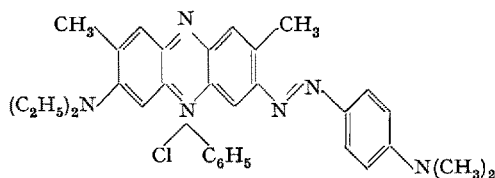


Fehlen einer karzinogenen Wirkung von Janusgrün an Ratten*

Quantitative Versuche zur Krebszerzeugung an Ratten mit 4-Dimethylaminoazobenzol¹ und ebenso mit 4-Dimethylaminostilben² hatten ergeben, dass die karzinogenen Effekte über die ganze Lebensdauer irreversibel fortbestehen («Summationswirkung»)¹ und bei der Zellteilung offenbar auch auf die Tochterzellen übertragen werden. Hieraus folgte, dass die Zellbestandteile, an denen die karzinogene Wirkung angreift und deren destruktive Veränderung schliesslich zur krebsigen Entartung der Zelle führt, nicht «de novo» gebildet werden können, sondern bei der Zellteilung ebenfalls verdoppelt werden müssen. Da nähere Angaben über ihre Lokalisation in der Zelle oder über ihre Funktion nicht möglich waren, wurden sie als «Duplikanten» bezeichnet. Die Auswertung der Versuchsergebnisse machte es in Übereinstimmung mit neueren Angaben³ wahrscheinlich, dass die betroffenen Zellbestandteile nicht in der Einzahl, sondern in einer Vielzahl in den Zellen vorhanden sind, so dass auch plasmatische «Duplikanten» in Frage kommen⁴.

Die Beobachtung, dass nach Applikation von karzinogenen aromatischen Kohlenwasserstoffen auf die Mäusehaut eine besonders starke und anhaltende Fluoreszenz in den Mitochondrien zu beobachten ist, veranlasste GRAFFI⁵ zu der Annahme, ihre Veränderung stelle den spezifischen Vorgang bei der Kanzerisierung der Zelle dar. Da die Mitochondrien, für die eine «Duplikanten»-Natur angenommen wird⁵, die wesentlichen Strukturen für die enzymatischen Oxydationen in der Zelle darstellen, führte WARBURG⁶ die Auffassung von GRAFFI als Stütze für seine interessante Theorie an, nach der eine Hemmung der Zellatmung die letzte und allgemeine Ursache der Krebsentstehung sei.



Mitochondrien werden durch den basischen Diazinfarbstoff Janusgrün elektiv vital gefärbt (MICHAELIS⁷) und offenbar auch vergiftet. Janusgrün ist ein hochwirksamer Hemmstoff für die Zellteilung (Seegelei)⁸ und vor allem für enzymatische Funktionen, die an den Mitochondrien lokalisiert sind, wie die Zitrullinsynthese⁹, die Succinoxidasen- und Zytochromoxidasenaktivität¹⁰,

sowie nach LEUTHARDT und EXNER¹¹ auch für die Zellatmung. Aus diesen Gründen wäre vom Janusgrün (Formel) eine geradezu spezifische karzinogene Wirkung zu erwarten.

Ferner wird das Janusgrün nach den Untersuchungen von GÜTTES und SCHMÄHL¹² im Organismus schnell gespalten, erscheint also gerade zu einer intermittierenden Hemmung der Zellatmung geeignet, die den Kanzerisierungsprozess besonders begünstigen soll. Nach BIELKA¹³ wird die karzinogene Wirkung von aromatischen Kohlenwasserstoffen durch gleichzeitige Applikation von Janusgrün gesteigert.

Aus diesen Gründen haben wir das Janusgrün auf karzinogene Wirkung untersucht. Die von uns verwendete Substanz erwies sich bei der papierchromatischen Untersuchung als einheitlich. Das Absorptionsmaximum bestimmten wir in methanolischer Lösung bei 645 m μ . Als Versuchstiere dienten Ratten unserer reinen Stämme BD I und BD III, deren Empfindlichkeit gegenüber karzinogenen Substanzen aus Vergleichsversuchen mit 4-Dimethylaminoazobenzol bekannt war. Die Prüfung erfolgte sowohl im Fütterungsversuch als auch bei subkutaner Injektion. Für beide Applikationsformen wurden die maximal verträglichen Einzeldosen experimentell ermittelt. Sie betrugen oral 20 mg/Ratte und subkutan 0,5 mg.

Im Fütterungsversuch erhielten 20 Ratten täglich je 20 mg in einer Mischkost verabreicht. Die Behandlungsdauer betrug 670 Tage, wobei einige Pausen eingeschoben wurden. Die aufgenommene Gesamtdosis erreichte 8,9 g/Ratte. Alle Tiere wurden bis an ihr natürliches Lebensende beobachtet. Die mittlere Lebensdauer betrug 650, die maximale 1034 Tage. Obwohl die applizierte Dosis etwa das 30fache der karzinogen wirksamen «Stop»-Dosis des Buttergelbs beträgt, trat keine maligne Geschwulst auf.

Im Injektionsversuch konnte wegen der lokal nekrotisierenden Wirkung des Janusgrüns nur 0,5 mg als Einzeldosis alle zwei Wochen gegeben werden. Die Behandlungsdauer betrug 802 Tage, die maximale Lebensdauer 902 Tage, die erreichte Gesamtdosis 33 mg. Bei keiner der 15 behandelten Ratten entstand eine Geschwulst.

H. A. NIEPER und H. DRUCKREY

Laboratorium der Chirurgischen Universitätsklinik
Freiburg i. Br., den 24. September 1956.

Summary

Janus green, a special dyestuff for coloring mitochondria and a poison with a remarkable respiration-inhibiting effect, was tested for carcinogenic activity in rats. Neither after oral nor subcutaneous injection was cancerisation observed.

Su un criterio di valutazione dell'attività di un farmaco antitubercolare nella cavia infettata con carica massiva

Nella tbc. sperimentale, allo scopo di ridurre al minimo le cause accidentali che possono interferire nella valutazione dell'attività di un antimicobatterico, già da

* Die Untersuchungen wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft ermöglicht.

¹ H. DRUCKREY und K. KÜPFMÜLLER, Z. Naturf. 3b, 254 (1948).

² H. DRUCKREY und D. SCHMÄHL, Exper. 12, 185 (1956). - D. SCHMÄHL und R. MECKE, Z. Krebsf. 61, 230 (1956).

³ B. RAJEWSKY, Z. Krebsf. 56, 274 (1949). - C. O. NORDLING, Brit. J. Cancer 7, 68 (1953). - P. STOCKS, Brit. J. Cancer 7, 407 (1953).

⁴ H. P. RUSCH, Cancer Res. 14, 407 (1954). - C. D. DARLINGTON, Brit. J. Cancer 2, 118 (1948). - R. DANNEEL und E. GÜTTES, Naturwissenschaften 39, 331 (1952).

⁵ A. GRAFFI, Abhandlg. dtsch. Akad. Wiss., Berlin 1, 151 (1953).

⁶ O. WARBURG, Krebsforschung und Krebsbekämpfung 34, 3, 41 (1955); Naturwissenschaften 42, 401 (1955); Science 123, 309 (1956).

⁷ L. MICHAELIS, Arch. mikr. Anat. 55, 588 (1900).

⁸ H. DRUCKREY, P. DANNEBERG und D. SCHMÄHL, Arzneim. Forsch. 1, 151 (1953).

⁹ F. LEUTHARDT und A. F. MÜLLER, Exper. 4, 478 (1948).

¹⁰ G. H. HOGEBOOM, W. C. SCHNEIDER und G. PALLADE, J. biol. Chem. 172, 619 (1948).

¹¹ F. LEUTHARDT und B. EXNER, Helv. chim. Acta 36, 519 (1953).

¹² E. GÜTTES und D. SCHMÄHL, Arzneim.-Forsch. 4, 479 (1954).

¹³ H. BIELKA, Naturwiss. 42, 299 (1955).

tempo siamo stati indotti¹ a sperimentare nella cavia sottoposta ad infezione massiva (con 1 mg di germi, peso umido, per via inguinale). Con questa metodica si conseguono particolari condizioni: a) rapidità dell'evoluzione del processo tbc., che al 70° giorno dall'infezione raggiunge nei controlli una intensità tale da esser ritenuta pari al 100%; b) maggiore costanza – a seconda del tempo intercorso dall'infezione – delle manifestazioni anatomiche a carico dei vari organi, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo; c) eliminazione o riduzione – sotto la carica batterica massiva e l'uso immediato del farmaco – d'interferenze, specie di carattere immunitario.

In varie ricerche – condotte in queste condizioni – sulla attività di diversi antimicobatterici, è stato da noi notato che l'evoluzione del processo tubercolare negli animali (così inoculati ed immediatamente trattati) corrisponde in misura talvolta sovrapponibile a quella di animali, che siano stati infettati con quantità inferiori di bacilli e non trattati. Riteniamo, ora, opportuno riferire i risultati e le deduzioni di apposite ricerche, limitatamente a quelle condotte con streptomicina e con idrazide dell'acido isonicotinico (INI.). Sono stati presi in esame i principali fattori, che intervengono nelle suddette condizioni sperimentali: carica batterica massiva ed attività, dose del farmaco, nonché inizio del trattamento.

Le cavié (peso medio 300 g) – suddivise in più lotti – sono state infettate per via inguinale con 1 mg (peso umido di germi); è stato usato un ceppo di spiccato potere patogeno e virulento, di recente isolamento (su terreno di PETRAGNANI) sensibile *in vitro* sia alla streptomicina che all'INI. Il primo lotto di 60 cavié è servito come controllo; gli altri lotti – ciascuno di 50 animali – sono stati rispettivamente trattati per via intramuscolare con le seguenti dosi pro die di streptomicina (500 γ; 1000 γ; 2000 γ; 6000 γ) oppure d'INI. (0,5; 1; 5; 10 mg). Altri lotti di cavié (60 animali cadauno) sono stati infettati per via inguinale, con dosi inferiori di germi: 1/10; 1/100; 1/1000 di mg, usando sempre il medesimo ceppo. Durante il decorso dell'infezione (ogni 10 giorni e fino al 70° giorno, sono stati sacrificati per ogni gruppo due animali, rilevando i vari elementi, che permettono

di calcolare l'indice dell'impegno tubercolare (I.T.) e che corrisponde all'indice d'infezione degli altri autori. I vari elementi macroscopici, necessari per la valutazione dell'I.T. sono stati già indicati in una nota precedente². Tenendo conto degli animali deceduti spontaneamente nel corso dell'esperienza, sono stati ricavati i valori relativi a T_{50} ed a T_{100} , secondo le indicazioni di DONOVICK *et al.*³. Nella seguente tabella, figurano i dati relativi a ciascun lotto di animali, riportando per brevità solo quelli finali relativi al termine dell'esperienza.

Nella valutazione dei dati, occorre prendere in esame: a) relazione tra il progredire e l'entità dell'infezione in funzione della carica bacillare; b) influenza della dose di antibiotico sul progresso ed entità dell'infezione, in seguito ad inoculazione con 1 mg.

Al 70° giorno nei controlli infettati con la dose di 1 mg, l'I.T. è al 100%, mentre in quelli infettati con carica di germi inferiore, l'I.T. è gradualmente minore. La mortalità di tutto il gruppo avviene in un lasso di tempo bene determinato, che è piuttosto limitato e costante nelle varie esperienze, pur se condotte con lotti diversi di animali. Da tutto ciò si ribadisce ancora una volta che la costanza dell'evoluzione del processo tubercolare – in funzione del tempo – si può ottenere solo inoculando gli animali con carica massiva, come già rilevato in precedenza da noi stessi¹ e da altri (DOMAGK⁴; PETRAGNANI⁵; PERITI e FOWST⁶).

Dall'esame, poi, dei dati relativi agli animali infettati con 1 mg e trattati, rispettivamente con streptomicina oppure con INI., si deduce che – a seconda della maggiore o minore attività delle varie sostanze, oppure della dose impiegata – i valori finali dell'Indice dell'impegno tubercolare possono corrispondere a quelli, che si rilevano nei lotti di animali infettati con quantità di germi inferiori ad 1 mg e non trattati. È ammissibile che l'immediato trattamento con un antimicobatterico in dose efficace possa determinare la riduzione della carica batterica iniziale.

Può essere, così, giustificata la proposta di valutare l'attività di un farmaco antitubercolare, in funzione della capacità di ridurre – nelle suddette condizioni d'e-

¹ C. BAZZICALUPO, M. CONTIERI e A. PORTELLA, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 28, 119 (1952). – C. BAZZICALUPO, M. CONTIERI e M. GEMMI, Arch. Tisiologia 5, 1024 (1950). – C. BAZZICALUPO, A. PORTELLA, M. CONTIERI, Il Farmaco (ed. Scient.) 8, 538 (1953).

² C. BAZZICALUPO, A. PORTELLA e M. CONTIERI, Il Farmaco (ed. Scient.) 8, 538 (1953).
³ R. DONOVICK *et al.*, Amer. Rev. Tuberc. 60, 109 (1949).
⁴ G. DOMAGK, Amer. Rev. Tuberc. 61, 8 (1950).
⁵ G. PETRAGNANI, Minerva Medica 47, vol. I, 1195 (1956).
⁶ P. PERITI e G. FOWST, Boll. Soc. It. Biol. sper. 28, 1054 (1952).

	Indice dell'impegno tbc. al 70° giorno	T_{50} giorni	T_{100} giorni
Cavié infettate con 1 mg e non trattate	100	42	72
Cavié infettate con 1/10 mg e non trattate	60	76	135
Cavié infettate con 1/100 mg e non trattate	45	110	198
Cavié infettate con 1/1000 mg e non trattate	30	126	215
Cavié infettate e trattate con streptomicina alle dosi <i>pro die</i> :			
γ 500	90	45	71
γ 1000	60	60	82
γ 2000	50	66	92
γ 6000	30	74	140
Cavié infettate con 1 mg e trattate con INI. alle dosi <i>pro die</i> :			
mg 0,5	70	59	72
mg 1	45	64	85
mg 5	40	70	90
mg 10	30	76	101

sperienza (infezione con 1 mg di germi) – al 70° giorno l'intensità dell'impegno tubercolare, ad un valore pari a quello che si può riscontrare in altri lotti di animali, in seguito ad infezione con una carica bacillare minore e non trattati. Pertanto, ogni ricercatore potrebbe allestirsi una scala di valori basata su questo criterio.

C. BAZZICALUPO e A. PORTELLA

Università di Napoli, il 31 luglio 1956.

Summary

It is reported that the data of index of tuberculous process obtained after 70 days of massive infection (with 1 mg bacilli) and immediately treated with antitubercular drug, are similar to the data observed in the guinea pig infected with a low dosage of bacilli and not treated with any antitubercular drug. The authors therefore suggest the use of this comparison for a test of the antitubercular activity of a drug.

Ricerche fisiologiche sulla distribuzione periferica del nervo depressore aortico destro nel cane

La distribuzione periferica dei nervi depressori aortici nel mammifero, quale è stata descritta dai primi ana-

tomici (KOESTER e TSCHERMAK¹; SCHUMACHER²) e riportata nella maggior parte dei moderni trattati di fisiologia, è alquanto diversa da quella illustrata nelle ricerche posteriori di TELLO³, MURATORI⁴ e NONIDEZ⁵.

Secondo i primi autori, che esaminarono il decorso dei nervi di Cyon e Ludwig in degenerazione Walleriana, ambedue questi nervi si distribuirebbero a tutto l'arco dell'aorta, emettendo estese arborizzazioni sulla superficie anteriore e posteriore del vaso.

Le ricerche di TELLO, MURATORI e NONIDEZ, condotte su embrioni di mammifero e su animali neonati, avrebbero invece stabilito che mentre il depressore sinistro si spinge sino all'arco aortico ramificandosi attorno all'arteria in una ristretta zona circoscritta al punto di origine della succlavia sinistra, il depressore destro si arresta invece in massima parte alla radice dell'arteria succlavia destra e in parte minore al segmento più distale del tronco brachio-cefalico.

¹ G. KÖSTER e A. TSCHERMAK, Arch. Anat. Physiol., Anat. Abt. Suppl. 255 (1902).

² S. SCHUMACHER, Anat. Anz. 27, 1 (1902).

³ J. F. TELLO, Trav. labor. rech. biol. Univ. de Madrid 22, 295 (1924).

⁴ G. MURATORI, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 8, 387 (1933); 9, 1041 (1934); Arch. ital. Anat. Embriol. 36, 387 (1937).

⁵ J. F. NONIDEZ, Amer. J. Anat. 57, 259 (1935); Anat. Rec. 69, 3 (1937).

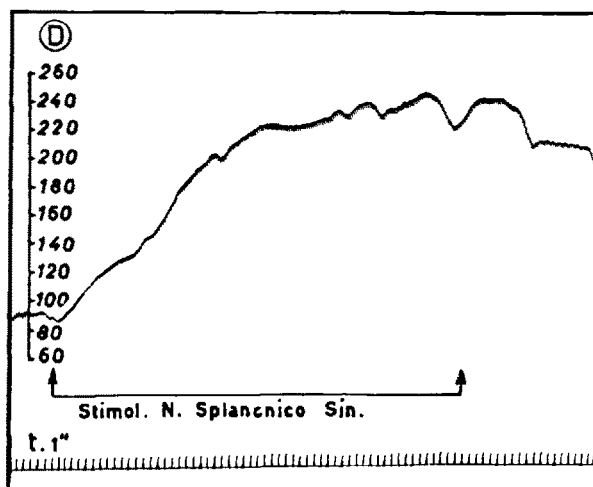
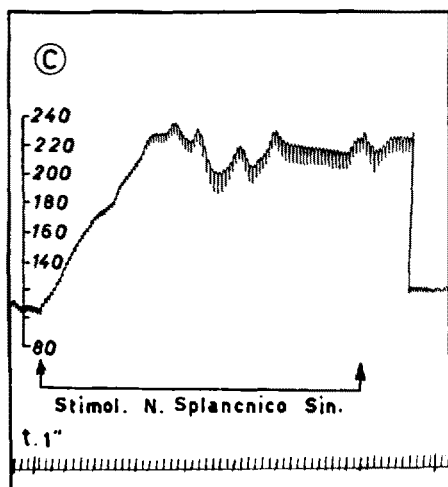
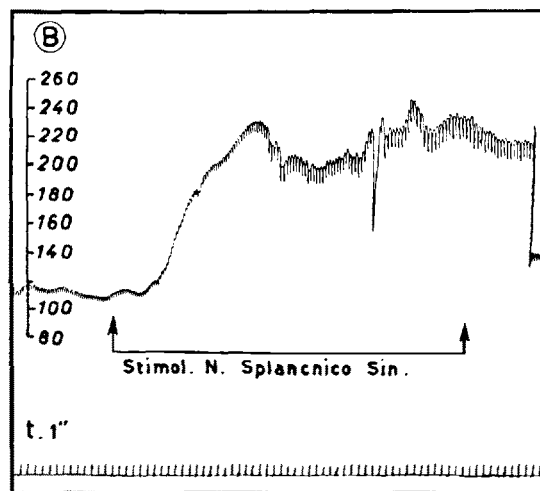
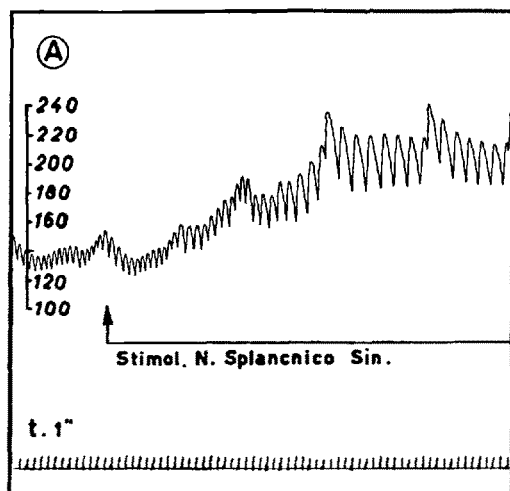


Fig. 1. Cane. Anestesia morfino-cloralosica. Registrazione della pressione arteriosa prima e durante la stimolazione elettrica del moncone periferico del n. splancnico sinistro. A Animale integro. B Dopo sezione dei due nervi di Hering e del vago-depressore sinistro. C Dopo denervazione dell'area barocetttrica di MURATORI-NONIDEZ. D Dopo sezione del nervo depressore aortico destro.