgruppe F verglichen, dann ließen sich keine Unterschiede mehr feststellen. Ebenfalls fand sich keine Korrelation zwischen Enzymaktivität und Malignitätsgrad.

Diskussion

Die Untersuchungen über den Einfluß einer gesteigerten Mitosetätigkeit bei der Hepatocarcinogenese zeigen unterschiedliche Ergebnisse. Während GLINOS et al.⁹ und LAWS¹⁰ eine Beschleunigung der Carcinogenese nach einer $2/3$ Resektion der Leber sahen, fand RAJEWSKY¹¹ keinen Einfluß. WEISBURGER et al.¹² konnten nach Implantation von hor-

		1 Leber (Gruppe G) 2 Leber (SHONK et al. ⁷)	1 praecanceröse Leber (Versuchstiere nach 351 mg DENA/kg Körper- gewicht Gruppe D, E, F 2 langsam wachsende Hepatome**	1 DMAB-Tumoren (SHONK et al. ¹⁷) 2 schnell wachsend Hepatome***
Fructose-1,6-diphosphatase	1	1,8* \pm 1,2 (7)	3,0* \pm 1,3 (17)	0,8
	2	4,3	2,7	0,9
α -Glycerophosphatdehydrogenase	1	62* \pm 2,0 (10)	48* \pm 12 (18)	1,5
	2	65	14	3,8
Glucokinase	1	1,6* \pm 0,3 (9)	0,5* \pm 0,15 (16)	2,7
	2	1,2	1,2	4,8
Phosphofructokinase	1	1,5* \pm 0,2 (9)	1,3* \pm 0,3 (15)	1,7
	2	2,2	1,4	3,1
Pyruvatkinase	1	34 \pm 5 (10)	29 \pm 8 (18)	44
	2	24	18	151
Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase	1	63* \pm 2,7 (6)	94* \pm 17 (18)	26
	2	63	50	47
Phosphoglyceratmutase	1	24* \pm 10 (10)	42* \pm 10 (17)	
	2	36		
Laktatdehydrogenase/ α -Glycerophosphat- dehydrogenase	1	5,8	6,3	42
	2	2,5	4,4 (3,7—8,7)	154 (20—498)

Tab. 3. Enzymaktivitäten mit Standardabweichung in μ Mol Substratumsatz pro Min. pro Gramm Frischgewicht im Gesamthomogenat. Zahl der Versuchstiere in Klammern. * Sehr signifikante Unterschiede. ** Hepatome 7787, 7793, 7316 A; 7800; 5123 D; 5123 A; 5123 C, H-35 (REUBER). *** Hepatome DUNNING, 3924 A, 3683, NOVIKOFF.

⁸ E. WEBER, Grundriß der biologischen Statistik. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1964.

⁹ A. D. GLINOS, N. L. R. BUCHER u. J. C. AUB, J. exp. Medicine **93**, 313 [1951].

¹⁰ J. O. LAWS, Brit. J. Cancer **13**, 669 [1959].

¹¹ M. F. RAJEWSKY, W. DAUBER u. H. FRANKENBERG, Science [Washington] **152**, 83 [1966].

¹² J. H. WEISBURGER, S. R. PAI u. R. S. YAMAMOTO, J. nat. Cancer Inst. **32**, 881 [1964].

monproduzierenden Hypophysentumoren eine gesteigerte Mitoserate der Leber und eine beschleunigte Hepatocarcinogenese feststellen.

Die 2-Stufentheorie der Carcinogenese fordert, daß eine nicht oder nur schwach carcinogene Substanz, die durch eine zweite Substanz eingeleitete Cancerisierung beschleunigt oder überhaupt erst zum Ausbruch bringt. Dabei sollte die einleitende Aktion möglichst kurz sein, die cocarcinogene Wirkung möglichst lang anhalten. Ein Umkehrtest — das Carcinogen nach dem Cocarcinogen — sollte negativ verlaufen. Außerdem sollte die Wirkung beider Substanzen sich zeitlich nicht überlappen, um eine bloß additive Wirkung von einem echten 2-Stufenprozeß zu unterscheiden (BERENBLUM¹³). Die letzte Forderung darf bei unseren Versuchen vernachlässigt werden, da bisher allein durch Hepatektomien keine Lebercarcinome erzeugt werden konnten.

Einen dem Umkehrtest entsprechenden Versuch machten SCHOENTAL und BENSTED¹⁴. Sie gaben 9 Tage nach einer partiellen Hepatektomie Ratten eine einmalige Dosis von 30 mg/kg Körpergewicht Retrorsin. Nach 19 Monaten Versuchsdauer fanden sie bei 2 von 9 Tieren Hepatome, ähnlich wie in der Kontrollgruppe, wo von 29 Tieren 5 nach durchschnittlich 25 Monaten Versuchsdauer Hepatome entwickelt hatten. Ein ähnlicher Versuch von LAWS¹⁰ mit Acetylaminofluoren war ebenfalls ohne Erfolg.

Versucht man jedoch nach einer Initialphase die durch DENA erfolgte Cancerisierung in einer anschließenden Entwicklungsphase mit einer $\frac{2}{3}$ Hepatektomie zu beschleunigen, ist kein Effekt nachweisbar. RAJEWSKY et al.¹¹ fütterten Ratten mit 5 mg DENA/kg Körpergewicht. Nach 82 Tagen stoppten sie nach den Forderungen der 2-Stufentheorie die Carcinogenzufuhr und führten 2 Tage später eine $\frac{2}{3}$ Resektion der Leber durch. Ihre Überlebenszeit unterschied sich nicht von der nicht hepatektomierter Tiere. Ähnliche, jedoch nicht so eindeutige Ergebnisse wie RAJEWSKY et al.¹¹ sahen GLINOS et al.⁹ bei der Dimethylaminobenzol-Hepatocarcinogenese. Führten wir dagegen die Hepatektomie gleichzeitig mit dem Beginn der Initialphase durch, dann war die

Beschleunigung der Hepatomentwicklung größer als wenn wir die Tiere erst 86 Tage später operierten. LAWS¹⁰ machte ein ähnliches Experiment mit Acetylaminofluoren. Die Hepatektomie zu Beginn der 4-monatigen Carcinogen-Fütterung beschleunigte das Auftreten der Malinome. Hepatektomie nach 3 Monaten brachte keinen Unterschied gegenüber nicht operierten Tieren.

Wir folgerten aus unserer 1. Versuchsreihe und den Ergebnissen anderer, daß im Anschluß an die Initialphase eine einmalige Hepatektomie nicht ausreicht, um die Carcinogenese zu beschleunigen oder aber, daß der Effekt der partiellen Hepatektomie auf den Cancerisierungsprozeß nicht durch die 2-Stufentheorie zu erklären ist. Es ist eher anzunehmen, daß bei der Mitose besonders leicht initiale Veränderungen zu setzen sind, die dann durch die carcinogene Wirkung der Nitrosamine und vielleicht durch weitere Hepatektomien zur Umwandlung in die Krebszelle führen. Zur Stütze dieser These planten wir eine zweite Versuchsreihe, in der wir das Carcinogen in der einen Versuchsgruppe (D) während der stärksten Mitosetätigkeit, in der anderen Gruppe (E) eine Woche später gaben. Zusätzlich versuchten wir die Untersuchungsergebnisse schärfer zu fassen. Da die Überlebenszeit ein ungenauer Parameter ist, töteten wir sämtliche Tiere, als das erste mit einem Carcinom verstarb.

Auch in dieser Versuchsreihe fanden wir einen signifikanten Unterschied gegenüber der nicht operierten Kontrollgruppe, jedoch keine Differenz zwischen den beiden Versuchsgruppen D und E. Verantwortlich dafür können einmal die geringen Unterschiede zwischen der Mitoserate der beiden Gruppen sein. Um die Mortalität nicht noch mehr zu erhöhen, konnten immer nur einzelne Leberlappen entfernt werden, wodurch der Anstieg der Mitoserate nur gering war (MCDONALD et al.¹⁵). Darüberhinaus üben zahlreiche Carcinogene einen zusätzlich hemmenden Effekt auf die Mitoserate aus (MAINI und STICH¹⁶), wohl besonders in der gegebenen hohen Konzentration. Zweitens war der Abstand der Nitrosamin-Fütterung zwischen beiden Gruppen möglicherweise zu gering, da durch Carcinogene die Re-

¹³ J. BERENBLUM, The Two-Stage Mechanism of Carcinogenesis as an Analytic Tool, in Cellular Control Mechanism and Cancer. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York 1964.

¹⁴ R. SCHOENTAL u. J. P. M. BENSTED, Brit. J. Cancer **17**, 242 [1963].

¹⁵ R. A. McDONALD, A. E. ROGERS u. G. PECHET, Lab. Invest. **11**, 544 [1962].

¹⁶ M. M. MAINI u. H. F. STICH, J. nat. Cancer Inst. **26**, 1413 [1961].

generationsphase verlängert wird und der Mitosegipfel sich abflacht (LAWS et al.¹⁰).

Das für die enzymatischen Untersuchungen verwandte Gewebe bestand fast ausschließlich aus präcancerös veränderten Zellen. Die Messung der Enzymaktivitäten erbrachten für die Unterscheidung der einzelnen Versuchsgruppen jedoch keine weiteren Vorteile, teils bedingt durch die kleinere Zahl der Versuchstiere — die Werte von frisch verstorbenen Tieren entfielen — teils durch die große Streuung der Meßwerte. Wurden aber die 3 Versuchsgruppen zusammengefaßt und mit den Werten unbehandelter Tiere verglichen, dann zeigten sich bei der Fructose-1.6-diphosphatase, Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase und Phosphoglyceratmutase signifikante Erhöhungen ($p < 0,01$). Bei der Glukokinase, α -Glycerophosphatdehydrogenase und Phosphofructokinase waren die Werte gegenüber normaler Leber signifikant erniedrigt ($p < 0,01$). Die Aktivitäten der anderen Enzyme unterschieden sich nicht signifikant von denen aus normaler Leber. Es waren diese Aldolase, Enolase, Glucose-6-phosphatdehydrogenase, Laktatdehydrogenase, Malatdehydrogenase, Phosphoglucoseisomerase, Phosphoglucomutase, 6-Phosphogluconatdehydrogenase, Phosphoglyceratkinase, Pyruvatkinase und Triosephosphatisomerase.

Vergleicht man aber die Werte des präcancerösen Gewebes mit Messungen in DMAB-Tumoren (SHONK

et al.¹⁷), dann findet sich das gleiche Enzymspektrum wie bei den langsam wachsenden Transplantations-Tumoren, mit im Verhältnis zu den schnell wachsenden Hepatomen niedrigen Kinase- und relativ hohen α -Glycerophosphatdehydrogenase- und Fructose-1.6-diphosphataseaktivitäten (Tab. 3).

Während die Fructosediphosphatase und Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase im Vergleich zur normalen Leber bei den langsam wachsenden Hepatomen gering erniedrigte Aktivitäten aufweisen, sind sie in dem präcancerösen Gewebe um etwa 50% erhöht.

Der Laktatdehydrogenase- α -Glyceraphosphatdehydrogenase-Quotient (LDH/GPDH), der in Beziehung zum Ausmaß der anaeroben Glykolyse der Tumorzellen steht (DELBRÜCK et al.¹⁸), liegt bei den schnell wachsenden Tumoren zwischen 20 und 500, bei den langsam wachsenden Tumoren noch gering über den Normalwerten. Während sonst das Enzymspektrum des präcancerösen Gewebes das den langsam wachsenden Tumoren entsprach, unterschied sich der LDH/GPDH-Quotient nicht von den Normalwerten.

¹⁷ C. E. SHONK u. G. E. BOXER, Cancer Res. **24**, 709 [1964].

¹⁸ A. DELBRÜCK, A. SCHIMASSEK, K. BARTSCH u. TH. BÜCHER, Biochem. Z. **331**, 297 [1959].