

SEMAINE D'ÉTUDE
SUR
LE PROBLÈME BIOLOGIQUE
DU CANCER



PONTIFICIA
ACADEMIA
SCIENTIARVM

EX AEDIBVS ACADEMICIS IN CIVITATE VATICANA

MCMXLIX

SEMAINE D'ÉTUDE
SUR
LE PROBLÈME BIOLOGIQUE
DU CANCER



PONTIFICIA
ACADEMIA
SCIENTIARVM

EX AEDIBVS ACADEMICIS IN CIVITATE VATICANA

MCMXLIX

P R É F A C E

En présentant le volume qui réunit les travaux de la «Semaine d'Etude» consacrée au «Problème biologique du Cancer», il me paraît à propos de donner au lecteur quelques notions qui l'aideront à comprendre le but de cette Assemblée.

Lorsque l'Académie Pontificale des Sciences fut fondée en 1936 par le Saint-Père PIE XI, de vénérée mémoire, dans son «*Motu Proprio*» du 28 octobre 1936 «*In multis solaciis*»⁽¹⁾, cette création suscita dans les milieux scientifiques un mouvement général de sympathie et d'admiration. Cette institution unique au monde, qui groupait en une même assemblée des représentants de toutes les Nations civilisées, était appelée en effet à de hautes destinées dans les développements de la pensée scientifique.

Dans ce «*Motu Proprio*» le Pape PIE XI proclamait solennellement la dignité de la recherche de la vérité pour elle-même et, élevant sa pensée au-dessus de toute préoccupation utilitaire, affirmait qu'il ne demandait

(1) L'Académie Pontificale des Sciences est l'héritière légitime de la célèbre Académie des «Lincei» fondée à Rome par le prince Federico Cesi en 1603 sous le titre de «*Lyncaeorum Academia*» et qui, après plusieurs vicissitudes historiques, avait été restaurée en 1847 par Pie IX, qui en fit le principal organisme scientifique de l'Etat Pontifical, sous le titre de «*Pontificia Accademia dei Nuovi Lincei*».

rien autre aux nouveaux « Académiciens Pontificaux » que de se consacrer avec une ferveur toujours plus grande au progrès de la science et, par là, au culte de la vérité: « C'est Notre souhait ardent et Notre ferme espérance: que par cet Institut, à la fois Notre et leur, les " Académiciens Pontificaux " contribuent toujours plus et mieux au progrès des sciences. Nous ne leur demandons pas autre chose; car en ce dessein généreux et ce noble labeur consiste le service, qu'en faveur de la vérité nous attendons de leur part » (*).

Tandis qu'on fixait les travaux de l'Académie, un problème se présenta bien vite avec évidence: les sciences posent chaque jour des problèmes nouveaux qui donnent lieu d'ordinaire à divers essais de solution, souvent contradictoires. Il arrive ainsi constamment que parmi les représentants les plus autorisés d'une science, et en particulier parmi ceux qui se sont consacrés à l'étude d'une même question, on rencontre des opinions opposées. Pareilles divergences se maintiennent parfois durant de longues périodes et constituent à la fois une grave difficulté pour l'enseignement des sciences, et fréquemment aussi un obstacle considérable à leur développement. Par ailleurs, l'expérience montre que les méthodes actuellement pratiquées dans la discussion des problèmes scientifiques, n'ont qu'une efficacité limitée au point de vue de l'établissement d'une unité de doctrine. Il serait dès lors hautement souhaitable de promouvoir tout ce qui pourrait favoriser un accord sur les points en discussion.

Un procédé semble devoir être particulièrement utile sous ce rapport: savoir l'établissement de contacts personnels prolongés entre quelques représentants d'opinions différentes au sujet d'une question déterminée.

(*) « Nobis autem in votis expectationeque est, ut fore " Pontificii Academici " vel per hoc Nostrum suumque studiorum Institutum, ad scientiarum progressionem fovendam amplius excelsiusque procedant; ac nihil praeterea aliud petimus, quandoquidem hoc eximio proposito praeclaroque labore famulatus ille nititur servientium veritati, quem ab iisdem postulamus ».

Et, en effet, le contact personnel des hommes de science constitue, sans aucun doute, le moyen le plus efficace de résoudre les controverses scientifiques.

Dans ce but, l'Académie Pontificale des Sciences a décidé d'organiser de pareilles rencontres scientifiques qu'on a appelées « Semaines d'Étude ».

L'Académie, agréant ma proposition, confia l'organisation scientifique à l'Académicien Pontifical S. E. PIETRO RONDONI, Professeur de Pathologie Expérimentale à l'Université de Milan et Directeur de l'Institut du Cancer de Milan, et l'organisation pratique au Chancelier de l'Académie, le Dr. PIETRO SALVIUCCI.

D'après le règlement des « Semaines d'étude », le nombre des participants devait être assez réduit, ainsi on dut se borner à inviter des représentants éminents de quelques domaines de la cancérologie expérimentale, dont les recherches peuvent être groupées de façon à donner un tableau à peu près complet de certaines questions bien actuelles. On a cru que le problème crucial est représenté aujourd'hui par le mécanisme de la cancérisation de la cellule: qu'est-ce qui se passe dans la cellule pour qu'elle acquière le caractère de la malignité? L'étude des hydrocarbures cancérigènes donne un paradigme très important qui permet de plonger notre regard dans la complexité de l'outillage cellulaire. C'est ainsi qu'on invita des biochimistes et des expérimentateurs qui ont apporté quelques lumières à ces questions. Mais on ne négligea pas certains agents étiologiques différents, comme les virus; et certaines modifications de l'organisme qui accompagnent la croissance de la tumeur.

On a regretté beaucoup de ne pas avoir pu élargir le nombre des participants en y comprenant d'autres savants distingués.

Selon le Règlement de la « Semaine d'Étude » toute question clinique et thérapeutique était exclue.

Ont été invités et ont participé à la « Semaine d'Étude » MM. les Professeurs dont voici les noms:

Prof. I. BERENBLUM (School of pathology University, Oxford);
Prof. E. BOYLAND (Chester Beatty Research Laboratory, Cancer Hospi-

tal, London); Prof. E. V. COWDRY (Division of Cancer Research, School of Medicine, Saint Louis, U. S. A.); Prof. H. v. EULER, Prix Nobel (Institutet för organ.-kemisk Forskning, Stockholm); Prof. J. P. GREENSTEIN (Department for Biochemistry, National Institute, Bethesda, U. S. A.); Dr. J. KRETZ (Primarius, Wien); Prof. A. LACASSAGNE (Laboratoire Pasteur de l'Institut du Radium, Paris); Prof. J. MAISIN (Institut du Cancer Louvain); Prof. PH. PEACOCK (Cancer Hospital, Research Department, Glasgow); Prof. F. PENTIMALLI (Istituto di Patologia generale dell'Università, Napoli); S. E. le Prof. P. RONDONI, Académicien Pontifical (Istituto di Patologia generale dell'Università e Direttore Istituto del Cancro, Milano); S. E. le Prof. L. RUZICKA, Académicien Pontifical, Prix Nobel (Institut f. organische Chemie an der Eidgenössischen technischen Hochschule, Zürich); Prof. J. SANZ IBAÑEZ (Instituto Nacional del Cancer, Madrid); Prof. H. R. SCHINZ (Röntgeninstitut und Radiumtherapeutische Klinik – Kantonsspital, Zürich).

M. le Prof. J. BITTNER (Division of the Cancer Biology, Medical School Minneapolis, U. S. A.) invité, a envoyé son rapport, n'ayant pas pu participer à la « Semaine d'Étude » pour des raisons personnelles. M. le Prof. HADDOW (Chester Beatty Research Laboratory, Cancer Hospital, London) a décliné l'invitation à cause d'engagements précédents. Les Académiciens Pontificaux S. E. ERNST FELIX PETRITSCH (Wien) et S. E. EDUARDO CRUZ COKE (Université du Chili, Laboratoire de Chimie physiologique et Pathologique, Santiago) ont présenté des mémoires. L'Académicien Pontifical S. E. Sir ALEXANDER FLEMING (London), Prix Nobel, a pris part aussi à quelques séances.

J'eus l'honneur d'inaugurer la « Semaine d'Étude » qui se déroula du 6 au 13 juin. Les travaux se poursuivirent sans interruption, sauf le matin du 7, pour l'Audience du Saint-Père et pour une Séance ordinaire que l'Académie tint le même jour à l'occasion de la « Semaine d'Étude » et à laquelle furent naturellement invités les cancérologistes.

Dans les premiers jours on écouta les rapports; après chacun d'eux des questions d'ordre technique furent parfois posées; mais les

discussions se déroulèrent ensuite dans les derniers jours, groupées selon l'affinité des sujets. Chaque séance fut présidée par un des membres.

Ce livre reproduit les rapports selon l'ordre dans lequel ils furent présentés, chacun étant suivi de la discussion qui s'y rapporte.

Pendant la « Semaine d'Étude » quelques-uns des savants participants eurent la bonté de faire des conférences à un auditoire plus vaste de médecins et de biologistes. On doit remercier cordialement le Rév. Père PAOLO DEZZA, Recteur Magnifique de la « Pontificia Universitas Gregoriana » qui mit à la disposition la Grande Salle et d'autres classes. Ainsi le Prof. J. MAISIN parla devant un public bien nombreux et moins spécialisé sur ce sujet: « Le cancer est-il contagieux et héréditaire? ». Suivirent les conférences de M. le Prof. E. BOYLAND sur la biochimie de la cancérisation; celle de M. le Prof. P. R. PEACOCK sur le cancer de l'estomac, surtout en relation avec l'alimentation; celle de M. le Prof. E. W. COWDRY sur le cancer de la peau, surtout au point de vue étiologique et pathogénétique. M. le Prof. A. LACASSAGNE accepta l'invitation de la Direction de l'Institut du Cancer de Rome et y donna une leçon sur les relations entre hypophyse et cancer.

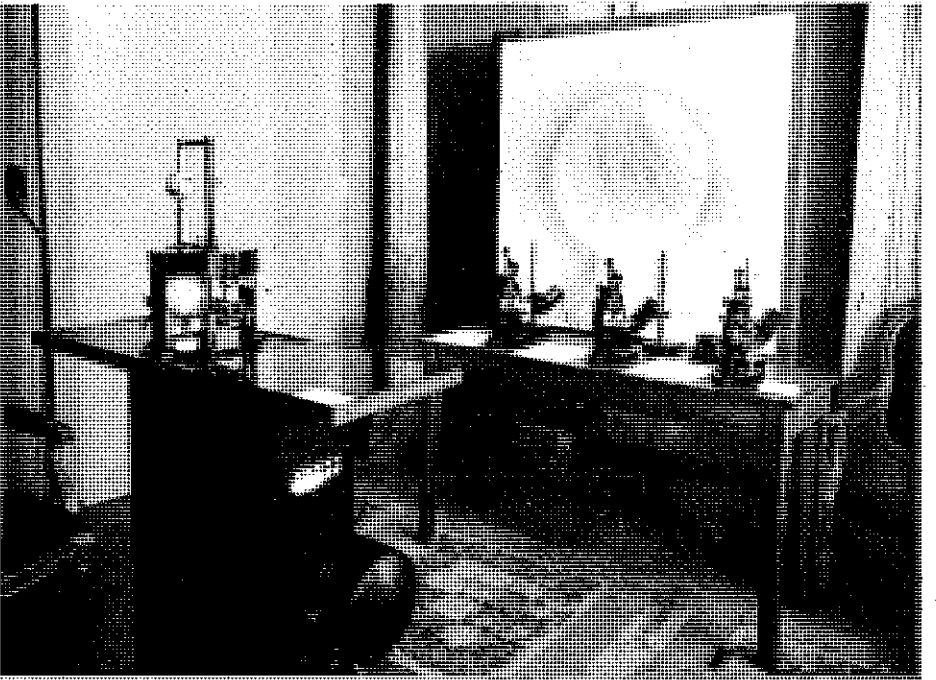
Participèrent à la « Semaine d'Étude » en qualité de Rapporteurs techniques: M. le Dr. GIOVANNI LOTTI et M. le Prof. MARIO MARGOTTINI; en qualité de traducteurs interprètes, Mme HÉLÈNE LOTTI, Melle la Comtesse KARINA CALVI DI COENZO et M. le Dr. MAX FINOCCHI; en qualité de secrétaires sténodactylographes polyglottes Melle Dr. BIANCA BATTAGLIA et Melle Dr. LEA MORLACCHI.

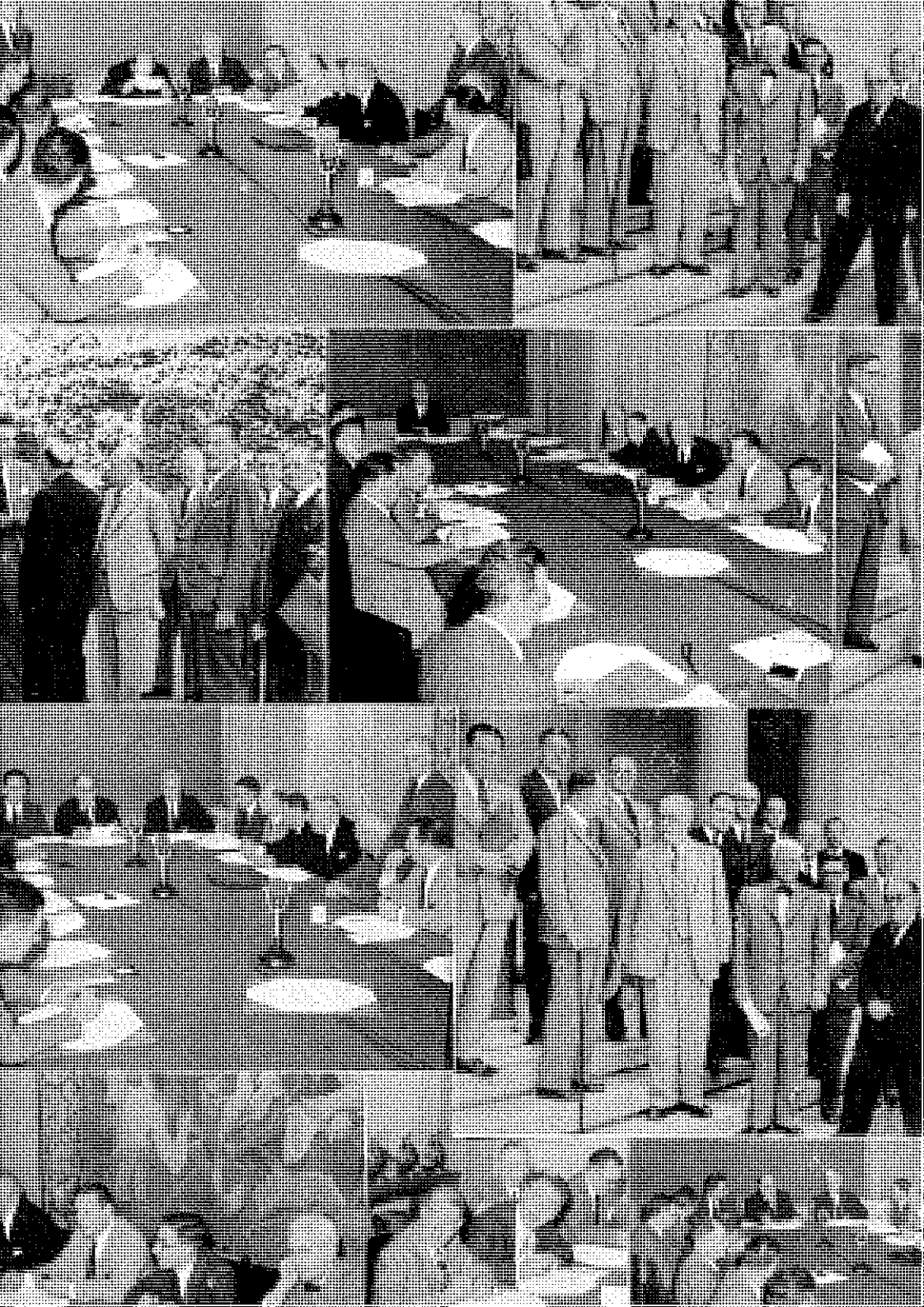
Les savants Participants purent faire des démonstrations microscopiques et des projections, grâce à l'obligeance de S. E. le Prof. DOMENICO MAROTTA, Directeur Général de l'Institut Supérieur de Santé en Italie, de M. le Prof. G. C. TRABACCHI, Chef du Laboratoire physique de cet Institut et du Dr. M. MARZIALI, technicien du même Institut, avec ses assistants, qui fournirent les appareils et s'occupèrent de leur mise au point et de leur fonctionnement.

La parfaite réussite de la « Semaine d'Étude » est prouvée avec évidence par le présent volume. Il restera dans l'histoire des recherches biologiques sur le cancer comme un souvenir cher aux savants illustres qui y prirent part et sera un témoignage des excellents résultats auxquels on peut aboutir par des réunions organisées sur le modèle de notre « Semaine d'Étude ». Il est le gage de l'heureux succès des « Semaines d'Étude » à-venir dont on prépare en ce moment le thème et l'organisation.

Il est de mon devoir, en mon nom comme en celui de tout le Corps Académique, de remercier tous ceux qui, à des titres divers et dans des proportions variables, collaborèrent à la bonne réussite de cette « Semaine d'Étude » et, surtout et avant tout, d'offrir un hommage public de reconnaissance au Souverain Pontife régnant, S.S. PIE XII, qui favorise même le culte des sciences, pour servir cette Vérité à la connaissance de laquelle il consacre son inlassable et lumineux labeur quotidien.

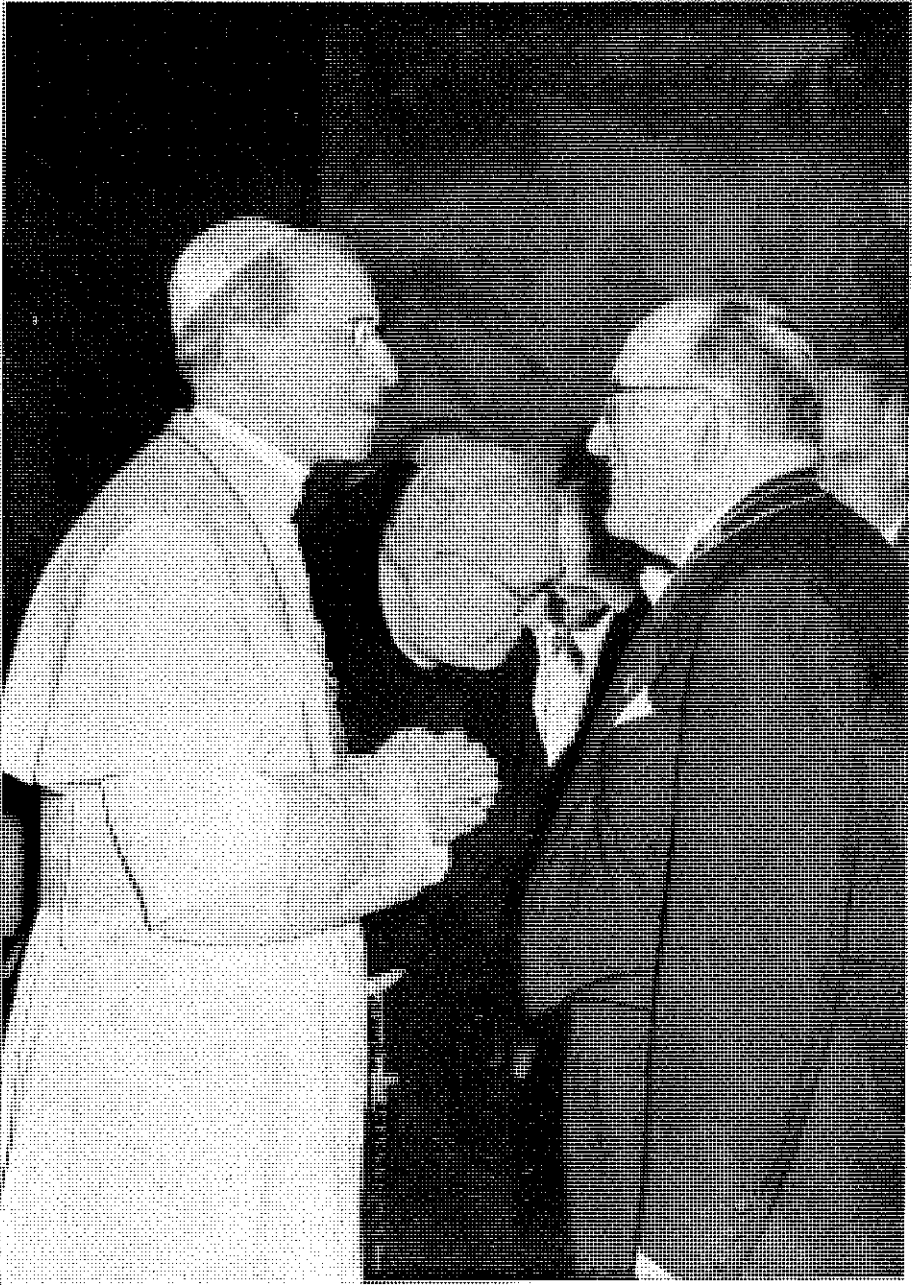
FR. AGOSTINO GEMELLI O. F. M. ; M. D.
PRÉSIDENT DE L'ACADÉMIE PONTIFICALE DES SCIENCES







L'AUDIENCE
ET LE DISCOURS DU SAINT-PÈRE



Le mardi 7 juin, à 9 h. 45, le Saint-Père PIE XII reçut en audience spéciale, dans la Salle du Consistoire, les savants illustres qui avaient été invités à prendre part à la « Semaine d'Etude » sur « Le problème biologique du cancer », à savoir MM. les Professeurs : I. BERENBLUM, E. BOYLAND, E. W. COWDRY, H. VON EULER, J. P. GREENSTEIN, J. KRETZ, A. LACASSAGNE, J. MAISIN, PH. PEACOCK, F. PENTIMALLI, l'Académicien Pontifical S. E. PIETRO RONDONI, L'Académicien Pontifical S. E. LEOPOLD RUZICKA, J. SANZ IBAÑEZ, H. R. SCHINZ. De nombreux Professeurs étaient accompagnés de leur famille.

Assistaient en outre à l'audience un nombre important d'Académiciens Pontificaux, savoir Leurs Excellences : le Rév.me Père AGOSTINO GEMELLI, O. F. M. Président, AMALDI, ARMELLINI, BOLDRINI, COLONNETTI, DE BLASI, FLEMING, CHIGI, GIORDANI, GOLA, LEPRI, LOMBARDI, PETRITSCH, PIERRANTONI, SEVERI, TONIOLO, VALLAURI et VERCELLI ; les Académiciens Suppléants Rév. PP. ALBAREDA O. S. B., GATTERER S. I. et STEIN S. I. ; le Chancelier de l'Académie M. le Dr. PIETRO SALVIUCCI. Assistait en outre le Prof. Nob. RICCARDO GALEAZZI-LISI, Directeur des Services Sanitaires de la Cité du Vatican.

L'Auguste Pontife, accueilli par l'hommage le plus déferent de tous les assistants, eut la bonté d'adresser à son auditoire distingué, en français, le discours suivant :

Si la surcharge des devoirs qui pèsent sur Nos épaules, tout particulièrement en ce temps-ci, Nous prive, cette fois, à Notre vif regret, éminents Académiciens et Professeurs, de la satisfaction de vous entretenir à loisir, Nous ne saurions pourtant pas résister au désir de vous souhaiter la bienvenue et de vous manifester l'intérêt très cordial que

Nous portons à vos travaux, Travaux de capitale importance par leur objet et sûrement fructueux, grâce à votre compétence hors ligne et aux méthodes de cette Académie.

Ils ont pour objet, cette année, le « problème biologique du cancer », horrible fléau, dont le nom seul épouvante, qui ravage incessamment une fraction notable de l'humanité, fléau redoutable, dont le traitement chirurgical ou radiologique ne fait, dans trop de cas, que retarder l'issue fatale.

Et, jusqu'au dénouement, quelles souffrances physiques, quelles angoisses morales ! Dans les formes internes, mystérieusement caché le cancer ne signale ordinairement sa présence que lorsque ses progrès l'ont déjà rendu à peu près incurable : petit à petit, il ronge silencieusement les organes vitaux et, rendant, dans plusieurs cas, difficile ou impossible toute absorption ou toute assimilation de la nourriture pour laquelle il cause d'ailleurs, souvent, une horreur insurmontable, il poursuit son oeuvre de destruction jusqu'à l'entière consommation.

Dans d'autres formes, ostensiblement, il dévore au grand jour les chairs de ses victimes, il les défigure, les mutilé de façon si affreuse, que ceux qui les approchent, mûs par la tendresse de leur affection ou par l'héroïsme de leur charité, s'ils parviennent à triompher de la répugnance naturelle qu'ils éprouvent, n'arrivent pas toujours à la dissimuler tellement que le malade ne la puisse deviner. Dans ce misérable état, l'isolement dont souffrent quelquefois ces infortunés, ils le recherchent pourtant et s'y confinent volontairement dans leur pudeur de se laisser voir tels qu'ils sont. Privés, par cet isolement même, de toute humaine consolation, leur tristesse va parfois jusqu'à la dernière extrémité du désespoir, jusqu'à la tentation de mettre fin à une vie que, seule, la ferme foi dans une autre vie d'éternelle félicité aide à tolérer avec patience.

Ce mal apparaît d'autant plus effroyable qu'on a devant lui, jusqu'à présent du moins, l'impression de se sentir désarmé, ou peu s'en faut. Quand, de temps à autre, on annonce imprudemment la nouvelle d'une découverte sensationnelle apportant enfin la victoire radicale et définitive sur l'impitoyable destructeur, on ne fait, hélas ! que ménager à ceux

qui s'y laissent prendre et qui ne demandent qu'à s'illusionner, une déception plus cruelle et plus profonde que tant d'autres qui l'ont précédée.

Combien plus modeste et, donc, combien plus haute et plus sûre est votre ambition, Messieurs ! En réalité, bien des hypothèses ont été tour à tour hasardées, bien des théories timidement échafaudées et discrètement proposées. Elles ne sont à déprécier, certes, car même non vérifiées, elles ouvrent la porte à de nouvelles recherches plus heureuses ; elles marquent donc quelque progrès, précieux sans doute mais forcément bien lent. Pour votre part, appliqués depuis de longues années à l'étude consciencieuse du cancer, de ses manifestations et symptômes, de sa nature, de ses causes, ou, du moins, de ses conditions d'origine et de développement, vous prétendez par là, chacun de vous dans sa propre spécialité, mais en permanente liaison entre vous, poursuivre, un pas après l'autre, votre marche en avant vers la lumière sous laquelle, plus facilement, vous cherchez et, plus heureusement, vous finirez par trouver d'abord le remède qui prévient ou qui soulage, avec l'espoir de préparer la conquête du remède qui guérit.

Les observations soigneusement faites, diligemment recueillies et comparées, même sans être concluantes, suggèrent cependant d'utiles réflexions sur la nature et l'action possible des divers agents carcinogènes, physiques, chimiques, organisés, sur le rôle de l'atmosphère, du sol, de la profession, de l'hérédité, dans l'apparition et la croissance du néoplasme, dans l'évolution de la cellule normale à la cellule maligne.

Ces observations, ces expériences, ces investigations, vous entendez les poursuivre assidûment dans un labeur patient, dont le grand public souvent ne se rend guère compte. Il ne vous attirera pas, peut-être, auprès de lui la popularité bruyante, mais vous mériterez, avec le témoignage de votre conscience, la reconnaissance des générations à venir.

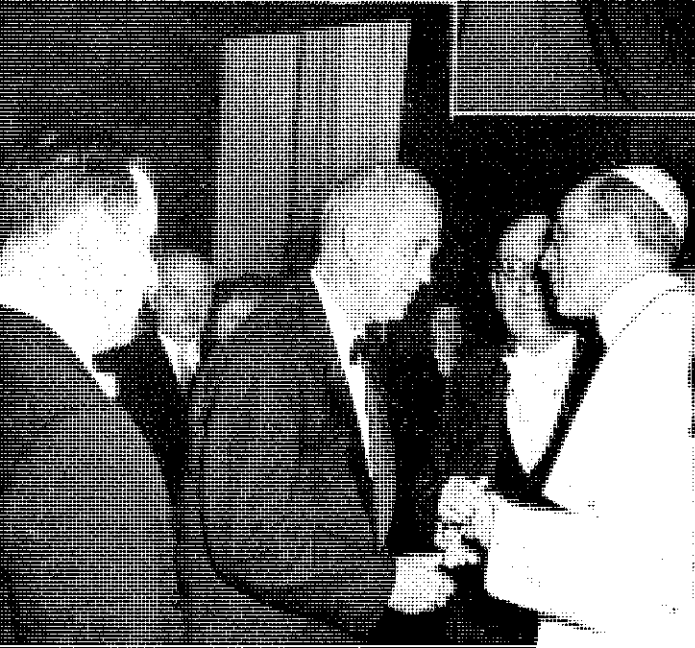
Il Nous plaît de louer ici l'initiative de Notre Académie Pontificale, sous les auspices de laquelle vous avez inauguré votre « Semaine d'Étude ». Toujours soucieuse de faire servir le progrès des sciences au plus grand bien de l'humanité, elle vous convie à préciser, suivant ses méthodes réglementaires, « les points sur lesquels un accord serait déjà réalisé, les points sur lesquels un accord n'aurait pas paru réalisable, les raisons

pour lesquelles l'accord n'aurait pu être réalisé, les suggestions relatives aux recherches paraissant les plus aptes à résoudre les difficultés ». On ne saurait, croyons-Nous, mieux exprimer votre propre esprit et vos propres intentions.

Voilà certes, illustres Maîtres, qui doit vous encourager à aborder, avec la confiance de ne pas les entreprendre en vain, vos travaux qui tendent, comme le dit avec une modeste assurance votre programme, « à ouvrir, sur une base scientifique, des perspectives vers une thérapeutique biologique des tumeurs malignes ».

Nous vous souhaitons, dans votre fraternelle collaboration, d'heureux et féconds résultats, appelant de tout Notre coeur sur vos travaux les lumières et les bénédictions de Dieu.

Après avoir donné la Bénédiction Apostolique, le Saint-Père admit au baiser de la main chacun des assistants, s'entretenant aimablement avec les savants de la « Semaine d'Étude » et avec les Académiciens et s'informant des travaux de chacun. Sa Sainteté laissait enfin la Salle après un nouvel hommage de reconnaissance et de filial attachement.



TRAVAUX SCIENTIFIQUES

THE BIOLOGICAL MECHANISM OF CARCINOGENESIS

PROF. I. BERENBLUM (OXFORD) *

In science, as in everyday life, it is easy to observe, but often difficult to interpret the meaning of the observation. When the pathologist speaks of « aetiology » and « pathogenesis », he is, in fact, emphasizing this distinction between *facts* and their *meanings*; between *the causes* of a disease and *the mechanism* whereby these causes produce the disease.

This is clearly exemplified in the field of cancer, in which the studies of experimental carcinogenesis have so far been more successful in providing information about the aetiology than about the pathogenesis of the disease. The little that is known about the pathogenesis of tumour-formation has been acquired by a variety of different approaches, including morphological studies of preneoplastic lesions, enzymatic comparisons between normal, preneoplastic, and neoplastic tissues, the correlation between the physical and chemical properties and metabolic behaviour of chemical agents and their carcinogenic propensities, and, finally, certain methods of experimental biology, whereby the functional sequences during the early stages of carcinogenesis can be analysed.

It is with the last-mentioned approach that I shall be mainly concerned in this brief review.

* Now, visiting Research Fellow at the National Cancer Institute, U. S. Public Health Service, Federal Security Agency, Bethesda Md., U.S.A.

The biological problem of the mechanism of carcinogenesis has as its basis the long-recognized fact that the appearance of a tumor is preceded by pathological changes. During this « latent period of carcinogenesis », lasting many years in the case of man, many weeks in the case of the mouse, important changes presumably take place in the affected tissue as an essential preliminary to the ultimate evolution of the tumour.

The discovery of chemical carcinogens, capable of inducing tumours in almost 100 per cent of mice when applied repeatedly to the skin or injected subcutaneously, laid the foundation for a scientific approach to the study of the changes leading up to the development of a tumour. By using large numbers of animals per experimental group, quantitative values may be obtained as measures of neoplastic response, namely, (1) the percentage tumour yield, and (2) the average latent period. A significant change in either of these values, following a modification of the experimental procedure, can be accepted as evidence of some influence having been exerted on the carcinogenic process.

The simplest procedure of modifying the carcinogenic effect is to combine the carcinogenic paintings with some added form of stimulation. Augmentation of carcinogenesis — or « cocarcinogenic effect » — has been obtained by the addition of scarification (DEELMAN, 1923), heat (DEROM, 1924; BANG, 1928), ultraviolet radiation (FINDLAY, 1928), mild freezing (BERENBLUM, 1929-*a*), certain (non-carcinogenic) basic fractions of tar (CABOT & al., 1940), and croton oil (BERENBLUM, 1941-*a*). Examples of inhibition — or « anticarcinogenic effect » — have also been observed, as for instance, with mustard gas and cantharidin (BERENBLUM, 1929-*b*, 1935), certain phenolic fractions of tar (SALL & al., 1940), and a number of chlorine-containing compounds (CRABTREE, 1940). However, by far the largest number of compounds tested proved to have neither cocarcinogenic nor anticarcinogenic properties (see review: BERENBLUM, 1944).

Where the added stimulation is itself carcinogenic, the resulting cocarcinogenic effect is hardly surprising, the result being merely an example of summated action. The most pronounced cocarcinogenic effect was observed, however, with croton oil, which

is itself devoid of carcinogenic action. The results (BERENBLUM, 1941-a) were briefly as follows: A 0.5 per cent solution of croton oil in acetone applied concurrently with a 1 per cent solution of benzpyrene gave no significant augmentation of carcinogenesis (presumably because the carcinogen was already acting near its optimum efficiency). But when the benzpyrene was diluted to the point where it was no longer active by itself (0.05 per cent), addition of croton oil raised the tumour incidence from 0 to 37 per cent, while addition of croton resin (the active component of croton oil) raised the incidence from 0 to 80 per cent. Yet, as already stated, croton oil or croton resin alone were found to be devoid of carcinogenic action.

Croton oil, in the concentration used, elicits a skin response closely similar to that observed in the pre-wart stage of carcinogenic painting. It seemed plausible to suppose that treatment of the skin with croton oil alone for some 20 weeks prior to the commencement of carcinogenic painting, should provide the preliminary phases of carcinogenesis (epidermal hyperplasia, etc.), enabling the carcinogen to produce its tumours more quickly, i.e. the average latent period should be reduced, or the curve (see fig. 1) moved forward. *When tested, this was not found to occur!* (BERENBLUM, 1941-b). Thus, despite the similarity between the changes produced by croton oil and the early changes produced by a carcinogen, *as judged by morphological criteria*, croton oil was incapable of replacing the early *biological effects* of a carcinogen.

However, when the experiment was reversed, the croton oil treatment being instituted *after* a limited period of carcinogenic painting (see fig. 2), there was a marked augmentation of tumour incidence, from 18 to 86 per cent.

Since croton oil could act as a substitute for a carcinogen for the late stages of carcinogenesis (i.e. for the precipitation of a tumour at a site « prepared » by treatment with a carcinogen), but could not institute the preliminary, or preparatory phase of carcinogenesis, the conclusion seemed inevitable that the mechanisms of the early and late stages of carcinogenesis must be different.

A similar conclusion was reached by Rous and his associates (ROUS & KIDD, 1941; MACKENZIE & ROUS, 1941; FRIEDEWALD

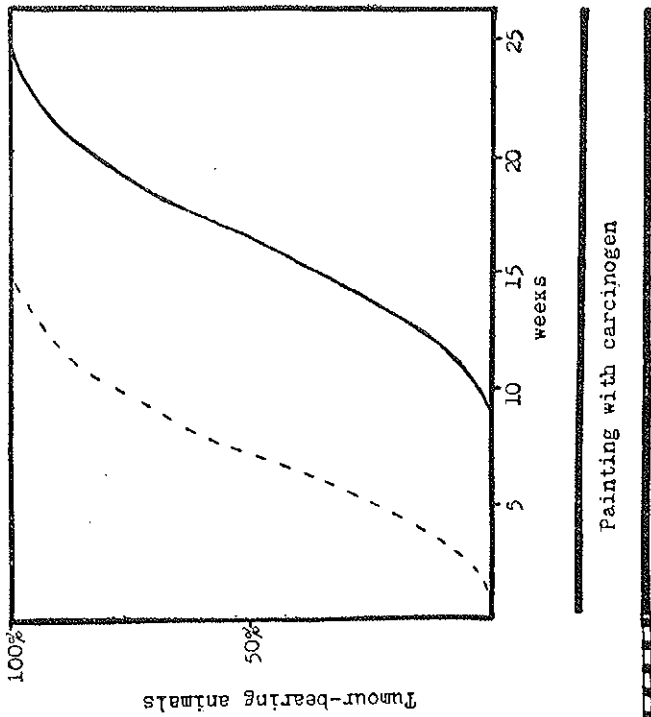


FIG. I.

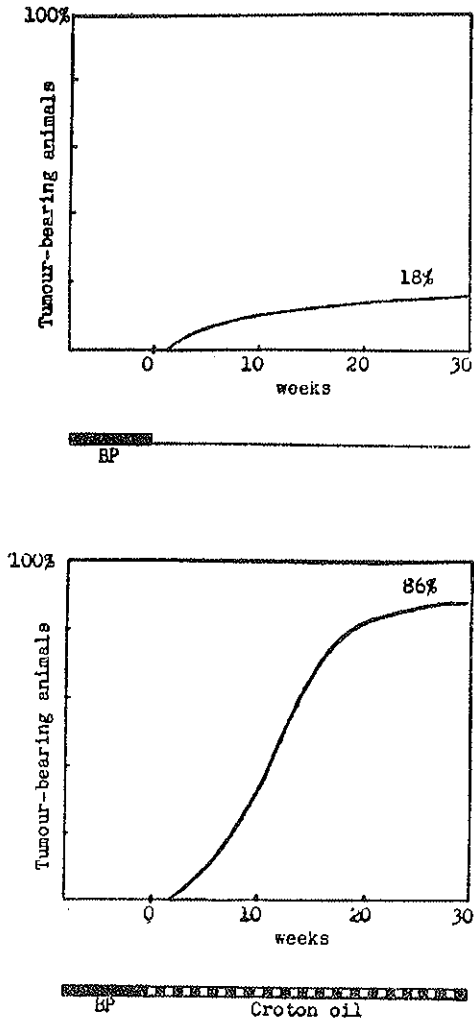


FIG. 2.

& Rous, 1944), from a study of the disappearance, and reappearance, of papillomas of the skin in rabbits. By causing the tumours that had regressed to reappear by a variety of non-carcinogenic stimuli, they concluded that tumour cells could persist in a latent

state, thus indicating that two distinct processes were involved in carcinogenesis: an *Initiating process*, responsible for the original transformation of normal into « latent tumour cells », and a *Promoting process*, responsible for their conversion into visible growths.

Further evidence in favour of the « two-stage mechanism » of carcinogenesis was afforded by TANNENBAUM (1944), using caloric restriction of the diet as a method of analysis, and by RUSCH (1944), using ultraviolet radiation and croton oil; while more recently, HALL (1948), in an extension of the work of BIELSCHOWSKY (1944), was able to demonstrate a similar mechanism in the induction of thyroid tumours, using acetylaminofluorene as Initiating agent, and goiterogenic substances as Promoting agents.

An important refinement in the technique for demonstrating the Promoting action of croton oil was introduced by MOTTRAM (1944), who showed that the effect could be elicited even after a *single* application of a carcinogen. (MOTTRAM also claimed that a further increase in tumour yield could be obtained by applying the croton oil *before* as well as *after* the single painting with the carcinogen, but this was not confirmed by BERENBLUM & SHUBIK, (1947-*a*) when larger numbers of animals were used). The value of the refinement of the technique, introduced by MOTTRAM, lay in the fact that the method now lent itself to more accurate, quantitative procedures.

If the Initiating action represents the conversion of a few normal cells into « latent tumour cells », while the Promoting action constitutes the conversion of the latter into visible tumours, then certain deductions seemed permissible, at least as a basis for further experiment: (1) The *potential number of tumours* that can be made to appear by the Promoting action must be predetermined by the Initiating action (i.e. the height of the tumour-incidence curve must be a measure of Initiating action); (2) the *speed* with which the tumours appear must be determined by the efficacy of the Promoting agent (i.e. the distance of the tumour-incidence curve along the time axis must be a measure of Promoting action); (3) by changing the potency of the carcinogen (single painting), but keeping the croton oil treatment constant, the heights of the curves should vary accordingly, but the average latent periods should remain the same (see fig. 3); (4) assuming that the « latent tumour cells » indeed remained

latent indefinitely, then, by delaying the commencement of croton oil treatment, the curves should be correspondingly delayed, the heights remaining constant (see fig. 4).

These expectations were verified by the following experiments (BERENBLUM & SHUBIK, 1947-*b*; 1949): Groups of mice painted once with different carcinogens, and then painted twice weekly with croton oil, yielded different percentages of tumours, the latent periods however remaining the same. In another experiment, the different

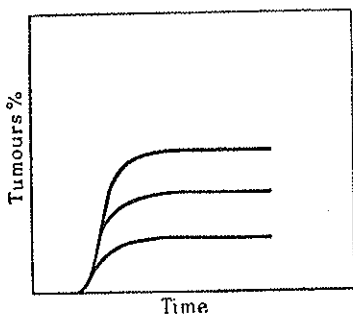


FIG. 3.

Type of curves anticipated in the 'Model Experiment' when different carcinogens are used for the single, initial painting.

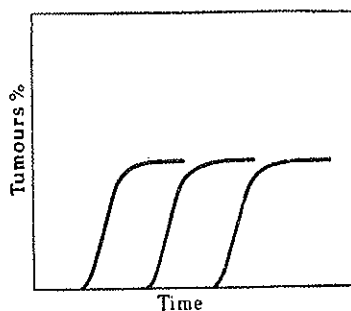


FIG. 4.

Type of curves anticipated in the 'Model Experiment' when the carcinogen is kept constant, but the croton oil treatment is delayed for different periods.

groups were painted with one and the same carcinogen, but in different concentrations, and then repeatedly with croton oil. Once again, there was found corresponding variations in tumour yield, with no significant difference in latent period (BERENBLUM & SHUBIK, 1949). Finally, when the croton oil treatment was delayed for 5, 10, 15, and 20 weeks, respectively, after the single painting of a carcinogen, the latent periods were correspondingly delayed, *but the total tumour incidence remained approximately the same in all.*

From the evidence available, it would seem that the Initiating process differs in its mechanism of action from the promoting process in being *more rapid in action* (since a single application of the carcinogen is sufficient to produce the effect), and *irreversible in its effect* (since the anticipated number of tumours can be elicited, by

subsequent promoting action, even after so long an interval as 20 weeks). (In a more recent experiment by BERENBLUM and SHUBIK, the effect was elicited even after an interval of 43 weeks.)

The rapidity of action of the Initiating process raises the possibility that it might be of the nature of a mutation. The weakness of the Somatic Cell Mutation Theory of Cancer, as originally propounded, was that a mutation is, by definition, an immediate reaction, whereas the development of cancer is one of the slowest biological phenomena. This objection disappears in the light of the « two-stage mechanism » of carcinogenesis, since it would now be necessary to postulate that only the Initiating process was mutational.

The possibility was submitted to experimentation by subjecting mice to a single painting of the skin with mustard gas, followed by repeated applications of croton oil. (BERENBLUM & SHUBIK, 1949). Mustard gas is known to be a potent mutating agent (AUERBACH & ROBSON, 1946), and should, therefore, be capable of acting as an Initiating agent if the Somatic Cell Mutation Theory of cancer were correct. The result, however, was negative.

Thus the only available direct evidence does not support this theory. Moreover, there is accumulating indirect evidence in the literature of a conflicting nature (see BERENBLUM & SHUBIK, 1949) which calls for caution in the acceptance of the validity of the theory. It should also be borne in mind that there are many examples in biology of irreversible changes that are nonmutational in character, and there is no reason to suppose that neoplasia may not be yet another example of this kind.

The nature of promoting action is still obscure. A plausible explanation would be that promoting action is simply growth stimulation, which acts by encouraging the « latent tumour cells », induced by Initiating action, to multiply. However, this explanation is neither borne out by experiment, nor by theoretical considerations.

SHUBIK (1950) has tested a large number of substances for promoting action. These were tested in concentrations capable of inducing vigorous epidermal hyperplasia. Yet none of them were effective as a promoting agent.

For the theoretical arguments, it is necessary to examine the fundamental distinction between hyperplasia and neoplasia.

Normally, in a tissue such as skin epidermis, the thickness, or the number of layers of cells, remains constant by virtue of the fact that the number of new cells produced in the germinal zone is balanced by the number that die at the surface. This may be expressed by saying that when the « stem cells » in the germinal zone divide, half the progeny remain as stem cells and the other half are destined to mature and die (WEISS, 1939). Increasing the rate of division of the stem cells causes a piling up of maturing cells (hyperplasia), but since these are destined to die, a new equilibrium is reached. Thus, provided the rule is maintained that half the progeny of stem cells remain as stem cells and the other half mature and die, increased rate of division, however great, must inevitably lead in time to a new equilibrium. From this, it is evident that increased mitotic rate *per se* can only produce hyperplasia, never neoplasia. For neoplasia to develop, it is essential that the ratio between stem cells and maturing cells be permanently disturbed in favour of the stem cells.

The difficulty arises in explaining the « two-stage mechanism » of carcinogenesis against this background. If the Initiating process were responsible for the disturbance in the ratio, as would seem likely at first sight, then it is difficult to understand what the function of the Promoting process could be, since once the disturbance in ratio is established, the normal mitotic activity should be sufficient to produce a growing tumour. Conversely, if the Promoting process were responsible for the disturbance in ratio, then it is difficult to explain the function of the Initiating process.

Here is a problem calling for further study. The « two stage mechanism » of carcinogenesis is but the beginning of our understanding of the pathogenesis of tumours. As in so many other branches of science, it has opened up as many new problems as it has solved.

REFERENCES

- AUERBACH C. and ROBSON J. M., 1946, *Nature*, 157: 302.
- BANG F., 1928, *Bull. du Cancer*, 17: 669.
- BERENBLUM I., 1929 *a*, *Brit. J. Exp. Path.*, 10: 179.
- BERENBLUM I., 1929-*b*, *J. Path. & Bact.*, 32: 425.
- BERENBLUM I., 1935, *J. Path. & Bact.*, 40: 549.
- BERENBLUM I., 1941-*a*, *Cancer Research*, 1: 44.
- BERENBLUM I., 1941-*b*, *Cancer Research*, 1: 807.
- BERENBLUM I., 1944, *Arch Path.*, 38: 233.
- BERENBLUM I. and SHUBIK P., 1947-*a*, *Brit. J. Cancer*, 1: 379.
- BERENBLUM I. and SHUBIK P., 1947-*b*, *Brit. J. Cancer*, 1: 383.
- BERENBLUM I. and SHUBIK P., 1949, *Brit. J. Cancer*, 3: 109.
- BIELSCHOWSKY F., 1944, *Brit. J. Exp. Path.*, 25: 90.
- CABOT S., SHEAR N., SHEAR M. J. and PERRAULT A., 1940. *Am. J. Path.*, 16: 301.
- CRATREE H. G., 1940, *J. Path. & Bact.*, 51: 303.
- DEELMAN H. T., 1923, *Bull. du Cancer*, 12: 24.
- DEROM E., 1924, *Bull. du Cancer*, 13: 422.
- FINDLAY G. M., 1928, *Lancet*, 215: 1070.
- FRIEDEWALD W. F. and ROUS P., 1944, *J. Exp. Med.*, 80: 101 & 127.
- HALL W. H., 1948, *Brit. J. Cancer*, 2: 273.
- MACKENZIE I. and ROUS P., 1941, *J. Exp. Med.*, 73: 391.
- MOTTRAM J. C., 1944, *J. Path. & Bact.*, 56: 181 & 391.
- ROUS P. and KIDD J. G., 1941, *J. Exp. Med.*, 73: 365.
- RUSCH H. P., 1944, *Physiol. Rev.*, 24: 177.
- SALL E. D., SHEAR M. J., LEITER J. and PERRAULT A., 1940, *J. Nat. Cancer Inst.*, 1: 45.
- SHUBIK P., 1950, *Cancer Research*, 10: 13.
- TANNENBAUM A., 1944, *Cancer Research*, 4: 673 & 678.
- WEISS P., 1939, « *Principles of Development* » Henry Holt & Co. New York.

SUMMARY

After the discovery of experimental carcinogenesis in animals, it became possible to analyse the process from many different angles, e.g. the relation of chemical structure of carcinogens to potency; the morphological changes during the latent period; species and tissue specificity and genetic factors in response to carcinogenesis; chemical and enzymic pattern of the tissues during the transformation; and the biological mechanism of carcinogenesis.

The last-mentioned (biological) approach began with the study of the influence of added irritation to carcinogenesis (cf. DEELMAN'S work), and led to the discovery of anticarcinogenic and cocarcinogenic effects, and later, to the distinction of separate and independent processes in carcinogenesis.

It is attempted here to review the literature of the whole field, with a more detailed discussion of the « croton oil » experiments by myself and Dr. SHUBIK and by MOTTRAM, RUSCH, & al.; also the studies by ROUS and his associates on similar investigations in rabbits; and to include some recent works, as yet unpublished.

Finally, some consideration is given to the implications arising from this work, and from the conception of « latent tumor cells »; and the significance of these findings in our new ideas on the subject of tumor aetiology and pathogenesis.

R É S U M É

Les études de la cancérisation expérimentale nous ont permis d'analyser le processus dans ses différents points de vue, c'est-à-dire: relation entre structure chimique et puissance des agents cancérogènes; alterations morphologiques pendant la phase de latence; spécificité zoologique et

tissural et facteurs génétiques en réponse à la cancérisation; constitution chimique et enzymatique des tissus pendant la transformation; et mécanisme biologique de la cancérisation.

On a commencé l'étude du mécanisme biologique avec des observations sur l'influence produite par des stimulations différentes ajoutés à l'agent cancérigène (v. trav. de DEELMAN), ce qui a conduit à la découverte des effets anticancérigènes et cocancérigènes et, enfin, à la distinction entre processus différents et indépendants dans la cancérisation.

On fait une revue de la littérature du sujet, avec une exposition plus détaillée sur les expérimentations avec « huile de croton » que j'ai réalisées en collaboration avec Dr. SHUBIK, et par MOTTRAM, RUSCH, etc.; sur les travaux de ROUS et collaborateurs qui ont conduit des études analogues chez les lapins. On considère aussi des récents travaux qui n'ont pas encore été publiés.

Enfin, on discutera brièvement sur les problèmes qui concernent ces recherches, en partant aussi de la conception de « cellules tumorales latentes »; et sur la signification de ces résultats en relation à nos récentes opinions sur l'étiologie et pathogénèse des tumeurs.

ZUSAMMENFASSUNG

Bezüglich des Vorganges der Krebsentstehung durch kanzerogene Stoffe sind von Wichtigkeit: Die Beziehung zwischen chemischer Struktur und Kanzerogenität, die morphologischen Veränderungen im Gewebe während des Latenzstadiums, die Eigenarten der Tierart, des Gewebes und der Erbfaktoren in ihrer Beziehung zur Karzinogenese, chemische Struktur und Fermentgehalt der Gewebe während der Umbildung von Normalgewebe zum Krebsgewebe, sowie der biologische Vorgang der Krebsentstehung.

Es wurden die biologischen Vorgänge mit Beobachtungen über den Einfluss bestimmter Stimulantien, welche der kanzerogenen Substanz beigegeben wurden, untersucht und man konnte antikanzerogene und co-kanzerogene Veränderungen zwischen Vorgängen, die von der Kanzerisation völlig unabhängig sind, unterscheiden. Es wurden Versuche mit Krotonöl ausgeführt, welches imstande ist, obwohl es selbst nicht kanze-

rogen ist, die Krebsrate durch kanzerogene Stoffe zu erhöhen. Der Begriff der « latenten Tumorzelle » wurde vom gegenwärtigen Standpunkt über die Aetiologie und Pathogenese der Tumoren näher untersucht.

S O M M A R I O

In seguito alla scoperta della cancerogenesi sperimentale negli animali, è stato possibile analizzare il processo dai più diversi punti di vista, e cioè: relazione tra struttura chimica e potenza dei cancerogeni; alterazioni morfologiche durante il periodo di latenza; specificità zoologica e di tessuto e fattori genetici in risposta alla cancerogenesi; aspetto chimico ed enzimatico dei tessuti durante la trasformazione; e meccanismo biologico della cancerogenesi.

L'ultimo di questi (meccanismo biologico) ebbe inizio con lo studio dell'influenza dell'irritazione aggiunta alla cancerogenesi (v. lavoro di DEELMAN) e condusse alla scoperta di effetti anticancerogeni e cocancerogeni e, infine, alla distinzione di processi separati e indipendenti nella cancerogenesi.

Si fa una rivista della letteratura di tutto l'argomento con una esposizione più dettagliata degli esperimenti con « olio di croton » condotti dall'A. in collaborazione coi Dott. SHUBIK, MOTTRAM, RUSCH ed altri; si riferirà anche sugli studi di ROUS e collaboratori, che hanno condotto ricerche analoghe in conigli; e su alcuni recenti lavori non ancora pubblicati.

Infine, si discuteranno brevemente i problemi che possono sorgere da queste ricerche e dal concetto di « cellule tumorali latenti »; e si tratterà del significato di questi risultati in relazione alle moderne opinioni sulla eziologia e patogenesi tumorale.

DISCUSSION:

SANZ IBÁÑEZ pregunta a BERENBLUM que tipo de reacción celular provoca el « croton-oil » con el Benzopyren.

BERENBLUM answers: Croton oil produces hyperplasia of the epidermis, similar to that produced by a carcinogen.

BOYLAND: 1. What is the chemical nature of the cocarcinogen of croton oil? Is cholesterol a cocarcinogen?

2. The common designation of carcinogenic activity is really a designation of cocarcinogenic activity. Methylcholanthrene is considered more active than dibenzanthracene but it only produces tumours more rapidly, it does not produce more tumours. A rapidly acting carcinogen like methylcholanthrene has both initiating and promoting activity.

3. The action of a cocarcinogen in reducing the latent period of carcinogenesis is perhaps analogous that of substances which abolish the latent period of growth of microorganism. Such substances are necessary for growth when few cells are present but are not essential when many cells are growing. Another possible mode of action is that the croton oil may induce a blood supply in the treated tissue.

4. KOLLER and I have injected rats bearing tumours with croton oil and found no specific chromosome damage which was produced by a treatment with carcinogenic hydrocarbon 1:2:5:6 dibenzanthracene.

5. The carcinogenic action of tissue extracts may be due to the promoting action of cholesterol which reveals the initial carcinogenic change which might occur spontaneously or by the irritant action of the injection.

BERENBLUM answers: 1. Croton oil has been separated into a resin fraction and the oily residue. The resin was found to be biologically active.

2. It is preferable to restrict the term « cocarcinogenic » to conditions where the action is on the cells treated by the carcinogen and to call other augmenting effects (e.g. solvent effects) « procarcinogenic ».

COWDRY asks whether the difference in response of susceptible and non susceptible species to the same carcinogen may not be due to difference in relationship established between said carcinogen and the cells rather than to differences in susceptibilities of said cells. It does not necessarily mean that carcinogen itself behaves differently in respect to cells equally exposed.

COWDRY asks: Why is there always a considerable latent period?

BERENBLUM answers: I doubt if we can answer this question at present. The promoting effect is undoubtedly a slow process, and it may be that malignant transformation involves yet a third independent process.

GREENSTEIN: BERENBLUM's illustration of promoting action of croton oil as specific action of benzpyrene in skin cancer reminds one of milk factor-estrogen relation in the development of breast cancers in susceptible mice in whom inciter is introduced at an early age and sensitizes the mammary tissue to subsequent specific action of estrogen which in this case acts as a carcinogen.

BERENBLUM answers: I agree that there is an interesting resemblance between the separate stages of skin carcinogenesis and the « milk factor » — oestrogen mechanism in the development of breast cancer in mice. By this analogy, however, it is likely that the « milk factor » is the Initiator and oestrone is the Promotor.

LACASSAGNE demande au Dr. BERENBLUM de lui confirmer que la notion de cocarcinogène ne s'applique pas exclusivement à des agents chimiques, mai également mécaniques et physiques. Dans ces

conditions, il pose la question si dans d'anciennes expériences de LACASSAGNE et VINCENT (confirmés par BURROW et MAYNEORD), aboutissant à la production de sarcomes, chez le lapin, par une irradiation unique par rayons X à faible dose portant sur une région atteinte d'inflammation (microbienne et même aseptique), on peut considérer qu'il s'agit d'une action cocancérigène entre processus infectieux et radiation?

BERENBLUM answers: In your experiments (LACASSAGNE et VINCENT), presumably the X rays acted as initiator, and the inflammation as promotor; but we cannot be sure.

MAISIN: 1. Avez vous étudié l'influence de l'alimentation sur l'action cocancérigène de l'huile de croton?

2. Vos expériences sur la cocarcinogène se permettent elles d'infirmier ou d'affirmer la vraisemblance d'une mutation dans la genèse du cancer par les hydrocarbures?

BERENBLUM answers: 1. TANNENBAUM has studied the influence of diet on the stages of carcinogenesis.

2. Only the initiating stage could be a mutation, because its effect persist indefinitely, while the promoting effect is slow in action.

PEACOCK: I think it is important to distinguish between the percentage of tumours following carcinogen plus cocarinogen and the proportion of papillomata that remained apparently benign and those that become malignant. In my experience the croton oil painted mice produce many papillomata but few of them become malignant.

PEACOCK: The experiments in which delay between painting with carcinogen and painting with croton oil did not reduce the influence in promoting carcinogenesis are very interesting for this reason:

1. Croton oil is irritating and mice will not lick their skin after its application and in earlier experiments in which croton oil was applied soon after the carcinogen and frequently afterwards they probably did not remove the carcinogen as effectively as the controls.

2. The latency of tumour cells is well known in human cancer where metastases may appear after many years of latency. There is nothing unlikely in the conception that a potential cancer cell should remain latent for a long time.

3. Have you used X rays as local carcinogen followed by croton oil regularly for months? I have used a single dose which caused greying of the hair followed by croton oil and have not seen any tumours develop up to 9 months.

BERENBLUM answers: I agree that it is important to take into account the influence of the mice licking the agents.

The significance of latent tumour cells in human cancer is undoubtedly of great importance and may have a practical significance in the « precipitation » of tumours by physical injury.

Your explanation of the failure of a single dose of X-ray to act as « initiator » is a very interesting one.

PENTIMALLI asks whether B. has worked with a pure genetic line of mice.

BERENBLUM answers: Two strains were used in England (one pure and one stock strain) and five strains were used in America in my work.

PENTIMALLI: If the co-carcinogenetic action may be defined as an increase in the production of a tumour, resulting from a direct and local effect on a tissue, then the first demonstration of a co-carcinogenetic action is given by a simple experiment, published by me in 1916.

I found that if you injure any tissue of a chicken by means of a thermo-cautery, say, for instance, the breast muscle, and you then inoculate the agent of sarcoma, after a few days, into the circulatory flow, you obtain a elective localisation of the agent, i.e. exclusively in the one spot that is injured. It is in fact in this one spot alone, that the tumour develops. To use an expression of

BERENBLUM'S it is a case of a phenomenon of « precipitation » of a tumour in a predetermined spot.

At that time, I interpreted the development of tumour under these conditions, as due to a *determining* factor (agent of sarcoma, separable from the cell), which acts on a cell that is disposed to render its action effective; the cell can therefore be considered as a *realising factor* of the determining action. These terms used by me are analogous to those of WILHELM ROUX'S in his fundamental studies on the mechanic of development.

In the analysis of similar phenomena which was done much later in experimental carcinogenesis of the epidermis through various substances, there is a mention of a *pre-carcinogenic action*, (BERENBLUM) of a *sensitizing factor* (MOTTRAM), of an *initiating process* (ROUS), all of which expressions serve to indicate the more or less precocious hyperplasia, which is more or less specific of the employed substance that precedes the appearance of the epidermic warts. The subsequent development (appearance of warts first, and progressive growth of same after) is looked upon by BERENBLUM as an *epicarcinogenic action*, by MOTTRAM as a *developing factor*, and by ROUS as a *promoting process*.

My aim in taking part in this debate is to state, in recalling my experiments of 1916, that the phenomenon which I described at the time is in direct connection with the phenomena later observed in the study of experimental cancerogenesis in the epidermis of mammals. First of all there lies at the base of both phenomena a process of cellular multiplication, which is more prevalent in my experiment, for it deals with an injury to the breast muscle caused by thermo cautery which produces a process of cellular de-differentiation followed by the proliferation of a reparative nature. At this phase the cell is sensitive to the action of the agent, i.e. it realises its action.

Also the study of cancerogenesis in the epidermis of rat has revealed that the cellular hyperplasia constitutes the pre-neoplastic condition.

At whatever moment of the experiment you provoke it — be it before, contemporaneously or after the action of the carcinogen — the hyperplasia, that arises owing to the action of the irritant, is the

necessary and indispensable fact for the development of a tumour. Consequently it is perfectly justified to admit that both in the case of chicken sarcoma as in the case of mice epithelioma, it is always a phenomenon of cellular multiplication that lies at the base of the process.

Continuing the comparison between these two kinds of experimental appearance of a tumour, we note that the introduction of the agent (which is separable from the cell in the chicken) by means of the circulatory flow, immediately provokes development of a tumour in the spot where tissues are in proliferation.

In the experiment on rats the action of the carcinogenic substance is enough to produce the hyperplasia first, as well as the development of tumour afterwards, and if there be any substance with a co-carcinogenic action, they are but irritants of a relatively non specific nature. If you experiment on chicken with carcinogenic substances (benzopyrene, metylcolantrene) this will also reveal the production of a tumour, which means that in the chicken, as well as in the rat, these substances represent stimuli for the tissues, that are not specific of tumour, but are, up to a certain degree, specific of that type of chronic irritation, with prevalent phenomena of hyperplasia, which is more than all others, capable of locally producing the agent of malignity. In the experiment I made, the agent which I introduced through circulation into the injured spot, only had the effect of supplying the tissue with the ready agent, which immediately causes the development of tumour. Thus, in the case of chicken, you need only supply the tissue immediately with the agent of malignity, whereas in the mouse, the cellular elements in proliferation only produce it as in answer to an irritation that is only specific to a certain degree, as in the case of carcinogen.

The fact that in the first case the agent may be separable from the cell, and not so in the second case, does not seem to fundamentally be able to shake the order of ideas. The cancer problem cannot be separated from the one of its development and determinant, i.e. from the causative analysis of the differentiation process, which, in superior animals, is inseparable from the process of multiplication. Now, as the « phenomena of induction » are of a chemical nature, since inductive action is separable from the vital elements that

produce it, thus can the cancerization phenomena be equally so. And if the agent be separable from the cell in chicken, so can it likewise be separable from the cells in mammals, as SHOPE has demonstrated by his papilloma and its successive transformation into cancer. The fact that such demonstration has not succeeded yet in the case of other tumours, can only be due to the deficiency of our present experimental possibilities.

BERENBLUM answers: I do not think that the localization of a virus should be called cocarcinogenic. It is perhaps a procarcinogenic effect.

RONDONI asks: What is the opinion of Prof. BERENBLUM on the ideas developed by ORR?

BERENBLUM answers: ORR found evidence to suggest that the appearance of skin papillomas, in experimental carcinogenesis, can be encouraged by local ischaemia, artificially induced by vasoconstrictors or by the insertion of sutures subcutaneously. A reinvestigation of the problem, with particular reference to the two separate stages of carcinogenesis, has recently been undertaken by a colleague in my laboratory. The results so far are conflicting, and an attempt to confirm ORR's results has not been entirely successful. One must, therefore, await a further, and more extensive reinvestigation of the « Orr effect ».

RONDONI would mention experiments with pyocyanine (1938-1939) which on being painted on the skin of mice (alcohol-solution) alternatively with benzpyrene, produced an increase in the carcinogenic action of the hydrocarbon (earlier appearance of warts, greater number of malignant growths). Experiments with CORBELINI on the carcinogenic action of dibenzacridines showed an enhancing function of skin burns. May be consider here real cases of cocarcinogenesis.

BERENBLUM answers: Your results with Pyocyanin and also with heat, could certainly correspond to « cocarcinogenic effects ».

RUZICKA: It is possible that the English croton oil contained some unknown catalyst accelerating the polymerisation of the croton oil and the polymer so produced was responsible for the higher activity of the English croton oil compared with the American oil.

H. R. SCHINZ: 1. Wenn ich zuerst Krotonöl anwende und dann Benzpyrene und viceversa, ist der Effekt der gleiche?

Wenn ja, so sind beide Stoffe cancerogen. Wenn der erste Versuch negativ ausfällt, wirkt nur als Promotor oder Initiator.

2. Wie wirken zwei sicher carcinogene Stoffe gleichzeitig oder hintereinander zusammen?

3. Ich persönlich glaube, dass der Krebs keine Entität sondern eine Pluralität ist. Man darf Resultate mit cancerogenen Kohlenwasserstoffen nicht einfach als allgemeingültig erklären. Beim Lungenkrebs der Maus, der mendelt, oder beim Viruskrebs kann pathogenetisch eine ganz andere Situation vorliegen. Was meint Herr Dr. BERENBLUM?

BERENBLUM answers: Yes, I agree naturally that croton oil is *not* itself a carcinogen, but a sort of « Realisator ».

I would be inclined to guess that, when we know much more, we shall find a *single underlying* cause of cancer, not a multiplicity.

v. EULER asks: 1. whether the polymerisation of the croton oil has been taken into consideration.

2. whether anything is known concerning the stability of croton oil in the body.

3. in connection with cholesterol, was cholesterolbutyrat studied, which is regarded by several authors (s. CHRISTIANI a. o.) as inhibitor.

BERENBLUM answers: 1. The fractionation of croton oil was done by differential partition between petroleum ether and 90% methanol.

2. Cholesterol butyrate has never been tested for cocarcinogenic action.

ADAPTATIONS CELLULAIRES, MODULATIONS ET MUTATIONS DANS LEURS RAPPORTS AVEC L'ENVIRONNEMENT ET LE CANCER EXPERIMENTAL

PROF. J. MAISIN, (LOUVAIN)

Au cours de ces dernières années, une série d'observations dans le domaine de la génétique expérimentale ont attiré l'attention des cancérologues. Il a été montré en effet que les agents cancérogènes les plus actifs tels que les substances cancérogènes, les rayons X, les rayons ultra-violetes sont des agents mutogénétiques. Tout récemment il a été montré (BOYLAND et HORNING) qu'un des meilleurs agents chimiques capables de provoquer des mutations, l'Ypérite, était cancérogène pour la souris en injection sous cutanée. Ces agents provoquent soit des mutations somatiques soit des mutations germinales suivant les conditions expérimentales. C'est ainsi qu'un nombre de plus en plus important de chercheurs ont été amenés à penser que le cancer expérimental pourrait être considéré comme un phénomène homologue d'une mutation somatique.

Ayant fait cette hypothèse, même si elle est prouvée exacte on n'a fait que déplacer la difficulté car on connaît encore bien peu de choses au sujet du mécanisme des mutations. Nous voudrions, au cours de cet article, discuter cette question au point de vue théorique et présenter quelques arguments expérimentaux qui pourraient aider pensons-nous à la compréhension du mécanisme de cancérisation.

I. ^a

Le fonctionnement d'un organisme déterminé doit être considéré comme le résultat d'une série d'interactions à caractères biochimiques essentiellement sous la dépendance première du

système génien caractérisant cet organisme. Si l'on admet avec les généticiens classiques que les gènes sont des entités morphologiques de structure essentiellement protéique voire nucléoprotéique, on se voit obligé d'admettre qu'un des premiers résultats du fonctionnement du Système génien consiste en la reproduction d'entités semblables à lui même. De telles entités ne peuvent être reproduites qu'en admettant qu'un gène est capable, aux dépens de son milieu, de synthétiser des composés chimiques, identiques ou très voisins de lui-même. Il va de soi que cette synthèse sera plus ou moins facile ou normale suivant la composition de ce milieu.

On doit admettre que le milieu « endocellulaire » où baignent les gènes doit avoir une influence primordiale. Toutefois la qualité de celui-ci ne peut être que fonction de l'activité génienne elle même et du milieu extérieur dans lequel la cellule baigne, milieu extérieur fournissant au milieu endocellulaire les éléments nécessaires à ses biosynthèses tout en prenant soin des déchets cataboliques.

Il est logique de penser que les gènes qui font partie de la matière vivante quelle que soit leur nature, contrôlent plus ou moins directement le fonctionnement de celle-ci qui est, on le sait avec certitude, de caractère essentiellement enzymatique. Ils doivent donc agir eux-même comme des enzymes ou contrôler le fonctionnement des enzymes. En fait, il a été établi par divers travaux (WINGE et LAUSTSEN, GOLDSCHMIDT, BEADLE et TATUM) que diverses réactions biochimiques comme la fermentation de certains sucres par des levures, la production de pigments dans les plantes sont spécifiquement sous le contrôle de gènes spécifiques. De plus (BEADLE et collaborateurs) il y a des raisons de croire que spécificité enzymatique et spécificité génienne sont des actions semblables ou en tout cas des spécificités de même ordre. Des recherches récentes de BEADLE et TATUM entr'autres montrent comment on peut concevoir que des gènes contrôlent le développement et les fonctions cellulaires ces auteurs ayant montré notamment qu'un seul gène contrôlait la synthèse de la vitamine B₁ chez certaines souches de *Neurospora*.

Si les gènes contrôlent les actions enzymatiques comme cela paraît bien démontré et que d'autre part beaucoup d'actions enzymatiques se passent dans le protoplasme on peut évidemment se demander comment ce contrôle s'effectue et partant quelle est la

localisation des gènes dans la cellule; on peut même se demander si cette situation est un endroit stable et immuable. Que le protoplasme soit indispensable à la reproduction et au fonctionnement génien, nous en avons, pensons-nous, la preuve dans le fait qu'il n'existe pas à notre connaissance de noyaux « nus », débarrassés de tout protoplasme, qui soient capables de reproduction ou de fonctionnement. Par contre des protoplasmes dépourvus de noyaux, comme les globules rouges des mammifères, peuvent parfaitement fonctionner sans noyaux sans toutefois se reproduire. L'autoreproduction d'un organite complexe comme un noyau a donc besoin pour s'effectuer de la présence fonctionnelle d'un cytoplasme. Sans cytoplasme pas de reproduction possible du noyau et sans noyau pas de reproduction possible du cytoplasme. Les deux parties d'une cellule vivante semblent indispensables l'une à l'autre pour effectuer la fonction de reproduction. On peut en déduire que dans le cytoplasme doivent exister des entités essentielles porteuses de certains caractères fonctionnels qui leur sont propres et qui sont homologues des caractères fonctionnels portés par les gènes du noyau et notamment la possibilité d'autosynthèse dans certaines conditions. On arrive ainsi par pur raisonnement à admettre l'existence d'organites protoplasmiques homologues de gènes qui seraient comme les gènes nucléaires des complexes enzymatiques capables d'autoreproduction. Ces complexes sont, comme nous venons de le dire, indispensables à la manifestation des potentialités géniennes nucléaires. Par ailleurs il est obvie qu'au moment des premières divisions cellulaires d'un être plurinucléé un grand nombre, en fait la plupart des réactions enzymatiques dont cet être est potentiellement capable ne sont pas déjà exprimées. Elles s'expriment plus tard surtout au cours des différenciations et seront alors essentiellement caractérisées par l'apparition de fonctions cytoplasmiques. Celles-ci existaient indubitablement en potentiel dans la cellule sous forme de « proenzymes ». Il est même logique d'admettre, étant donné le rôle indispensable joué par le protoplasme dans la vie nucléaire que ces proenzymes existaient dans le protoplasme. Comment deviennent-ils fonctionnels? Il semble qu'ici la question de milieu joue un rôle important. Supposons un instant qu'une telle fonction en potentiel existant dans un proenzyme con-

siste dans la fermentation d'un sucre déterminé. Comment cette fonction en potentiel pourrait-elle se révéler sans entrer en contact avec un tel sucre? Par ailleurs on peut se demander si le simple contact du proenzyme avec le sucre déclenche automatiquement la fermentation de celui-ci. Certaines expériences « d'adaptation » semblent bien montrer que non. Le mécanisme est plus complexe. Dans sa mise en branle il est bien possible que les gènes nucléaires jouent un rôle important. Ceux-ci agissant sur le proenzyme cytoplasmique mis en présence du substrat adéquat transformeraient ce proenzyme en un enzyme fonctionnel. A partir de ce moment, d'après Ch. LINDEGREEN et SPIEGELMAN, ce proenzyme devenu enzyme serait, en présence de son substrat, capable d'autoreproduction et de fonctionnement indépendant, n'ayant plus désormais besoin de l'appoint fonctionnel du gène nucléaire ou chromogène. Il est désormais lui-même devenu un gène protoplasmique un cytogène. Cette fois encore si l'on admet l'intervention des chromogènes et il semble bien que les faits nous conduisent à l'admettre, la question de location de ces chromogènes et de leur mode d'action reste entière. On pourrait supposer mais ce n'est que pure hypothèse, qu'ils peuvent migrer pour entrer en contact et réagir sur le procytogène ou tout au moins que certains inducteurs émanant d'eux, peuvent migrer par diffusion dans le milieu cellulaire, pour aller effectuer les fonctions qui leur sont imparties.

Les fonctions cellulaires et notamment celles du protoplasme dépendent donc, d'après cette conception, de l'interaction de plusieurs facteurs parmi lesquels il faut citer les chromogènes, les procytogènes et le substrat. On comprend dès lors qu'une modification génienne ne doive pas toujours se traduire immédiatement par un changement fonctionnel déterminé, celui-ci dépendant non seulement du chromogène ou du procytogène mais aussi du milieu. En d'autres termes on comprend ainsi qu'il puisse exister des mutations en potentiel. Les observations de AUERBACH, ROBSON et CARR sur les *Drosophila melanogaster*, donts les mâles avaient été traités au gaz moutarde, ont permis d'observer parmi les descendants un nombre important de « mosaïques »: 30 à 50%. Or parmi les femelles présentant un ovaire « mosaïque » il a été noté qu'un certain nombre

de leurs descendants où la mutation ne s'était pas exprimée, étaient porteuses d'ovaires en « mosaïque » pour la même mutation. Dans ce cas une « instabilité spécifique » a été transmise d'une génération à l'autre avant de s'exprimer sous la forme de modification stable. On se trouve ainsi en présence de gènes instables ou métastables porteurs d'une mutation en potentiel, celle-ci n'allant s'exprimer que lorsque les conditions de milieu sont favorables à cette expression.

Les recherches récentes de génétique ont fait penser que les vraies mutations géniques seraient la conséquence de réarrangements extrêmement délicats survenus au niveau de chromosomes si délicats et si minuscules que les méthodes cytologiques les plus fines ne peuvent les détecter. Les mutations à caractère léthal sont souvent la conséquence de fragmentation de chromosomes avec translocations consécutives.

D'un autre côté il a été montré par AUERBACH et ROBSON que certaines plantes du genre Brassica produisent des substances, telle l'isothiocyanate d'allyle, qui sont des agents chimiques capables d'induire des mutations au même titre que les Ypérites bien qu'à un moindre degré. Si des mutations ne surviennent pas chez ces plantes c'est du fait qu'elles sont capables de se défendre contre de tels agents à l'aide peut-être d'agents ou de facteurs antimutogénétiques.

Considérées sous cet angle les mutations apparaissent alors comme le résultat de l'interaction de fonctions chimiques de tendances opposées où le milieu doit certes jouer un rôle non négligeable.

On connaît à l'heure actuelle de nombreux agents physiques et chimiques capables d'induire des mutations et on a toujours considéré la mutation comme une résultante fatale un tout ou rien de l'action de ces agents. AUERBACH, ROBSON et CARR en montrant l'existence de mutations en potentiel nous forcent à reviser nos conceptions sur ce sujet. Eux-mêmes disent, que si l'on n'a jamais observé de mutations en potentiel suite à l'action des rayons X et des ultra-violets c'est que l'énergie libérée par l'absorption de ces radiations, au point d'impact du photon déterminant la mutation, est trop considérable et partant trop brutale. Le résultat est encore une fois tout ou rien. Nous verrons plus loin dans cet article qu'il a été

possible, chez de êtres monocellulaires tout au moins, de déterminer par des ultra-violets employés dans certaines conditions de telles mutations en potentiel.

II. - MODULATIONS, MUTATIONS ET ENVIRONNEMENT CHEZ LA LEVURE.

Nous avons pensé que des êtres monocellulaires comme les levures, chez qui on peut au gré de la volonté modifier profondément les conditions de milieu où ils vivent, seraient un matériel favorable pour l'étude de certains de ces phénomènes d'adaptation, de mutations en potentiel de mutations vraies.

Il existe dans la littérature de très belles observations sur l'influence mutogénétique des rayons X, des rayonnements du radium et du polonium, des rayons ultra-violets, des gaz moutarde, sur certaines levures, sur le neurospora et diverses variétés de microbes (G. NADSON et G. PHILIPPOV, 1925; A. LACASSAGNE, W. SCHOEN et P. BÉRAUD (1939), BEADLE et TATUM (1945), HOLLAENDER, SANSOME, ZIMMER et DEMEREC (1945), HOLLWECK et LACASSAGNE (1930). Considérant ces observations comme classiques nous ne les commenterons pas ici.

Dès 1937 à la suite des études d'une de nos collaboratrices Y. POURBAIX sur l'influence des substances cancérigènes sur le métabolisme des hydrates de carbone dans les organes survivants des mammifères, nous avons songé à étudier cette influence chez la levure du groupe *Saccharomyces Cerevisiae* et plus tard chez les *Saccharomyces Ellipsoïdus*.

Les premières études de Y. POURBAIX dans notre laboratoire ont porté sur une levure commerciale de boulangerie mais de race pure appartenant au genre *Saccharomices Cerevisiae* (1938-39) et sur une levure de laboratoire de souche absolument pure la levure de WILDIERS (1938). Ces recherches, faites sur les levures maintenues au contact d'un corps cancérigène hydrosoluble le styryl 430, ont consisté surtout dans des observations concernant la modification du métabolisme du glucose chez de telles levures. Il faut s'en reporter aux publications originales pour se rendre compte de l'importance du travail effectué à cette époque et qui avait amené Y. POURBAIX

à conclure que les modifications évidentes observées alors dans le métabolisme des hydrates de carbone chez ces levures semblaient devoir provenir d'une inhibition par le styryl 430 de la phosphorylation en général et de la phosphorylation de la B₁ en particulier. Au cours de ces expériences nous avons pu noter, par l'examen microscopique, la présence dans la levure de grains rouges dus peut être à l'absorption de styryl 430.

Au cours de la guerre dès que nous avons pu très modestement reprendre nos travaux expérimentaux, nous avons prié deux de nos collaborateurs Y. POURBAIX et notre collègue J. DECLERCK (1942) de continuer ces recherches sur la levure dans le but bien défini de rechercher si les modifications observées par Y. POURBAIX en 1937-1938 avaient un caractère transmissible en ce sens qu'on puisse les retrouver dans les sous cultures des souches ayant été en contact prolongé avec le styryl 430.

La levure utilisée pour ces expériences a été une souche de levure pure de brasserie de fermentation haute, *Saccharomices Cerevisiae*, cataloguée au laboratoire de Zymotechnie de l'Université de Louvain sous le titre de « levure anglaise ». Les expériences ont été faites sur un milieu liquide recommandé par BÉRAUD pour l'étude des radio-races et dont la composition est la suivante:

Saccharose	100 gr.
Peptone Merck	7,5 »
Phosphate Monopotassique	3 »
Sulfate de magnésium	2 »
Eau distillée g. s. p.	1 litre

milieu stérilisé à l'autoclave: 1 atmosphère pendant 20 minutes.

La technique employée pour la mise en contact de la levure avec le styryl a été la suivante: dans un tube contenant 10 cc. d'une solution de styryl 430 à 1/10.000 on verse le culot d'une culture de *Saccharomices Cerevisiae* sur moût non houblonné âge de 17 jours. On agite cette suspension 2 minutes. On prélève à la pipette 4 cc. de cette suspension à l'aide de laquelle onensemence un tube contenant 25 cc. du milieu saccharose-peptone de BÉRAUD. On ense-

mence en même temps sur même milieu une même quantité de culture témoin n'ayant pas été en contact avec le styryl. Après 4 jours, cultures styryl comme cultures témoins, sont en pleine fermentation. Ces levures S-T constituent la première génération de nos expériences. Un cc de cette première génération est prélevée pour réensemencement. C'est la génération n. 2. Dans les mêmes conditions on obtient la génération n. 3, et ainsi de suite. A partir de la 7^{me}. génération les 2 types de levure s'étant parfaitement adaptées à ce milieu synthétique on procède au réensemencement à l'aide de l'anse de platine. A partir du 4^{me}. jour même dans ces conditions, le développement est complet. On réensemence tous le 4 jours. On a ainsi étudié le comportement de ces souches jusqu'à la 18^{me}. génération. Au cours des premières générations sur milieu synthétique, la souche témoin T respirait peu, mais dès la 3^{me}. génération, s'étant adaptée au milieu, elle respirait normalement. La levure Styryl (S) par contre respire plus faiblement que la témoin et cette différence permanente se stabilise au cours des générations successives. Voici un tableau résumant les résultats d'une de ces expériences:

Génération	Age de la culture	Q O ₂ (1)		Q $\begin{cases} \text{O}_2 \text{ (2)} \\ \text{CO}_2 \end{cases}$		Rapport $\frac{Q \begin{cases} \text{O}_2 \\ \text{CO}_2 \end{cases}}{Q \text{ O}_2}$		Croissance (3)	
		Levure témoin	Levure Styryl.	Levure témoin	Levure Styryl	Levure témoin	Levure Styryl	Levure témoin	Levure Styryl
1 ^{ère}	11	- 3,3	- 1,8	+ 16,2	+ 59	4	32	38,8	14,8
2 ^{me}	14	- 7,5	- 2,5	+ 26	+ 50,6	3,4	20,2	51,6	44,7
3 ^{me}	12	- 10,7	- 3,6	+ 35	+ 38,3	3,2	10,6	33,0	58,5
4 ^{me}	5	- 9,3	- 3,4	+ 61,7	+ 64,4	6,6	18,9	11,8	47,1
10 ^{me}	9	- 8,3	- 1,8	+ 53	+ 88,8	6,3	49	28,5	35,4

(1) Q O₂: représente le nombre de mmc d'oxygène absorbé en 1 h. par la quantité de levure correspondant à 1 mgr. de matière sèche.

(2) Q: représente le nombre de mmc de CO₂ dégagé 1 h. en présence d'oxygène par 1 mgr. de matière sèche.

(3) Croissance: elle est représentée par le nombre de mgr. de matière sèche par culture.

La levure styryl comme on voit respire indubitablement moins que la levure témoin. Les différences sont telles et se maintiennent si nettement au cours des générations successives qu'on ne peut parler de cause d'erreur. A la 10^{me}. génération la respiration de la levure S est semblable à la respiration résiduelle d'une levure normale qui aurait été traitée par le cyanure de K. Ces modifications fonctionnelles se maintenant après un nombre important de générations doivent être liées à des altérations du patrimoine héréditaire et correspondre à une modulation, au sens WEISS (1939) et de MONOD (1947) ou à une mutation.

Il est intéressant de noter que ce type de modification fonctionnelle que nous venons de décrire n'est pas le seul qui puisse être obtenu sous l'action du styryl. Y. POURBAIX et J. DECLERCK ont obtenu, sous l'influence d'une action momentanée du styryl, une race de levure respirant plus et glycolysant moins que la race témoin. Cette race se comporte comme les radio-races de BÉRAUD et LACASSAGNE. Ces caractéristiques nouvelles se sont aussi montrées stables pendant 10 générations comme pour la race à respiration diminuée et à glycolyse augmentée. Encore une fois on paraît bien se trouver en présence d'un autre type de modulation ou de mutation.

Pour voir si les caractères nouvellement acquis étaient stables quel que soit le milieu de culture, la souche à glycolyse active et à respiration réduite S, a étéensemencée sur divers milieux. Y. POURBAIX, en effet avait montré dès 1939, qu'en présence de levure bouillie, de certains extraits de levure ou de nucléinate de soude l'effet styryl se trouvait neutralisé. Pour le nucléinate de soude toutefois cette neutralisation n'était possible que si le contact avec le styryl avait été de courte durée.

Les milieux utilisés pour étudier la stabilité des caractères acquis ont été les suivants:

- 1) le milieu saccharose-peptone de BÉRAUD décrit plus haut.
 - 2) le milieu additionné d'1 gr. au litre de nucléinate de soude
- MERCK.

3) le milieu de NIELSEN additonné de 5% de moût de malt. Ce milieu de NIELSEN a la composition suivante:

Mg. cl ₂	0,7 gr.
KH ₂ PO ₄	1,0 »
Na cl	0,5 »
Ca cl ₂	0,4 »
Fe cl ₃ à 1%	0,5 cc.
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,6 gr.
Saccharose	100 »
Moût de malt à 8%	50 cc.
Eau distillée q. s. p.	1 litre.

4) Un milieu au moût de malt.

Voici les résultats de ces expériences:

Race de levure	Milieu de culture	Génération sur le milieu	Age de la culture	Q O ₂
Styryl I	Saccharose-peptone nucléinate de soude	3	15 j.	- 3,1
Témoin	» » » »	3	15 j.	- 9,3
Styryl I	Saccharose-peptone	14	5 j.	- 2,1
Styryl I	Saccharose-peptone nucléinate de soude	6	5 j.	- 3,2
Styryl I	Saccharose-peptone	18	12 j.	- 3,4
Témoin I	Saccharose-peptone	18	12 j.	- 9,6
Styryl I	Nielsen + 5% moût	2	12 j.	- 9,5
Témoin	Nielsen + 5% moût	2	12 j.	- 11,4
Styryl I	Moût	1	13 j.	- 11,1
Témoin	Moût	1	13 j.	- 9,1

Ces résultats sont très clairs: même après 18 repiquages sur milieu saccharose-peptone la levure S. I conserve parfaitement ses caractères acquis. Sur ce milieu elle est stable. Après 3 générations

sur ce milieu additionné de nucléiate de soude à 1/100 elle conserve aussi ses caractères. Par contre après 2 générations sur milieu de NIELSEN enrichi de 5% de mout de malt elle perd ses caractères acquis: sa respiration est égale à celle de la souche originale. Après une seule génération sur mout de malt il en est de même.

Les caractères nouvellement acquis sont donc fonction du milieu. Ce phénomène intéressant vaut qu'on s'y arrête.

Au cours de nos recherches depuis 1937 jusque 1942, notre attention et celle de nos collaborateurs avait été centrée surtout sur les modifications biochimiques survenues dans le métabolisme des hydrates de carbone. Nous avons bien noté certains aspects morphologiques particuliers comme ceux figurés par Y. POURBAIX dans son travail de 1938 mais sans étudier le phénomène en détails.

En 1948-49, nous avons demandé à une de nos collaboratrices Th. CONSTANTIN de réétudier cette question des modulations et mutations des Saccharomices sous l'influence du styryl 430 et du 20 méthylcholanthrène. Elle s'attacha avant tout aux modifications morphologiques sans toutefois négliger le côté biochimique. Les constatations qu'elle a pu faire sont extrêmement intéressantes et seront publiées en détails dans un travail à paraître dans « La Cellule », elles ont été résumées dans deux notes parues ou à paraître à la Société de biologie (1949).

La souche utilisée par Th. CONSTANTIN est une souche de l'Institut Pasteur à Paris, la levure Springer variété de *Saccharomyces Cerevisiae*.

La technique utilisée a été soit la technique de Y. POURBAIX et J. DECLERCK sur milieu liquide, soit la technique sur milieu solide gélosé. Celui-ci avait la composition suivante:

Peptone	10 gr.
Glucose	20 »
Gélose	18 »
Eau distillée q. s. p.	1000 cc.

Le styryl a été ajouté à ce milieu à la dose de 10^{-4} . Ce mélange peut se faire d'une façon très homogène et le milieu est uniformément coloré.

Les cultures ont été faites à 23°. La souche de levure en expérience (Levure Springer) a été maintenue pendant 15 jours et 3 repi-

quages sur milieu au styryl. Après ce contact sur milieu ainsi coloré, l'examen au microscope (objectif 3) révéla une modification particulière dans un certain nombre de colonies: elles prenaient un aspect clair, transparent. Ces colonies claires furent alors repiquées sur milieu gélosé sans styryl, elles y ont conservé et elles conservent toujours à l'heure actuelle, après un an et un nombre considérable de repiquages sur ce même milieu, le même caractère (microphoto fig. 1) Examinées individuellement à un grossissement plus considérable ces cellules de levure présentent une série de modifications morphologiques curieuses comparativement à la souche point de départ. Les cellules ne sont plus ovoïdes mais sphériques, elles présentent une grande vacuole centrale. Non colorées elles se montrent plus claires, plus transparentes aux rayons lumineux, leur capsule est peu marquée, elles sont pauvres en graisses et pauvres en peroxydases (Dessin fig. 2 a et b). Alors que les témoins sporulent normalement, les levures S ne sporulent pas sur milieu de Gorodkova. Ensemencées sur milieu synthétique pauvre sans azote organique elles se développent mal au même pas du tout. On se trouve donc à nouveau, comme dans les expériences de Y. POURBAIX et J. DECLERCK devant une souche qui présente une série de caractères nouveaux, caractères morphologiques faciles à mettre en évidence et qui ne font que refléter évidemment de profondes modifications biochimiques. Au point de vue du métabolisme des hydrates de carbone elle présente des caractères très proches des souches S obtenues au cours de nos premières expériences par contact prolongé avec le styryl; elles respirent peu et glycolysent intensément en aérobiose. Au point de vue biochimique également elles synthétisent malaisément leurs acides aminés ou leurs protéines aux dépens d'azote inorganique puisqu'elles poussent mal sur des milieux renfermant uniquement ce type de composés azotés.

Ces caractères nouveaux sont stables comme pour les types S obtenus au cours des premières expériences à condition tout au moins que la souche soit entretenue sur des milieux synthétiques peu riches à base de glucose et de peptone. Ces caractères répétés ne se sont maintenus dans ces conditions et se maintiennent aujourd'hui encore après plus d'un an et un nombre de repiquages très considérable. Sur un tel milieu où la souche est bien adaptée elle se développe aussi rapidement ou même plus rapidement que la souche T point de départ.

Par contre si on porte cette levure sur le même milieu enrichi de moût de malt, elle perd ses caractères acquis et revient à la souche T du début dont elle réacquiert les caractéristiques morphologiques et biochimiques.

Comment faut-il appeler ces modifications morphologiques et biochimiques caractérisant la souche nouvelle S? Sommes-nous en présence d'une mutation ou d'une modulation?

Nous pensons qu'il est logique de considérer ces modifications comme résultant d'une modulation c'est-à-dire une altération ou même une perte de certains caractères fonctionnels comme la faculté de synthétiser certaines graisses ou certains acides aminés dans des conditions de milieu déterminées. Quand le milieu reste tel ces caractères nouveaux sont permanents; par contre quand le milieu change ils sont susceptibles de disparition.

Si nous admettons la manière de voir de LINDEGREEN et SPIEGELMAN au sujet des cytogènes et des chromogènes, nous dirions que la levure S présente une altération de ses cytogènes puisqu'ils sont désormais incapables de fonctionner normalement dans le milieu où ils se trouvent placés ou du moins de fonctionner comme les cytogènes de T, point de départ.

De telles altérations fonctionnelles, transmissibles indéfiniment dans certaines conditions de milieu sont elles primairement conditionnées par des altérations chromogéniques? On ne peut répondre avec certitude à une telle question. Classiquement nous avons été habitués à considérer les altérations chromogéniques transmissibles comme des altérations définitives, des mutations. Quand ces mutations intéressent des cellules somatiques, elle se transmettent à leurs cellules-filles seulement et ne sont pas transmissibles évidemment par les cellules sexuelles qui ne sont pas affectées, d'où le nom de mutation somatique qu'on a proposé de leur donner. Quand ces mutations chromogéniques frappent les cellules germinales et se transmettent aux cellules germinales filles, comme celles-ci sont appelées, par leur développement, à donner naissance à un être nouveau celui-ci est évidemment porteur des caractères nouveaux induits par mutation germinale et les caractères seront indéfiniment transmis aux descendants par l'intermédiaire de ces cellules germinales toujours porteuses de cette mutation. Dans le cas de la levure qui nous occupe les caractères acquis par la

souche S, transmissibles aux levures-filles pourraient être considérés comme une mutation somatique si ils étaient stables dans toutes les conditions de milieu. Or nous avons vu qu'il n'en était rien, qu'ils étaient fonction du milieu.

Précisément c'est cette instabilité ou si l'on veut cette stabilité fonction du milieu qui nous fait hésiter à qualifier de mutation somatique un tel genre d'acquisition de caractères nouveaux puisque toute modification chromogénienne à caractère héréditaire a toujours été considérée classiquement comme irréversible.

L'expérimentation de plus en plus poussée dans ce domaine nous met devant des faits que l'on range difficilement parmi les phénomènes connus et nous mène insensiblement à préciser tout en la limitant la signification de certains termes, à reviser la définition de certains autres, voire même à en créer de nouveaux.

Si classiquement une mutation chromogénienne est considérée comme un phénomène irréversible peut-être pourrions-nous distinguer entre mutations fatales inéluctables et mutations en potentiel. En effet si l'on admet, comme le proposent AUERBACH, ROBSON et CARR (1947), l'existence de mutations en potentiel résultant de la présence de certains gènes instables ne donnant lieu à une mutation que pour autant que l'équilibre soit rompu dans un certain sens, alors on pourrait comprendre que dans certaines conditions de milieu ces gènes instables plutôt que d'induire une mutation, induisent la production d'un individu normal. On pourrait aussi admettre que chez des organismes monocellulaires comme les levures, les conditions de milieu favorables ou défavorables à l'expression d'une mutation en potentiel soient plus faciles à réaliser que chez les insectes (*Drosophila melanogaster*) où de tels gènes ont été observés et étudiés.

C'est donc surtout pensons-nous une question de définition: mutation somatique ou modulation, les faits que nous venons d'exposer ne permettant pas de dire si ces modifications sont dues uniquement à des lésions des citogènes ou bien si les chromogènes sont également lésés mais d'une façon réversible. Si l'on admet avec WEISS et MONOD que toute lésion de ce type à caractère réversible est une modulation alors c'est ce terme que l'on doit employer pour caractériser cette levure S.

Quoiqu'il en soit les faits étant ce qu'ils sont nous sommes contraints d'admettre que l'on puisse produire, à l'aide du styryl 430, des modifications fonctionnelles et morphologiques à caractère transmissible dans des conditions déterminées de milieu. Au cours de l'exposé d'autres faits nouveaux qui va suivre, nous allons voir apparaître d'autres modifications fonctionnelles et morphologiques à caractère plus stable si pas irréversible qui nous conduiront à admettre que certains types de mutations, chez les levures tout au moins, sont des accidents qui surviennent en deux ou plusieurs temps. Quel que soit le nom de modulation ou de mutation somatique que l'on veuille donner aux changements qui caractérisent les levures S que nous avons décrits nous allons montrer qu'ils représentent le premier temps précédant une série d'autres modifications plus stables qui vont survenir éventuellement par la suite et, dont l'apparition tout au moins semble bien elle aussi, être fonction du milieu.

Voici les faits en question.

Si on laisse vieillir sur milieu solide glucose-peptone gélosé une culture S faiblement ensemencée et largement étalée sur boîte de Petri, au bout de deux à trois semaines ou plus, on peut voir survenir brusquement au sein des individus appartenant à une colonie isolée déterminée des individus présentant des caractères entièrement nouveaux? La première impression qu'un bactériologue de profession pourrait en avoir c'est qu'il s'agit d'une contamination. Il hésite toutefois à tirer cette conclusion du fait que le phénomène apparaît non point en margination des colonies mais au sein même de celles-ci. Qui plus est, malgré toutes les précautions d'aseptie qu'il puisse prendre, il voit le phénomène se reproduire systématiquement bien que d'une façon imprévisible. Etant donné que toutes les boîtes « contrôles » restent aseptiques il est bien obligé d'admettre que ces formes nouvelles proviennent d'une modification survenue au sein des éléments S de la colonie. Th. CONSTANTIN et nous-même avons vu apparaître ainsi une grande variété de formes nouvelles. Nous en décrivons quelques unes, celles qui ont été bien étudiées et individualisées par Th. CONSTANTIN. Une forme fréquente est la forme dite « filamenteuse ». Macroscopiquement elle donne sur milieu solide en boîte de Petri après une dizaine de jours, des colonies à filaments disposés ra-

diairement sorte de colonies chevelues en houppe (microphotos: figure 3 et figure 4). Quand on examine ces filaments au microscope (objectif 3; figures 5, 6 et figures 7, 8: dessins) on constate que chaque filament est constitué par une multitude de levures juxtaposées. Ces levures examinées à un grossissement considérable ($\times 600$) montrent des cellules (figure 9) s'allongeant longitudinalement donnant une forme étirée, filament microscopique bourgeonnant aux deux extrémités pour donner des éléments d'abord arrondis qui deviennent ensuite ovales, puis s'étirent en longueur. Ces éléments ont toujours le caractère « clair » des cellules originelles. Ils produisent généralement un pigment en abondance. Une des variétés isolées par Th. CONSTANTIN produisait un pigment ocre. Nous en avons isolées diverses sous variétés produisant des pigment allant du rose au noir en passant par le vert et l'ocre. Ces pigments sont colorables au Soudan III. Il s'agit vraisemblablement d'un chromolipéide. Cette coloration est plus marquée en milieu enrichi de glucose (100 gr. au litre) ou en glucose (50 gr. au litre) et en glycérine (50 gr. au litre). La richesse de l'atmosphère en oxygène hâte l'apparition de la coloration (Th. CONSTANTIN). Ces variétés filamenteuses sont particulièrement intéressantes au point de vue phylogénétique parce qu'elles marquent un retour vers les formes ancestrales filamenteuses des champignons. LANGERON et TALICE ont décrit des champignons levuriformes et dès 1904 GUILLIERMOND établissant la phylogénie des levures les reliait aux endomycetacées.

Mais ces formes filamenteuses sont loin d'être les seules à apparaître ainsi au niveau de cultures S vieillissant sur milieu glucose-peptone gélifié. Au moins 6 autres formes ont été isolées et individualisées par Th. CONSTANTIN et pour leur description détaillée nous renvoyons le lecteur à son mémoire qui paraîtra dans « la Cellule ». Certaines de ces formes non filamenteuses produisent en abondance un pigment rose ou rouge (mutant R), pigment probablement proche de celui produit par les formes filamenteuses. Elles secrètent une quantité abondante de mucus (fig. 10, dessin).

Un autre mutant, mutant Ba, est lui aussi intéressant à signaler parce qu'il se présente sous forme de batonnets (fig. 11, dessin) de longueur de 1 à 5 μ se multipliant par division comme les schizosaccharomyces ou les bactéries.

Les autres formes, figurées schématiquement dans le texte ou reproduites en microphotographie, possèdent des caractères particuliers, tels qu'une capsule plus ou moins épaisse, la propriété de former du mucus en plus ou moins grande abondance (voir mémoire Th. CONSTANTIN). (Fig. 12, 13, 14, 15).

Au point de vue de leurs propriétés biochimiques les mutants, d'une façon générale, ont une fermentation aérobie inférieure à celle de la levure Springer originelle.

Étant donné que ces mutants apparaissent au sein des cultures S vieillies il était intéressant d'étudier les conditions favorisant leur apparition. Certaines observations ont été faites qui méritent pensons-nous d'être signalées.

Ainsi l'ensemencement de cultures S sous une cloche remplie d'azote favorise l'apparition de formes filamenteuses. En effet, des cultures de même origine maintenues en atmosphère ordinaire ont montré après quelques jours de nombreuses colonies dites « incertaines » c'est-à-dire n'étant plus absolument semblables aux colonies S point de départ mais n'ayant pas un caractère filamenteux, les cultures en atmosphère d'azote ont à la même époque montré un nombre important de colonies filamenteuses sans que l'on puisse noter la présence de colonies incertaines. On peut donc supposer que les colonies incertaines de la culture en milieu oxygéné seraient devenues filamenteuses en atmosphère d'azote.

Il a également été noté que des milieux déséquilibrés par leur richesse en glucose ou en glycérine favorisent également l'apparition de mutants.

Un milieu synthétique liquide ne contenant pas d'N organique de formule suivante :

Glucose	20	gr.
Phosphate monopotassique	2	»
Sulfate d'ammoniaque.	2	»
Sulfate de magnésie	0,5	»
Eau distillée g. s. p. f.	1.000	cc.

constitue, comme nous l'avons déjà signalé, un mauvais milieu pour le développement de la forme S. Ensemencée dans ces conditions, ou bien elle ne se développe pas du tout ou bien un développement ap-

paraît très tardivement. Il s'agit très généralement d'un mutant qui est parvenu à s'adapter à ces conditions de milieu anormales pour la forme S.

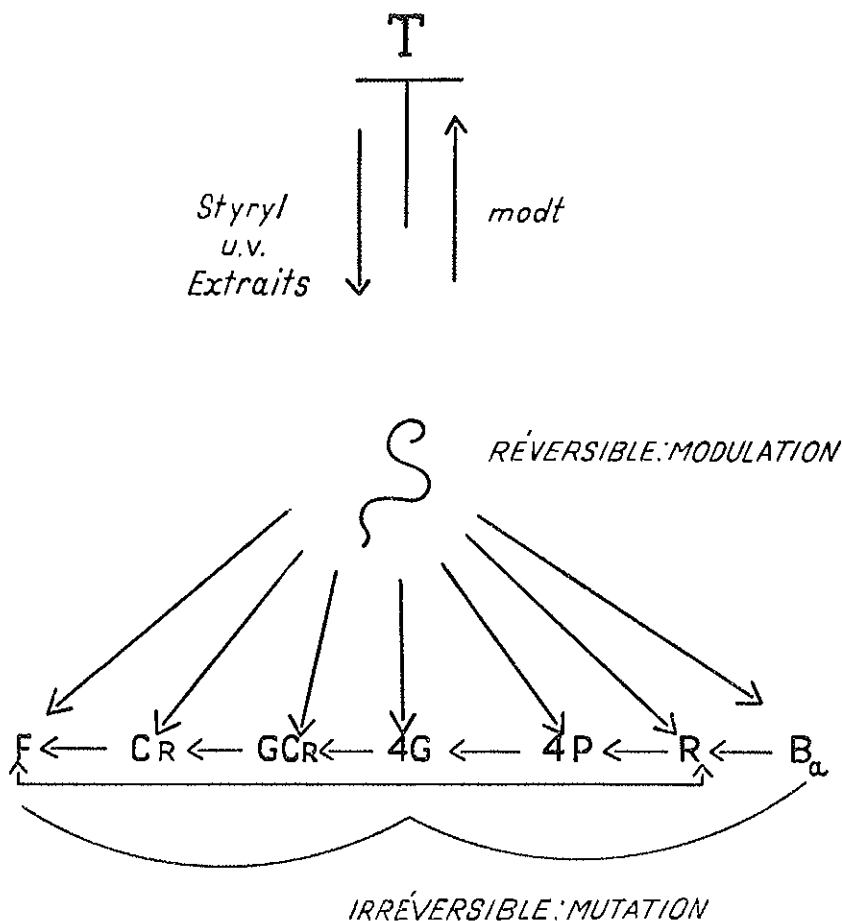
On peut se demander qu'elles conditions communes peuvent exister entre ces diverses conditions de milieu favorisant l'apparition de mutants. Il n'est pas aisé de répondre à une telle question. Toutefois on pourrait supposer qu'entre les milieux riches en glucose et en glycérine et les milieux anaérobiques, il existe certaines relations. On pourrait supposer en effet qu'en anaérobiose la forme S incapable de bruler normalement, le glucose du milieu enrichit celui-ci en glycérine, métabolite intermédiaire de la fermentation du glucose, mais ce n'est là qu'une hypothèse que nous n'avons pas vérifiée par dosage de la glycérine dans le milieu.

Un autre fait intéressant à signaler concernant les facteurs qui influencent l'apparition de mutants c'est l'influence inductrice d'une culture d'une souche déterminée sur une culture d'une autre souche qui l'avoisine quand onensemence une même boîte de Petri avec les deux souches. Qu'il nous suffise pour le moment de signaler le fait, nous y reviendrons plus loin.

Ces mutants nouveaux provenant de la forme S possèdent une stabilité remarquable quel que soit le milieu sur lequel on les entretient. Il est exceptionnel de voir une quelconque de ces formes de mutants se transformer en une autre forme. La forme filamenteuse est particulièrement stable. Une seule fois on a pu, en l'entretenant en milieu uniquement peptoné, la voir se transformer en forme R. Pratiquement parlant jusqu'ici nous n'avons jamais vu ces formes nouvelles revenir soit à la forme S ou à la forme T c'est-à-dire les formes point de départ. On se trouve donc en présence d'une toute autre variété de mutants que celle représentée par la forme S par rapport à la forme T; ils semblent avoir acquis une stabilité considérable quel que soit le milieu de culture sur lequel ils sont entretenus.

Si l'on considère l'irréversibilité comme un caractère essentiel d'une mutation vraie on peut dire que ces formes nouvelles sont la résultante d'une vraie mutation chromogénienne. Celle-ci aurait ainsi été réalisée en deux temps. Au cours du premier temps apparaît la forme S, forme instable, réversible pouvant sur milieu riche revenir vers la forme T normale. Au cours du deuxième temps, cette forme

S mise dans certaines conditions de milieu donne naissance à une série de formes désormais stables, irréversibles, des mutants vrais.



T = levure témoin.

S = levure ayant subi l'action du styryl: réversible suivant milieu.

F, CR, GCR, 4G, 4P, R, Ba = Diverses variétés stables de mutants.

Ce genre de mutations en deux temps avait déjà été observé par LEVAN (1947) et par SKOVSTED (1948) lors de leurs études sur l'action du camphre sur les levures. Ce phénomène est particulièrement intéressant parce que nous verrons plus loin qu'on retrouve des phéno-

mènes homologues en cancérologie expérimentale. Le tableau ci-joint résume bien l'ensemble des processus.

Le fait que ces mutations en deux temps ou mieux des mutations en plusieurs temps aient été observée par d'autres auteurs sur d'autres souches de levures indique que c'est un phénomène assez général qui ne dépend pas des singularités d'une souche donnée. TH. CONSTANTIN, dans nos laboratoires a d'ailleurs obtenu des formes S aux dépens de deux autres souches de levures, une levure sauvage le n. 108 de la collection de l'Institut de Brasserie et de Distillerie de Louvain et un *Sacharomyces Ellipsoïdus* provenant de la Collection de l'Institut Pasteur à Paris.

A l'occasion de ces transformations de T en S de ces deux souches Th. CONSTANTIN a pu montrer une fois de plus l'importance du milieu de culture sur les processus. Il lui a fallu trois mois et demi de contact avec le styryl pour obtenir des formes S aux dépens de la levure 108 entretenue précédemment sur moût de bière. La même levure entretenue pendant trois mois sur notre milieu habituel glucose-peptone sans être mise en contact avec le styryl, a subi l'influence de celui-ci après quinze jours de contact et a donné les colonies claires caractéristiques de la forme S. Elle a pu observer le même phénomène aux dépens de *Saccharomyces Ellipsoïdus* I. P. P. (fig. 16).

En milieu riche la levure semble donc être réfractaire à l'action du styryl, elle paraît pouvoir se protéger contre l'action du styryl. Quand on entretient la levure Springer sur milieu synthétique glucose-peptone, milieu pauvre bien que contenant de l'azote organique, on voit, après un certain temps, apparaître au sein des colonies des cellules d'un aspect clair semblable aux cellules S. Ces cellules sont toujours en très petit nombre et dominées par les cellules du type normal T de ce fait l'on ne voit pas apparaître de colonies composées exclusivement d'éléments clairs. Nous savons qu'en plaçant des levures T sur milieu gelose-peptone en contact de styryl le nombre de ces éléments augmente dans des proportions considérables et l'on voit apparaître de nombreuses colonies claires du type S qui finalement subsistent à l'état pur. D'autres substances ajoutées au milieu de culture tel le camphre par exemple sont capables d'in-

duire des mutations. Nous avons rappelé au début de ce travail que divers auteurs à l'aide de radiations (LACASSAGNE et ses collaborateurs, BEADLE et TATUM ainsi que d'autres) étaient parvenus à des résultats semblables à l'aide de diverses radiations (rayons ultra-violet, rayons X, rayons α). Les mutations obtenues par ces auteurs étaient stables. Nous avons également rappelé les travaux de AUERBACH, ROBSON et CARR (1947) qui à l'aide du gaz moutarde chez les *Drosophila Melanogaster* obtiennent des formes instables c'est-à-dire des gènes portant en eux la potentialité de mutation sans que cette mutation doive nécessairement s'exprimer au cours de la première génération. Ces auteurs pensent que de tels gènes instables sont des gènes faiblement lésés par l'action du gaz moutarde. Ils pensent qu'ils n'ont jamais été signalés après l'action des radiations de courte longueur d'ondes parce que l'action de celles-ci, due à la libération d'énergie provenant de l'absorption d'un quantum de ces radiations au niveau du gène atteint, est trop brutale et mène à la destruction du gène plutôt qu'à une simple modification de fonction ou une modification de fonction en potentiel. Toutefois TH. CONSTANTIN a pu, à l'aide de radiations ultra-violettes émises par une lampe à vapeurs de mercure mais employée à très faible dose, obtenir des formes S aux dépens d'une culture normale. La dose ainsi administrée en se servant pour le calcul de la méthode de dosage proposée par LATARGET (1944) a été de 1303 ergs par mm² (65 minutes d'irradiation, 10 mètres de distance de la source). Des formes potentiellement instables et potentiellement capables de mutations stables comme la forme S peuvent donc également être obtenues par des agents physiques (fig. 17).

Nous avons vu qu'on pouvait également en obtenir en mettant en concurrence vitale sur un même milieu de culture les formes S et T ou encore la forme T et d'autres mutants stables.

On est en droit de se demander, étant donné le grand nombre d'agents pouvant donner naissance à des formes de levure potentiellement capables de muter comme la forme S, si ces agents ne facilitent pas tous la production, chez la levure soumise à leur action, de certaines substances particulières, sortes de métabolites de la levure qui eux seraient les agents mutogénétiques spécifiques. Leur

production en plus ou moins grande quantité suivant l'intensité d'action de l'agent lésionnel et suivant le milieu, mènerait ou à la production de gènes instables ou à la production d'une mutation vraie.

A ce propos nous devons rappeler ici que AUERBACH et ROBSON en 1944 ont montré que l'isothiocyanate d'allyl, produit naturel extrait de plantes du genre Brassica, a une action mutogénétique faible mais certaine. Il est évident que de telles substances sont produites en plus ou moins grande quantité suivant les conditions de milieu. Si de telles substances existent dans la nature comme produit d'un métabolisme normal d'un être vivant il n'est pas illogique de supposer que des substances homologues puissent être produites par d'autres êtres vivants dans certaines circonstances en quantité plus ou moins grande. TH. CONSTANTIN est parvenue, en employant la méthode utilisée par J. BEUMER pour extraire la substance antibiotique du Bacille de Lisbonne, à extraire des cultures S et F une substance qui répandue sur le milieu de culture gélosé avant l'ensemencement d'une culture T fait apparaître dans cette culture T des colonies S en nombre relativement considérable. La réaction inverse c'est-à-dire la transformation de S en T par un extrait de T est chose très difficile à réaliser et n'a pu être obtenue qu'une seule fois.

Nous n'avons pu jusqu'ici déterminer la nature chimique des substances actives. Nous espérons pouvoir le faire ou tout au moins avoir une idée du groupe chimique auquel elles appartiennent. A ce propos on sait que des mutations « dirigées » ont été réalisées par divers auteurs sur des microbes et notamment pour la première fois par GRIFFITH en Angleterre puis par AVERY, MACLEOD, et MACCARTY sur le pneumocoque, DAWSON et SIA, ALLOWAY sur le pneumocoque, BOIVIN et ses collaborateurs sur les colibacilles ainsi que WEIL et BINDER (1947) sur les dysentériques, MANNINGER et NOGRADI (1948) sur la B anthracis et la B mesentericus. D'après les expériences de AVERY et ses collaborateurs ainsi que celles de BOIVIN et ses collaborateurs il semble bien que l'inducteur de telles mutations dirigées soit un acide désoxyribonucléique provenant de la souche ayant servi à faire l'extrait. Dans les expériences de MANNINGER et NOGRADI l'extrait était un extrait de B mesentericus, encapsulé induisant la transformation d'une variété non encapsulée de B. anthracis en B

entericus encapsulé, l'expérience inverse ayant été elle aussi réalisée, le B anthracis non flagellé est très proche parent du B mesentericus flagellé. Ici les capsules renferment un polypeptide à base d'acide glutamique. Jusqu'ici le mécanisme des mutations est resté très mystérieux. Il semble que par des expériences comme celles que nous avons rappelées au sujet des bactéries et celles sur les levures effectuées dans nos laboratoires on puisse espérer pouvoir jeter un peu de lumière sur ces processus si obscurs encore de la biochimie de l'hérédité. Le problème est évidemment des plus ardu étant donné l'ignorance complète dans laquelle nous sommes au sujet du mécanisme de fonctionnement des gènes et de certaines inhibitions exercées par les allèles dominants sur l'expression de certains caractères. Ainsi parlant de mutation et de modulation chez la levure on ne devrait jamais perdre de vue les phénomènes de sexualité signalés depuis longtemps par KRUIS et SATAVA en 1918, confirmés par WINGE en 1935, par WINGE et LAUSTSEN en 1937 et par LINDEGREEN (1945-46). D'après LINDEGREEN le type diploïde est hétérozygote pour un nombre considérable de gènes « mutants ». Cette forme diploïde est néanmoins très stable les mutations ne pouvant s'exprimer par suite du caractère dominant de l'allèle normal. Au cours de l'haplophase au contraire cette inhibition disparaît ce qui permet de voir survenir au cours de cette phase un nombre extraordinaire de mutations. Par repiquage et sélection on obtient alors des variants stables qui semblent avoir perdu leur capacité de donner naissance à d'autres variants. Nous aurions voulu vérifier, dans le cas de nos mutations multiples à partir de la forme S, le rôle joué par la forme haploïde dans l'apparition de nos mutants mais la chose nous a été impossible étant donné que nous ne sommes pas parvenus à faire sporuler la forme S.

Nous terminerons ces considérations en faisant à nouveau remarquer que dans l'état actuel de nos recherches, il nous est impossible de dire avec certitude si les chromogènes jouent un rôle dans l'apparition des formes S ou bien s'il s'agit uniquement de modifications des cytogènes. Le fait de la réversibilité de cette forme suivant les conditions de milieu plaide classiquement contre l'existence de lésions chromogéniques. L'existence de gènes instables et de mutations en potentiel n'exclut pas toutefois cette éventualité.

A notre point de vue parmi les faits mis en évidence au cours de nos recherches ceux qui nous intéressent particulièrement sont ceux montrant, d'une façon évidente, l'existence de mutations en deux ou plusieurs temps, ceux concernant l'influence du milieu sur l'induction du premier temps de celles-ci et enfin le caractère réversible de ce premier temps sous l'action du milieu.

Dans la deuxième partie de ce travail nous parlerons de phénomènes homologues à ces mutations en deux ou plusieurs temps que l'on voit survenir au cours de la cancérisation expérimentale.

III. — MODULATIONS, MUTATIONS, ENVIRONNEMENT ET CANCER EXPERIMENTAL

Quand on suit attentivement les processus pathologiques qui se succèdent pour donner naissance à un cancer expérimental produit par substances cancérogènes appliquées sur la peau, on ne peut s'empêcher de noter que l'apparition du cancer n'est jamais une réponse immédiate à l'action de l'agent cancérogène et que le plus souvent au cours de cette période de latence plus ou moins longue, le cancer est précédé par l'apparition de tumeurs bénignes.

La période de latence la plus courte que l'on puisse noter chez la souris avant l'apparition du cancer suite à l'application d'une substance cancérogène très active comme le 20 méthylcholanthrène se situe aux environs de 60 jours. Elle est généralement plus longue et elle peut dépasser une année. Au cours de cette période de latence au point de vue macroscopique deux choses sont à noter: le plus souvent la peau badigeonnée, même après la cessation des badigeonnages, présente des signes lésionnels banaux tels que la chute plus ou moins complète des poils, des épaisissements plus ou moins évidents avec ou sans signes d'hyperkératose ou bien des lésions plus spécifiques telle que la présence de papillomes. Au microscope on note les mêmes lésions avec en plus certains îlots hyperplasiques réactionnels souvent autour du collet des poils, difficiles à apprécier macroscopiquement quand ils sont discrets. Au point de vue biochimique divers auteurs ont montré, dès ces stades préliminaires, des altérations enzymatiques ainsi que divers troubles qualitatifs dans la

teneur des cellules en certains de leurs éléments minéraux et organiques. Récemment COWDRY et ses collaborateurs après une série d'études approfondies sur ce genre de modifications survenant chez la souris après application de 20 méthylcholanthrène ont confirmé l'existence de lésions biochimiques au cours de cette période de latence.

Le cancer apparaît alors en un point limité de cet épiderme ainsi modifié le plus souvent aux dépens d'un papillome préexistant mais parfois aux dépens d'une zone limitée d'épiderme, macroscopiquement vierge de tumeur mais indubitablement lésée à un point de vue microscopique ou biochimique.

Le cancer n'apparaît donc jamais immédiatement après l'application d'un cancérigène comme une réponse directe et immédiate à l'action de celui-ci. De plus, il apparaît toujours en un point très limité, très circonscrit souvent unique bien qu'on puisse néanmoins voir parfois plusieurs cancers naître au niveau d'une peau badigeonnée. Quand il existe ainsi plusieurs cancers, ceux-ci n'ont pas forcément le même type histologique, certains présentent des signes de différenciation nettement plus marqués que les autres.

Quand on compare ce genre de lésions à ce qui se passe au niveau d'une culture pure de levures soumise à l'action d'une substance cancérigène, on est frappé par l'analogie des processus: le temps de latence, l'apparition de lésions irréversibles en deux ou plusieurs temps, le caractère sporadique et comme accidentel de telles lésions. Si l'on peut identifier les lésions irréversibles chez la levure à des mutations somatiques il est vraisemblable que la cellule cancéreuse représente le même genre de processus.

Nous avons vu combien le milieu nutritif jouait un rôle important chez la levure dans la production de la première phase du phénomène et nous avons vu que sur certains milieux cette première phase était réversible. Si l'on doit homologuer les processus chez la levure et chez la souris, il est important de savoir si les lésions « latentes » existant au cours de la période de latence sont influençables par le milieu soit dans leur production soit dans leur régression éventuelle.

Au cours de nos études sur la levure nous avons montré que certains extraits de levure influençaient nettement l'apparition de la première phase et nous avons rappelé que chez les microbes, des muta-

tions dirigées avaient pu être produites par certains acides désoxyribonucléiques. Nous avons aussi rappelé l'existence de gènes instables qui sont peut être sous l'influence de substances antimutogénétiques produites par l'individu porteur de ces gènes instables.

Dans l'étude de cancérologie expérimentale qui va suivre nous allons essayer de voir jusqu'à quel point des conditions de milieu telles que des facteurs alimentaires ou des facteurs hormonaux peuvent influencer la genèse de cancers expérimentaux. On peut rechercher de tels facteurs alimentaires dans le règne végétal ou dans le règne animal et nous verrons qu'ils existent dans l'un et l'autre. Toutefois étant donnés les travaux classiques au sujet de l'organisateur et des organismes (SPEEMAN, NEEDHAM, BRACHET) étant données les possibilités d'induire des mutations dirigées à l'aide d'acides désoxyribonucléiques de familles voisines, chez les microbes nous avons au cours de ces dernières années limité nos investigations à la recherche de facteurs de régulation d'origine organique chez les mammifères.

a) *Cancers de la peau de la souris provoqués par le 20 méthylcholanthrène.*

Nous avons, avec divers de nos élèves, publié depuis 1927 une série de travaux portant sur l'influence de l'alimentation sur la genèse des cancers de la peau de la souris produits soit par le goudron soit par des hydrocarbures à l'état de pureté. Nous avons montré l'existence de tels facteurs dans les divers tissus animaux et dans divers végétaux, sortes de facteurs de régulation de la croissance. Nous avons montré l'existence de facteurs agissant dans les deux sens c'est-à-dire favorisant ou retardant l'apparition de ces cancers, celle-ci ainsi que leur croissance paraissant être la résultante d'un trouble de l'équilibre existant à l'état de santé entre les deux groupes de facteurs. Nous avons proposé de les appeler facteurs antiblastiques ou problastiques suivant qu'ils inhibent ou favorisent le cancer. Nous pensons que ces facteurs agissant par voie générale doivent être distingués du moins provisoirement des facteurs cocancérigènes, épicancérogènes et anticancérigènes de BERENBLUM, facteurs qui dans l'esprit de l'auteur sont des facteurs à action locale. Nous avons également montré que les facteurs antiblastiques étudiés par nous rési-

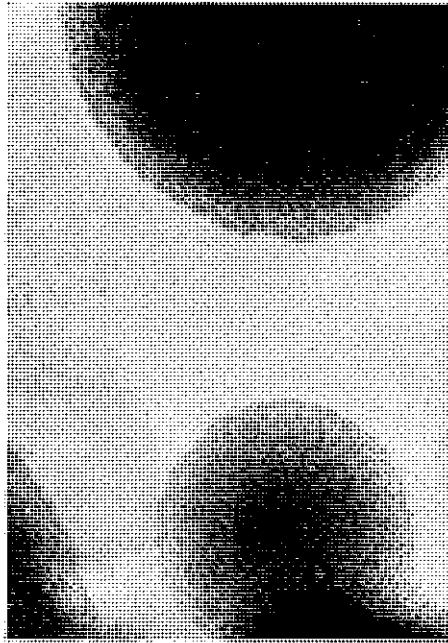


FIG. 1

En haut: Colonie T. Âge: 4 jours

En bas: Colonie S. Âge: 4 jours

N. B. La mise au point a été faite uniquement sur les bords de la colonie

Grossissement: 160

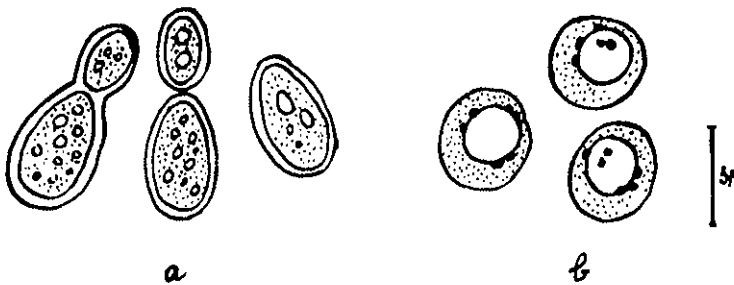


FIG. 2

(Dessin)

a) Cellule témoin (T): vacuoles

b) Cellule Styryl (S): vacuoles

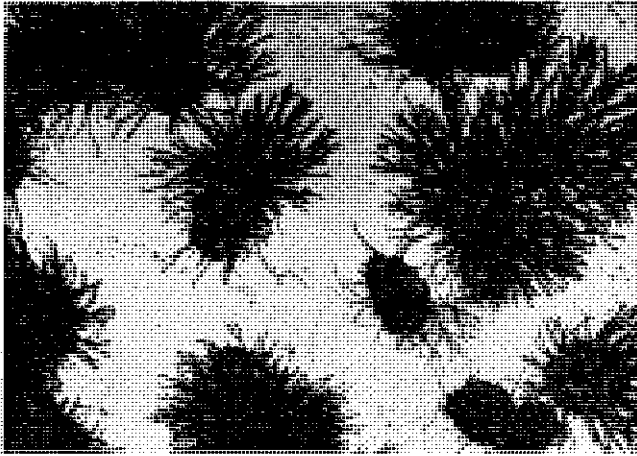


FIG. 3
Colonies filamenteuses. Âge 12 jours.
Grossissement: 3

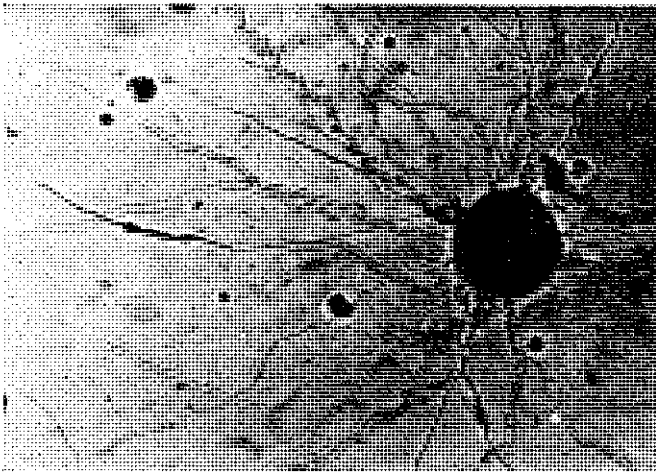


FIG. 4
Colonie F avec longs filaments. Âge: 3 jours.
Grossissement: 60



FIG. 5

À droite: Colonie F sans filaments. Âge 5 jours. Eléments cellulaires très clairs.

Vers le milieu et à gauche filaments enfoncés dans la gelose. Ils proviennent d'une colonie qui n'est pas dans le champ.

Grossissement: 160.



FIG. 6

Filaments constitués de bourgeonnements cellulaires. Age: 5 jours.

Grossissement: 160.

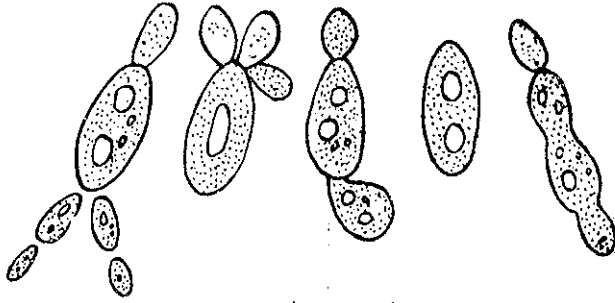


FIG. 7

(Dessin)

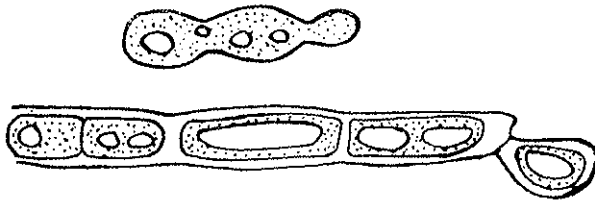


FIG. 8

(Dessin)



FIG. 9

Cellules F se multipliant soit par bourgeonnement soit par division. Âge: 2 jours.
Grossissement: 600.

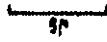
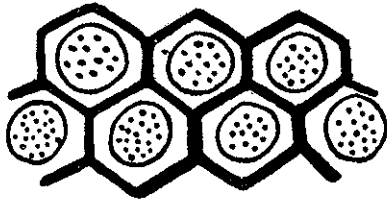


FIG. 10 (Dessin)

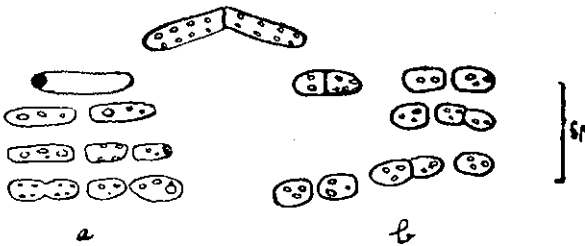


FIG. 11 (Dessin)

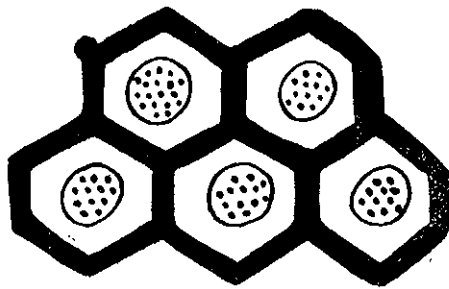


FIG. 12 (Dessin)

Forme Cr: Capsules particulièrement épaisses et substance intercellulaire abondante.



FIG. 13

À gauche: Forme Cr. Âge: 5 jours. Noter l'abondance de substance mucoïde séparant les éléments cellulaires.

À droite: Colonie témoin.

Grossissement: 160

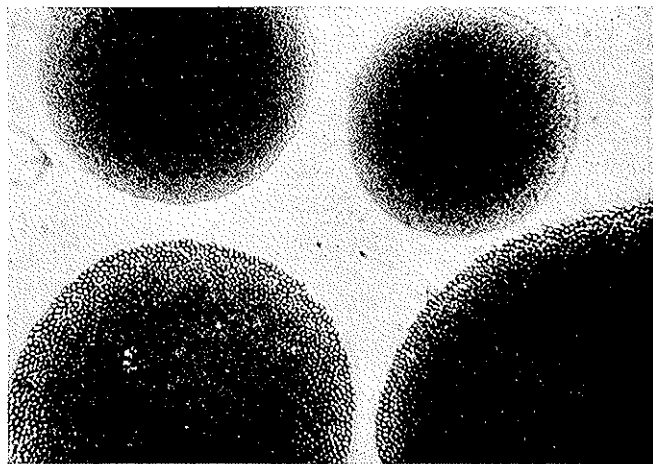


FIG. 14

En haut: Forme 4g. Âge 5 jours. En bas: Forme 4P. Développement très maigre
Grossissement: 160.

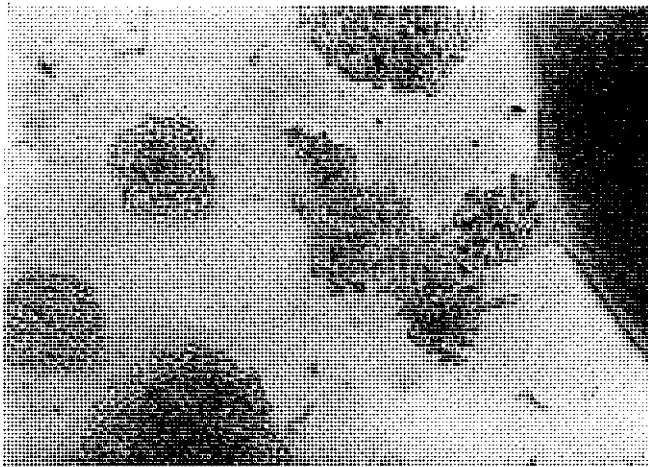


FIG. 15

Forme Ger. Cellules irrégulières. Substance intercellulaire abondante comme Cr.
Grossissement: 160.



FIG. 16

En haut à droite: Colonie *Saccharomyces Ellipsoidus*. Âge 5 jours.

En bas à gauche: Colonie *saccharomyces Ellipsoidus* ayant subi l'action du Styryl. Âge 5 jours.

Grossissement: 160.

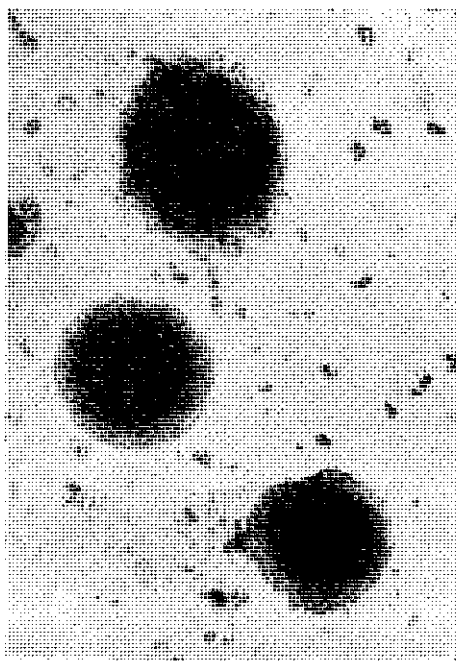


FIG. 17

Saccharomyces Cerevisiae 10 jours après irradiation par U. V. Développement bloqué au stade 1, 2, 4, 8, cellules. Quelques colonies se développent; elles prennent un aspect clair.

Grossissement: 160



FIG. 18

Photo macroscopique des foies des animaux recevant comme régime: pomme de terre + foie frais.

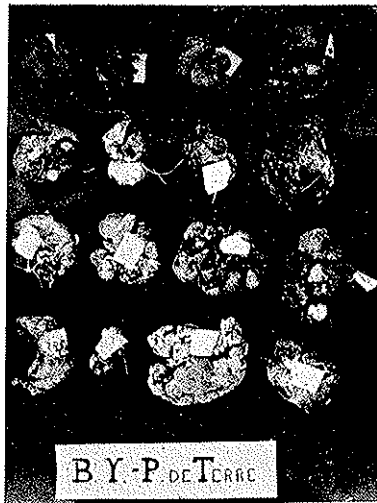


FIG. 19

Photo macroscopique des foies des animaux de controle recevant comme régime: pommes de terre + carottes.

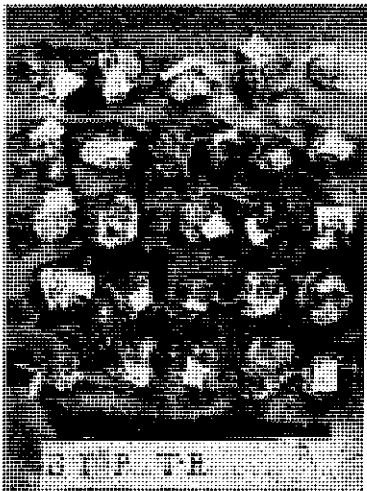


FIG. 20

Photo macroscopique des foies des animaux d'expérience recevant comme régime: pomme de terre + extra.



FIG. 21

Photo macroscopique des foies des animaux recevant comme régime: pomme de terre + foie cuit à l'eau.



FIG. 22

Photo macroscopique des foies des animaux recevant comme régime: pomme de terre + extraction du foie a chaud dans du liquide physiologique.

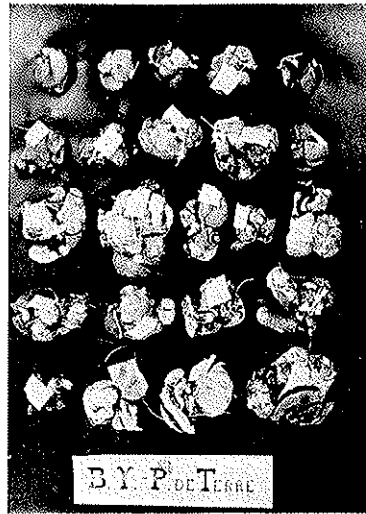


FIG. 23

Photo macroscopique des foies des animaux de controle recevant comme régime: pomme de terre + carottes.



FIG. 24

Photo macroscopique des foies des animaux recevant comme régime: farine d'orge + carottes.

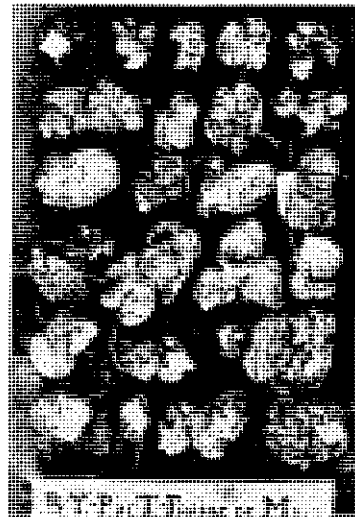


FIG. 25

Photo macroscopique des foies des animaux recevant comme régime: pomme de terre + farine de malt + carottes.

étaient à un chauffage modéré pendant 10 à 15 minutes à des températures allant de 80 à 100°. Dans certains cas un tel chauffage semble même libérer de tels facteurs. La guerre nous avait contraint à abandonner ces recherches. Malgré l'ordre de grandeur du travail effectué on pouvait dire qu'il s'agissait d'un simple travail de prospection les recherches n'ayant jamais été assez poussées que pour affirmer que ces facteurs appartenissent à l'un ou l'autre groupe chimique. De plus les différences signalées dans nos travaux étaient parfois peu importantes; certaines autres expériences où les différences avaient été importantes étaient malaisées à reproduire avec les mêmes résultats. Pour ces raisons ce genre de recherches longues et fastidieuses avait suscité peu d'enthousiasme. Les recherches actuelles ont visé à améliorer ces résultats et à les rendre plus systématiques grâce à la purification progressive des fractions actives.

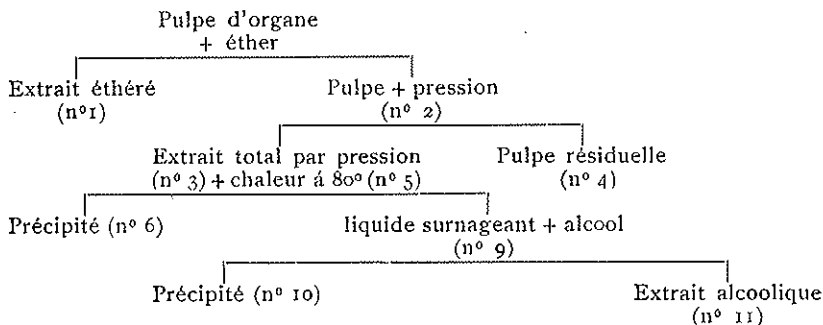
Nous nous limiterons à exposer les résultats obtenus au cours de quelques recherches types.

Facteurs alimentaires présents dans le foie.

Le foie de boeuf ou de vache aussi frais que possible est broyé à la machine et extrait à l'éther par agitation mécanique continue à la température de la pièce (plus ou moins 20°) pendant 8 à 10 heures. On emploie deux volumes d'éther pour un volume d'organe broyé et l'éther est renouvelé deux fois. On distille l'éther dans une atmosphère d'azote par barbotage continu à travers un fil capillaire et le résidu après évaporation est ce que nous appelons l'extrait éthéré total (extrait n. 1).

La pulpe restante (extrait n. 2) est alors broyée au pilon sur un filtre de Buchner, sous la hotte, de façon à en exprimer la portion liquide non soluble dans l'éther. Cette portion est évidemment riche en protéines, nous l'appelons « extrait total par pression » (n. 3). La masse solide qui reste après une telle extraction à l'éther et par pression est appelée la pulpe résiduelle (n. 4). L'extrait total par pression chauffé au bain marie à 80° pendant 10 minutes (n. 5) montre un très important précipité que l'on sépare aisément par filtration sur filtre de Buchner (n. 6) ou par centrifugation du liquide surnageant. Ce dernier liquide (n. 9) est alors mélangé avec de l'alcool à 94° de

façon à ramener la teneur en alcool du mélange à 70°. Il se produit un précipité que l'on sépare, par filtration au Buchner, de la fraction liquide (alcool à 70°), nous appelons cette fraction le précipité alcoolique du liquide surnageant chauffé (n. 10) La portion soluble dans l'alcool à 70° est alors mise à distiller en atmosphère d'azote de façon à éliminer l'alcool au maximum du possible. Cette fraction encore très complexe est appelée extrait alcoolique à 70° du liquide surnageant chauffé (extrait n. 11) Voici le schéma des processus.

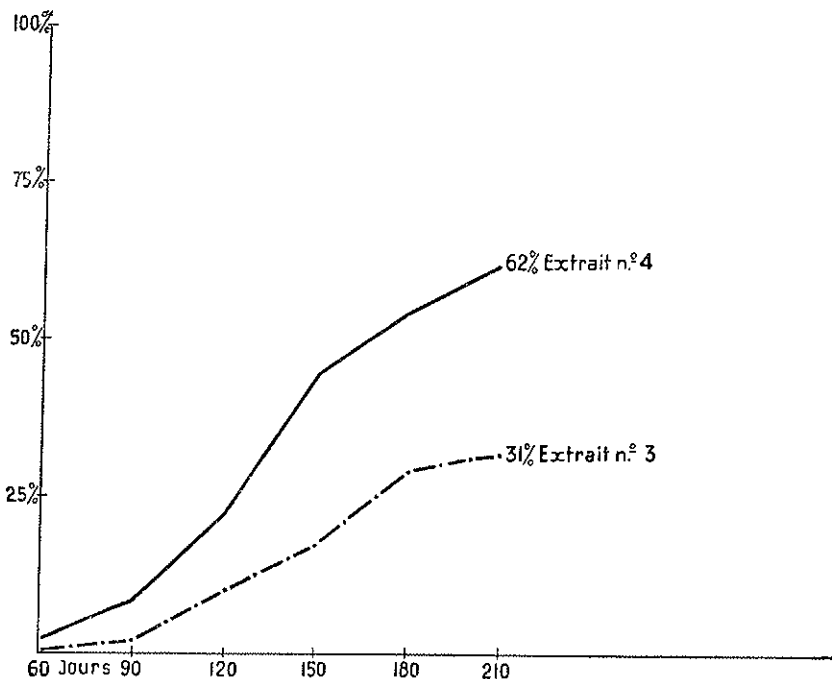


Nous avons testé toutes ces fractions et d'autres encore. Après ce long travail nous croyons pouvoir dire qu'une portion notable des facteurs problastiques se trouve présente dans la pulpe résiduelle, nous disons notable mais nous ne disons pas l'entièreté. De même une fraction notable des facteurs antiblastiques mais nullement l'entièreté se retrouve dans l'extrait alcoolique à 70° du liquide surnageant chauffé (n. 11).

Pour tester la présence des facteurs actifs dans ces diverses fractions voici comment nous avons procédé. Une fraction déterminée est donnée en alimentation à un groupe de cinquante souris provenant toutes d'une même souche de souris blanches mais non homozygote ou bien d'une même souche homozygote de souris noires la souche 057. La fraction à étudier est intièrement mélangée à une pâtée à l'eau de farine complète d'orge. Cette façon de procéder permet une distribution très homogène du produit dans la nourriture. Trois fois par semaine les animaux reçoivent en outre et à volonté, des rondelles de carottes fraîches. Cette nourriture est donnée pendant toute la vie de l'animal à partir du premier badigeonnage et ce, 6 jours par

semaine. Pendant un jour ils ne reçoivent que de la farine mouillée non additionnée du produit à tester.

La substance cancérigène est du 20 méthylcholanthrène en solution à 1/400 dans l'éther additionné de 20% d'huile de paraffine. Les badigeonnages se font trois fois la semaine. On en fait 20 en tout.



GRAPHIQUE I.

Chaque animal reçoit 2 gouttes du produit au cours de chaque badigeonnage. Les 20 badigeonnages étant terminés les animaux continuent à recevoir leur alimentation de régime et l'on procède régulièrement au relevé des tumeurs qui apparaissent. Les animaux sont régulièrement pesés. Ceux recevant les fractions 2, 3, 4, 8, 9, 10, et 11 sont des animaux particulièrement bien portants et pesant en moyenne 10 % de plus que les animaux recevant uniquement de la farine et des carottes. Les différences que l'on note ne sont donc pas

à imputer à des restrictions caloriques dues à un régime pauvre ou toxique. Qui plus est, nos animaux vivent en excellente santé, si l'on songe que 4 mois après le début de l'expérience il n'est pas rare de voir 75% ou plus des animaux en vie parmi ceux qui reçoivent de la nourriture de régime.

Voici d'ailleurs les résultats de cette expérience présentés sous forme d'un tableau et d'un graphique (graphique I). Ce dernier montre 2 courbes représentant le nombre absolu de cancers parmi les animaux recevant respectivement les extraits 3 et 4.

TABLEAU I.

Dates	Animaux nourris au régime de base + extrait 4			Animaux nourris au régime de base + extrait 3		
	Nombre souris	Nombre cancer	Nombre absolu de tumeurs.	Nombre souris	Nombre cancer	Nombre absolu de tumeurs.
Début de l'exp.	50	—	—	50	—	—
60 jours	50	1	8	47	—	5
90 »	49	4	26	47	1	12
120 »	46	11	33	46	5	15
150 »	40	22	35	42	8	16
180 »	36	27	39	36	14	24
210 »	24	31	40	29	15	24

Cette expérience a été répétée deux fois avec des résultats comparables avec 50 souris par groupe dans chacun des essais. Elle a été faite en collaboration avec une de nos élèves M.lle BERCKMANS.

Les différences qui se répètent, sans être impressionnantes, sont pensons-nous suffisamment significatives pour pouvoir dire que dans le foie il existe des facteurs alimentaires influençant dans les deux sens la genèse du cancer de la peau de la souris produit par le méthylcholanthrène. La fraction 4 renferme surtout des facteurs problastiques et la fraction 3 surtout des facteurs antiblastiques.

Nous avons tenté de concentrer ces derniers dans les fractions subséquentes mais pour le foie en particulier nos expériences concernant ces fractionnements ne sont pas assez avancées que pour être publiées.

Facteurs alimentaires présents dans le coeur.

Nous avons fractionné cet organe de la même façon que le foie et donné les mêmes numéros aux extraits homologues.

Nos expériences conduites exactement de la même façon nous ont donné les résultats suivants:

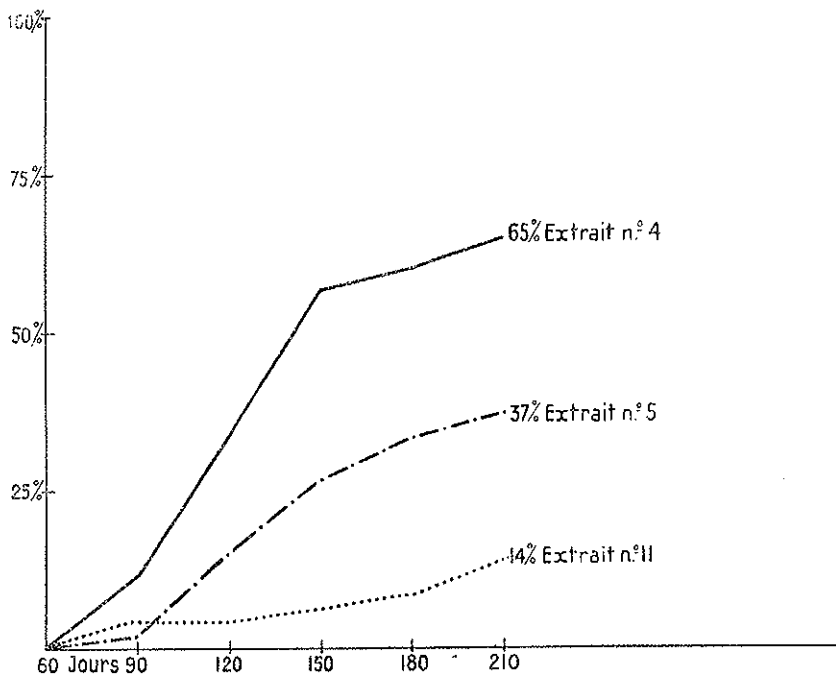
TABLEAU II.

Dates	Animaux nourris au régime de base+extrait n° 4			Animaux nourris au régime de base+extrait n° 5			Animaux nourris au régime de base+extrait n° 11		
	Nombre souris	Nombre cancer	Nombre absolu tumeurs	Nombre souris	Nombre cancer	Nombre absolu tumeurs	Nombre souris	Nombre cancer	Nombre absolu tumeurs
Début de l'ex.	50	—	—	50	—	—	50	—	—
60 jours	43	—	4	48	—	7	49	—	3
90 »	41	5	19	48	1	20	49	2	7
120 »	40	15	28	46	7	27	47	2	10
150 »	33	25	29	45	13	29	45	3	10
180 »	26	26	31	40	16	30	45	4	12
210 »	28	28	35	34	18	39	42	7	13

Nous retrouvons dans les fractions homologues des substances à actions homologues c'est-à-dire que dans la fraction 4 nous retrouvons des substances problastiques et dans la fraction 3 des substances antiblastiques. Les substances antiblastiques ne sont pas détruites par 10 minutes de chauffage au bain marie à 80% (fraction 5). Si nous comparons la courbe (graphique 3) des animaux vivants sans cancers dans la fraction 5 d'avec ceux vivants sans cancers dans la fraction 4 nous voyons que des différences importantes existent au cours de l'expérience et qu'elles subsistent ou s'accroissent au 210^e jour c'est-à-dire 7 mois après le début: 54% sans cancer dans la fraction 5 contre 18 dans la fraction 4.

Nos chiffres montrent également que dans la fraction n. 11 il subsiste une fraction importante de facteurs antiblastiques puisque

c'est la fraction qui nous donne les meilleurs résultats: au 180ème jour 86% des animaux sont encore vivants sans cancer contre 20% pour la fraction 4. Ces chiffres sont significatifs au point de vue statistique.

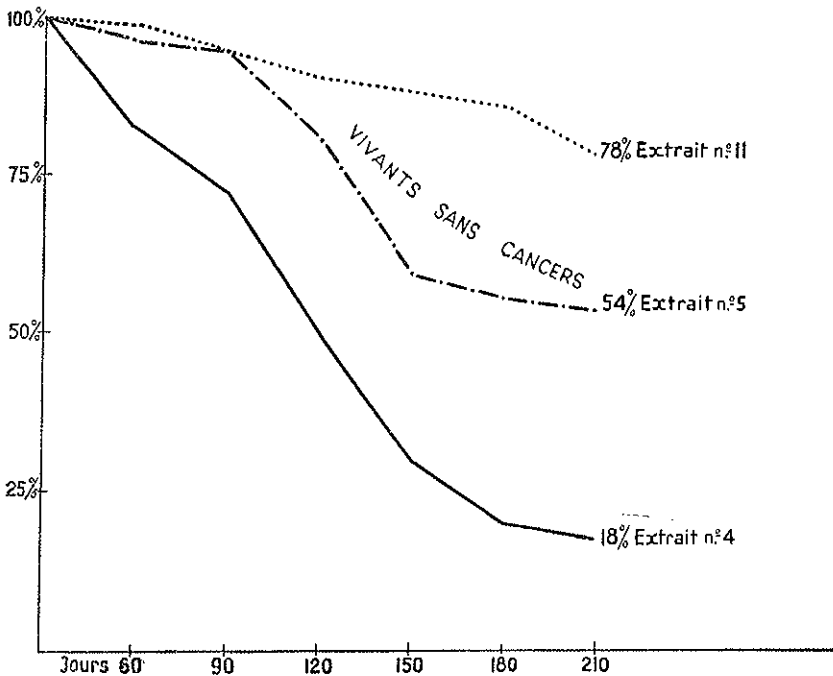


GRAPHIQUE II.

Malgré tout, le problème est d'une importance telle que ces expériences doivent être répétées plusieurs fois encore pour en établir le bien fondé.

Ces résultats paraissent montrer qu'au cours du phénomène de cancérisation de la peau par le méthylcholanthrène l'apparition du deuxième temps des processus, c'est-à-dire le cancer, peut-être influencé par certains éléments de milieu et notamment par des facteurs alimentaires. Nous disposons de chiffres pour montrer que l'on peut aussi influencer, par ces mêmes facteurs, l'apparition du premier temps. De tels facteurs sont présents dans les organes normaux de ruminants (le boeuf) comme le foie et le coeur. Jusqu'à nouvel

ordre nous les considérons comme des facteurs de régulation de la croissance et de la différenciation des cellules épithéliales, produits normaux d'un métabolisme normal chez un animal sain.



GRAPHIQUE III.

b) *Cancers du foie du rat provoqués par le 4 diméthylaminoazobenzol*

Il est indispensable aussi de dire un mot de la succession des lésions du foie qui, suite à l'administration de ce produit par la bouche mènent au cancer hépatique. On peut ici également distinguer au moins deux temps dans la succession de ces lésions. Au cours d'un premier temps on voit survenir des lésions en tous points homologues aux papillomes, ce sont des cholangiomes, tumeurs bénignes avec ou sans cirrhose. Au cours d'un deuxième temps apparaissent les cancers proprement dits qui se présentent sous divers aspects de dédifférenciation, lésions irréversibles, comme les cancers de la peau

de la souris, du moins dans les conditions expérimentales habituelles.

Ici aussi il est particulièrement intéressant de voir jusqu'à quel point les conditions de milieu et notamment des facteurs alimentaires peuvent influencer la genèse de ce type de cancer. On sait, que pour pouvoir provoquer des cancers avec cette substance ou l'orthoaminoazotoluol les animaux d'expérience doivent être maintenus à un régime très pauvre, le régime au riz décortiqué étant un des meilleurs. Dès le début des recherches dans ce domaine, l'école japonaise a soupçonné et ensuite démontré l'importance du régime. KINOSHITA et ses collaborateurs ainsi que NAKAHARA et ses collaborateurs ont publié au cours des années 1938-39 de nombreuses études sur ce sujet. Nous-mêmes dès 1935 avons été dans l'impossibilité d'obtenir des cancers du foie chez des rats maintenus à un régime à la farine complète auquel on ajoute de l'orthoaminoazotoluol. Nous avons cru à l'époque que la substance n'était pas cancérigène. Après la découverte de KINOSHITA montrant que le 4' diméthylaminoazobenzol était plus cancérigène que l'orthoaminoazotoluol nous reprîmes ces recherches et dès 1939 nous montrions avec nos collaborateurs POURBAIX et CUVELIER que la farine complète de seigle renferme des facteurs inhibants très actifs vis-à-vis de ces types de cancers. Depuis, un très grand nombre de travaux ont paru un peu partout mais surtout aux Etats-Unis (RUSH, BAUMANN et leurs élèves 1941-47) montrant qu'on pouvait trouver de tels facteurs dans le lait, le jaune d'oeuf, la levure. Ils ont montré ensuite que l'acide laurique est un inhibant très actif. La vitamine B₂ elle aussi, additionnée de caséine, joue un rôle protecteur net mais non absolu (du VIGNEAUD et ses collaborateurs).

En 1939, NAKAHARA et ses élèves ont montré que le foie desséché au bain-marie était doué d'un pouvoir d'inhibition considérable.

Parallèlement à nos travaux concernant l'influence des facteurs alimentaires d'origine organique sur la genèse des cancers de la peau de la souris, nous avons entrepris une série de recherches de même ordre sur le cancer du foie. Nous avons publié un certain nombre de ces résultats montrant que le foie renferme, ainsi que l'avait montré NAKAHARA et ses collaborateurs, des facteurs antiblastiques.

très puissants vis-à-vis du cancer du foie (Fig. 18). Nous avons pu montrer que la fraction n. 2 du foie est extrêmement active, de même que la fraction n. 3 au point qu'il est impossible d'obtenir un seul cancer parmi les animaux maintenus à un régime aux pommes de ter-

TABLEAU III.

	Contrôle p. de t. bouillies + carottes	Pulpe après ex- traction de l'éther (fraction n° 2)
Cancers	$\frac{16}{17}$	$\frac{0}{27}$
Métaplasie ou Cholangiome	$\frac{1}{17}$	$\frac{4}{27}$
Total	$\frac{17}{17}$	$\frac{4}{27}$

re pelées, bouillies et écrasées additionnées des fractions sus-mentionnées. Nous nous sommes servis de pommes de terre épluchées et bouillies comme régime des base parce que nous avons montré (MAISIN, BEECKMANS) que ce régime pouvait parfaitement remplacer le riz décortiqué.

Le tableau n. 3 présente sous forme de chiffres les résultats de cette expérience.

Les photos montrant les lésions macroscopiquement visibles dans les foies des divers groupes illustrent bien ces résultats. Photo figure n. 19, 20.

On voit que cette fraction qui renferme, comme on sait, à côté des facteurs antiblastiques une quantité importante de facteurs problastiques est néanmoins capables d'inhiber complètement l'apparition de ce cancer. Les lésions du premier temps sont elles-mêmes très rares.

Nous avons pu montrer ensuite que les facteurs actifs résistaient parfaitement à une ébullition dans l'eau pendant 5 minutes (Fig. 21) qu'ils n'étaient pas présents dans l'eau d'ébullition (Fig. 22) mais

bien dans la masse du parenchyme hépatique coagulée après cette ébullition.

Donc ici aussi comme pour les cancers de la peau, les facteurs actifs résistent à une ébullition de courte durée.

S'ils résistent à l'ébullition certains de ces facteurs sont néanmoins détruits relativement aisément par certains processus biologiques telle que la germination. Ainsi avons nous pu réaliser l'expérience suivante qui jusqu'ici n'a pas été publiée.

TABLEAU IV.

	Contrôles pom. de terre + carottes	Farine d'orge + carottes	Farine de malt + carottes
Cancers	$\frac{19}{21}$	$\frac{6}{23}$	$\frac{21}{24}$
Métaplasie ou Cholangiome	$\frac{2}{21}$	$\frac{5}{23}$	$\frac{1}{24}$
Total des lésion . . .	$\frac{21}{21}$	$\frac{11}{23}$	$\frac{22}{24}$

Un groupe de 25 rats est nourri à la farine complète d'orge, un deuxième groupe à la farine de malt, un troisième groupe aux pommes de terre bouillies. Les trois groupes reçoivent trois fois par semaine des rondelles de carottes à volonté. Tous reçoivent la même quantité de diméthylazobenzol mêlé à leur nourriture et ce, pendant une durée de 4 mois.

Voici les résultats de cette expérience présentés dans le tableau n. 4.

Ici aussi les photos de l'ensemble des foies de chaque groupe tels qu'ils furent trouvés à l'autopsie des animaux sont très démonstratives. (Fig. 23, 24, 25).

Il y a comme on le voit une nette différence de comportement entre les animaux nourris à la farine complète d'orge et ceux nourris à la farine de malt. Or au point de vue alimentaire la différence

entre les deux régimes consiste simplement dans le fait que la farine de malt a été fabriquée avec du grain d'orge germé et débarassé de son germe tandis que les autres animaux ont reçu de la farine provenant de graines complètes fraîches et broyées. Le processus de la germination qui consiste en une série complexe de fermentations accompagnées de lyses et de synthèses a donc complètement détruit les facteurs antiblastiques présents dans le grain d'orge. Les résultats montrent que ce régime est même moins bon que le régime à base de pommes de terre bouillies.

Dans le cas du cancer du foie du rat provoqué par les azodérivés l'influence protectrice du régime est tellement évidente que personne ne peut douter de la réalité des faits. Toutefois à notre avis il pourrait s'agir ici de facteurs facilitant le métabolisme et la désintégration des azodérivés dans le tube digestif ou ailleurs plutôt que de facteurs protégeant les cellules contre les lésions dues au corps cancérigène, lésion menant au premier temps ou au deuxième temps des processus de cancérisation. Quand il s'agit du cancer de la peau par badigeonnages on est certain que le produit cancérigène imprègne les cellules et pénètre leur intérieur. Si les cellules malgré tout, sous l'influence du milieu, ne subissent pas la série de modifications qui les mènent au premier ou au deuxième temps de la cancérisation c'est qu'il existe dans ce milieu des facteurs qui les protègent et agissent directement sur le processus de cancérisation proprement dit. Quoiqu'il en soit du mécanisme intime d'action des facteurs alimentaires sur la cancérisation du foie par les azodérivés, nous avons vu que cette cancérisation, comme celle de la peau, se réalise en 2 ou plusieurs temps et que des facteurs de milieu tels que des facteurs alimentaires ont une action déterminante sur l'évolution des processus.

c) *Influence d'un oestrogène de synthèse le diéthylstilboestrol sur la production de cancers expérimentaux chez le rat.*

On sait, depuis les belles recherches désormais classiques de LACASSAGNE, que lorsqu'on injecte des quantités importantes de substances oestrogènes à des souris mâles appartenant à une souche héréditairement susceptible de faire du cancer, on produit chez ceux-ci

des cancers de la mamelle alors que sans ce traitement ils n'en font jamais. Si on soumet des femelles à ce même traitement elles font leur cancer plus tôt dans la vie et le pourcentage de tumeur est plus élevé. Il est généralement admis que cette expérience ne réussit que chez les individus appartenant à des races prédisposées par hérédité.

En 1939, GESCHICHTER en injectant de grandes quantités d'hormones oestrogènes à des rats a soutenu que la mamelle de cet animal répond toujours à la cancérisation à la suite d'un tel traitement quel que soit le patrimoine héréditaire de cet animal.

En 1947, DUNNING, CURTISS et SEGALOFF reprenant ces expériences et se servant comme oestrogène du diéthylstilboestrol en implantation sous la peau ont montré que le genre de réponse dépend du patrimoine héréditaire du rat, certaines souches font du cancer de la mamelle avec grande aisance, certaines autres font des calculs vésicaux avec cancer, certaines autres encore font l'un ou l'autre type de tumeurs malignes. Toutefois, au cours de leurs expériences, toutes les souches testées se sont montrées susceptibles de faire soit du cancer de la vessie soit du cancer mammaire.

Nous avons, avec un de nos élèves MEERSEMAN, repris ces recherches de DUNNING, CURTISS et SEGALOFF en nous servant d'une souche homozygote de rats entretenue dans nos laboratoires depuis plus de 10 ans, par croisements entre frères et soeurs ou proches cousins, et n'ayant jamais été contaminée par une souche étrangère. La nourriture de nos animaux a toujours consisté depuis 10 ans en farine complète et légumes frais. Nous avons suivi les indications de DUNNING et CURTISS concernant la dose de diéthylstilboestrol ainsi que le mode d'administration. Nous avons implanté, sous la peau du dos de chaque animal, un comprimé renfermant 15 milligrammes de diéthylstilboestrol mélangés avec 15 milligrammes de cholestérine pure. Ces comprimés se résorbent lentement et agissent pendant toute la vie de l'animal. Nous avons greffé des animaux jeunes pesant de 50 à 100 grammes en moyenne soit 25 mâles et 25 femelles. Il est aisé de noter l'action du diéthylstilboestrol car les animaux subissent un arrêt de croissance quasi immédiat et ils restent nains toute leur vie. Si on enlève le comprimé de diéthylstilboestrol à un animal ou s'il l'élimine spontanément il recommence rapidement sa croissance. Le poids des animaux implantés a varié de 93 à 195 grammes, la

plupart des animaux (voir le tableau) pesant aux environs de 110 à 120 grammes. Un animal, le rat n. 16 mort 7 mois après son implantation a atteint un poids de 263 grammes, mais il avait éliminé son comprimé. Les animaux de contrôle appartenant aux mêmes nichées ont atteint des poids allant de 170 à 300 grammes. Ces animaux nains par implantation ont généralement survécu longuement à celle-ci: 34 ont survécu plus de 300 jours après l'implantation et certains ont survécu au delà de 500 jours. Aucun de ces animaux n'a présenté de tumeur au point d'implantation. Aucun de ces animaux non plus n'a présenté de cancer de la mamelle. Les seules lésions que nous ayons trouvées à l'examen macroscopique ou microscopique furent des kystes d'un diamètre maximum de 1 à 2 millimètres sans signe de prolifération cellulaire. Nous avons trouvé 13 pyosalpinx sur 25 femelles implantées, pyosalpinx parfois énormes emplissant l'abdomen et faisant songer à une portée à terme. Il n'y eut toutefois aucun cancer de l'utérus. Chez 6 animaux nous avons noté des calculs vésicaux mais sans cancer et sans trace de prolifération de la muqueuse.

La lésion la plus intéressante que nous ayons notée c'est le développement quasi systématique d'adénomes hypophysaires chez les animaux ayant survécu 300 jours ou plus à l'implantation. Ces adénomes ont souvent atteint des poids considérables, 250 milligrammes ou plus. Un de ces adénomes a atteint 680 milligrammes! Il s'agissait de la femelle n. 29 ayant survécu 450 jours. Nous n'avons pas constaté de différence parmi mâles et femelles quant à la propension à développer des adénomes: 15 mâles sur 25 et 12 femelles sur 25 ont présenté ce type de lésion. Du vivant de ces animaux on pouvait, dans le cas d'adénomes importants, faire le diagnostic des porteurs de ces tumeurs parce qu'ils devenaient aveugles.

L'examen microscopique de ces tumeurs a montré qu'on se trouvait en présence d'adénomes composés de cellules de divers types mais non de cancers. Un fait très intéressant à noter c'est l'énorme congestion de ces tumeurs. Certaines d'entre-elles, notamment les plus volumineuses, pourraient être appelées des adéno-angiomes tellement le nombre de capillaires néoformés est considérable. Néanmoins histologiquement parlant, on a nettement l'impression de se trouver en présence d'hyperplasies fonctionnelles et non pas de tumeurs mali-

gnes. Nous ignorons toutefois si elles régressent à la suite des désimplantations.

Les détails de cette expérience sont consignés dans le tableau n. 5 (*a, b, c*).

Cette expérience démontre que les substances oestrogènes ne peuvent être considérées comme des agents cancérigènes vrais, même pour la mamelle. Pour que de tels cancers surviennent suite à leur action, il faut que les animaux soient héréditairement prédisposés. En quoi consiste cette prédisposition? Est-elle locale ou générale? S'agit-il de gènes instables capables de muter dans certaines conditions de milieu? il faudrait d'autres recherches pour répondre avec certitude à ces questions. Quoiqu'il en soit les expériences de LACASSAGNE menant à la production de cancers chez la souris mâle prédisposée à l'aide d'hormones oestrogènes et les nôtres montrant l'impossibilité d'arriver à un tel résultat chez des rats non prédisposés, illustrent bien les possibilités comme les limites d'action de certains facteurs de milieu comme les hormones dans l'apparition du cancer.

TABLEAU V-a.

IMPLANTATION D'OESTROGENE CHEZ LE RAT

mois	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8		
	Date de greffe	Poids à greffe	Après 1 mois	Après 3 mois	A la mort	Date de la mort	Poids maximum atteint															
♂	5-XII-47	65	91	102	82	7-IX-48	111															
2	5-XII-47	72	95	95	82	16-IX-48	103															
♂	11-XII-47	78	98	116	108	24-I-49	124															
♂	11-XII-47	71	93	105	114	28-II-49	120															
5	12-XII-47	63	87	93	79	28-IX-48	102															
6	18-XII-47	60	77	83	92	25-IX-48	93															
7	18-XII-47	58	80	93	79	20-IX-48	101															
♂	10-XII-47	65	85	90	102	10-XI-48	102															
9	19-XII-47	58	76	88	104	21-XI-48	104															
♂	19-XII-47	59	80	100	88	26-XII-48	112															
11	19-XII-47	58	81	89	94	2-I-49	95															
♂	22-XII-47	72	90	114	104	25-XII-47	133															
13	22-XII-47	65	80	94	105	26-X-48	106															
♂	22-XII-47	58	81	102	108	28-II-49	120															
15	22-XII-47	69	95	110	119	4-III-49	125															
♂	22-XII-47	75	105	138	263	26-VII-48	263															
17	22-XII-47	61	79	106	122	28-X-48	128															
													Durée de Survie:	▼ 150 jours	▼ 303 jours	▼ 450 jours						

TABLEAU V-6.

	mois	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	Seins	Surré- nales	Varia	
		Date de greffe	Date de greffe	Poids à greffe	Après 1 mois	Après 3 mois	A la mort	Date de la mort	Date de la mort	Poids maximum atteint															
♂ 18		23-XII-47	70	95	103	93	11-XI-48	124																	
19		23-XII-47	50	76	100	115	4-IV-49	120																	
♂ 20		23-XII-47	48	85	111	72	15-XII-48	122																	
21		23-XII-47	70	86	108	107	2-I-49	125																	
♂ 22		23-XII-47	62	83	100	115	31-I-49	117																	
23		23-XII-47	60	75	92	96	23-VII-48	109																	
♂ 24		24-XII-47	64	99	109	135	12-III-49	135																	
25		24-XII-47	65	95	109	96	17-V-48	109																	
♂ 26		24-XII-47	65	88	105	127	21-IV-49	127																	
27		24-XII-47	55	78	100	119	20-XII-48	119																	
♂ 28		31-XII-47	73	56	56	56	31-I-48	73																	
29		31-XII-47	73	80	98	118	9-IV-49	121																	
♂ 30		2-I-48	91	100	113	88	12-II-49	128																	
31		2-I-48	71	87	94	99	5-V-49	99																	
♂ 32		2-I-48	61	88	119	95	18-VIII-48	132																	
33		2-I-48	69	86	110	107	9-VIII-48	117																	
♂ 34		2-I-48	70	95	117	139	30-III-49	141																	

Durée de Survie: ▼ 150 jours ▼ 300 jours ▼ 450 jours

TABLEAU V-c.

mois	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8
	Date de greffe	Poids à greffe	Après 1 mois	Après 3 mois	A la mort	Date de la mort	Poids maximum atteint	Hypophyse	Seins	Surrénales	Varia									
35	2-1-48	65	80	104	80	27-V-48	107		—	±										
♂ 36	8-1-48	76	100	127	146	24-II-49	195	Adénome 174 mg	—	±										
37	8-1-48	86	105	113	100	20-IX-48	115	Adénome	—	±	Pyosalpinx									
♂ 38	8-1-48	77	93	109	101	2-XI-48	120		—	±										
39	8-1-48	82	103	121	137	26-XI-48	137	Adénome	—	±										
♂ 40	8-1-48	82	110	137	130	9-VIII-49	246	Adénome	—	±										
41	8-1-48	84	94	112	134	12-III-49	150		—	±										
♂ 42	12-1-48	78	95	105	115	22-VII-49	120	Adénome	—	±										
43	12-1-48	100	109	123	103	7-1-49	139	Adénome	—	±										
♂ 44	12-1-48	99	109	128	126	14-III-49	146	Adénome	—	±										
45	12-1-48	58	84	97	101	25-X-48	101		—	±										
♂ 46	12-1-48	96	113	134	155	1-IV-49	155	Adénome	—	±										
47	12-1-48	65	89	99	126	5-1-49	126		—	±										
♂ 48	13-1-48	76	97	112	95	26-1-49	120		—	±										
49	13-1-48	74	96	107	121	2-1-49	124	Adénome	—	±	Pyosalpinx Calc. Vessie N.									
♂ 50	13-1-48	54	80	105	130	29-XII-48	130	Adénome	—	±	Calc. vésicaux. Vessie norm.									
Durée de Survie:													150 jours	300 jours	450 jours	600 jours				

RÉSULTAT ET CONCLUSIONS

I. - Dans la première partie de ce travail nous avons montré que l'on pouvait, chez la levure, induire des mutations ou des modulations à l'aide d'un agent cancérigène hydrosoluble comme le styryl 430. Les variants ont des caractéristiques biochimiques et morphologiques différentes des souches originales.

Nous avons également montré l'existence chez la levure, de mutations en deux ou plusieurs temps.

Le milieu de culture joue un rôle important dans l'apparition de ces mutations.

Le premier temps est un temps réversible sous l'influence de certains milieux riches comme le moût de malt. Le deuxième temps est irréversible ou difficilement réversible sous l'influence du milieu.

Nous avons aussi montré que certains extraits de levure ont une influence sur la production du premier temps de ces mutations.

II. - Dans la deuxième partie de ce travail nous avons montré l'analogie existant entre les processus de cancérisation par substances cancérigènes et les mutations en deux temps chez la levure.

Nous avons montré l'influence du milieu sur l'expression de ces « mutations » en deux ou plusieurs temps caractérisant le cancer.

Nous avons montré ensuite que des facteurs alimentaires peuvent influencer dans les deux sens l'apparition du deuxième temps caractérisant le cancer (cancers du foie provoqués par les azodérivés et cancers de la peau provoqués par le méthylcholanthrène).

Nous avons enfin montré que les hormones ne sont pas des agents cancérigènes au sens propre du terme mais des facteurs de milieu permettant de réaliser une cancérisation existant par ailleurs en potentiel.

BIBLIOGRAPHIE

CHAPITRE I.

- BOYLAND E. and HORNING E. S., *British Journal of Cancer*, V, III, p. 118, 1949.
- WINGE O. et LAUSTSEN O., On a cytoplasmic effect of inbreeding in homozygous yeast. *Compt. rendus. trav. lab. Carlsberg ser. physiol.*, t. 23, p. 17, 39, 1940.
- BEADLE G. W., *Genetics and metabolism in Neurospora*. *Physiol. Rev.*, t. 25, p. 643-663, 1945.
- BEADLE G. W. et TATUM, Genetic Control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 27, p. 499-506, 1941.
- HOROWITZ N. H. and BEADLE G. W., *Amer. Nat.*, t. 79, p. 304-317, 1945.
- TATUM E. L. *Biochemistry of Fungi*. *Ann. Rev. Biochemistry*, t. 13, p. 667-704, 1944.
- TATUM E. L. and BELL T. T., *Neurospora*. Thyamin synthesis, *Am. J. Botany*. t. 33, 1946.
- BEADLE G. W. et TATUM E. L., *Am. J. of Botany*, t. 32, p. 678, 1945.
- LINDEGREEN C. L., Mendelian and Cytoplasmic inheritance in yeasts. *Ann. of Miss. Bot. Garden*, t. 32, p. 107-123, 1945.
- LINDEGREEN C. C., SPIEGELMAN S. and LINDEGREEN G., Mendelian inheritance of adaptative enzymes in yeast. *Proc. Nat. Ac. Sc. U.S.A.*, t. 30, p. 346-352, 1944.
- SPIEGELMAN S., LINDEGREEN C. C. and LINDEGREEN G., Maintenance and increase of a genetic character by a substrate-cytoplasmic interaction in the absence of the specific gene. *Proc. Nat. Acad. Sc. U. S. A.*, t. 31, p. 95-102, 1945.
- SONNEBORN T. M., *Gene and Cytoplasm*. *Proc. Nat. Acad. Sc. U. S. A.*, t. 29, p. 329-338, 1943.
- LINDEGREEN C. L., *Yeast Genetics*. *Botanical. Rev.*, v. 9, n. 3-4, p. 111 à 170, 1945.

- SPIEGELMAN S., Nuclear and cytoplasmic factors controlling enzymatic constitution. Cold Spring Harbor symp. Biol., t. 11, p. 256, 1946.
- AUERBACH C., ROBSON J. M. et CARR J. G., The chemical production of mutations. Science, t. 105, p. 243, 1947.

CHAPITRE II.

- NADSON G. et PHILIPPOV G., C. R. Soc. Biologie, t. 93, p. 473, 1925.
- LACASSAGNE A., SCHOEN M. et BÉRAUD P., Ann. Ferment., t. 5, p. 129, 1939.
- BEADLE G. W., et TATUM E. L., Americ J. of Botany. t. 32, p. 678, 1945 et nombreux autres travaux.
- POURBAIX Y., C. R. Soc. Biologie, t. 110, p. 1015, 1932; t. 112, p. 1222, 1933; t. 113, p. 390, 1933; t. 115, p. 1738, 1934.
- HOLLAENDER A., SANSOME E. R., ZIMMER E. and DEMEREC M., Quantitative irradiation experiments with Neurospora Crassa. Am. J. Bot., t. 32, p. 226-235, 1945.
- HOLLWECK F. et LACASSAGNE A., C. R. Soc. Biol., t. 82, p. 1343, 1930.
- POURBAIX Y., C. R. Soc. Biol., t. 126, p. 92, 448, 451, 1937; t. 127, p. 364 et 1475, 1938.
- Acta Unio intern. C. Cancrum Vol. III, p. 31, n. 1, 1938; Vol. IV p. 719, n. 3, 4, 1939.
- POURBAIX Y. et DECLERCK J., Acta Biol. Belgica, t. 1, p. 20, 1942; t. 3, p. 309, 1942.
- BÉRAUD P., Am. Fermentat., t. 5, p. 108, 1939.
- WEISS P., Principles of Development H. Holt et Cie., 1939.
- MONOD J., The phenomenon of enzymatic adaptation, Growth symposium, t. 11, p. 223, 1947.
- CONSTANTIN TH., Comptes-rendus de la Soc. de Biol., t. 143, p. 131, 1949.
- LAUGERON M. et TALICE R. V., Ann. de Parasitologie, t. 10, p. 1, 1932.
- GUILLIERMOND A., Sur la phylogénèse des levures. C. R. Soc. biol., t. 66, p. 517, 1909.
- LEVAN A., Studies on the camphor reaction of yeast, Hereditas, t. 33, p. 457, 1947.
- ŠKOVSTED A., Induced Camphor Mutations in yeast C. R. Lab. Carlsberg, t. 24, p. 249, 1948.

- AUERBACH C., ROBSON J. M. et CARR J. G., The chemical production of mutations. *Science*, t. 105, p. 243, 1947.
- LATARGET R., Le problème du dosage du rayonnement ultra-violet en thérapeutique et en biologie. *Cahier de physique*, t. 23, p. 1, 1944.
- AUERBACH C. et ROBSON J. M., *Nature*, t. 154, p. 81-82, 1944; t. 157, p. 302-303, 1946.
- BEUMER J., *C. R. Soc. Biol.*, t. 142, p. 847, 1948.
- AVERY O., MACLEOD C. et MAC CARTY M., *Journal of Exp. Med.*, t. 79, p. 137, 1944.
- BOIVIN A., DELAUNOY A., VENDRELY R. et Mme LÉHOULT Y., *C. R. A. Soc.*, t. 221, p. 708, 1945; *C. R. Soc. Biol.*, t. 139, p. 1046, 1945.
- BOIVIN A., VENDRELY R. et TULASME R., *Arch. Soc. Physiol.*, t. 1, p. 36, 1947.
- MANNINGER et NOGRADI, *Exper.*, t. 4, p. 276, 1948.
- WEIL et BINDER, *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, t. 66, p. 349, 1947.
- KRUIS K. et SATAVA J., *Nakl-C-Akad. Praha*, 1918, cité d'après LINDEGREEN.
- WINGE O., On hapophase and diplophase in Some *Saccharomycetes* *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg Ser. Physiol.*, t. 21, p. 77 à 112, 1935.
- WINGE O., et LAUSTSEN O., On two types of spore germination and on genetic segregations in *saccharomyces* demonstrated through single spore cultures. *Ibid.*, t. 22, p. 99-116, 1937.
- LINDEGREEN CARL C., *Yeast genetics.*, *Bacteriological Rev.* V. 9, p. 111, 1945.

CHAPITRE III

- MAISIN J., FRANCOIS M. A. et Secret., *Ann. de la Soc. Scientifique Bruxelles*, t. 47, p. 197, 1928.
- MAISIN J. et FRANCOIS M. A., *Ann. de Medecine*, t. 24, p. 455, 1928.
- MAISIN J. et POURBAIX Y., *Am. J. Cancer*, t. 24, p. 257, 1935.
- MAISIN J., *Acta Unio Intern. C. Cancrum*, t. 4, p. 704, 1939.
- MAISIN J. et POURBAIX Y., *Bull. ass. Franc. p Et. du Cancer*, t. 29, p. 223-251, 1940.
- MAISIN J. et POURBAIX Y., *Revue Belge des Sc. Médicales*, t. XII, p. 241-255, 1941.
- ANDO T., *Gann.*, t. 32, p. 252, 1938 et t. 34, p. 371, 1940.
- KINOSHITA, *Jap. Soc. Diseases dig. org.*, t. 37, p. 513, 1938.
- NAKAHARA W. et MORI K., *Gann.*, t. 33, p. 13, 1939.

- NAKAHARA W., FUJIWARA T. et MORI K., Gann, t. 33, p. 57, 1939; t. 33, p. 406, 1939.
- SHUZO, MORIGAMI et KASIWABARA, t. 35, p. 65, 1941.
- MAISIN J., POURBAIX Y, et CUVELIER E., Compt. Rend. Soc. de Biol., t. 132, p. 315, 1939.
- DU VIGNEAUD V., SPANGLER J. M., BURK D., KENSLER C. J., SUGIURA K. and RHOADS C. P., Science, t. 95, p. 174, 1942.
- MILLER J. A., MINER D. L., RUSH H. P. and BAUMANN C. A., Cancer Research, t. 1, p. 699, 1941; t. 3, p. 296, 1943.
- MAISIN J. et BEECKMANS M. L., C. R. Soc. Biol., t. 141, p. 872, 1947; Acta Unio Intern. C. Cancrum, t. VI, p. 2, 1949.
- MAISIN J. et BEECKMANS M. L., C. R. Soc. de Biol., t. 141, p. 872, 1947; t. 142, p. 569, 1948.
- LACASSAGNE A., C. R. ac des Sc., t. 195, p. 630-632, 1932; C. R. Soc. Biol., t. 129, p. 641-643, 1938.
- GESCHICHTER C. F., Science, t. 89, p. 35-37, 1939; Radiology, t. 33, p. 439-444, 1939; Acta Unio Intern. C. Cancrum, t. 5, 1940.
- DUNNING W. F., CURTISS M. R. et SEGALOFF A., Acta Unio Inter. C. Cancrum, t. VI, p. 2, 1949.

R É S U M É

Nous avons pu montrer qu'une substance cancérigène, le styryl 430, est un agent de mutation efficace vis-à-vis d'une variété de levure « *Saccharomyces Cerevisiae* ». Ces mutations paraissent se faire en deux temps. Un premier temps ou stade que nous appelons métastable, est un stade réversible permettant dans certaines conditions de milieu, un retour vers le stade normal initial. Au cours d'un 2^e temps apparaissent alors des mutations à caractère plus stable dont le retour vers le type initial est très difficile ou impossible. Nous montrons que le rôle joué par le milieu nutritif est très important dans le déterminisme d'apparition des mutations. Ainsi certains extraits provenant de certaines souches peuvent induire des modifications comparables à celles du styryl 430.

Nous montrons ensuite que les cellules normales de mammifères soumises à l'action d'une substance cancérigène tel que le méthylcholanthrène par exemple, se comportent jusqu'à un certain point comme la cellule de levure, comme si la cancérisation était une mutation en deux temps. Au cours d'un premier stade, la cellule modifiée est dans un état métastable. Elle peut guérir, redevenir une cellule normale ou passer au deuxième stade et devenir cancéreuse, stade très difficilement réversible ou peut-être irréversible. Nous montrons que le milieu ici aussi et notamment le milieu nutritif a une influence nette sur le comportement et la destinée de la cellule qui a été en contact avec le cancérigène.

S U M M A R Y

We have been able to prove that a carcinogenic substance, Styryl 430, is an active agent of mutation when acting on a certain kind of yeast « *Saccharomyces Cerevisiae* ». Mutations seems to occur in two stages. A first stage, which we called « metastable » is a reversible one which allows

under some conditions of milieu a return to the normal, starting point. During a second stage changes appear to have a character of greater stability, the return to the initial or normal conditions is very difficult or altogether impossible. We show that culture medium plays an important part in the determinism of the mutations. So some extracts obtained from some strains may induce changes which are similar to those induce by styryl 430.

We are further demonstrating that normal mammalian cells submitted to the action of a carcinogenic substance as e.g. methylcholanthrene, behave up to a certain point, like yeasts' cells as if cancerisation were a change taking place in two steps. During the first stage the modified cell is in a metastable condition: it may recover, returning to normal or pass on to a second stage, becoming cancerous. This is a hardly reversible stage or perhaps altogether irreversible. We show that milieu and chiefly culture medium has a great influence on the behaviour and development of a cell which has been submitted to the carcinogenic agent.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Wirkung von Styryl 430 auf das Wachstum von Hefebazillen untersucht. Die durch Styryl herbeigeführten Zellveränderungen wiesen zwei Stadien auf. Das erste « metastabile » Stadium ist reversibel und gestattet unter bestimmten Umständen den Rückgang in das normale Ausgangsstadium. Nach einem bestimmten Intervall treten Veränderungen von einem mehr stabileren Charakter auf, deren Rückbildung in das Ausgangsstadium nur mehr sehr schwierig oder nicht mehr möglich ist. Bezüglich des Auftretens dieser Veränderungen ist das Ernährungsmilieu ausserordentlich wichtig. Es mögen auch andere Stoffe ähnliche Veränderungen wie das Styryl 430 an den Hefezellen herbeiführen.

In weiterem Verlaufe konnte gezeigt werden, dass die normalen Zellen von Säugetieren, welche der Einwirkung einer kanzerogenen Substanz, wie beispielsweise dem Methylcholanthren unterworfen wurden, sich bis zu einem gewissen Grade wie die Hefezellen verhalten, als ob die Krebsentstehung sich wie eine zweizeitige Mutation abspielt. Im ersten Stadium befindet sich die veränderte Zelle noch in einem metastabilen

Zustand. Sie kann ausheilen, wieder eine normale Zelle werden oder aber im zweiten Stadium zur Krebszelle werden. Es konnte gezeigt werden, dass auch hier das Ernährungsmilieu einen sehr wichtigen Einfluss auf die Zelle, die dem Einfluss eines kanzerogenen Stoffes ausgesetzt wurde, ausübt.

S O M M A R I O

Abbiamo potuto dimostrare che una sostanza cancerogena, lo Styryl 430, è un agente di mutazione attivo in presenza di una varietà di lievito « *Saccharomyces cerevisiae* ». Queste mutazioni sembrano comparire in due tempi: il primo tempo o stadio, che noi chiamiamo metastabile, è uno stadio reversibile, che permette, in certe condizioni di ambiente, un ritorno verso lo stadio normale iniziale. In un secondo tempo apparirebbero poi delle mutazioni a carattere più stabile: in questo stadio il ritorno verso il tipo iniziale è molto difficile o addirittura impossibile. Abbiamo osservato che il terreno nutritivo ha un ruolo molto importante nel determinismo della comparsa delle mutazioni. Così certi estratti provenienti da alcuni ceppi possono indurre delle modificazioni comparabili a quelle prodotte dallo Styryl 430.

Abbiamo dimostrato poi che le cellule normali dei mammiferi se sottoposte all'azione di una sostanza cancerogena, come per esempio il metilcolantrene, si comportano in un certo senso come le cellule dei lieviti, come se la cancerizzazione fosse una mutazione in due tempi. Nel corso del primo stadio la cellula trasformata è in uno stato metastabile, essa può guarire, ridiventare cioè una cellula normale oppure passare al secondo stadio diventando così cancerosa: questo stadio è molto difficilmente reversibile o addirittura irreversibile. Abbiamo osservato che l'ambiente in genere e particolarmente il terreno nutritivo ha una influenza netta sopra il comportamento ed il destino della cellula, che è stata in contatto con l'agente cancerogeno.

DISCUSSION:

PENTIMALLI: Je suis bien d'accord que les phénomènes de mutation ont grand importance pour une théorie générale de la cancérisation. Mais je dois observer, comme pathologue, que les cellules qui ont subi des mutations connues (p. ex. changement de couleur) continuent à obéir aux lois générales de l'organisme et pour cela ne sont pas des tumeurs. Les phénomènes que je connais décrites comme « mutations », ne constituent pas, à mon avis, des tumeurs. Et s'il est vrai que le procès de cancérisation produit une mutation tant morphologique que métabolique dans la cellule, la proposition contraire que chaque mutation soit un cancer n'est pas également vraie.

GREENSTEIN asks: Have yeasts treated with styryl altered fermentative power? And is so, can this power be restored by supplementation of the medium?

GREENSTEIN: 1. Is there any observable metabolism of styryl by the yeast? Is the adaptation of the yeast an accomodation to what might be considered a modified medium?

2. How soluble was the styryl in the medium used? And did it get into the yeast cell as unaltered styryl?

LACASSAGNE: Les modifications des levures, obtenues par le styryl 430, rappellent beaucoup celles que LACASSAGNE, SCHOEN et BÉRAUD avaient décrites chez *Sacharomyces Ellipsoïdeus* après irradiation. Plusieurs « radioraces » de cette levure ont pu être sélectionnées; elles ont conservé intacts leurs nouveaux caractères pendant plusieurs années.

PEACOCK: Does the aqueous solution of styryl 430 enter the yeast cells and if so does it form precipitate granules as it does in animal cells?

RONDONI demande si le principe produisant la mutation décrite par MAISIN est comparable à l'inducteur de Avery pour la mutation du pneumocoque.

SCHINZ: 1. Was sind die Kriterien, um die erhaltenen Formen von *Saccharomyces Cerevisiae* für Mutationen zu halten?

2. Handelt es sich um somatische oder gametische Mutationen? Um Gen-Mutationen oder Chromosomen-Mutationen?

3. Haben Sie mit anderen cancerogenen Stoffen oder mutagenen Stoffen ähnliche Veränderungen bei Ihrem Objekt erhalten?

MAISIN à SCHINZ: Il m'est impossible de dire au Prof. SCHINZ si les mutations produites sont des mutations chromosomiales. Par contre je puis dire qu'il s'agissait de modifications permanentes jusqu'ici absolument irréversibles caractérisées par des modifications de formes, des modifications ou des pertes de fonctions enzymatiques, l'apparition de caractères particuliers telle que la production de pigment. Je ne puis dire néanmoins qu'il s'agit de modifications chromosomiales, parce que la levure styryl, premier stade du premier temps de la mutation, ne sporule plus, ou moins; dans les expériences faites dans nos laboratoires par ma collaboratrice M.lle CONSTANTIN elle n'a pas sporulé. Par conséquent nous ne savons pas avec certitude si nous travaillons avec une forme haploïde ou diploïde. D'après LINDEGREEN, la forme haploïde de toute levure est capable d'adaptation à un degré extraordinaire, adaptation qui même à l'apparition de formes particulières qui font penser à des mutations mais qui, dans ce cas, n'en sont pas. Il pense que dans leur état diploïde l'allele dominant empêche les modifications structurales par adaptation. Quoi qu'il en soit, le premier temps des modifications observées par nous est parfaitement réversible, le second temps ne l'est pas. Nous manquons actuellement d'une terminologie adéquate pour exprimer certains phénomènes biologiques que

nous observons dans le domaine des modifications structurales et fonctionnelles induites par les agents cancérigènes et qui, par certains cotés rappellent les mutations, par d'autres, les *modulations* au sens de Weiss.

À RONDONI: Nous avons pu produire le premier temps de nos « mutations » par des extraits de levure « Styryl » ou de levure type « filamenteux » (précipité à l'acide trichloroacétique N/2), lavé à la soude caustique pH 10 et ramené ensuite au pH de la culture. La modification inverse jusqu'ici n'a jamais pu être réalisée. Il s'agit certes d'un phénomène qui rappelle les expériences de AVERY avec les pneumocoques et de BOIVIN avec les colibacilles.

À GREENSTEIN: 1. Les levures traitées au styryl (type S) ainsi que nous le montrons dans ce travail présentent des modifications de leur pouvoir fermentaire. Ces modifications sont réversibles ou non suivant les conditions de milieu. Nous n'avons pas testé la réversibilité de ces modifications pour les formes « stables » telles que les formes filamenteuses.

2. Nous ne connaissons rien au sujet des métabolites du Styryl par la levure. Le styryl est parfaitement soluble au pH convenable et mélangé à la gélose glucosée et peptonée il est entièrement incorporé à la masse. Il est difficile de suivre son sort par après et de dire si oui ou non il est certainement présent dans les levures qui se développent en son contact. (Voir plus bas la réponse au Dr. PEACOCK).

Les formes pigmentées de levures observées par nous produisent un pigment rouge ou brun qui n'a rien à voir avec le styryl. Nous avons fait analyser ce pigment par un des biochimiste de notre Institut, le Dr. LAMBERT, et il appartient à la classe des Chromo-lipoïdes.

Quant aux contaminations produites, nous pouvons affirmer que nous avons fait le nécessaire pour les éviter et les contrôles toujours faits ont été négatifs. Qui plus est l'expérience peut être répétée un grand nombre de fois dans le même sens à savoir qu'en se mettant dans les conditions voulues de milieu on induit des « Mutations » stables aux dépents des formes styryl sans toutefois qu'on puisse

prévoir le type de celles-ci. En d'autres mots, nous n'avons pas encore pu réaliser de « Mutations » dirigées.

À LACASSAGNE: Ce que vient de dire le Prof. LACASSAGNE confirme donc la stabilité des formes obtenues. M.lle CONSTANTIN dans nos Laboratoires a d'ailleurs pu reproduire à l'aide des U. V. à doses appropriées le premier temps de la mutation, c'est-à-dire le stade « clair » ou stade « S ».

À PEACOCK: Le styryl certes précipite au contact des tissus vivants et injecté; dans l'organisme il devient une masse insoluble restant en place très longtemps et provoquant des tumeurs. Il est toutefois parfaitement soluble dans l'eau à pH bien ajusté et nous pouvons affirmer que le mélange avec le milieu de culture gélosé est parfaitement homogène. En milieu peptoné liquide le styryl est aussi parfaitement soluble. Quand on ajoute à ce milieu « styryl » de couleur rouge une certaine quantité de levure en culture liquide par exemple un centimètre cube, on voit le styryl se précipiter sur les levures ajoutées et s'accumuler avec elles au fond du tube. Les levures adsorbent finalement la totalité ou la plus grande partie du styryl du milieu. Nous pensons que ce sont là des circonstances particulièrement favorables permettant à la levure de subir l'action du styryl.

THE BIOCHEMISTRY OF CARCINOGENESIS AND EXPERIMENTAL CHEMOTHERAPY OF CANCER

PROF. E. BOYLAND (LONDON)

During the first quarter of the present century the study of cancer was mainly advanced by pathologists who examined the structure and dissemination of the many different types of malignant disease. During the second quarter of the century, however, our knowledge of cancer has perhaps been increased more by biochemical investigations and the implication which they have for future research.

The first pure chemical agents which will produce cancer and the many chemical substances which can be used in the treatment of cancer have been described during the last twenty years. The two effects of carcinogenesis and therapy of cancer are often shown by the same agents though they were usually discovered independently. The two kinds of effect were first described following the action of X rays. Soon after Röntgen's discovery of X rays they were used by many clinicians for the treatment of diseases including cancer and after a few years experience with these radiations they were found to be capable of inducing cancer. The first tumour due to exposure to X rays appears to have been described by FRIEBEN [1] in 1902.

Many years later MULLER [2] showed that radiations increased the incidence of mutations in *Drosophila*. Still later MULLER found that X rays caused visible abnormalities of chromosomes. These four different effects - inhibition of tumour growth, induction of cancer,

induction of mutations and damage to chromosomes - are often associated. We will see that these four effects are usually all produced by carcinogenic agents so that they seem to be related to each other.

During the last war the biological affects of mustard gas, β dichloro-diethylsulphide and of the nitrogen mustards were investigated and their leucopenic action was observed many times. Because of this effect American workers used the nitrogen mustards in the treatment of leucaemia and related diseases. Good results were obtained in the treatment of Hodgkin's disease and these compounds are now used as substitutes for radiotherapy and in the treatment of cases which are resistant to radiation. Quite independently of this AUERBACH, ROBSON and CARR [4], working in Edinburgh, found that these vesicants increased the incidence of mutations in *Drosophila*. After the war KOLLER and I [5] found that the nitrogen mustards produced chromosome breaks in cancer cells similar to those produced by X ray. In the last year HORNING and I have induced tumours in mice with the nitrogen mustards. The tumours obtained included bronchial carcinomata, sarcomata and lymphosarcomata. Thus all the four effects obtained with X rays have been produced with nitrogen mustards.

These four effects have been obtained with the carcinogenic aromatic hydrocarbon 1 : 2 : 5 : 6 - dibenzanthracene, which was the first pure compound shown by Sir ERNEST KENNAWAY [6] to have carcinogenic activity. The inhibition of growth with this substance was shown by HADDOW [7]. CARR [8] has described mutations induced in mice by this carcinogen and KOLLER [9] has obtained chromosome breaks similar to those following irradiation. They are also seen following treatment with methylcholanthrene, a carcinogenic hydrocarbon which is more rapid in its action than most of the chemical carcinogens which have been discovered. Mutations in mice following treatment with methylcholanthrene have been described by STRONG [10]. ENGELBRETH-HOLM [11] has used the very potent carcinogenic hydrocarbon 9 : 10 - dimethyl 1 : 2-benzanthracene in the clinical treatment of leucaemia. The effects of carcinogenesis, inhibition of growth and chromosome damage have also been seen with urethane. Urethane was shown by American workers [12] to be able to induce cancer of the lung in mice. Almost at the same time

and quite independently British scientists [13] found that it inhibited the growth of tumours and that it was particularly effective in controlling chronic leucaemia. Urethane is now used extensively in the palliative treatment of chronic myeloid leucaemia; it also causes breakage of chromosomes in the same way as other radiomimetic agents.

Although the action of urethane on tumours is similar to that of nitrogen mustard it is very much weaker. A dose of 1 g. urethane per kg body weight has about the same effect as a dose of one tenth of a milligram of nitrogen mustard (HN₂), so that the mustard is 10,000 times more active than urethane. The nitrogen mustard is of course also much more toxic to the host. These doses of 1 g. urethane per kg body weight or 0.1 mg nitrogen mustard per kg body weight produce about the same effect as irradiation with 30 roentgens of X rays. Although urethane has been used as an anaesthetic for a long time we still do not know how it acts biochemically. During the last few months we have found that it increases the respiration of treated tumours. This may be due to the urethane blocking the utilisation of energy from respiration processes.

Two other groups of carcinogenic compounds which are of interest have been described by Professor HADDOW and his colleagues. The first are the aminostilbenes [14] which were first found to be potent inhibitors of growth of tumours and of young animals and later shown to induce cancer in many different parts of the body. The aromatic nitrogen mustards [15] are another group of substances which were first found to inhibit the growth of tumours and were later found to produce cancer in animals. One of the compounds of this series, the bis (β β' chloroethyl) 2 naphthylamine is being used clinically in the treatment of Hodgkin's disease. It has some advantages over the aliphatic nitrogen mustards such as methylchloroethylamine (HNZ). In the first place it is much less toxic and can be given by mouth instead of by intravenous injection. Also it does not produce nausea and vomiting in patients which is one of the disagreeable features of the use of the original nitrogen mustard.

Another group of substances which have the two actions of inducing cancer and inhibiting cancerous growth are the oestrogens. The natural oestrogens such as oestrin or the synthetic oestrogens

like stilboestrol are able to induce cancer of the breast or cancer of the pituitary gland in suitable animals. These same oestrogens are of great value in treatment of cancer of the prostate in men and in a proportion of cases of cancer of the breast in elderly women. KOLLER has shown that treatment of tumours with stilboestrol causes damage to chromosomes. Although the oestrogens are carcinogenic in the broad sense that their administration to certain animals causes them to have tumours which they would not otherwise have, on the other hand the mechanism of action is probably different and less direct than that of carcinogenic hydrocarbons.

The androgens such as testosterone, which are sometimes found to inhibit the growth of mammary cancer in young women, have also been found to produce cancer in mice. These numerous examples show that there must be some significant connection between growth inhibition or palliative treatment of cancer and of cancer induction.

Although all the means used for treatment of cancer at present can be shown to be carcinogenic, the carcinogenic action is usually not a serious hazard. Radiological treatment is controlled so that the treatment is unlikely to cause cancer. The chemotherapeutic agents are unlikely to be carcinogens under the conditions of clinical use because the carcinogenic action is slow and cancer patients are unlikely to live long enough for the carcinogenic action to develop. The possibility of inducing cancer by the drugs I have mentioned indicates that these drugs including the nitrogen mustards and urethanes should not be used for less serious diseases than cancer, particularly in young patients.

Although the nitrogen mustards produced tumours in mice in a number of different sites the action was very slow. One lung tumour appeared after treatment for 284 days but most of the tumours were not seen until the mice had been dosed for over a year. Now BERENBLUM [16] has shown how carcinogenic action can be divided into an initial stage in which cells are irreversibly changed into latent tumour cells and a development stage which can be brought about by cocarcinogens such as croton oil. The proportion of animals treated which develop tumours is probably dependent on the initiating action while the rate of appearance of the tumours depends upon cocarcinogenic action. The fact that the mice treated with

nitrogen mustard developed tumours very slowly but that the tumours occurred in most of the treated mice which survived a year, indicates that the nitrogen mustards have initiating power but little cocarcinogenic action. The initiating stage is probably associated with the chromosome damage and is related to the radiomimetic action. The cocarcinogenic action is responsible for the development of these initially changed cells into a visible tumour. In a rapidly acting carcinogenic hydrocarbon such as methylcholanthrene the two factors responsible for initiation and development are presumably present in the same compound.

This initiating action or the first step of carcinogenesis is only one of the kinds of activity which is common to these carcinogenic vesicants and radiations. These effects have been called radiomimetic because they are similar to those produced by ionising radiations. Many radiomimetic effects have been described.

(1) The burns produced by X-rays lead to blisters like those produced by vesicants. In this as in other radiomimetic effects the vesicants are more rapidly acting than radiations. The vesicle is the result of a localized and limited toxic action. If vesicants are applied in massive doses a necrotic reaction rather than a vesicle is produced.

(2) When given in lethal doses vesicants and ionizing radiations cause delayed death in 3-20 days with haemoconcentration, diarrhoea and leucopenia. The toxic actions of nitrogen mustard and X-rays are additive if the nitrogen mustard is given first, but if mice are first irradiated and then dosed with nitrogen mustard the total lethal action is less. This suggests that treatment with X-rays reduces the sensitivity of cells to nitrogen mustard. The lethal action of nitrogen mustard is more rapid than that of X-rays. Such mice as die following a dose of nitrogen mustard approximating to the median lethal dose survive 3-8 days. Mice killed with the median lethal dose of X-rays, which is about 600 roentgens, usually die between the 7th and 15th day following irradiation.

(3) Both the poly- β -chloroethylamines and radiations damage the nuclei of cells causing increased stickiness of chromosomes as shown by the presence of dumbbell forms. Both types of agent cause chromosome breaks. The effects on nuclei may be due to inhibition

of phosphokinases concerned in nucleic acid metabolism. Treatment with croton oil did not produce any chromosome damage.

(4) Both chloroethylamines and radiations are mutagenic. X-rays and methyl-di-(β -chloroethyl)amine cause mutations in *Drosophila*. Mutant strains which are more exacting in their nutritional requirements have also been caused in *Neurospora* by X-rays and by nitrogen mustard. The occurrence of mutations is perhaps the best indication of abnormalities of cell divisions as these are functional manifestations of the process.

(5) If aqueous solutions of polychlorethylamine hydrochlorides (HN_2 or HN_3) are injected subcutaneously into coloured mice the hair continues to grow, but at the site of injection the hair is white [5]. This effect seem to be permanent, as white patches have remained on black mice for over a year after injection of either the aliphatic or aromatic nitrogen mustards.

Irradiation appears to loosen hair of human patients, but implantation of radio-active material (plutonium) or exposure to X-rays in black mice causes bleaching of hair in the same way as injection of vesicants. This greying of hair is possibly a somatic mutation but it may be due to the selective killing of cells which produce pigment.

(6) As has been mentioned the radiations [1] and nitrogenous vesicants [17] are both able to induce cancer in animals. Professor HADDOW [18] has been able to induce cancer in animals with aromatic bis-(chloroethyl)amine derivates.

(7) Both radium and vesicants damage bone marrow and lymphoid tissue. In bone marrow with both types of treatment there is degeneration of leucocytes and myelocytes. The histological damage following treatment with mustard gas is accompanied by a fall in the glycolysis and respiration of bone marrow as measured *in vitro*. This damage which causes a reduction in the circulating leucocytes and thrombocytes leading to leucopenia and thrombocytopenia, which may allow petechial internal haemorrhages to develop, is a common result of high doses of radiations and vesicants. Clinical experience suggests that the leucocytes of patients suffering from Hodgkin's disease are more sensitive to the action of nitrogen mustard than are leucocytes of patients with carcinomas of different types.

(8) The radiation sickness following treatment with X-rays is well known as one of the adverse effects of radiological treatment. If lethal doses of X-rays are given to animals, diarrhoea and haemoconcentration due to loss of fluid occur. All these effects are found with nitrogen mustard. Patients treated with the chloroethylamines generally suffer from nausea and vomiting, but this does not appear to be prevented by pyridoxin. Animals given lethal doses of nitrogen mustard suffer from diarrhoea, but the clinical use of these drugs has caused only slight diarrhoea very occasionally.

(9) Vesicants in general are potent inhibitors of enzymes, particularly hexokinase [19], and the toxic effects of these substances may be due to inhibition of hexokinase or other phosphokinases in the tissues. The phosphokinases are those enzymes which are responsible for the esterification of tissue constituents and metabolites with phosphoric acid and the transference of phosphate groups between different substances.

The glycolytic system and the phosphokinases are particularly sensitive to vesicants whether they be reactive halogen compounds like methyl bromide and the mustards, or unsaturated lactones like proto-anemonin. Although the phosphokinases contain sulphhydryl groups, the inactivation by mustard gas does not appear to be due to action through the sulphhydryl groups. The vesicants also inhibit other enzymes including proteinases and peptidases, but the phosphokinases appear to be the most sensitive to poisoning by these agents. When rats bearing tumours are dosed with sufficient nitrogen mustard to inhibit the growth of the tumour the glycolysis of the tumour tissue is reduced.

The ionizing radiations are also general enzyme poisons, showing effects in many enzymes including carboxypeptidases. There is, however, some evidence that radiations have oxidising effects, and BARRON, DICKMANS and SINGER [20] consider that radiations can poison sulphhydryl enzymes by virtue of this oxidising action, and have shown that phosphoglyceraldehyde dehydrogenase is completely inhibited by exposure to 500 roentgens of X-rays. This enzyme is much more sensitive than yeast hexokinases to X-rays, so that the effect may be different from that of vesicants.

The fact that the nitrogen mustards are potent inhibitors of hexokinase (the enzymes which causes glucose to react with phosphate) and of the group of enzymes known as phosphokinases in general, seems to be specially significant. These enzymes are necessary for the utilisation of the energy of metabolism in synthetic processes of the cell. The synthesis of nucleotides and nucleic acids must involve formation of phosphoric esters and the transfer of phosphate groups from a phosphate donor such as adenylyl pyrophosphate to a carbohydrate, purine or to amino acids. These enzymes which are involved in nucleic acid synthesis are easily inhibited by the nitrogen mustards. Cells poisoned with nitrogen mustard are therefore likely to be deficient in enzymes concerned in the synthesis and function of nucleic acids. This deficiency may lead to the visible abnormalities of chromosomes and the damaged genes causing genetical mutations and cancer.

This would suggest that the changes produced are random or accidental variations from the normal. The inhibition of the enzymes increases the difficulty of cell division and, if the division proceeds, the possibility of the occurrence of errors of division is increased. This would explain the association of the effects of inhibition of growth and of the production of damaged chromosomes, mutations and cancer.

The mutant forms and the tumours probably arise in the cells or organism which have received a sublethal dose of the agent. The tumours which arise as the result of treatment of cells with a mutagenic agent are derived from a normal host cell which has produced daughter cells differing from the parent cell because of some accidental error or abnormality of cell division. When the total number of cell divisions in the whole mammalian body are taken into account these abnormalities are very infrequent under normal conditions. The chance of their occurrence seems to be made much more probable by the presence of a carcinogenic or mutagenic agent which possibly increases the difficulties of cell division.

If the change brought about by carcinogenic agents are random variations of original cells as suggested it is perhaps surprising that different tumours are so similar in their morphology and biochemistry. Each tumour has its own specific characters but the differences

between tumours induced by carcinogenic agents are relatively small. Different tumours resemble each other more closely than they resemble the tissue of their origin. Thus tumours have less of the specific functions of the cell from which the tumour arose and tumours have the property of producing lactic acid aerobically. Of the mutations which occur in somatic cells probably many are unable to survive; many will die normally and others will be unable to withstand the attacks of defence processes of the host. Of the numerous mutations which occur, only these which produce cells able to survive, grow and induce the host to provide a blood supply will become detectable cancers and for these biological processes specific characters of function and morphology are required. As the changes are induced by substances which damage the chromosome material, and probably the genes (either directly or indirectly) the changes are probably the result of loss or inactivation of genes, as it seems unlikely that a toxic agent should add something to the nuclear material. Such changes would be analogous to the mutations induced in *Neurospora* which result in the loss of ability to carry out some specific chemical process.

The biochemical mechanism which operates when radiations, nitrogen mustards or carcinogenic hydrocarbons induce mutations or cancer, is still obscure. The nitrogen mustards or chloroethylamines are chemically reactive and combine with many tissue constituents and inactivate many enzymes, but particularly the phosphokinases and the pyruvic oxidase system. In order to produce chromosome damage and inhibition of the growth of tumours in animals the aliphatic chloroethylamines must have two chloroethyl groups. Thus while methyl bis (β -chloroethyl) amine inhibits tumour growth and produces specific chromosome damage dimethyl- β -chloroethylamine is inactive in these respects. GOLDACRE, LOVELESS and ROSS [21] have suggested that the two active groups join chromosome parts by cross linkage of protein or other constituents. As a result of these additional cross linkages the division of chromosomes is hindered and breakages and damage to the chromosomes occurs. This theory would not account for the action of urethane (which seems to have no chemically reactive groups) and it is difficult to see how arsenicals such as sodium arsenite could act in this way. Sulphydryl com-

pounds are the only body constituents with which arsenite is known to react. As there is very little cysteine or other sulphhydryl compound in chromosomes, combination of chromosome chains by union of sulphhydryl groups through an arsenic atom is unlikely to occur.

One hypothesis, known as the target hypothesis, advanced for the action of radiations is that the radiations hit a particular part of a chromosome and thus causes chromosome damage directly or inactivate a gene. Such a process might take place with the radiomimetic compound by direct chemical combination with chromosomes or genes. There are therefore at least three theories for the action of radiations and radiomimetic drugs. These are the inactivation of enzymes, the cross linking of dividing chromosomes and the target hypothesis. Further investigation should show which is the true mechanism for the action of these agents and experimental study of the theories is likely to lead to better knowledge of the nature of cell division.

The substances which induce mitotic abnormalities differ greatly in their apparent chemical reactivity. The nitrogen mustards are very reactive substances, the aromatic chloroethylamines react slowly but the aromatic carcinogenic compounds are rather inert. The French theoretical chemists DAUDEL [22], PULLMAN and their associates working under the inspiration of LACASSAGNE have shown that the carcinogenic hydrocarbons have regions, known as the K regions, in which there is a high electron density, which in the majority of carcinogenic hydrocarbons resembles a phenanthrene double bond.

The mean electron density of an area of the molecule depends upon the electrons attached to the bond and the electrons around the atoms at each end of the bond. In the non-carcinogenic hydrocarbons such as anthracene, the high electron density areas of the meso carbon atoms and of the reactive double bonds do not overlap so that there is no region approximating to the size of a carbon-carbon bond with a particularly high electron density. In phenanthrene, because the electron-rich carbon atoms are joined by an electron-rich bond, the density of the region is higher than any similar region in anthracene, but is not so high as in the carcinogenic hydrocarbons. The region of high electron charge has been called.

TABLE I. — *Reaction of carcinogens and related substances with perbenzoic acid. M/50 solutions of substances dissolved in carbon tetrachloride with M/50 perbenzoic acid at 25°C. The remaining perbenzoic acid was estimated iodometrically and the results are expressed as millimols of perbenzoic acid used per mol substrate.*

COMPOUND	TIME IN HRS.				CARCINOGENIC ACTIVITY
	3	24	48	72	
9 : 10 Anthraquinone	5	0	0	5	—
Naphthalene	0	0	20	10	—
Phenanthrene	5	15	20	25	—
9 : 10-Phenanthraquinone	0	0	25	35	—
Anthracene	5	35	60	80	—
1 : 2-Benzanthracene	0	25	70	95	—
1 : 2 : 5 : 6-Dibenzanthracene	0	15	35	95	+
5-Methyl-1 : 2-benzanthracene	0	40	40	110	+
4-Aminostilbene	32	85	120	140	+
2-Acetylaminofluorene	0	40	100	160	+
3 : 4-Benzpyrene	5	90	130	202	+
3 : 4-Benzphenanthrene	45	90	145	220	+
Stilbene	5	20	110	295	?
3 : 4 : 5 : 6-Dibenzcarbazol	95	215	265	322	+
20-Methylcholanthrene	105	275	340	405	+
2'-Methyl-4-dimethylaminostilbene	215	405	465	535	+
2'-Chloro-4-dimethylaminostilbene	175	390	500	590	+
Dimethylaminoazobenzene	455	590	615	—	+

the K region by the PULLMAN, and in carcinogenic hydrocarbons the calculated mean electron charge of the area has been found to be between 1.29 and 1.35 in the examples for which the laborious calculations have been made. There is close correlation between carcinogenic power and electron density of the K region.

The activation is enhanced by substituents such as benzene rings or methyl groups which repel electrons, in such positions that they increase the electron density of the phenanthrene double bond. This double bond in the more potent carcinogenic hydrocarbons such as 9:10-dimethylbenzanthracene has a chemical reactivity in some addition reactions approaching that of an aliphatic ethylenic bond and even greater than that of the ethylene bond of some stilbenes. This theory which is now substantiated by experimental evidence, suggests that the more active carcinogens in any particular series of aromatic compounds are those which are the most chemically reactive in addition processes.

Phenanthrene itself reacts readily with osmic acid [23] and the carcinogenic hydrocarbons react even more rapidly [24]. Osmic acid adds on to the double bond of the K region to form an adduct. The osmic acid adducts can be easily hydrolysed to give *cis*-dihydroxy-dihydro derivatives.

Perbenzoic acid is another reagent which appears to react with carcinogenic hydrocarbons at rates varying with the carcinogenic activity. This reagent was shown to react with methylcholanthrene and 3:4-benzpyrene more rapidly than with anthracene and phenanthrene by ECKHARDT [25] before the theory of the K region of carcinogens had been developed. In looking for a means of measuring the relative reactivity of the K region, the reaction of perbenzoic acid with a series of carcinogens has been determined. Some of the data obtained are shown in the table I. The figures show that the carcinogenic hydrocarbons react at about the same rate as the carcinogenic aminostilbenes. This suggests that the bond of the K region of the hydrocarbons is as reactive as the ethylenic bond of the stilbene molecule and as the azo group of the carcinogenic dimethylaminobenzene. This work of the last few years which has been inspired by the French theory has indicated that the carcinogens

are not inert, but that their biological effects are probably dependent on chemical reactivity.

Dimethylaminoazobenzene, or butter yellow, dosed to animals in which it induces hepatomas was found by MILLER and MILLER [26] in a combined form in the protein of the liver, which shows that a carcinogen can react with tissue protein. This coloured protein compound however, is only found in the livers of animals of species which develop liver tumours with these azo compounds and only in these species in conditions which will favour tumour induction. Such combination seems essential for carcinogenic action. As the carcinogenic hydrocarbons are almost as reactive chemically as dimethylaminoazobenzene the carcinogenic hydrocarbons might also be expected to combine with some tissue protein in a similar way.

Although the French theoretical chemists have concentrated on the K region of particular carcinogenic hydrocarbons it is perhaps worth noticing that these substances have two active regions. Many carcinogens such as 1:2:5:6 - dibenzanthracene and 3:4 - benzphenanthrene contain two active phenanthrene double bonds or K regions. In those carcinogenic hydrocarbons with only a single K region the groups which activate that region may also increase the activity of a second part of the molecule. Thus in the potent carcinogen 9:10-dimethyl-1:2-benzanthracene the two methyl groups not only make the 3:4 bond more active than in the unsubstituted 1:2 benzanthracene but also increase the chemical reactivity of the 9:10 or meso positions. Such meso substituted anthracene derivatives are extremely susceptible to chemical reactions, such as photo-oxidation. The metabolism of carcinogens also shows that another region of the molecule (the benzene ring adjoining the K region) is liable to attack *in vivo*. Although it is quite clear that carcinogenic hydrocarbons must have one centre of high chemical reactivity, they also have a second active centre, either a second phenanthrene double bond, active meso positions, or an amino group, as in the aminostilbenes or the aminoazobenzene derivatives.

The reactivity of hydrocarbons is also shown by metabolism experiments with non-carcinogenic hydrocarbons such as naphthalene, phenanthrene [29] and anthracene [30] as well with the carcinogenic

hydrocarbons. These hydrocarbons undergo the reaction of perhydroxylation involving the addition of the elements of hydrogen peroxide with formation of dihydroxydihydro derivatives or diols. In the case of the non-carcinogenic hydrocarbons the addition of the hydroxyl groups occurs at the centres with highest electron density. But in the carcinogenic hydrocarbons which have been examined the oxidation occurs in positions in a ring adjacent to the K-region, not in the reactive K region itself. This may be because the more reactive carcinogens combine with some tissue constituent through the double bond so that only regions of secondary activity are available for the oxidative process. The investigation of 3:4-benzpyrene metabolism [31] showed that the dihydroxydihydrobenzpyrene known as BPX formed by metabolism in isolated skin was combined to some tissue constituent. The combination, however, could be destroyed by treatment with wet acetone. Studies with 1:2:5:6-dibenanthracene containing radioactive carbon have shown that a small part of the carcinogen remains in animals for many months after injection. Thus there are several indications that the carcinogenic hydrocarbons can react with as yet unidentified tissue constituents.

It is possible that metabolism of carcinogens by perhydroxylation is a detoxication and is not directly associated with the carcinogenic change, but I think the change is essential for carcinogenesis, and the dihydroxy dihydroderivative or the energy changes concerned are the proximate causes of carcinogenesis will try to summarise the experimental evidence on the subject.

The conversion of carcinogens to water-soluble diols occurs in mouse skin. If benzpyrene is painted on the excised skin of a recently killed mouse the benzpyrene is changed into BPX, and under such conditions as much as 80 per cent of a small amount of benzpyrene can be transformed into BPX after incubation for 6 hours. Under these conditions the BPX does not diffuse into the Ringer solution but can be extracted from the tissue with wet acetone. This suggests that the BPX is combined with tissue constituents in the surviving cells. Analogous changes occur in most of the body tissues of mice. If a suspension of benzpyrene is injected intravenously, it is stored in many of the organs, such as liver, lung, kidney and adipose tissue, and then metabolised and excreted.

Conditions which increase the carcinogenic action of benzpyrene also increase the rate of excretion, as was shown clearly by experiments of DICKENS and WEIL-MALHERBE [32]. When benzpyrene dissolved in tricapyrylin containing 3 per cent cholesterol was injected into mice, it was more rapidly excreted and produced tumours more rapidly than when it was injected in tricapyrylin alone. Addition of cephalin and lecithin to the tricapyrylin solution of benzpyrene decreased the rate of metabolism of the carcinogen and increased the mean induction time of the tumours.

The process of diol formation is probably a metabolic process which normally involves the usual body constituents. When we inject synthetic materials such as naphthalene or carcinogenic hydrocarbons, we present the cell enzymes with a substrate which resembles some normal tissue constituents sufficiently closely for it to be dealt with through the usual channels. The known common natural substances resembling the aromatic hydrocarbons are phenyl alanine and the steroids. It is possible that injection of cholesterol would increase the power of the tissue to metabolise steroids by a mechanism analogous to the production of adaptive enzymes and with this a concomitant ability to metabolise hydrocarbons.

Another argument in favour of the hypothesis I wish to put forward depends upon the relation of the stereo-isomers of the diols produced by different species and the difference in response to carcinogens. If a cold solution of 1:2:5:6-dibenzanthracene is injected into mice or rats it induces tumours in most cases at the site of injection, but the same solution injected into rabbits does not produce tumours at the site of injection. Some other carcinogens will produce local tumours in rabbits, but rabbits are undoubtedly more resistant to carcinogens than are rats or mice. Now when naphthalene and anthracene are injected into rats and rabbits they are metabolised to diols which contain two asymmetric carbon atoms. The spacial configurations of the diols produced are different in the two species. In the case of naphthalene, the rat product is laevo-rotatory and the rabbit product is dextro-rotatory.

An analogous species difference in carcinogenicity and metabolism is found with β -naphthylamine. When given to dogs β -naphthylamine is excreted as the sulphate of 2-amino-1-naphthol, and

β -naphthylamine induces cancer of the bladder in dogs. In other species, including rats and rabbits, no bladder tumours are induced and the excretion product is 2-acetyl-amino-6-hydroxynaphthalene.

The formation of a diol involves the conversion of an aromatic ring into a non-aromatic or less unsaturated ring. The fact that the hydroxyl groups enter in positions other than those of the active K region indicates that the K region is probably combined with some tissue constituent. Whatever the combination on the atoms of the K region, it appears to be of a labile nature as only the free diol has been isolated and not the complexes. One possibility is that the partial saturation of the ring adjoining the K region changes the affinity of the bond so that the free diol is released. Although a highly active K region is necessary for carcinogenesis, it is obviously not required for the conversion of a hydrocarbon such as naphthalene into a diol. This suggests that the linkage of a carcinogen through the K region is stronger than is the linkage of a substrate to an enzyme; but it may be similar to linkages of that kind. The type of hypothetical carcinogen complex postulated may be analogous to the protein-vitamin A compounds of normal cells. At one stage in the process, therefore, the carcinogen is held by addition to the K region double bond while other rings may be « de-aromatised » by diol formation.

Although these carcinogenic hydrocarbons have some of the biological effects of nitrogen mustards they do not appear to inhibit the hexokinase of tumours, as the anaerobic glycolysis and respiration of tumours is the same whether they are growing normally or inhibited by 1:2:5:6-dibenzanthracene. On the other hand inhibition of tumour growth by nitrogen mustard is accompanied by a decrease in the anaerobic glycolysis of the tissue. ELSON[33] has shown that the inhibition of tumour growth by carcinogens such as 4-dimethylaminostilbene or 1:2:5:6-dibenzanthracene is only seen if the treated animals are maintained on a low protein diet. This finding indicates that the inhibition of growth is probably due to interference with protein metabolism which can be overcome if the protein intake of the host is sufficiently high. As 1:2:5:6-dibenzanthracene causes abnormalities of chromosomes these experiments suggest that chromo-

somes require an adequate supply of amino acids for their proper maintenance.

In this response to protein diet there is a definite difference between the action of X rays and the growth inhibitory action of carcinogenic compounds. The carcinogenic compounds can apparently inhibit the growth of the tumour only if the animals are maintained on a low protein diet. In the response to radiation, however, there is a defence process which is favoured by a high protein diet. With animals treated with X rays a greater proportion are able to rid themselves of their tumours if they receive a high protein diet so that their defence processes and tissue reactions are more effective.

The rates of diffusion and reaction are probably important characteristics of the nuclear poisons which have been discussed. The compounds must, presumably, react in or near the nucleus to produce their effects. For this they must diffuse through the cell to the nucleus more rapidly than they react with the constituents of the tissue through which they are passing, unless they have a specific affinity for the particular constituents concerned with nuclear behaviour. The aliphatic nitrogen mustards react very rapidly in the body having a life of only a few minutes, but they do not react instantaneously with any reagent and diffuse sufficiently rapidly for some unchanged molecules to reach the nucleus.

The results which I have discussed show how a number of biological effects are produced by a group of agents which differ considerably in their chemical reactivity and in their biochemical effects. Thus the nitrogen mustards inhibit the phosphokinases and glycolysis of tissues. Urethane increases the respiration of affected cells possibly by interference with the Pasteur reaction, X rays inhibit phosphoglyceraldehyde dehydrogenase and carcinogenic hydrocarbons appear to interfere with amino acid metabolism. All these agents have specific inhibiting effects but these effects are different in each of the four cases. This suggests that the action is due to a specific and strictly limited toxic action on the cell. If this action is very strong the cells are killed, if it is less strong then chromosome damage and mutations occur because of the increased difficulty of cell di-

vision. I think that cancer production is equivalent to a somatic mutation and the facts which which I have presented are in agreement with this idea.

All the drugs used in the palliative treatment of cancer show specificity of action. Oestrogens are of value for cancer of the prostate, urethane for both myeloid and lymphatic leukaemia, aromatic and aliphatic chloroethylamines for Hodgkin's disease and androgens for mammary cancer in young women. Recently SNAPPER [34] has obtained good results with stilbamidine in cases of myeloma, and FARBER and other workers [35] have found aminopterin, or 4-aminofolic acid, to prolong life of cases of acute leukaemia in children. In all these cases, the drugs show preferential action on tumours of a particular site or type. This suggests that we might expect palliative remedies for tumours of particular sites, rather than a remedy for cancer in general.

Although this specificity for different types of cancer exists, the radiations and radiomimetic drugs appear to inhibit growing cells by their action on the cell nuclei. This might occur either in the resting state, so that the injury is revealed when division occurs, or in the early stages of division. They presumably act on tumours because the tumours have many dividing cells rather than because of any other distinctive property of cancer cells. The nitrogen mustards, urethane and probably all the agents except the hormones, are nuclear poisons. This suggests that another group of substances might be available as therapeutic agents which would poison the cytoplasm rather than the nuclei of cells. Such cytoplasmic poison would have to have specific affinity for tumour cells. If the substances did not have this affinity they would be general toxic agents damaging the healthy tissues of the body. The nuclear poisons or radiomimetic agents which are available at present damage the bone marrow and such damage frequently necessitates the discontinuance of treatment before beneficial effects are attained. Drugs without this disadvantage might be found by increasing their specific affinity for tumour tissue. There is some evidence that the nitrogen mustards are possibly more damaging to malignant than to normal cells. Thus in cases with bronchial carcinoma treated with nitrogen mustard the

fall in leucocytes is much less than in cases of leucaemia or Hodgkin's disease treated with similar doses of the same substance. The specific differentiation between normal and tumour tissues needs to be increased but it is difficult to know how it can be accomplished except by random experimentation and trial.

The usual line of progress in biochemical research is first to find some biological property which can be affected by a preparation and then to develop methods of biological assay which will give quantitative data on biological effectiveness. In chemotherapy of cancer the methods of assay, or what are called « screening tests », are still mostly qualitative and rather inadequate. Present knowledge and experience give one reason to expect remedies for cancer of particular sites rather than for cancer in general. A drug with a specific action on a particular type of tumour is less likely to damage other normal tissue, so that the limitation of action may be a good thing. For this reason, potential therapeutic agents for cancer should be tested against as wide a range of tumours as possible. Difficulties arise in the establishment of suitable animal tumours particularly with animals of pure lines, and such animals are of the greatest value for this work. We hope to have established a series of tumours in mice including a mammary carcinoma, a sarcoma, a hepatoma, a prostatic carcinoma, a lung tumour, a lymphosarcoma, a leukaemia, and a gastric carcinoma. In addition to such tumours, well-established transplanted tumours such as the WALKER rat carcinoma are of great value.

The methods used may depend upon measurement of growth or of duration of life, or alternatively in histological, haematological and cytological changes caused by treatment. The increase in length of life is the most practical criterion to use, but in the case of animals with spontaneous tumours the expected survival time of untreated animals is very variable and difficult to assess. In such cases the growth rate of the tumour is taken into consideration with the body weight and general health of the animal. With transplanted tumours, the extension of life by treatment seems to be the most satisfactory guide, but in all cases, histology and cytology can help in indicating the possible mechanism of drug action.

There is little doubt that in the problem of cancer therapy we have established the fact that some therapeutic effect against cancer can be shown, so that some standards are established; the next steps should be to establish methods of testing, using quantitative methods, and to determine the mode of action of such agents as we have available for the control of cancer growth. If good methods for assay of chemotherapeutic effectiveness can be established, then progress to rational chemotherapy of cancer should be assured.

REFERENCES

1. FRIEBEN, *Fortschr. Gebiete Röntgenstrahlen*, 6 (1902) 106.
2. H. J. MULLER, *Proc. Natl Acad. Sci.*, 14 (1928) 714.
3. T. S. PAINTER and H. J. MULLER, *J. Heredity*, 20 (1929) 287.
4. C. AUERBACH, J. M. ROBSON and J. G. CARR, *Science*, 106 (1947) 243.
5. E. BOYLAND, J. W. CLEGG, P. C. KOLLER, E. RHODEN and O. H. WARWICK, *Brit. J. Cancer*, 2 (1948) 17.
6. E. L. KENNAWAY, *Biochem. J.*, 24 (1930) 497.
7. A. HADDOW, C. M. SCOTT and J. D. SCOTT, *Proc. Roy. Soc. B.*, 122 (1937) 477.
8. J. G. CARR, *Brit. J. Cancer*, 1 (1947) 152.
9. P. C. KOLLER (1948), Personal communication.
10. L. C. STRONG, *Proc. Natl Acad. Sci.*, 31 (1945) 290.
11. J. ENGELBRETH-HOLM, *Approaches to tumor chemotherapy*, (1947), p. 419.
12. A. NETTLESHIP and P. S. HENSHAW, *J. Natl Cancer Inst.*, 4 (1943), 309.
13. E. PATERSON, I. A. THOMAS, A. HADDOW and J. M. WATKINSON, *Lancet*, 1 (1946), 667.
14. A. HADDOW, R. J. C. HARRIS, G. A. R. KON and E. M. F. ROE, *Phil. Trans. A.*, 241 (1948), 147.
15. A. HADDOW, G. A. R. KON and W. C. J. ROSS, *Nature*, 162 (1948), 824.
16. I. BERENBLUM, *Biochim. et Biophys. Acta*, 4 (1950).
17. E. BOYLAND and E. S. HORNING, *Brit. J. Cancer*, 3 (1949), 118.
18. A. HADDOW, E. S. HORNING and P. C. KOLLER (1950) (in press).
19. M. DIXON and D. M. NEEDHAM, *Nature*, 158 (1946), 432.
20. E. S. G. BARRON, S. DICKMANS and T. P. SINGER, *Federation Proc.*, 6, 236.
21. R. J. GOLDACRE, A. LOVELESS and W. C. J. ROSS, *Nature*, 163 (1949), 667.
22. R. DAUDEL, *Rev. Sci.*, 84 (1946), 37.
23. R. CRIEGEE, B. MARCHAND and H. WANNOWIUS, *Ann.*, 550 (1942), 99.
24. G. M. BADGER, *Brit. J. Cancer*, 1 (1949), 309.
25. H. J. ECKHARDT, *Ber.*, 7313,

26. E. C. MILLER and J. A. MILLER, *Cancer Research*, 7 (1947), 468.
27. J. BOOTH and E. BOYLAND, *Biochem. J.*, 44 (1949), 361.
28. L. YOUNG, *Biochem. J.*, 41 (1947), 417.
29. E. BOYLAND and G. WOLF, *Biochem. J.*, 42 (1948) xxxii.
30. E. BOYLAND and A. A. LEVI, *Biochem. J.*, 29 (1935), 2679.
31. F. WEIGERT and J. C. MOTTRAM, *Cancer Research*, 6 (1946), 109.
32. F. DICKENS and H. WEIL-MALHERBE, *Cancer Research*, 6 (1946), 161.
33. L. ELSON and A. HADDOW, *Brit. J. Cancer*, 1 (1947), 97.
34. I. SNAPPER, *J. Am. Med. Assoc.*, 133 (1947), 157-61.
35. S. FARBER, L. K. DIAMOND, R. D. MERCER, R. F. SYLVESTER JR., and J. A. WOLFF, *New Engl. J. Med.*, 238 (1948), 1-19.

SUMMARY

The change of normal into malignant cells can be brought about by many agents and substances of different chemical groups. Tumours have recently been induced in animals with chloroethylamines or nitrogen mustards of the aliphatic and aromatic series. The carcinogenic agents are able to produce many effects similar to those produced by radiations. These radiomimetic effects include induction of cancer, induction of mutations, greying of hair of coloured mice (which may be a somatic mutation) and specific damage to chromosomes in dividing cells.

The nitrogen mustards are known to inhibit phosphokinases and the biological effects of these compounds may be due to inhibition of nucleotide and nucleic acid synthesis leading to deficiency of materials essential for the maintenance of normal functioning chromosomes. Dosing of tumour bearing rats with urethane causes chromosome damage and an increase in the respiration of the tumour tissue. This increase in respiration possibly indicates that urethane interferes with the mechanism regulating respiration or possibly with the utilisation of energy derived from metabolism. Experiments on the effects of carcinogenic hydrocarbons and aminostilbenes have shown that their inhibitory actions are reduced or neutralised by a high protein diet. This suggests that the hydrocarbons interfere with protein metabolism.

These results suggest that similar biological results are obtained following different biochemical lesions. In all cases disturbances of some metabolic processes probably occurs. The mutation or change from the normal to the cancer cell is probably a random change, the probability of which is increased by the presence of a specific inhibitor.

R É S U M É

Plusieurs agents et substances chimiques peuvent provoquer la transformation maligne des cellules normales. Tout récemment de tumeurs ont été induites chez les animaux par la chloroéthylamine ou axote-yprites

de la série alifatique et aromatique. Les facteurs cancérigènes peuvent déterminer des effets comparables à ceux qui sont produits par les radiations. Ces effets radiomimétiques comprennent: induction de tumeurs, induction de mutations, grisonnement du pelage des rats colorés (ceci peut être une mutation somatique) et lésions spécifiques dans les chromosomes des cellules en division.

On sait que les azoto-yprites inhibent les phosphochinases et que les effets biologiques de ces composés peuvent être dûs à l'inhibition de la synthèse des nucléotides et de l'acide nucléique qui conduit à une insuffisance de matériaux nécessaires pour la fonction des chromosomes. Si l'on administre de l'urethane à des rats porteurs de tumeurs, on voit une altération chromosomique et une plus intense respiration du tissu tumoral. L'élévation de l'activité respiratoire probablement indique que l'urethane s'engrène dans le mécanisme de la régulation de la respiration, ou dans l'utilisation de l'énergie fournie par les processus métaboliques. Recherches sur l'action des hydrocarbures cancérigènes et des aminostilbenes ont démontré que leur effet inhibitoire de la croissance est réduit ou neutralisé par une diète riche en protéines; ce que fait supposer que les hydrocarbures cancérigènes intéressent le métabolisme protidique.

On peut penser que des effets biologiques égaux sont produits par de différentes lésions biochimiques. La mutation ou transformation de la cellule normale en cellule cancéreuse est probablement une transformation casuelle; la probabilité de laquelle est augmentée par la présence d'un inhibiteur spécifique.

ZUSAMMENFASSUNG

Verschiedene chemische Stoffe sind in stande eine maligne Umwandlung der normalen Zellen herbeizuführen. Verfasser untersuchte die Kanzerogenität von Chloräthylamin und Nitrogenmustard im Tierversuch. Die Wirkung dieser kanzerogenen Stoffe ist ähnlich der kanzerogenen Wirkung der Röntgenstrahlen. Die « radiomimetischen » Effekte umfassen die Entstehung von Tumoren, das Auftreten von Zellmutationen, das möglicherweise durch eine somatische Mutation bedingte Grauerwerden der Haare und Schädigungen der Chromosomen der in Teilung befindlichen Zellen.

Man nimmt an, dass Nitrogenmustard die Phosphorinase hemmt und dass die biologische Wirkung seiner Abkömmlinge mit einer Hemmung der Bildung der Zellkerne und der Nukleinsäure einhergeht, die für die Bildung der Chromosomen wesentlich ist. Die Verabreichung von Urethan an die Tumortiere führt Veränderungen an den Chromosomen und eine gesteigerte Oxydation im Karzinomgewebe herbei. Das Ansteigen der Atmungsvorgänge zeigt wahrscheinlich an, dass Urethan in den Mechanismus der Atmungsregulationen eingreift. Untersuchungen über die Wirkung der kanzerogenen Kohlenwasserstoffe und der Aminostilbene zeigten, dass ihre Wirkung bei einer Diät, die reichlich Eiweiss enthält, vermindert oder gänzlich aufgehoben wird. Dies berechtigt die Annahme, dass die kanzerogenen Kohlenwasserstoffe den Eiweissstoffwechsel beeinflussen.

Es kann angenommen werden, dass gleichartige biologische Effekte durch verschiedenartige biochemische Veränderungen zustandekommen. Die Mutation oder die Umwandlung einer Normalzelle in eine Krebszelle wird wahrscheinlich durch die Anwesenheit eines spezifischen Hemmfaktors ausgelöst.

S O M M A R I O

La trasformazione maligna delle cellule può essere provocata da parecchi agenti e sostanze di natura chimica diversa. Recentemente sono stati evocati tumori in animali mediante cloroetilamine o azoto-ipriti della serie alifatica e di quella aromatica. Gli agenti cancerogeni possono produrre effetti paragonabili a quelli prodotti dalle radiazioni. Questi effetti radiomimetici comprendono: induzione di tumori, induzione di mutazioni, ingrignimento del pelame di topi colorati (che può essere una mutazione somatica) e lesioni specifiche nei cromosomi delle cellule in divisione.

E' noto che le azoto-ipriti inibiscono le fosfochinasi e gli effetti biologici di questi composti possono essere dovuti alla inibizione della sintesi dei nucleotidi e dell'acido nucleinico, che conduce ad una deficienza di materiali necessari al mantenimento del normale funzionamento dei cromosomi. Somministrando a ratti portatori di tumori dosi di uretano si ha una alterazione cromosomica ed una più intensa respirazione del tessuto tumorale. L'elevazione dell'attività respiratoria probabilmente sta

ad indicare che l'uretano si ingrana nel meccanismo di regolazione della respirazione oppure nell'utilizzazione dell'energia fornita dai processi metabolici. Ricerche sopra l'azione degli idrocarburi cancerogeni e degli aminostilbenici hanno dimostrato che il loro effetto inibente è ridotto o neutralizzato da una dieta ricca in proteine. Questo fa supporre che gli idrocarburi interferiscono col metabolismo proteico.

Questi risultati fanno supporre che effetti biologici simili siano ottenibili in seguito a diverse lesioni biochimiche. La mutazione o trasformazione della cellula normale in cellula cancerosa è probabilmente una trasformazione casuale; la probabilità della quale è aumentata dalla presenza di un inibitore specifico.

DISCUSSION:

BERENBLUM asks: In the « cross linkage » hypothesis is the nitrogen mustard molecule sufficiently long to bridge the gap between two chromosomes?

BOYLAND answers: The nitrogen mustard molecules would join parts of a chromosome before division. Such adventitious bridges or cross linkages might persist during and after division and cause breaks and other chromosome abnormalities.

COWDRY asks: Did you intentionally fail to mention the possibility that these hydrocarbons act on plasmagenes?

BOYLAND answers: Carcinogens may produce their most important biological effects through action on plasmagenes, but the direct visible effects on chromosomes are the only ones which can be seen.

COWDRY asks: Have you any data on the penetration of these hydrocarbons into the nuclei?

BOYLAND answers: No.

GREENSTEIN asks: What components of the high protein diet are effective in neutralising the action of hydrocarbons on tumour growth?

BOYLAND answers: The particular components have not been identified.

BERENBLUM: What is the evidence that the greying of the hair is a mutation?

PEACOCK: I suggest that greying of the hair is unlikely to be a mutation, as every cell would have to undergo the same sort of

mutation. I know of no example of a mutagen that can cause 100% of mutations in exposed cells.

VON EULER: The grey-hair effect may depend on the destruction of the enzyme-system producing tyrosinase.

BOYLAND admits that the greying of hair might be something other than a somatic mutation but it is a permanent change induced in some cells. Research on this point is being carried out in Birmingham and London.

ÉTUDE DU POUVOIR CANCÉRIGÈNE DE NOUVELLES BENZACRIDINES ANGULAIRES

ESSAI DE CONTRÔLE DE LA THÉORIE ÉLECTRONIQUE

PROF. A. LACASSAGNE (PARIS)

Le problème de la pathogénie du cancer compte parmi ceux dont la solution est rendue difficile, plutôt par pléthore que par manque de connaissances. Des découvertes nombreuses et importantes, réalisées dans ce domaine depuis une trentaine d'années, ont ouvert des vues sur des horizons variés, et permis d'imaginer plusieurs interprétations - chacune apparemment fondée - mais difficilement conciliables entre elles.

Cependant, quand on a suivi de près, par l'observation sur le vivant et par l'étude de coupes histologiques, les étapes de la transformation maligne d'un épiderme sous l'action répétée soit d'irradiations soit d'applications d'un hydrocarbure aromatique actif, et même celles du passage d'un papillome infectieux du Lapin au stade d'épithélioma, il est difficile d'écarter l'idée d'un mécanisme analogue intervenant dans tous les cas.

Cherchant, il y a quelques années, une explication à un phénomène d'antagonisme d'action entre deux hydrocarbures polycycliques employés simultanément, qu'avec mes collaborateurs nous étudions [10], je pris connaissance de l'hypothèse proposée depuis peu par un chimiste allemand Otto SCHMIDT [16, 17]: purement théorique, sans aucun fondement expérimental, elle avait du moins l'attrait de la nouveauté et de la cohérence des solutions qu'elle proposait.

SCHMIDT avait cherché à étendre aux hydrocarbures polycycliques les conceptions de quelques chimistes théoriciens d'avant-garde, qui s'efforçaient d'expliquer les propriétés chimiques, physiques et même biologiques des corps, par des déplacements d'électrons dans leur molécule. Par l'emploi des calculs de la mécanique ondulatoire, on peut déterminer la probabilité de présence des électrons libres sur chaque atome d'une molécule et, par là, reconnaître des zones de leur plus grande densité devant correspondre à une région de plus forte réactivité chimique.

Etudiant comparativement les formules des principaux hydrocarbures polycycliques dont l'activité cancérigène était alors connue, SCHMIDT conclut à une concordance entre le degré de cette propriété et la concentration d'électrons libres en un point particulier de leur molécule. La théorie expliquait: que l'hydrogénation (laquelle réduit la concentration électronique) abaisse le pouvoir cancérigène; qu'au contraire, la présence de tel substituant, favorable au resserrement des électrons libres, augmente l'activité; alors qu'un substituant qui capte les électrons la diminue. Evaluant cette sorte d'énergie d'activation, obtenue dans ces conditions avec celle des longueurs d'ondes cancérigènes de l'ultra-violet. SCHMIDT admit un ordre de grandeur voisin, permettant d'attribuer la cancérisation, dans les deux cas, au transfert de l'excitation sur une charge protéique, pour y catalyser une réaction (une émolisation, par exemple), qui serait à l'origine d'une mutation aboutissant à la cancérisation.

Cette théorie ne reçut pas un accueil plus favorable que tant d'autres, à l'énoncé desquelles se livrent périodiquement des esprits d'autant plus imaginatifs qu'ils connaissent moins le cancer. Elle ne s'accompagnait pas de la moindre tentative de contrôle, soit biologique, soit même mathématique. En effet, SCHMIDT était arrivé à ses conclusions, sans se livrer à des calculs précis, mais par simple approximation, d'après la forme du squelette des molécules. Voici le jugement porté sur ce sujet, en 1940, par COOK et KENAWAY dans la revue critique qu'ils consacraient aux nouveaux travaux publiés sur les agents cancérigènes [6]: « These conceptions of SCHMIDT are of interest, but in the absence of exact data concerning electron densities it is difficult to submit them to experimental test. Moreover, like many other theoretical interpretations they are apt

to be more successful in explaining known phenomena than on predicting new ones ».

Cependant, une tentative de vérification, par calcul de la densité électronique fut publiée par SVARTHOLM en 1942 [19]. Il avait construit les différents « diagrammes de superposition » correspondant à des squelettes d'hydrocarbures, en particulier du 1:2-benzanthracène. Par comparaison de ce corps avec les structures de divers hydrocarbures cancérigènes, l'auteur conclut qu'il paraissait justifié d'associer la propriété particulière de ces composés à une plus grande tendance à faire des réactions d'addition.

Il convenait donc de porter le problème sur le terrain expérimental, et de voir si la thèse résisterait à la double épreuve d'une étude approfondie s'exerçant aussi bien au point de vue biologique que mathématique. Mais, le projet se présentait comme devant être d'exécution difficile et laborieuse. Il ne pouvait être entrepris que par une équipe de travailleurs qualifiés, appartenant à des disciplines variées.

Depuis que nous avons commencé ce travail, à l'Institut du Radium, en 1944, de nombreuses publications lui ont été consacrées, par les chimistes organiciens chargés de préparer des corps nouveaux [4], par les biologistes qui avaient recherché le pouvoir cancérigène de ceux-ci [9, 11] par les théoriciens qui établirent des méthodes de calcul (de plus en plus simples et cependant de plus en plus précises) des facteurs électroniques de cancérisation [7, 8, 13, 14].

Cet exposé est destiné à permettre de se rendre compte si des progrès ont été accomplis, et si des arguments sérieux ont été apportés en faveur de l'hypothèse initiale.

Au début, la recherche théorique avait consisté à établir une méthode d'évaluation quantitative de la structure électronique de molécules complexes comme celles d'hydrocarbures aromatiques à cinq anneaux. Ce fut l'oeuvre de R. DAUDEL et A. PULLMAN [8]. Leur méthode dite des « diagrammes moléculaires » consistait à déterminer la valeur des charges électriques existant à chaque sommet et au niveau de chaque liaison de la molécule. L'ayant appliquée à des corps dont l'activité oncogène avait été antérieurement établie sur l'animal, PULLMAN reconnut que les différents groupes d'hydrocarbures cancérigènes se caractérisent par une charge électrique

particulièrement forte, localisée sur une double liaison et les deux sommets adjacents [13]. Dans les carbures possédant les cycles du phénanthrène (série du 1:2-benzanthracène et des benzacridines), on trouve sur l'anneau médian, dans la « région mésophénanthrénique » un excès particulier de charge; il existe deux zones de forte charge dans le dibenzanthracène. Enfin, PULLMAN établit une relation quantitative entre l'intensité du pouvoir cancérigène et la grandeur de la charge au niveau de ce qu'elle désigna comme la « région K » de la molécule.

Encouragés à poursuivre la vérification d'une théorie qui prenait de la vraisemblance, nous avons décidé de la soumettre à une épreuve capable d'entraîner la conviction soit dans un sens, soit dans un autre. Il convenait: a) de faire préparer par les chimistes des séries de corps nouveaux; b) de demander aux théoriciens d'en examiner la structure moléculaire au point de vue électronique et d'en prédire l'activité cancérigène; c) enfin, de les essayer sur la souris, dans les conditions d'administration habituelle.

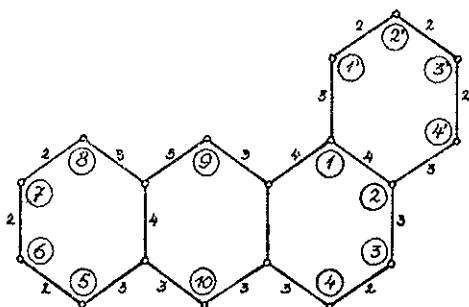
Le groupe des benzacridines angulaires, étudié dans notre laboratoire depuis plusieurs années, se prêtait favorablement à cette expérience. On sait, en effet, qu'il fournit des dérivés dont le pouvoir cancérigène varie considérablement d'un corps à un autre. La synthèse de benzacridines encore jamais préparées, portant en différentes positions des radicaux méthyles ou phényles capables de faire varier la charge électrique, a été effectuée sous la direction de BUU-HOÏ, par DAT, DECLERCK, EKERT, HOAN, JACQUIGNON, KHOI, LAVIT, LECOQ, ROYER.

A mesure qu'ils étaient obtenus, la formule de ces corps était communiquée aux calculateurs. Après étude, ceux-ci devaient chiffrer la charge électronique et tirer de ce résultat l'indication de l'index théorique d'oncogénicité.

Cependant, une plus grande précision avait été apportée à la manière d'évaluer théoriquement le pouvoir cancérigène. L'étude faite à ce sujet par P. et R. DAUDEL, JACQUES, JEAN, MARTIN, VROELANT, les avait conduits à tenir compte de trois facteurs capables d'intervenir dans la manifestation de cette propriété biologique de l'hydrocarbure: la tendance à l'addition avec une molécule vivante,

la stabilité du complexe ainsi formé, l'optimum de la charge dans la région favorable à l'addition.

Pour aboutir à une somme de cette triple influence, on doit calculer trois grandeurs correspondant grossièrement aux facteurs précédents: 1^o) l'indice de liaison qui mesure la tendance à l'addition, et aussi l'aptitude à la formation d'un complexe stable; 2^o) l'indice



Le Benzanthracène = squelette des Benz-acridines

Diagramme des différents types de liaison

(Les chiffres entourés d'un cercle indiquent la notation chimique, les autres permettent de trouver les types de liaison.)

FIG. 1.

de valence libre, qui favorise lui-aussi l'addition; 3^o) la charge des électrons mobiles de chaque atome de la molécule.

En ce qui concerne les types de liaisons, voici à quoi aboutissent les calculs (figure 1). La plus favorable à une addition stable est le type (3-3); on voit qu'il existe, en position 3:4, dans le squelette de la benzacridine. Sa valeur a été chiffrée (figure 2) à 0,692, nombre qui traduit la force de cette liaison par rapport à la liaison éthylénique prise pour unité. Sur cette même figure, on a aussi chiffré l'indice de valence libre, localisé sur chaque atome. On peut voir que, si l'on fait la somme des indices de liaison de chaque atome, avec celui de sa valence libre, on trouve pour chacun d'eux 1,68, qui représente

la force totale de la liaison de l'électron π de l'atome. C'est également la position 3:4 du squelette qui possède le plus grand indice de valence libre: $0,48 + 0,48 = 0,96$. Elle correspond donc à la région la plus apte à l'addition, dont il reste à établir la charge.

Pour cela, il faut d'abord se rappeler que le diagramme des charges de benzantracène est très simple, car chaque atome renferme un électron π (figure 3). Mais, si on place un azote sur le cycle, on

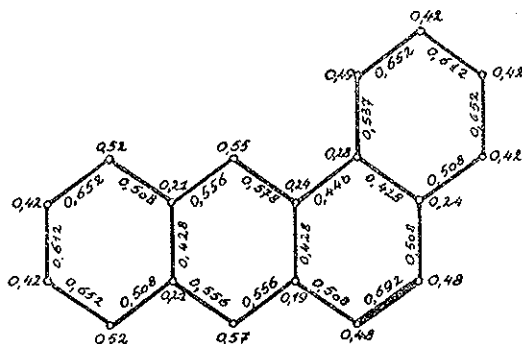


Diagramme des indices de liaison et des indices des valences libres

Il fait apparaître comme zone la plus apte à l'addition la liaison 3:4 (région mésophénanthrénique, ou région K).

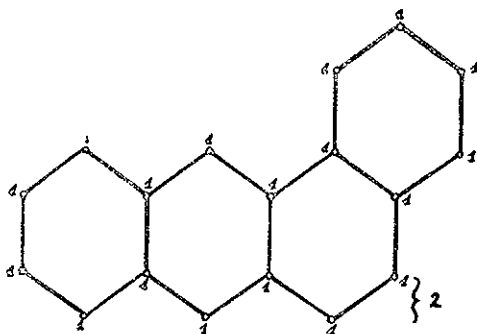
FIG. 2.

diminue les charges un peu partout, surtout au voisinage de l'azote. Dans ces conditions, la région mésophénanthrénique des 5:6-benzacridines voit sa charge décroître plus fortement que celle des 7:8-benzacridines (figure 4), la charge devenant 1,973 dans le premier cas et 1,984 dans le second (figure 5). Inversement, l'introduction de radicaux méthyles augmente plus ou moins la charge suivant les positions; sur la figure 6 sont représentées les plus favorables de celles-ci, correspondant aux plus grandes valences.

En possession de ces différents facteurs numériques, on peut établir une courbe de la variation du pouvoir cancérogène en fonction de la charge, qui doit permettre - si la théorie et les calculs sont

exacts - de trouver automatiquement le degré d'activité de tout hydrocarbure nouveau (figure 7).

Seize nouvelles benzacridines (dont huit de la série 7:8 et huit de la série 5:6) ont été mises en expériences de contrôle biologique avec la collaboration de RUDALI et ZAJDELA. Selon la technique habituelle, des lots de 10 souris ont reçu, soit des applications cutanées



*Diagramme des charges électroniques du
Benzanthracène
(La région en question possède une charge 2)*

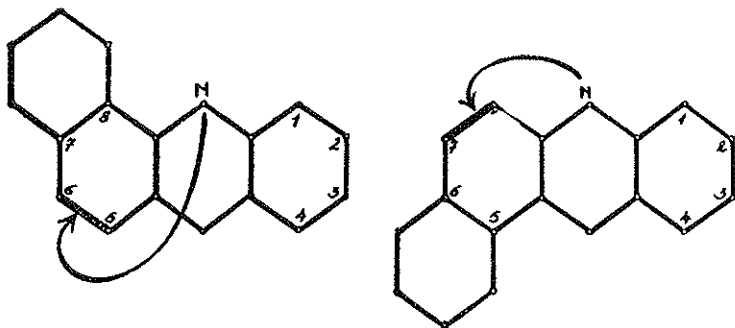
FIG. 3.

répétées, soit des injections sous-cutanées. Cinq 7:8 benzacridines et cinq 5:6- ont été employées par les deux procédés; trois autres, de chaque série, ne l'ont été que par injection. Les plus anciennes de ces expériences ont débuté en août 1948. On se bornera à indiquer ici les résultats de quelques-unes seulement d'entre elles, qui sont arrivées à leur terme. (1)

Pour neuf de ces corps nouveaux, on possède actuellement le résultat des applications cutanées, faites selon le procédé habituel: 1 goutte, deux fois par semaine, d'une solution à 0,3% dans l'acé-

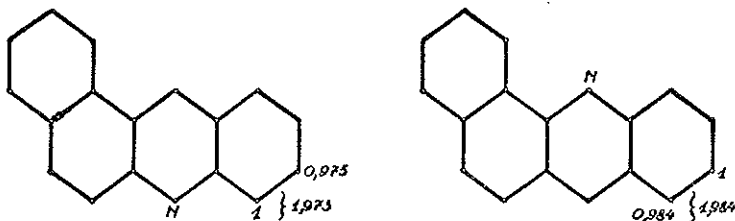
(1) Cette recherche a été subventionnée par la section du cancer de l'« U. S. Public Health Service ».

tone, sur 10 souris de même lignée. Le résultat des injections (de 0,5 à 0,8 mg) qui demande un temps de latence beaucoup plus long pour être considéré comme acquis, n'est pas encore démonstratif.



*Influence de l'introduction de
l'azote dans la molécule
Schéma qualitatif*

FIG. 4.



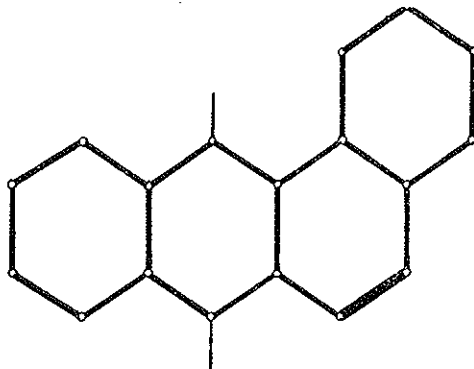
*Influence de l'introduction de
l'azote dans la molécule
Schéma quantitatif*

FIG. 5.

Ces neuf corps sont: parmi les 7:8 benzacridines, les trois triméthyl 1:4:10-; 1:6:10-; 2:3:10-; et deux diméthyl 1:2-; 6:10-.

Parmi les 5:6 benzacridines, les trois triméthyl 1:2:10-; 2:3:10-; 2:4:10-; et la diméthyle 1:2.

Le tableau de la figure 8 présente les résultats expérimentaux obtenus avec ces neuf corps, en ce qui concerne les applications cutanées. On les a rangés dans l'ordre décroissant de l'activité, en



Positions des méthyles les plus favorables à la cancérisation

FIG. 6.

tenant compte des trois effets aisément constatables: l'épilation, l'apparition de papillomes, l'apparition d'épithéliomes. Le degré de l'épilation est indiqué par deux croix si le phénomène a été obtenu chez toutes les souris du lot; par une croix si quelques-unes seulement l'ont présenté; par 0 quand aucune épilation ne s'est produite. Les index de papillomatose et de cancérisation ont été établis selon le procédé antérieurement indiqué (pourcentage des tumeurs induites parmi les animaux ayant survécu au delà du délai d'apparition de la première tumeur, divisé par la durée moyenne de latence). Dans un seul cas, les injections ont fourni des sarcomes de façon précoce (de 130 à 150 jours). Mais, dans la plupart des autres cas, la survie généralement trop brève des animaux peut n'avoir pas permis la manifestation de cette tumeur à latence ordinairement longue. Aussi,

l'indication n'en est donnée, ici, qu'à titre documentaire; la question des sarcomes devra être réservée pour une étude ultérieure.

Dans une dernière colonne sont indiqués les excès de charge électronique, qui nous avaient été fournis préalablement au contrôle biologique. Les nombres indiquent le supplément d'électron, au

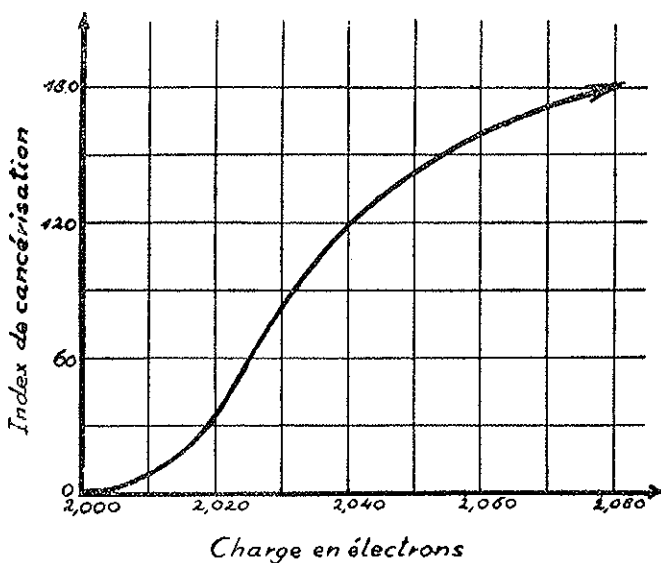
Nouvelles benzacridines	Epi- tation	Index papill.	Index épithél.	Index sar- come	Excès de charge
I. 2 : 3 : 10-triméthyl-7 : 8 . . .	++	61,5	28	—	38
II. 1 : 4 : 10 » 7 : 8 . . .	++	49	43,5	—	37
III. 1 : 6 : 10 » 7 : 8 . . .	+	25	19,5	—	71
IV. 2 : 3 : 10 » 5 : 6 . . .	++	0	0	20	16
V. 1 : 2 : 10-triméthyl-5 : 6 . . .	+	0	0	—	18
VI. 1 : 2-diméthyl-7 : 8	+	0	0	—	8
VII. 6 : 10 » 7 : 8	+	0	0	—	61
VIII. 2 : 4 10-triméthyl-5 : 6	0	0	0	—	12
IX. 1 : 2-diméthyl-5 : 6	0	0	0	—	2

dessus de deux, se trouvant dans la région active, laquelle est supposée formée de deux atomes. Cet excès est nul dans le cas du benzanthracène, puisque la charge est partout égale à deux, comme on l'a vu sur la figure 3. Les nombres correspondent à des millièmes d'électron. C'est ainsi que, dans le cas de la 2 : 3 : 10 - triméthyl - 7 : 8 - benzacridine, 38 signifie que la charge est de 2,038 sur la zone active, ce qui correspond à un excès de charge de 38 millièmes d'électron.

A première vue, l'examen de ce tableau est décevant: la comparaison entre l'ordre des activités biologiques et l'ordre des excès de charge n'indique aucun parallélisme, ce qui paraît devoir exclure toute relation entre les deux phénomènes.

Toutefois, il importe de faire remarquer qu'une anomalie était prévue comme devant se présenter dans le cas des deux corps III

et VII. En effet, les calculs avaient indiqué que la substitution d'un méthyle en position 6, c'est à dire sur un des atomes de la région mésophénanthrénique, doit augmenter considérablement la charge de cette zone de haute réactivité. Mais, il était impossible



Variation du pouvoir cancérisation en fonction de la charge

FIG. 7.

de prédire si la présence de ce radical sur la zone elle-même faciliterait ou générerait les réactions d'addition admises comme devant s'y produire. L'expérience semble établir que cette présence inhibe l'effet de l'excès de charge (figure 8).

Si l'on veut bien faire abstraction de ces deux corps, la comparaison des résultats théoriques et expérimentaux devient plus satis-

faisante et n'interdit pas de penser que les prévisions de l'activité cancérogène, d'après les calculs de la mécanique ondulatoire, puissent présenter quelque valeur, tout au moins qualitativement.

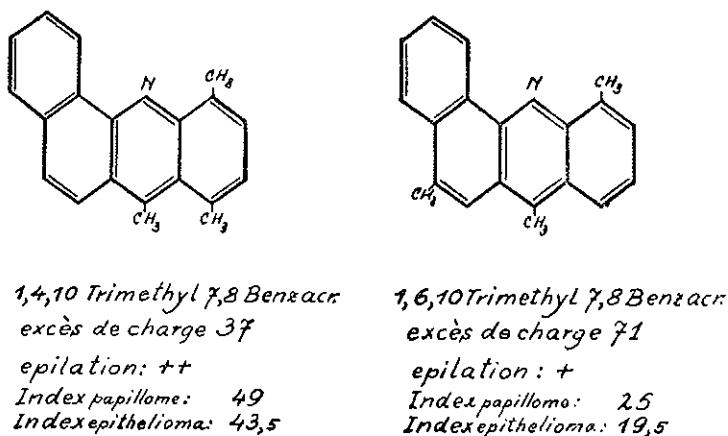
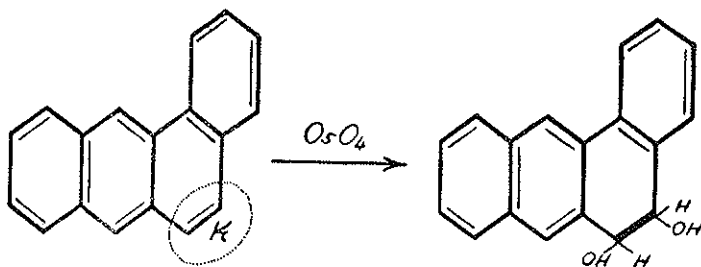


FIG. 8.



*Schéma de l'oxydation des hydrocarbures
cancérogènes par le tetroxyde d'osmium
(Badger 1949)*

(L'attaque de la région K est facilitée par la présence de groupes méthyles en "mésos", en accord avec les résultats du calcul)

FIG. 9.

D'ailleurs, les travaux de ces dernières années ont mis en évidence l'intervention d'autres facteurs que celui de la charge

électronique, capables d'influencer la formation du complexe substance cancérigène-constituant cellulaire, à laquelle on attribue le rôle essentiel dans la cancérisation.

On est donc conduit à poursuivre les essais d'amélioration des techniques tant théoriques qu'expérimentales, dans cette voie particulière de recherche. Dans le domaine biologique, nous essayons maintenant la méthode de BERENBLUM et SHUBIK, par action cocarcinogénique de l'huile de croton pour la production des tumeurs cutanées [2], et celle de SHEAR par implantation d'hydrocarbures, plutôt que par injections, pour l'obtention de sarcomes [18]. Nous espérons, ainsi, diminuer l'influence toxique des substances, et obtenir des survies plus prolongées permettant d'augmenter la précision des index d'activité biologique.

Depuis quelque temps, la théorie électronique de la cancérisation devient un sujet de plus en plus fréquemment débattu. D'autres méthodes d'étude de la structure des molécules des hydrocarbures (inagnétochimie par BUU-HOÏ et PACAULT [5], mesure des distances interatomiques par ROBERTSON [15], réactions chimiques par BOYLAND et par BADGER), si elles ne la confirment pas, du moins fournissent — dans leur domaine respectif — des résultats en accord avec les siens.

C'est ainsi que BOYLAND [3] a fourni des arguments en faveur d'une combinaison avec un constituant essentiel de la cellule, se faisant par addition au niveau de la double liaison de la région K des hydrocarbures cancérigènes.

Récemment, BADGER [1], utilisant une réaction découverte par COOK, consistant à oxider les hydrocarbures aromatiques par le tétraoxyde d'osmium, a noté que cette réaction a toujours lieu sur la région mésophénanthrénique dans la série du benzanthracène; l'oxydation se produit d'autant plus rapidement que la charge calculée de la région K est plus forte (fig. 9).

Au point de vue pratique, la prévision du pouvoir cancérigène des nouveaux composés, par le calcul, rendrait de grands services. Au point de vue de la compréhension du mécanisme de la cancérisation, elle servirait de terrain solide de départ pour l'étude des réactions biochimiques conduisant à la transformation maligne de la cellule.

La théorie électronique est, en effet, conciliable avec les différentes hypothèses faites, par différents auteurs, quant à la combinaison chimique intéressée dans la réaction de cancérisation. Une des dernières est celle de PINK [12], qui explique la carcinogénèse par l'intermédiaire de composés éthyléniques se produisant à partir des hydrocarbures par oxydation enzymatique des groupe-

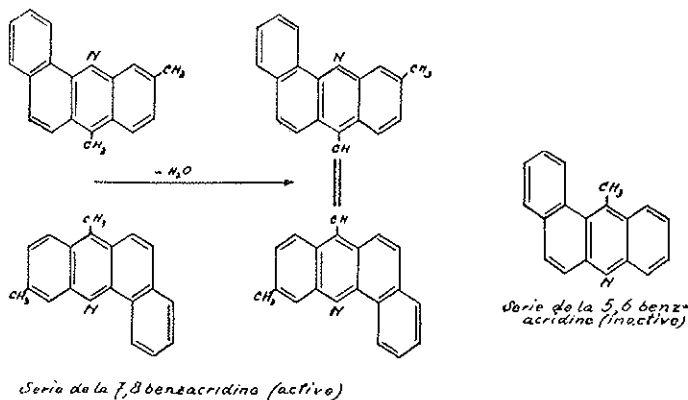


FIG. 10.

ments méthyles présents dans la molécule initiale, ou qui y seraient introduits par méthylation biologique au moyen de donneurs de méthyles (cystéine, méthionine, etc....) L'hypothèse explique la différence d'activité entre les méthyl-5:6-benzacridines et leurs isomères de la série 7:8, qui résiderait dans le fait que la position méso active est occupée, dans le premier cas, par un atome d'azote incapable de réagir; tandis que, dans le second, il existe un méthyle très réactif qui donne naissance à un éthylénique (figure 10).

Dans un symposium consacré à la discussion du problème biologique du cancer, il convenait que l'état actuel des données concernant la théorie électronique de la cancérisation fut présenté. Les expériences dont les résultats viennent d'être rapportés, entreprises en vue de soumettre l'hypothèse à une épreuve rigoureuse, ne portent encore que sur peu de corps. Aussi peut-on seulement tirer la conclusion que la prévision, par le calcul, de l'activité cancérogène

d'une combinaison polycyclique a donné, jusqu'ici, des résultats qualitatifs acceptables. Cependant, les fluctuations biologiques dans des expériences ne portant que sur un petit nombre d'animaux, et les incertitudes sur certaines variables dans les méthodes d'évaluation des charges électroniques, ne permettent pas encore de considérer la théorie comme suffisamment établie pour la prendre comme fondement d'une explication pathogénique du cancer.

BIBLIOGRAPHIE

1. BADGER G. M., Brit. J. Cancer, T. 2, p. 309, 1948.
2. BERENBLUM I. and SHUBIK P., Brit. J. Cancer, T. 1, p. 383, 1947.
3. BOYLAND E., Acta de l'Union int. c. cancer, T. 6, p. 335, 1948.
4. BUU-HOÏ N. P., J. Chem. Soc., p. 670, 1949.
5. BUU-HOÏ N. P. et PACAULT, J. Physique et radium, T. 6, p. 33, 1945.
6. COOK J. W. and KENNAWAY E. L., Am. J. Cancer, T. 39, p. 402, 1940.
7. DAUDEL R., Bull. Assoc. franç. étude cancer, T. 35, pp. 119 et 319, 1948.
8. DAUDEL R. et PULLMAN A., C. R. Acad. Sci., T. 220, p. 888, 1945.
9. LACASSAGNE A., Acta de l'Union int. c. cancer, T. 6, p. 9, 1948.
10. LACASSAGNE A., BUU-HOÏ N. P. et CAGNIANT P., C. R. Soc. de Biol. T. 138, p. 16, 1944.
11. LACASSAGNE A., BUU-HOÏ N. P., LECOCQ J. et RUDALI G., Bull. Assoc. franç. étude cancer, t. 37, p. 48, 1946.
12. PINCK L. A., Ann. New York Acad. Sci. T. 50, p. 1, 1948.
13. PULLMAN A., C. R. Soc. de Biol. T. 139, p. 1056, 1945.
14. PULLMAN A., Bull. Assoc. franç. étude cancer, T. 33, p. 120, 1946.
15. ROBERTSON J. M., Acta crystallogr., T. 1, p. 101, 1948.
16. SCHMIDT O., Ztsch. f. phys. Chemie, T. 42, p. 83, 1939.
17. SCHMIDT O., Naturwiss., T. 29, p. 146, 1941.
18. SHEAR M. J., Am. J. Cancer, T. 26, p. 322, 1936.
19. SVARTHOLM N., Arch. f. Kemi, Miner. Geol., T. 15, p. 1, 1942.

R É S U M É

Si les progrès réalisés depuis quelques années par la théorie du virus devaient permettre, un jour, d'étendre celle-ci à tous les néoplasmes, le problème biologique du cancer se trouverait simplifié, et ce groupe pathologique perdrait la plupart de ses caractères considérés jusqu'ici comme distinctifs.

Toutefois, la notion de la multiplicité des agents de cancérisation expérimentale (tels que radiations, diverses substances chimiques exogènes ou endogènes) pose des énigmes que l'hypothèse virus ne résoud pas.

Mes recherches personnelles ont surtout porté sur ces agents de cancérisation cellulaire. Leur variété rend difficile d'imaginer un mécanisme commun d'action.

L'hypothèse qui — momentanément — répond le mieux aux nombreux problèmes pendants, est celle d'O. SCHMIDT, hypothèse qu'avec mes collaborateurs nous avons développée et précisée et que j'ai désignée comme « théorie électronique de la cancérisation ». Elle a l'avantage d'être conciliable avec la plupart des facteurs étiologiques connus, y compris les facteurs génétiques et ceux transmis par filtrats.

La transformation maligne serait un aboutissement, résultant de la perte de la fonction de régulation des multiplications cellulaires, que pourraient réaliser aussi bien certaines radiations, de nombreuses substances chimiques, voire des virus.

Le caractère nouveau, ainsi acquis par la cellule (un pouvoir illimité de division dans l'organisme et au dépens des autres éléments de celui-ci) est le seul qui paraisse constant et, par conséquent, spécifique de la cellule cancéreuse, par comparaison avec la cellule normale.

S U M M A R Y

If the progress obtained in these last years by the virus theory were to allow us, one day, to apply the same theory to all tumours, then the biological problem of cancer should be greatly simplified and this patho-

logical group would lose most of the characteristics which have been considered up to this day as specific.

Yet the knowledge of the great number of experimental carcinogenesis agents (such as radiations and several exogenous and endogenous chemical substances) gives rise to problems that the virus theory does not solve.

My personal researches were chiefly centred upon these agents of cellular cancerisation. Their great variety makes it very difficult to admit of a common mechanism of action.

The supposition that at present answers better to the numerous open problems is that of O. SCHMIDT, an hypothesis that my assistants and myself have developed and exactly specified and which I denominated « electronic theory of cancer ». It offers the advantage of being eventually applied to most known etiological factors including genetic factors and factors transmitted by filtrates.

The malignant change would then appear to be the outcome of a loss of the fonction regulating cellular fission; and may occur through certain radiations, the action of many chemical substances or even virus.

The new characteristic that the cell thys acquires (an unlimited capacity of fission inside the body at the expense of the other constituents of the organism) is the only one that seems to be constant, and consequently, distinctif of the cancerous, as compared to a normal cell.

ZUSAMMENFASSUNG

In den Bemühungen, die Kanzerogenität der verschiedenen chemischen Substanzen zu erklären, entspricht die Hypothese von O. SCHMIDT, welche vom Verfasser und seinen Mitarbeitern weiter entwickelt, genauer präzisiert und als « Elektronentheorie » bezeichnet wurde, gegenwärtig noch am besten den verschiedenen, noch schwebenden Problemen. Sie besitzt den Vorteil, mit den meisten bekannten ätiologischen Faktoren, einschliesslich der genetischen Faktoren und der übertragbaren filtrierbaren Agentien in Uebereinstimmung gebracht werden zu können. Die maligne Zellumwandlung geht auf den Verlust wichtiger regulatorischer Eigenschaften zurück, die ebenso durch bestimmte Strahlen, durch chemische

Substanzen oder durch ein Virus verursacht werden können. Die Zelle erwirbt neuartige Eigenschaften, die nunmehr die Charakteristika der Krebszelle darstellen.

S O M M A R I O

Se i progressi realizzati da qualche anno dalla teoria sopra i virus ci permetteranno un giorno di estendere questa teoria a tutti i tumori, il problema biologico del cancro sarà molto semplificato; questo gruppo nosologico perderebbe la maggior parte dei caratteri considerati finora come specifici.

Tuttavia la molteplicità degli agenti cancerogeni sperimentali (come le radiazioni, diverse sostanze chimiche esogene ed endogene) mette in rilievo degli enigmi che la teoria dei virus non basta a risolvere.

Le mie ricerche personali sono state condotte soprattutto su questi agenti della cancerizzazione cellulare. La loro varietà rende difficile l'ipotesi che essi abbiano un meccanismo d'azione in comune.

La concezione che al momento risponde meglio ai numerosi problemi posti in questione è quella di O. SCHMIDT, concezione che io ed i miei allievi abbiamo sviluppato e precisato e che io ho designato come « teoria elettronica della cancerizzazione ». Essa ha il vantaggio di poter abbracciare la maggior parte dei fattori eziologici conosciuti, ivi compresi i fattori genetici e quelli trasmessi dai filtrati.

La trasformazione maligna sarebbe un resultante della perdita dei meccanismi che regolano la moltiplicazione cellulare; tale trasformazione può aversi anche per mezzo di certe radiazioni, di numerose sostanze chimiche e persino per mezzo dei virus.

Il nuovo carattere così acquisito dalla cellula (potere illimitato di moltiplicazione nell'organismo, a spese degli altri elementi cellulari) è il solo che appare costante e perciò specifico della cellula cancerosa, in confronto della cellula normale.

DISCUSSION:

BERENBLUM: There is a difficulty in correlating electron density on the K region and carcinogenicity, in that carcinogenesis is a relative, not an absolute property, depending on the species or strain of animal and the tissue used.

BOYLAND asks: Have you calculated or considered the relation between the activity of the K region of carcinogens with the: 1) time of tumour induction and 2) percentage incidence of tumours, separately, instead of in the carcinogenic index?

PEACOCK: I think any substance that has been shown to be carcinogenic for any tissue of any animal must be classed unreservedly as a carcinogen. Otherwise we shall have difficulty in correlating our biological observations with physical and chemical observations.

LACASSAGNE répond: Il est bien connu que les cancérigènes agissent inégalement dans les diverses espèces animales et sur les différentes espèces cellulaires d'un même animal. C'est pourquoi nos expériences ont été strictement limitées aux réactions de l'épiderme et du tissu sous-cutané de souris de même origine, de façon que la seule variable soit (autant que possible) le composé chimique éprouvé.

Les conclusions provisoires de ces expériences inachevées précisent que les résultats indiqués sont seulement qualitatifs.

THE INFLUENCE OF SOLVENTS ON TISSUE RESPONSE TO CHEMICAL CARCINOGENS

DR. P. R. PEACOCK (GLASGOW)

The advent of pure chemical carcinogens in 1930, thanks to the work of KENNAWAY and his colleagues at the London Cancer Hospital, brought with it the problem of possible action on the tissues of the organic solvents used as vehicles for painting or injection experiments.

Two classes of solvents were used: 1) volatile solvents e. g. ether, benzene; 2) non-volatile solvents e. g. animal or vegetable fats and oils.

KENNAWAY used lard, for early injection experiments, as a solvent for 1:2:5:6 dibenzanthracene and as I was able to obtain some of this substance through his kindness in 1930 I also used lard as a solvent.

My purpose was to inject dibenzanthracene into the connective tissues of fowls in the hope of inducing sarcomata for comparison with the well known chicken tumour no. 1 of ROUS and MURPHY.

As a necessary control I injected lard alone into the opposite side of the same birds.

It was necessary to heat the lard to 140° C for half an hour to dissolve the Dibenzanthracene and the control lard was similarly heated at the same time.

Three people checked every injection and there is no reason to suppose that any errors occurred regarding the sites injected with Dibenzanthracene.

Of 30 birds so treated 7 developed sarcomata at the site of Dibenzanthracene dissolved in lard (0,4%) only and 3 birds deve-

loped sarcomata both at the site of lard plus dibenzanthracene and at the site of control lard injection. The tumours appeared at about the same time in both sites and in one case the tumour at the site of lard injection appeared before the Dibenzanthracen tumour. We therefore had to face an additional problem, that of the possible carcinogenicity of heated lard.

These results I described in 1933, and in the following year BARRY and COOK described spindle cell tumours of undefined malignancy in rats and in 1936 BURROWS, HIEGER and KENNAWAY obtained with injections of olive oil, lard and other fatty materials tumours of rats but not of mice.

In our experiments it was noted that in every case there was an encapsulating reaction enclosing encysted material at the site of injection and that the tumours had taken origin not from the point of maximum contact with the injected material but from some point in the encapsulating fibrous tissue.

In order to avoid as far as possible this encapsulating reaction so as to test the direct effect of carcinogen on resting connective tissue I employed chicken fat as a solvent for Dibenzanthracene injected into fowls.

Under these conditions no visible reaction tissue developed, fluorescence due to the carcinogen disappeared in a few weeks and no tumours appeared.

Using egg-yolk fat (the ether soluble fraction of egg-yolk) as a vehicle in similar experiments I observed only slight encapsulating reaction but metastasising sarcomata developed in two out of four birds that survived for more than nine months after the injections and in these birds fibrous cysts were present at the site of inoculation.

Owing to the costly and time consuming nature of experiments lasting for years in fowls we extended the work to mice, using mouse fat as a homologous solvent for Benzpyrene which was by then available.

We also used a variety of solvents as vehicles for Benzpyrene, and BECK and I showed in 1938 that when the solvent retained the carcinogen at the site of injection (as judged by local fluorescence) for 5 months or more there was a high incidence of tumours (36 out of 43 mice) whereas when the solvent and the dissolved carcinogen

disappeared from the site of injection within 3 months the tumour incidence was low 5 out of 46 mice.

DICKENS and WEIL-MALHERBE at first confirmed our observations on the effect of mouse fat as a solvent for benzpyrene, but later, as a result of further experiments found that the results were not constant and were related to the amount of phospholipid present in a given volume of mouse fat. A high content of phospho-lipid inhibited tumour growth whereas a high content of cholesterol and a low content of phospho-lipid favoured tumour growth.

Owing to the uncertain result obtained with animal and vegetable fats of variable composition DICKENS used tricaprylin, as recommended by SHEAR, as being a stable solvent. DICKENS and WEIL-MALHERBE published in 1946 results that they interpret as showing that rapid elimination of Benzpyrene from the site of injection favours carcinogenesis and slower elimination is less favourable.

Terms like *rapid* and *slow* require further definition and in fact the graphs published by DICKENS and WEIL-MALHERBE show that Benzpyrene was present in all their mice for at least 85 days in one experiment and 100 days in another in which the phospholipid concentrations were low or high respectively. As their graphs show a steady rate of elimination of Benzpyrene extrapolation would indicate that elimination would have been complete by about the 26th week, by which time 10 out of 26 mice had recognisable tumours. It seems likely therefore that in their experiments as in ours Benzpyrene was in fact present at the site of injection throughout the latent period of carcinogenesis. This corresponds closely with our own experience.

However to make sure of this point we repeated as exactly as possible their procedure and examined groups of mice at various time intervals after single injection of 0.3 ml of a 0.1% solution of 3:4 Benzpyrene in tricaprylin into the right flank.

Twelve mice were killed on the 123rd day after injection; three of these had tumours at the site of injection and Benzpyrene was proved spectrographically to be present encysted at the site of inoculation.

3 mice were killed on the 153rd day one of which had a tumour and in including the tumour mouse Benzpyrene was present and additional bands suggested the presence of a metabolite.

2 mice were killed on the 198th day one of which had a tumour and also showed the presence of Benzpyrene. The other mouse had no tumour and no benzpyrene but bands suggestive of a metabolite.

3 mice were killed on the 232nd day 2 of which had tumours; fluorescence was detected at the site of injection in one of these, but bands suggesting a metabolite only were detected; the other mouse showed only a slight general fluorescence band.

10 surviving mice were killed on the 307th day and had no tumours no cysts and no fluorescence at the site of injection.

These results confirm our previous contention that the presence of Benzpyrene throughout the probable latent period (3-5 months for connective tissues of mice) favours carcinogenesis.

We have no means of telling whether the hydrocarbon acts as such, as through a metabolite or whether the carcinogenic stimulus may be found in the energy expended in conversion from the parent hydrocarbon to its metabolite.

There is no convincing evidence about the action of the metabolite of Benzpyrene first described by me in 1935 at a Meeting of the Pathological Society of Gt. Britain and Ireland at St. Bartholomew's Hospital London July 1935 and isolated by CHALMERS in my laboratory and now thought to be 8-hydroxy-benzpyrene as the substance is unstable and attempts to synthesise it have not yet been successful. The 8-methoxybenzpyrene prepared by BERENBLUM and SCHOENTHAL was found by them to be carcinogenic.

In order to avoid the use of lipid solvents I employed rubber as a vehicle for Benzpyrene having observed the bright and persistent fluorescence of my rubber gloves used for protection when handling this substance. The amounts of Benzpyrene adsorbed by the rubber were less than 0.1 gamma but in two mice inoculated with such fluorescent rubber sarcomata developed. No tumours developed at the site of control rubber in the same or other mice during the same period of observation (9-12 months).

One other effect of solvent on carcinogenic action I should like to mention.

Until recently no one has succeeded in inducing an epidermoid carcinoma in a fowl. The skin of fowls is in my experience extending

over many years completely resistant to painting with any known carcinogen with or without cocarcinogen (croton oil).

In some experiments in which my wife and I wished to add known amounts of 2-acetylaminofluorene to the diet of fowls we injected this substance as a 1 % solution in arachis oil into the lumen of the crop through the skin.

Our technique was not perfect and occasionally drops of the solution were injected into the mucous membrane and subcutaneous tissues. At the site of such injections in two birds squamous carcinomata have appeared after 17 and 21 months respectively. The encapsulation of the injected material by macrophage reaction is in close contact with the squamous epithelium of the crop and it seems that here too the solvent may have played a part in determining the result.

In fact as regards the carcinogenic action of hydrocarbons known to be effective for the epithelium of the skin of mice, we do not know whether these substances can induce sarcoma in undamaged connective tissues; those experiments in which little proliferative reaction is caused by the experimental procedures yield the fewest tumours. Sections of these tumours were demonstrated at this Meeting.

S U M M A R Y

The evidence that solvents profoundly modify the local action of carcinogenic hydrocarbons is briefly reviewed.

Benzpyrene dissolved in tricaprylin is shown to remain at the site of injection in progressively diminishing amounts throughout the latent period of sarcoma induction in stock mice. Towards the end of the latent period evidence of the presence of a metabolite is found at or near the site of injection.

No evidence is yet available to show whether benzpyrene acts as such or through its metabolites to induce sarcoma.

R É S U M É

On considère brièvement la modification provoquée par les solvants sur l'action locale des hydrocarbures cancérogènes.

La solution du benzopyrène en tricapryline reste au point d'injection en quantité qui s'amointrit peu à peu pendant la phase de latence de l'induction sarcomateuse chez les souris.

Presqu'à la fin de la phase de latence on observe, au point d'injection ou dans le voisinage, la présence d'un métabolite de l'hydrocarbure.

On ne peut pas encore assurer si le benzopyrène agit dans l'induction sarcomateuse par soi même ou par ses métabolites.

ZUSAMMENFASSUNG

Vortragender berichtet über den Einfluss der Lösungsmittel auf die örtliche Einwirkung der kanzerogenen Kohlenwasserstoffe. Bei Lösung von Benzpyren in Trikaprylin bleibt dieses am Ort der Injektionsstelle und vermindert sich während des Latenzstadiums der Sarkomentstehung

bei der Maus allmählich immer mehr. Fast am Ende des Latenzstadiums beobachtet man an der Injektionsstelle, bzw. in deren Umgebung die Anwesenheit von Stoffwechselprodukten (« Metabolite ») der Kohlenwasserstoffe. Es lässt sich heute noch nicht mit Sicherheit feststellen, ob Benzopyren selbst oder dessen Abbauprodukte die Sarkomentstehung herbeiführen.

S O M M A R I O

E' riesaminata brevemente la modificazione prodotta dai solventi sull'azione locale degli idrocarburi cancerogeni.

Si dimostra che il benzopirene sciolto in tricapriliua rimane nella sede di iniezione in quantità che diminuisce progressivamente durante il periodo di latenza dell'induzione sarcomatosa in topi. Verso la fine del periodo di latenza si riscontra, nella sede di iniezione o in vicinanza di essa, la presenza di un metabolita dell'idrocarburo.

Non vi è ancora nessuna evidenza sicura che possa dimostrare se, nell'induzione del sarcoma, il benzopirene agisca di per sè o per mezzo dei suoi metaboliti.

DISCUSSION:

BOYLAND: The metabolism of benzpyrene leads first to the formation of BPX which is probably a dihydroxydihydrobenzpyrene. This is converted by treatment with acid or in the animal intestine to a phenolic compound called BPF which is probably 8-hydroxybenzpyrene.

I think that the part of a carcinogenic hydrocarbon which produces its effect is that which is bound to a tissue constituent and so stays at the site of action. This may be then oxidised to a dihydroxydihydrohydrocarbon complex. It is presumably a complex of this kind which is the proximate active agent of carcinogenesis.

This complex may increase the difficulties of cell division and so that the change that the change of the type of mutation or of cancer is more likely to occur.

COWDRY asked PEACOCK whether tumours in these experiments appear before the metabolite of the carcinogen is formed.

COWDRY: regarding PEACOCK's view expressed the contrary view that knowledge of noncancerous cells must be the basis of an understanding of the mutation which we believe to take place in very few of them.

COWDRY also presented a schema of carcinogenesis for discussion. He expressed the hope that it would be added to and extended by others and that eventually it would indicate areas of agreements and points of difference of opinion some of which would be selected as susceptible of study by controlled experiments thus following out the plan for the Conference originally defined by Professor RONDONI and approved of by his Holiness the Pope.

CANCEROGENE, CANCERICIDE, MUTAGENE UND MORPHOGENE STRAHLEN UND STOFFE IM MITOSEVERSUCH

PROF. HANS R. SCHINZ (ZÜRICH)

I. Wir besitzen zur Zeit zwei Methoden, um Krebse dauernd zu heilen. Es sind dies Operation und Bestrahlung mit kurzwelligen Strahlen (Röntgenstrahlen, natürliche und künstliche radioaktive Stoffe). Mit diesen Methoden können im Frühstadium nach Früherfassung und Früherkennung Dauerheilungen erzielt werden. Es handelt sich um eine Lokalthherapie, die bei genereller Krebsaussaat versagen muss. Von 100 Dauerheilungen von Krebskranken fallen 70 auf das Konto Strahlentherapie und 30 auf das Konto Chirurgie. Erst im Anfangsstadium befindet sich die Chemotherapie der malignen Geschwülste. Sie ist noch keine Therapie der Wahl, sondern eine Hoffnung und ein Wechsel auf die Zukunft. Um nicht falsche Erwartungen zu erwecken und um Enttäuschungen vorzubeugen, möchte ich zu Beginn meines Vortrages ausdrücklich feststellen: Wer Chemotherapie der Krebse treibt und die chirurgischen und radiotherapeutischen Heilverfahren vernachlässigt, schadet den Kranken.

Das Prinzip und das Ziel der chirurgischen Krebstherapie ist einfach und bietet keine Probleme. Der Chirurg versucht, den Krebs im Gesunden, en bloc aus dem Körper herauszuschneiden. Der Strahlentherapeut will die Krebszellen innerhalb des Körperversandes vernichten, indem er eine cancericide Dosis verabreicht. Die Krebszelle muss so geschädigt werden, dass sie zugrunde geht, während die normale Nachbarzelle leben bleibt und möglichst wenig geschädigt werden soll. Zahlreich sind die Untersuchungen, welche

die Nekrobiose der Krebszellen unter Strahlenwirkung in vivo und in vitro untersucht haben. Die zytomorphologische Beobachtung zeigt, dass beim Untergang der Krebszellen Kernveränderungen unter dem Bilde von Kernpyknosen, Karyolysen usw. festzustellen sind. Es gibt hoch strahlensensible und sehr strahlenresistente Krebse. Dazwischen findet sich ein ganzes Spektrum der Strahlensensibilität von malignen Zellen. Der geschilderte Strahleneffekt ist Modell für die cancericiden chemischen Mittel, die — und darin liegt ihre allfällige Ueberlegenheit — nicht lokal wirken, sondern überall im ganzen Körper an die Krebszellen herangebracht werden können. Die Forschungen über experimentelle Krebserzeugung beim Tier haben schlussendlich das gleiche Ziel: Aufklärung der Krebsgenese als Grundlage jeder Krebsheilung. Wir hoffen nach Kenntnis der cancerogenen Noxen — seien es Strahlen, seien es chemische Stoffe — nicht nur erfolgreich Krebsprophylaxe treiben zu können, sondern wir glauben, aus der Analyse der Entstehung der Krebszelle aus der Normalzelle Mittel und Wege zu finden, um Krebsheilmittel zu gewinnen.

II. Nachdem die klinisch-morphologische Krebsforschung um die Jahrhundertwende zu einem gewissen Abschluss gekommen ist, hat im 20. Jahrhundert, im Zusammenhang mit der grossartigen Entwicklung der Biologie, der Strahlenforschung und der Biochemie die intensive Erforschung der Krebsaetiologie und der Krebspathogenese eingesetzt. Im Laufe der letzten Jahrzehnte sind fünf Gesichtspunkte als *Leitmotiv* der Krebsforschung in den Vordergrund getreten und haben an den verschiedensten Orten die Forscher zur Arbeit angeregt.

1. Die Tatsache der *Berufskrebse* hat im Tierexperiment zur Entdeckung von *cancerogenen* Noxen geführt. Wir erzeugen heute mit Leichtigkeit bei unseren Laboratoriumstieren Strahlenkrebs und chemische Krebs.

2. Kurz nach Entdeckung der Röntgenstrahlen ist den Klinikern aufgefallen, dass die kurzweilige Strahlung sowohl Krebse heilen als auch Krebse erzeugen kann. Zuerst wurde die *cancericide* und erst nachher die cancerogene Wirkung festgestellt.

3. Von grosser Bedeutung wurde die Entdeckung der *mutagenen* Wirkung dieser cancericiden und cancerogenen Röntgenstrahlen durch Muller 1927. Die Strahlengenetik als eigener Zweig der Vererbungsforschung hat sich entwickelt und ist für die Krebsforschung und für die Theorie der Krebsentstehung von grosser Bedeutung geworden.

4. Die Entwicklung der Krebszelle aus der Normalzelle ist ein *morphogenes* Problem, handelt es sich doch um eine irreversible Zelländerung. Die Entdeckung der gestaltlichen Umwandlung von Keimen und Keimteilen unter dem *induktiven* Einfluss von lebendem Nachbargewebe durch Spemann, der Nachweis der stofflichen Natur dieser Induktoren durch Holtfreter und deren Ersatz durch totes Gewebe und chemische Stoffe verlangt deren Prüfung im Krebsexperiment, denn auch die Krebsbildung ist ein Problem der Formbildung.

5. Die *zytomorphologische* Betrachtung vergleicht die unter cancerogenen, cancericiden, mutagenen und induktiven Einwirkungen entstandenen Zellveränderungen und stellt zum Teil weitgehende Uebereinstimmung der Effekte fest. Der Prozess kann sich an der ruhenden Zelle als *zytolytischer* und karyoklastischer Effekt abspielen oder sich an der teilungsbereiten oder in Teilung begriffenen Zelle als mitotroper Effekt äussern.

Es scheint wertvoll und notwendig, die verschiedenen Stoffe und Strahlen sowohl auf cancerogene und cancericide, wie auch auf mutagene, morphogen-induktive und mitotrope Wirkungen zu prüfen. Ist der Nachweis der einen Wirkung gelungen, so besteht auch die Möglichkeit der Wirkung in anderen Richtungen. In geeigneten Versuchsreihen sollten mutagene Stoffe auf cancerogene und cancerogene Stoffe auf mutagene Wirkung erprobt werden usw. Es können dadurch neue cancerogene Stoffe, neue mutagene Stoffe, neue Induktionsmittel und neue mitotrope Stoffe entdeckt werden, wie bereits an Hand der heutigen Beobachtungen bewiesen werden kann. Darüber hinaus dürften wir durch solche Untersuchungen Einblick in das Wesen der Krebsentstehung bekommen. Wirken cancerogene Stoffe gleichzeitig mutagen, so dürfte die *Mutationstheorie* der Krebsentstehung darin ihre Stütze finden; sind

cancerogene Stoffe induktiv wirkungsvoll, so dürfte dies für die *Induktionstheorie* der Krebsentstehung sprechen. Ich glaube, dass an Krebsforschungsstätten solche Untersuchungen systematisch angestellt werden sollten, denn infolge der weitgehenden Spezialisierung und aus Zeitmangel ist der einzelne Forscher nicht in der Lage, persönlich alle notwendigen Prüfungen durchzuführen. Weder beherrscht er die jeweils notwendige Technik, noch hat er die unentbehrliche Routine für alle die verschiedenen Untersuchungsmethoden. Es liegt ein klassisches Beispiel für *Gruppenarbeit* vor.

Bevor wir auf die Ergebnisse solcher Untersuchungen eintreten sei kurz die *Methodik* angegeben, die bei den zu prüfenden Stoffen und Strahlen systematisch angewendet werden kann.

1. Prüfung am Tier auf *allgemeintoxische* und *zytolytische* Wirkungen in Abhängigkeit von der Dosis.

2. Prüfung an reingezüchteten krebsfreien Tierstämmen auf *cancerogene* Wirkung und analoge Prüfung in der Gewebekultur von normalen Geweben mit nachträglicher Ueberimpfung auf gesunde krebsfreie Tiere.

3. Prüfung im entwicklungsmechanischen Experiment, z. B. an Molchkeimen und in embryonalen Explantaten auf *induktive Fähigkeiten*.

5. Prüfung an Tieren mit Spontantumoren aus reingezüchteten Krebsstippen, an Tieren mit Transplantations-tumoren und an Tieren mit Experimentalkrebsen auf *cancericide* Wirkungen. Erst nach dem positiven Ausfall dieser Tierexperimente erfolgt die Erprobung am Krankenbett.

6. Prüfung in der Gewebekultur, im Pflanzentest und am Tier auf *zymorphologische* und *mitotrope* Wirkungen. Zu prüfen ist auf Zellveränderungen in der Ruhe- und in der Teilungsphase (Zytolyse, Primäreffekt, zytostatischer Effekt, Sekundäreffekt). Eine quantitative Auswertung ist vorzunehmen.

7. Prüfung des *Stoffwechsels* im Tierversuch oder im Gewebeschnitt (Warburg-Apparatur).

8. Prüfung des *Hormon-* und *Fermenthaushaltes* im Tierversuch und im Explantat.

Dies ist ein Programm, das für die in Betracht kommenden Stoffe und Strahlen noch nicht systematisch durchgeführt worden ist und auch vom Einzelnen nicht durchgeführt werden kann. Sie werden deshalb in den folgenden synoptischen Tafeln manches Fragezeichen finden.

III. Ich beginne mit der Besprechung der Wirkungen von *cancerogenen* Strahlen und Chemikalien. Die Frage lautet: *Haben die bekannten und bewährten Noxen auch mutagene und induktive Wirkungen?*

Vorerst wollen wir uns kurz über die wichtigsten cancerogenen Stoffe und Strahlungen orientieren, die sich im Tierexperiment zur Krebserzeugung bewährt haben. Sie sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Aufzählung ist nicht vollständig, es fehlt der von mir entdeckte *Metallkrebs*, und weggelassen sind auch die *Viruskrebse*. Gemeinsam ist allen Krebsnoxen, dass der Krebs erst nach langer Latenzzeit auftritt. Notwendig ist meist auch eine sehr lange Einwirkungsdauer der cancerogenen Noxe. Im Vordergrund des Interesses steht einerseits *der Kohlenwasserstoffkrebs* und andererseits *der Strahlenkrebs*.

Was die Krebserzeugung durch aromatische Kohlenwasserstoffe anbetrifft, so ist es auffallend, dass die verschiedenartigsten morphologischen Krebsformen gebildet werden, in Abhängigkeit von der Applikationsweise und von der gewählten Tierart. So erhalten wir bei Pinselung des Fells mit cancerogenen Kohlenwasserstoffen Pflasterzell-carcinome der Haut, bei subkutaner Injektion die verschiedensten Sarkomarten usw. In Tabelle 2 sind solche Befunde zusammengestellt. Auch für ein und denselben aromatischen Kohlenwasserstoff sind die verschiedenen Laboratoriumstiere verschieden empfindlich, wie aus Versuchen von BERENBLUM hervorgeht (Tabelle 3). Wir entnehmen der Tabelle, dass das Meerschweinchen entgegen der landläufigen Meinung nicht resistent ist gegen 9,10 Dimethyl- 1,2 Benzanthracen. Am empfindlichsten gegenüber dieser cancerogenen Noxe ist die Kaninchenhaut. Weitere Einzelheiten mag man der Tabelle entnehmen. Auffallend ist, dass alle cancerogenen Kohlenwasserstoffe Doppelbindungen enthalten und der aromatischen Chemie angehören. SCHMIDT hat in der Dichte der bei Doppelbin-

dungen nur locker gebundenen Elektronen das Hauptmerkmal der cancerogenen Kohlenwasserstoffe sehen wollen und glaubt, dass diese lockergebundenen Elektronen der Doppelbindungen mit dem Elektrogenas in den Metallen zu vergleichen sind und als Energieüberträger auf das Zelleiweiss fungieren, das unter deren Einwirkung verändert wird. Diese *Elektronentheorie* der Krebsentstehung wird heute durch LACASSAGNE und seine Schüler weiter verfolgt. Wir wollen uns hier mit dieser kurzen Andeutung begnügen.

Auch Strahlenkrebse sind leicht zu erzeugen. Zuerst war es der Radiumkrebs, der entdeckt wurde, bald folgte der Röntgenkrebs. Mit Korpuskularstrahlen können ebenfalls Krebse produziert werden, wie aus Tabelle 4 hervorgeht. Auch für den Strahlenkrebs stellen wir fest, dass durch ein and dieselbe Noxe die verschiedensten Krebsformen entstehen.

Nach dieser Kurzen Orientierung über den heutigen Stand der Krebsentstehung im Tierexperiment wollen wir uns mit der Frage der *mutagenen Wirkung* der *cancerogenen Strahlen und Stoffe* beschäftigen. Wir haben bereits angeführt, dass die Röntgenstrahlen ein ausgezeichnetes mutagenes Agens sind. Zuerst stellte man deren cancerogene Fähigkeiten fest, später erzeugte man mit deren Hilfe die ersten experimentellen Mutationen, wie Muller in genialer Versuchsanordnung nachgewiesen hat. Alle Quanten von den Gammastrahlen über die harten und weichen Röntgenstrahlen bis und mit dem ultravioletten Licht wirken cancerogen und mutagen. Unwirksam in diesen Beziehungen hingegen ist das sichtbare Licht und der noch langwelligere Bereich des elektromagnetischen Spektrums. Wegen ihrer Durchdringungsfähigkeit und leichten zeitlichen und räumlichen Dosierbarkeit ist die kurzwellige Strahlung nach wie vor das einfachste Mittel zur experimentellen Mutationserzeugung. Die kurzwellige Strahlung hat aber auch allgemein-toxische, zytolytische, mitotrope, morphogene und cancericide Effekte. Die cancericide Wirkung geht aus der Krebsheilung durch Bestrahlung hervor. Die allgemein-toxische Schädigung ist unangenehme Begleiterscheinung der Strahlenbehandlung. Die mitotrope Wirkung ist ein sehr bekannter Effekt, auf den wir später eingehen werden und die Erzeugung von Missbildungen durch Röntgenbestrahlung ist ebenfalls schon längst bekannt. Der Strahlenkrebs war die Krankheit der Pioniere der

Röntgenologie und kann im Experiment leicht nachgeahmt werden.

Gehen wir zu den aromatischen Kohlenwasserstoffen mit cancerogener Wirkung über, so sind neuerdings durch DEMEREC an *Drosophila* und durch STRONG an der Maus mutagene Wirkungen nachgewiesen worden, während für die gleiche Stoffgruppe WADDINGTON und NEEDHAM Induktionswirkungen festgestellt hatten, die einem embryonalen Organisator gleichwertig sind. Auch cancericide Wirkungen sind von K. H. BAUER und von HADDOW nachgewiesen worden. Für die übrigen in der Tabelle 5 aufgeschriebenen cancerogenen Stoffe ist deren mutagene Wirkung (Tabelle 5) Z. T. noch nicht bekannt oder noch nicht untersucht, und das Gleiche gilt für allfällige cancericide und morphogene Wirkungen, während wir über deren mitotrope Effekte ziemlich gut orientiert sind. In Tabelle 5 habe ich die Erfahrungen zusammengestellt, welche über *oestrogene* und *neuralinduktive* Wirkungen der cancerogenen Kohlenwasserstoffe gesammelt worden sind. Wir entnehmen derselben, dass z. B. Methylcholanthren carcinogen und neuralinduktiv wirkt, während Benzpyren auch noch *oestrogene* Effekte hervorruft. Bei der mutagenen Wirkung wird die Erbsubstanz geändert, bei der induktiven Wirkung hingegen bleibt sie intakt. Es entsteht direkt über das Protoplasma oder indirekt über den Kern — ohne Aenderung der Erbsubstanz—aus einem Blastem etwas Neues, das in der normalen Entwicklung nicht vorgesehen war, potentiell aber in dem Reaktionssystem vorhanden ist. Wir werden darauf zurückkommen.

Zusammenfassend stellen wir fest, dass cancerogene Strahlen und Stoffe mutagene, morphogene und cancericide Wirkungen haben können, dass aber bei der Mehrzahl der cancerogenen Substanzen diese Effekte noch nicht eingehend geprüft sind.

IV. *Haben die bisher bekannten mutagenen Stoffe auch cancerogene und cancericide Wirkungen?* Für die kurzweilige Strahlung und für die jonisierende Korpuskularstrahlung haben wir die Antwort bereits gegeben. Bevor wir aber auf die allfälligen cancerogenen Eigenschaften der heute bekannten mutagenen Chemikalien eingehen, möchten wir vorerst kurz noch auf die mutagene Wirkung eintreten, wobei die Ergebnisse der Strahlengenetik massgebend sind, hat man doch auf deren Basis eine Art Atomtheorie der Erbsubstanz, d. h.

eine *Gentheorie* entwickeln können. Ganz allgemein konnte festgestellt werden, dass der Typus der experimentellen Erbänderung durch kurzwellige Strahlen, und wie wir bald sehen werden, auch durch chemische Stoffe, sich prinzipiell nicht von dem unterscheidet, was man an Spontanmutationen im Laboratorium oder in freier Wildbahn beobachtet. Die dabei festgestellten Gesetzmässigkeiten gelten für alle Lebewesen. Die erzeugten Mutationen sind ferner unspezifisch, was sagen will, dass prinzipiell alle Gene mutationsbereit sind und mutieren, wenn sie von einem mutagenen Agens getroffen werden.

Das Agens Röntgenstrahlen wirkt so auf die Gene, wie wenn man mit einer gleichmässig streuenden Schrotladung eine gleichmässig verteilte Schar Vögel beschiesse würde. Es war naheliegend, nach Chemikalien zu suchen, die mutagen wirksam sind, und es bestand dabei die Hoffnung, solche Stoffe zu finden, die ganz spezifisch nur ganz bestimmte Mutationen hervorbringen, indem eine chemische Substanz X auf ein Gen Y einwirkt, nicht aber auf ein Gen Z (gerichtete Mutationsauslösung). Jahrelang waren die Versuche erfolglos oder die Ergebnisse vieldeutig und die Ausbeute gering. Erst während des 2. Weltkrieges wurden mutagene Chemikalien entdeckt, die ebenso zuverlässig wie die kurzwellige Strahlung irgend ein Gen aus seinem stabilen Zustand *a* in einen neuen stabilen Zustand *a'* überführen, also eine Mutation erzeugen. Diese mutagenen Stoffe sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Englische Biologen hatten sich mit der biologischen Wirkung von Kampfgasen zu beschäftigen. Senfgas — auch Lost oder Yperit genannt — ruft ähnliche Gewebsschäden hervor wie Röntgenstrahlen. Es kommt zu schwer heilbaren Verbrennungen. ROBSON schloss aus Analogie zu den Röntgenstrahlen beim *Senfgas* auf mutagene Wirkung und konnte mit Frl. AUERBACH diesen Effekt an der *Drosophila* einwandfrei sicherstellen. Die Mutationsrate bei Senfgasapplikation war gleich hoch wie bei Röntgendosen. Auch das Senfgas wirkt völlig unspezifisch und erzeugt die verschiedenartigsten Erbänderungen. Mit Senfgas konnte man auch morphogene Effekte erzeugen. Senfgas wirkt auch cancericid. Der Nachweis cancerogener Wirkung ist bisher nicht gelungen. Da die allgemein-toxische Schädigung sehr hoch ist, wurde nach anderen Verbindungen gesucht, die sich vom Senfgas ableiten. Hieher gehört

der *Nitrogen-Mustard*, in dem das Schwefelatom durch Stickstoff ersetzt ist. Es wirkt weniger toxisch, hat aber die gleiche mutagene und cancericide Wirkung. Auch cancerogene Effekte wurden nachgewiesen. Senföle wirken schwach mutagen, sonst ist nichts bekannt. In Zürich haben NIGGLI und HADORN mit *Phenol* Drosophilamutanten erzeugt, indem sie Eierstöcke in Phenollösung badeten und dann transplantierten. Es scheint eine gewisse genspezifisch auswählende Wirkung vorzuliegen, indem bei wiederholter Prüfung gewisse Mutanten abnorm häufig auftraten. Phenol ist auf allfällige cancerogene Wirkungen noch zu prüfen. Ein weiterer Stoff mit mutagener Wirkung ist das *Urethan*, das sowohl im Pflanzenversuch, wie auch im Drosophilaversuch eine klare mutagene Aktivität aufweist. HADDOW entdeckte bei Leukaemien dessen cancericide Wirkung. NETTLESHIP und HENSOW erhielten nach Urethan bei Mäusen eine Erhöhung der spontanen Lungentumorrate und JAFFE erzielte Lungenkrebs in krebsrefraktären Mäusenstämmen. Auch *Formaldehyd* wirkt nach den Untersuchungen von RAPAPORT, die in Amerika bestätigt wurden, mutagen. Die Prüfung auf cancerogene und cancericide Wirkung steht noch bevor. Am Schluss dieser Tabelle sehen Sie *Colchicin* angeführt. Es ruft keine Genmutationen hervor, erzeugt aber Polyploidie und wirkt allgemein-toxisch. Auch ein gewisser cancericider Effekt ist nachweisbar.

Bei anderen mutagenen Substanzen steht der positive Nachweis von carcinogenen Wirkungen noch aus. Die therapeutische Anwendung als cancericides Mittel scheidet meist an der schweren allgemeintoxischen Wirkung. Nur Nitrogen-Mustard und Urethan haben zu therapeutischen Erfolgen geführt, die aber leider über palliative Effekte nicht hinausgehen.

Zusammenfassend stellen wir fest, dass für einige mutagene Stoffe auch cancerogene und cancericide Effekte nachgewiesen werden können.

V. Wir haben bereits bei Besprechung der cancerogenen und mutagenen Wirkungen der kurzwelligen Strahlung angeführt, dass diese auch ausgesprochen mitotrope Effekte erzeugen. *Wir wollen nun feststellen, ob cancerogene, cancericide und mutagene Stoffe ähnliche mitotrope Wirkungen haben.* Die Prüfung erfolgt im Tier-

experiment, in der Gewebekultur oder im Wurzeltest von *Vicia Faba* (HOHL). Wir haben diese einfache und billige Methode gewählt und in Quetschpräparaten nach Feulgen-Färbung die Effekte festgestellt (Tabelle 7). Die Dosen werden so gewählt, dass keine lokalen schweren Gewebsschädigungen und keine toxischen Allgemeinwirkungen auftreten. Die *Dosen* sind also *sehr niedrig*, wir können von annähernd physiologischen Dosen sprechen. Der Ruhekern wird in Ruhe gelassen und nur der teilungsbereite und in Teilung begriffene Kern beeinflusst. Wir unterscheiden bei mitotropen Wirkungen 1. den Primäreffekt (*), der sich an jenen Zellkernen abspielt, die im Moment des Insultes in Teilung begriffen sind, 2. das *mitosenfreie Intervall* oder die *zytostatische Wirkung*, die sich darin äussert, dass der Uebertritt des Ruhekernes in die Prophase verhindert wird und 3. den *Sekundäreffekt*, der sich darin kundgibt, dass Mitosestörungen bei jenen Zellen auftreten, die im Moment des Insultes zwar in Ruhephase aber doch teilungsbereit waren.

Die mitotropen Effekte können mikroskopisch festgestellt und quantitativ ausgewertet werden. Sie führen zu Wachstumshemmung.

Es ist bekannt, dass solche Effekte mit sehr vielen Substanzen erzielt werden können, wenn man sie in hohen Dosen anwendet. Für unser Problem sind aber nur jene Stoffe wichtig, die in *minimalen Dosen* mitotrope Effekte aufweisen.

Was hat sich ergeben? *Die Wirkungen von Senfgas, Nitrogen-Mustard und Trypaflavin gleichen weitgehend den bereits gut bekannten zytomorphologischen Röntgenstrahleneffekten.* Wir finden bei diesen Stoffen den Primäreffekt, das mitosenfreie Intervall und den Sekundäreffekt. Der Primäreffekt ist charakterisiert durch Chromosomenpyknosen, welche zu Anaphasenbrücken führen, durch Chromosomenbrüche und Chromosomenrestitutionen, durch Centromerschäden, sodass die getroffenen Chromatiden in der Äquatorialebene liegen bleiben und durch Blockade der frühen Metaphase. Wir finden auch zytostatische Wirkungen, die Mitosenzahl wird herabgesetzt und schliesslich verschwinden sämtliche Mitosen für einige Zeit, um dann dem Sekundäreffekt Platz zu machen, der wiederum

(*) Es handelt sich dabei nicht um den physikalischen oder chemischen Primärvorgang in der Zelle, sondern um den frühesten biologischen Kerneffekt.

charakterisiert ist durch Chromosomenbrüche, Chromosomenrestitutionsen, Centromerschäden, andere Mitoseatypien und Karyomerenbildung infolge Schädigung des Spindelapparates. Bei *Urethan* fanden wir einen ausgesprochenen Primäreffekt und zytostatische Wirkungen. Sekundäreffekte haben wir nicht beobachtet. Auffallend ist die Karyomerenbildung, die Chromosomenverkürzung durch Aufspiralisation der Chromonemen und die Polyploidisierung. Chinonderivate, Folinsäure, carcinogene Kohlenwasserstoffe usw. haben ähnliche Primäreffekte und zytostatische Wirkungen, während die Sekundäreffekte in unserer Versuchsanordnung fehlen. Beim Colchicin konnten wir auch keine Zytostase feststellen.

Die Prüfung der verschiedenen Agentien auf mitotrope Effekte hat einen doppelten Sinn: Fällt der Versuch negativ aus, so ist von den verwendeten Substanzen, die als Krebsheilmittel angeboten werden, kein cancericider Effekt zu erwarten und auch cancerogene und mutagene Wirkungen sind unwahrscheinlich. Fällt der Versuch auf mitotrope Wirkung bei grossen Dosen positiv aus, so besagt er nicht viel, denn mit allen möglichen Substanzen sind mit grossen toxischen Dosen solche Effekte zu erzielen. Fällt der Versuch bei minimalen Dosen positiv aus, so lohnt es sich, das betreffende Agens in weiteren Versuchen auf cancericide, cancerogene und mutagene Wirkungen zu prüfen.

Zusammenfassend stellen wir fest, dass bei allen von uns untersuchten cancerogenen, cancericiden und mutagenen Stoffen schon bei minimalen Dosen ausgesprochen mitotrope Effekte gefunden werden konnten.

Natürlich darf man bei festgestellter mutagener Wirkung ohne Versuch nicht auf cancerogenen Effekt schliessen, die Versuche zeigen nur, dass wir es mit *biologisch höchst aktiven Stoffen* zu tun haben, die in minimalen Dosen zu den verschiedenartigsten biologischen Effekten führen. Der Beweis cancerogener Wirkung ist im Tierexperiment erst zu erbringen.

VI. Was für *Folgerungen* ergeben sich aus den aufgezählten Befunden und Beobachtungen für die *Chemotherapie* der Krebse? Für den Krebstherapeuten ist die Prüfung der verschiedenen Stoffe auf *cancericide* Wirkung am wichtigsten. Ein ideales chemisches

Krebsheilmittel muss folgende Bedingungen erfüllen: Es muss die Krebszellen unter Schonung der gesunden Zellen bei minimaler toxischer Allgemeinschädigung abtöten. Als Modell-substanz erwähne ich das Alloxan, das elektiv die Pankreas-inseln nekrotisiert; allerdings wirkt es sehr toxisch. *Wir besitzen bis heute kein chemisches Krebsheilmittel, das zytolytisch alle Arten der Krebszellen vernichtet.* Ich glaube auch nicht, dass je ein solches Universalmittel gefunden wird. Die bis heute bekannt gewordenen cancericiden Chemikalien schädigen nur oder vorwiegend ganz spezielle Arten von Zellen durch Zytolyse. So wirkt Nitrogen-Mustard auf die Zellen der lymphogranulomatösen Neubildungen und Urethan auf die Leukämie-Stammzellen. Die Wirkung auf Karzinomzellen ist minimal. Interessanterweise äussert sich die hohe Sensibilität und Vulnerabilität der genannten malignen Zellarten nicht nur gegenüber den erwähnten Giften, sondern in gleicher Weise auch gegenüber der kurzwelligen Strahlung und gegenüber mechanischen Einwirkungen. Offen bleibt die Frage, warum wir bei Lymphogranulomatose und bei Leukämie durch die Chemotherapie keine Dauerheilung erzielen können. Es tritt nach kürzerem oder längerem symptomfreien Intervall immer wieder das Rezidiv auf. Es müssen also maligne Zellen erhalten geblieben oder neu gebildet worden sein. Der Grossteil der malignen Zellen ist freilich während der Behandlungsperiode zytolytisch zugrundegegangen. Offensichtlich wirken die genannten Stoffe nur auf eine oder einige wenige Glieder der malignen Zellgenerationen ein und verschonen andere. Vielleicht sind es auch verschiedene Funktionszustände, welche die verschiedene Resistenz bzw. Vulnerabilität der neoplastischen Zellen bedingen. Darüber sind weitere Untersuchungen notwendig.

Die Mehrzahl der bis heute bekannt gewordenen, untersuchten und als Chemotherapeutika gegen Krebs empfohlenen Substanzen wirken nicht zytolytisch, sondern mitotrop. Sie hemmen für kürzere oder längere Zeit das neoplastische Wachstum und erzeugen dadurch palliative Effekte. Eine Dauerheilung ist durch mitotrope Wirkung allein nicht zu erreichen. Die Mehrzahl der Krebse sind übrigens den heute verwendeten Chemikalien gegenüber chemoresistent, ähnlich wie es neben strahlensensiblen auch strahlenresistente Krebsformen gibt. Es bleibt die Hoffnung, dass durch Kombination von Strahlung-

gen und chemischen Stoffen ein cancericider, zytolytischer und nicht nur mitotroper Summationseffekt erzielt wird, und es bleibt weiter die grosse Hoffnung, elektivzytotrope Chemotherapeutika zu finden, die ausgerichtet sind auf ganz bestimmte Krebsformen, zu denen sie passen, wie ein spezieller Schlüssel zu einem speziellen Schloss.

VII. Am Schluss meiner Ausführungen möchte ich auf die Folgerungen eingehen, welche sich aus den festgestellten Befunden für die *Krebsgenese* ergeben. Un dieses klinisch so bedeutungsvolle Phaenomen zu verstehen, müssen wir uns den biologischen Erfahrungsschatz zunutze machen, der etwa seit der Jahrhundertwende durch die erfolgreiche Tätigkeit der Biologen entdeckt und klar-gestellt worden ist. Wir kennen zahlreiche Krebsursachen, es liegt ein typisches Beispiel von *Poly-Aetiologie* vor. Die Pathogenese aber ist immer noch sehr umstritten. Die *Ursachen* sind das *Aktionssystem* und die *Zellen* das *Reaktionssystem*. Beide stehen in fort-gesetzter Wechselwirkung. Es ist durchaus möglich, dass der Krebs zwar keine aetiologische, aber eine pathogenetische Einheit ist. Die Reize, welche biologische Effecte erzeugen, charakterisieren wir nicht nur nach ihren chemischen oder physikalischen Eigenschaften, sondern nach dem Effekt, den sie erzeugen. Wir unterscheiden modifikatorische, mutagene, induktive und umprägende Reize (Ta-belle 8), die wir der Reihe nach ganz allgemein und im speziellen in Hinsicht auf das Krebsproblem besprechen wollen.

a) *Modifikatorische* Reize sind solche, welche an Zellen, Ge-weben, Organen oder Individuen zur Entstehung von *Modifikationen* und *Dauermodifikationen* führen. Art und Ausmass der Verände-rungen sind bedingt durch die erblich gegebene *Reaktionsnorm* (*). Es handelt sich um nicht-erbfeste, adaptive Reaktionen des Phae-notypus mit seinen Phaenen auf die verschiedensten Umweltbedin-gungen. Diese Reaktionen sind quantitativ und qualitativ vom Reiz abhängig und zum Teil *reversibel*, zum teil auch *irreversibel*. Der Prozess spielt sich im Zytoplasma ab ohne Aenderung des genetischen

(*) Unter Reaktionsnorm versteht die Biologie das Vermögen, auf die jeweils einwirkenden Umweltfaktoren gesetzmässig mit einer besonderen Gestalt-ung zu reagieren, wobei unter gleichen Umständen alle biologischen Einheiten in übereinstimmender Weise antworten.

Apparates, d. h. ohne Aenderung der sich selbst vermehrenden Erbmassen von Kern und Zytoplasma. Fällt der Reiz weg, so sistiert der Prozess und die erzeugte Veränderung kann u. U. rückgebildet werden. Klassische Beispiele sind die Narkose, aber auch die Muskelhypertrophie bei starker Arbeitstätigkeit. Unter Umständen können freilich Dauerstrukturen erhalten bleiben, so z. B. der durch gute Ernährung erzeugte Riesenwuchs oder ein traumatisch erzeugtes Hühnerauge; dieses stellt aber sein Wachstum nach Sistieren des Reizes ein. Die *klassische Reiztheorie* der *Krebsentstehung* von Virchow stand auf diesem Boden, wenn freilich die Begriffsbildung damals noch nicht so geklärt war.

Die grosse Mehrzahl der Krebsforscher nimmt heute unseres Erachtens mit Recht an, dass die bösartigen Geschwülste nicht durch reversible, sondern durch *irreversible Zelländerungen* zustandekommen, wobei es vorläufig offensteht, ob die irreversible Zelländerung die Erbmasse unverändert lässt oder ob durch Erbänderung eine neue Zellrasse entsteht. Von irreversiblen Lebensprozessen sprechen wir ganz allgemein dann, wenn entweder bestehende Dauerstrukturen von Zellteilen, Zellen, Geweben und Organen entweder definitiv und irreperabel vernichtet und nicht mehr regeneriert werden, sodass Funktionen ausfallen, oder wenn es zur Bildung neuer Dauerstrukturen kommt, die neue Funktionen ermöglichen. Klassische Beispiele aus der Biologie sind die Embryonalentwicklung, die Reifung und das Altern, aber auch die Entstehung neuer Formen und Rassen. Wir kennen zur Zeit drei Mechanismen, die solche irreversible Zelländerungen hervorrufen; es sind dies die *Mutation* durch mutagene Reize, welche die Erbmasse verändern, die *Induktion* durch Induktoren, welche die Erbmasse unverändert lassen und zu einer Aenderung der Determination und Differenzierung im Zytoplasma führen und die *Umprägung* durch spezifische « infektiöse » Umprägungsreize, die alle für die Krebsgenese verantwortlich gemacht worden sind und verantwortlich gemacht werden können.

b) Bei der *Mutation* handelt es sich um eine sprunghafte, diskontinuierliche irreversible Aenderung der Erbmasse. Angriffsort ist der Genotypus, Ursache ist ein Treffer in der *Erbmasse*. Diese sitzt zum Teil im Kern und zum Teil im Zytoplasma und besitzt die Fähigkeit der Selbstreproduktion. Sehr gut orientiert sind wir über die

Erbmasse des *Zellkernes*; sie besteht aus einzelnen distinkten stabilen *Kerngenen*, die linear in den Chromosomen angeordnet sind und in der somatischen diploiden Zelle zweifach vorhanden sind. Bei der geschlechtlichen Fortpflanzung trennen sie sich gesetzmässig, sie mendeln. In der Natur entstehen spontan, d.h. ohne erkennbare äussere Ursache Kerngenmutationen, Chromosomenmutationen und Genommutationen, die das Material für die Entstehung neuer Arten darstellen, wenn sich der Mutationsvorgang in den Geschlechtszellen abspielt. Der gleiche Mutationsvorgang kommt aber auch in den Kernen der somatischen Zellen vor. Ueber die Erbmasse des *Zytoplasmas*, über die plasmatische Vererbung, sind wir weniger gut orientiert, sicher ist nur, dass auch das Zellplasma Erbmasse enthält, die aber vielleicht nicht aus einzelnen Genen zusammengesetzt ist, von denen jedes vom anderen verschieden ist, sondern es ist wahrscheinlich, dass die Erbmasse des Zellplasmas aus tausenden von gleichen *Plasmagenen* besteht. Es handelt sich um das sich selbst fortpflanzende Proteinsystem des Zytoplasmas, das selbständig mutieren kann. Ueber die Beziehungen der Kerngene zu den Plasmagenen wissen wir noch nicht viel, sicher ist nur, dass sich Zellen und Kerngene schneller fortpflanzen können als Plasmagene. Die Plasmagene können von den Kerngenen abhängig sein und umgekehrt, und gewisse Teile des Zellapparates können weder durch die Kerngene allein noch durch die Plasmagene allein hervorgebracht werden. Irgendwie müssen beide zusammenspielen, denn neben der reinen *Kernvererbung* gibt es eine *plasmatische* oder *mütterliche* Vererbung und eine *genoplasmatische* Vererbung (SCHINZ), wobei Kern und Plasma für den entstehenden Phaenotypus und die verschiedenen Phaene verantwortlich sind. Es gibt auch Phaene, die zwar plasmatisch vererbt, aber genkontrolliert sind.

Es ist möglich, dass Krebse durch solche mutative Vorgänge entstehen, dass mutagene Reize die Ursache der Krebsbildung sind, wobei sich die Erbsubstanz im Kern oder im Plasma oder in beiden ändert. Zahlreiche Forscher haben die Mutationstheorie der Krebsgenese angenommen. Nach den Angaben der Literatur scheint der Lungenkrebs sich einfach-dominant zu vererben. Die Ursache dieses Erbkrebses wäre also eine Mutation in einer Geschlechtszelle gewesen, wobei *ein* bestimmtes Kerngen in ein *Tumorgen* mutiert hat, sodass

eine *Krebsrasse* entstanden ist. Spielt sich dieser Vorgang in einer somatischen Zelle ab, so wäre in dieser aus einem normalen Kerngen ein Tumorgen entstanden. Wenn diese Genänderung dominanter Natur ist, so wird sie sich sofort in den Zellnachkommen äussern. Handelt es sich aber — und das trifft für die überwiegende Mehrzahl aller beobachteten gonischen und somatischen Spontanmutationen zu — um eine rezessive Mutation, so wird der Tumor nur sichtbar, wenn der gleiche Mutationsschritt in ein und derselben Zelle zweimal erfolgt, denn jedes Kerngen ist ja in jeder somatischen Zelle zweimal vorhanden. Dies ist aber ausserordentlich unwahrscheinlich und der schwache Punkt der Lehre von der somatischen Mutation als Ursache der menschlichen Krebse. Gegen diese Lehre spricht auch die grosse Ausbeute bei der experimentellen Krebserzeugung, denn Spontanmutationen des gleichen Charakters sind ausserordentlich selten. Es müsste sich also um eine gerichtete Mutation handeln, wofür wir in der Biologie noch keine sicheren Beispiele kennen. Es ist auch denkbar, dass ein solcher Mutationsschritt sich nicht im Zellkern, sondern in der Erbsubstanz des *Zellplasma* abspielen würde. Die Krebsentstehung wäre die Folge einer Erbänderung des Zellplasmas in einer Keimzelle oder in einer Somazelle. Im Zuchtexperiment würde sich dies durch *mütterliche Vererbung* kundtun. Die Kerngene würden dabei keine Rolle spielen. Auch diese Theorie ist aufgestellt und verteidigt worden. Schliesslich wäre es denkbar, dass eine Krebszelle sich von der Normalzelle sowohl im Erbplasma des Kernes, wie in demjenigen des Zytoplasmas unterscheiden würde, dass also ein bestimmter Plasmotypus mit einem bestimmten Genotypus zusammenwirken müsste, um einen Krebs entstehen zu lassen. Auf Grund der Experimente und Resultate von Bittner habe ich für den Brustkrebs der Mäuse diese genoplasmatische Vererbung auseinandergesetzt.

Zusammenfassend muss ich feststellen, dass nach der *Mutationstheorie* der *Krebsentstehung* ein Krebs durch genische Mutation im Kern, durch plasmatische Mutation oder durch genoplasmatische Mutation entstehen kann. Gemeinsam ist allen diesen Möglichkeiten Folgendes: Ausgangspunkt ist immer eine Zelle. Ein Strahlenquant oder ein Molekül erzeugt in einer Zelle einen « *Treffer* ». Milliarden von Geschossen können auf die Zelle fallen ohne muta-

genen Effekt, nur ein Treffer an einer ganz bestimmten Stelle des Zellgefüges erzeugt die Mutation. Dieser Treffer ist ein Elementarprozess im Sinne der Mikrophysik. Der Effekt, in unserem Falle die Krebsbildung, ist das Ergebnis eines Einzelvorganges, der nach den statistischen Gesetzen der Treffertheorie entweder eintritt oder ausfällt. Wir kennen heute auch Treffergifte. Dazu gehören die cancerogenen Kohlenwasserstoffe, das Senfgas, das Phenol, Nitrogen-Mustard und Urethan. Es handelt sich auch hier nicht um einen gerichteten, sondern um einen zufälligen richtungslosen Effekt. Gegen die Mutations-theorie der Krebsgenese spricht nicht nur, wie bereits ausgeführt, die grosse Ausbeute bei der experimentellen Krebs-erzeugung, sondern auch die klinische Erfahrung, dass nach Dauerheilung des ersten Krebses das Auftreten eines zweiten und dritten neuen Krebses an einer anderen Körperstelle beobachtet wird, was nach der Treffertheorie höchst unwahrscheinlich wäre. Gegen die somatische Mutation als Ursache der Krebse beim Menschen spricht ferner indirekt die von mir und meinen Mitarbeitern nachgewiesene statistisch gesicherte familiäre Häufung von Krebsen bei Geschwistern, Eltern, Onkeln und Tanten von Krebsprobanden im Vergleich zur Krebsbelastung in der Durchschnittsbevölkerung. Nach der Mutationstheorie der Krebsentstehung in somatischen Zellen müsste die familiäre Häufung rein zufälliger Natur sein.

Ein Beweis für die somatische Mutation als Krebsursache steht aus, er könnte am Strahlenkrebs oder am Kohlenwasserstoffkrebs geführt werden. Die Krebsausbeute müsste dosisproportional, zeitunabhängig und wellenlängenunabhängig sein, wie das für zahlreiche Strahlenmutationen bewiesen ist. MIESCHER und seine Mitarbeiter glauben für den Benzpyrenkrebs eine solche Gesetzmässigkeit gefunden zu haben. Die Dosiseffektkurven folgen einer Poisson-verteilung. Bei Aufzeichnung der Ergebnisse in ein Raster, bei dem die Ordinate nach dem Gauss'schen Integral und die Abszisse linear oder logarithmisch geteilt ist, erhalten sie nicht gerade, sondern krumme Linien. Man kann daraus schliessen, dass beim Zustandekommen des Kurvenverlaufes ein Treffergeschehen in Frage kommen *kann* aber nicht *muss*. Ausgeschlossen wäre es nur, wenn eine Reihe von Versuchspunkten in dem eben beschriebenen Raster eine Gerade ergibt (Gauss-Verteilung). Dieser Kurvenverlauf ist aber,

wie auch die Autoren vorsichtigerweise schreiben, kein Beweis für das Mitwirken eines Treffergeschehens. Es könnte eine verschiedene Empfindlichkeit der verwendeten Mäuse vorliegen, die ebenfalls der Poisson-Verteilung folgen kann. Die Versuche müssten an einem nach jahrelanger Inzucht genetisch absolut reinen Tiermaterial wiederholt werden, um beweisend zu sein. Diese Betrachtungen zeigen, dass das Auftreten cancerogener und mutagener Wirkungen durch ein und dieselben Noxe kein Beweis dafür ist, dass der Krebs durch Mutation entsteht.

c) Prüfen wir den zweiten Mechanismus irreversibler Zelländerungen: Die *Induktion*. Es handelt sich nicht um eine Aenderung des Erbgefüges, sondern um eine *Aenderung des Substrates*, in dem die Erbfaktoren wirken. Der Begriff stammt aus der Entwicklungsphysiologie, hat doch SPEEMAN gezeigt, dass aus Ektoderm nur dann Gehirn und Rückenmark entsteht, wenn dieses Ektoderm im richtigen Zeitmoment von Chordamesoderm unterlagert wird. Unter Induktionswirkungen erfolgt aus dem Keim die Organbildung und die gewebliche Differenzierung. Die Erbsubstanz einer Leber- oder Nierenzelle ist dabei genau gleich der Erbsubstanz der befruchteten Eizelle, aus der diese differenzierten Gewebe hervorgegangen sind. Durch Induktion wird *nichts* prinzipiell *Neues* geschaffen, das nicht schon *potentiell* im Keim vorhanden wäre. Der Induktor, der häufig auch Evokator genannt wird, wirkt auslösend, er löst nämlich einen in den reagierenden Zellen bereitliegenden Reaktionsmechanismus aus. Von den verschiedenen Potenzen wird *eine* realisiert. Wir kennen zahlreiche Induktorstoffe (Genwirkstoffe, Organisatorstoffe, Virusstoffe, Hormone, Antigene usw.). Auch totes Lebergewebe und totes Krebsgewebe usw. haben induktive Fähigkeiten. Das Gleiche gilt für cancerogene Kohlenwasserstoffe. Die Fülle der induzierenden Substanzen hat gezeigt, dass es vor allem auf das *Reaktionssystem*, nämlich das lebende Gewebe, ankommt. So konnte vor Kurzem Holtfreter nachweisen, dass aus Ektoderm ein Neuralrohr entstehen kann ohne gewebliche Organisator-Unterlagerung und ohne fremde Induktorstoffe. Durch Nekrobiose einzelner Zellen werden *zelleigene* Stoffe frei, welche die Induktion im Nervensystem auslösen. Diese wichtige Entdeckung erklärt, warum die verschiedensten Stoffe die

gleiche Wirkung haben. Der unspezifische Induktorstoff wirkt indirekt, der eigentliche Induktorstoff ist ein zelleigen gebildeter Stoff.

Die Nutzenanwendung auf das Krebsgeschehen lautet: Die Krebsnoxe ist ein Stoff oder eine Energieform, welche durch indirekte Induktionswirkung zu einer irreversiblen Zelländerung führt, deren Charakteristikum darin besteht, dass das Reaktionssystem neue körperfremde Eigenschaften entwickelt, die in den folgenden Zellgenerationen dauernd beibehalten werden. Durch den cancerogenen induktiven Reiz wird die Zelle zu einer neuen Reaktionsfähigkeit determiniert, zur Malignität. *Die Malignompotenz wäre eine ganz allgemeine Zelleigenschaft, die sich aber nur dann äussert, wenn vom Standpunkt des Ganzen aus eine Fehlinduktion und damit eine Fehldetermination zustandekommt.* Ausgangspunkt der Krebse ist nicht eine einzelne Zelle, sondern ein ganzer *Zellkomplex*. Ursache des Geschehens ist nicht ein Treffer, sondern eine Fehlinduktion oder die Verhinderung der normalen Induktion. Als Induktoren wirken cancerogene Stoffe und Virusstoffe, ebenso wie kurzweilige Strahlung. Der sogenannte Reizkrebs entsteht vielleicht durch solche Fehlinduktion.

Die Forschung bekommt die Aufgabe, alle möglichen cancerogenen Stoffe im Entwicklungsexperiment und im embryonalen Explantat auf induktive Wirkungen zu prüfen. Die Schwierigkeit liegt nur darin, wie soeben ausgeführt, dass in allererster Linie das lebende Reaktions-system für die Reaktion entscheidend ist und nicht das Aktions-system. Wichtig ist aber immer der Zeitpunkt der Einwirkung des Aktionssystemes. Die Entwicklungsmechanik spricht deshalb von der Phasenspezifität. Eine merkwürdige Beobachtung von LEUPOLD würde verständlich. Er hat durch Säuren und Laugen Krebse erzeugt. Man hat dagegen eingewendet, dass es sich nicht um echte Blastome, sondern um reaktive Zellwucherungen handle. Man hat eingewendet, dass Spontankrebse vorliegen, denn LEUPOLD hat nicht mit reinen Stämmen gearbeitet und man hat drittens die Ergebnisse deshalb abgelehnt, weil ein erheblicher Teil der Geschwulste nicht am Ort der Einwirkung der Salzlösungen, sondern weit davon entfernt und nach sehr kurzer Zeit entstanden seien. Die Versuche müssen dringendst wiederholt werden, denn auf dem Boden der *Induktionstheorie* der Krebsentstehung waren sie verständlich.

d) Ein vierter Mechanismus wäre denkbar, um die Krebsentstehung zu erklären. Es handelt sich dabei um Reize *spezifischer* Natur, welche zu einer *Umprägung* der betroffenen Zellen oder Individuen führen. Diese Reize sind ferner dadurch charakterisiert, dass die *Zelländerung* nur solange anhält und *irreversibel* ist, als der *Reiz anwesend* ist. Die Präsenz eines solchen Reizes ist dadurch garantiert, dass die betroffene Zelle in ihrem Stoffwechsel das Agens fortgesetzt selber bildet. Wir sprechen von *Autoreproduktion*. Wahrscheinlich ist das Agens ein Nucleoproteid. Der umprägende Reiz ist ein Virus oder virusähnliche Substanz im Zytoplasma der Wirtszelle. Die Frage bleibt vorläufig offen, ob ein solcher virusartiger Stoff ein submikroskopisches Lebewesen ist, das sich aber nur in lebenden Zellen vermehren kann, oder ob es sich um ein spezifisches Eiweiss handelt, das normalerweise von der Zelle nicht gebildet, aber nach « Impfung » von der Zelle neuproduziert werden kann. Die Zelle hätte durch die Impfung einen neuen Weg des Stoffwechsels eingeschlagen, ohne dass die Erbmasse geändert würde. Es ist durchaus möglich, dass bei der Krebsentstehung ein solcher Vorgang sich abspielt, dafür spricht der Viruskrebs des Huhnes, und der Viruskrebs beim Cotton-tail rabbit usw. Die Tatsache, dass man bei den menschlichen Krebsen noch keine solchen Virusstoffe gefunden hat, spricht natürlich nicht gegen deren Existenz. Die Virusforscher, die Mikrobiologen und die Krebsforscher werden in Zusammenarbeit dieses Problem weiter klären können, ist es doch durchaus möglich, dass solche Prozesse weit verbreitet sind.

Im letzten Jahrzehnt haben die Biologen einige Phaenomene entdeckt, die hierher gehören, wobei es freilich noch sehr strittig ist, ob die Wirkung von Plasmagenen oder von virusartigen Substanzen abhängt. So zeigte SONNEBORN in einer Reihe äusserst interessanter Experimente an *Paramecium aurelia*, dass gewisse Rassen die Fähigkeit haben, andere Aufgusstierchen derselben Tierart zu töten. Die tödliche Eigenschaft ist auf die weibliche Linie und auf Tiere beschränkt, die ein K-Gen im Kern enthalten. Dieses Kerngen K erzeugt im Zytoplasma eine Vorläufersubstanz, aus der Kappkörperchen entstehen, die sich im Zytoplasma autoreproduktiv vermehren. Sie können aber weder allein durch den Kern noch allein durch das Zytoplasma hervorgebracht werden und sind infektiös, denn wenn

zwei Aufgusstierchen dazu gebracht werden, im Paarungsakte lange zusammenzustecken, so kann das eine das andere mit Kappateilchen infizieren und verhält sich wie ein natürliches Virus, das sich selbständig forzeugt. Bei der *Drosophila melanogaster* hat L'HÉRITIER eine CO₂-empfindliche Rasse entdeckt, wobei diese Eigenschaft von der Mutter vererbt wird. Das Serum einer empfindlichen Fliege überträgt bei Injektion in eine unempfindliche diese Empfindlichkeit auf deren Eier. Im Serum sind also diffusionsfähige und künstlich ansteckende Teilchen vorhanden. Sie unterscheiden sich von einem natürlichen Virus dadurch, dass keine spontane Infektion erfolgt, und sie unterscheiden sich von einer gewöhnlichen chemischen Substanz durch ihr Autoreproduktionsvermögen. Hieher gehören auch die Arbeiten von SPIEGELMAN an der Hefe und die Beobachtungen von BILLINGHAM und MEDAWAR an *Schweinen* und *Meerschweinchen*. In scheckigen Tieren bedeckt häufig die schwarze Hautfärbung eine grössere Fläche als das schwarze Fell. Bei Ueberpflanzungsversuchen zeigte sich, dass die schwarze Hautfärbung in weissen Gebieten gebildet wird, die sie normalerweise nicht selbst bilden würde. Sie werden infolge ihrer « Infektion » von der Nachbarschaft her durch einen virusartigen Stoff geschwärzt und bleiben dauernd in ihren Zellnachkommen schwarz. Die Anwendung auf carcinogene Substanzen lautet: Die carcinogenen Stoffe und Strahlungen beeinflussen die Eigenschaften ausgewachsener Zellen so, dass sie erneut wachsen und sich teilen und nie mehr zu ihrem Normalcharakter zurückkehren. Die *Agentien sind irgendwie spezifisch und wirken auch auf gewisse Gewebe spezifisch*. Der Zellkern scheint unverändert, nur das Zytoplasma ändert sich. Es wird irreversibel umgeprägt. Offen bleibt freilich die Frage, ob es sich dabei um Aenderung eines Plasmagenes handelt oder um einen virusartigen Effekt, denn die Beobachtungen des Killerfaktors bei Pantoffeltierchen, des Milchfaktors der Mäuse mit Brustkrebs usw. können durch Mutation eines Plasmagenes oder durch Infektion mit einem virusartigen Stoff erklärt werden. Diese Fragen sind alle noch im Fluss, und wir müssen uns vorläufig mit diesen Andeutungen begnügen. Unverbindlich sprechen wir deshalb in Anwendung auf die Krebsentstehung von der *Umprägungstheorie* der *Krebsgenese*. Diese Anschauung erklärt auch die verschiedene Uebertragungsweise der Krebse. Einige lassen sich nur

durch Transplantationen übertragen, andere kann man durch die Iniektion zellfreier Extrakte erzeugen und wieder andere Geschwülste, wie das Shope-Papillom und gewisse Warzen der Menschen sind kontagiös und daher mit Recht als Viruskrankheiten beschreibbar.

Es ist heute noch nicht möglich, zwischen den vieraufgezählten Möglichkeiten der Krebspathogenese eine sichere Entscheidung zu treffen. Für jede der genannten Theorien lassen sich Indizien anführen und die Situation scheint zur Zeit so zu liegen, dass es verschiedene Arten der Krebsentstehung gibt, die wir zum Schlusse in einer schematischen Darstellung zusammenfassen wollen (Abb. 1).

TABELLE 1.

Carcinogène Strahlen und Stoffe	W I R K U N G E N				
	allgemein toxische und zytolytische	mitotrope	mutagene	morphogendische	cancericide
Kurzwellige Strahlen Korpuskularstrahlen	+	+	+	+	+
Aromatische Kohlenwasserstoffe	+	+	+	+	+
Azofarbstoffe (o-Amino-azotoluol, Buttergelb)	+	+	?	+	?
Akridinfarbstoffe (7,8 Benakridin)	+	+	?	?	?
Anilin	+	?	?	?	?
Naphtylamin (†)	+	+	?	?	?
Fluorene (Acetylaminofluoren)	?	?	?	?	?
Styryl 430	+	+	+	+	?

(†) Durch verschiedene Autoren bei Hunden Blasencarcinome

(‡) Mutationen wurden durch LATARGET und auch durch MAISON erzeugt.

TABELLE 2. — *Kanzerogene Kohlenwasserstoffe.*

Applikation	Organ	Maus	Ratte	Kanin- chen	Meerschw.	Huhn
Pin selung	Haut	Ca selten Sa	Ca selten	Ca	—	—
Injektion	Subcutis	Sa	Sa	Sa	Sa	Sa
Injektion	Mamma	Ca	Ca	—	—	—
Injektion	Uterus	—	Ca	Ca	—	—
Injektion	Muskulatur	Sa	—	—	—	—
Inhalation	Lunge	Ca	—	—	—	—
Fütterung	Magen	Ca	—	—	—	—
Fütterung	Dünndarm	Ca	—	—	—	—
Injektion	Dickdarm	—	—	—	—	—
Injektion	Bauchfell	Sa	Sa	—	—	—
Injektion	Hoden	—	—	Sa	—	—
Injektion	Samenblase	—	Ca	—	—	—
Injektion	Niere	Ca	Ca u. Sa	—	—	—
Injektion	Prostata	—	Ca u. Sa	—	—	—
Injektion	Gehirn	Gliom u. Sa	Ca	—	—	—
Injektion	Parotis	Ca u. Sa	Ca u. Sa	—	—	—
Pin selung u. Injektion	Lymph- knoten	Sa	—	—	—	—
Depot	Leber	Ca	—	—	—	—
Pin selung	Leber	Leukämie	Leukämie	—	—	Leukämie
Depot u. Injektion	Knochen	Sa	Sa u. Leukämie	—	—	—

Unter Carcinomen traten auf: Plattenzell- und Adenocarcinome

Unter Sarkomen traten auf: Spindelzell-, Fibro-, Osteo-, Leiomyo- und Rhabdomyosarkome.

TABELLE 3.

Cancerogene Wirkungen von 9,10 Dimethyl - 1,2 Benzanthracen

Tierart	Haut (Papillome und Carcinome)	Subkutangewebe (Sarkome)
Kaninchen	+ + + + +	—
Maus	+ + + + +	+ + + +
Ratte	+ + +	+ + + + +
Meerschweinchen	+ +	+ + +

Nach mündlicher Mitteilung von BERENBLUM vom National Cancer Institute Bethesda Washington.

TABELLE 4. — *Strahlenkarzinogenese*

Strahlung	Element	Applikat.-weise	Maus	Ratte	Kaninchen
Alpha	Plutonium (HWZ = 25.000 J.)	i. m. od. i. v. Injekt.	Osteosarkom	Osteosarkom	
		s. c. Injekt.	Osteosarkom Fibrosarkom		
		Inhalation		Lungenkarzinom	
Beta	Yttrium (HWZ = 57 Tg)	Verfüttert		Colonkarzinom	
		s. c. Injekt.	Hautkarzinom		
		i. m. Injekt.	s. c. Fibrosarkom	Osteosarkom	
		i. v. Injekt.	Osteosarkom	Osteosarkom	
		Inhalation		Mammatumor	
Beta	Strontium (HWZ = 55 Tg)	i. periton Injekt.	Osteosarkom Haemangio- endotheliom	Osteosarkom	Osteosarkom
Beta + Gamma	Cerium (HWZ = 247 Tg)	Inhalation		Lungenkarzinom	

TABELLE 5.

S T O F F	W I R K U N G E N		
	oestrogene	carcinogene	neuralinduktive
1, 2, 5, 6 Dibenzanthracen	—	+	—
5, 6 Cyclopenteno - 1, 2 Benzan- thracen	+	+	—
3, 4 Benzpyren	+	+	+
Methylcholanthren	—	+	+
1, 2, 5, 6 Dibenzcarbazol	—	+	—
Styryl-blau	—	+	+
Sterine, Gallensäure, Sexualhor- mone	—	indirekt	Hemmung
Nukleinsäuren, Nukleoproteide, S-H haltige Proteide, Nukleo- tide	—	—	+

TABELLE 6.

W I R K U N G E N					
mutagene Strahlen und Stoffe	allgem.-toxische und zytolytische	mitotrope	cancerogene	morphogenet.	cancericide
Sulphur-Mustard	+	+	— ⁽¹⁾	+	+
Nitrogen-Mustarde	+	+	+ ⁽²⁾	+	+
Senföle	+	+	?	?	?
Phenol	+	+	?	?	?
Urethane	+	+	+	+	+
Formaldehyd	+	+	?	?	?
Colchicin (Polyploidie)	+	+	?	?	+

(1) Mit Senfgas hat Berenblum keine Carcinome erzeugen können, auch nicht mit Krotonöl zusammen.
 (2) Mit Nitrogen-Mustarden haben HESTON, BOYLAND und HORNING bei Mäusen Carcinome erzeugt.

TABELLE 7. — *Mitotrope Effekte (Angriffsort: Kern).*

Agens	Primäreffekt (1)	Zytostase (2)	Sekundäreffekt (3)	Versuchsobjekt
Kurzwellige Strahlung	Chromosomenpyknose Chromosomenbruch Chromosomenrestitution Centromerschaden	+	Chromosomenbruch Chromosomenrestitution Centromerschaden Karyomerenbildung	Vicia Faba L.
Nitrogen-Mustard Senfgas	Chromosomenpyknose Centromerschaden	+	Centromerschaden Karyomerenbildung	Vicia Faba L.
Urethane	Chromosomenpyknose Chromosomenverkürzung Karyomerenbildung Metaphasenblockade	+	—	Vicia Faba L.
Trypaflavin	Chromosomenpyknose	+	Mitoseotypen, unvollständige Chromosomensätze	Vicia Faba L.
Colchicin	Metaphasenblockierung, Polyploidie	—	—	Vicia Faba L.
Chinone	Chromosomenpyknose Metaphasenblockade	+	—	Vicia Faba L.
Folinsäure	Chromosomenverkürzung Chromosomenpyknose	+	—	Herzfibroblastenkultur (Lettre)
Carcinogene Kohlenwasserstoffe	Chromosomenpyknose Metaphasenblockade Chromosomenverkürzung	+	—	Vicia Faba L.
Hormone und synthet. Oestrogene	Metaphasenblockade Chromosomenverkürzung	+	—	Vicia Faba L.
Diamidine	—	+	—	Vicia Faba L. (Hohl) Tiertumoren (Kovak)
Alloxan	Chromosomenpyknose	—	—	Vicia Faba L.

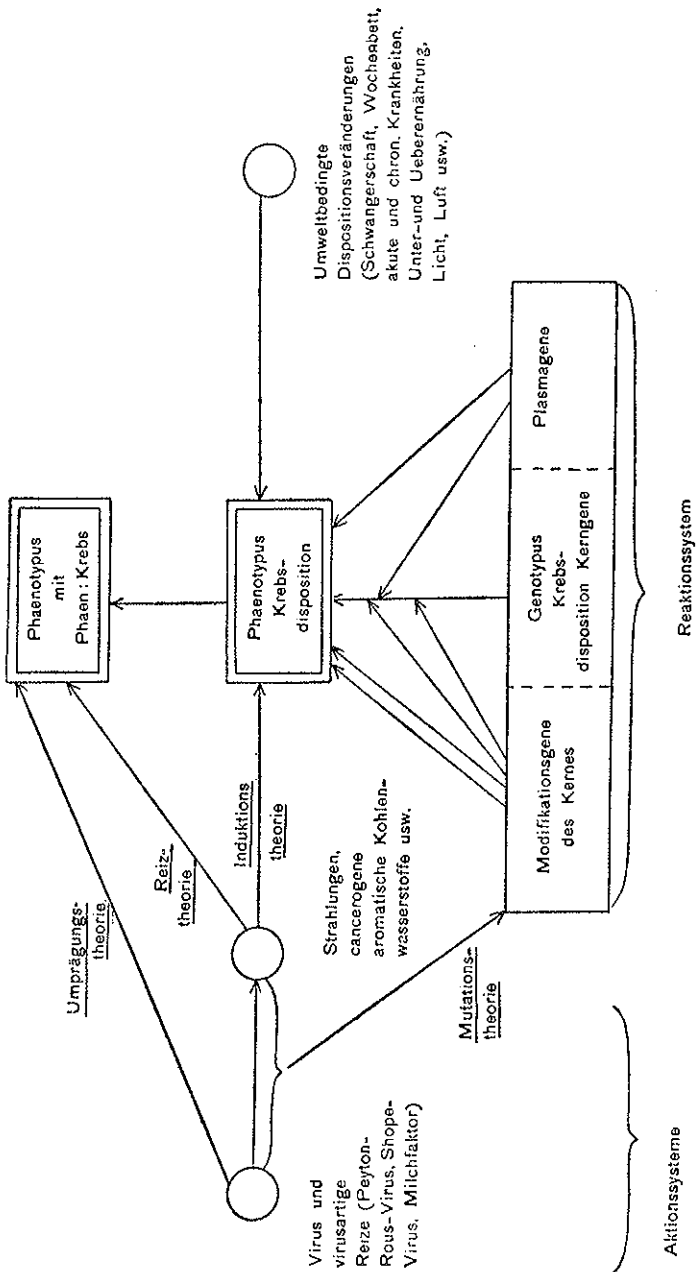
(1) Der Primäreffekt wird nicht der Elementarvorgang der Absorption eines Quants verstanden und nicht die primäre Reaktion zwischen zellfremden und zelleigenen Molekülen, sondern der zytomorphologische Effekt an Mitosen oder Meiosen, die während der Einwirkung der Noxen ablaufen.

(2) Unter Primäreffekt wird nicht der Elementarvorgang der Absorption eines Quants verstanden und nicht die primäre Reaktion zwischen zellfremden und zelleigenen Molekülen, sondern der zytomorphologische Effekt an Mitosen oder Meiosen, die während der Einwirkung der Noxen ablaufen.

(3) Unter Sekundäreffekt werden alle zytomorphologisch fassbaren Veränderungen zusammengefasst, welche sich nach dem Primäreffekt in dem oben zitierten Sinn und nach einer eventuellen zytostatischen Periode abspielen.

TABELLE 8.

Art der Reize	Angriffsort	Reaktionsweise	Effekt	Anwendung auf Krebsgenese
<i>Modifikatorische Reize:</i> Modifikatoren	Phänotypus (Phaene)	Reversible oder irreversible, qualitativ und quantitativ von Reiz und Reizdauer abhängige, nicht erbteste <i>adaptive Reaktion</i>	Modifikationen und <i>Dauermodifikationen</i> innerhalb der Reaktionsnorm	<i>Reiztheorie</i> im klassischen Sinne
<i>Mutagene Reize</i>	Genotypus (Gene)	<i>Irreversible Erbänderung</i> durch <i>Trefser</i>	<i>Mutationen</i> (Genom- und Plasmonvariationen)	<i>Mutationstheorie</i> im weitesten Sinne
<i>Induktive Reize:</i> Induktoren	Phänotypus (Phaene)	<i>Irreversible Determination</i> durch freigesetzte zelleigene Stoffe	Normale und abnorme Differenzierungen	<i>Induktions- oder Determinationstheorie</i>
<i>Umprägende Reize</i>	Phänotypus (Phaene)	<i>Irreversible spezifische Reaktion</i> auf autoreproduktives <i>Virus</i> und virusähnliche Zyttoplasmabestandteile	« <i>Infektiöse</i> » <i>Umprägung</i> der Reize	<i>Umprägungs- oder Virustheorie</i>



ZUSAMMENFASSUNG

1. Kankerizide Reize haben auch kankerogene Wirkungen.
2. Neben diesen Effekten beobachtet man mutagene Wirkungen. Dies gilt für kurzweilige Strahlung, ionisierende Korpuskularstrahlung, kankerogene aromatische Kohlenwasserstoffe, Senfgas, Nitrogen-Mustard und Urethan. Für andere mutagene Stoffe wie Phenol, Senföl und Formaldehyd ist der Nachweis kankerizider und kankerogener Wirkungen noch zu führen.
3. Induktive Wirkungen sind für kankerogene Kohlenwasserstoffe nachgewiesen.
4. Zytomorphologische Effekte sind mit Strahlungen und vielen Chemikalien zu erzielen. Sie äussern sich in Zytolyse, Karyoklasie und in mitotropen Effekten (Primäreffekt, Zytostase, Sekundäreffekt). Wichtig sind diese zytomorphologischen Befunde dann, wenn sie bei sehr niedrigen, annähernd physiologischen Dosen auftreten, sonst sind sie Ausdruck allgemeiner uncharakteristischer Zellschädigungen.
5. Die mitotropen Effekte von Senfgas, Nitrogen-Mustard und Trypflavin gleichen weitgehend den Röntgenstrahleneffekten in den Zellen und äussern sich in den drei Phasen des Primäreffektes, des zytostatischen mitosenfreien Intervalles und des Sekundäreffektes, während wir bei anderen mitotropen Substanzen nur Primäreffekte und Zytostasen beobachten.
6. Bei der Testung von kankerogenen und kankeriziden Stoffen ist die systematische Durchprüfung auf mutative, induktive und umprägende Effekte aufschlussreich und notwendig.
7. Krebsheilungen sind nur durch Stoffe mit zytolytischer Wirkung zu erreichen, die mitotrope Wirkung erzielt nur palliative Effekte. Ein

elektiv oder spezifisch zytolytisches Chemotherapeutikum zur Krebsheilung ist noch nicht bekannt.

8. Die Entscheidung zwischen der Reiztheorie, der Mutationstheorie, der Induktionstheorie und der Umprägungstheorie der Krebsentstehung ist noch nicht möglich. Für jede derselben lassen sich Indizien anführen, die aber nicht entscheidend sind.

R É S U M É

1. On sait que les agents cancéricides peuvent aussi avoir action cancérigène.

2. A côté de ces effets, on observe aussi des actions mutagènes. Ceci vaut pour les radiations à ondes courtes, les radiations corpusculaires ionisantes, les hydrocarbures aromatiques cancérigènes, le gaz-moutarde, la moutarde azotée et l'uréthane. Pour les autres substances mutagènes, ainsi que pour le phénol, l'huile de moutarde et le formaldéhyde, l'action cancérigène n'est pas encore démontrée.

3. Des actions inductives (formation de plaques neurales) ont été démontrées pour les hydrocarbures cancérigènes.

4. Les radiations et plusieurs substances chimiques produisent des effets cytomorphologiques (cytolyse, caryoclasie) et des effets mitotropes (effet primaire, cytostase, effet secondaire). Ces effets cytomorphologiques sont très importants lorsqu'ils sont obtenus avec de très petites doses, à peu près physiologiques; autrement ils sont l'expression de lésions cellulaires générales et non spécifiques.

5. Les effets mitotropes du gaz-moutarde, de la moutarde azotée et de la trypaflavine peuvent être comparés aux actions des rayons Röntgen sur les cellules et se manifestent avec les trois stades de l'effet primaire, de l'intervalle de cytostase amitotique et de l'effet secondaire. En employant des autres substances mitotropes on observe seulement l'effet primaire et la cytostase.

6. En faisant des tests avec les substances cancérigènes et cancéricides, il est nécessaire de faire un contrôle systématique des actions mutagènes et mitotropes.

7. On peut traiter le cancer uniquement avec des substances à action cytolytique; l'action mitotropique produit seulement des effets palliatifs. Une chimiothérapie élective ou spécifiquement cytolytique pour le traitement du cancer n'est pas encore connue.

8. Il n'est pas encore possible de décider entre la théorie irritative, la théorie mutative, la théorie inductive et la théorie adaptative de l'étiologie du cancer. Pour chacune de ces théories on peut recueillir des indices qui cependant ne sont pas décisifs.

S U M M A R Y

1. It has been known for a long time that carcinogenic agents can produce a destruction of cancer cells.

2. Besides these effects mutagenic actions may be present: this is true for short waves radiations, ionising corpuscular radiations, carcinogenic aromatic hydrocarbons, mustard - gas, nitrogen - mustard and urethane. A carcinogenic function was not yet demonstrated for other mutagenic substances (phenol, mustard-oil and formaldehyd).

3. Some carcinogenic hydrocarbons were shown to induce neural-plate (embryonic induction).

4. Such morphological effects can be produced with radiations as well as with chemical compounds; they appear as cytolysis-caryoclasia and as mitotropic effects (primary effect, cytostase, secondary effect). Such cytomorphological effects may be important if they appear in very low nearly physiological dosage, otherwise they express merely a general not characteristic damage of the cell.

5. Mitotropic effects of mustard-gas, nitrogen-gas and tryptaflavin as well as those of Roentgen-rays show the three same stages (primary effect, cytostase, secondary effect). With other mitotropic substances we observed only primary effect and cytostase.

6. When testing a carcinogenic and cancer inhibiting compounds a systematic research of mutagenic, inductive and mitotropic fonction may be important.

7. Cure of cancer can be obtained only by cytolytic agents. Mitotropic substances produce only some growth inhibition and a palliative effect. A specific cytolytic treatment of cancer is not yet known.

8. These choose between the irritation theorie, the mutation theory, the induction theory and the adaptation theory can not yet be reached. For each of these theories there are positive argument's, but a conclusion can not be given.

S O M M A R I O

1. E' vecchia nozione che gli agenti cancericidi possono avere pure azione cancerogena.

2. Contemporaneamente possono anche aversi effetti mutageni. Questo vale per le radiazioni ad onda corta, le radiazioni corpuscolari ionizzanti, gli idrocarburi aromatici cancerogeni, il gas mostarda, la mostarda azotata e l'uretano. Per altre sostanze mutagene, come il fenolo, l'olio di senape e l'aldeide formica, non è ancora provata la loro azione cancericida e cancerogena.

3. Sono dimostrate azioni induttive per gli idrocarburi cancerogeni.

4. Le radiazioni e molte sostanze chimiche producono effetti citomorfologici: citolisi, carioclasia ed effetti mitotropi (effetto primario, citostasi, effetto secondario). Importanti sono questi reperti citomorfologici quando sono ottenuti con dosi molto piccole, press'a poco fisiologiche; altrimenti essi sono l'espressione di alterazioni cellulari generali non specifiche.

5. Gli effetti mitotropi del gas mostarda, della mostarda azotata e della tripaflavina possono essere comparati agli effetti prodotti dai raggi Roentgen nelle cellule e si estrinsecano nelle tre fasi dell'effetto primario, dell'intervallo di citostasi amitotico e dell'effetto secondario. Con altre sostanze mitotrope noi osserviamo soltanto l'effetto primario e la citostasi.

6. Studiando sostanze cancerogene e cancericide è utile e necessario condurre una ricerca sistematica di controllo sopra gli effetti mutativi, induttivi e mitotropi.

7. La cura del cancro si può intraprendere soltanto con sostanze ad azione citolitica; l'azione mitotropa porta soltanto ad effetti palliativi. Una chemoterapia elettivamente o specificamente citolitica nella cura del cancro non è finora conosciuta.

8. Non è ancora possibile decidere fra la teoria irritativa, la teoria mutativa, la teoria induttiva e la teoria adattativa nella genesi del cancro. Per ognuna di queste teorie si possono enunciare soltanto delle ipotesi, ma nulla di decisivo.

DISCUSSION :

BERENBLUM: Concerning your reference to the question as to whether β -naphthylamine, colchicine, sulphur mustard or nitrogen mustard have been tested for mutagenic and carcinogenic action, I should like to refer you to the work of DEMEREC (1947) on the mutagenic action of β -naphthylamine. Sulphur mustard has been found to be non-carcinogenic to the skin (BERENBLUM, 1929), while the carcinogenicity of nitrogen mustard has been discussed by Dr. BOYLAND.

GREENSTEIN: Do you mean to separate the effect of the milk factor and of hormones on cancer genesis, or do you consider them to act together?

MAISIN: Intervention dans la discussion au sujet des mutations (travaux du Prof. COWDRY et du Prof. SCHINZ).

Il est évidemment difficile dans une domaine où il subsiste tellement d'inconnues, à commencer par celle de la nature des gènes eux-mêmes, d'aborder une discussion sur les rapports existants entre Mutation et Cancer. On est aussi très gêné par la question de terminologie. Néanmoins je vais essayer de présenter aussi clairement que possible certaines vues se rapportant à cette question. Comme introduction à cette discussion je crois utile de résumer brièvement les idées de LINDEGREEN et SPIEGELMAN au sujet des nucléogènes et des cytogènes ainsi que du rapport respectif qu'ils estiment exister entre les deux. Les nucléogènes ou chromogènes sont des entités fonctionnelles existant dans les chromosomes automatiquement reproductibles au cours de la division cellulaire et qui sont considérés classiquement comme étant de nature nucléoprotéique. Toutefois cette nature exclusivement nucléoprotéique n'est pas admise par tout le monde. Les chromogènes sont donc les vecteurs des principaux ca-

ractères héréditaires. Ceux-ci s'expriment par les fonctions protoplasmiques. Ces fonctions sont très généralement des fonctions enzymatiques. Pour qu'un enzyme puisse manifester sa présence il doit être en présence d'un substrat qu'il peut métaboliser. Si ce substrat n'est pas présent l'enzyme ne révèle pas sa présence par l'accomplissement de sa fonction propre. Néanmoins il doit être présent comme entité formelle sous forme d'une molécule protéique qu'on peut appeler un proenzyme. Ce proenzyme en présence d'un substrat spécifique entre en fonctionnement et devient un enzyme. Comme toutes ces fonctions sont transmises héréditairement au sens chromogénien du terme, on doit donc admettre que le chromogène intervient dans le mécanisme du fonctionnement enzymatique du protoplasme. Celui-ci résulte donc de l'interaction de 3 facteurs, un facteur chromogénien, un facteur protoplasmique, le proenzyme, et un facteur de milieu qui est le substrat. SPIEGELMAN et LINDEGREEN ont montré que les 3 facteurs étaient nécessaires pour le déclenchement ou la mise en branle de ce phénomène fonctionnel. Plus tard lorsque l'enzyme est en fonction, l'intervention du facteur chromogène n'est plus nécessaire. L'enzyme en présence du substrat continue à fonctionner. De plus il se reproduit lui-même dans la cellule. « Au cours des divisions cellulaires il est transmis aux cellules-filles.

LINDEGREEN et SPIEGELMAN ont proposé d'appeler cette entité enzymatique protoplasmique autoreproductible et se retrouvant dans les cellules-filles du nom de *cytogène* et de donner le nom de *procytogène* au proenzyme. Ils ont proposé ce nom parce que cette entité présente dans le protoplasme jouit de plusieurs qualités des gènes, notamment l'autoreproduction et la transmission aux cellules-filles.

Cette conception de LINDEGREEN et SPIEGELMAN peut rendre des sérieux services pour essayer de comprendre ce qui se passe dans la cellule au moment de la cancérisation: temps de latence, cellules cancéreuses latentes, cancer proprement dit, modulations ou mutations en un, deux ou plusieurs temps. Le terme de modulation pourrait s'appliquer selon WEISS et MONOD à des modifications fonctionnelles d'ordre pathologique et réversible. Le terme de mutation ayant une signification très précise liée au chromogène des

gamètes doit être employé avec la plus grande circonspection. Il nous manque un terme approprié pour caractériser l'état « cancéreux » de la cellule, déviation pathologique de la différenciation normale.

J'aimerais aussi faire observer au Professeur SCHINZ qu'il me paraît difficile de faire une distinction absolue entre destruction et mutation. C'est une question de degré. Dans un nombre important de cas, une mutation ne représente rien d'autre qu'une destruction à l'échelle microscopique ou submicroscopique, destruction de gènes n'entraînant pas la mort cellulaire.

KRETZ: Der Vorschlag einer Testung der cytostatischen Wirkung von Krebstherapeutica sollte auch auf Organextrakte., Hormone ausgedehnt werden. Hierbei dürften pflanzliche Versuchsubjekte nicht ausreichend sein und es würde sich empfehlen auch die Gewebezüchtung hierzu heranzuziehen, da bei dieser die Umweltfaktoren am besten bestimmbar sind.

SCHINZ: Ich kann nicht glauben BOYLAND gegenüber, dass die weissen Haare der Nitrogen-Mustard Mäuse die Folge einer somatischen Mutation sind. Die Zahl der weissen Haare ist viel zu gross. Die gleiche somatische Mutation wiederholt sich ganz ausserordentlich selten. Es handelt sich wohl um ein Zerstückung des Ferment-systems ohne Aenderung der Erbsubstanz der Zelle.

PROPERTIES OF SQUAMOUS CELL CANCER COMPARED WITH THOSE OF NORMAL EPIDERMIS

PROF. E. V. COWDRY (ST. LOUIS)

Our work during the past ten years has been carried on in the belief that the most direct approach to the cancer problem is to discover by what properties malignant cells differ from normal cells of the sort from which they have developed. These new properties condition the malignant behavior of the cancer cells which it is hoped eventually to correct. If correction is not feasible, the differences between them and their normal prototypes may serve as clues to means whereby the cancer cells can be inhibited or killed without serious injury to the other cells of the body.

Many others before us have had exactly the same idea and have labored to the same end. The excuse that we offer for these investigations, which have no originality and are not designed to test the validity of some captivating theory, is our belief that we have so arranged the experimental conditions as to be more favorable than those under which others have worked before us.

First, we chose epidermis as the normal tissue because the cells in it can be more directly compared with those of squamous cell cancer of epidermal origin than can any other normal cells be compared with the malignant ones developed from normal cells of the same kind.

The comparison next in directness would be that between normal hepatic cells and malignant hepatoma cells developed from them. Epidermis is more suitable than liver for chemical analyses, because it is avascular, alymphatic and is not subject to large oscillations in volume in different physiological states. Epidermis is, also, better

for our purpose than the liver since all the cells in it are epithelial and of ectodermal origin with the possible exception of a few so-called « dendritic cells »; whereas, in the liver, the cellular population is far more diverse and includes a not inconsiderable number of endothelial and connective tissue cells, epithelial cells of bile ducts and so on. Though corrections can be made for the blood in the liver, the results of chemical analysis focus far less directly in the liver on the normal cells capable of this particular malignant transformation than they do in the epidermis. Our transplantable squamous cell carcinoma is equally suited for chemical analysis to a rapidly growing hepatoma as long as small tumors of uniform size having a minimum of necrosis are used.

Second, we knew at the outset that we would have the advantage of being able to concentrate all the research funds possessed by the Barnard Hospital, supplemented by what we could raise, on this single project, barring illness or accidents, for about 10 years. The research team has changed somewhat from time to time; but a total of 44 workers have published papers on this project. Thus we have been enabled to effect a greater concentration on this project than has thus far been possible by others on similar projects, which is a very great advantage.

Another feature of our studies is that very close attention has been paid to technique and implementation. Our procedure has been to concentrate on the properties of normal and malignant epidermal cells that can be quantitatively measured. Techniques that had been employed by others for other tissues often required radical changes before they could be employed for epidermis separated from dermis by our heat, or freezing, methods and for the small and uniform squamous cell cancer transplants. Not infrequently entirely new techniques had to be devised. Many of these have been polarographic and we owe them chiefly to Carruthers.

We have investigated not only the normal epidermis and the cancer transplants but also the sequence of changes in epidermal carcinogenesis in our closely inbred strain of mice resulting from repeated applications to the skin of 0.6 per cent methylcholanthrene in benzene. All possible variables were eliminated in this carcinogenic series so that chemical analyses by a given method of the treated

epidermises of different lots of mice at a specified time in the process might be expected to yield approximately the same results. Standardization to this extent was essential in order constructively to build together the results of many techniques. For instance, 10 days after beginning the applications we had measurements for calcium by one method, for inositol by another, and for urea by a third, each of course made with epidermises of different lots of mice. We then assumed that all treated epidermises at 10 days had these amounts of calcium, inositol and urea, though these were determined separately.

For obvious reasons I cannot stop in this summary of our work to give credit which is due to each of my 44 associates. Their papers are listed on the accompanying sheets.

The most convenient way to present our findings for discussion is, first, to give data on properties measured in normal epidermis and squamous cell carcinomas; and, second, to mention some observations on the same properties in the intervening stages of carcinogenesis.

Table I gives data on mouse and human epidermis and carcinoma. Those for the human tissues are very incomplete by comparison with those for the mice; but we hope gradually to complete them. As far as they go the differences are in the same direction, whether a decrease or an increase, in both.

The method of presentation employed in constructing Table II for the mouse tissues of the standard series is less accurate; since it does not include the precise figures of the chemical determinations; but it is instructive, because it shows how askew, as contrasted with normal epidermis, are these cancers. While there is no change in the amounts of some of the components, ascorbic acid, P^{32} , inositol, and so on, there are marked decreases and increases in others, many them 50 % or more of the normal.

Such radical dislocations in components, each essential for the lives of the cells, must have profound effects on cellular behavior.

Actually, however, only a very few of the essential materials for life, compared with the enormous number that exist, have been measured by us. The activity of a few enzymes has been determined, but to carry on its business each cell utilizes at least 10,000 different

TABLE I.

CONSTITUENT	MOUSE		HUMAN	
	Epidermis	Carcinoma	Epidermis	Carcinoma
MINERALS ^a				
Potassium	347	313	322	—
Sodium	168	147	123	—
Calcium	44	9	16	8,5
Magnesium	19	18	18	—
Zinc	5,2	1,7	2,4	1,7
Copper	0,58	0,10	0,54	0,16
Iron	6,4	2,2	—	—
CALCIUM BINDING ^a				
Free Calcium	30,8	1,5	—	—
Bound Calcium	49,4	3,7	—	—
NUCLEIC ACIDS ^a				
Nucleoprotein phosphorus . .	124	139	—	—
Desoxyribonucleic acid . . .	935	582	—	—
LIPIDS				
Total lipid ^b	28,6	19,1	21,3	—
Lipid phosphorus ^b	0,16	0,31	0,12	—
Cholesterol ^b	1,66	0,66	0,95	—
Polarographically reducible li- pids ^c (A)	25,0	0	64	0
(B)	0	3,1 to 20,3	0	44,0 to 98,0
WATER ^d				
	60,0	81,6	—	—
VITAMINS				
Biotin ^e	0,079	0,030	—	—
Choline ^e	990	1150	—	—
Inositol ^e	210	212	—	—
p-Aminobenzoic acid ^e	0,96	0,58	—	—
B ₆ complex ^e	0,98	0,76	—	—
Ascorbic acid ⁱ	0,193	0,184	—	—

TABLE I.

CONSTITUENT	MOUSE		HUMAN	
	Epidermis	Carcinoma	Epidermis	Carcinoma
ENZYMES				
Cytochrome <i>c</i> ^e	52	34	—	—
Cytochrome oxidase ^f	9,9	7,5	—	—
Succinic dehydrogenase ^f	1,4	2,9	—	—
Adenylpyrophosphatase ^f	8,4	25,2	—	—
Arginase ^f	61,0	732,0	—	—
NITROGENOUS CONSTITUENTS				
Urea ^g	77	22	33	—
Ammonia ^g	24	8	24	—
Lysine ^h	5,15	8,18	—	—
Isoleucine ^h	2,65	3,83	—	—
Leucine ^h	4,17	5,28	—	—
Methionine ^h	0,91	1,20	—	—
Valine ^h	2,84	3,86	—	—
Phenylalanine ^h	1,46	1,89	—	—
Threonine ^h	2,43	3,17	—	—
Histidine ^h	3,33	3,40	—	—
Glutamic acid ^h	7,90	7,72	—	—
Cystine ^h	1,50	1,42	—	—
Arginine ^h	11,50	11,42	—	—
Tryptophan ^h	0,98	1,60	—	—

^a Mg. per 100 gr. of fresh tissue.

^b Gm. per 100 gm. of dry tissue.

^c Microamperes per 100 mg. lipid; lipid in carcinoma qualitatively different from that of epidermis.

^d Gm. per 100 gm. of fresh tissue.

^e ug. per gm. of fresh tissue.

^f Q-values; quantity of substrate used or decomposed per hour (expressed in microliters of gas) per mg. of wet weight of tissue.

^g Mg. of N per 100 gm. of fresh tissue.

^h Amino acid N as per cent of total tissue N.

ⁱ Mg. of ascorbic acid per mg. of nucleoprotein phosphorus.

enzymes. The factors that condition malignancy, for which we are searching, may or may not be included in this incomplete picture of askewness. The distinguished chemists in this group, drawn together by RONDONI, are far better qualified than I am to interpret this askewness.

TABLE II.

PROPERTIES OF SQUAMOUS CELL CANCER COMPARED
WITH THOSE OF NORMAL EPIDERMIS

INCREASE: (50% or more) ↑ INCREASE: (less than 50%) ↑ NO CHANGE: ↓ DECREASE: (less than 50%) ↓ DECREASE: (50% or more)	Lipid phosphorus: dry wt. ratio, succinic dehydrogenase activity, adenylypyrophosphatase activity, arginase activity, lysine, tryptophane isoleucine. Water content, choline, leucine, methionine, valine, phenylalanine, threonine. Ascorbic acid: NP ratio, specific activity of P^{32} in phospholipid fraction, inositol (wet wt. basis), histidine, glutamic acid, cystine, arginine. Potassium: NP ratio, sodium: NP ratio, magnesium: NP ratio, cytochrome oxidase, desoxyribonucleic acid (wet wt. basis), cytochrome α , paraminobenzoic acid (wet wt. basis), vitamin B_6 complex (wet wt. basis). Calcium: NP ratio, iron: NP ratio, copper: NP ratio, zinc: NP ratio, nonprotein nitrogen (wet wt. basis), urea (wet wt. basis), ammonia (wet wt. basis) total free amino acids (wet wt. basis; chromatography), biotin (wet wt. basis), Ca^{45} uptake and retention, free calcium.
	NP - Nucleoprotein Phosphorus

The time available does not permit me so fully to present the data gathered by our team on the intermediate stages of carcinogenesis, that is on the steps in the acquisition of this new and different manner of life by the cancer cells.

In order to collect sufficient material for chemical analysis of normal epidermis, and of epidermis in various stages of hyperplasia before malignant behavior on the part of a few cells is first detected, it has been necessary to combine, or to pool together, the treated epidermises of several mice. The analyses reveal the amounts of the components in each lot of tissues analyzed. They do not give us information on the amounts within the epidermises of the individual mice which epidermises were pooled together. Neither do they tell us whether, within the extent of a single epidermis, the content of any particular substance is uniform throughout or uneven.

It is clear, nevertheless, that in the treated epidermises as a whole there is early established, say within ten days, a new manner of cell life which persists for weeks and in the background of which the cancers appear in small restricted foci. As is well known most of the area of treated epidermis remains free from cancer. This new chemical equilibrium has been well described by my colleagues insofar as we have investigated it. For example at 10 days after the first application of carcinogen:

1. Calcium is reduced about 50 percent of normal and remains between that and 60 percent at least to 60 days.
2. Iron is reduced 50 percent of normal and is further depressed to about 70 percent at 60 days.
3. Biotin is reduced 40 percent of normal and remains low being approximately 32 percent at 60 days.
4. Cholesterol-protein nitrogen ratio is reduced from normal of 0.3 to below 0.2 and remains between 0.2 and 0.1 for 60 days.

Microscopic evidence is accumulating that the brunt of these and other deprivations in this new precancerous chemical equilibrium is felt most by the epidermal cells of the spinous layer of hyperplastic epidermis:

1. Demineralization, revealed by microincineration, is greater in the spinous than it is in the basal or corneal layers.
2. Displacement of chromatin and nucleoli, under the influence of ultracentrifugal force, is also most marked in the spinous layer.
3. Chromosome abnormalities, observed in smears of the cells, seem also to be most evident in the spinous layer.

4. Maximum mitotic frequency is in the basal layer of epidermis, not in the spinous layer where it is concentrated in the many layered epidermis of the foot pads of normal mice.

It is tempting to assume, purely as a working hypothesis, that the living conditions of the new chemical equilibrium have become more unfavorable for the spinous cells than they have for the basal ones, which, by contrast, are nearer to the source of supplies in the blood stream of the dermis. Perhaps the shifting of the stratum of maximum frequency of mitoses from the spinous to the basal layer is not unrelated to the better conditions presumed to exist in the basal layer. It is tempting to suppose that, under the rigorous living conditions in the spinous layer, there may be not only more chromosome abnormalities than elsewhere in the epidermis but also a greater tendency to survival mutations occasioned by alterations in nuclear, or in plasma genes, or in both.

The evidence at present is consistent with the hypothesis that among these supposed mutations the malignant transformation is to be tentatively listed. The occurrence of the malignant change in one, or in very few, of many thousands of cells living generation after generation for over 60 days subjected to such hardships is what one would expect numerically if the change is actually a mutation.

The chief consideration that makes me a little hesitant about definite acceptance of this mutation hypothesis, as operative in our standardized carcinogenic series, is that the cancer cells never make their appearance before the expiration of a long latent period. If their origin were by mutation I would look for their occasional appearance more promptly.

Carrying on this line of thought it is, of course, conceivable that malignant mutations do occur more promptly, but that the resultant cancer cells are so tightly bound together with neighboring cells in the epidermis that they are physically unable to break loose, to enter the underlying dermis and to display malignant properties. According to this view the cells, having undergone malignant mutations would have the status of «latent cancer cells» so clearly described at this meeting by BERENBLUM. If so they

apparently wake up with considerable regularity without awaiting the action of any « promoters » resembling croton oil.

In our experiments it would appear that one factor which promotes the invasion of the dermis by cancer cells, whether these have existed in a latent state for weeks or have newly arisen by mutation, is reduction in free calcium. Justification for this idea is given both by the work of other investigators and of ourselves. It has been observed by CHAMBERS et al, that the connections binding cells together are loosened when the tissue is placed in a calcium free fluid. As already stated, we have discovered a marked reduction in both free and bound calcium, but especially in the former, in epidermal carcinogenesis and Coman has measured the force necessary to separate normal and malignant cells and has found this to be distinctly less in the case of the latter.

It seems to me that the work of our team, which I have so inadequately outlined to you, demonstrates two points of importance for us. *First*, it reveals some significant differences between the manner of life of the malignant cells chosen for study and that of normal cells of the kind from which the malignant cells originated, which differences are the most logical guides to attempts to control these particular malignant manifestations. *Second*, it shows how several workers can profitably concentrate on a single objective in cancer research, maintaining individual initiative and publishing their own results as these contribute to this objective. Indeed, hundreds of investigators could have participated in this project without any lost motion. Cancer research needs large cooperative efforts organized as in war and industry.

This Semaine d'étude on the biological aspects of cancer, so wisely planned by RONDONI and so well conducted by the Pontifical Academy of Sciences, indicates how fruitful team work can be on the much larger, international, scale in the attack on cancer as a world problem.

EPIDERMAL CARCINOGENESIS

- BAUMBERGER J. PERCY and BARDWELL, KATHLEEN, Hydrogen Electrode Half Cell in Polarography. *Industrial and Engineering Chemistry*. 1943, 15, 639-641.
- BAUMBERGER J. PERCY, SUNTZEFF V. and COWDRY E. V., Methods for the Separation of Epidermis from Dermis and Some Physiologic and Chemical Properties of Isolated Epidermis. *J. Nat. Cancer Inst.* 1942, 2, 413-423.
- BIESELE JOHN J., Ribonucleic Acid and Heterochromatin in Epidermal Carcinogenesis. *Cancer Res.* 1944, 4, 737-750.
- BIESELE JOHN J. and BIESELE, MARGUERITE MCAFEE, Alkaline Phosphatase in Mouse Skin under Methylcholanthrene Treatment. *Cancer Res.* 1944, 4, 751-755.
- BIESELE JOHN J. and COWDRY E. V., Chromosomal Changes in Epidermal Carcinogenesis. *J. Nat. Cancer Inst.* 1944, 4, 373-384.
- CARRUTHERS C., Vitamin E and Experimental Tumours. *Am. J. of Cancer*, 1939, 35, 546-553.
- CARRUTHERS C., The Effect of Carcinogens on the Hepatic Vitamin A Stores of Mice and Rats. *Cancer Res.* 1942, 2, 168-174.
- CARRUTHERS C., An Improved Photometric Method for Ascorbic Acid. *Industrial & Engineering Chemistry*. 1942, 14, 826.
- CARRUTHERS C., Influence of Limited Application of Methylcholanthrene upon Epidermal Iron and Ascorbic Acid. *J. Nat. Cancer Inst.* 1942, 3, 217-220.
- CARRUTHERS C., Ultramicromethod for Sodium Employing the Polarograph. *Industrial and Engineering Chemistry*. 1943, 15, 70.
- CARRUTHERS C., Microdetermination of Magnesium with the Polarograph. *Industrial and Engineering Chemistry*. 1943, 15, 412.
- CARRUTHERS C., Microdetermination of Copper with the Polarograph. *Industrial and Engineering Chemistry*. 1945, 17, 398-399.
- CARRUTHERS C., Polarographic Determination of Cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 1947, 171, 641-651.
- CARRUTHERS C., Chemical Studies on the Transformation of Mouse Epidermis to Squamous Cell Carcinoma. *J. Am. Dietetic Ass'n.*

- CARRUTHERS C. and SUNTZEFF V., Chemical Studies on the Mode of Action of Methylcholanthrene on Mouse Epidermis. *Cancer Res.* 1943, *3*, 744-48.
- CARRUTHERS C. and SUNTZEFF V., The Role of Calcium in Carcinogenesis. *Science*, 1944, *99*, 245-247.
- CARRUTHERS C. and SUNTZEFF V., Chemical Studies on the Transformation of Mouse Epidermis by Methylcholanthrene to Squamous Cell Carcinoma. *J. Biol. Chem.* 1944, *155*, 459-464.
- CARRUTHERS C. and SUNTZEFF V., Copper and Zinc in Epidermal Carcinogenesis Induced by Methylcholanthrene. *J. Biol. Chem.* 1945, *159*, 647-651.
- CARRUTHERS C. and SUNTZEFF V., Calcium, Copper, and Zinc in the Epidermal Carcinogenesis of Mouse and Man. *Cancer Res.* 1946, *6*, 296-297.
- CARRUTHERS C. and SUNTZEFF V., Desoxyribonucleic Acid in Epidermal Carcinogenesis Induced by Methylcholanthrene. *Cancer Res.* 1946, *6*, 8-10.
- CARRUTHERS C. and SUNTZEFF V., Succinic Dehydrogenase and Cytochrome Oxidase in Epidermal Carcinogenesis Induced by Methylcholanthrene in Mice. *Cancer Res.* 1947, *7*, 9-14.
- CARRUTHERS C. and SUNTZEFF V., Cytochrome c in Epidermal Carcinogenesis in Mice Induced by Methylcholanthrene. *Arch. Biol. Chem.* 1948, *17*, 261-267.
- CARRUTHERS and SUNTZEFF V., A Qualitative Chemical Change in Carcinogenesis. *Science.* 1948, *108*, 450-454.
- CARRUTHERS C. and SUNTZEFF V., Studies with the Polarograph on the Lipids of Epidermis During Normal and Rapid Growth. *Cancer Res.* 1949, *9*, 210-214.
- CHU C. H. U., Staining of Nerve Endings in Mouse Epidermis by Feulgen's Nuclear Reaction. *Science.* 1947, *106*, 70.
- COOPER Z. K., Mitotic Rhythm in Human Epidermis. *J. Invest. Derm.* 1939, *2*, 389-300.
- COOPER Z. K., FIRMINER, HARLAN I. and RELLER, HELEN C., Transplantable Methylcholanthrene Skin Carcinomas of Mice. *Cancer Res.* 1944, *4*, 617-621.
- COOPER Z. K. and FRANKLIN H. CHARLES, Mitotic Rhythm in the Epidermis of the Mouse. *Anatomical Record.* 1940, *78*, 1-8.
- COOPER Z. K. and RELLER H. C., Mitotic Rhythm in Human Epidermis. *J. Nat. Cancer Inst.* 1942, *2*, 335-344.
- COOPER Z. K. and SCHIFF ALICE, Mitotic Rhythm in Human Epidermis. *Proc. of the Soc. for Experimental Biol. and Med.* 1938, *39*, 323-324.

- COSTELLO C. J., CARRUTHERS C., KAMEN M. D. and SIMOES R. D., Uptake of Radiophosphorus in the Phospholipid Fraction of Mouse Epidermis in Methylcholanthrene Carcinogenesis. *Cancer Res.* 1947, 7, 642-646.
- COWDRY E. V., Properties of Cancer Cells. *Arch. Path.* 1940, 30, 1245-1274.
- COWDRY E. V., Experimental Epidermal Methylcholanthrene Carcinogenesis in Mice. *Biological Symposia.* 1943, 10, 131-162.
- COWDRY E. V., Factors in Cancer Production. *Surgical Clinics of North America.* October 1944, 985-993.
- COWDRY E. V., Experimental Epidermal Methylcholanthrene Carcinogenesis in Mice. Second Summarizing Report. *J. Invest. Derm.* 1945, 6, 15-42.
- COWDRY E. V., Microscopic and Chemical Properties of Precancerous Lesions. *Science,* 1945, 102, 165-168.
- COWDRY E. V., Epidermal Carcinogenesis. *J. A. M. A.* 1947, 135, 408-411.
- COWDRY E. V., Properties of Cancer Cells. Reprinted from *The Quarterly, The Chicago Medical School. Seminar.* May 5, 1948.
- COWDRY E. V., CARRUTHERS C. and SUNTZEFF V., Influence of Age on Copper and Zinc Content in Carcinogenesis Induced by Methylcholanthrene in Mice with a Note on the Role of Calcium. *J. Nat. Cancer Inst.* 1948, 3, 209-213.
- COWDRY E. V. and PALETTA F. X., Alterations in Nuclear Viscosity during Experimental Carcinogenesis determined by Ultracentrifugation. *Am. J. of Path.* 1941, XVII, 335-357.
- COWDRY E. V. and PALETTA F. X., Changes in Cellular, Nuclear and Nucleolar Sizes During Methylcholanthrene Epidermal Carcinogenesis. *J. Nat. Cancer Inst.* 1941, 1, 745-759.
- COWDRY E. V. and SUNTZEFF V., Influence of Age on Epidermal Carcinogenesis Induced by Methylcholanthrene in Mice. *The Yale Journal of Biology and Medicine.* 1944, 17, 47-58.
- COWDRY E. V. and THOMPSON, HENRY C. JR., Localization of Maximum Cell Division in Epidermis. *Anat. Rec.,* 1944, 88, 403-409.
- COWDRY E. V., VAN DYKE J. H. and GEREN B. B., Localization of Stratum of Maximum Mitotic Frequency in Epidermal Methylcholanthrene Carcinogenesis in Mice. *Cancer Res,* 1946, 6, 620-624.
- CRAMER WILLIAM and SIMPSON W. L., Mast Cells in Experimental Skin Carcinogenesis. *Cancer Res.* 1944, 4, 601-616.
- CRAMER WILLIAM and STOWELL ROBERT E., Carcinogenesis in the Mouse's Skin by the Infrequent Application at Long Intervals of Methylcholanthrene. *Cancer Res.* 1941, 1, 849-852.

- CRAMER WILLIAM and STOWELL ROBERT E., The Early Stages of Carcinogenesis by 20-Methylcholanthrene in the Skin of the Mouse. I. Experimental Technique and Microscopic Changes. *J. Nat. Cancer Inst.* 1942, 2, 369-378.
- CRAMER WILLIAM and STOWELL ROBERT E., The Early Stages of Carcinogenesis by 20-Methylcholanthrene in the Skin of the Mouse. II. Microscopic Tissue Changes. *J. Nat. Cancer Inst.* 1942, 2, 379-402.
- CRAMER WILLIAM and STOWELL ROBERT E., Skin Carcinogenesis by a Single Application of 20-Methylcholanthrene. *Cancer Res.* 1943, 3, 36-42.
- CRAMER WILLIAM and STOWELL ROBERT E., On the Quantitative Evaluation of Experimental Skin Carcinogenesis by Methylcholanthrene. The Factors of Dosage, Time, Spacing of Applications, and the Multiplicity of the Carcinogenic Response. *Cancer Res.* 1943, 3, 668-681.
- GOPAL-AYENGAR A. R. and COWDRY E. V., Desoxyribose Nucleic Acid from Isolated Chromosome Threads in Experimental Epidermal Methylcholanthrene Carcinogenesis in Mice. *Cancer Res.* 1947, 7, 1-8.
- KRAEMER DOROTHY ZIEGLER, Epidermal Nuclear Size Changes in Methylcholanthrene Induced Carcinogenesis. *Anat. Rec.* 1946, 94, 289-311.
- KUNG S. K., Lipase Activity during Experimental Epidermal Carcinogenesis. *J. Nat. Cancer Inst.* 1949, 9, 435-438.
- LANSING ALBERT I., ROSENTHAL T. B. and AU M. H., Ultrafilterable and Non-Ultrafilterable Calcium in Normal, Hyperplastic Epidermis and Squamous Cell Carcinoma. *Arch. Biochem.* 1948, 16, 361-365.
- LANSING ALBERT I., ROSENTHAL T. B. and KAMEN M. D., Calcium Ion Exchanges in Some Normal Tissues and in Epidermal Carcinogenesis. *Arch. Biochem.* 1948, 19, 177-183.
- LI CHAO-T'É and ROBERTS EUGÈNE, Amino Acids in the Mitochondrial Fractions of Tissues as Determined by Paper Partition Chromatography. *Science.* 1949, 110, 559-560.
- LIANG HSU-MU, A New Method for Staining Nerves and Their Endings Using the Schiff Reaction. *Anat. Rec.* 1947, 99, 511-522.
- LIANG HSU-MU, Localized Changes in Methylcholanthrene Treated Epidermis. *Cancer Res.* 1948, 8, 211-219.
- MA C. K., Morphological and Chemical Investigation of Dermal Elastic and Collagenic Tissue during Epidermal Carcinogenesis. *Cancer Res.* 1949, 9, 481-487.
- PALETTA F. X. and COWDRY E. V., Influence of Colchicine during Methylcholanthrene Epidermal Carcinogenesis in Mice. *Am. J. of Path.* 1942, 18, 291-311.

- PALETTA F. X., COWDRY E. V. and LISCHER C. E., Comparison of Methylcholanthrene Hyperplastic Epidermis with Benign Hyperplastic Epidermis in Healing Wounds. *Cancer Res.* 1941, *1*, 942-952.
- PALETTA F. X. and MAX PAUL F., Influence of Estradiol Benzoate on Epidermal Methylcholanthrene Carcinogenesis. *J. Nat. Cancer Inst.* 1942, *2*, 577-581.
- RELLER H. C. and COOPER Z. K., Mitotic Incidence in the First 48 Hours of Methylcholanthrene Epidermal Carcinogenesis. *Cancer Res.* 1944, *4*, 236-239.
- RITCHEY M. G., WICKS L. F. and TATUM E. L., Biotin, Choline, Inositol, p-Aminobenzoic Acid, and Vitamin B₆ in Transplantable Mouse Carcinomas and in Mouse Blood. *J. Biol. Chem.* 1947, *171*, 51-59.
- ROBERTS EUGÈNE, Estimation of Arginase Activity in Homogenates. *J. Biol. Chem.* 1948, *176*, 213-222.
- ROBERTS EUGÈNE, CALDWELL A. LEE, CLOWES G. H. A., SUNTZEFF V., CARRUTHERS C. and COWDRY E. V., Amino Acids in Epidermal Carcinogenesis in Mice. *Cancer Res.* 1949, *9*, 350-353.
- ROBERTS EUGÈNE and CARRUTHERS C., Adenylpyrophosphatase Activity in Epidermal Carcinogenesis in Mice. *Arch. Biochem.* 1948, *16*, 239-255.
- ROBERTS EUGÈNE and FRANKEL SAM., Arginase Activity and Nitrogen Content in Epidermal Carcinogenesis in Mice. *Cancer Res.* 1949, *9*, 231-237.
- ROBERTS EUGÈNE and FRANKEL SAM., Urea and Ammonia Content of Mouse Epidermis. *Arch. Biochem.* 1949, *20*, 386-393.
- ROBERTS EUGÈNE and FRANKEL SAM., Free Amino Acids in Normal and Neoplastic Tissues of Mice as Studied by Paper Chromatography. *Cancer Res.* 1949, *9*, 645-648.
- ROBERTS EUGÈNE and TISHKOFF GARSON H., Distribution of Free Amino Acids in Mouse Epidermis in Various Phases of Growth as Determined by Paper Partition Chromatography. *Science*, 1949, *109*, 14-16.
- SIMPSON W. L., CARRUTHERS C. and CRAMER W., Loss of Carcinogenic Activity when Methylcholanthrene is Dissolved in Anhydrous Lanolin. *Cancer Res.* 1945, *5*, 1-4.
- SIMPSON W. L. and CRAMER W., Further Observations on Skin Carcinogenesis by a Single Application of 20-Methylcholanthrene. *Cancer Res.* 1943, *3*, 604-605.
- SIMPSON W. L. and CRAMER W., Fluorescence Studies of Carcinogens in Skin. I. Histological Localization of 20-Methylcholanthrene in Mouse Skin after a Single Application. *Cancer Res.* 1943, *3*, 362-369.

- SIMPSON W. L. and CRAMER W., Sebaceous Glands and Experimental Skin Carcinogenesis in Mice. *Cancer Res.* 1943, 3, 515-518.
- SIMPSON W. L. and CRAMER W., Sensitization of Skin by Carcinogenically Inactive Methylcholanthrene to Subsequent Carcinogenesis. *Cancer Res.* 1945, 5, 5-10.
- SIMPSON W. L. and CRAMER W., Fluorescence Studies of Carcinogens in Skin. II. Mouse Skin after Single and Multiple Applications of 20-Methylcholanthrene. *Cancer Res.* 1945, 5, 449-463.
- STOWELL ROBERT E., The Photometric Histochemical Determination of Substances in the Skin. Measurements of Thymonucleic Acid. *J. of Invest. Derm.* 1945, 6, 183-189.
- STOWELL ROBERT E. and ALBERS V. M., A Spectrophotometric Analysis of Tissue Staining. *Stain Technology.* 1943, 18, 57-71.
- STOWELL ROBERT E. and COOPER Z. K., The Relative Thymonucleic Acid Content of Human Normal Epidermis, Hyperplastic Epidermis, and Epidermoid Carcinomas. *Cancer Res.* 1945, 5, 295-301.
- STOWELL ROBERT E. and CRAMER W., The Effect of Solvents in Methylcholanthrene Epidermal Carcinogenesis. A Comparison of Benzene and Acetone. *Cancer Res.* 1942, 2, 193-197.
- SUNTZEFF V. and CARRUTHERS C., The Effects of Methylcholanthrene upon Epidermal Sodium and Calcium. *Cancer Res.* 1943, 3, 431-433.
- SUNTZEFF V. and CARRUTHERS C., Potassium and Calcium in Epidermal Carcinogenesis Induced by Methylcholanthrene. *J. Biol. Chem.* 1944, 153, 521-527.
- SUNTZEFF V. and CARRUTHERS C., The Mineral Composition of Human Epidermis. *J. Biol. Chem.* 1945, 160, 567-569.
- SUNTZEFF V., CARRUTHERS C. and COWDRY E. V., Influence of Age on Calcium in Epidermal Carcinogenesis Induced by Methylcholanthrene in Mice. *Cancer Res.* 1945, 5, 572-575.
- SUNTZEFF V. and CARRUTHERS C., The Water Content in the Epidermis of Mice Undergoing Carcinogenesis by Methylcholanthrene. *Cancer Res.* 1946, 6, 574-577.
- SUNTZEFF V., CARRUTHERS C. and COWDRY E. V., The Role of Sebaceous Glands and Hair Follicles in Epidermal Carcinogenesis in Mice. *Cancer Res.* 1947, 7, 439-443.
- SUNTZEFF V., COWDRY E. V. and CARRUTHERS C., Influence of Age on Total Epidermal Lipid during Carcinogenesis Induced by Methylcholanthrene in Mice. *Cancer Res.* 1946, 6, 179-182.

- TATUM E. L., RITCHEY M. G., COWDRY E. V. and WICKS L. F., Vitamin Content of Mouse Epidermis during Methylcholanthrene Carcinogenesis. I. Biotin, Choline, Inositol, p-Aminobenzoic Acid and Pyridoxine. *J. of Biol. Chem.* 1946, *163*, 675-682.
- WICKS L. F., Sex and Proteinuria of Mice. *Proc. of the Soc. for Experimental Biol. and Med.* 1941, *48*, 395-400.
- WICKS L. F., and SUNTZEFF V., Reduction of Total Lipid-Protein Nitrogen Ratio of Mouse Epidermis by a Single Application of Methylcholanthrene. *J. Nat. Cancer Inst.* 1942, *3*, 221-226.
- WICKS L. F. and SUNTZEFF V., Changes in Epidermal Cholesterol during Methylcholanthrene Carcinogenesis in Mice. *Cancer Res.* 1945, *5*, 464-468.
- ZIEGLER DOROTHY M., A Method for the Collection of Nuclei of Epidermal Cells. *Anat. Rec.* 1945, *91*, 169-173.

S U M M A R Y

The contents of several constituents in the normal epidermal cells of mice and in cells undergoing a cancerous transformation by methylcholanthrene were investigated (Lipid P, water, some aminoacids, mineral constituents, biotin, ascorbic acid, nucleic acids, etc.). The contents are registered in tables, for every one the increase or decrease is noted. Some findings in human cancers of the skin are described.

R É S U M É

On a étudié comparativement chez la souris la teneur en plusieurs composés chimique des cellules épidermiques normales et des cellules en transformation cancéreuse par le methylcholanthrène (P lipidique, eau, plusieurs acides aminés, constituants minéraux, biotine, acide ascorbique, acides nucléiques, etc.). Les teueurs sont rapportées dans des tables, avec notation des augmentation et des diminutions pour chaque substance. On rapport aussi des chiffres pour des cancers humaines de la peau.

ZUSAMMENFASSUNG

An Hand ausgedehnter Untersuchungen werden das Verhalten verschiedener Eiweissfermente, Mineralgehalt, der Gehalt an Biotin, Cholin Inositol-, P-Aminobenzoesäure, Vitamin-B₆, C-Vitamin, verschiedener Lipoide, Nukleinsäuren und Eiweissabkömmlinge festgestellt.

S O M M A R I O

E' studiato nel topo il contenuto di moltissimi componenti cellulari comparativamente nelle cellule epidermiche normali ed in quelle in trasformazione carcinomatosa da metilcolantrene (fosforo lipidico, acqua, diversi aminoacidi, costituenti minerali, biotina, acido ascorbico, acidi nucleinici, ecc.). Tale contenuto è riportato in tabelle con notazione dell'aumento o diminuzione per ciascun componente.

Vi sono anche alcuni dati di raffronto per carcinomi e pelle umana.

DISCUSSION:

GREENSTEIN asks: Since the term « destruction » has been used to refer to the action of methylcholanthrene on the skin, would you not apply such a term chemically where you obtain increases in enzymatic activity as in the case of arginase, etc.?

COWDRY answers: No, I would not.

BERENBLUM. The term « mutation » has a very precise meaning to the geneticist, being concerned with a change in a particular gene, and we must be careful not to use it in a vaguer sense, to mean any kind of *apparently irreversible change*. Perhaps it is safer to describe the neoplastic change as an «*irreversible functional dedifferentiation*».

The mutation theory of cancer is attractive because it enables one to correlate carcinogenesis with virus tumours, on the hypothetical assumption that tumour viruses are mutated genes (as plasmagenes).

At the same time, we must remember that not all chemical carcinogens are mutagens, and not all mutagens are carcinogens.

SOME BIOCHEMICAL ASPECTS OF CANCER

PROF. JESSE P. GREENSTEIN (WASHINGTON)

It is a great honor and privilege for me to journey from one of the world's newest capitals to this ancient seat of the Roman empire. Particularly to one whose city's white marble and great architecture are still new and shiny, the thought must inevitably occur that only man's spirit and the search for truth is enduring. The expression of this spirit and its search are characteristic of this distinguished Pontifical Academy under whose auspices this meeting has been assembled.

The purpose of scientific investigation is to understand the laws of nature and to attempt to interpret and unify discovered phenomena into a reasonable system of knowledge. The strength and power of contemporary synthetic organic chemistry is an example of a successful unification of phenomena made predictable.

The investigator in the field of cancer research, confronted by its monstrous, amorphous, and contradictory literature, may do either of two things: he may retire in discouragement to some easier task, or he may attempt to find in this voluminous literature some common factor or series of factors, common to all cancers, capable of accurate quantitative measurement, and expressible in terms which are generally accepted and clearly understood. A study of the factors presumed in cancer production reveals a wide variety of agents, chemical, physical, and biological, which act in apparently different ways. It would be indeed difficult to interpret on the basis of a single mechanism the action of such various agents as ultraviolet light, polycyclic hydrocarbons, arsenic, and viruses, particularly when each of these agents may act differently in different species,

Greenstein - 1

in different inbred stocks within the same species, and even in males and females of the same inbred stock. Under favorable experimental circumstances, and in susceptible hosts, cancers may readily arise. These cancers induced by the same agent in the same or different species may exhibit different biological properties, one from another; thus some may grow faster than others (multiple tumors in the same animal as well as in different animals), some may metastasize and others may not, some may possess varying histologic patterns, some may grow rapidly for a time and then regress, and some may grow more readily in one environment than in another. The natural history of various cancers, viewed from the outside of the animal, often presents so diverse a picture that it is little wonder that the view is often expressed that cancer is not a single but a multiplicity of diseases, each cancer presumably representing a different type of disease.

This thought of the plurality of cancer, if the expression permits of such condensation, represents to me an almost hopeless point of view, and one from which no solution of the problem could conceivably be derived. The natural history of an object may have a certain antiquarian and perhaps taxonomic interest, but the best of contemporary zoologists have gone beyond the days of BUFFON and CUVIER. Various members of the human race, and even members of the same family, may grow at different rates, possess different pigmentation, different physical constitutions, and die at different ages, but they are all human, and distinguishable as such from fish and fowl. If each biological variation — and how small shall it be? — represents a different cancer, with properties peculiar to itself, and unlike all others, how may we ever hope to reach an understanding?

If we are to look ahead to a hopeful solution of this problem of cancer, we must look for those phenomena which are common to all cancers, and not to those phenomena which appear to divide them. What phenomena have been found to be practically universally common to all cancers, whether in mice, rats, rabbits, or man, in Japan, in Germany, in England, or in the United States? The first of these is the phenomenon of glycolysis, first noted by OTTO WARBURG (1). The capacity of all cancers to produce lactic acid anaerobically and aerobically is a property which has been widely recognized, and

has been supported by numerous investigations notably by DICKENS and BOYLAND in England, by RONDONI and his coworkers in Italy, and by BURK and by KURT STERN in the United States. The property of tumours to produce lactic acid aerobically has been related in part to the lack or near-lack of the Krebs cycle in tumors, the loss of the capacity of pyruvate to condense with oxalacetate, and the low malic dehydrogenase activity (POTTER), as well as the very low values of cytochrome oxidase and of cytochrome C in tumours (lack of functions related to aerobic metabolism — POTTER, STOTZ). The common glycolytic phenomenon of all cancers studied, no matter what their histogenesis and etiology, in whatever species observed, or in what country investigated, fall into a recognizable pattern, i. e., excessive amounts of lactic acid are produced, and various oxidase and dehydrogenase systems are uniformly low in activity.

The glycolytic cycle is however a complex of various individual enzyme systems, and the direction and extent of the metabolism of glucose to carbon dioxide and water depend obviously upon the nature and extent of the rate-limiting, individual systems. We have therefore undertaken an extensive series of investigations on the optimal activities of various individual enzyme systems in a wide variety of normal and neoplastic tissues of experimental animals and of human beings, under identical experimental conditions, and choosing among certain systems concerned with protein, fat, and carbohydrate metabolism those which are susceptible to accurate, quantitative measurement.

Our approach included essentially four types of investigation, all of them interrelated, and as they turned out, mutually quite consistent (2). They are as follows:

I. - *Enzyme Pattern in a Wide Variety of Normal and Tumor Tissues of the Mouse and of the Rat.*

Fresh normal tissues of the rat and mouse as follows, liver, kidney, spleen, brain, pancreas, skeletal muscle, intestinal mucosa, gastric mucosa, cardiac muscle, bone, lung, lymph nodes, and skin were homogenized and suspended in the appropriate volumes of distilled water. Freshly obtained tumors of these species, including

such varied types as hepatoma, lymphoma, gastric and intestinal adenocarcinomas, sarcoma, melanoma, and breast cancer were studied in these normal and cancerous tissues under identical experimental conditions so that all results were comparable. These systems included the following: (a) proteolytic—peptidase, dehydropeptidase, amidase, cystine desulfurase, and arginase, (b) nucleolytic—nucleodesaminase, nucleophosphatase, nucleodepolymerease, adenase, guanase, cytidinase, and the phosphatases for nucleotides and nucleasides, (c) saccharolytic—amylase (phosphorylase), (d) lipolytic—esterase, and (e) oxidative—cytochrome oxidase, cytochrome C, amino acid oxidase, and xanthine oxidase. Expressed in the same units, the following results may be noted:

A - The enzymatic pattern of normal tissues is highly differentiated, e. g., certain tissues possess very high activities of certain enzymes, other tissues possess very little of these enzymes, but may possess still other enzymes in high concentration. Each normal tissue therefore possesses a specific and unique pattern of enzymatic activity.

B - On the other hand, the enzymatic pattern of tumors is relatively uniform, e. g. the level of activity of each enzyme studied is nearly the same in each tumor, regardless of etiology or histogenesis. Thus, whereas normal liver and normal gastric mucosa are vastly different enzymatically, hepatoma and gastric adenocarcinoma are nearly indistinguishable.

C - This is due to the fact that those functions peculiar to liver, such as urea synthesis, high arginase activity, etc., and those functions peculiar to gastric mucosa, such as pepsin and rennin, are greatly diminished or lost altogether as a result of the neoplastic transformation. As a rule, the specific functional characteristics which distinguish or differentiate one normal tissue from another are reduced or disappear when these tissues become cancerous. The normal tissue thus becomes functionally dedifferentiated on cancerization.

D - However, the cancers arising each from a wide variety of normal tissues, approach each other functionally, and assume functional characteristics peculiar to what might be now termed a common type of tissue, common to all neoplasm or cancers. Thus

one may speak of cancer tissue as one speaks of liver tissue, or kidney tissue, namely, as a tissue with limited and ascertainable properties. So far as we know, all cancers are not absolutely identical although many of their properties are, but rather tend to converge to a common type of tissue, and resemble each other more than they resemble normal tissues or than normal tissues resemble each other. Thus, the livers, for example, of a wide variety of tissues resemble each other closely, even though in a few instances such as in purine metabolism, the livers of man and of the rat differ, and in nitrogen metabolism the livers of man and of birds differ considerably. Nevertheless the liver functions in general of man, rats, and birds resemble each other so closely that we can regard this tissue as generally common in all species and can designate it by a common name. In some tissues, such as bone and thyroid, etc., the specific functional characteristics, e. g. phosphatase and thyroxine respectively, may not disappear completely in the neoplastic transformation of these tissues. The fact that certain tumors may retain some vestige of the normal tissues of their origin is no bar to the general principle of the physiological uniformity of tumors, for in only a few cases has the comparison between the levels of the retained function been placed on a quantitative basis of comparison with that of the normal tissue. Little or no data exist on the amount of adrenalin for example per unit weight of normal adrenal gland and adrenal tumor. The prostatic cancer still retains a high acid phosphatase level, characteristic of the normal gland, but per unit weight of tissue, the activity of the cancer is probably much less than that of the normal gland. Since there is generally a higher proportion of epithelial cells per unit weight of cancer tissue, than of epithelial cells per unit weight of normal tissue (greater cell homogeneity of cancers), the specific functional activity of the tumor is probably even still less on a cell for cell basis. With extensive metastatic growth however, the total number of cancerous epithelial cells may far outnumber the usual amount of normal epithelial cells, and even though each cancer cell contains less than the usual amount of secretory material or specific enzyme, the sheer total number of such cells may produce a hyperfunctional state in the host, e. g. hyperthyroidism, hyperinsulinism, high serum acid phosphatase, etc.

The level of each enzyme systems in tumors stands between the highest level and the lowest level in normal tissues, e. g. the activity of each enzyme in tumors does not exceed that of the most active normal tissue, and is not lower than of the least normal tissue. The metabolic properties in general of tumors fan somewhere between the extremes of the normal tissue. Thus when a normal tissue possesses a very high activity of an enzyme system (arginase in liver, pepsin in gastric mucosa), it is usually diminished when the tissue becomes cancerous. On the other hand, when a normal tissue possesses a very low activity of an enzyme system (arginase in skin, dehydropeptidase in liver) it rises when the tissue becomes cancerous. These phenomena are an expression of the convergence of tumors toward a common type. One cannot say therefore, as has often been said in the past, for example, that « tumors possess a high arginase activity. » « High » in relation to what? The arginase level in tumors is certainly higher than in skin or in muscle, but certainly lower than in liver and in kidney.

2. - *The Level of Activity of Enzyme Systems in Tumors.*

Each of the enzyme systems in tumors, thus occupies a median position in relation to the levels in normal tissues. Some are nearly as active in all tumors as the most active normal tissue, some as little active as the least active normal tissue. Those systems which are nearly as active concerned with protein metabolism, e. g. peptidases and dehydropeptidases. Those systems which are as little active as the least active normal tissues include those systems concerned with the utilization of molecular oxygen, e. g., cytochrome oxidase-cytochrome C, amino acid oxidase, etc. Arginase in tumors occupies almost a middle position between normal extremes.

3. - *Changes in Enzymatic Level as a Result of the Primary Neoplastic Transformation and of Subsequent Transplantation.*

These studies were conducted with normal liver, the primary hepatoma, and a transplanted, subcutaneously-growing hepatoma. In the course of the primary neoplastic transformation, certain

enzymatic systems of the liver changed in magnitude whereas others remained unchanged. On subsequent transplantation, certain of the systems which had changed as a result of the primary transformation changed still further — in the same direction — whereas other remained appreciably constant. Among those systems which altered to the fullest extent in the primary neoplastic transformation (did not change further on transplantation) were the oxidases. Other systems changed further on transplantation, such as arginase and alkaline phosphatase. The fact that there is such a continuous progression in level for at least certain systems suggests that there may be progressive gradations in malignancy with progressive growth of the tumor whereby the tumor, through either internal alterations (irreversible?) or through continuous selection of more malignant cells, approaches through frequent transplantations (or metastases) the fully malignant state. In the latter condition, all tumors are presumably alike.

4. - *Enzymatic Levels in the Tissues of the Tumor-bearing Host*

Certain enzyme systems in the tissues of the tumor-bearing host are changed progressively in magnitude from the normal as the tumor grows. These changes are most marked in the catalase level of liver and kidney, and to some extent in the liver arginase, and are appreciable only in the case of rapidly-growing tumors from the point at which they form about 5 percent of the body weight of the host animal. These effects are reversible, and the levels of liver catalase for example are restored rapidly to normal when the tumor is excised or removed in some other manner. With very rapidly growing tumors, the catalase activity of the liver of an animal carrying the tumor in a distant site, can be decreased almost to one-twentieth of its normal value. The fact that relatively slow-growing tumors do not show this effect suggests that there is probably a competition between the toxic effect of the tumor carried perhaps through the circulation, and the normal efforts of the body to combat and repair the effects of this toxicity. With rapidly growing tumors the former predominates, and with slow-growing tumors the body has a chance to favor the latter.

Two important fundamental features of this phenomenon are: (1) the fact that with tumors growing rapidly enough, the hepatotoxic effect is noted with all kinds of tumors, regardless of etiology and histogenesis, thus another piece of evidence in favor of the uniformity of tumors as a unique class of tissues, and (2) the changes induced in the liver of the tumor-bearing animal are in the direction which the liver itself would take if it became neoplastic. The liver of a cancerous animal thus shows neoplastic qualities in the absence of any discernable morphologic change, and suggests the more or less generalized property of neoplastic disease.

REFERENCES

1. WARBURG O., *Metabolism of Tumors*. London and New York, 1930.
2. GREENSTEIN J. P., *Biochemistry of Cancer*. New York, 1947.

S U M M A R Y

Study of the catalytic components of tumors has revealed that tumors possess a rather uniform pattern, regardless of etiology and histogenesis. Tumors form a special and unique type of tissue with a metabolism and chemical behavior and properties peculiar to this type. Thus tumors of all kinds resemble each other more than they resemble normal tissues, or than normal tissues resemble each other. In accord with this generalization is the observation that when a normal tissue becomes cancerous, the special, differentiating properties which the normal tissue possessed become lost or markedly reduced. The chemical properties of tumors fall between the extremes of the normal tissues; e. g. the respiratory capacities of tumors resemble those of the least active normal tissues, the proteolytic capacities of tumors resemble those of the most active normal tissues. No chemical property of any tumor is in excess of that of the most active normal tissue; no chemical property is less than that of the least active normal tissues. In chemical terms, therefore, tumors occupy a median, relatively undifferentiated position, in regard to the wide range of highly differentiated normal tissues.

Certain of tissues of the tumor-bearing host, notably the liver, show chemical changes in a direction which these normal-appearing tissues would take if they became cancerous. The tissues of the tumor-bearing host thus show cancerous changes in the absence of morphologic change, an indication of the generalized character of neoplastic disease.

R É S U M É

Les études sur les composants catalytiques des tumeurs ont mis en évidence que les tumeurs ont des caractéristiques assez uniformes sans aucun rapport avec l'étiologie e l'histogénèse. Les tumeurs forment un type unique et spécial de tissu ayant un métabolisme et des caractères chimiques distinctifs de ce type de tissu. De même tous les types de

tumeurs se ressemblent entre eux bien plus qu'ils ne ressemblent aux tissus normaux ou encore assez plus que les tissus normaux entre eux.

Cette hypothèse est soutenue par l'observation que lorsqu' un tissu normal devient cancéreux, il perd tous ou la plupart de ses caractères spécifiques et différentiels.

Les propriétés chimiques des tumeurs sont contenues entre les extrêmes des tissus normaux, par exemple la respiration des tumeurs ressemble à celle des tissus normaux les moins actifs; les propriétés protéolytiques des tumeurs sont les mêmes de celles des tissus normaux les plus actifs. Les tumeurs n'ont aucune propriété chimique en plus de celles que possède le tissu normal le plus actif et aucune propriété chimique en moins de celles que possèdent les tissus normaux les moins actifs.

Par conséquent, au point de vue chimique les tumeurs occupent une position moyenne, relativement indifférenciée en rapport à la grande ampleur de variation des tissus normaux fort différenciés. Certains tissus normaux de l'hôte porteur de la tumeur, surtout le foie, présentent des altérations chimiques dans une direction que ces tissus apparemment normaux prendraient s'ils devenaient cancéreux. Ainsi les tissus de l'hôte présentent des altérations cancéreuses même en absence de lésions morphologiques indiquantes une généralisation des caractères de la maladie cancéreuse.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Abweichungen der Fermente sind bei den Tumoren ziemlich gleichartig und stehen in keiner Beziehung zu deren Ätiologie und Histogenese. Die Tumoren bilden eine einheitliche und spezifische Abart des Gewebes. Ebenso weisen sie eine Abweichung des Stoffwechsels und der chemischen Eigentümlichkeiten der betreffenden Gewebeart auf. Alle Tumorarten ähneln sich untereinander mehr oder minder.

Wenn Normalgewebe krebzig entartet, so verliert es alle oder die Mehrzahl seiner früheren charakteristischen Eigentümlichkeiten. Die chemischen Abweichungen des Tumorgewebes halten sich innerhalb der äussersten Grenzwerte der im normalen Gewebe gefundenen Abweichungen. So erscheint die Atmung des Tumorgewebes nur etwas weniger aktiv als die des normalen Gewebes, die proteolytischen Eigentümlichkeiten sind im Prinzip die gleichen, wie die des normalen Gewebes. Die Tumoren

zeichnen sich durch keine chemische Besonderheit gegenüber den Normalzellen aus. Zusammengefasst nehmen die Tumoren vom chemischen Standpunkt eine Mittelstellung unter den breiten Variationsmöglichkeiten des normalen Gewebes ein.

S O M M A R I O

Lo studio dei costituenti enzimatici dei tumori ha messo in evidenza che i tumori posseggono uno schema enzimatico piuttosto uniforme, senza alcun rapporto con l'eziologia e l'istogenesi. I tumori formano uno speciale ed unico tipo di tessuto avente un metabolismo, un comportamento chimico e delle proprietà peculiari di questo tipo. Perciò i tumori di ogni tipo si assomigliano fra di loro molto più che non assomiglino ai tessuti normali oppure molto più di quello che i tessuti normali si assomiglino fra di loro. Conferma questa generalizzazione l'osservazione del fatto che quando un tessuto normale diventa canceroso esso perde del tutto od in parte le speciali proprietà differenziative che possedeva.

Le proprietà chimiche dei tumori sono contenute fra i limiti estremi dei tessuti normali; per esempio le capacità respiratorie dei tumori somigliano a quelle dei tessuti normali meno attivi; le attività proteolitiche dei tumori somigliano a quelle dei tessuti normali più attivi. Nei tumori non c'è alcuna proprietà chimica in più di quelle che esistono nel tessuto normale più attivo, così come non esiste alcuna proprietà chimica in meno di quelle che hanno i tessuti normali meno attivi. In termini chimici quindi i tumori occupano una posizione intermedia, relativamente indifferenziata rispetto all'ampia variabilità dei tessuti normali altamente differenziati.

Certi tessuti normali dell'ospite portatore di tumori, soprattutto il fegato, mostrano delle alterazioni chimiche in una direzione che questi tessuti, che appaiono normali, assumerebbero se essi diventassero cancerosi.

I tessuti dell'ospite, pur non presentando alterazioni morfologiche, mostrano delle modificazioni cancerose, indicando così il carattere generalizzato della malattia neoplastica.

DISCUSSION:

BERENBLUM: It is now considered that only a few « latent tumour cells » are neoplastic in the stage of preneoplastic hyperplasia. Since these represent a minute minority among the surrounding cells, any specific effects they might have (e. g. enzymatic or other effects) would be too small to be detected.

Consequently, when any effects is found to increase *gradually* from the normal, through hyperplasia, to neoplasia, then that reaction is probably not specific for neoplasia.

BOYLAND: We have found that the metabolism of Urethane is much reduced in mice and rats bearing transplanted tumours as compared with normal animals. This indicate that the activity of the enzymes concerned in this urethane metabolism is reduced in a way similar in that point with catalase.

COWDRY asks GREENSTEIN whether there is any essential difference in the enzyme patterns of carcinomas and sarcomas. GREENSTEIN answered that there is not.

LACASSAGNE emphasized difference between human and animal cancers in constrast of GREENSTEIN's idea of similarity.

COWDRY pointed to similarity in calcium content of mouse and human squamous cell carcinomata.

LACASSAGNE: Je pense que, lorsque GREENSTEIN dit que « tous les types de tumeurs se ressemblent entre eux bien plus qu'ils ne ressemblent aux tissus normaux » il présente une conclusion de recherches biochimiques très particulières, qui contredit des notions pourtant bien acquises en histologie, en physiologie et en clinique du cancer.

Il est connu que le degré de la dédifférenciation de la cellule cancéreuse varie beaucoup, même dans des cancers provenant d'une même lignée cellulaire d'un même organe. Ce qui a conduit certains anatomo-pathologistes à distinguer, dans une même espèce de cancers, des variétés: typique (reproduisant tous les caractères de la cellule normale), métatypique et atypique. On sait, d'autre part, que toute cellule normale qui se divise subit un certain degré de dédifférenciation; des variations biochimiques quantitatives pourraient donc être une conséquence de l'activité multiplicatrice, aussi bien que de l'état de cancérisation.

Il ne faut, d'autre part, pas oublier que les cancers humains (qui doivent être un objet particulier de nos préoccupations) fournissent un matériel d'une extrême variété; alors que le matériel expérimental usuel dans les laboratoires est réduit, assez homogène et même - à certains points de vue - artificiel.

MAISIN: Nous aimerions demander au Dr. GREENSTEIN si il a étudié les alterations fonctionnelles du foie au stade prénéoplasique chez les animaux qu'on badigeonne aux hydrocarbures. On pourrait voir par exemple si chez de tels animaux le foie transforme toujours les acides aminés en même quantité et de même façon que celui des animaux normaux.

PEACOCK: Have you compared the normal tissues with well differentiated and less differentiated tumours?

Have you also used as normal controls embryonic tissues as well as adult tissues?

Arising out of BOYLAND'S comments were the tumour bearing animals he used grafted or bearing spontaneous tumours. (Answer: Mostly grafted tumours but some spontaneous tumours bearing animals behave in the same way).

It is not surprising that chemical analyses of the tumours from different origins should resemble each other as it is well known that histological similarities between tumour cells exist. The more anaplastic the tumours become the more they resemble each other histologically and this probably corresponds with the similarities of chemical behaviour observed by Dr. GREENSTEIN.

GREENSTEIN: Answers to COWDRY: Similar enzymatic results have obtained with sarcomas as well with carcinomas. It will be recalled that the Coris had observed nearly identical values for lactic acid in such diverse tumours (of the mouse).

Answers to PEACOCK: Four types of comparable hepatic tissues (of the rat) have been employed, i. e., normal adult, regenerating, fetal and neoplastic with results which indicated a more or less quantitative similarity in enzymatic levels between the adult and regenerating liver on the one hand, and fetal and neoplastic liver on the other. An other type of hepatic tissue might be included, namely the liver of the tumor bearing rat which shows a few, selective changes in the same direction which liver would have taken had it become cancerous.

Answers to LACASSAGNE: Our studies have been conducted to a large extent with various transplantable tumours of the mouse, which may be said to have undergone through several generation transplants a selection toward highly malignant cells. Nevertheless we have noted in the primary hepatoma changes in enzymatic level which all tumors apparently undergo, and these changes go still further - in the same direction - in certain cases when the tumor is transplanted. It is if we would represent cancer as occurring in several stages as follows:

$N \longrightarrow A \longrightarrow B \longrightarrow C \longrightarrow \dots Z$ where $A \longrightarrow \dots Z$
(normal)

represent successive neoplastic stages as the characteristics of the normal tissue are left behind and the cancer approaches the fully malignant state Z. In state A, or B, etc., i. e., the early stages, the cancer may show same characteristics of the normal tissue of origin, i. e., thyroxin in thyroid tumours, adrenalin in adrenal tissues, etc., but the problem at issue is not that the cancer may show *qualitatively* some aspect of normal function, but quantitatively *how much* per unit weight, per unit cell, etc., in comparison with the normal tissue of origin. Thus, the primary prostatic cancer shows high acid phosphatase, but still much less than that of the normal prostate

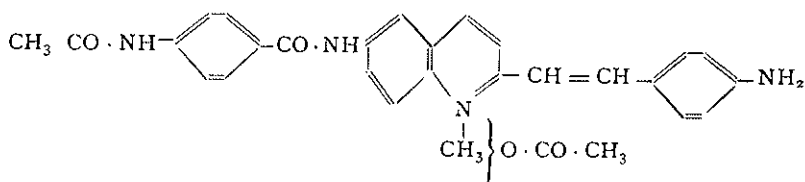
epithelium. Perhaps if one could examine secondary prostatic growth in the soft tissues (to avoid skeletal metastases) he might find still less acidphosphatase than in the primary tumour as in the comparable studies of ours on primary and transplanted hepatomas. Similarly, it may well be that per unit cell, thyroid tissues have less thyroxin than normal thyroid. It is therefore the quantitative aspect which is important in these phenomena as it is always.

Answers to SCHINZ: There is no one specific enzyme for cancer but there is an unique and specific enzyme pattern which all tumours possess in common.

PRODUCCION EXPERIMENTAL DE SARCOMA EN EL RATON POR LA SIMPLE INYECCION SUBCUTANEA DE UNA BENZOIL-AMINO-ESTIRIL-QUINOLEINA

PROF. DR. J. SANZ IBAÑEZ (MADRID) [1]

Bajo epigrafe semejante comunicaron BROWNING, GULBRANSEN y NIVEN, en 1936, la aparación de sarcomas en el ratón en el sitio de una inyección subcutánea de una solución acuosa de 2 (p. amino estiril) 6 (p. acetil. amino. benzoil, amino) quinoleina metaacetato = Estiril 430.



Este producto habia sido ensayado por estos autores como quimioterapico frente a la infección experimental por *T. brucei* y de él ya habian constatado en 1933 su acción sarcogenetica, si bien se trataba entonces de experimentos en que dicha infección entraba en concurrencia.

Desde el primero momento nos interesó el estudio morfológico del sarcoma, originado en el ratón por una sola inyección subcutánea de dicho preparado.

Material y Metodos. — Se preparó una suspensión al 1 % de Estiril 430 en solución salina fisiológica y esterilizada a vapor fluente durante 15 minutos.

[1] En este trabajo ha colaborado el Dr. BRAÑEZ-CEPERO.

Una dosis única de 1 c.c. de esta suspensión fué inyectada subcutáneamente y en la región dorsal a ratones blancos de 15 a 20 gramos de peso, previa vigorosa agitación de la suspensión de Estiril 430.

Fueron inyectados un total de 20 ratones, de los cuales 4 fueron sacrificados a intervalos de 15 días (1 ratón), 1 mes (2 ratones), 2 meses (1 ratón) y 3 meses (1 ratón) y destinados al estudio histológico.

Los restantes (15 ratones) fueron abandonados a su evolución natural, bajo diaria vigilancia, en espera de la aparición de tumores. Solamente en uno de ellos, transcurridos casi 7 meses desde la fecha de inoculación (desde el 30-IX-46 hasta primeros del V-47) presentó en el dorso, bajo la piel y en la zona pigmentada por la inyección del colorante, una tumoración que fué creciendo progresivamente hasta adquirir el tamaño de una nuez (Fig. 1).

El animal portador de la tumoración fué sacrificado el 2-VI-47 bajo narcosis eterea. En la autopsia pudo comprobarse que el tumor se hallaba solidamente adherido a planos profundos (músculos de los canales vertebrales, costillas, raquis y peritoneo). Los ganglios linfáticos de axilas e inglés estaban muy engrosados y el bazo aparecía considerablemente agrandado, siendo su tamaño el doble del normal. El resto de las vísceras no presentaban alteraciones macroscópicas (Fig. 2). (En la figura 2 se ve el tumor cerrado, en la 3 está abierto).

Un trozo del tumor se aprovechó para hacer el pase a 16 ratones. El pase se hizo por medio de trocitos pequeños injertados bajo la piel de los animales.

Se han hecho 28 pases, desde el 2 de Junio de 1947 hasta el 19 de Junio de 1948.

Solamente en un pequeño lote de 10 ratones (pase 11; 3-VII-47) se ensayó sin notable éxito, la inyección subcutánea de suspensión de pulpa tumoral en líquido de Tyrode, obtenida por fragmentación del tumor con bisturí y machacamiento con perlas de vidrio. El método se mostró poco útil y fué abandonado.

El material recogido fué fijado en líquido de Flemming, tormol (15 %)-alcohol (65 %) o solución acuosa de formol al 10 %. Los cortes fueron practicados por congelación y más frecuentemente por la inclusión en celoidina-parafina según PETERFI. Las técnicas de colo-

N. Pase	Fecha	N. Ratones	Prendimiento	Prendimiento	Observaciones
I	2-VI-47	15	9	60%	
II	18-VI-47	12	3	75%	Iny. de pulpa tumoral.
II	21-VI-47	7	0	0%	
II	3-VII-47	15	14	91%	
II	3-VII-47	10	1	10%	
II	11-VII-47	10	3	3%	
III	5-VIII-47	13	2	15%	Infección del tumor matriz.
III	3-IX-47	5	2	40%	Infección del tumor matriz.
IV	23-IX-47	6	2	33%	
IV	25-IX-47	5	2	40%	60%
IV	4-X-47	10	7	70%	
V	11-XI-47	4	2	50%	69%
V	19-XI-47	12	9	75%	
VI	14-XII-47	10	8	80%	87%
VI	20-I-48	12	11	92%	
VII	13-I-48	9	8	89%	
VIII	7-II-48	8	5	61%	
IX	2-III-48	10	5	50%	
X	1-IV-48	10	6	60%	
XI	2-IV-48	10	5	50%	45%
XI	21-IV-48	10	4	40%	
XII	19-VI-48	10	6	60%	

ración utilizadas fueron la de safranina-verde luz, hematoxilina progresiva, hematoxilina regresiva y eosina, de Feulgen-Rosembeck para caracterización nuclear y del carbonato argéntico amoniaco de del Rio-Hortega para el tejido conjuntivo.

Resultados. — La inyección de la suspensión de Estiril 430 en solución salina va seguida de fuerte retención local en el sitio de la inyección. Transcurrido hasta más de un año de la inyección, cuando la aparición del tumor no tuvo lugar, el pigmento persiste visible en el sitio de la inyección, a través de la piel del animal, como una placula roja e indurada.

La solubilidad acuosa del Estiril es pequeña (2 %), y su inestabilidad grande; una pequeña adición de plasma basta para precipitarlo y en solución salina solamente se logra una suspensión.

El acúmulo de la suspensión de Estiril 430 inyectado es al principio líquido, luego se torna viscoso como gelatina y por fin relativamente consistente.

El estudio histológico de la zona de inyección realizado a los 15, 30, 60, y 90 días permite observar una imagen cuya persistencia en el tiempo sorprende.

Histologicamente se aprecia una formación lacunar central de intenso color rojo oscuro (Fig. 4) en la que el pigmento de Estiril 430 aparece precipitado en forma masiva; es muy difícil distinguir en esta zona central traza de estructura celular. La vigorosa precipitación del Estiril 430 dá a esta zona un aspecto micromacliforme, casi amorfo. Dentro de esta zona lacunar fundamentalmente amorfa son visibles restos de estructuras celulares, detritus y células en vías de necrosis determinada por la agresión local del Estiril 430.

En torno a esta zona existe una banda de gran actividad celular. Numerosas células conectivas móviles aparecen cargadas de pigmento (Fig. 5). Las más sobrecargadas semejan un tachón redondeado rojo en el que no es posible reconocer directamente estructura celular alguna, identificándose tan solo por su silueta chinesca. Es posible no obstante desenmascararlas si se las libra del pigmento tratando el corte con solución de permanganato potásico al 5 % y luego con ácido oxálico al 10 %, antes de la coloración por la hematoxilina. Otras células aparecen con inclusiones pigmentarias rojas,

en su citoplasma, en grado muy variable. Se comprende que representan estadios diversos en su función macrofágica.

La infiltración leucocitaria es relativamente pequeña y los fenómenos de exudación mínimos. El proceso de remoción del pigmento tiene caracter casi exclusivamente histiocitario.

El pigmento aparece incluido en el citoplasma muy frecuentemente bajo la forma de agujitas que semejan formaciones bacilares especialmente en los márgenes de la zona de necrosis. Un poco más lejos el pigmento aparece en agujas más cortas o casi amorfo. Es posible se trate de un proceso de fragmentación o transformación que tenga lugar durante la emigración histiocitaria.

A cierta distancia de la zona necrótica se vé como los histiocitos, portadores del pigmento, se infiltran por entre los intersticios del tejido conectivo subcutáneo y el conectivo interfascicular del tejido muscular subyacente. La emigración por los linfáticos es poco intensa. El pigmento difunde hasta los folículos, y se le distingue dentro de ellos y en los estratos más centrales.

Con todo la remoción pigmentaria es poco intensa y el Estiril 430 persiste en el sitio de inyección, como ya señalamos, durante varios meses.

En uno de los 15 ratones que se abandonaron a su evolución espontánea apareció, casi al cabo de siete meses de efectuada la inyección de Estiril 430, en el sitio de la inoculación una tumoración que alcanzó, tres semanas después, el tamaño de una nuez.

Sacrificado el animal pudo comprobarse se trataba de un tumor macizo, de intenso color rojo vinoso, jaspeado, casi porfídico, de relativa consistencia, poco adherido a la piel y más a planos profundos.

Histológicamente el tumor fué identificado como un sarcoma cuya estructura variaba algo de unas regiones a otras del tumor. Presentaba zonas de aspecto polimorfo, especialmente en las regiones más sobrecargadas de pigmento, en otras es fusocelular típico. Hay abundante mitosis (Fig. 6).

Infiltrando el tumor y formando acúmulos hay células cargadas de pigmento, semejantes en todo a las que describimos en las inmediaciones de la zona lacunar del sitio de la inyección durante sus primeras fases evolutivas. Tales elementos celulares son de dos ti-

pos: grandes, de segura estirpe histiocitaria (leucocitoides) y pequeños y redondeados de origen leucocitario. Tenemos la impresión de que *las células conectivas propiamente blastomatosas no se cargan de pigmento de Estiril 430*.

Con ser escaso el armazon fibrilar del tumor, existe sin embargo una fina red de reticulina que sirve de basamento a la estructura tumoral. Los vasos, embrionarios y capilariformes son relativamente abundantes y la neoformación vascular del tumor se hace especialmente visible en las capas profundas del dermis de los sucesivos animales injertados.

Sin embargo, el tumor no es hemorragiparo. Existen pequeñas zonas degenerativas y de necrosis.

El tumor aparece envuelto por una delgada cápsula fibro-conectiva, especialmente por su cara exterior — la que mira a la piel — en cambio la cara profunda se muestra muy infiltrante, el tumor diseca y aísla los haces musculares, destruyéndolos (Fig. 7). También el tejido adiposo aparece infiltrado por el tumor en formas de gotas, finas o más frecuentemente gruesas. La base histológica de la hiperesplenía que ya apuntamos es una hiperplasia difusa del órgano que afecta al sistema de los folículos linfoides pero de manera dominante al sistema reticular. La hiperplasia reticular se caracteriza por la presencia de un sinnúmero de células gigantes multinucleadas (Fig. 8). Tales elementos celulares se disponen aisladamente o en acúmulos, ocupando los territorios interfoliculares de la pulpa. De abundante citoplasma homogéneo, el número de núcleos oscila de 2 a 15, siendo el promedio dominante de 5 a 10, los núcleos se disponen abigarradamente, rara vez en corona, existiendo acusadas diferencias morfológicas y de tamaño entre los de una misma célula.

También en los ganglios linfáticos axilares e inguinales, especialmente en los primeros, se aprecia una notable hiperplasia de las estructuras linfoides y linforeticulares, existiendo células de estirpe histiocitaria con inclusiones pigmentarias.

Las vísceras examinadas, hígado, riñones, pulmón y corazón no presentaban alteraciones ostensibles.

En los sucesivos trasplantes — en la actualidad estamos en el pase 28 y el número total de ratones utilizados para la serie asciende aparte otros utilizados para estudios marginales que no se incluyen

en el presente trabajo-hemos podido comprobar la persistencia de la imagen que conserva las mismas características histológicas de un sarcoma fusocelular.

Sin embargo, hay que anotar el hecho de que el pigmento de Estiril 430 se va agotando en los sucesivos pases; prácticamente deja ya de ser visible sobre el V y VI pases. Paralelamente la imagen del tumor se estabiliza, es decir pierde mucho de su pleomorfismo para convertirse en un puro sarcoma fusocelular.

La velocidad de crecimiento del tumor permanece no obstante constante y en cada pase, los animales en los que prende más precoz e intensamente alcanza al cabo de 25 a 30 días su total desarrollo, es decir el correspondiente al del tumor matriz y casi prácticamente el compatible con la vida del animal, según nuestra experiencia.

En ningún caso hemos observado la formación de metastasis. El crecimiento del tumor puede, en ocasiones determinar la ulceración de la piel, especialmente si la sutura no fué coaptada cuidadosamente. En cuanto al crecimiento en profundidad del tumor transplantado repite sistemáticamente cuanto dijimos para el tumor original. Señalaremos que en algún caso el crecimiento en profundidad del tumor determinó parálisis de algunas de las patas posteriores, seguramente por englobamiento de los nervios motores a nivel de la región glutea y muslo. En un caso, el tumor, de marcado carácter invasor, había destruido el canal raquidiano determinando una paraplejía flácida posterior con incontinencia por rebosamiento — la autopsia demostró la vejiga ampliamente distendida — es decir un síndrome de sección medular transversa completa.

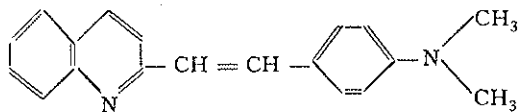
En algún caso el tumor sufrió contaminación bacteriana. Anotemos que los injertos realizados con material infectado prendieron también aún cuando algunos siguieron una evolución abscesiforme. Como es natural, estos casos fueron desechados para la prosecución de los pases.

La hiperplasia ganglionar y la hiperesplenía persisten a través de todos los pases, aún cuando los restos de Estiril 430 ya no sean visibles y no exista contaminación bacteriana. La hiperesplenía alcanza su mayor grado en las formas más voluminosas y antiguas del tumor.

Discusion de los resultados. — Nuestro trabajo, confirmando al de BROWNING, GULDBRANSEN y NIVEN, comprueba la producción experimental en el ratón, por una única dosis de 1 ctgrm. de Estiril 430 propinado por vía hipodérmica, de un típico sarcoma capaz de ser transmitido en serie por injerto homoplástico.

La sustancia ensayada es un cuerpo sintético relacionado con los llamados carcinogénicos químicos. Por el momento se ignora la estricta relación existente entre su constitución química y su capacidad sarcogénica. HADDOW y KON sugieren, en relación con los trabajos de BROWN, quien ha abordado el estudio sistemático de la serie del amino-estilbeno, que la acción inhibitoria (como se sabe esta acción se pone en relación con la capacidad carcinogénica) depende del grupo básico *p* u *o*, un puente etileno (y no uno de los átomos de C) en el cual ninguno de los átomos de H deben ser substituidos, una posición *p* libre y la configuración *trans* de la molécula. BROWN estudia la posibilidad de substituir el anillo B por diversos heterociclos en tanto se mantiene la capacidad inhibitoria del crecimiento.

Anotaremos que una de estas sustancias ensayadas está representada por la 2- (4-dimetilamino) estilil-quinolina, para la que todavía no se ha demostrado acción carcinogénica aunque es de suponer que la posea y que forma parte de la molécula de Estiril 430.



El valor de nuestro ensayo difiere del de BROWNING y &. Estos autores obtuvieron sobre 19 animales, 10 casos de tumores en un plazo de 8 meses mientras que nosotros solamente hemos obtenido 1 al cabo de unos 7 meses, sobre un lote de 15 ratones y un plazo de observación muy superior a un año. Es decir si aceptamos el índice de IBALL ⁽¹⁾ para expresar numericamente la actividad sarcogénica del Estiril 430, nosotros obtenemos un valor de 3,75 contra 20 que se deduce del trabajo de BROWNING y &.



FIG. 1.

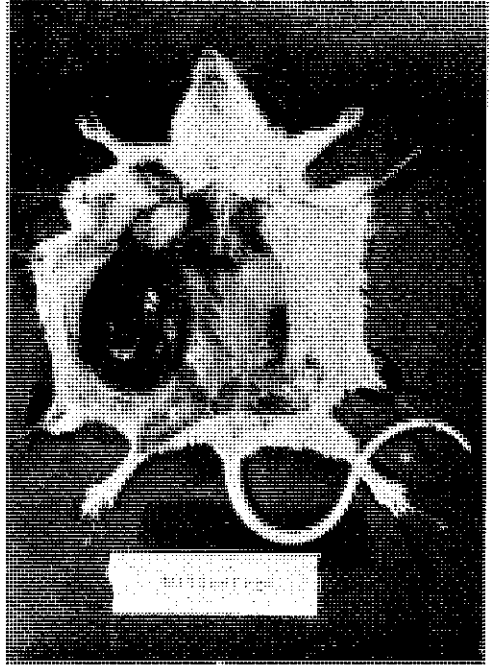


FIG. 2.



FIG. 4.

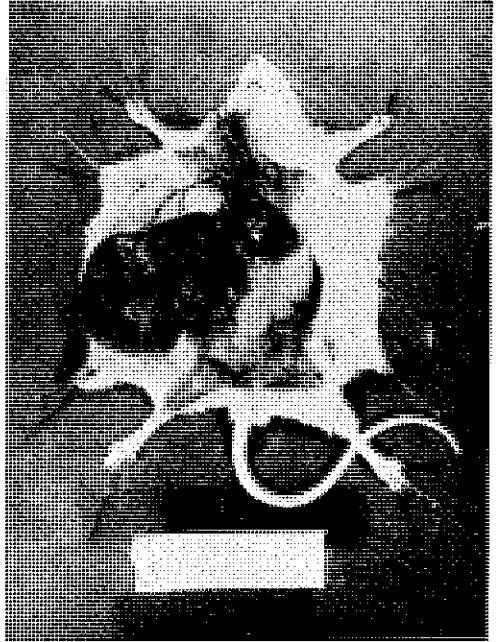


FIG. 3.

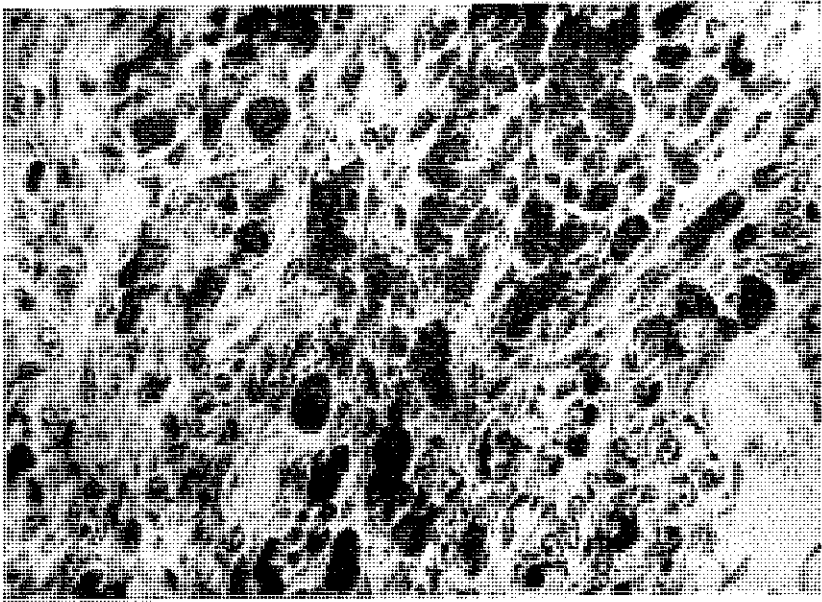


FIG. 5.

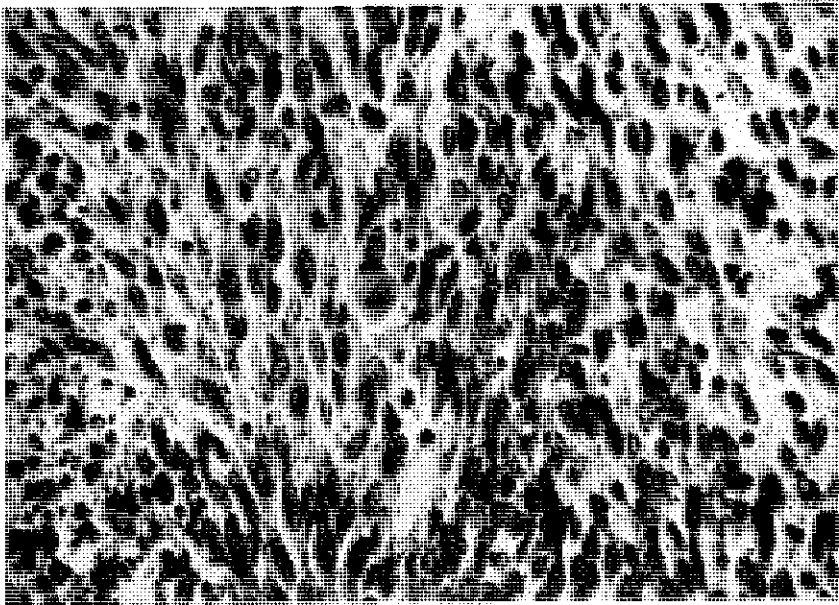


FIG. 6.

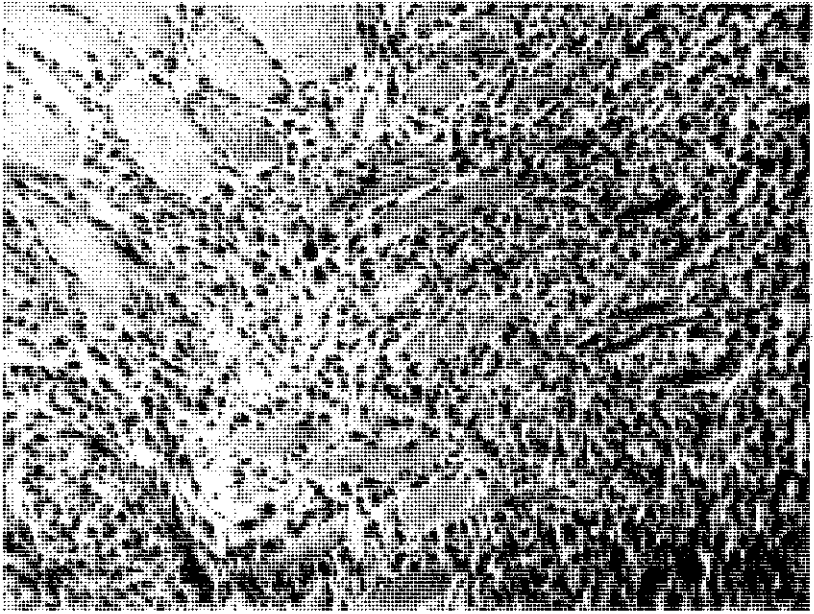


FIG. 7.

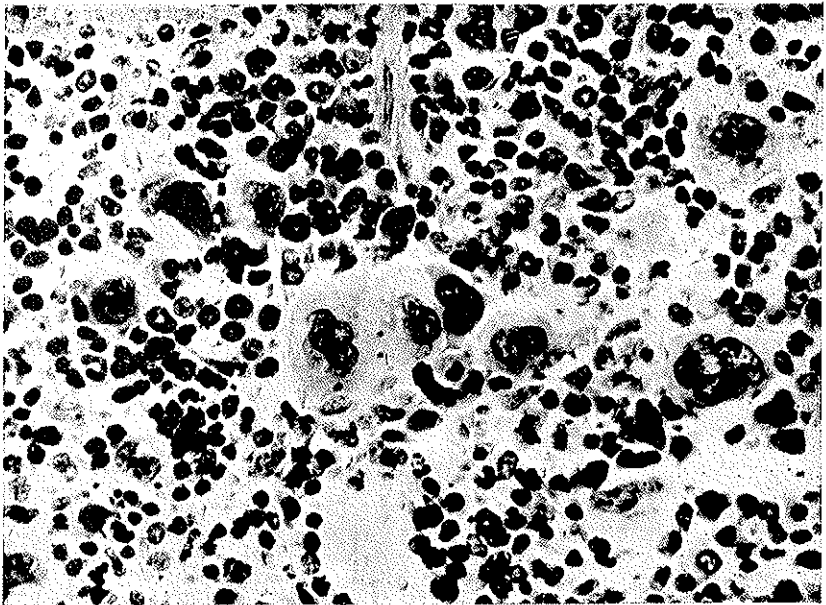


FIG. 8.

Como se comprende, esta cifra en si tiene poco valor dado al reducido material estadístico sobre que se apoya. Por otra parte es posible existen diferencias raciales entre los dos lotes de animales ensayados y acaso también diferencias dietéticas.

La naturaleza sarcomatosa del tumor es indudable, pero hay que señalar y recalcar la ausencia sistemática de metastasis; es decir, algo muy distinto de lo que nos tienen habituados los sarcomas de la clínica humana. Todo lo cual confiere un aparente aspecto de benignidad a este tumor, no obstante ser histológicamente maligno y conducir a la muerte en un plazo de 1 a 2 meses. No son frecuentes los casos de reabsorción del tumor y desde luego esta no tiene lugar cuando el tumor ha alcanzado ya el tamaño de una avellana, es decir cuando el crecimiento ha iniciado una segura marcha ascendente.

Sigue en pie para este tumor, como para todos los sarcomas, el problema de la naturaleza de las células que lo determinan, si de las conectivas fijas o de las emigrantes. De intento no entramos en consideraciones sobre este extremo.

Señalamos, por que este hecho nos ha llamado poderosamente la atención, que el sarcoma originado por el Estiril 430 determina una intensa hiperplasia de los sistemas reticular y linfoide, particularmente del primero, dando origen a numerosísimas células gigantes multinucleadas a nivel de las estructuras reticulares del bazo y que esta hiperplasia no tiene relación con el agresivo Estiril 430 ni con una eventual infección concomitante del tumor.

En líneas generales, la capacidad de colonización del injerto de tumor oscila entre el 30 y el 95 %, según los distintos países. Sobre este punto tenemos la impresión de que este % depende mucho del estado de vitalidad del tumor matriz utilizado en el injerto; en general nos parece mas fértil la zona periférica del tumor y de ellos los que no han alcanzado un desarrollo máximo; sin embargo también nos han prendido injertos realizados con material necrótico e infectado, de donde se infiere que la capacidad de colonización es grande.

(*) J. IBALL, denomina *índice carcinogénico* al resultante de multiplicar el % de tumores obtenidos en un lote de animales (A) por 100 y dividiendo el total por el periodo medio de latencia (B), es decir:
$$\frac{A \times 100}{B} = X.$$

BIBLIOGRAFIA

1. E. BOYLAND and H. BURROWS, *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 41, 231, 1935.
2. D. M. BROWN. Citato por A. HADDOW y G. A. R. KON, *Química de los compuestos carcinogénicos*. *Bol. Méd. Brit.*, 4, 334, 1947.
3. C. H. BROWNING, J. B. COHEN, K. E. COOPER, S. ELLINGWORTH and R. GULBRANSEN, *Proc. Roy. Soc., B*, 113, 300, 1933.
4. C. H. BROWNING and R. GULBRANSEN, *The Jour. of path. and Bact.*, 39, 75, 1934.
5. C. H. BROWNING, R. GULBRANSEN and J. S. F. NIVEN, *The Jour. of Path. and Bact.*, 42, 155, 1936.
6. J. IBALL, *Amer. Jour of cancer*, 35, 188, 1939.

S U M A R I O

Se logra producir sarcoma en el raton por una sola inyección subcutanea. El sarcoma primero apareció a los 7 meses y solo en uno de los 20 ratones inoculados.

Histológicamente se aprecia una formación lacunar central de intenso color rojo oscuro en la que se distingue el Estiril y no estructuras celulares. Alrededor de esta zona hay una banda de gran actividad celular. Numerosas células conectivas aparecen cargadas de pigmento. Hay moderada infiltración leucocitaria y los fenómenos de exudación son minimos.

Cuando se desarrolla el tumor se comprueba un tumor macizo, de intenso color rojo vinoso y poco adherido a piel y planos profundos. Histológicamente se trata de un sarcoma.

Un hecho que consideramos importante es que las células blastomatosas no se cargan de pigmento de Estiril 430.

El tumor aparece envuelto por una delgada capsula fibro conectiva en la zona que limita con la piel en tanto que la profunda es infiltrante.

Un dato interesante es la hiperplasia del bazo y de los foliculos linfoides traducida en la aparición de un gran número de células gigantes multinucleadas.

En ningun caso hemos observado la formación de metastasis.

En total se han realizado 21 pases.

R É S U M É

On réussit à produire un sarcome chez les rats par une seule administration sous-cutanée. Le sarcome primitif apparut après 7 mois, chez un seul animal sur 20. Histologiquement on remarque une formation lacunaire centrale d'une couleur rouge sombre dans laquelle on peut distinguer le styril, sans aucune structure cellulaire. Tout autour de cette masse centrale il y a une couche de grande activité cellulaire: beaucoup de cellules connectivales sont chargées de pigment. Il y a une modeste infiltration

leucocitaire; les phénomènes d'exsudation sont très limités. La tumeur apparaît compacte, d'une couleur rouge-vin et peu adhérente à la peau et aux couches profondes; elle a tout à fait la structure d'un sarcome.

On peut considérer comme bien important le fait que les cellules tumorales ne se chargent pas de styryl-pigment. La tumeur est enveloppée par une capsule connectivale délicate dans la partie tournée envers la peau tandis qu'elle est infiltrante dans la partie profonde.

On doit remarquer la hyperplasie de la rate et des follicules lymphatiques, exprimée par une grande quantité de cellules géantes plurinucléaires. Nous n'avons jamais observé des métastases. On a fait jusqu'ici 21 passages.

S U M M A R Y

A sarcoma may be produced in rats with a single subcut injection of styryl 430. The first tumour appeared 7 months after the injection, only in one animal (out of 20).

The histological examination shows a central reticular formation, dark red in colour, containing the injected compound and no cellular structure. All around this central patch a layer with an high cellular activity is seen; many connective cells appear loaded with pigment; a moderate leucocytic infiltration is present; the exudation is very scanty. The tumour is rather coarse, wine-red in colour, scarcely adherent to the skin and to the deeper layers: it is quite sarcomatous in character.

Whe might stress the fact, that tumour cells never are loaded with Styryl-pigment. The tumour is limited by a thin connective capsule against the skin, while the deep part of it is infiltrating. The hyperplastic changes of spleen and lymph-nodes are noteworthy; they are expressed by a great number of multinucleated giant cells.

Metastasis were never observed. Hitherto 21 transplants (passages) were made.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine einzelne subkutane Injektion vom Styryl 430 führt bei der Ratte nach 7 Monaten (in einem einzelnen Fall nach 20 Monaten) zu Entstehung eines Sarkoms. Bei der histologischen Untersuchung findet man in einem

zentralen Hohlraum das Styryl, sowie lebhaft zelluläre Veränderungen in dessen Umgebung. Zahlreiche Bindegewebszellen sind mit Pigment beladen. Es findet sich eine mässige leukozytäre Infiltration. Der Tumor hat das Aussehen eines Sarkoms. Der Tumor ist von einer zarten Bindegewebekapsel umgeben, Milz und Lymphdrüsen weisen eine Hyperplasie mit zahlreichen Riesenzellen auf. Metastasen gelangten nicht zur Beobachtung.

S O M M A R I O

Si riesce a produrre nel ratto un sarcoma con una sola iniezione sottocutanea. Il sarcoma primitivo appare dopo 7 mesi in un sol ratto su 20 iniettati. Istologicamente si apprezza una formazione lacunare centrale di colore rosso scuro intenso in cui si distingue lo Styryl, senza alcuna struttura cellulare. All'intorno di questa massa centrale c'è uno strato con intensa attività cellulare. Numerose cellule connettive appaiono cariche di pigmento, si ha modica infiltrazione leucocitaria, scarsissimi fenomeni esudativi. Il tumore è compatto, di intenso colore rosso vinoso e poco aderente alla pelle ed ai piani profondi. Ha struttura del tutto sarcomatosa.

Ci sembra importante il fatto che le cellule sarcomatose non sono cariche di pigmento Styryl. Il tumore appare avvolto da una capsula sottile connettivale verso la pelle, mentre la parte profonda è infiltrante.

E' interessante la iperplasia della milza e dei linfonodi, espressa dalla comparsa di un gran numero di cellule giganti polinucleate.

Mai furono osservate metastasi. Sono stati eseguiti complessivamente 21 passaggi.

DISCUSSION:

PEACOCK asks whether the results obtained are alike which BROWNING obtained.

SANZ IBÁÑEZ contesta que efectivamente el tipo de tumor es igual y encontramos diferencias en lo que se refiere al tanto por ciento de aparición del mismo.

COWDRY asks whether the histologic pattern is the same through the passages (trasplantations).

SANZ IBÁÑEZ contesta que durante todos, los pases se conserva el mismo tipo histológico de sarcoma.

ACTIONS OF NORMAL AND SARCOMATOUS SERA ON TUMOUR CELLS

HANS VON EULER (STOCKHOLM)

The study of the reactions between sera and organs, tissues or isolated cells touches problems of general and principal importance, not only for the understanding of cancer growth but also for serology and immunology.

I. AMINO ACIDS IN NORMAL AND SARCOMATOUS BLOOD⁽¹⁾

Many authors have investigated these reactions especially in connection with attempts to elaborate a method for an early cancer diagnosis. However, from the diagnostic point of view these attempts have not been successful. Firstly the analytical base for comparisons between the chemical composition of normal and pathological sera has been too weak. Secondly our experiences on the constancy or variability of the serum constituents under different conditions are not yet so complete, as to allow a certain distinction between normal and pathological serum.

The statement of qualitative differences between both groups of tissues implies the possible existence of a specific and characteristic change in the amino-acid pattern of the serum, a change connected with the appearing of some new protein or amino acid, not existing in the normal proteins.

Quantitative differences in protein metabolism have been observed and measured by many authors, but only in a few investiga-

⁽¹⁾ VON EULER and LEO HELLER, Sv. Vet. Akad. Archiv f. Kemi, 24 B, N. 10 (1947).

tions the amino-acid content of the proteins was taken into consideration. Thus it was possible, that essential particularities would exist in some protein fractions of the tumour tissues, and it seemed desirable to compare the quantitative pattern of free amino acids of normal and cancerous blood by new experiments.

The total amount of amino acids was determined by the ninhydrine reaction, as described by D. D. VAN SLYKE and DILLON⁽¹⁾ and modified by MCFADYEN⁽²⁾.

Using the titrimetric form of this method, indicated by CHRISTENSEN et al. (J. Biol. Chem. 132 and 137) we obtained the following values:

TABLE I.

Normal Rats No	Amino-N mg %	Sarcomatous Rats No	Amino-N mg %
N 23	7,75	SJ 22	4,49
N 25	6,95	SJ 23	5,99
N 26	6,55	SJ 24	5,12
N 28	6,92	SJ 25	6,44
N 29	6,71	SJ 32	6,33
Average	6,98	Average	5,49

All rats were of the same age and had lived under the same nutritional conditions.

Our result, that the plasma of sarcomatous rats contains about 20% less amino acids than the plasma of the normal animals is not caused by all amino acids in the same proportion; each amino acid contributes to this value in a different rate. We know e. g. from EDLBACHER⁽³⁾ investigations that the arginine — and arginase —

(1) D. D. VAN SLYKE a. DILLON, Proc. Soc. exp. Biol. a. Med., 34, 362 (1936).

(2) D. A. MCFADYEN, J. Biol. Chem., 145, 387 (1942).

(3) EDLBACHER u. Mitarb., Z. physiol. Chem., 260, 182 (1939). — 171, 252 (1927). — BACH, Biochem. J., 34, 310 (1940).

content differ essentially in cancerous and in normal tissues. This result, previously obtained for arginine, seemed to justify further studies in this direction. Determinations of free arginine and histidine in the blood of normal and of sarcomatous rats demonstrated a marked decrease in their concentrations. In the following table our values obtained for histidine (*) are recorded.

TABLE II. — *Free Histidine in Serum of Normal Rats*

Rat No	Age Weeks	Sex	Body Weight	Histidine in Serum mg % α -Amino-N
N 41	10	Male	120 g	0,18
N 42	12	Female	123	0,15
N 43	14	Male	170	0,16
N 44	22	Male	265	0,15
N 45	15	Female	150	0,14
Average				0,156 mg %

TABLE III. — *Free Histidine in serum of Jense sarcoma-Rats*

Rat Nr.	Age Weeks	Sex	Body-weight g	Sarcoma weight g	Days after Implant.	Appearance of the Sarcoma	Histidine in Serum mg % α -Amino N
8052	12	Male	150	31	27	Big necroses	0,09
8507	12	Male	141	22	27	Necroses	0,11
8527	14	Male	140	19	22	Necroses	0,12
8553	13	Female	102	5	16	Vesly small necroses	0,09
8556	12	Female	140	6	16	Very big necroses	0,11
Average							0,104 mg %

(*) VON EULER U. L. HELLER, Sv.Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 25 A., N. 16 (1947).

Histidine, though definitely lowered in the serum of sarcomatous rats showed nearly normal values in human cancerous blood. This apparent discrepancy probably depends on the circumstance, that the human tumour as a rule only constitutes a very little part

TABLE IV. — *Free Alanine in the Blood of Normal Rats.*

Sex	Age Month	Body Weight gms	α -Alanine in Blood γ in 1 c.c.
Female	4 $\frac{1}{2}$		125
Male	6		128
Male	2 $\frac{1}{2}$	90	126
Female	13	260	119
Male	13	310	82
Female	4	140	108
Female	4 $\frac{1}{2}$	140	116
Female	3	130	123
Female	3	128	101
Female	3	130	144
Male	6	140	186
Average			123 γ \pm 17 γ
Free Alanine in the Blood of Sarcomatous Rats:			
No distinct secondary changes in the tumours Average 102 γ \pm 18 γ			
Tumours with appreciable necroses » 90 γ \pm 23 γ			

of the whole organism; its influence must therefore be less than in the case of the relatively much bigger Jensensarcoma of the rat.

The amino acids α -alanine and glycine are in the serum of the sarcomatous rats slightly less concentrated than in the serum of normal rats. The decrease of free α -alanine (†) appears to be more marked in primary benzpyrene tumour than in Jensensarcoma.

(†) VON EULER u. L. HELLER, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 25 A, N. 22 (1948).

Table IV shows the individual variations of the alanine content of the blood. No correlations between these values and the age, the sex or the body weight of the animals could be stated.

S. BALAKRISHNA RAO and L. HELLER⁽¹⁾ found a slight and statistically not well ascertained decrease in the arithmetical mean of the individual glycine blood levels of sarcomatous rats, which were free of secondary changes in the tumours. Necrosis, infection and hemorrhage in the tumour seem to heighten the blood glycine level.

The disappearance of the amine acids from the sarcomatous blood may be caused by the consumption of these substances by the tumour, if this consumption is not compensated at a sufficient rate by an enzymatic regulation of their metabolism.

E. FREUND and KAMINER⁽²⁾, who in 1910 presented a new method for cancer diagnosis at the Vienna Medical Society, summarized their results in 2 statements:

A) The serum of non carcinomatous individuals destroys carcinoma cells, but leaves the organ cells of both carcinomatous and non-carcinomatous individuals unchanged.

B) The serum of carcinomatous individuals does not destroy carcinomatous cells, but leaves the organ cells of both carcinomatous and non-carcinomatous individuals unchanged.

In our first reexamination⁽³⁾ we used not the original method of FREUND but we carried out our experiments in accordance with WILLHEIM and STERN (cytolysis correlated with the increase of lipoids): Aceton extracts of rat liver tissue were dried, ground and extracted with ether and (after centrifuging) with alcohol. The same quantity of lipoid extract (containing 0.7-1.9 mg dry residue) was added to all test tubes, which were evaporated. Increasing volumes of serum were then added to each series of experiments. After incu-

(1) BALAKRISHNA RAO and L. HELLER, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, 25 B, N. 9 (1948).

(2) E. FREUND and G. KAMINER, Wien. klin. Wochenschr., 1910, N. 10; Biochem. Z. 26, 312 (1910); E. FREUND, Metabolic Therapy of Cancer, London, D. GODWIN. Translated by L. WOLFE.

(3) VON EULER, L. HELLER and CHR. CURMAN, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, 1, N. 8 (1949).

bation 37°, 18 hours) the solutions were filtered and determined either colorimetrically in a photometer or by an interferometric method.

Working in this way we found no indication for the existence of regular and reproducible differences between the action of normal and cancerous sera on lipid extracts of tumours.

FREUND (l. c.) carried out his experiments in the following manner: He incubated a suspension of tumour cells with normal serum at 40° for 24 hrs. and counted then the destroyed cells in a Thoma-Zeiss hemocytometer. Several authors emphasized the difficulty of obtaining by this method exact values for the destroyed cells, and they therefore considered that an «objectivation» of the Freund-Kaminer reaction is necessary.

2a. COMPARISON OF THE CARYOLYTIC EFFECT OF NORMAL AND CANCEROUS SERA BY INCUBATION OF FIXED TUMOUR CELLS.

As also our own experiences made the difficulties of FREUND's counting method evident, we wished to elaborate a technique which would allow to detect and to measure more detailed effects of the caryolytic serum actions. We used a method⁽¹⁾ which is in some respect connected with experiments described by HIRSCHFELD⁽²⁾.

Cell preparations of Jensesarcoma and of mice-ascytes carcinoma were suspended, washed with Ringer solution⁽³⁾ and then used for smearpreparations which were treated in two different ways: One part of these preparations was fixed with methanol, an other part was heated in a Bunsen-flame. By the fixation in methanol the cells were prepared for a panoptical staining according to PAPPENHEIM (combined staining May-Giemsa). The preparations treated by heating were designed for staining according to FEULGEN.

The fixed and dried smears were covered with the serum or in their middle part with a control solution and incubated for 3 or 6

(1) VON EULER, L. HELLER u. CHR. CURMAN, Sv. Vet. Akad. Archiv f. Kemi 1, 44 (1949).

(2) A. HIRSCHFELD, Arch. de l'Inst. Prophyl. 8, 207 (1936).

(3) For the purpose to eliminate protecting substances from the ascites liquor.

hrs at 37° in PETRI dishes under steril conditions. After this incubation the preparations were washed with water and stained (the cells fixed by heating were kept before staining for 24 hrs in 96 per cent alcohol). For controlling observations we used the outer parts of the smears, which had not been covered with the serum.

The incubation had striking effects only on the cells which after heating were stained according to FEULGEN: In the case of these cells the FEULGEN reagent produced no colour, which indicates that the desoxyribonucleic acid was changed or destroyed by serum enzymes. This caryolytic effect of the rat serum is independent of its normal or sarcomatous character. Thus the activity of the serum enzymes, which destroy the desoxyribonucleic acid of the heated cells, seems to be identical or nearly identical in normal and in cancerous serum.

The cells fixed with methanol were very little altered by the incubation, the May-Giemsa staining was less distinct, more pale.

2b. ENZYMATIC DEPHOSPHORYLATION OF NUCLEOPROTEINS BY NORMAL AND BY SARCOMATOUS RAT SERUM.

In addition to the result obtained on Feulgen-stained tumour-cells it may be of interest to mention some data from an earlier investigation⁽¹⁾ concerning the nucleophosphatatic action of normal and of sarcomatous rat serum on nucleoproteins.

The determination of the nucleophosphatase action was carried out according to methods used by P. RONDONI⁽²⁾ in his important studies on nucleoproteins in tumours. In the first part of our investigation it is shown, that we could not find any regular differences between the action of any rat serum on desoxyribonucleoprotein, whether it was isolated from Jensensarcoma or from a normal rat liver: I must therefore confine myself to mention the second part of our enzymatic experiments: Our values already published and supplementary values (H. HASSELQUIST, B. EK, W. SOLODKOWSKA

(1) VON EULER, L. AHLSTRÖM u. H. HASSELQUIST, Sv. Kem. Tidskr. 56, 293 (1944).

(2) P. RONDONI, Z. physiol. Chem. 265, 102 (1940); Schweiz. med. Woch. 71, 31 (1941); Il Cancro, Milano 1946, pag. 443-444.

not yet published) show that desoxyribonucleoproteins from normal rat liver is dephosphorylated faster by normal rat serum than by sarcomatous serum (the ratio of hydrolysed PO_4 in 18 hrs. being 1:0.38). I am inclined to consider this result as the effect of an inhibitor contained in the sarcomatous serum.

The existance of (not specific) inhibitors in phosphatase preparations from calf intestines has been stated by EULER and FONÓ⁽¹⁾ Such nucleophosphatase preparations are complex enzyme systems. By auto-digestion of a nucleophosphatase preparation and elimination of the inhibitor by dialysis we could show the interaction of a nucleinase and a phosphomono-esterase⁽²⁾ in these phosphatase complexes. We were not yet able to realize the differentiation of the nucleinase and the phospho-mono-esterase in nuclei and cytoplasm from normal and cancerous tissues. But recently some experiments were carried out in this institute concerning the esterase activity of mitochondria from the cytoplasm of rat liver HELLER and N. BARGONI⁽³⁾ which may be described in this connection.

3. PRELIMINARY EXPERIMENTS WITH ISOLATED LIVER MITOCHONDRIA

It was our purpose in this investigation to determine the average nitrogen content and relative enzyme activity of a single isolated mitochondria. For this attempt it was of course necessary to elaborate a technique for counting the mitochondria, implying an at least temporary stabilisation of those extremely unstable biological units, as well as making them visible and avoiding their eventual agglutination.

The method of isolating the liver mitochondria described by HOGEBOOM, SCHNEIDER and PALADE⁽⁴⁾ was found to perfectly satisfy our requirements. Samples of suspensions of liver mitochondria prepared in 30 per cent sucrose solution, when fixed with osmium tetroxide, yielded relatively polymorphic particles, morphologically

(1) VON EULER u. A. FONÓ, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, 25 A, N. 24 (1948).

(2) The activity of the preparatus was also proved with desoxyribonucleoprotein as substrate.

(3) L. HELLER and N. BARGONI, Arkiv. f. Kemi 1, 57 (1949).

(4) G. H. HOGEBOOM, W. C. SCHNEIDER and G. E. PALADE, J. Biol. Chem. 172, 619 (1947).

identical with the intracellular mitochondria of the vitally stained liver tissue. These particles were found sufficiently stable to stand the procedure of counting in a Petroff-Hausser counting chamber.

Freshly prepared and diluted solutions of crystal violet (mitochondria stain of Benda ⁽¹⁾), when buffered to pH=7.6, constitute a suitable stain which colored the osmium-fixed mitochondria without agglutinating them.

The mitochondria, when examined in the Petroff-Hausser counting chamber, seemed to have a lower density than most of the bacteria, because they did not settle to the bottom of the chamber on standing, as reported for the bacteria. This in connection with the relatively vivid Brownian movements of the mitochondria, rendered their counting somewhat more difficult than that of the bacteria. It was therefore necessary to use more dilute suspensions, which were easier to control optically.

The results of our preliminary counting experiments are summarized in a recent publication (in print).

The average number of mitochondria per gm fresh liver tissue was found to be

$$5.1 \cdot 10^{10} .$$

The nitrogen content of a single mitochondrion is

$$1.7 \cdot 10^{-7} \gamma .$$

The average catalase activity as found to be

$$1.46 \cdot 10^{-10} \text{ k/mitochondrion,}$$

The average butyric esterase activity was found (L. HELLER and N. BARGONI ⁽²⁾) to be

$$6.0 \cdot 10^{-10}$$

⁽¹⁾ B. ROMBEIS, Taschenbuch d. mikroskop. Technik. München-Berlin 1943.

⁽²⁾ The size and number of mitochondria from a certain type of cells (in particular the liver cells) show a considerable variability when evaluated qualitatively on the basis of the cytological picture, according to the momentary physiological condition of the animal at the time it is killed.

The relative values of the esterase activity and the N-content of 1 mitochondrion show a striking parallelism. Such parallelism may be accounted for by the assumption that the amount of enzyme in a mitochondrion is approximately direct proportional to the mass of the latter. This would mean a constant activity per unit of the mitochondrial mass.

Summarizing our results concerning the activity of several enzymes contained in the serum of normal and of sarcomatous rats, we conclude, that no essential differences exist in this respect between these sera. That means, — as far as normal and cancerous sera and tissues are concerned — that eventual differences between the influence of homologous and heterologous sera on tumour tissues are not caused by enzymes, at least *not by enzymes of the mentioned type*, possibly by activating or inhibiting components of enzyme systems.

4. HOMOLOGOUS AND HETEROLOGOUS SYSTEMS

The problem of heterology is one of the most important and interesting in the field of serology. Nearly all serological publications, treating the action of a serum on cells of an other evolutionary origin, are concentrated on the reactions of various sera with heterologous erythrocytes or with fractions of blood proteins; the study of the reaction of heterologous sera *with cells from various organs* have been practically neglected. This circumstance is probably caused by the technical difficulties to isolate and identify cells and cell constituents. Apart from the numerous publications of FREUND and his school there are very few statements concerning the behaviour of organ cells incubated in blood serum.

As it was mentioned above, we never were able to state any influence of heterology concerning the action of normal and cancerous sera on tumour cells. But in an other group of phenomena the different behaviour of homologous and heterologous systems is

generally known and often discussed, namely in the group of *transplantation processes*. In these processes, which are determined by the resistance of the organs against inoculation of normal or cancerous tissues from foreign species, the phenomenon of heterology seems to appear very distinctly.

The susceptibility of animals to tumour growth can be changed by a preceding treatment with foreign normal tissues or with drugs. As E. V. COWDRY (1) has emphasized the susceptibility of every cell is a matter of heredity and is directly dependent upon other cells associated with it. In the first stage of implantation one observes enzyme actions connected with infiltrations of the inoculated tissue. This temporary growth is followed by a regress of the transplanted tumour. Its subsequent fate is in the main influenced by *inhibiting and growth promoting factors*.

Heterologous transplantations. — In the course of our investigations we wished to collect own experiences concerning the limits of resistance to foreign tissues. All our transplantations of the type described by PUTNOKY (2) (from rats to mice) ended with failure. Even when rat brain was used as substrate (host tissue) directly through the perforated rat cranium transplanted carcinoma tissues from human brain failed to grow, whilst corresponding implantations of Jensen-sarcoma and of benzpyrene sarcoma in the rat brain always were successful (3).

We had adopted as working hypothesis, that the processes of implantation of a cancerous tissue in a normal host are essentially determined by the actions of tumour-activating and growth-inhibiting factors, which firstly initiate the histological contact between the host and the inoculated tissue, secondly activate the development of the implanted tumour.

About 10 years ago we wished to decide, whether or not differences exist between Jensensarcoma and benzpyrene sarcoma concerning the factors mentioned above, and whether or not these two types of sarcoma behave as heterologous tissues.

(1) E. V. COWDRY, Textbook of Histology, 3rd ed. Philadelphia 1944.

(2) FR. J. PUTNOKY, Z. f. Krebsforsch., 23, 520 (1930).

(3) FR. SOAVE, Private communication Arkiv. f. Kemi, 1 n. 57 (1950).

Series A and B. 18 implantations of 12- 40 mg finely divided and cooled or frozen benzpyrene sarcomas were inoculated into Jensen sarcomas with the results recorded in the following table.

TABLE V.

Ser. No	Number of rats	E F F E C T
A ₁	3	Died 3-6 days after transplantation
A ₂	3	Jensen (host) tissue grew 12, 13, 16 days resp. Then the rats were killed. Transplant showed no survival; big necroses in the Jensen sarcoma
A ₃	5	Jensen (host) tissue regressed { 2 mutual infiltrations 3 benzpyrene sarcoma dead
B	7	Jensen (host) tissue unchanged { 1 benzpyrene sarcoma grew 6 benzpyrene sarcomas undeveloped (dead)

In a recent series C small pieces (10-20 mg) of Jensen sarcomas were transplanted to benzpyrene sarcomas (6-12 g). The effects of these transplantations are histologically not yet cleared. Several of the transplanted sarcomas *grew*, but *without distinct infiltration* in the host tissue and apparently separated from it.

The enzyme activities of our Jensen sarcomas and our benzpyrene sarcomas were compared concerning alkaline phosphatase, catalase, succino-dehydrogenase and lacto-dehydrogenase. We found the activities in our Jensen sarcomas 10-25 % higher than in our benzpyrene sarcomas. But as the activities vary with the age of the animal and with the age and the volume (weight) of the sarcoma our results can not be regarded as significantives.

3 rats of Ser. A₃ (Table V) were decapitated 14 days after the implantation of the benzpyrene sarcomas. The blood was used for determinations of the pyruvic acid (PA) content (1) As it was stated

(1) We used the method described by D. G. LU, Biochem. J., 33, 249 (1939). Modification by VON EULER and B. HÖGGERG, Sv. Vet. Archiv f. Kemi, 13B, N. 16 (1939).

by many investigations from this laboratory⁽¹⁾ the PA-content of the blood of sarcoma bearing rats is 200-400 % higher than that of normal rats; it is dependent on the weight of the sarcoma and could be expected to be 30 γ PA/ ccm blood. The mean values of PA determined in 1 ccm blood were:

Mean value in normal rat blood	13 γ PA/ ccm
Mean value in blood of rats with sarcoma 13.5g	30 γ
Mean value in blood of 3 rats of Ser. A ₃	18 γ

It is remarkable, that the PA value found in the blood of the 3 rats of Ser. A₃ is *decisively lower than it should be expected according to the mean weight of the sarcoma* (13.5 g). We suppose, that the PA-increasing factor of sarcomas is *inactivated or compensated by the implantation*.

For comparison we carried out 2 series of experiments, in which 20 Jensen sarcoma bearing rats were inoculated with suspensions of 5 mgs of liver cells from normal rat liver of the same strain. The results was as follows: In 3 rats an infection was stated; in 8 rats of the remaining 17 regression of the sarcoma occurred; in 2 sarcomas the increase of the sarcoma weight was essentially lowered, in 7 animals the Jensen sarcoma grew unaffected by the inoculation.

This result was practically not changed when liver suspension was heated for 30 minutes to 55°.

(1) VON EULER et al., Z. f. Krebsf., 55, 10 (1944).

S U M M A R Y

1. Free Amino Acids and Nucleotides in Rat Serum.
2. Different Enzyme Actions in Normal and Sarcomatous Sera, measured by different Methods.
3. Examinations of Nuclei and Cytoplasm stained after incubation with different Sera.
4. Reactions in heterologous Systems.

R É S U M É

1. Acides aminés libres et nucleotides dans le sérum du rat;
2. Différentes actions enzymatiques dans le sérum normal et sarcomateux, déterminées avec des méthodes différentes;
3. Etude du nucléus et du cytoplasme colorés après incubation avec des serums différents;
4. Réactions dans des systèmes hétérologues.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde das Verhalten freier Aminosäuren und Nukleinsäuren im Serum der Ratte und die verschiedenen Enzymwirkungen im Serum von Normalen und von Sarkomkranken mit verschiedenen Methoden untersucht. Weitere Untersuchungen betrafen das Verhalten der Zellkerne und des Zytoplasmas nach Einwirkung verschiedener Seren. Untersuchungen bezüglich der zytolytischen Substanz der *Freund-Kaminerschen* Reaktion

ergaben keinen Anhaltspunkt für das Vorhandensein gesetzmässiger Unterschiede zwischen der lipolytischen Fähigkeit von normalem und Karzinomserum gegenüber Lipoidextrakt von Tumoren.

S O M M A R I O

1. Aminoacidi liberi e nucleotidi nel siero del ratto;
2. Diverse azioni enzimatiche nel siero normale e sarcomatoso, determinate con diversi metodi;
3. Esame del nucleo e del citoplasma colorati dopo incubazione con diversi sieri;
4. Reazioni in sistemi eterologhi.

DISCUSSION:

COWDRY asks: Was the regression of sarcomata complete?

Von EULER answers: In some cases it was; in others ultimate fate was not determined because sarcoma was removed for microscopic study.

COWDRY asks: Did you try intraocular transplantation?

VON EULER answers: No.

GREENSTEIN asks: What criteria and what pH were used to follow the action of normal and cancerous sera on nucleo-proteins?

VON EULER answers: Generally pH 8.5.

GREENSTEIN asks: Was nucleic acid or nucleoprotein the substrates used for the action of the serum enzymes?

VON EULER answers: Both nucleic acid and nucleoproteins.

KRETZ: Am chemischen Universitätsinstitut in Wien (Prof. MARK) wurden 1936 Untersuchungen zur Aufklärung der chemischen Natur der lytischen Substanzen der Freund-Kaminer'schen Reaktion durchgeführt. Sie hatten ein negatives Ergebnis. Die cytolytische Reaktion ist eine empirische Methode, sie beruht auf Richtigkeit, sie ist jedoch infolge der Labilität der beteiligten Faktoren (Tumorzellen, etc.) für exacte Untersuchungen nicht geeignet.

NATURE OF THE AGENT OF ROUS SARCOMA

PROF. FRANCESCO PENTIMALLI (NAPOLI)

The object of my communication concerns the nature of the agent of chicken sarcoma. Notwithstanding the great attention that this problem deserves, the fervour of study that it once caused has almost died down at the present day, owing may be to the ascertained difficulties it has met with; but the more difficult the problem, the greater claims should it have on the efforts of human intelligence.

The question of nature — be it vital or not — has come to a deadlock from which it is imperative to free it, in order to put it on the right way towards advancing ever further and further.

I continue to doubt today, as I did in the past, as to whether the upholders of living nature are capable of giving proofs of the two properties that every agent must necessarily possess for it to be defined as living, i.e. the power of multiplication of this agent, and its capacity of assimilation in a heterogenous medium. Should you want to admit that the agent is a living one solely in a cellular ambient, owing to a sort of compulsory symbiosis with the cells, you must give proof of this *individual* vitality i.e. of such a one that is connected with the agent as entity, and of the kind of the symbiosis.

On the other hand, the upholders of chemical nature are up against the difficulty of obtaining a purified agent, for the methods of analytical chemistry with which one has tried to gradually purify an extract of sarcoma, have not given sufficient proofs for the identification of the agent. Evidently the extract of a tumour, even after eliminating various fractions by diverse means, still represents too complex a material, and this constitutes the main obstacle which

hinders one from reaching unanimous and satisfactory results, when starting from this material.

In 1935 I reported to the « Leuwenhoek Vereininging » Society in Amsterdam that when a physiological solution is made to circulate through the vases of a tumour, it gets charged with the agent, so much so that when inoculated into a normal animal, it causes a tumour to develop.

This perfusion liquid of a tumour presents the following properties:

1. It contains a protein with a phosphate group, at the average amount of mgr. 0.70 per 100 cc. of liquid.

2. Through spectrographic analysis you can perceive an absorbing band in ultra-violet, round about 2800 Å.

There is no doubt about the fact that a physiological solution, when made to circulate through the tissue of a tumor, becomes loaded with the tumor agent and therefore, inoculated into a normal animal, is able to produce a tumor therein. Former experiments of mine showed that the same phenomenon is to be found when circulating normal erythrocytes in the tumor; they adsorb the agent and not only in their surface; but it is the haemoglobine-molecule itself which proves to contain it. In the case of the physiological solutions circulating, the agent is dissolved however in the liquid of perfusion which, after filtration through Berkefeld V or N gives positive results in about 50%. Several hundred experiments convinced me that the positive result is chiefly due to the quantity of agent in the liquid of perfusion, which, in its turn, depends from the anatomical vessels and biological conditions (integrity of tissue). On the other hand, it is also necessary to consider that the inoculated animal's resistance in the case of such small, absolute quantities of agent, plays a relatively more important part in hindering the development of tumors.

The spectrographic analysis of the liquid of perfusion puts in evidence a band of absorption in the ultraviolet field, at about = 2800 Å — which band is at times masked by other substances which concur in producing the absorption. The more pronounced the band is, the more frequent the positive result of the inoculation of perfusion liquid. Referring solely to the cases in which the band of absorption is more evident, the percentage of positive results of

inoculation of perfusion liquid rises to 75%. Considering from how many other factors the possibility of tumor development can depend, it is clear and justifiable to connect the biological activity of perfusion liquid with the presence and intensity of the band of absorption.

Correspondingly with the spectrographical analysis, the chemical analysis reveals the presence of a protein with a phosphate group, in average quantity of mgr. 0.70 per 100 ccm. of liquid (in the employed experimental conditions). All the possible controls induce one to admit that this protein is specific: the liquid not containing it, is devoid of every biological activity from the point of view of tumor production: the one containing it, in sufficient quantity, is able to produce a tumor.

3. The spectrographic behaviour of this protein shows that we are dealing with a substance of an absorbing intensity three times greater than plasma proteins, and it can therefore not be identified with plasmatic protein.

4. The protein precipitates with sulphate of ammonia at 30% and the perfusion liquid remains inactive.

5. The protein is adsorbed by aluminium hydroxyde.

6. It is hydrolysed and rendered inactive through pancreatin.

7. Its behaviour towards heat is the same as that of common proteins (in a dry state it can resist a temperature of 70° C.).

8. It crystallises into paracrystals, which are infective.

9. The agent is adsorbed by embryonic cells, but not by normal ones.

10. The agent is dialisable in parts.

11. The agent is centrifuged by powerful gravimetric actions, together with the plasma proteins.

12. The agent is adsorbed by haemoglobin whose molecule therefore shows assymetry.

13. The agent becomes enormously active, in its biological properties (capacity of producing a tumour) through minimum concentrations of H C N.

The above mentioned researches on perfusion liquid all concur towards making us suppose that the substance, of a proteic nature, which has been brought about by chemical and spectrographic methods, be endowed with such biological activity as to produce a

sarcoma. But is this protein the very agent of the sarcoma? or might the specificity not be bound to the protein itself but to a highly reactive group that would then constitute the really specific quid, upheld by the protein, which would simply act as a colloidal vector?

The following more precise indications on points 5. 10. & 11. may enlighten us on the subject:

Point 5. — The adsorbment through alluminium hydroxyde of the protein contained in the perfusion liquid divests the liquid of protein and renders it inactive. But in two, out of thirteen experiments the supernatant, which remained perfectly clear after sulphursalicylic acid had been added, showed itself still active.

Point 10. — The dialysis of perfusion liquid shows a decrease of biologic activity, whilst the coagulable azote remains unvaried as to quantity; obviously the dialysis manages to eliminate a certain fraction of the agent which is not bound to the protein.

Point 11. — When a connection is brought about between the different strata of the ultracentrifugation cell of a biologically active blood plasma, through biological test, this reveals that one part of the agent remains in the plasma even after 3 hours of centrifugation at 60.000 revolving turns per minute have sent all the heavy molecules to the botton.

On the strength of these observations it seems justified to assume that in the perfusion liquid as well as in the blood plasma the agent is both free and yet bound to the protein.

On the other hand (point 6) the pancreatin, in hydrolizing the protein, renders its action inactive, which constitutes a new proof of the agent's link to a proteic substance and of its being dependent on the constitution of same. The biological activity of the liquid (i. e. the capacity of its producing a tumour) is therefore principally, but not exclusively, linked to the presence of the proteic substance; it is not a particular property of the protein as such, but a property due to the link that the protein takes on, as vector, towards a molecular group which is endowed with the biological activity of producing a tumour. This active group would then constitute the « agent » in a strictly specific sense; the support or colloidal vector may be a favourable condition (point 5) or also an indispensable one (6).

It is presence of the proteic vector which causes those reactions on account of which a proteic nature is generally ascribed to the agent.

Whether the agent is always by the same colloidal vector, is unknown; but it is more probable that it vary according to the ambient in which the agent lies, i.e. protoplasmatic proteins in the cell, plasma proteins in the blood, (point 11) haemoglobin in red corpuscles, (point 12) etc. and I have even succeeded in transporting it on to the haemoglobin of various species of animals, (rabbits, rats).

In ambients that contain various proteins, the agent may spread in different ways among them, thus causing a state of equilibrium that is regulated according to the laws of adsorbment. Thus, the adsorbment compound resulting here from, through still constituting a proteic molecular edifice, contains the active and specific factor, be it enclosed or simply adsorbed.

The chemical composition of an active group, such as this, is not as yet defined; only by mere assumption can we be led to thinking of it as akin to that of the catepsine, if we wish to take into consideration the observation (point 13) that H C N greatly increases the activity of the sarcoma agent.

After the publication of BERGMANN's works it is a well-known fact that these proteinases not only part in the autolitical-cellular processes, through hydrolitic function, but also that they take part in the processes of proteic synthesis through inverted function. Therefore, if in a system, based on a process of proteic synthesis (new construction of cellular protoplasma) the adding of a chemical substance, such as H C N whose action on the activity of the catepsine is well-known, causes an enormous increase of those proteic synthesis of which the essence of a tumour consists, it is perfectly justifiable to admit that the agent possesses a catepsine constitution, or one that is very much akin to it. The best known function of the catepsines, i.e. the hydrolitic one, does not seem to have great specificity, save for the optimal action on the owns proteins of the organ; this latter function of organisation of the synthetic processes, as BERGMANN says, is, on the contrary, strictly specific.

Hence the ascertained specificity of the action of the agent in a living organism.

One might be led to believe that whereas the cathepsines with hydrolitic function are to be found in all normal cells, as has been known for long, the cathepsines with synthetic function are to be found wherever there be an increase of living substance, as occurs in tumours, and that these be the very cause of the unruly proliferation of the cells. By this we do not wish to affirm that there be a « cancer enzyme ». But it is justifiable to suppose that in the collection of cellular enzymes, which does not — according to Greenstein's studies — undergo changes of any importance during a neoplastic transformation, there be a category of enzymes revealing an inverted function that belongs to enzymes that are akin to cathepsines.

The last question that arises is: whether these enzymes with inverted function are only responsible for the malignity in the special case of chicken sarcoma, whose agent is separable from the cell, or whether their existence may be also admitted in the case of tumour in mammals.

BIBLIOGRAPHIE

- Point 1. Leeuwenhoek-Vereeniging, IV Conférence tenue à Amsterdam, Juin 1935.
- » 2. Tumori, vol. 22, fasc. I, 1936; fasc. IV-V, 1936.
 - » 3. Tumori, vol. 22, fasc. I, 1936.
 - » 4. Rendiconti Accademia d'Italia, serie VII, fasc. 7, vol. I, 1940.
 - » 5. Ib.
 - » 6. Ib.
 - » 7. Settimana medica, vol. 35, 1947.
 - » 8. Ib.
 - » 9. Verhandlugen Deut. Path. Gesell., 1927.
 - » 10. Tumori, vol. 22, fasc. IV-V, 1936.
 - » 11. Acta de l'Union Intern. contre le cancer. Congrès de St. Louis Mo, 1947.
 - » 12. Verhandlungen Deut, Path. Ges. 1934.
 - » 13. Relazione al II° Congresso contro il cancro. Bruxelles, 1936.
La Settimana Medica, vol. 35, 1947.

S U M M A R Y

The subject of my communication regards the nature of the sarcoma agent. This subject has never lost interest even though it seems to be following rather the trend initiated by those who admit a chemical nature of the agent, than the opinion of those who sustain the living nature. The testing material consisting of a sarcomaextract, even though relatively purified, is still a too gross one.

If instead of experimenting with a tumor extract, tumor's perfusion fluid is used, a material as clear as water is obtained, containing the agent, which if not in its pure state, is mixed with a number of other substances, certainly inferior to that contained in the extracts.

This perfusion fluid shows to have a biological activity when injected into normal animals and all my experiments with this fluid suggest that its capacity to give rise to a tumor is due to the presence of a phospho-protein, which has an absorption-intensity three times greater than that of plasma and therefore can not be identified as a plasma protein.

Other experiments show that such a protein is only the colloidal carrier of an actif highly specific group, which should be, strictly speaking, the genuine agent. The chemical constitution of this actif group is not exactly identified, but we may suppose that it is an enzyme similar to cathepsine at least if we must judge by the fact that HCN greatly accelerates its activity. It should be, of course, a cathepsine with inverted function, according to BERGMANN.

R É S U M É

Le sujet de ma communication concerne la nature de l'agent du sarcome. Cet argument n'a jamais perdu d'intérêt, quand même il considère plutôt l'opinion de ceux qui reconnaissent la nature chimique de

l'agent, que l'opinion de ceux qui en admettent la nature vivante. Le matériel de recherche, consistant en un extrait de sarcome, quoique relativement purifié, constitue encore quelque chose de trop grossier.

Si au lieu de travailler avec des extraits de tumeur, on expérimente avec un liquide obtenu par la perfusion de la tumeur, on a un matériel clair comme l'eau qui contient l'agent qui n'est pas à l'état pur, mais il se trouve mélangé à une quantité de substances étrangères certainement pas paragonable à celle contenue dans les extraits de la même tumeur.

Ce liquide de perfusion explique probablement une action biologique lorsqu'on l'administre à des animaux normaux et après les expériences avec ce liquide même on retient que sa capacité à produire une tumeur est due à la présence d'une protéine phosphorée qui a une intensité d'absorption trois fois supérieure à celle des protéines plasmatiques. Par conséquent on ne peut pas l'identifier avec ces protéines.

On démontre avec d'autres expériences que la protéine phosphorée représente seulement le vecteur colloïdal d'un groupement actif qui est très spécifique et qui serait le vrai agent. La constitution chimique de ce groupement actif n'a pas encore été identifiée avec exactitude mais on pourrait supposer qu'il s'agit d'un enzyme comparable à une cathepsine, tout en considérant que l'HCN accélère beaucoup son activité.

Il devrait s'agir naturellement d'une cathepsine ayant une fonction invertie, selon BERGMANN.

ZUSAMMENFASSUNG

In Fortführung früherer Untersuchungen gewann Verfasser einen Sarkomextrakt, der gegenüber den sonst gewonnenen und gereinigten wasserklaren Extrakten ein trübes Aussehen hatte und Fettsubstanzen enthielt. Mit diesem Extrakt gelang es, Tumoren zu erzeugen. Verfasser glaubt, dass die Tumorentstehung durch die Anwesenheit einer Phosphatase bedingt ist, die jedoch lediglich ein Träger einer biologisch sehr aktiven und streng spezifischen Substanz zu sein scheint, welche das

wirkliche Sarkomagens darstellt. Die genaue chemische Formel dieses Agens konnte noch nicht festgestellt werden. Verfasser nimmt ein Enzym ähnlich dem Katepsin an.

S O M M A R I O

L'oggetto della mia comunicazione riguarda la natura dell'agente del sarcoma. Questo argomento non ha mai perduto d'interesse, anche se fu avviato in una strada che non spunta tanto da coloro che vogliono riconoscere la natura chimica. Il materiale di esperimento, costituito da un estratto di sarcoma, anche se relativamente purificato, costituisce ancora un materiale troppo grossolano.

Se invece di sperimentare con estratti di tumore, si sperimenta con liquido di perfusione di un tumore, si ha un materiale, limpido come acqua, che contiene l'agente, se non allo stato puro, accompagnato da una quantità di sostanze di certo non paragonabile a quella degli estratti.

Questo liquido di perfusione si dimostra biologicamente attivo se inoculato in un animale normale e tutti gli esperimenti da me fatti con esso, inducono a ritenere che la sua capacità di produrre un tumore sia dovuta alla presenza di una sostanza proteica fosforata, che ha una intensità di assorbimento tre volte maggiore di quella del plasma, e perciò non può essere identificata come proteina plasmatica.

Con altri esperimenti si può dimostrare che tale proteina è soltanto il vettore colloidale di un gruppo attivo, altamente specifico, che sarebbe il vero agente in senso stretto. La costituzione chimica di questo gruppo attivo non è definita; ma si potrebbe supporre che si tratti di un fermento simile alle catepsine, almeno a giudicare dal fatto che l'HCN lo attiva straordinariamente. Si tratterebbe, naturalmente, di una catepsina, a funzione invertita, secondo BERGMANN.

DISCUSSION:

COWDRY asked how great was the increase obtained when H C N was added to transfusate in tumour production. PENTIMALLI answered that perfusate + HCN gave tumours when the same perfusate without HCN did not.

GREENSTEIN: In order to prove that the virus agent had catheptic activity in the presence of HCN, was the agent ever inoculated with denatured protein and the digestion followed?

PENTIMALLI answers: In order to give clear evidence, experiments of this kind have to be carried out with a highly purified agent. This is at present not yet possible.

GREENSTEIN: Is the hemoglobin-virus combination more active than the virus alone?

PENTIMALLI answers: No.

SANZ IBÁÑEZ pregunta a PENTIMALLI como hace la demostración que que el agente es adsorbido por la célula embrionaria y no por la normal y que influencia tiene el pH en la prueba.

PENTIMALLI risponde: Questa dimostrazione è stata data da me con prove di adsorbimento dell'agente su cellule adulte e su cellule embrionali, e solo in quest'ultimo caso si è avuto risultato positivo.

SANZ IBÁÑEZ pregunta a PENTIMALLI si la hemoglobina para la adsorción es hemoglobina substancia o la de los eritrocitos.

PENTIMALLI risponde: L'agente viene adsorbito dagli eritrociti, ma io credo anche dalle molecole dell'emoglobina, sulla base di ricerche spettrografiche e di ultracentrifugazione.

MAISIN: Avez-vous fait des dosages par dilutions successives pour montrer que l'HCN reactive l'agent de Rous?

PENTIMALLI répond: J'ai fait de telles dosages avec résultat positif.

MAISIN: Avez-vous étudié la teneur de votre liquide de perfusion en acide ribonucleique?

L'acide ribonucleique pathologique présent à l'état de traces ne pourrait-il être rendu responsable de l'apparition des tumeurs dans le liquide de perfusion?

PENTIMALLI répond: Il est trop tôt d'attribuer la propriété infective à l'acide nucléique (de tous les deux types). Ce point fondamental pourra être établi seulement quand on aura à disposition l'agent hautement purifié, de façon que l'on soit arrivé à la condition idéale que chaque particule de l'agent soit indefective.

MAISIN: Avez-vous étudié l'action des ribonucleases sur le caractère « infectant » du liquide de perfusion?

PENTIMALLI répond: Il n'a pas été prouvé.

PEACOCK: Was reaction of HCN in increasing the infectivity of tumour perfusate a protective effect against oxidation?

PENTIMALLI answers: Experiments of that kind have not been made.

THE MODE OF ACTION OF THE CARCINOGENIC HYDROCARBONS

PROF. P. RONDONI (MILANO)

I. - THIOL GROUPS AND CANCEROGENESIS

The aromatic polycyclic hydrocarbons are nearly insoluble in water; but some solubility in the organic fluids and in protoplasm is not quite absent, owing to the lipoidal contents of these body constituents. Lipoids may represent the pathway which carries the hydrocarbons (carcinogenic or not) in the most intimate structure of the protoplasm. Here, if the hydrocarbon is carcinogenic, a chain of reactions is started which leads to malignancy. Previous work in this and other laboratories makes very likely an interaction between the active regions of the hydrocarbon and some cell protein (nucleo-protein?), which undergoes a kind of denaturation (RONDONI, 1939, 1940, 1941, 1946) and according to a rather diffuse working hypothesis may be transformed in something like an (endogenous) proteinvirus (RONDONI 1939-1946; POTTER; FLASCHENTRÄGER a. BULLET). Some researches point out to thiol-groups as those atomic groups in proteins which are in some way affected by hydrocarbons: so CRABTREE was able to demonstrate that certain substances which readily combine with SH-groups can partially inhibit the carcinogenic power of 3,4-benzpyrene; and a blockage of cellular SH-groups, preventing the access of the carcinogen was admitted. GAETANI in our laboratory found that benzpyrene and methylcholanthrene exert some inhibition on papain digestion of gelatine (Table I), while some non-carcinogenic hydrocarbons are devoid of such action. Older researches of POZZI and of RONDONI and BELTRAMI had shown a

partially inhibiting action of benzpyrene on cathepsins in vitro and in vivo. As papain and cathepsins are SH-enzymes, i.e. enzymes whose activity is bound to presence of SH-groups in the enzyme molecule, it may be assumed that the inhibiting power of the hydrocarbons is related with an interaction with the thiol-groups of the enzyme

TABLE I. — *Proteolytic action of papain on gelatine*
(Increase of formol-acidity in ml 0,05 n NaOH)

Digestion after hours	Papain alone	Papain with bzp. suspension : ml							
		0,25	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0	3,5	4,0
2	0,60	---	---	---	---	---	---	0,20	---
4	0,85	---	---	0,65	---	---	---	0,35	---
2	0,70	---	---	0,50	---	0,25	0,30	---	---
4	0,85	---	---	0,70	---	0,35	0,35	---	---
2	0,50	---	0,50	0,40	---	0,25	0,20	---	0,20
4	0,65	---	0,70	0,55	---	0,40	0,40	---	0,35
2	0,75	0,75	---	0,65	0,55	0,55	0,50	---	0,55
4	0,95	0,90	---	0,80	0,80	0,80	0,75	---	0,80
2	0,75	---	---	---	---	---	0,50	---	---
4	1,00	---	---	0,80	---	---	0,65	---	---
2	0,65	---	0,70	0,60	---	0,55	0,50	---	0,50
4	0,90	---	0,85	0,75	---	0,75	0,70	---	0,70

or of some enzyme activator. RONDONI and BORETTI tried to study the contents of thiol-groups in a water-soluble protein fraction of some organs of rats after intraven. injection of benzpyrene. The SH-groups were estimated in water-extracts of organ 1-21 days after the injection (modified method of MIRSKY-ANSON). Comparative determinations on normal, not treated rats were made. The results were not very striking, though a diminution of thiol groups in liver protein and perhaps in kidney proteins after bzp-injections may be admitted (s. Table II).

The liver is the organ, where the greatest amount of injected bzp. is stored (BOYLAND and WEIGERT); so our results seem to agree with this finding and may demonstrate some partial blockage of thiol-groups of proteins. Of course a research on some other protein fractions, chiefly on those fractions which are more intimately bound to the cell structure and are not easily extracted by water, would have been more important; but we could not dispose on such large amounts of tissues to work upon as GREENSTEIN and coll. did in

TABLE II.

SH-groups expressed as mgr cysteine for 1 mgr N precipit. by trichloro-acetic acid				
	Liver	Kidney	Muscle	Lung
Mean values for 5 control rats . .	0,045	0,038	0,043	0,025
Mean values for 6 bzp. injected rats	0,035	0,030	0,041	0,021

their comparative researches on SH-groups of nucleoproteins of rat hepatomas and rat livers.

GALLICO has found a certain diminution of succinic dehydrogenase activity in some tumours, which may be referred to a diminution of free SH-groups, as we know (HOPKINS a. coll.) that this enzyme needs the presence of such groups in its molecule for a normal activity. It is therefore possible that also other carcinogenic agents besides the powerful hydrocarbons can block thiol-groups of highly specialised proteins; although according to GALLICO and BORETTI in rats hepatoma produced by o-amino-azotholuene a decrease of thiol-groups in water soluble proteins seems to appear rather late, when the tumour is well constituted. In such rat livers the decrease of succinic and malic dehydrogenases is more precocious, appearing before onset of neoplastic changes. However, in judging decrease of thiol-groups as well as of certain enzymatic activities, one must not

forget that many transplant-and experimental tumours show large regressive changes, which may account for such findings. The livers of tumour bearing rats showed often normal or increased contents of succinic dehydrogenase (GALLICO); i.e. a enzyme pattern rather different from the tumour itself. But we have not many observations on this point.

Now we have begun to investigate on a larger basis whether different carcinogenic and non-carcinogenic hydrocarbons can inhibit proteolysis (RONDONI 1948 a. RONDONI and BASSI). The results may be summarised as follows:

It is confirmed that papain digestion (on gelatine) is partially inhibited by benzpyrene (in watery suspension as well as in *coffein-solution*); such inhibition appears also against papain which was activated by cysteine or BAL (British Antilewisite: dimercaptopropanol). The inhibition is still stronger against cathepsins (autoproteolysis in extracts from rat sarcoma or horse liver); here the activating function of cysteine and BAL is completely suppressed by benzpyrene. Acetylaminofluorene and aminofluorene (Hydrocarbons derivatives, recently introduced in the experimental carcinogenesis) behave like benzpyrene in inhibiting proteolytic enzymes and in contrasting more or less completely the activating function of sulphhydryl compounds.

The non carcinogenic hydrocarbons phenanthrene, anthracene and pyrene gave no such results.

We may report (Table III) a typical experiment with horse liver extract, benzpyrene and cysteine (R. and BASSI).

One can see a rather strong bzp. inhibition; and the full suppression of SH-activation by bzp.

It is worth remarking that some carcinogenic substances were able to prevent nearly completely the activating function of such SH-compounds as cysteine and BAL on some SH-enzymes. We may mention for a comparison the researches of CALCUTT and NEWHOUSE concerning the photodynamic action of benzpyrene on *Paramaecium*: such action is partially inhibited by cysteine. So a SH-compound can interfere with an hydrocarbon in two ways: the hydrocarbon may prevent the activating function of such compound on some proteolytic enzymes on one hand; and a toxic function of the hydro-

carbon (affecting Protozoa) in presence of light is prevented by the SH-compound on the other hand.

We have tried (R. and BARBIERI) to extend our researches to a larger number of carcinogenic as well as of non-carcinogenic hydrocarbons, in order to better establish whether the interaction with thiols is really a character of the cancer producing hydrocarbons or

TABLE III.

Four mixtures were prepared:				
a)	Horse liver extract, prepared according to <i>Waldschmidt-Leitz</i> and <i>Deutsch</i> , ml. 9; distl. water ml. 159; acet. puffers (pH 4) ml. 12.			
b)	Liver extr. as above; d. water ml. 149; $\frac{m}{50}$ cysteine chlor. ml. 10; puffers as above.			
c)	Liver extr. as above; d. wat. ml. 154; benzpyrene suspension (ml. 1 acetone solution 0,5% dropped in ml. 10 boiling d. water) ml. 5; puffers as above.			
d)	Liver extr. as above; d. wat. ml. 144; benzpyrene suspension as above ml. 5; $\frac{m}{50}$ cystein chlor. ml. 10; puffers as above.			
Formol titration after 3 and 6 h incubation (37°)				
Digestion (ml. 0,05 n. sol. NaOH)				
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>
After 3 h	0,20	0,40	0,05	0,30
» 6 h	0,85	1,15	0,25	0,85

rather a common feature of many of such compounds, due to some general physical property without any connection with the carcinogenic activity. The general method was the same as shown in Table III. I owe most of the hydrocarbons to the kindness of Prof. J. W. COOK, Glasgow, to whom I express my best thanks. The results are resumed in table IV.

There is a rather striking concordance between carcinogenic activity of every compound and its inhibitory function on autoprotoleolysis, although some not very deep divergences may be noted, which may be ascribed to different solubility or other disturbing

factors. On the whole we may say that some carcinogenic substances (hydrocarbons, acetylaminofluorene; less clearly an azo compound) block more or less thiol groups and therefore inhibit SH-activated enzymes.

I have tried to investigate the ability of some hydrocarbons to react in vitro (watery suspension) with thiol groups of cysteine,

TABLE IV. — *Autoproteolysis in liver extracts.*

Hydrocarbons or other substances	Effect on proteolysis	Biological function
Benzpyrene	++	ca
Methylcholanthrene	++	ca
Pyrene	o	Non-ca
Anthracene	o	Non-ca
Phenanthrene	o	Non-ca
Perylene	o	Non-ca
1, 2, 5, 6-dibenzacridine	o	Sl.ca
1, 2, 5, 6-dibenzanthracene	++	ca
3, 4, 5, 6-dibenzphenanthrene	o	Non-ca
1, 2-dimethylchrysene	+	Sl.ca
1, 2, 5, 6-dibenzfluorene	—+	ca
9, 10-dimethyl-1, 2-benz anthracene	—+	ca
Acenaphthanthracene	—+	Non-ca/Sl.ca
Acetylaminofluorene	++	ca
o-aminoazotoluene	—+	ca

Effect on proteolysis:

++ = evident inhibition
+ = slight inhibition
—+ = inhibition of cysteine activation only
o = no inhibition at all

Biological function:

Ca = carcinogenic
Sl.ca = slightly carcin.
Non-ca = non carcinogenic.

estimating free not blocked groups by reduction of ferricyanide to ferrocyanide and colorimetric determination of latter as Prussia blue according to BACC, CHÉVREMONT and FREDERIC and to GOFFART and P. FISCHER. It is quite evident that some hydrocarbons (benzpyrene) and acetylaminofluorene bind, in certain proportions, the SH-groups;

that other compounds, carcinogenic as well as inactive, do not or in a scanty measure. However a concordance between SH-binding power and biological activity is not regular: e. g. methylcholanthrene has given uncertain result: while anthracene (non carc.) has bound strongly. But we have here a rather gross experiment, which cannot imitate the interaction with an enzyme system and much less with components of the living cell.

I may perhaps support the hypothesis that cancer is the effect of faulty protein synthesis, produced by many agents having sometimes their point of attack in SH-groups of some cell proteins. Some carcinogens as well as some mutagens may perhaps be compared with the « substances thioprives » of BACQ. The inactivation of the hydrolytic function of endocellular proteinases may even play some hitherto unexplained role in the malignant transformation of cells: it might perhaps facilitate some abnormal synthesizing process. The chemical change, transforming a normal protein (nucleoprotein or liponucleoprotein) in a kind of endogenous virusprotein, i. e. in a new, *abnormal inner organisator*, overbearing the system of normal cell organisators (RONDONI, 1948 b), may be by itself very small; but can be enough for upsetting the life of the cell (perhaps by changing some ultrastructural implements) and for impairing or suppressing the sensibility of the new formed more or less dedifferentiated protoplasm to the organismic regulation. A comparison between neoplastic cell transformation and protein denaturation was attempted by me: the carcinogenesis may be a problem of physical chemistry of proteins (1946).

II. - MAGNETIC BEHAVIOUR OF SOME CARCINOGENIC SUBSTANCES

The « electronic theory » of carcinogenesis is gaining more and more evidence, at least concerning aromatic hydrocarbons and related substances. The existence of a relation between the electronic configuration and carcinogenic activity of organic molecules was suggested by O. SCHMIDT; and since then has been confirmed by A. and B. PULLMAN, who however recognised that the quantum-

mechanical calculations adopted by SCHMIDT were insufficient and devised new methods in order to verify the proposed relation.

R. DAUDEL and A. PULLMAN have shown in many carcinogenic hydrocarbons the existence of an highly charged *K region*, situated at the mesophenanthrene bond; and a « K region-hypothesis » was emitted and developed (A. PULLMAN). Benzene ring according to the resonance theory is calculated to be an *hybrid* of different structures, KEKULÉ forms as well as DEWAR forms; now, summing the charges required for each of these structures, PULLMAN was able to draw a molecular diagram showing the distribution of π electrons (B electrons of O. SCHMIDT). Such calculations were extended to many aromatic hydrocarbons; and of late A. and B. PULLMAN (1948) tried to include in their hypothesis other cancerogenic compounds (aminostylbenes, azocompounds). For recent conceptions on mode of action of cancerogenic hydrocarbons I may refer to the article of G. M. BADGER.

Now a further progress on such line of research may be made by studying some physical properties, which are known to be strictly dependent upon electronic structure. An important one of such properties is the behaviour in an inhomogeneous magnetic field; the *diamagnetism*, which is a common feature of all bodies, according to the Langevin's theory, is related with the electronic orbits in atoms. The researches of PACAULT represent an important development of magnetochemistry on this point: he compared the experimental values of magnetic suscettibility (χ) with the values which can be calculated on the ground of KEKULÉ bonds as well as of abnormal bonds (DEWAR), and came to the conclusion that every experimental value of χ is comprised between the theoretical values.

I give here an account of some researches (with G. MAYR and E. GALLICO) on magnetic suscettibility of some aromatic hydrocarbons and a few other compounds.

The measures of χ were made in an inhomogeneous field with a magnetic pendulum of the type Weiss-Foex, modified by G. MAYR; all measures were related with water χ ($0,72 \times 10^{-6}$); control experiments with water, bismuth, mercury were also made.

Temp.: 20⁰-22⁰. The values of χ mol. were derived according to the classical formulæ and to the datas of W. KLEMM. The calculations of χ from the admitted *normal* electronic distribution were made according to PACAULT. The two sets of results, those experimentally found, and those which were calculated on the admission of a *normal* electronic structure, were compared: s. table. V.

Whereas non cancerogenic compounds (acenaphthanthracene perhaps endowed with a slight activity; perylene; 3,4,5,6-dibenzphenanthrene) show a fair coincidence of the two values, in the case of carcinogenic substances the experimental value of the susceptibility remains more or less below the calculated one. This difference is most striking for benzpyrene, less for methylcholanthrene, still less for the other substances, which are all carcinogenic, although not so much as the two named above. This behaviour of χ in carcinogenic substances may express the abnormal distribution of electrons, brought about e. g. by electron-attracting or electron-repelling substituents, with formation of active, highly charged centres in the molecule, very apt to react with cell constituents. The amount of the difference may be related with

TABLE V. — *Magnetic suscettibility* (χ).

Substances	$\chi \times 10^6$		N. of measures	Biological function
	Calculated values	Found values		
Methylcholanthrene . .	-0,75	-0,68 \pm 0,34	48	ca
3,4-Benzpyrene . . .	-0,73	-0,59 \pm 0,06	36	ca
Acenaphthanthracene .	-0,73	-0,73 \pm 0,03	48	Non-ca/Sl. ca
Acetylaminofluorene .	-0,66	-0,63 \pm 0,02	48	ca
Perylene	-0,68	-0,69 \pm 0,03	42	Non-ca
1,2,5,6-dibenzofluorene	-0,73	-0,69 \pm 0,03	42	ca
3,4,5,6-dibenzphenanthrene	-0,72	-0,73 \pm 0,03	48	Non-ca
o-aminoazotoluene . .	-0,64	-0,61 \pm 0,02	36	ca

number of electron couples which fail to give a contribution to the diamagnetism (s. further researches of MAYR, in press) and with the statistical distribution of different structural types in the molecule entering in contact with the living matter.

GENERAL CONCLUSIONS

Some carcinogenic and non carcinogenic hydrocarbons and related substances have been submitted to a double direction of investigation:

I. The relationship between carcinogenic activity and ability to react in vivo and in vitro with thiol groups. A certain decrease of chemically estimated SH-groups in the liver of rats injected with 3,4-benzpyrene was found; low contents of succinodehydrogenase (i.e. of an enzyme requiring SH-groups for its fonction) were found in some experimental and transplant tumours; a fair concordance between carcinogenic power and inhibitory fonction on SH-activated proteolytic enzymes (papain, cathepsin) was established (carcinogenic compounds were rather regular inhibitors, reacting with activating cysteine or BAL; non carcinogenic compounds did not show inhibitory fonction on proteolysis and did not suppress the SH-activation).

II. The « electronic theory » of O. SCHMIDT modified and corrected by A. and B. PULLMAN, PACAULT, etc. admits that a peculiar concentration of electrons π in some part of the molecule may explain the carcinogenic fonction of some hydrocarbons and of other organic compounds. Now the magnetic suscettibility (χ) of some compounds (diamagnetism) has been investigated. Whereas 3 non carcinogenic hydrocarbons showed experimental values of χ which coincide with the values that could be calculated according to PACAULT on the basis of a *normal* electron distribution, 5 carcinogenic compounds gave always experimental values below the calculated ones. Latter finding may be interpreted as a deviation from the normal electronic distribution, i.e. as the predominance in the molecule of structural types presenting abnormal condensa-

tions and rarefactions of the electronic cloud, with constitution of *active* centres.

The carcinogenic activity of hydrocarbons and perhaps of other compounds may depend upon the size and shape of the molecule; but also on some ability to react with some cell constituents; very likely with thiol groups of proteins. Such reaction initiates the chain of events which give rise to the malignant transformation. The electronic distribution in the molecule affects likewise the biological function; and even may have some relation with the inhibition exerted by carcinogenic hydrocarbons on some proteolytic enzymes.

REFERENCES

- BACQ Z. M., *Experientia*, 2, 349 (1946).
- BACQ Z. M., CHÈVREMONT M. and FREDERIC J., *Acta biol. belg.*, 3, 62 (1943).
- BADGER G. M., *Brit. Jl. of Cancer*, 2, 309 (1948).
- BOYLAND E. and WEIGERT F., *Brit. med. Bull.*, 4, n. 5-6, (1947).
- CALCUTT G. and NEWHOUSE J. P., *Nature*, 161, 53 (1948).
- CRABTREE H. G., *Cancer res.*, 4, 688 (1944); *ib.*, 5, 346 (1945).
- DAUDEL R. and PULLMAN A., *C. R. Ac. Sc.*, 222, 663 (1946).
- FLASCHENTRÄGER and BULLET, *Schw. med. Woch.*, 74, 290 (1944).
- GAETANI E., *Tumori*, 32, 165 (1946).
- GALICO E., *Tumori*, 33, 139 (1947).
- GALICO E. and BORETTI G., *Tumori*, 34, 130 (1948).
- GOFFART M. and FISCHER P., *Arch. internat. Physiol.*, 55, 258 (1947).
- GREENSTEIN J. P., JENRIETTE W. V. and WHITE J., *Journ. of nat. Cancer Inst.*, 2, 305 (1941).
- HOPKINS F. G., MORGAN E. J. and LUTWAK-MANN C., *Bioch. Journ.* 32, 1829 (1938).
- KLEMM W., *Magnetochemie*, Akad. Verlagsges. Leipzig (1936).
- MAYR G., *Rend Ist. Lomb. Scienze e lett.*, 78, 459 (1945).
- MIRSKY A. E. and ANSON M. L., *Journ. gen. physiol.*, 18, 307 (1935).
- PACAULT A., *C. R. Ac. Sc.*, 219, 158 (1944).
- POTTER V. R., *Advances in enzymology*, 4, 201 (1944).
- POZZI L., *Mem. R. Acc. d'Italia, Cl. Sc. fis.*, 6, 193 (1935).
- PULLMAN A., *Ann. d. Chimie*, 2, 1, 1947.

- PULLMAN A. and B., *Experientia* 2, 364 (1948); *Unio intern. contra cancerum, Acta*, 6, 57 (1948).
- RONDONI P., *Riforma Medica*, 1131 (1939).
Ergebnisse der Hyg., 23, 1 (1940).
Enzymologia, 9, 380 (1941).
Scientia, 77, 34 (1945).
Experientia, 2, 127 (1946).
Il Cancro, Casa editr. ambrosiana (1946).
Pontificia Academia Scientiarum, 12, n. 2 (1948 a).
Schweiz. med. Woch., 78, 419 (1948 b).
- RONDONI P. and BARBIERI G. P., *Enzymologia*, in press.
- RONDONI P. and BASSI M., *Ricerca Scientifica*, 18, 1038 (1948).
- RONDONI P. and BELTRAMI W., *Enzymologia*, 3, 251 (1937).
- RONDONI P. and BORETTI G., *Tumori*, 33, 274 (1947).
- RONDONI P., MAYR G. and GALLICO E., *Experientia*; 1949.
- SCHMIDT O. *Zeitschr. f. physik. Chem.*, 42, 83; 44, 185 u. 193 (1939).
Ber. d. d. chem. Ges., 73, A, 97 (1940).
Naturwissensch., 146; *Tumori*, 27, 475 (1941).

S U M M A R Y

Some carcinogenic and non carcinogenic hydrocarbons and related substances have been submitted to a double direction of investigation:

I. - The relationship between carcinogenic activity and ability to react in vivo and in vitro with thiol groups. A certain decrease of chemically estimated SH-groups in the liver of rats injected with 3,4-benzpyrene was found; low contents of succinodehydrogenase (i.e. of an enzyme requiring SH-groups for its fonction) were found in some experimental and transplant tumours; a fair concordance between carcinogenic power and inhibitory fonction on SH-activated proteolytic enzymes (papain, cathepsin) was established (non carcinogenic hydrocarbons generally did not inhibit proteolysis; carcinogenic compounds were rather regular inhibitors, more or less suppressing even the activating fonction of cysteine or BAL).

II. - The magnetic susceptibility χ of some compounds (diamagnetism) has been investigated. Whereas 3 non carcinogenic hydrocarbons showed experimental values of χ which coincide with the values that could be calculated according to PACAULT on the basis of a *normal* electron distribution, 5 carcinogenic compounds gave always experimental values below the calculated ones. Latter finding may be interpreted as a deviation from the normal electronic distribution, i. e. as the predominance in the molecule of structural types presenting abnormal condensations and rarefactions of the electronic cloud, with constitution of *active* centres.

The carcinogenic activity of hydrocarbons and perhaps of other compounds may depend upon the size and shape of the molecule; but also on some ability to react with some cell constituents, very likely with thiol groups of proteins. Such reaction initiates the chain of events which give rise to the malignant transformation. The electronic distribution in the molecule affects likewise the biological fonction; and even may have some relation with the demonstrated inhibition of some proteolytic enzymes.

R É S U M É

On a étudié des hydrocarbures et des substances corrélatives cancérigènes et non cancérigènes à deux points de vue :

I. - La relation entre l'activité cancérigène et l'aptitude à réagir *in vitro* et *in vivo* avec les groupements thiol. En effet on a trouvé une certaine diminution des groupements-SH démontrables chimiquement dans le foie des rats injectés avec du 3,4-benzopyrène; un taux assez bas de succinodéhydrogénase (c'est à dire d'un enzyme exigeant des groupements-SH pour son activité) fut constaté dans quelques tumeurs expérimentales et transplantables; surtout on a établi une assez nette concordance entre le pouvoir tumorigène et la fonction empêchante vis-à-vis des enzymes protéolytiques activés par les groupements thiol (papaïne, cathépsine): les hydrocarbures non cancérigènes en général n'empêchent pas la protéolyse, tandis que les substances cancérigènes essayées inhibent plus ou moins la protéolyse, en réagissant avec la cystéine en fonction d'activateur (dans quelques expériences aussi avec le BAL).

II. - On a étudié la susceptibilité magnétique (χ) de quelques corps (diamagnétisme): tandis que la χ de 3 hydrocarbures non cancérigènes présente des valeurs expérimentales coïncidentes avec celles calculées selon PACAULT dans l'admission d'une distribution régulière des électrons, 5 substances cancérigènes donnent toujours des valeurs expérimentales au dessous des valeurs calculées. On pourrait interpréter ce dernier résultat en admettant un trouble de la distribution électronique normale, c'est à dire la prédominance dans la molécule de types structurels présentant des condensations et des rarefactions du nuage électronique, avec formation de centres actifs.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Wirkungsweise der kanzerogenen Kohlenwasserstoffe und anderer verwandter kanzerogener und nichtkanzerogener Stoffe wird von zwei Gesichtspunkten aus untersucht:

1. Bei bestimmten Stoffen findet sich eine Verminderung der SH-Gruppen in der Leber von Ratten, welche mit Benzpyren behandelt

wurden. Ebenso findet sich eine Verminderung der Sukzinodehydrogenase in zahlreichen Experimentaltumoren. Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Tumorerzeugung und der Hemmung bestimmter Eiweissfermente.

Die nicht kanzerogenen Kohlenwasserstoffe hemmen im allgemeinen die Proteolyse nicht, während alle kanzerogenen Substanzen sie mehr oder weniger hemmen.

2. Die Elektronentherapie von O. SCHMIDT, modifiziert durch PULLMAN und PACAULT versucht eine Erklärung zwischen der Elektronenverteilung und dem Grad der Kanzerogenität zu geben.

S O M M A R I O

Si sono studiati degli idrocarburi e sostanze correlate cancerogene e non cancerogene in due diverse direzioni:

I. - La relazione fra l'attività cancerogena e l'attitudine a reagire in vitro ed in vivo con dei gruppi sulfidrilici. Infatti si è trovata una certa diminuzione dei gruppi SH dimostrabili chimicamente nel fegato dei ratti iniettati con 3,4-benzopirene; un contenuto assai basso di succinodeidrogenasi (ossia di un enzima che richiede i gruppi SH per la sua attività) fu constatato in alcuni tumori sperimentali e da trapianto; soprattutto si è stabilita una assai netta concordanza tra il potere cancerogeno e la funzione inibitrice di fronte ad enzimi proteolitici attivabili dai gruppi sulfidrilici (papaina, catepsine): gli idrocarburi non cancerogeni in generale non inibiscono la proteolisi, mentre che le sostanze cancerogene sperimentate inibiscono più o meno la proteolisi reagendo colla cisteina in funzione di attivatore (in alcune esperienze pure col BAL).

II. - Si è studiata la suscettibilità magnetica (χ) di alcuni corpi (diamagnetismo): mentre che la suscettibilità magnetica di 3 idrocarburi non cancerogeni presenta dei valori sperimentali coincidenti con quelli calcolati secondo PACAULT nella ammissione di una distribuzione regolare degli elettroni, 5 sostanze cancerogene danno sempre dei valori sperimentali al di sotto dei valori calcolati. Si potrebbe interpretare questo risultato ammettendo un perturbamento della distribuzione elettronica normale, vale a dire la predominanza nella molecola di tipi strutturali presentanti delle condensazioni e delle rarefazioni della nuvola elettronica, con formazione di centri attivi

DISCUSSION:

RUZICKA: Es ist nicht möglich allgemeine quantitative Gesetzmässigkeiten aufzustellen ueber irgend eine physiologische Wirkung und die chemische Konstitution der Verbindungen, welche die Wirkung hervorrufen. Es sind darüber schon viele Beispiele bekannt aus allen möglichen Gebieten, so z.B. bei Riechstoffen, Arzneimitteln, Hormonen and Vitaminen. Prof. BERENBLUM hat in der Diskussion eben Beispiele gegeben aus dem Krebsgebiet (z.B. Umkehrung der Stärke der carcinogenen Wirkung von Benzpyren und den Verbindungen aus der Mutterlauge vom Benzpyren bei Kaninchen und Mäusen). Zahlreiche Erfahrungen zeigen ferner dass man nicht irgend eine bestimmte Stelle einer physiologisch wirksamen Verbindung für das Zustandekommen der physiologischen Wirkung verantwortlich machen kann. Man kann den Anteil der chemisch reaktionsfähiger Stelle eines Moleküls an dem Zustandekommen der physiologischen Wirkung nicht trennen von dem Anteil des übrigen chemisch wenig reaktionsfähigen Teils des Moleküls. Auch dafür hat man unzählige Beispiele aus den verschiedensten Gebieten physiologischer Wirkungen. Die cancerigene Wirkung der bekannten polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe kann daher wohl nicht in quantitativem Sinne von irgendeinem Teilgebiet des Moleküls abhängig sein, wie z.B. von der sogenannten K-Region. Als ein Beweis dafür können die von Prof. Berenblum angeführten Beispiele betrachtet werden.

Ein anderer Beweis liegt in den Beobachtungen über die Prof. RONDONI berichtete, nämlich in der Tatsache, dass bei 5 cancerigenen Verbindungen die Konzentration der Elektronen (gemessen durch Bestimmung der magnetischen Suszeptibilität) deutlich geringer ist als bei 3 nicht cancerigenen Verbindungen. Diese Beobachtungen zeigen deutlich, dass es nicht möglich ist gewisse Gesetzmässigkeiten, die auf einem bestimmten eng begrenzten Gebiet aufgestellt werden konnten, ohne weiteres auf andere Gebiete zu übertragen.

THE ETIOLOGY OF MAMMARY CANCER IN MICE*

PROF. JOHN J. BITTNER (MINNESOTA)

Until 1933, it was generally considered that mammary cancer in mice resulted from the interaction of the hormones and genetic susceptibility. However, the first reciprocal crosses between homozygous strains revealed that the mothers of the cancerous strains contributed some « influence » which was not transmitted by the males of the same strains (Staff of the Jackson Memorial Laboratory and Korteweg, for literature see [1-5]).

In an attempt to determine how this maternal influence might operate, the young mice born to females of cancerous strains were removed soon after birth and were transferred to foster mothers of low cancerous lines. These fostered mice had a very low incidence of mammary cancer as compared with the young of the same strain which had been nursed by their mothers. Thus, it was demonstrated that some agent was transferred in the milk of females of cancerous strains which influenced the genesis of this disease.

To obtain a low incidence of mammary cancer in the fostered mice, the young must be removed from their mother soon after birth. No significant reduction in the incidence may be obtained

* These studies have been assisted by grants from the Citizens Aid Society of Minneapolis, the National Cancer Institute of the U. S. Public Health Service, the American Cancer Society upon recommendation by the Committee on Growth of the National Research Council, the Minnesota Division, American Cancer Society, the Cancer Research Fund of the University of Minnesota Graduate School, and the Elsa U. Pardee Foundation.

if the young are permitted to nurse their mother for 24 hours. The females of the cancerous strains will transfer the agent to the young born in their first litter—they do not have to be cancerous. If the fostered mice did not obtain any of the agent, now called the mammary tumor milk agent, from their mother before they were transferred, they may nurse their progeny and they likewise will show few tumors. The descendants of the mice fostered in 1934 are being continued and one line has been maintained for approximately 35 generations and has had an incidence of less than one per cent.

When mice of strains with a low incidence are nursed by females of cancerous strains, the results are determined by the genetic constitution of the strain. Some continued to show a low incidence following the introduction of the milk agent while others were found to have a high incidence. These latter stocks were susceptible for the development of mammary cancer but had a low incidence because one of the causative factors was lacking.

In 1939, a theory was advanced that mammary cancer in mice usually resulted from the action of three causative factors, which are:

1. Hormonal stimulation
2. An inherited susceptibility
3. The mammary tumour milk agent.

The relationship of the causative factors has not been completely determined. No theory that has been suggested will explain all of the experimental data—by selecting certain results it is possible to support one hypothesis whereas other experimental observation will disprove the same theory. One might state that the most consistent observations one secures in cancer research are the incompatible data which are obtained when one attempts to duplicate certain findings.

It should be mentioned at this point that there is not, from present data, any nursing influence involved in the genesis of any other type of cancer in mice.

Soon after the influence of foster nursing was observed, with the development of lines with low incidences, it was found that if the progeny of these mice were nursed by females of cancerous lines, a high incidence of mammary cancer was again realized. Likewise, it was found that if extracts of milk, lactating mammary tissue or

spontaneous mammary cancer were injected into susceptible mice without the milk agent, these mice also showed high incidences. Because of these observations it has been possible to determine the distribution of the milk agent and to study its properties. Details are given later.

Each factor in the genesis of mammary cancer is of approximately equal importance and each is nearly completely determining in its effects. This may be clearly seen by a comparison of the incidences that have been obtained in three strains of mice under different experimental conditions. Breeding females of the A and C₃H stocks with the milk agent have incidences in excess of 90 per cent. Without the hormonal stimuli of breeding, the virgin females of the A strain will have an incidence of about 4 per cent while the virgins of the C₃H stock may have the same incidence as the breeding females, but the tumors develop at a later average cancer age. The reciprocal hybrids between these two cancerous strains have high incidences when they are maintained as either virgins or breeders. When mice of these cancerous susceptible strains do not have the mammary tumor milk agent—as the result of foster nursing—low incidences are obtained regardless of the degree of hormonal stimulation. Several studies have been reported on the incidences in « low susceptible » strains with the milk agent; incidences of less than 10 per cent have been observed for several stocks and ANDERVONT has published that mice of one line of the C₅₇ black stock will not give rise to mammary tumors after being nursed by females of the C₃H strain and neither will they propagate the milk agent. Using mice of other lines of the same strain various investigators have found that not only may tumors develop but the agent may be transferred for several generations. Mice should be tested with the milk agent and maintained as breeders before they are stated to have a « low susceptibility » for mammary cancer.

The characteristics of mammary cancer, in that it usually results from the action and interaction of several causative factors, make it difficult to study the genetics of the inherited susceptibility. In one experiment we found that the incidences in the hybrids were influenced by the litter in which the young were born and the age at which the mothers developed mammary cancer. These findings are

not representative for all hybrid crosses, however. Linkage has been demonstrated in mice of the A stock between one of the genes which determined the inherited susceptibility and the gene for brown coat color. In unpublished data it has been observed that reciprocal hybrids with comparable genetic constitutions will have different incidences depending upon the source of the mammary tumor milk agent. Several investigators have observed that the incidences in cancerous strains may be altered following nursing by females of other cancerous strains. These studies suggest that we may have a different milk agent in the various strains and that the activity of these « agents » may be influenced by the inherited make-up of the hosts.

In addition to the inherited susceptibility for mammary cancer, the genes play a role in controlling the hormonal mechanism, at least in virgin females. This may be seen in determining the incidence of mammary cancer in non-breeding females and has been termed the inherited hormonal influence. This hormonal factor was originally demonstrated by reciprocal crosses between the cancerous A and C₃H stocks. While the former has a low incidence as virgins the latter gives a high incidence and the reciprocal hybrids even when they were maintained as non-breeders also had high incidences. Thus the mechanism which controlled a high incidence in virgin females was found to be transmitted.

The F₁ hybrids between the A and C₃H strains were used by HUSEBY and the writer [6] to study the function of certain endocrine organs of the two strains by placing them in the common environment. This was accomplished by ovariectomizing the hybrids when approximately one month of age and grafting a pair of ovaries from month old females of either A, C₃H, or F₁ mice. Transplantation was made deep in the axillary tissue of the recipient animal. In the hybrid animals the ovaries would be under very similar or identical pituitary stimulation and the hormones produced would act upon and be metabolized by genetically identical tissues. Studies of the estrous cycles of animals bearing grafts indicated that ovaries transplanted in this manner function similarly to undisturbed abdominal ovaries.

There is considerable morphological difference between the ovaries of mice of the A and C₃H stock. Whereas those of the A

strain have few mature corpora lutea and a well developed « interstitial organ », the ovaries from C₃H mice contain many adult corpora lutea and only a small portion of the gland was taken up with the interstitial tissue. The hybrid females had ovaries that resembled those of the C₃H parent. Three months after transplantation into the F₁ hybrid females the ovaries from donors of the A strain were found to be indistinguishable from the ovaries from C₃H or F₁ animals. This would suggest differences in pituitary gonadotrophic function in the parental stocks.

The vaginal smear records in the three groups did not show significant differences during the first ten months but after thirteen months the hybrids bearing ovaries from the C₃H animals came into estrus less frequently than the others with either A or F₁ ovaries.

As regards the development of mammary cancer, the controls behaved like virgin females of the respective stocks (ovariectomized A females with grafted A ovaries, etc.). Whereas the virgin females of the A strain and castrated females of the same stock with grafted ovaries showed an incidence of approximately 5 per cent, ovariectomized F₁ females with ovarian grafts from the A strain gave an incidence of 57 per cent, nearly as high as with either C₃H (66 per cent) or F₁ ovaries (70 per cent). However the average cancer age was much later in the F₁ females with grafted A ovaries. This was interpreted as indicating a difference in inherent hormonal function in the ovarian tissue of the two parental stocks as well as other organs of the endocrine system. This technique is being used to study the physiological effects of other hormonal mechanisms.

In cooperation with F. SMITH, a relationship has been found between hyperplasia of the adrenal cortex in ovariectomized mice of some stocks, a condition observed by WOOLLEY et al, and the inherited hormonal influence. This observation has been extended by HUSEBY and BITTNER [6] to include several strains but whether this will apply to all must be determined by further study. One strain has been found which showed adrenal hyperplasia following ovariectomy and, although it has a low susceptibility for mammary cancer, did transmit the inherited hormonal influence. That is, when males of this low susceptible strain were mated to females of the A strain having a low incidence in virgins, the F₁ virgins had a high

incidence of mammary tumors. Several other adrenal mechanisms are being investigated as related to the etiology of spontaneous mammary cancer.

The incidence of mammary cancer in mice may be altered by diet, temperature, crowding, etc. The physiological effects of these environmental influences may be the suppression of hormonal stimulation as evidenced from the histological study of the various tissues [1-5].

The agent normally transferred in the milk has been recovered in the extracts of various tissues: lactating mammary tissue, spontaneous and transplanted mammary carcinoma, spleen, liver, etc., in fact every tissue which has been extensively investigated. The agent will remain active following desiccation, lyophilization, treatment with glycerin, filtration, but becomes inactive when subjected to temperatures of 56° to 60° C. for thirty minutes or longer. To demonstrate the presence of the agent, the extracts are injected into young susceptible mice that do not possess the virus.

ANDERVONT and BRYAN determined that antibodies might be stimulated in rabbits by the injection of extracts from mouse carcinoma and that the sera from these immunized animals would neutralize the agent *in vitro*. They showed that mammary cancer did not develop in mice that received the immune serum previous to the agent; if the mice had obtained the agent by nursing the injection of antiserum later did not prevent the appearance of mammary cancer [3,4]. Serum produced against normal mouse tissue with the milk agent has comparable cytotoxic properties to that produced against cancerous tissue (IMAGAWA and BITTNER, unpublished). A precipitin test has been described which may be useful in detecting the presence of the mammary tumor milk agent in extracts (IMAGAWA, GREEN, and HALVORSON) [7].

Some of the properties of the milk agent in the extract of spontaneous mammary carcinoma were investigated by centrifugation by BARNUM, BALL, and BITTNER [8]. The initial and final supernatant fluids and three resuspended sedimentable fractions were tested in dilutions ranging from 10⁻³ to 10⁻⁵ gram equivalents. It was found that essentially all of the agent was sedimentable at 23,000 times gravity within one hour and most of the activity was

associated with the fractions containing the large particles and microsomes of the cytoplasm.

In another experiment, BARNUM, HUSEBY, and BITTNER [11] observed that « when a microsome fraction containing the milk agent is extracted at pH 10 and essentially all of the 'nucleoprotein' is removed, the agent remains associated with the 'lipoprotein' portion and does not appear to have lost any its activity. This does not imply that the milk agent contains no nucleic acid but rather that at least 95 per cent of the ribonucleic acid of the microsome fraction can be removed without impairing the activity of the agent ». The supernatant fluids of the fractions treated at pH 9 and pH 10 showed little activity.

The interpretation of experimental data on the activity and/or concentration of the milk agent in extracts of various tissues is difficult as seen in the above and other serial dilution studies. In one experiment approximately 225 mice of comparable ages were tested with an extract of spontaneous mammary cancer. Each mouse received, by intraperitoneal injection, from 10^{-1} to 10^{-6} gram equivalents of the source material suspended in 1 c.c. of distilled water. The highest incidence was seen in the group that obtained 10^{-3} gram equivalents and the earliest average cancer age was recorded in the mice that had received the extract diluted 10,000 fold. A one million fold dilution gave an incidence of 36 per cent in the test animals.

In the blood the milk agent may be recovered from both the serum and resuspended blood cells. It may also be adsorbed onto red blood cells from mice without the agent that have been added to the serum from cancerous animals.

Thus, the mammary tumor milk agent may be classified as an infectious or « virus », since:

1. It increases in amount in the presence of living cells.
2. It is macro-molecular in size as shown by centrifugation, etc.
3. It is specifically antigenic.
4. It remains active following lyophilization, desiccation, filtration, etc.
5. It appears to have a rather wide range of pH stability.

Published data and other studies still in progress would suggest that the various cancerous strains do not possess the same milk agent with comparable activity and/or concentration.

Although the mammary tumor milk agent has the characteristics of an infectious agent or virus, its mode of action is apparently quite different from the other viruses known to produce the cancer in other species. It is introduced at birth, but does not produce any visible manifestation of its presence until the development of mammary cancer, perhaps two years later. Although it has been suggested that the architecture of the mammary gland was different in mice of some strains with and without the milk agent, such a difference was not apparent in comparable mice of the A and C₃H strains and their hybrids [3-5]. Professor KORTEWEG confirmed this interpretation after he had examined whole mounts of the mammary glands prepared by HUSEBY and the author for our study.

SAMUELS, BITTNER, and SAMUELS [9] have investigated the excretion of unconjugated ketosteroids in the feces of mice. Animals of several stocks and their hybrids were included and in every instance higher readings were obtained for mice without the agent than when the agent was present. The excretion rates for several groups of one series without the agent were altered, following the injection of extracts with the agent, to that seen for mice of the same generation with the agent. Although there was considerable variation in the excretion rates for mice of different cancerous stocks, the readings could not be correlated directly with the incidence of mammary tumors in either virgin or breeding females or with any known inherited characteristics. HUSEBY and BITTNER [10] found that in some strains and their hybrids, these with the milk agent came into estrus more often than when the mice were not infected with the agent. However, the results for all groups were not consistent and further investigation must be completed to ascertain if these data may have some significance.

Future work will determine if the role of the mammary tumor milk agent in the development of mammary cancer in mice is to play a part in hormonal metabolism and or production; whether or not mice with the agent may have more hormones with « carcinogenic » activity than would be found in animals without the agent.

The long delay between the introduction of the milk « virus » and the genesis of mammary tumor in mice could be explained if the hormones, altered because of the action of the « virus », might be the « primary » cause of the disease. However, the action and interaction of all of the causative factors — milk agent, genetic susceptibility, and hormones — would be prerequisites for a high incidence.

LITERATURE CITED

1. Research Conference on Cancer, A. A. A. S., 1945.
2. Staff of the National Cancer Institute. A symposium on mammary tumors in mice. A. A. A. S., 1945.
3. BITTNER J. J., The Harvey Lectures, Series 42 : 221-246. 1946-1947.
4. BITTNER J. J., Der Krebsarzt, 3 : 321-336. 1948.
5. Proceeding, 4th International Cancer Research Congress. In press.
6. HUSEBY R. A. and BITTNER J. J., Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 69 : 321-329. 1948.
7. IMAGAWA D., GREEN R. G. and HALVORSON H. O., Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 68 : 162-166. 1948.
8. BARNUM C. P., BALL Z. B. and BITTNER J. J., Cancer Research, 7 : 522-527. 1947.
9. SAMUELS L. T., BITTNER J. J. and SAMUELS B. K., Cancer Research, 7 : 722. 1947.
10. HUSEBY R. A. and BITTNER J. J., Cancer Research, 7 : 722-723. 1947.
11. BARNUM C. P., HUSEBY R. A. and BITTNER J. J., Proc. 4th International Cancer Research Congress. In press.

SUMMARY

The importance of the hormones in the genesis of mammary cancer in mice is stressed. The inherited hormonal influence is largely discussed: an other genetic factor is admitted which was reported in 1944 as having an important role in the development of cancer in virgin mice. As determined by the work of HUSEBY and the author, part of the physiological effects of the hormonal mechanism is mediated through the ovary, and balanced through other organs of the endocrine system, such as the pituitary, adrenals, etc. Much more research must be completed before we may have the answer. Other hormonal factors as they influence the genesis of mammary cancer in mice, are also studied.

From the cooperative work with SAMUELS we are thinking of the possibility that the milk agent may work through the hormones as a causative factor. In every stock that we have tested, mice with the agent excrete with the feces a smaller amount of unconjugated 17-ketosteroids than do mice without the agent. In various injection experiments, we have found that following the introduction of the agent, the excretion rate may be changed to that seen in mice with a high incidence.

The long delay between the introduction of the milk « virus » and the genesis of mammary tumor in mice could be explained if the hormones, altered because of the action of the « virus », might be the « primary » cause of the disease. However, the action and interaction of all of the causative factors (milk agent, genetic susceptibility, and hormones) would be prerequisites for a high incidence.

R É S U M É

On a étudié l'importance des hormones dans la g n se du cancer du sein de la souris. L'influence hormonale transmise par la voie héréditaire vient discutée à fond: il est admis un autre facteur génétique qui a été décrit en 1944. Il joue un rôle important dans le développement du cancer de la souris virginale. Les travaux de HUSEBY et de l'Auteur d -

montrent qu'une partie des effets physiologiques du mécanisme hormonal est conditionnée par l'ovaire et balancée par les autres glandes du système endocrine, comme l'hypophyse, les glandes surrénales, etc. Mais les recherches doivent être poursuivies et complétées avant d'en tirer des conclusions. On a ainsi étudié d'autres facteurs endocriniens qui influencent la genèse du cancer mammaire de la souris.

Les recherches conduites par l'Auteur et son collaborateur SAMUELS font supposer la possibilité de considérer le *facteur du lait* comme un facteur causal qui agit au moyen des hormones. Dans toutes les lignées de souris que nous avons étudiées, nous avons vu que les souris affectées par cet agent éliminent avec les fèces une quantité de 17-ketostéroïdes libres inférieure à celle éliminée par les souris qui n'ont pas cet agent. En plusieurs expériences avec injections nous avons vu que administrant l'agent, la quantité excrète peut être différent de celle éliminée par les souris à haute incidence.

Si les hormones modifiés par l'action du facteur du lait puissent être la cause « primaire » de la maladie, on pourrait ainsi bien expliquer le long délai de temps entre l'introduction du facteur du lait et la formation de la tumeur mammaire dans la souris. Cependant l'action et l'interaction de tous les facteurs de causalité (facteur du lait, susceptibilité génétique et hormones) pourraient constituer des conditions préliminaires favorables à la haute incidence de la tumeur.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Entstehung des Mäusebrustkrebses wird auf die Wichtigkeit des hormonalen Faktors hingewiesen. Ein zweiter Faktor, der Erbaktor, über den Verfasser 1944 berichtete, ist von grosser Bedeutung bei der Entstehung des Brustkrebses bei der virginellen Maus. Die physiologischen Wirkungen der Hormonorgane werden durch die Funktion der Ovarien und von dem System der übrigen endokrinen Drüsen bestimmt, vor allem von der Hypophyse und von der Nebennierenrinde gesteuert. Weitere Untersuchungen über andere endokrine Faktoren sind noch nicht abgeschlossen.

Der Milchfaktor wird als kausaler Faktor, der mit Hilfe der Hormone erst zur Auswirkung kommt, beurteilt. Die erkrankten Mäuse aller unter-

suchten Mäusestämme, welche mit dem Milchfaktor in Berührung kamen, scheiden mit den Faeces eine geringere Menge von 17-Ketosteroiden aus als jene Mäuse, welche nicht mit dem Milchfaktor in Berührung kommen.

Wenn die durch den Einfluss des Milchfaktors veränderten Hormone als primäre Ursache des Brustkrebses der Maus anzusehen wären, würde dies den langen Zwischenraum zwischen Einführung des Milchfaktors und Tumorbildung erklären.

S O M M A R I O

Viene studiata l'importanza degli ormoni nell'eziologia del cancro mammario del topo. E' largamente discussa l'influenza ormonale trasmessa per via ereditaria: è ammesso un altro fattore genetico. Esso fu descritto nel 1944 come avente un importante ruolo nello sviluppo del cancro in topi vergini. Dai lavori di HUSEBY e dell'Autore si suppone che questi effetti fisiologici del meccanismo ormonale si estrinsecano in parte attraverso l'ovaio, venendo equilibrati dagli altri organi del sistema endocrino, come la ghiandola pituitaria, i surreni, ecc. Ma le ricerche in questo campo abbisognano di completamento prima di poter dare una risposta al problema. Sono stati studiati altri fattori ormonali, che influenzano l'eziologia del cancro mammario del topo.

Dal mio lavoro in collaborazione con SAMUELS è nata l'ipotesi che il fattore latteo possa avere, attraverso questi ormoni, una importanza nella cancerogenesi. In ogni stipite di topi da noi studiato, abbiamo osservato che i topi ad incidenza tumorale eliminano con le feci una quantità di 17 chetosteroidi non coniugati, minore di quella eliminata da topi di stipiti indenni. In varie ricerche con iniezioni abbiamo trovato che dopo introduzione dell'agente, il tasso di escrezione può essere diverso da quello trovato nei topi ad alta incidenza.

La lunga latenza fra l'introduzione del « virus » latteo e l'insorgenza del cancro mammario nel topo potrebbe essere spiegata se gli ormoni alterati dall'azione del « virus » potessero costituire la causa « primaria » della malattia. Tuttavia l'azione ed interazione di tutti i fattori causali (fattore latteo, suscettibilità genetica e ormoni) sarebbero requisiti che predispongono i topi all'alta incidenza del cancro mammario.

CONCLUSIONS

Les membres de la « Semaine d'Étude » sur *Le Problème biologique du cancer* tiennent à exprimer leur reconnaissance à l'Académie Pontificale des Sciences pour l'occasion offerte de discuter leurs problèmes, en des conditions idéales, dans la quiétude du Vatican.

Ils partent pleinement convaincus de l'importance de ce genre de réunions au cours desquelles un nombre relativement restreint de membres ont vraiment la possibilité d'échanger leurs opinions dans une totale indépendance.

En réponse à la demande de conclusions que formulait l'Académie Pontificale des Sciences, les participants soussignés de la « Semaine d'Étude », ayant discuté différents rapports relatifs aux divers aspects du problème biologique du cancer, estiment que les questions suivantes sont de celles qui méritent une étude approfondie (l'ordre de présentation ne préjuge pas de l'importance relative des questions):

1. Les relations entre le processus de cancérisation et les phénomènes de mutation (dans le sens génétique du terme) ainsi que d'autres changements durables de la cellule.

2. La période de latence dans la cancérisation et le problème des cellules cancéreuses quiescentes.

3. L'intervention, dans la cancérisation, de facteurs locaux et de facteurs généraux d'inhibition et d'activation.

4. Les relations entre la constitution chimique et l'activité carcinogène de différentes substances.

5. Les relations entre l'action des agents physiques et celle des autres facteurs cancérogènes.

6. Le métabolisme des substances cancérogènes en rapport avec la production des tumeurs.

7. Les changements biochimiques associés à la transformation néoplasique de la cellule.

8. La nature et le rôle dans le cancer de certaines entités intracellulaires transmissibles et la question de leur autoreproduction.

BERENBLUM, BOYLAND, COWDRY, GREENSTEIN, KRETZ,
LACASSAGNE, MAISIN, PEACOCK, PENTIMALLI, RONDONI,
RUZICKA, SANZ IBAÑEZ, SCHINZ, VON EULER

The participants in the «Week of Study» of *The Biological Problem of Cancer* wish to express their gratitude to the Pontifical Academy of Sciences for the opportunity afforded to discuss their problems under ideal conditions in the tranquillity of the Vatican.

Having attended this meeting we are convinced of the value of conferences of this kind wherein a relatively limited number of participants are given every possibility to exchange opinions in a complete independence.

In response to the request of the Pontifical Academy of Sciences, that we should formulate our conclusions and after discussing the different reports covering various aspects of biological problems of cancer, we, participants of the «Week of Study», consider that the following problems are among those which merit intensive investigation (no significance is attached to the order of presentation):

1. Relations, between the processes of cancerisation and mutation in the genetic sense of term, as well as other persistent changes in cells.
2. Problems concerning the latent period of carcinogenesis and problem of quiescent cancer cells.
3. Intervention of local and general factors of inhibition and activation in the development of cancer.
4. The relationship between chemical constitution and carcinogenic activity of different substances.
5. The relationship between the action of physical agents and other carcinogenic factors.
6. The metabolism of carcinogens in relation to the production of tumors.
7. Biochemical changes associated with neoplastic transformation of the cells.
8. The nature and the role in cancer of certain intracellular transmissible entities and the question of their autoreproduction.

BERENBLUM, BOYLAND, COWDRY, GREENSTEIN, KRETZ,
LACASSAGNE, MAISIN, PEACOCK, PENTIMALLI, RONDONI,
RUZICKA, SANZ IBAÑEZ, SCHINZ, VON EULER.

Die Teilnehmer der « Studien-Woche » über *Das biologische Problem des Krebses* wollen der Päpstlichen Akademie der Wissenschaften ihre Dankbarkeit ausdrücken, dass ihnen in solch idealer Weise, in der Ruhe des Vatikans die Gelegenheit geboten wurde ihre Probleme zu besprechen.

Sie lassen sich Volllkommen überzeugt über die Wichtigkeit dieser Art Zusammenkünfte, in welcher einer eigentlich gemessene Zahl der Mitglieder, die Möglichkeit gegeben wird, in vollkommener Unhabhänglichkeit, ihre Meinungen zu wechseln.

Nach der Besprechung der verschiedenen Berichte über die vielfachen biologischen Probleme des Krebses, die unterschriebenen Teilnehmer, in Antwort auf die Frage der Päpstlichen Akademie der Wissenschaften, denken dass die folgenden Probleme jenen angehören, welche gründliches Forschen benötigen (es wird keine Bedeutung der Vorleungsfolge beigelegt):

1. Die Beziehung zwischen der Krebsentstehung und Phenomen der Mutation sowie anderer dauernden Zellveränderungen.
2. Das Stadium der Latenz der Krebsentstehung und das Ruhen der Krebszellen.
3. Die hemmenden und fördernden Einflüsse lokaler und allgemeiner Faktoren bei der Krebsentstehung.
4. Die Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Karzinogenese.
5. Die Beziehungen zwischen der Wirkung physikalischer und anderer karzerogener Faktoren.
6. Die Stoffwechselprodukte der kanzerogenen Substanzen und ihre Beziehung zur Krebsentstehung.
7. Die mit der malignen Entartung der Zelle verbundenen chemischen Veränderungen.
8. Die Natur und ihre Bedeutung für die Krebsentstehung von bestimmten intrazellulären übertragbaren Agentien und die Frage ihrer selbstständigen Vermehrungsfähigkeit.

BERENBLUM, BOYLAND, COWDRY, GREENSTEIN, KRETZ,
LACASSAGNE, MAISIN, PEACOCK, PENTIMALLI, RONDONI,
RUZICKA, SANZ IBAÑEZ, SCHINZ, VON EULER.

I partecipanti alla « Settimana di Studio » su *Il problema biologico del cancro* desiderano esprimere la loro gratitudine alla Pontificia Accademia delle Scienze per aver potuto discutere i loro problemi, in condizioni ideali, nella tranquillità del Vaticano.

Dopo avervi preso parte, essi sono convinti dell'importanza di riunioni di questo genere, nelle quali un numero relativamente piccolo di partecipanti hanno veramente la possibilità di scambiarsi le loro idee in una completa indipendenza.

In risposta alla domanda della Pontificia Accademia delle Scienze di formulare le nostre conclusioni, noi sottoscritti partecipanti alla « Settimana di Studio » dopo aver discusso differenti relazioni intorno ai diversi aspetti del problema biologico del cancro crediamo che le seguenti questioni siano quelle che meritano uno studio più approfondito (l'ordine di elencazione non si riferisce all'importanza degli argomenti):

1. Le relazioni fra il processo di cancerizzazione ed i fenomeni di mutazione (nel senso genetico del termine), come pure altri cambiamenti persistenti della cellula.

2. Il periodo di latenza nella cancerizzazione ed il problema delle cellule cancerose quiescenti.

3. L'intervento di fattori locali e generali di inibizione e di attivazione nello sviluppo del cancro.

4. Le relazioni fra la costituzione chimica e l'attività cancerogena di differenti sostanze.

5. Le relazioni fra l'azione di agenti fisici e quella di altri fattori cancerogeni.

6. Il metabolismo delle sostanze cancerogene in rapporto con la produzione dei tumori.

7. I cambiamenti biochimici connessi alla trasformazione neoplastica della cellula.

8. La natura e il compito di certe entità intracellulari trasmissibili e la questione della loro autoriproduzione.

BERENBLUM, BOYLAND, COWDRY, GREENSTEIN, KRETZ,
LACASSAGNE, MAISIN, PEACOCK, PENTIMALLI, RONDONI,
RUZICKA, SANZ IBAÑEZ, SCHINZ, VON EULER.

APPENDICE

DIE EINWIRKUNG VON ULTRASCHALL AUF KREBSGEWEBE

PROF. E. F. PETRITSCH (WIEN)

Professor E.F. PETRITSCH macht eine kurze Mitteilung über einige bei der Behandlung von Krebsgeweben mit Ultra-Schall erzielten Ergebnisse. Der Ultra-Schall ist wie der Hörschall eine mechanisch-elastische Energieform, eine fortschreitende longitudinale Schwingung der Materie grundverschieden von der elektro-magnetischen Strahlung (z. B. Röntgen); er zeigt aber eine gewisse Verwandtschaft mit mechanischen Wärmeschwingungen, nur weisen die Schallschwingungen bei gleicher Schwingungsenergie millionenmal grössere Amplituden als wie die mechanischen Wärmeschwingungen auf und sind auch dementsprechend wirksamer. Druck und Zug, Pressung und Dehnung folgen unendlich rasch aufeinander und bewirken, dass Zellen und Gewebsteile infolge der grossen Schwingungsamplitude millionenfach kräftiger durchgeknetet und massiert werden, als durch energiegleiche Wärmebehandlung. Dieses Durchkneten der Zellen, diese mechanische Massage wird von den Nerven als Temperatur registriert. In der Zug- und Dehnungsphase bilden sich in den Geweben kleinwinzige Hohlräume, wahrscheinlich Kohlensäurebläschen, die in der sich anschliessenden Druck- und Pressungsphase wieder zusammen knallen. Durch die einsetzende Kavitation werden schwache und kranke Zellen zerstört, während gesunde Zellen sich gegenüber Ultraschallbestrahlung als äusserst widerstandsfähig erweisen.

Professor Dr. CAMILLO WIETHE, Vorstand der Universitäts-Klinik für Hals-, Nasen-und Ohrenkrankheiten in Wien hatte die Lie-

benswürdigkeit sechs Lichtbilder zur Verfügung zu stellen, welche die bei 4 Fällen erhaltenen histologischen Befunde wiedergeben.

Fall I betrifft zwei Carcinom-metastasen in den seitlichen Halsdrüsen ausgehend von einem Larynxcarcinom. Die obere Drüse wurde 4 mal je 15 Sekunden beschallt (Frequenz etwa 10^6 Hertz, Energie 1 bis 2 Watt (cm^2)). 3 Wochen nach der ersten Beschallung wurden beide Drüsen chirurgisch entfernt. Während der Beschallungszeit war eine leichte Rötung der Haut, weiters in der ersten Woche eine Vergrößerung der Drüsen und eine Infiltration des subcutanen Zellgewebes zu bemerken. Nach 14 Tagen trat ein rasches Kleinerwerden der Drüsen in Erscheinung, derart, dass sie kaum mehr getastet werden konnten.

Ueberraschend war der histologische Befund (Bild 1). Die obere, mit Ultraschall behandelte Drüse zeigte keinerlei Zellstruktur einer Lymphknotens resp. eines Krebsgewebes, sie war wöllig verkäst (Nekrose). Die bindegewebigen Septen mit ihren Blutgefäßen zeigen dagegen keinerlei Veränderung. Die untere unbeschallte Drüse ist dagegen voll von Carcinomgewebe und weist keinerlei regressive Veränderung auf.

Fall II betrifft Knochenmetastasen (Rippen) nach einem Carcinom der Parotis, die sich deutlich im Bereiche des seitlichen Thorax tasten liessen. Eine Probeexcision (Bild 2) vor der Beschallung zeigte deutlich Carcinommetastase. Die Metastase wurde 4 mal je 20 Minuten beschallt. Anfänglich war ein Anschwellen der Metastase, dann aber ein Kleinerwerden zu bemerken. Die Beschallung erfolgte derart, dass nur der untere Teil der Metastase vom Schallstrahl erreicht wurde. Die Excision (Bild 3) erfolgte 4 Wochen nach der ersten Beschallung. Der histologische Befund zeigt entsprechend dem Schallstrahl eine streifenförmige Nekrose; während hier keinerlei Struktur zu erkennen ist, lagert darüber das unveränderte Carcinom.

Fall III betrifft einen inoperablen Gebärmutterkrebs an der Portio des Uterus. Die Probeexcision vor der Beschallung zeigte deutlich die Krebsinseln im Gewebe (Bild 4).

Die Ultraschallquelle wurde an die Symphyse gelegt und so erreicht, dass der Schallstrahl ohne Zwischentreten eines Luftspaltes den primären Tumor erreichte. Die Patientin wurde 2 mal je 30 Minuten beschallt, nach 6 Wochen starb die Patientin, die hochgradig



BILD 1.

Carcinommetastasen in seitlichen Halsdrüsen, oben beschallt, hell, strukturlos, unten unbeschallt, dunkel, Krebsgewebe.

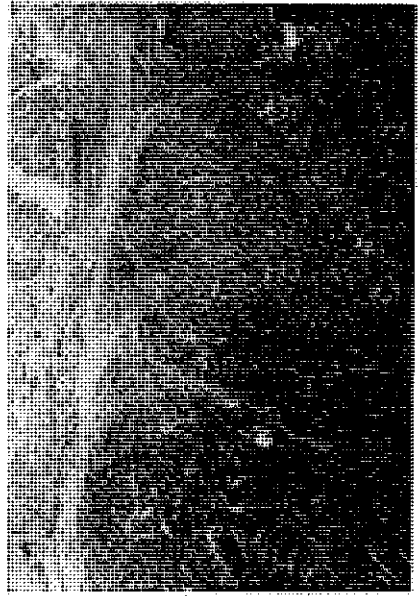


BILD 2.

Knochenmetastase (Rippen), Probexcision, unbeschallt, Carcinommetastase.



BILD 3.

Knochenmetastase (Rippen, wie Bild 2), unten beschallt, hell, strukturlos, Nekrose dem Schallstrahl entsprechend.



BILD 4.
Gebärmutterkrebs, Probeexision vom Muttermund,
beschallt, Krebsinseln im Gewebe.



BILD 5.
Gebärmutterkrebs (wie Bild 4), Grenzgebiet zwi-
schen beschalltem und nicht beschalltem Gewebe,
letzteres strukturlos, den nekrotischen Krebszellen
entsprechend.

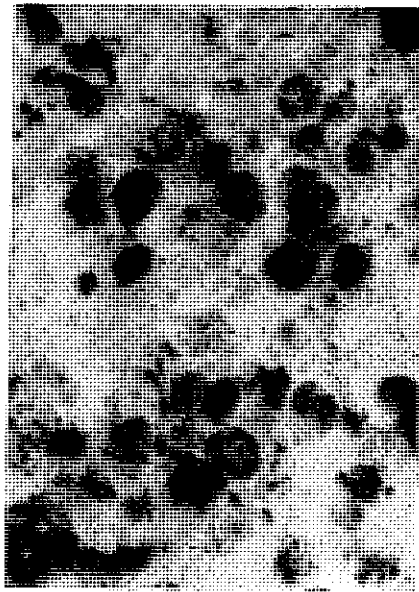


BILD 6.
Krebsmetastase, 2 mal 30 Minuten beschallt, 12
Tage nach der letzten Beschallung chirurgisch
entfernt, Zellreste und nekrotische Massen.

kachektisch war, an einer Pneumonie. Der histologische Befund (Bild 5) des beschallten Uterus, der bei der Obduktion erhalten wurde, zeigte deutlich, dass das vom Shallstrahl erreichte Krebsgewebe völlig nekrotisch war (strukturlose Masse). Die die Krebsnester umgebenden Muskelfasern, Bindegewebe und Gefäße zeigen jedoch keine Veränderungen.

Fall IV, Bild 6, zeigt das Gewebebild einer Krebsmetastase, die 2 mal je 30 Minuten beschallt und 12 Tage nach der ersten Beschallung chirurgisch entfernt wurde. Man findet hier einerseits Zellreste, hauptsächlich Kerne, andererseits körnige nekrotische Massen, die bereits zerfallenen Zellen entsprechen. Die Kerne zeigen eine Verplumpung und Verklumpung des Chromatins und zwar derart, dass es sich hauptsächlich randständig lagert. Gelegentlich treten kleine Vacuolenbildungen auf. Das Protoplasma (Zelleib) ist fast überall bereits zerfallen, an manchen Stellen lässt sich noch schattenhaft eine Zellkontur beobachten.

Professor PETRITSCH weist darauf hin, dass die Durchführung und histologische Auswertung dieser Versuche in der Hand des erwähnten Professors Wiethe der Wiener Universitäts-Klinik lag und er sich daran nur als ein Hilfsorgan auf physikalisch-technischem Gebiete beteiligen konnte.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Ultraschall wird eine intensive Massage der beschallten Gewebe, in welchen sich Kavitationen bilden, herbeigeführt. An Hand von Mikrophotographien wird die Einwirkung des Ultraschalls auf Krebsgewebe auf Grund einschlägiger Beobachtungen der Laryngolog. Univ.-Klinik Prof. C. WIETHE, Wien, demonstriert.

LA METASTASIZZAZIONE ELETTIVA EMATOGENA NEI MALIGNOMI

PROF. H. R. SCHINZ (ZÜRICH)

I caratteri principali dei malignomi sono la comparsa di metastasi linfoghiandolari regionali e di metastasi ematogene a distanza. In questo lavoro ci limiteremo esclusivamente alla metastasizzazione ematogena a distanza. La prima premessa per tale metastasizzazione è la comparsa d'un embolo neoplastico; la seconda è quella di un arresto dell'embolo diffuso in un filtro e la formazione d'una metastasi dopo che si è attaccata a quel filtro. Lo sviluppo, il luogo ove originano queste metastasi e la quantità di queste dipende da fattori molto diversi, in tutto non completamente chiari. Le ricerche fatte negli ultimi cento anni hanno provato chiaramente che la dottrina di VIRCHOW sull'embolia vale pure per la diffusione ematogena discontinua dei tumori. Venne controllato sistematicamente questo principio negli ultimi tempi da WILLIS (1934) e da WALTHER (1948) attraverso un grande materiale, e nuovamente affermato per i carcinomi e sarcomi organoidi o istoidi, i quali rappresentano una solida struttura cellulare di tessuto epiteliale anormale (carcinoma) o di cellule sarcomatose le quali stanno collegate strettamente da sostanza intracellulare tumorale. Per questi emboli neoplastici valgono le leggi dell'idrodinamica, secondo le quali detti emboli si arrestano nella rete capillare degli organi contigui, dove — in certe condizioni — si attaccano e originano delle metastasi.

In una ammalata di struma vegetante di Langhans associata con metastasi linfoghiandolari nel mediastino (Fig. 1 a) si trovano delle metastasi a distanza nei polmoni e nella pleura quali primi filtri contigui al tumore primitivo. Anche le metastasi possono dif-

fondere e formare delle ulteriori metastasi (« Enkelgeschwülste ») nel sistema osseo quale filtro contiguo. Appartengono a questa categoria tutti i cancri extraintestinali, ad eccezione del cancro polmonare primitivo, ed i cancri epatici primitivi. Ci si riferisce al *tipo polmonare* o *tipo della cava*. Il primo nome esprime il filtro contiguo al tumore primitivo, il secondo il vaso per il quale viene trasportato l'embolo neoplastico fino al momento del suo arresto.

Nei cancri intestinali — ad eccezione di quelli epatici — abbiamo quale primo filtro contiguo al tumore primitivo il fegato; l'embolo neoplastico viene trasportato per la vena porta. Le metastasi polmonari si formano dalle metastasi epatiche rappresentando quindi delle metastasi di secondo grado (« Enkelgeschwülste »). Parliamo del *tipo epatico* o *portale* (Fig. 1 b). Le metastasi ossee si formano solo dopo una ulteriore diffusione con punto di partenza dalle metastasi di secondo grado nei polmoni.

Nel cancro polmonare primitivo tutti i sistemi capillari e le reti mirabili della *grande* circolazione sono dei filtri contigui al tumore primitivo. Gli emboli neoplastici passano attraverso le vene polmonari in questi (Fig. 1 c). Parliamo del *tipo della polmonare*. Le metastasi a distanza nel polmone sono o il risultato della diffusione del tumore primario passando per le arterie bronchiali o il risultato della diffusione di metastasi in qualsiasi rete capillare della grande circolazione attraverso le vene cave.

Quindi in caso di metastasizzazione ematogena progressiva trovasi sempre compartecipazione del polmone quale filtro contiguo a tutti i cancri primitivi extraintestinali e a quelli primari del fegato. Il polmone forma un filtro contiguo alle metastasi dei tumori intestinali ed al cancro primitivo del polmone come pure alle metastasi di esso. E' necessario dunque esaminare esattamente i polmoni in tutti i casi di malignoma.

Da parecchi autori vengono interpretate le eccezioni a questa regola della metastasizzazione ematogena a distanza: 1) come embolia diretta o capillare (ZAHN) supponendo che tali emboli neoplastici passino i capillari polmonari larghi senza arrestarsi; 2) come embolia paradossa attraverso il forame ovale aperto in casi di pressione aumentata nella piccola circolazione evitando quindi il filtro polmonare (ZAHN); 3) come embolia venosa (v. RECKLINGHAUSEN)

la quale viene interpretata quale trasporto retrogrado nell' interno delle vene. Quell'ipotesi afferma la constatazione di un sistema capillare che protegga dalle metastasi il sistema seguente. Forse è importante anche il quarto punto, cioè la constatazione di BATSON della possibilità, in caso di tensione aumentata intraaddominale, di un afflusso diretto di sangue nelle vene vertebrali con punto di partenza le vene del bacino. Ed il quinto punto, cioè la dimostrazione di un gran numero di vene a corto circuito tra vena porta e vena cava (PFANNER). Queste interpretazioni sono molto discusse. WALTHER dimostrò che nella maggioranza dei casi la localizzazione delle metastasi neoplastiche segue esclusivamente le leggi della fisiologia normale della circolazione. La mancata dimostrazione, cioè la presenza di metastasi organiche senza manifestazione polmonare, è da imputarsi o ad un esame incompleto o ad una cartella errata. L'unico punto chiaro per i carcinomi differenziati ed i sarcomi è quello che non esiste un trasporto di emboli neoplastici nella circolazione del sangue, ma solo un trasporto dal tumore primitivo o secondario fino al più vicino filtro. Quella è la *classica metastasizzazione ematogena a distanza*.

Un comportamento completamente diverso trovasi nei malignomi a struttura nettamente cellulare dove le singole cellule non sono collegate da sostanza intermedia o — come le cellule epiteliali — in un agglomerato solido. Quelle, secondo FISCHER-WASELS, HUECK ed altri, vengono chiamate *Meristomi*. In caso di invasione di essi nei vasi si trovano emboli cellulari costituiti da singole cellule che circolano nel sangue come i globuli rossi e bianchi e non emboli tissurali come nella metastasizzazione classica. Esse passano per i diversi sistemi capillari ove formano delle metastasi in luoghi ove trovano il substrato adatto. Verosimilmente, per render possibile un accrescimento rapido, quello deve assomigliare moltissimo al terreno madre del tumore primitivo. Questo secondo tipo di metastasizzazione ematogena viene chiamato *tipo elettivo*.

La metastasizzazione ematogena segue, indipendentemente dalle leggi idrodinamiche della circolazione del sangue, la suscettibilità dei diversi tessuti e l'accrescimento delle metastasi in essi. Senza arresto le cellule neoplastiche isolate circolano nel sangue passando tutti i filtri capillari. Data la specificità del substrato viene simulata

una malattia sistematica; la topografia del tumore primario non giuoca un ruolo riguardo all'ordine della comparsa delle metastasi.

Negli stadi tardivi, però si ha un tracollo della resistenza e quindi una generalizzazione.

Quale primo esempio dimostro in figura 2-a il *tipo del midollo osseo*. Lo schema è basato su di un caso di plasmocitoma in una vertebra toracica in un uomo di anni cinquantacinque, con metastasi in tutto il sistema osseo e mancanza completa di esse nei polmoni. L'origine del tumore primario è nel midollo osseo ove le cellule neoplastiche circolanti nel sangue si fermano. Il paziente prima di arrivare allo stadio di generalizzazione è deceduto per compressione del midollo spinale. Grande importanza assume in questo caso la puntura sternale come pure l'esame del sangue per ricercare le cellule neoplastiche. Il plasmocitoma extramidollare si comporta del resto come quello midollare dimostrato in figura 2-b. In un uomo di anni cinquanta il tumore primario trovasi nell'epifaringe; nel collo si possono osservare delle metastasi linfoghiandolari bilaterali. Un anno e mezzo dopo irradiazione del tumore primario e delle metastasi regionali con risultato favorevole si trova una metastasizzazione elettiva di tutto lo scheletro analoga alla malattia di Kahler. La durata completa della malattia fu di tre anni e otto mesi. Il terzo esempio del tipo di midollo osseo che dimostro è un sarcoma di Ewing in un uomo di anni diciotto colpito da tumore primario nella tibia sinistra (Fig. 2-c). Rapidamente compaiono delle metastasi ossee al cranio, bacino e femore. Altre metastasi non vengono riscontrate fino al decesso. La durata della malattia fu di 2 anni e 4 mesi. Trattasi anche in questo caso di una metastasizzazione precoce ematogena elettiva.

Nel *tipo linfatico* della metastasizzazione elettiva tutti i linfonodi sono ingrossati; oltre il fegato e la milza che sono colpiti abbastanza presto, non si vede più nessun'altra metastasi. Non di rado ci si riferisce in questo stadio ad una linfo-sarcomatosi generalizzata. Nel nostro esempio (Fig. 3) viene considerato quale tumore primario un grosso pacchetto di linfonodi paravertebrali. Ci sono però esempi sufficienti per il fatto che veramente si trova in un luogo qualunque dell'organismo, per esempio nel collo, un isolato linfonodo ingrossato che, mediante puntura o biopsia viene riconosciuto quale linfo-

sarcoma. Poche settimane o mesi più tardi viene constatata una linfo-sarcomatosi generalizzata. Secondo la nostra opinione queste metastasi linfooghiandolari non originano per via linfatica ma per via ematica. Il tumore primitivo invia degli emboli cellulari attraverso le vie linfatiche abducenti per il dotto toracico nella vena cava superiore. Essi circolano nel sangue e si attaccano ad un substrato adeguato, cioè nel tessuto linfatico di tutto l'organismo. Le cellule neoplastiche passano attraverso le arterie nutritive nei linfonodi. Il risultato negativo della puntura sternale ed il risultato positivo della puntura lienale ed epatica è un fatto diagnosticamente prezioso. L'esame del sangue, talvolta, dà una linfoopenia.

Il tipo *retoteliiale* o *reticoloendoteliiale* è molto polimorfo. Nel nostro schema (Fig. 4-a) trattasi di un *sarcoma globocellulare* dello struma che ha diffuso elettivamente tanto nei linfonodi quanto nei follicoli solitari e nelle placche del Peyer dell'intestino e specialmente anche nell'appendice; e poi ancora nel fegato e nel midollo osseo. I polmoni e gli altri organi rimangono liberi. Tutti i summenzionati luoghi di diffusione appartengono al sistema reticoloendoteliiale in senso stretto. La diagnosi venne posta mediante biopsia del tumore primario. Per confermare la diagnosi, è di grande valore la puntura dei linfonodi e del fegato. In certe condizioni si osservano radiologicamente dei focolai nel midollo osseo. L'esame del sangue non rivela alcunchè di anormale. La durata della malattia è stata press'a poco due anni. Appartengono a questo gruppo anche i sarcomi globocellulari del timo che sono molto radiosensibili ed altamente maligni; metastasizzano presto e contemporaneamente nel sistema linfatico, nella milza, nel fegato e nel midollo osseo (Figura 4-b). Verso la fine non di rado si ha un'invasione di cellule neoplastiche nel sangue che dà l'immagine di una leucemia acuta. Oggi si parla in questi casi di leucemia leucoblastica. Anche il nostro paziente venne a morte di leucemia micromieloblastica dopo un intervallo di 6 mesi dalla irradiazione, durante il quale non manifestò alcun sintomo.

La radiografia del torace dimostra un tumore mediastinico bilaterale prima dell'inizio del trattamento e scomparso dopo irradiazione. Dalla biopsia fatta su di una linfooghiandola sopraclaviculare si ottiene il seguente risultato:

Non di rado le cellule neoplastiche sono a nucleo nudo; nel caso che vi sia del plasma cellulare, questo è scarsamente basofilo; i nuclei sono rotondeggianti, spesso polimorfi, ed hanno un contenuto molto vario di cromatina. Si trovano numerose mitosi e picnosi. Nella puntura sternale non si osservano degli elementi normali del midollo osseo, però una cultura pura di cellule neoplastiche. Le cellule sono rotondeggianti, non di rado anche con nucleo polinucleolare.

Un decorso analogo abbiamo osservato, 6 settimane prima del ricovero ospitaliero, in una donna di anni trentasei con tumore medianistico, pleurite essudativa destra e linfonodi sopraclavicolari. La biopsia rivelò nuovamente un sarcoma globocellulare. Guarigione locale mediante irradiazione con scomparsa del tumore mediastinico e del versamento pleurico. Il quadro ematologico dapprima fu normale; più tardi si notò una leucopenia di circa 3 mila, dopo 2 mesi un aumento a ventiquattro mila. La differenziazione non dimostrò alcun elemento patologico. I medici internisti posero la diagnosi di leucemia linfoidea aleucemica. In un controllo fatto più tardi venne scoperto nel sangue una leucemia micromieloblastica; 2 settimane dopo, esito letale sotto il quadro di anemia progressiva con diatesi emorragica. La diagnosi anatomo-patologica ha dato una leucemia mieloblastica ed infiltrati leucemici nel fegato, nella milza e nei linfonodi.

Il terzo esempio che dimostro è un *tumore primitivo della tonsilla*, istologicamente riconosciuto dapprima come linfogranuloma e più tardi come linfo sarcoma. Dopo irradiazione guarigione e assenza di sintomi per un anno e mezzo. Compaiono poi dei pacchetti linfo ghiandolari inguinali che dopo irradiazione scompaiono; nuovamente assenza di sintomi per un anno. Di poi si manifestano rapidamente estesi tumori linfo ghiandolari in tutto l'organismo come pure un esoftalmo a sinistra in seguito a metastasi alla base del cranio. Mentre nel periodo precedente il quadro ematologico era completamente normale, 4 anni dopo l'inizio del trattamento si ha una leucemia micromieloblastica. I globuli bianchi aumentano a ventisette mila, poi diminuiscono subito. La puntura sternale conferma la diagnosi e si arriva all'esito letale sotto l'immagine d'una gravissima

leucopenia. Al striscio sternale non si trova alcun elemento normale, però piccole cellule neoplastiche a carattere linfoide.

Appartiene pure al tipo retoteliale il *simpatogonioma* (Fig. 5-a). Il tumore primitivo è localizzato alla surrenale. Si ha molto precocemente una diffusione ematogena nel sistema scheletrico, fegato, milza e nei linfonodi. In caso che prevalga la metastasizzazione nel fegato e nella milza, si parla del *tipo di Pepper*; in caso di metastasizzazione nel midollo osseo, del *tipo di Hutchinson*. Il nostro schema rappresenta uno stadio intermedio dato che troviamo prevalentemente delle metastasi ossee, ma contemporaneamente anche delle metastasi epatiche. Trattasi dunque in entrambi i tipi solamente di una forma di metastasizzazione ematogena elettiva nel sistema reticoloendoteliale che differisce nel tempo della sua manifestazione. In questo caso, la manifestazione nelle due surrenali, può essere spiegata con una metastasizzazione ematogena del tumore primitivo da una surrenale nell'altra. In senso stretto, quella pure fa parte del sistema reticoloendoteliale. Per la diagnosi e per rendere visibile le surrenali si deve ricorrere al metodo della insufflazione di aria ed alla puntura sternale.

L'ultimo esempio del tipo retoteliale dimostra in Fig. 5-b un reticulosarcoma. Il tumore primario si è localizzato in un linfonodo cervicale. La diffusione negli altri linfonodi dell'organismo, nel fegato e nella milza proseguiva lentamente; verso la fine nello scheletro; i polmoni invece rimanevano liberi per tutto il lungo periodo della malattia. Il tipo di metastasizzazione reticoloendoteliale dà una prova indiretta della esattezza della denominazione di sistema reticoloendoteliale secondo Landau ed Aschoff. Viene confermato dal fatto della metastasizzazione elettiva di certi meristomi.

Vengono rappresentate le date cliniche ed il decorso dei nostri ammalati in una tabella sinottica (Fig. 14). Si vede in essa l'andamento delle fasi ed il susseguirsi della manifestazione nei diversi sistemi organici. Alla guarigione del tumore primario segue sempre un periodo di latenza prima che si manifestino le metastasi. In caso di insuccesso, la metastasizzazione elettiva prosegue senza arresto.

L'alta radiosensibilità e la predisposizione ad una lesione meccanica e tossica è un'altra caratteristica della metastasizzazione elet-

tiva. La radiosensibilità non va però di pari passo con la radiocurabilità. La grande maggioranza di tutti i nostri pazienti muore alla fine in seguito a metastasizzazione elettiva o generalizzata.

Nella patologia generale dei tumori non viene usata finora la espressione di metastasizzazione elettiva per il fatto che non di rado gli anatomico-patologi non vedono i casi prima che siano entrati nello stadio di una completa ed irregolare generalizzazione, ed anche perchè i clinici, benchè osservino gli stadi summenzionati, non danno a questi che una vaga denominazione di malattia sistematica. Fatto è che esistono delle vere malattie sistematiche, per esempio le tesarismi. In questi casi, però, l'inizio della lesione è localizzato, si sistematizza e alla fine si assiste ad una generalizzazione. La sistematizzazione non rappresenta che una fase nel decorso della malattia.

Ancora e brevemente accennerò un altro esempio di metastasizzazione elettiva: le *metastasi nel liquor* dei tumori maligni del sistema nervoso centrale che appaiono molto spesso nei casi di *medulloblastoma*, tumore molto radiosensibile, e raramente nel *glioblastoma multiforme*. I tumori primari sono caratterizzati da un accrescimento rapido ed invasivo e sono bene vascolarizzati. Nonostante non si osservino mai delle metastasizzazioni ematogene a distanza. Pare che gli emboli non trovino un substrato adeguato al di fuori del sistema nervoso centrale e che regrediscano subito. Si ha però accrescimento solo in caso di invasione nel liquor. Quest' ipotesi trova una conferma indiretta nel fatto che non esiste neppure un infiltrato nel tessuto extracraniale anche in caso di contatto molto stretto dopo apertura operativa del tumore. Solamente in qualche caso di glioblastoma multiforme viene osservato un infiltrato nel tessuto sottocutaneo e nella cute. Nell'esempio suesposto l'elettività si limita agli spazi del liquor; non si trovano delle metastasi ematogene. Gli spazi del liquor, del resto, formano anche un substrato molto favorevole per i tumori primari di altre localizzazioni. Per esempio, i carcinomi del faringe invadono direttamente il sacco durale e si diffondono negli spazi del liquor che forma un substrato piuttosto favorevole.

RIASSUNTO

1. — Nei carcinomi differenziati e nei sarcomi la metastasizzazione ematogena dipende puramente dalle leggi meccaniche della circolazione. Trattasi o del tipo polmonale o epatico e della polmonare.

2. — La metastasizzazione ematogena nei meristomi non è casuale ma conforme ad una legge: Le metastasi ematogene si sviluppano e crescono là dove il substrato morfologicamente o biochimicamente è analogo o molto simile al terreno madre dello sviluppo neoplastico. Trattasi di un tipo di metastasizzazione elettiva.

3. — Il tipo di metastasizzazione elettiva è suddiviso in un tipo del midollo osseo, in un tipo linfatico ed in un tipo retoteliiale. Le cellule neoplastiche circolano nel sangue. Invece dell'embolo neoplastico abbiamo l'embolo cellulare.

4. — Si arriva alla metastasizzazione generale con cachessia generale soltanto negli stadi finali. Questo stadio viene osservato oggi più spesso in seguito al trattamento radiante.

ZUSAMMENFASSUNG

1. - Bei ausdifferenzierten Carcinomen und Sarkomen folgt die haematogene Metastasierung den mechanischen Kreislaufgesetzen: Lungentypus, Lebertypus, Pulmonalstypus.

2. - Bei Meristomen dagegen handelt es sich um einen elektiven Metastasierungstypus. Die haematogenen Metastasen gehen dort an, wo das Substrat dem Mutterboden der Primärgeschwulst morphologisch und biochemisch gleich oder ähnlich ist.

3. Die elektive Metastasierung zerfällt in den Knochenmarkstypus, den lymphatischentypus und den Retotheltypus. Die Malignomzellen zirkulieren im Blut als Zellenboli.

4. Erst im Endstadium kommt es unter Kachexie zur allgemeinen Metastasierung. Dieses Stadium kommt heute infolge der Strahlenbehandlung häufiger zur Beobachtung als früher.

INDEX ANALITIQUE
INDEX OF SUBJECTS
INHALTSVERZEICHNIS
INDICE ANALITICO

INDEX ANALITIQUE

- Acenaphthanthracène, 259.
 Acetylaminofluorène, 6, 131, 254, 256.
 2-acetyl-amino-6-hydroxynaphtalène, 94.
 Adrénaline, 197.
 Alanine dans le sang de rats normaux
 et sarcomateux, 226, 227.
 Alimentation et cancer, 6, 16, 48-53, 56.
 Alloxane, 146.
 Aminoacides, 95 (Contenu en) dans le
 sang et sérum normaux et cancé-
 reux, 223 et suiv.
 0-amino-azotoluène, 253.
 0-amino-azotoluol, 56, 253.
 Aminofluorène, 254.
 4-aminofolique (Acide), 96.
 2-amino-1-naphtol, 93.
 Aminoptérine, 96.
 Aminostilbène, 90.
 Androgènes, 82, 96.
 Anthracène, 88, 90, 91, 254.
 Anticancérigène (Effet), 2.
 Arginase, 196, 198, 199, 224.
 Arginine, 224, 225.
 Arsenic, 193.
 Ascorbique (Acide), 175.
 Autoprotéolyse dans les extraits de foie,
 254, 256.
 Azodérivés et cancer expérimental, 55
 et suiv.
 Azote-ypérite, 81-87, 94-96, 105, 143-
 146, 151, 170.

INDEX OF SUBJECTS

- Acenaphthanthracene, 259.
 Acetylaminofluorene, 6, 131, 254, 256.
 2-acetyl-amino-6-hydroxynaphthalene,
 94.
 Adrenal hyperplasia, 273.
 Adrenaline, 197.
 Alanine in the blood of normal and
 sarcom. Rats, 226, 227.
 Alloxan, 146.
 Aminoacids, 95.
 Aminoacids in normal and sarcomatous
 Blood and Serum, 223 a. ff.
 0-amino-azotholuene, 56, 253.
 Aminofluorene, 254.
 4-aminofolic acid, 96.
 2-amino-1-naphthol, 93.
 Aminopterin, 96.
 Aminostilbenes, 90.
 Androgens, 82, 96.
 Anthracene, 88-91, 254.
 Anticarcinogenic action, 2.
 Antimutagenic factors, 27.
 Arachis oil, 131.
 Arginase, 195, 198-199, 224.
 Arginine, 224, 225.
 Arsenic, 193.
 Ascorbic acid, 175.
 Autoreproduction of Cells, 25, 26, 142,
 144, 148, 151, 155, 165, 171.
 Autoproteolysis in liver extracts, 254,
 256.

INHALTSVERZEICHNIS

- Acenaphthanthracen, 259.
 Acetylaminofluoren, 6, 131, 254, 256.
 2-acetyl-amino-6-hydroxynaphtalen, 94.
 Adrenalin, 197.
 Alanin im Blut von normal. und sarkom. Ratten, 226, 227.
 Alloxan, 146.
 0-aminoazo-toluol, 56, 253.
 Aminofluoren, 254.
 4-aminofol, 96.
 2-amino-1-naphthol, 93.
 Aminopterie, 96.
 Aminosäuren, 95.
 Aminosäuregehalt des Blutes und des Serum von normal. und sarkom. Tieren, 223 u. ff.
 Aminostilben, 90.
 Androgene, 82, 96.
 Anthracen, 88-91, 254.
 Anticancerogene Wirkungen, 2.
 Antimutagene Faktoren, 27.
 Arachis Öl, 131.
 Arginase, 196, 198-199, 224.
 Arginin, 224, 225.
 Arsen, 193.
 Ascorbinsäure, 175.
 Atmung der Tumoren, 85, 94, 95.
 Autoproteolyse im Leberextrakt, 254, 256.

INDICE ANALITICO

- Acenaftantracene, 259.
 Acetilaminofluorene, 6, 131, 254, 256.
 2-acetilamino-6-idrossinaftalene, 94.
 Acidi nucleinici, 84, 86, 238, 250.
 Acido 4-aminofolico, 96.
 Acido ascorbico, 175.
 Acido cianidrico e sarcoma di Rou, 243, 249, 250.
 Acido desossiribonucleinico, 44, 48.
 Acido lattico, 87, 194, 195, 206.
 Acido laurico, 56.
 Acido osmico, 90.
 Acido perbenzoico, 89, 90.
 Acido piruvico nei tumori, 233-235.
 Alanina nel sangue di ratti normali e sarcomatosi, 226, 227.
 Alimentazione e cancro, 6, 16, 48-53, 56.
 Allossano, 146.
 Aminoacidi, 95.
 — (Contenuto in) del sangue e del siero normali e cancerosi, 223 e segg.
 0-amino-azotoluene, 56, 253.
 Aminofluorene, 254.
 2-amino-1-naftolo, 93.
 Aminopterie, 96.
 Aminostilbene, 90.
 Androgeni, 82, 96.
 Antracene, 88, 90, 91, 254.
 Arginasi, 196, 198, 199, 224.

INDEX ANALITIQUE

- Ball (British Antilewisite), 254, 260.
 Benzacridines, 107-121.
 — (Structure électronique de la molécule des), 109, 110.
 Benzantracène, 109-113, 119.
 Benzoil-amino-estryl-chinoleine. (Sarcome du rat produit par), 209 et suiv.
 Benzopyrène, 3, 14-15, 19-21, 134, 141, 151, 226, 233, 251-256, 259.
 — (Métabolisme du), 90, 92, 129-131, 134.
 — (Solvants du), 128.
 — (Fluorescence du), 128, 130.
 3, 4-Benzphénanthrène, 91.
 Bersaille (Théorie du), 88, 150, 151.
 Biotine, 179.
 Calcium, 175, 179, 181, 204.
 Cancer.
 — (Adaptations, modulations, mutations cellulaires en rapport avec le Milieu et), 23, 31, 36, 46-62.
 — (Biochimie du), 79 et suiv., 193 et suiv.
 — (Chimiothérapie du), 79-98, 135 et suiv.
 — (Dédifférentiation du), 193 et suiv.
 — (Étiologie du), 1, 16 et suiv., 136 et suiv., 200.
 — et alimentation, 6, 16, 48-53.
 — et hérédité, 23 et suiv., 59, 60, 151, 155.
 — et Radiations, 135 et suiv.
 — (Incidence du), 3, 6, 7, 60, 151.
 — (Induction du), 19, 79, 153, 269, 270.
 — (Métabolisme du), 193 et suiv.
 — (Pluralité du), 194 et suiv.

INDEX OF SUBJECTS

- Azocompounds and experimental cancer (Cfr. also Hydrocarbons, Carcinogenic Agents), 55 a. ff.
 Barley, 58, 59.
 Benzacridines, 107-121,
 — (Electronic structure of), 109, 110.
 Benzantracene, 109-113, 119.
 Benzoyl-amino-estryl-chinolein. (Sarcoma of rats by), 209 a. ff.
 3,4-benzphenanthrene, 91.
 Benzpyrene, 3, 14-15, 19-21, 134, 141, 151, 226, 233, 251-256, 259.
 — (Fluorescence of), 128, 130.
 — (Metabolism of), 90, 92, 129-131, 134.
 — (Solvents of), 128.
 Biotin, 179.
 Blood. (Amino acids in normal and cancerous), 223 a. ff.
 Bone marrow. (Damages of) by radiations, 84, 96.
 British Antilewisite (Ball), 254, 260.
 Calcium, 175, 179, 181, 204.
 Cancer. (Adaptations, modulations, mutations, rapport with the environment and), 23, 46-62.
 — and Diet, 6, 16, 48-53.
 — and Heredity, 23 a. ff., 59, 60, 151, 155.
 — (Biochemistry of), 79 a. ff., 193 a. ff., 207.
 — (Chemiotherapy of), 79-98, 135 a. ff.
 — (Dedifferentiation of), 193 a. ff.
 — (Incidence of), 3, 6, 7, 60, 61, 151.
 — (Induction of), 19, 79, 153, 269, 270.
 — (Metabolism of), 193 a. ff.

INHALTSVERZEICHNIS

- Azoverbindungen. (Cfr. auch Kohlenwasserstoffe und cancerogene Agenten), 55 u. ff.
- Ball (« British Antilewisite »), 254, 260.
- Benzacridinen, 107-121.
- (Elektronische Struktur der), 109, 110.
- Benzanthracen, 109-113, 119.
- 3,4-Benzophenanthren, 91.
- Benzopyren, 3, 14-15, 19-21, 134, 141, 151, 226, 233, 251-256, 259.
- (Fluoreszenz des), 128, 130.
- (Lösungsmittel des), 128.
- (Stoffwechsel des), 90, 92, 129-131, 134.
- Bestrahlungen. (Cfr. Strahlungen).
- Benzoyl-amino-estryl-chinolin. (Rattensarkome durch), 209 u. ff.
- Biotin, 179.
- Blut (Aminosäuren im normale und krebsige), 223 u. ff.
- Brenztraubensäure in der Tumoren, 233-235.
- Brenztraubensäure-oxydase, 87.
- Brustkrebs. (Cfr. Mammakrebs).
- Calcium, 175, 179, 181, 204.
- Cancericide Strahlungen, 135, 137.
- Cancericide Wirkungen (Effekte), 135-146, 155, 165.
- Cancerogene (Substanzen). (Cfr. Kohlenwasserstoffe Azoverbindungen), 2, 3, 14-16, 46, 75, 86, 88, 95, 136-145, 153, 155, 165, 170, 180, 191, 193.
- (Lösungsmittel der) 27-131.
- (Stoffwechsel der), 89-93, 105.
- Strahlungen, 135-141.

INDICE ANALITICO

- Arginina, 224, 225.
- Arsenico, 193.
- Automoltiplicazione cellulare, 25, 26, 142, 144, 148, 151, 155, 165, 171.
- Autoproteolisi in estratti di fegato, 254, 256.
- Azocomposti e cancro sperimentale. (Vedi anche Idrocarburi e Agenti cancerogeni), 55 e segg.
- Azoto-iprite, 81, 83-87, 94-96, 105, 143-146, 151, 170.
- Ball (British antilewisite), 254, 260.
- Benzacridine, 107-121.
- (Struttura elettronica delle), 109, 110.
- Benzanthracene, 109-113, 119.
- Benzenofantrene, 91.
- Benzoil-amino-estiril-chinoleina (sarcoma del ratto da), 209 e segg.
- Benzopirene, 3, 14-15, 19-21, 134, 141, 151, 226, 233, 251-256, 259.
- (Fluorescenza del), 128, 130.
- (Metabolismo del), 90, 92, 129-131, 134.
- (Solventi del), 128.
- Bersaglio (Urto) (Teoria del) nel cancro, 88, 150, 151.
- Biotina, 179.
- Calcio, 175, 179, 181, 204.
- Cancericidi (Agenti), 135-146, 156, 165 (distruggenti il cancro).
- Cancerogene (Sostanze). (Vedi anche Cancerogenesi, Azocomposti e Idrocarburi), 2, 3, 14-16, 46, 75, 86, 88, 95, 135-145, 153, 155, 165, 170, 180, 191, 193.
- (Metabolismo delle) 89, 90-93, 105.

INDEX ANALITIQUE

- (Propriété du) à produire acide lactique, 195.
- (Sérologie et immunologie du), 223 et suiv.
- (Théories sur le) V. Théories.
- (Thérapie du), 79-98, 135-145, 172.
- Cancer de la peau, 5, 15, 18, 20, 46 et suiv., 52, 55, 59, 107, 131, 139, 174, 181, 191, 198.
- de la prostate, 82, 96, 197, 207.
- du foie chez le rat, 55 et suiv.
- du poumon chez la souris, 80, 96, 143, 153.
- spontané chez les animaux, 138, 153.
- Cancer du sein chez la souris, 60 et suiv. 82, 96, 150, 155, 196, 244.
- (Éthiologie du), 269 et suiv.
- (Génétique du), 271 et suiv.
- (Organes endocrines dans le), 272.
- (Ovairectomie et), 272.
- Cancer par irritation, 153.
- par radiations, 136, 139-140, 146, 151.
- Cancéricides (Agents), 135-146, 156, 165, (détruisants le cancer).
- Cancérigènes (Substances) (V. aussi Cancérigène, Azodérivés, Hydrates de carbone), 2, 3, 14-16, 20, 46, 75, 86, 88, 95, 135-145, 153, 155, 165, 170, 180, 191, 193.
- (Métabolisme des), 89, 90-93, 105.
- (Solvants organiques des) et cancérisation, 127-131.
- Cancérisation.
- (Alimentation et), 6, 16, 48 et suiv., 59.
- (Biochimie de la), 79 et suiv., 86, 94, 134, 193 et suiv., 257.
- (Extraits de coeur et), 53 et suiv.

INDEX OF SUBJECTS

- (Pathogenesis of), 1, 16 a. ff., 136 a. ff., 200.
- (Plurality of), 194, a. ff.
- (Properties of), to produce lactic acid, 195.
- (Radiations and), 135 a. ff.
- (Serology and Immunology of), 223 a. ff.
- (Theories on) Cfr. Theories, 172.
- (Therapy of), 79-98, 135-145.
- Cancer of the Breast. (Cfr. Mammary Cancer).
- Cancer destroying Agents, 135-146, 155, 165.
- Cancer destroying Radiations, 135-137.
- Cancer gens, 149.
- Cantharidin, 2.
- Carbohydrate (Metabolism of), 28, 29, 33, 193, 195, 205.
- Carboxypeptidases, 85.
- Carcinogenesis.
- (Biochemistry of), 79 a. ff., 86, 94, 134, 193 a. ff., 205, 257.
- (Biological mechanism of), 1, 3, a. ff., 6-9, 20, 23 a. ff., 46, 59 a. ff., 81, 119, 147-154, 172, 175, 178, 193 a. ff.
- (Extract of heart and), 53 a. ff.
- (Extract of liver and), 49 a. ff.
- (General modifications by), 147.
- (Genetic factors of), 6, 8, 17, 23 a. ff.
- (K-regions and), 88-94, 110, 112, 119, 258.
- (Latent period of), 2, 3, 5-7, 14-17, 46, 82, 129.
- (Nutrition and), 6, 16, 48 a. ff., 59.
- (Oestrogens and), 15, 59, 60, 81, 82, 96.

INHALTSVERZEICHNIS

- Cancerogenese.
 — (Allgemeine Modifikationen in der), 147.
 — (Biochemie der), 79 u. ff., 86, 94, 134, 193 u. ff., 205, 257.
 — (Biologische Mechanismus der), 1, 3, u. ff., 6-9, 20, 23 u. ff., 46, 59 u. ff., 81, 119, 147-154, 172, 175, 178, 193 u. ff.
 — (Ernährung und), 6, 16, 48 u. ff., 59.
 — (Genetische Faktoren der), 6, 8, 17, 23 u. ff.
 — (Herzextrakt und), 53 u. ff.
 — (K-region und), 88-94, 110, 112, 119, 258.
 — (Latenzzeit der), 2-3, 5-7, 14-17, 46, 82, 129.
 — (Leberextrakt und), 49 u. ff.
 — (Organische Lösungsmittel und), 127-131.
 — (Oestrogene und), 15, 59, 60, 81, 82, 96.
 — (SH-Verbindungen und), 251 u. ff.
 — (Strahlungen und), 79 u. ff., 136 u. ff.
 — (Theorien auf) Cfr. Theorien.
 Cantharidin, 2.
 Carboxypeptidasen, 85.
 Chemotherapie des Krebses (Cfr. Krebstherapie), 79-98, 135-146.
 Chloroethylamine, 83, 84, 87, 88, 96.
 bis ($\beta\beta'$ -chloroethyl) 2-naphthylamin, 81.
 Cholesterin, 60.
 Cholesterol, 14, 21, 93.
 Chromogene. (Cfr. Kerngene).
 Chromosomen. (Cfr. Mitosen und Kern), 26, 75, 79-88, 94, 95, 105, 144, 145, 170, 179, 180.

INDICE ANALITICO

- (Solventi organici delle) e cancerizzazione, 127-131.
 Cancerogenesi. (Vedi anche Cancro).
 — (Alimentazione e), 6, 16, 48 e segg., 59.
 — (Biochimica della), 79 e segg., 86, 94, 134, 193 e segg., 257.
 — (Estratti di cuore e), 53 e segg.
 — (Estratti di fegato e), 49 e segg.
 — (Estrogeni e), 15, 59, 60, 81, 82, 96.
 — (Fattori genetici della), 6, 8, 17, 23 e segg.
 — (K-regioni molecolari e), 88-94, 110, 112, 119, 258.
 — (Meccanismi della), 1, 3 e segg., 6-9, 20, 23 e segg., 46, 59 e segg., 81, 82, 119, 147-154, 172, 175, 178, 193 e segg.
 — (Modificazioni generali nella), 147.
 — (Periodo di latenza della), 2, 3, 5-7, 14-17, 46, 82, 129.
 — (Radiazioni e), 79 e segg., 136 e segg.
 — (SH-gruppi e), 251 e segg.
 — (Solventi organici degli agenti cancerogeni e), 127-131.
 — (Teorie sulla). Vedi Teorie.
 Cancro.
 — (Adattamenti, modulazioni, mutazioni cellulari in rapporto all'ambiente e), 23, 31, 36, 46-62.
 — (Biochimica del), 79 e segg., 193 e segg.
 — e alimentazione, 6, 16, 48-53.
 — (Chemioterapia del), 79-98, 135 e segg.
 — e eredità, 23 e segg., 59, 60, 151, 155.
 — (Incidenza del), 3, 6, 7, 60, 61.

INDEX ANALITIQUE

- (Extraits de foie et), 49 et suiv.
- (Facteurs génétiques de la), 6, 8, 17, 23 et suiv.
- (K-regions moléculaires et), 88-94, 110, 112, 119, 258.
- (Mécanismes de la), 1, 3 et suiv., 20, 23 et suiv., 46, 59 et suiv., 81, 119, 147-154, 172, 175, 178, 193 et suiv.
- (Modifications générales dans la), 147.
- (Oestrogènes et), 15, 59, 81, 96.
- (Période de latence dans la), 2, 3, 5-7, 14-17, 46, 82, 129.
- (Radiations et), 79 et suiv., 136 et suiv.
- (Solvants organiques pour les substances cancérigènes et), 127-131.
- (Thiols et), 251 et suiv.
- (Théorie sur la) V. Théories.
- Cantharidin, 2.
- Carboxypeptidase, 85.
- Caseine, 56.
- Catalase, 199, 204.
- Catepsines, 243, 244, 252, 255.
- Cellule.
 - (Auto-reproduction), 25, 26, 142, 144, 148, 151, 155, 165, 171.
 - (Anomalies dans la division), 86, 88, 95, 205.
- Céphaline, 93.
- β -Chloro-éthyl-amines, 83, 84, 87, 88, 96.
- bis - ($\beta\beta'$ -chloroéthyl) 2-naphthyl-amine, 81.
- Chimiothérapie du cancer, 79-98, 135-146.
- Cholestérine, 60.
- Chromogènes. (V. Gènes nucléaires).

INDEX OF SUBJECTS

- (Organic solvents and), 127-131.
- (Radiations and), 79 a. ff., 135 a. ff.
- (SH-compounds and), 251 a. ff.
- (Theories of). Cfr. Theories.
- Carcinogenic Radiations, 135-141.
- Carcinogenic substances. (Cfr. Hydrocarbons Azocompounds), 2, 3, 14-16, 46, 75, 86, 88, 95, 135-145, 153, 155, 165, 170, 180, 191, 193.
- (Metabolism of), 89, 90-93, 105.
- (Organic solvents of), 127-131.
- Casein, 56.
- Catalysis, 199, 204.
- Catepsines, 243, 244, 252, 255.
- Cell Division (Abnormalities of), 18, 25, 86, 88, 95, 205.
- Cephaelin, 93.
- Chemotherapy of cancer. (Cfr. Therapy of cancer), 79-98, 135-146.
- Chetosteroids in the stools of mice, 276.
- Chloroethylamines, 83, 84, 87, 88, 96.
- bis ($\beta\beta'$ -Chloroethyl) 2-naphthylamine, 81.
- Cholesterin, 60.
- Cholesterol, 14, 21, 93.
- Chromogens. (Cfr. Nucleogens).
- Chromosomes. (Cfr. Mitoses and Nucleus), 26, 75, 79, 80-88, 94, 95, 105, 144, 145, 170, 179, 180.
- (Cross-linkage of), 88.
- Cocarcinogenesis, 2, 14-20, 48, 82, 83, 119, 131.
- Colchicine, 143, 170.
- Croton oil, 2, 3-8, 14-17, 21, 84, 119, 131.
- Cultures of tissues in vitro, 138, 144, 172.
- Cyanidric acid and Rous's sarcoma, 243, 249, 250.

INHALTSVERZEICHNIS

- (« Linkage » der), 88.
 Co-cancerogenese, 2, 14-20, 48, 82, 83, 119, 131.
 Colchicin, 143, 170.
 Crotonöl, 2, 3-8, 14-17, 21, 84, 119, 131.
 Cyanwasserstoffsäure und Rous Sarkom, 243, 249, 250.
 Cystein, 88, 253, 260.
 Cytochrome C, 195, 198.
 Cytogene. (Cfr. Plasmagene).
 Dehydrogenase, 85, 253, 254.
 Desoxyribonucleinsäure, 44, 48.
 Dibenzacridines, 20.
 1,2,5,6-Dibenzanthracen, 14, 80, 91-94, 127.
 3,4,5,6-Dibenzphenanthren, 259.
 Diethylstilboestrol, 59, 60.
 Dihydroxy-dihydrobenzpyren (BPX), 92, 134.
 Dimercaptopropanol. (Cfr. Ball), 254.
 4-Dimethyl-aminoazobenzol, 55.
 Dimethyl-aminobenzol, 90, 91.
 4-Dimethyl-aminostilbene, 94.
 Dimethyl-azobenzol, 58.
 9,10-Dimethyl 1,2-Benzanthracene, 80, 90, 91, 139.
 Drosophila melanogaster, 20, 36, 43, 79, 80, 84, 141-143, 155.
 Eisen, 179.
 Elektronen.
 — (Ladungsdichte der), 88-90, 108-109.
 — (Elektronische Theorie des Krebs), 107-121, 140, 257-260.
 Embryonale Organisatoren, 141.
 Entdifferenzierung der Krebszellen, 205.
 Enzyme, 24, 85, 86, 138, 171, 175, 191, 195, 197, 238, 244, 251 u. ff.

INDICE ANALITICO

- (Incidenza familiare del), 151.
 — (Induzione del), 19, 79, 153, 269, 270.
 — (Metabolismo del), 193 e segg.
 — (Patogenesi del), 1, 16 e segg., 136 e segg., 200.
 — (Pluralità del), 194 e segg.
 — (Proprietà del) a produrre acido lattico, 195.
 — (Radiazioni e), 135 e segg.
 — (Sdifferenziazione del), 193 e segg.
 — (Sierologia e immunologia del), 223 e segg.
 — (Teorie sul). Vedi Teorie.
 — (Terapia del), 79-98, 135-145, 172.
 Cancro da irritazione, 153.
 — da metalli, 139.
 — da radiazioni, 136, 139-140, 146, 151.
 — del fegato del ratto, 55 e segg.
 — del polmone nel topo, 80, 96, 143, 153.
 Cancro della mammella nel topo, 60 e segg., 82, 96, 150, 155, 196, 244.
 — (Eziologia del), 269 e segg.
 — (Genetica del), 271.
 — (Organi endocrini nel), 272.
 — (Ovariectomia e), 272.
 Cancro della pelle, 5, 15, 18, 20, 46 e segg., 52, 55, 59, 107, 131, 139, 174, 181, 191, 198.
 — della prostata, 82, 96, 197, 207.
 — spontaneo in animali, 138, 153.
 Cantaridina, 2.
 Carboidrati (metabolismo dei), 28, 29, 33, 193, 195, 205.
 Carbossipeptidasi, 85.
 Caseina, 56.
 Catalasi, 199, 204.

INDEX ANALITIQUE

- Chromosomes. (V. aussi Mitoses et Noyau), 26, 75, 79-88, 94, 105, 144, 170, 179.
 — (Cross-linkage des), 88.
 Cocancérigénèse, 2, 14-20, 48, 82, 119, 131.
 Coeur. (Facteurs alimentaires dans le), 53 et suiv.
 Colchicine, 143, 170.
 Croissance.
 — (Facteurs de régulation de la), 48.
 — (Inhibition de la), 21, 56, 79, 80, 86, 94-96.
 — du cancer, 146, 194, 199, 223.
 — et oestrogènes, 60.
 Cultures in vitro, 138, 144, 172.
 Cyanydrique (Acide) et Sarcome de Rous, 243, 249, 250.
 Cysteine et substances concérigènes, 88, 253, 260.
 Cytochrome C, 195, 198.
 Cytogènes. (V. Gènes plasmatiques).
 Cytolytiques (Effets), 137, 138, 140, 145, 165.
 Cytomorphologiques (Effets), 144.
 Cytoplasma, 25, 149.
 — (Poisons du), 96.
 Dédifférentiation des cellules cancéreuses, 193 et suiv.
 Déhydrogenase, 85, 253, 254.
 Désoxyribonucléiques (Acides), 44, 48.
 Dibenzacridines, 20.
 1,2,5,6-dibenzanthracène, 14, 80, 91-94, 127.
 3,4,5,6-dibenzophénanthrène, 259.
 β -dichloro-diéthylsulphide, 80.
 Diéthylstilboestrol, 59, 60.

INDEX OF SUBJECTS

- Cysteine, 88, 253, 260.
 Cytochrome C, 195, 198.
 Cytogens. (Cfr. Plasmagens).
 Cytolytic actions and effects, 137, 138, 140, 145, 165.
 Cytomorphologic actions and effects, 144.
 Dédifferentiation of tumour cells, 205.
 Dehydrogenase, 85, 253, 254.
 Desoxyribonucleic acid, 44, 48.
 Dibenzacridine, 20.
 1,2,5,6-Dibenzanthracene, 14, 80, 91-94, 127.
 3,4,5,6-Dibenzphenanthrene, 259.
 β -Dichloro-diethylsulfid, 80.
 Diethylstilboestrol, 59, 60.
 Dihydroxy-dihydrobenzopyren (BPX), 92, 134.
 Dimercaptopropanol (Cfr. British antilewisite), 254.
 4-Dimethyl-aminoazobenzol, 55.
 Dimethylaminobenzene, 90, 91.
 4-Dimethylaminostilbene, 94.
 Dimethyl-azobenzol, 58.
 9,10-Dimethyl 1,2-benzanthracene, 80, 90, 91, 139.
 Drosophila melanogaster, 20, 36, 43, 79, 80, 84, 141-143, 155.
 Electronic Theory on Cancer, 107-121, 140, 257-260.
 Electrons (Density of charge of), 88-90, 108-109.
 Embryonale Organisator, 141.
 Environment. (Adaptations, modulations, mutations and) and cancer, 23, 31, 36, 46-62.

INHALTSVERZEICHNIS

- (Einwirkung von verschiedenen) in dem Serum von normalen und krebsigen Ratten, 229 u. ff.
- (Inaktivierung der) durch Strahlungen, 88.
- gehalt in Tumoren and Organen, 195 u. ff., 204-207, 254.
- (SH-Gruppen in der) 252 u. ff.
- (Einwirkung von Kohlenwasserstoffe auf den proteolytische), 251 u. ff.
- Epicancerogenese, 18.
- Epidermiszelle.
- (Eigenschaften und chemische Zusammensetzung der normale und bösartige), 173-178, 191.
- (Hyperplasie der), 3, 8, 14, 18, 179.
- Ernährung und Krebs, 6, 16, 48-53, 56.
- Erythrocyten und Krebs, 239 u. ff.
- Esplanten, 138, 153.
- Feulgenmethod, 149, 229.
- Fluoreszenz der cancerogene Kohlenwasserstoffe, 128-130.
- Formaldehyd, 143, 165.
- Freund-Kaminer-Reaktion, 227, 238.
- Gärung, 24.
- Gärungsfähigkeit der Hefen, 74, 76.
- Genetische Faktoren der Cancerogene, 6, 8, 17, 23 u. ff., 60, 141, 151, 155.
- Gerste, 58, 59.
- Gewebeulturen, 138, 144, 172.
- Glycin, 226, 227.
- Glykolyse, 85, 94, 194, 195.
- Hämoglobin, 240-250.
- Hautkrebs, 6, 15, 18, 20, 46 u. ff., 52, 55, 59, 107, 131, 139, 174, 181, 191, 198.

INDICE ANALITICO

- Catepsine, 243, 244, 252, 255.
- Catrame, 2, 48.
- Cefalina, 93.
- Chemioterapia del cancro, 79-98, 135-146.
- Chetosteroidi nelle feci di topi, 276.
- Cisteina, 88, 253, 260.
- Citocromo C, 195, 198.
- Citogeni. (Vedi Plasmageni).
- Citoplasma, 25, 149.
- (Veleni del), 96.
- Cloroetilamine, 83, 84, 87, 88, 96.
- bis ($\beta\beta'$ -cloroetil) 2-naftilamina, 81.
- Cocancerogenesi, 2, 14-20, 48, 82, 83, 119, 131.
- Colchicina, 143, 170.
- Colesterina, 60.
- Colesterolo, 14, 21, 93.
- Corteccia surrenale (iperplasia della), 273.
- Crescita.
- (Fattori di regolazione della), 48.
- (Inibizione della), 21, 56, 79, 80, 86, 94-96.
- del cancro, 146, 194, 199, 223
- ed estrogeni, 60.
- Cromogeni. (Vedi Nucleogeni).
- Cromosomi. (Vedi anche Mitosi e Nucleo), 26, 75, 79, 80-88, 94, 95, 105, 144, 145, 170, 179, 180.
- (« Cross-linkage » dei), 88.
- Culture in vitro, 138, 144, 172.
- Cuore (Fattori dietetici nel), 53 e segg.
- Cute. (Vedi Pelle).
- Deidrogenasi, 85, 253, 254.
- Dibenzacridine, 20.

INDEX ANALITIQUE

- Dihydroxydihydro-benzopyrène (BPX), 92, 134.
- Dimercaptopropanol. (V. Ball).
- 4-Diméthyl-amino-azobenzol, 55.
- Diméthyl-amino-benzène, 90, 91.
- Diméthyl-aminostilbène, 94.
- Diméthyl-azobenzol, 58.
- 9,10-diméthyl 1,2-benzanthracène, 80, 90, 91, 139.
- Drosophila melanogaster, 26, 36, 43, 79, 80, 84, 141-143, 155.
- Electrons. (V. Théorie électronique du cancer).
- (Densité de charge des), 88-90, 108-109.
- Environnement (Milieu).
- (Adaptations, modulations, mutations dans leurs rapports avec l') et le cancer expérimental, 23, 46-62.
- (Adaptations, modulations, mutations dans leurs rapports avec l') et levures, 28-46, 74-77.
- Enzymes, 24, 85, 138, 171, 175, 191, 195, 197, 238, 244, 251 et suiv.
- (Activité de différents) contenus dans le sérum normal et cancéreux, 229 et suiv.
- (Contenu en) des tissus normaux et cancéreux, 195 et suiv., 204-207, 254.
- (Inactivation des) par les radiations, 88.
- (Thiols dans les), 252 et suiv.
- Enzymes protéolytiques.
- (Action des hydrates de carbone sur les), 251 et suiv.
- Epicancérogénèse, 18.

INDEX OF SUBJECTS

- (Adaptations, modulations, mutations and) and yeasts, 28-46, 74-77.
- Enzymes, 24, 85, 86, 138, 171, 175, 191, 195, 197, 238, 244, 251, a. ff.
- (Activity of different) contained in the serum of normal and cancerous animals, 229 a. ff.
- (Inactivation of) by Radiations, 88.
- (SH-Group of), 252 a. ff.
- Enzymatic pattern of normal and cancerous tissues, 195 a. ff., 204-207, 254.
- Enzymes. (Action of hydrocarbons on the proteolytic), 251 a. ff.
- Epicarcinogenesis, 18.
- Epidermis cells.
- (Hyperplasia of), 3, 8, 14, 18, 179.
- (Properties and chemical composition of normal and malignant), 173-178, 191.
- Epidermis. (Squamous cell cancer and normal), 173 a. ff.
- Erythrocytes and cancer, 239 a. ff.
- Explantat, 138, 153.
- Fermentation of Yeasts, 74, 76.
- Feulgen (Method of), 149, 229.
- Fluorescence of carcinogenic Hydrocarbons, 128-130.
- Formaldehyd, 143, 165.
- Freund-Kaminer reaction, 227, 238.
- Genetic factors and Carcinogenesis. (Cf. Heredity), 6, 8, 17, 23 a. ff., 60, 141, 151, 155.
- Glycine, 226, 227.
- Glycolysis, 85, 94, 194, 195.

INHALTSVERZEICHNIS

- Hefen,
 — (Anpassungen, Modulierungen, Mutationen, Milieu und), 28-46, 74-77.
 — (Gärungsfähigkeit der), 74, 76.
 — (Kolonienformen der), 36-46, 76, 77.
 — (Mutagene Substanzen durch), 43, 44.
 — (Phylogense der), 37-40.
 — (Radiumrassen der), 28, 31, 43, 74.
 Hepatome, 173, 174, 196, 198, 206, 207.
 Herz (Diätetische Faktoren im), 53 u. ff.
 Heterologe und homologe Systeme, 232.
 Hexokinase, 85, 86, 94.
 Histidin im Serum der normale und krebsige Ratten, 225, 226.
 Hodgkinskrankheit, 80, 81, 94, 96.
 Hormone, 96, 138, 170, 172, 270.
 — (Stoffwechsel der) und Milchfaktor, 276.
 8-Hydroxybenzpyren, 134.
 Hyperplasie der Epidermis, 3, 8, 14, 18, 46, 179.
 Hyperplasie und Neoplasie (Unterschiedung zwischen), 8, 9, 61, 204.
 Induktionstheorie der Krebsentstehung, 138, 153.
 Induktoren, 137-139, 141, 152-153.
 « Initiating » Prozess der Cancrogenese, 6-9, 17, 18, 20, 83.
 Inositol, 175.
 Isothiocyanat, 27, 44.
 Jensen-Sarkom von Ratten, 226, 229, 233.
 Kasein, 56.
 Katalase, 199, 204.
 Kathepsine, 243, 244, 252, 255.

INDICE ANALITICO

- 1, 2, 5, 6-Dibenzantracene, 14, 80, 91-94, 127.
 3, 4, 5, 6-Dibenzofenantrene, 259.
 β -dicloro-dietilsolfuro, 80.
 Dieta. (Vedi Alimentazione).
 Diidrossi-diidrobenezopirene (BPX), 92, 134.
 Dimercaptopropanolo, 254.
 Dimetil-aminobenzene, 90, 91.
 4-Dimetil-aminoazobenzolo, 55.
 4-Dimetilaminostilbene, 94.
 Dimetilazobenzolo, 58.
 9, 10-dimetil-1, 2-benzantracene, 80, 90, 91, 139.
 Divisione cellulare, 18, 25, 86, 88, 95, 205.
 Drosophila melanogaster, 26, 36, 43, 79, 80, 84, 141-143, 155.
 Effetti citolitici, 137, 138, 140, 145, 146, 165.
 Effetti citomorfologici, 144.
 Effetti mitotropici, 137, 145, 146
 Effetti tossici generali, 138-143.
 Elettroni.
 — (Densità di carica degli), 88-90, 108-109.
 — (Teoria elettronica del cancro), 107-121, 140, 257-260.
 Emoglobina, 240-250.
 Enzimi, 24, 85, 86, 138, 171, 175, 191, 195, 197, 238, 244, 251 e segg.
 — (Attività di vari) contenuti nel siero di ratti normali e cancerosi, 229 e segg.
 — (Contenuto in) dei tessuti tumorali e normali, 195 e segg., 204-207, 254.
 — (Inattivazione degli) mediante le irradiazioni, 88.

INDEX ANALITIQUE

- Epidermis.
 --- (Hyperplasie de la), 3, 8, 14, 18, 179.
 --- (Propriétés et composition chimique des cellules normales et malignes de l') 173-178, 191.
 Erythrocytes et cancer, 239 et suiv.
 Explantes, 138, 153.
 Facteur du lait, 15, 155, 170.
 --- (Propriétés du), 274 et suiv.
 Facteur du lait et cancer du sein chez la souris, 269 et suiv.
 Facteurs antimutagènes, 27.
 Facteurs de régulation de la croissance, 48.
 Facteurs déterminants, 18.
 Facteurs d'induction, 137-139, 152, 153.
 Facteurs favorisants (réalisants) la croissance du cancer, 6-9, 14-18, 21, 233.
 Facteurs génétiques de la cancérogenèse, 6, 8, 17, 23 et suiv., 60, 151, 155.
 Facteurs initiateurs de la cancérogenèse, 6-9, 17-20, 83.
 Facteurs problastiques, 48, 50-53, 57.
 Facteurs sensibilisants, 18.
 Fer, 179.
 Fermentation. (Pouvoir de) des levures, 74, 76.
 Feulgen. (Méthode de), 144, 229.
 Fluorescence des Hydrates de carbone, 128, 130.
 Foie.
 --- (Cancer du), 55 et suiv.
 --- (Facteurs antiblastiques dans le), 49 et suiv., 252, 255.
 --- (Facteurs alimentaires dans le), 49 et suiv.

INDEX OF SUBJECTS

- Growth.
 --- (Inhibition of), 21, 56, 79, 80, 86, 94-96.
 --- (Regulation's factors of), 48.
 --- of cancer, 146, 194, 199, 223.
 --- and oestrogens, 60.
 Haemoglobine, 240-250.
 Heart. (Dietetic factors in), 53 a. ff.
 Hepatoma, 173, 174, 196, 198, 206, 207.
 Heredity. (Cfr. Genetic). (Biochemistry of), 45.
 --- and cancer, 23 a. ff., 60, 141, 142, 148-151.
 --- and Radiations, 137 a. ff.
 Heterogenous and homologous Systems, 232.
 Hexokinase, 85, 86, 94.
 Histidine in serum of normal and sarcomatous rats, 225, 226.
 Hodgkin's disease, 80, 81, 94, 96.
 Hormons, 96, 138, 170, 172, 270
 --- (Metabolism of) and Milkfactor, 276.
 Hydrocarbons. (Cfr. Carcinogenic substances Azocompounds), 2, 14, 16, 20-21, 48, 82-83, 87-91, 105, 109, 119, 139, 152, 154, 165, 257.
 --- (Action mechanism of carcinogenic), 251 a. ff.
 --- (Electronic structure of), 109, 110 a. ff. 140, 257, 259, 260.
 --- (Fluorescence of carcinogenic), 128-130.
 --- (K-regions of), 88, 90-94, 110, 112, 119, 258.
 --- (Magnetic behaviour of), 257, 259.
 --- (Metabolism of), 28-34, 90-95, 105, 127-131, 134, 193, 195, 205.

INHALTSVERZEICHNIS

- Kern. (Cfr. Chromosomen, Mitose), 25, 83, 95, 105, 144.
- Kerngifte, 95, 96.
- Kernveränderungen und Strahlenwirkung, 136 u. ff.
- Kerngene. (Cfr. Mutationen), 25, 26, 35, 45, 149, 150, 154, 170, 171.
- Ketosteroide im Stuhl der Mäuse, 276.
- Knochenmark (Schädigungen des) durch Strahlungen, 84, 96.
- Kohlenhydrate. (Stoffwechsel der), 28, 29, 33, 193, 195, 205.
- Kohlenwasserstoffe (Cfr. Cancerogene Substanzen Azoverbindungen), 2, 14, 16, 20-21, 48, 82-83, 87-91, 105, 109, 119, 139, 152, 154, 165, 257.
- (Elektronische Struktur der), 109, 110 u. ff. 140, 257, 259, 260.
- (Fluoreszenz der cancerogene), 128-130.
- (K-region der), 88, 90-94, 110, 112, 119, 258.
- (Lösungsmittel und lokale Wirkung der) 127-131.
- (Magnetische Verhalten der), 257, 259.
- (SH-gruppen und) 251 u. ff.
- (Stoffwechsel der), 28-34, 90-95, 105, 127-131, 134, 193, 195, 205.
- (Wirkungsmechanismus der cancerogene) 251 u. ff.
- K-region und Cancerogenese, 88, 90-94, 110, 112, 119, 258.
- Krebs.
- (Anpassungen, Modulationen, Mutationen, Milieu und experimentelle), 23, 46-62.
- (Biochemie des), 79 u. ff., 193 u. ff., 207.

INDICE ANALITICO

- (SH-gruppi negli) 252 e segg.
- Enzimi proteolitici (Azione degli idrocarburi sugli), 251 e segg.
- Epatoma, 173, 174, 196, 198, 206, 207.
- Epicancerogenesi, 18.
- Epidermide.
- (Iperplasia della), 3, 8, 14, 18, 179.
- (Proprietà e composizione chimica delle cellule normali e maligne del-1'), 173-178, 191.
- Eredità. (Vedi anche Fattori genetici e Genetica).
- (Biochimica della), 45.
- e cancro, 23 e segg., 60, 141, 142, 148-151, 154, 172, 270.
- e radiazioni, 137 e segg.
- Eritrociti e cancro, 239 e segg.
- Esplanti, 138, 153.
- Estrina, 81.
- Estrogeni e cancerizzazione, 15, 59-62, 81, 82, 96, 141.
- Estrone, 15.
- Exochinasi, 85, 86, 94.
- Fattore del latte, 15, 155, 170.
- (Proprietà del), 274 e segg.
- Fattore del latte e cancro mammario del topo, 269 e segg.
- Fattori anticancerogeni, 2.
- Fattori antimutageni, 27.
- Fattori determinanti, 18.
- Fattori favorenti (promuoventi, realizzanti) la crescita del cancro, 6-9, 14-18, 21, 233.
- Fattori genetici della cancerogenesi. (Vedi anche Eredità, Genetica), 6, 8, 17, 23 e segg., 60, 151, 155.
- Fattori inizianti (scatenanti) la cancerogenesi, 6-9, 17, 18, 20, 83.

INDEX ANALITIQUE

- (Mitochondries du), 230.
 Formaldéhyde, 143, 165.
 Freund et Kaminer (Réaction), 227, 238.
 Gaz Moutarde, 2, 8, 23, 27, 28, 43, 80, 84, 85, 142, 144, 146, 151, 165, 170.
 Gènes nucléaires (Chromogènes), 25, 35, 45, 149, 154, 170, 180. (V. Mutations).
 Gènes plasmatiques (Cytogènes), 26, 35, 45, 105, 154, 170, 180, 191. (V. Mutations).
 Génétique et cancer. (V. aussi Hérité), 6, 8, 17, 23 et suiv., 60, 151, 155.
 Glycine, 226, 227.
 Glycolysis, 85, 94, 194, 195.
 Goudron, 2, 48.
 Hémoglobine, 240-250.
 Hépatoma, 173, 196-198, 206.
 Hérité.
 — (Biochimie de la), 45.
 — et cancer, 23 et suiv., 60, 141, 148-151, 154, 172, 270.
 — et radiations, 137 et suiv.
 Hexokinase, 85, 86, 94.
 Hodgkin (Maladie de), 80, 81, 84, 96.
 Hormones, 96, 138, 170, 172, 270.
 — (Métabolisme des) et facteur du lait, 276.
 — Hormones oestrogènes. (V. Oestrogènes).
 Huile d'arachide, 131.
 — de croton, 2-8, 14-17, 21, 84, 119, 131.
 — d'olive, 128.
 Hydrates de carbone. (Métabolisme des), 28, 29, 33, 193, 195, 205.

INDEX OF SUBJECTS

- (Organic solvents of) and their local action, 127-131.
 — (SH-Compound and), 251 a. ff.
 8-Hydroxybenzopyrene, 134.
 Hyperplasia and neoplasia (distinction between), 8, 9, 61, 204.
 Hyperplasia of epidermis, 3, 8, 14, 18, 46, 179.
 Inductive factors, 137, 138, 139.
 Inductors, 137-139, 141, 152-153.
 Induction theory of carcinogenesis, 138, 153.
 Initiating process of carcinogenesis, 6-9, 17, 18, 20, 83.
 Inositol, 175.
 Iron, 179.
 Irradiations. (Cfr. Radiations).
 Irritation Theory by Virchow, 147 a. ff.
 Isothiocyanate d'allyle, 27, 44.
 Jensen's sarcoma of rats, 226, 229, 233.
 K-regions and carcinogenesis, 88, 90-94, 110, 112, 119, 258.
 Lactic (acid), 87, 194, 195, 206.
 Lard (Carcinogenic action of), 128.
 Latent period of carcinogenesis, 2, 3-7, 14-17, 46, 82, 129, 139, 171.
 Latent tumour cells, 6, 8, 17, 82, 171, 180, 204.
 Lauric acid, 56.
 Lecithin, 93.
 Lethal factor, 155.
 Leucaemia, 80, 81, 96, 143, 146.
 Leucocytes (Damages of) by radiations, 84, 96.

INHALTSVERZEICHNIS

- (Chemotherapie des), 79-98, 135 u. ff.
- (Einfall des), 3, 6, 7, 60, 61, 151.
- (Entdifferenzierung des), 193 u. ff.
- (Induktion des) 19, 79, 153, 269, 270.
- (Mehrfachheit des), 194 u. ff.
- (Milchsäurebildung durch), 195.
- (Pathogenese des), 1, 16 u. ff., 136 u. ff., 200.
- (Serologie und Immunologie des), 223 u. ff.
- (Stoffwechsel des), 193 u. ff.
- (Strahlungen und), 135 u. ff.
- (Theorien auf). Cfr. Theorien.
- (Therapie des), 79-98, 135-145, 172.
- und Ernährung, 6, 16, 48-53.
- und Vererbung, 23 u. ff., 59, 60, 151, 155.
- Krebsgene, 149.
- Krebstherapie. (Cfr. Chemotherapie), 135-145, 172.
- Latenttumorzell, 6, 8, 17, 82, 171, 180, 204.
- Latenzzeit der Cancerogenese, 2, 3-7, 14-17, 46, 82, 129, 139, 171.
- Laurinsäure, 56.
- Leber
 - (Antiblastische Faktoren im), 49 u. ff., 252, 255.
 - (Diätetische Faktoren im), 49 u. ff.
 - (Krebs von), der Ratten, 55 u. ff.
 - (Mythochondren des), 230.
- Lecithin, 93.
- Lethalfaktor, 155.
- Leukämie, 80, 81, 96, 143, 146.
- Leukocyten (Schädigungen der), durch Strahlungen, 84, 96.

INDICE ANALITICO

- Fattori letali, 155.
- Fattori problastici, 48, 50, 52, 53, 57.
- Fattori sensibilizzanti, 18.
- Fegato.
 - (Cancro del), 55 e segg.
 - (Fattori antiblastici nel), 49 e segg., 252, 255.
 - (Fattori dietetici nel), 49 e segg.
 - (Mitocondri del), 230.
- Fenantrene, 88, 90, 254.
- Fenilalanina, 93.
- Fenoli, 143, 151, 165.
- Fermentazione, 24.
 - (Potere di) dei lieviti, 74, 76.
- Ferro, 179.
- Feulgen (Metodo di), 144, 229.
- Fluorescenza degli idrocarburi cancerogeni, 128-130.
- Formaldeide, 143, 165.
- Fosfatasi, 197, 199, 206, 207, 230.
- Fosfochinasi, 84-87, 95.
- Fosfolipidi, 129.
- Fosforo radioattivo (P³²), 175.
- Gas mostarda (Iprite), 2, 8, 23, 28, 43, 80, 84, 85, 142, 144, 146, 151, 165, 170.
- Gene tumorale, 149.
- Genetica e cancro. (Vedi eredità), 24 e segg., 60, 151, 155.
 - e radiazioni, 141.
- Geni mutanti. (Vedi Mutageni).
- Geni nucleari. (Vedi Nucleogeni).
- Geni protoplasmatici. (Vedi Plasmageni).
- Glicina, 226, 227.
- Glicolisi, 85, 94, 194, 195.
- Gruppi Sulfidrilici, 85, 87.
 - e Cancerogenesi, 251 e segg.

INDEX ANALITIQUE

- Hydrocarbures. (V. aussi Cancérigènes Azoderivés), 2, 14, 16, 20, 48, 82, 87-91, 105, 119, 139, 152, 154, 165, 257.
- (Procédé magnétique des), 257, 259.
- (Fluorescence des) cancérigènes, 128-130.
- (Influence des solvants organiques sur l'action locale des), 127-131.
- (K-regions des molécules des), 88, 90-94, 110, 112, 119, 258.
- (Mécanisme d'action des) cancérigènes, 251 et suiv.
- (Métabolisme des) 28-34, 90-95, 105, 127-131, 134, 193, 195, 205.
- (Sulphydryl-groupes et), 251 et suiv.
- (Structure électronique de la molécule des), 109, 110 et suiv., 140, 257, 259, 260.
- 8-hydroxy-benzopyrène, 134.
- Hyperplasia.
- (Différence entre) et néoplasie, 8, 9, 61, 204.
- de l'épidermis, 3, 8, 14, 18, 179.
- Hystidine dans le sérum des rats normaux et sarcomateux, 225, 226.
- Inducteurs, 137-139, 141, 152, 153.
- Induction (Théorie de l') et cancérigénèse, 138, 153.
- Inositol, 175.
- Irradiations. (V. Radiations).
- Irritation. (Théorie irritative de Virchow), 147 et suiv.
- Isothiocyanate d'allyle, 27, 44.
- Jensen (Sarcome de) chez le lapin, 226, 229, 233.

INDEX OF SUBJECTS

- « Linkage » of Chromosomes, 87, 94, 105.
- Lipoids, 227, 251.
- Liver.
- (Antiblastic factors in the), 49 a. ff., 252, 255.
- (Cancer of) of rats, 55 a. ff.
- (Dietetic factors in the), 49 a. ff.
- (Mitochondria of), 230.
- Lung (Cancer of the) in mice, 80, 96, 143, 153.
- Lymphogranulomatosis, 146.
- Magnetic behaviour of Hydrocarbons, 258, 259.
- Mammary Cancer in mice.
- (Etiology of), 269 a. ff.
- (Genetic of), 271.
- (Endocrine organs and), 272.
- (Ovariectomy and), 272.
- Melanoma, 139.
- Methylcholanthrene, 14, 19, 33, 48, 51, 54, 80, 83, 90, 141, 174, 251, 259.
- Methyl-dichloro-ethylamine (HNZ), 81, 84.
- Milkfactor, 15, 155, 170.
- (Properties of), 274 a. ff.
- and mammary cancer of mice, 269 a. ff.
- Milieu. (Cfr. Environment).
- Mitoses (Cfr. Chromosomes, Nucleus), 88, 135-145, 165, 180.
- Mitotropic actions and Effect, 137, 145, 146.
- Modulations, Adaptations, Mutations, Environment and experimental cancer, 23, 31, 36, 46-62, 171.

INHALTSVERZEICHNIS

- « Linkage » der Chromosomen, 87, 94, 105.
 Lipoidstoffe, 227, 251.
 Lungenkrebs der Mäuse, 80, 96, 143, 153.
 Lymphogranulomatose, 146.
 Magnetische Empfindlichkeit von Kohlenwasserstoffe, 258, 259.
 Mammakrebs der Mäuse, 60, u. ff., 82, 96, 150, 155, 190, 244.
 — (Entstehung des), 269 u. ff.
 — (Genetik des), 271.
 — (Endocrinen Organen und), 272.
 — (Ovariektomie und), 272.
 Metallkrebs, 139.
 Methylcholanthren, 14, 19, 33, 48, 51, 54, 80, 83, 90, 141, 174, 251, 259.
 Methyl-dichloro-ethylamin (HNZ), 81, 84.
 Milchfaktor, 15, 155, 170.
 — (Eigenschaften von), 274 u. ff.
 — und Mammakrebs von Mäuse, 269 u. ff.
 Milchsäure, 87, 194, 195, 206.
 Milieu.
 — (Anpassungen, Modulierungen, Mutationen und) und Krebs, 23, 31, 36, 46-62.
 — (Anpassungen, Modulierungen, Mutationen und) und Hefen, 28-46, 74-77.
 Mitosen. (Cfr. Chromosomen, Kern), 88, 135-145, 165, 180.
 Mitotrope Wirkungen und Effekte, 137, 145, 146.
 Modulierungen, Anpassungen, Mutationen, Milieu und experimentelle Krebs, 23, 31, 36, 46-62, 171.

INDICE ANALITICO

- Hodgkin (Malattia di), 80, 81, 94, 96.
 Idrocarburi. (Vedi anche Agenti cancerogeni, Azocomposti), 2, 14, 16, 20, 21, 48, 82, 83, 87-91, 105, 109, 119, 139, 152, 154, 165, 257.
 — (Comportamento magnetico degli), 257, 259.
 — (Fluorescenza degli) cancerogeni, 128-130.
 — (Influenza dei solventi organici sopra l'azione locale degli), 127-131.
 — (K-regione degli), 88, 90-94, 110, 112, 119, 258.
 — (Meccanismo d'azione degli) cancerogeni, 251 e segg.
 — (Metabolismo degli), 28-34, 90-95, 105, 127-131, 134, 193, 195, 205.
 — (SH-gruppi e), 251 e segg.
 — (Struttura elettronica della molecola degli), 109, 110 e segg., 140, 257, 259.
 8-idrossi-benzopirene, 134.
 Induttori, 137-139, 141, 152-153.
 Induzione (Teoria della) nella cancerogenesi, 138, 153.
 Inositolo, 175.
 Iperplasia (differenza tra) e neoplasia, 8, 9, 61, 204.
 Iperplasia dell'epidermide, 3, 8, 14, 18, 46, 179.
 Iprite. (Cfr. Gas Mostarda).
 Irradiazioni. (Vedi Radiazioni), 79 e segg., 96.
 Irritazione. (Teoria della) di Virchow, 147 e segg.
 Isiotiocianato d'allile, 27, 44.
 Istidina nel siero di ratti normali e cancerosi, 225, 226.

INDEX ANALITIQUE

- Kétosteroides dans les fèces de la souris, 276.
- K-régions des molécules et cancérisation, 88, 90-92, 94, 110, 112, 119, 258.
- Lactique (Acide), 87, 194, 206.
- Lard (Action cancérisante du), 128.
- Latence. (Cellules tumorales en), 6, 8, 17, 82, 171, 180, 204.
- (Période de), 2, 3, 5-7, 14-17, 46, 82, 129, 139, 171.
- Laurique (Acide), 56.
- Lécithine, 93.
- Léucémies, 80, 81, 96, 143, 146.
- Leucocytes. (Lésions des) par les radiations, 84, 96.
- Levures.
- (Adaptations, modulations, mutations cellulaires en rapport avec l'environnement et), 28-46, 74-77.
- (Colonies des), 36-46, 76, 77.
- (Pouvoir fermentative des), 74, 76.
- (Phylogénèse des), 37-40.
- (Radium-races des) 28, 31, 43, 74.
- (Substances mutagènes produites par les), 43, 44.
- « Linkage » des Chromosomes, 87, 94, 105.
- Lipoides, 227, 251.
- Lymphogranulomatose, 146.
- Magnétique. (Susceptibilité) des Hydrates de carbone, 258, 259.
- Métaux (Cancer par), 139.
- Méthylcholanthrène, 14, 19, 33, 48, 51, 54, 80, 83, 90, 141, 174, 251, 259.
- Méthyl-dichloro-éthylamine (HNZ), 81, 84.
- Milieu. (V. Environnement).

INDEX OF SUBJECTS

- Modulations, Adaptations, Mutations, Environment and Yeasts, 28-46, 74-77.
- Muscle, 148, 198.
- Mustard Gas (Yperite), 2, 8, 23, 27, 28, 43, 80, 84, 85, 142, 144, 146, 151, 165, 170.
- Mutagenic Radiations, 135 a. ff.
- Mutagenic Substances, 23, 43, 48, 75, 84, 86, 135-149, 165, 170, 191.
- Mutation. (Theory of the somatic cell) of cancer, 8, 96, 137, 148, 149, 151, 180, 191.
- Mutations, 7 a. ff., 14-16, 23, 26-28, 35, 37, 41, 44-47, 75, 80-87, 95, 106, 137, 140-143, 148-151, 170-172, 180, 191.
- Lethal mutations, 27, 36, 155.
- Mutations, adaptations, modulations. Environment and cancer, 23, 31, 36, 46-62, 171.
- Mutations, adaptations, modulations. Environment and Yeasts, 28-46, 74-77.
- Myeloma, 96.
- Mythochondria of Liver (Isolation of), 230.
- Naphtalene, 91, 93.
- β -Naphthylamine, 93, 170.
- Narcosis, 148.
- Neurospora, 24, 28, 84, 87.
- Ninhydrine reaction, 224.
- Nitrogen mustard, 81, 83-87, 94-96, 105, 143-146, 151, 170.
- Nucleic acids, 84, 86, 238, 250.
- Nucleogens. (Cfr. Mutations), 25, 26, 35, 45, 149, 150, 154, 170, 171.
- Nucleoproteid, 154, 170.

INHALTSVERZEICHNIS

- Modulierungen, Anpassungen, Mutationen, Milieu und Hefen, 28-46, 74-77.
- Muskel, 148, 198.
- Mutagene Strahlen, 135 u. ff.
- Mutagene Substanzen, 23, 43, 48, 75, 84, 86, 135-149, 165, 170, 191.
- Mutation. (Theorie der somatische) des Krebses, 8, 96, 137, 148, 149, 151, 180, 191.
- Mutationen, 7 u. ff., 14-16, 23, 26-28, 35, 37, 41, 44-47, 75, 80-87, 95, 106, 137, 140-143, 148-151, 170-172, 180, 191.
- lethale, 27, 36, 155.
- Mutationen, Anpassungen, Modulationen, Milieu und cancer, 23, 31, 36, 46-62, 171.
- Mutationen, Anpassungen, Modulationen, Milieu und Hefen, 28-46, 74-77.
- Myelom, 96.
- Mythochondren der Leber (Isolierung der), 230.
-
- Naphthalen, 91, 93.
- β -naphthylamin, 93, 170.
- Narkose, 148.
- Nebennierendehyperplasie, 273.
- Neurospora, 24, 28, 84, 87.
- Ninhydrin-Reaktion, 224.
- Nitrogenmustard, 81, 83-87, 94-96, 105, 143-146, 151, 170.
- Nukleinsäuren, 84, 86, 238, 250.
- Nukleoproteide, 154, 170.
- Nukleoproteine. (Enzymatische Dephosphorylierung der), 229.
- Nukleotide, 86.

INDICE ANALITICO

- K-regione e cancerogenesi, 88, 90-92, 94, 110, 112, 119, 258.
- Lardo (azione cancerogena del), 128.
- Latenza (Cellule tumorali in), 6, 8, 17, 82, 171, 180, 204.
- Latenza (Periodo di) nella cancerogenesi, 2, 3-7, 14-17, 46, 82, 129, 139, 171.
- Lecitina, 93.
- Leucemie, 80, 81, 96, 143, 146.
- Leucociti. (Alterazioni dei) mediante le radiazioni, 84, 96.
- Lieviti.
- (Adattamenti, modulazioni, mutazioni cellulari in rapporto all'ambiente e), 28-46, 74-77.
- (Colonie dei), 36-46, 76, 77.
- (Forme filamentose dei), 37-40.
- (Potere fermentativo dei), 74, 76.
- (Radium-razze dei), 28, 31, 43, 74.
- (Sostanze mutagene prodotte dai), 43, 44.
- Linfogranulomatosi, 146.
- « Linkage » dei cromosomi, 87, 94, 105.
- Lipoidi, 227, 251.
- Mammella. (Vedi Cancro della mammella).
- Metalli (Cancro da), 139.
- Metilcolantrene, 14, 19, 33, 48, 51, 54, 80, 83, 90, 141, 174, 251, 259.
- Metil-dicloro-etil-amine (HNZ), 81, 84.
- Midollo osseo (Alterazioni del) dovute alle radiazioni, 84, 96.
- Mieloma, 96.
- Milieu.
- (Adattamenti, modulazioni, mutazioni cellulari in rapporto al) e cancro sperimentale, 23, 31, 36, 46-62.

INDEX ANALITIQUE

- Mitochondries du foie (isolation des), 230.
- Mitoses, (V. aussi Chromosomes et Noyau), 88, 135-145, 165, 180.
- Mitotropiques (Effets), 137, 145, 146.
- Modulations, mutations, adaptations cellulaires en rapport avec l'environnement et cancer expérimental, 23, 31, 36, 46-62, 171.
- Modulations, mutations, adaptations cellulaires en rapport avec l'environnement et levures, 28-46, 74-77.
- Moelle. (Lésions de la) par les radiations, 84, 96.
- Muscle, 148, 198.
- Mutagènes (Agents), 23, 43, 48, 75, 84, 86, 135-149, 165, 170, 191.
- Mutations, 7 et suiv., 14-16, 23, 26-28, 35, 37, 41, 44-47, 75, 80-87, 95, 106, 137, 140-143, 148-151, 170-172, 180, 191.
- Mutations léthales, 27, 36, 155.
- Myeloma, 96.
- Naphtalène, 91, 93.
- β -naphtylamine, 93.
- Narcose, 148.
- Neurospora, 24, 28, 84, 87.
- Ninydrine (réaction), 224.
- Noyaux, 25, 83, 95, 105, 136 et suiv., 144.
- (Poisons du), 95, 96.
- (Lésions du) et radiations, 136 et suiv.
- Nucléiques (Acides), 84, 86, 238, 250.
- Nucléoprotéïdes, 154, 170.
- Nucléoprotéïnes. (Déphosphorylation enzymatique des), 229.
- Nucléotides, 86.

INDEX OF SUBJECTS

- Nucleoproteins. (Enzymatic dephosphorylation of), 229.
- Nucleotides, 86.
- Nucleus. (Cfr. Chromosomes, Mitoses), 25, 83, 95, 105, 144.
- (Poisons of), 95, 96.
- (Damages of) and Radiations, 136 a. ff.
- Nutrition and cancer, 6, 16, 48-53, 56.
- Olive oil, 128.
- Oestrin, 81.
- Oestrogens and carcinogenesis, 15, 59-62, 81, 82, 96, 141.
- Oestrone, 15.
- Osmic acid, 90.
- Pancreatine, 242.
- Papain, 252, 254.
- Paramecium aurelia, 154, 254.
- Pasteur reaction, 95.
- Pathogenesis of cancer. (Cfr. Carcinogenesis).
- Pepsin, 196.
- Perbenzoic acid, 89, 90.
- Perfusion liquid of Rous's sarcoma, 239-250.
- Perylene, 259.
- pH, 249.
- of the Serum, 238.
- Phenanthrene, 88, 90, 254.
- Phenol, 143, 151, 165.
- Phenylalanine, 93.
- Phosphatase, 197, 199, 206, 207, 230.
- Phosphokinase, 84-87, 95.
- Phospholipide, 129.
- Phosphor (radioactive) P³², 175.
- Piruvic acid in Tumours, 233-235.

INHALTSVERZEICHNIS

Oliveöl, 128.
 Oestrin, 81.
 Oestrogene und cancerogenese, 15, 59-62, 81, 82, 96, 141.
 Oestron, 15.
 Osmiumsäure, 90.
 Pankreatin, 242.
 Papain, 252, 254.
 Paramecium aurelia, 154, 254.
 Pasteur-Reaktion, 95.
 Pathogenese des Krebs. (Cfr. Cancerogenese).
 Pepsin, 196.
 Perbenzoesäure, 89, 90.
 Perfusion von Tumoren, 239-250.
 Perylen, 259.
 pH, 249.
 — von Serum, 238.
 Phenanthren, 88, 90, 254.
 Phenol, 143, 151, 165.
 Phenylalanin, 93.
 Phosphatase, 197, 199, 206, 207, 230.
 Phosphokinase, 84-87, 95.
 Phospholipide, 129.
 Phosphor (radioaktive) P³², 175.
 Plasmagene. (Cfr. Mutationen), 26, 35, 45, 105, 149, 154, 155, 170, 171, 180, 191.
 Plutonium, 84.
 Polyploidie, 143, 145.
 Pre-cancerogenese, 18, 179, 204.
 Problastische Faktoren, 48, 50, 52, 53, 57.
 Pro-cancerogenese, 15, 20.
 Procytogen, 26.
 Pro-enzyme, 25, 26, 171.

INDICE ANALITICO

— (Adattamenti, modulazioni, mutazioni cellulari in rapporto al) e lieviti, 28-46, 74-77.
 Mitochondri del fegato. (Isolamento dei), 230.
 Mitosi. (Vedi anche Cromosomi e Nucleo), 88, 135-145, 165, 180.
 Modificazioni (generali) nella cancerogenesi, 147.
 Modulazioni, adattamenti, mutazioni cellulari in rapporto all'ambiente e cancro sperimentale, 23, 31, 36, 46-62, 171.
 Modulazioni, adattamenti, mutazioni cellulari in rapporto all'ambiente e lieviti, 28-46, 74-77.
 Muscolo, 148, 198.
 Mutageni, 23, 43, 48, 75, 84, 86, 135-149, 165, 170, 191.
 Mutazioni, 7 e segg., 14-16, 23, 26-28, 35, 37, 41, 44-47, 75, 80-87, 95, 106, 137, 140-143, 148-151, 170-172, 180, 191.
 Mutazioni letali, 27, 36, 155.
 Mutazioni, adattamenti, modulazioni cellulari in rapporto all'ambiente e cancro, 23, 31, 36, 46-62, 171.
 Mutazioni, adattamenti, modulazioni cellulari in rapporto all'ambiente e lieviti, 28-46, 74-77.
 Naftalene, 91, 93.
 β-naftilamina, 93, 170.
 Narcosi, 148.
 Neurospora, 24, 28, 84, 87.
 Nucleo. (Vedi anche Cromosomi, Mitosi), 25, 83, 95, 105, 144.
 — (Veleni del), 95, 96.
 — (Alterazioni del) e radiazioni, 136 e segg.

INDEX ANALITIQUE

- Oestrine, 81.
 Oestrogènes et cancérisation, 15, 59-62,
 81-82, 96, 141.
 Oestrone, 15.
 Organismes embryonnaire, 141, 152.
 Osmique (Acide), 90.
 Pancreatine, 242.
 Papaine, 252, 254.
 Paramecium aurelia, 154, 254.
 Pasteur (Réaction), 95.
 Peau. (Cancer de la), 5, 15, 18, 20, 46
 et suiv., 52, 55, 59, 107, 131, 139,
 174, 181, 191, 198.
 Perbenzoïque (Acide), 89, 90.
 Perfusion (Liquid) d'un tumeur, 239-
 250.
 Pepsine, 196.
 Perylene, 259.
 pH, 249.
 — du Sérum, 238.
 Phénanthrène, 88, 90, 254.
 Phénol, 143, 151, 165.
 Phénylalanine, 93, 170.
 Phosphatase, 197, 199, 206, 207, 230.
 Phosphokinases, 84-87, 95.
 Phospholipides, 129.
 Phosphor-radioactive (P^{32}), 175.
 Piruvique (Acide) dans les tumeurs, 233-
 235.
 Piruvique (Oxydase), 87.
 Plutonium, 84.
 Poisons nucléaires. (V. Mitotropiques -
 Effets), 95, 96.
 Polyploidie, 143, 145.
 Poumon. (V. Cancer du poumon).
 Précancérigénese, 18, 179, 204.

INDEX OF SUBJECTS

- Piruvic oxidase system, 87.
 Plasmagens. (Cfr. Mutations), 26, 35,
 45, 105, 149, 154, 155, 170, 171,
 180, 191.
 Plutonium, 84.
 Polyploidie, 143, 145.
 Pre-carcinogenesis, 18, 179, 204.
 Problastic factors, 48, 50, 52, 53, 57.
 Pro-carcinogenesis, 15, 20.
 Procytogen, 26.
 Pro-enzymes, 25, 26, 171.
 Promoting (realising) process of carcino-
 genesis, 6-9, 14-18, 21, 233.
 Prophylaxis of cancer, 136.
 Prostate (cancer of the), 82, 96, 197,
 207.
 Proteinases, 243.
 Proteines, 91, 94, 105, 223, 224, 242.
 — (Denaturation of), 239, 249, 251 a. ff.
 — (SH-Groups and), 251 a. ff.
 — (Synthesis of), and cancer, 257.
 Proteinvirus, 251.
 Proteolytic enzymes. (Action of Hydro-
 carbons on), 251 a. ff.
 Pyocyanine, 20.
 Pyrene, 254.
 Pyridoxin, 85.
 Radiations, 135 a. ff.
 — cancericide, 135-137.
 — cancerogene, 135-141.
 — ionizing, 83, 85, 88, 140, 141.
 — mutagene, 135 a. ff.
 — (Cancer by), 136, 139, 140, 146, 151.
 — (Genetic factors of), 141.
 — (Theories on the action of), 88.
 — and Heredity, 137 a. ff.

INHALTSVERZEICHNIS

- « Promoting » Prozess der Krebswachstum, 6-9, 14-18, 21, 233.
- Prophylaxe des Krebs, 136.
- Prostatekrebs, 82, 96, 197, 207.
- Proteasen, 243.
- Proteine, 91, 94, 105, 223, 224, 242.
- (Denaturierung der), 239, 249, 251 u. ff.
- (SH-Gruppen und), 251 u. ff.
- (Synthese der), und Krebs, 257.
- Proteinvirus, 251.
- Proteolytische Enzyme. (Wirkung der Kohlenwasserstoffe auf), 251 u. ff.
- Pyocyanin, 20.
- Pyren, 254.
- Pyridoxin, 85.
- Radiomimetische Agentien and cancer, 80, 83, 88, 96.
- Radium, 28, 84.
- Radium-rassen der Hefen, 28, 31, 43, 74.
- Radium-therapie der Krebse, 80 u. ff., 96, 135 u. ff.
- Reis, 56, 57.
- Reizkrebs, 153.
- Reiztheorie der Krebsentstehung von Virchow, 147 u. ff.
- Rennin, 196.
- Ribonuklease, 250.
- Rous-Sarkom, 17, 19, 127.
- (Chemische Natur des Agent von), 239.
- (Cyanwasserstoffsäure und), 243, 249, 250.
- Saccharomyces Cerevisiae, 28, 29, 33, 75.
- Saccharomyces Ellipsoïdus, 28, 74.
- Sarkom, 139, 158.

INDICE ANALITICO

- Nucleogeni, 25, 26, 35, 45, 149, 150, 154, 170, 171. (Vedere Mutazioni).
- Nucleoproteidi, 154, 170.
- Nucleoproteine (Defosforilazione enzimatica delle), 229.
- Nucleotidi, 86.
- Olio di arachidi, 131.
- Olio di croton, 2, 3-8, 14-17, 21, 84, 119, 131.
- Olio di oliva, 128.
- Organizzatori embrionali, 141.
- Ormoni, 96, 138, 170, 172, 270.
- estrogeni, 63 e segg.
- (Metabolismo degli) e fattore latteco 276.
- Orzo (Farina di), 58, 59.
- Pancreatina, 242.
- Papaina, 252, 254.
- Papilloma di Shope del coniglio, 5, 16, 20, 48, 107, 156.
- Paramecium aurelia, 154, 254.
- Pasteur (Reazione di), 95.
- Patogenesi del cancro. (Vedi Cancro-genesi).
- Peile. (Vedi Cancro della).
- Pepsina, 196.
- Perfusione (Liquido di) di un tumore, 239-250.
- Perilene, 259.
- pH, 249.
- del siero, 238.
- Piocianina, 20.
- Pirene, 254.
- Piridossina, 85.
- Piruvicoossidasi, 87.

INDEX ANALITIQUE

- Procancérigénese, 15, 20.
 Procytogène, 26.
 Proenzymes, 25, 26, 171.
 Prophylaxie du cancer, 136.
 Prostate. (V. Cancer de la).
 Proteinase, 243.
 Protéines, 91, 94, 105, 223, 224, 242.
 — (Dénaturation des), 239, 249, 251 et suiv.
 — (Synthèse des) et cancer 257.
 — (Thiols-groupes et), 251 et suiv.
 Protéinvirus, 251.
 Pyocianine, 20.
 Pyrène, 254.
 Pyridoxine, 85.
- Radiations, 135 et suiv., 153, 155, 165.
 — cancéricides, 135-137.
 — cancérogènes, 135-141.
 — jonisantes, 83, 85, 88, 140, 141.
 — mutagènes, 135 et suiv.
 — (Cancer par), 136, 139, 140, 146, 151.
 — (Génétique des), 141.
 — (Théories sur l'action des), 88.
 — et Hérité, 137 et suiv.
 Radiomimétiques (Agents), 80, 83, 88, 96.
 Radium, 28, 84.
 Radium-races des levures, 28, 31, 43, 74.
 Radiumthérapie du cancer, 80 et suiv., 96, 135 et suiv.
 Rayons α , 43.
 Rayons γ , 140.
 Rayons Roentgen, 16, 17, 23, 27, 28, 43, 49-85, 95, 135, 137, 140, 142, 144, 146, 165.
 Rayons Ultra-violet, 2, 6, 23, 27, 28, 43, 77, 140, 193.

INDEX OF SUBJECTS

- Radiomimetic drugs and cancer, 80, 83, 88, 96.
 Radium, 28, 84.
 Radium-races of yeasts, 28, 31, 43, 74.
 Radium-therapie of cancer, 80 a. ff., 96, 135 a. ff.
 Rays.
 — α Rays, 43.
 — γ Rays, 140.
 — Röntgen-Rays, 16, 17, 23, 27, 28, 43, 49-85, 95, 135, 137, 140, 142, 144, 145, 165.
 — Ultra-violets-Rays, 2, 6, 23, 27, 28, 43, 77, 140, 193.
 Rennine, 196.
 Respiration of tumours, 85, 94, 95.
 Ribonucleases, 250.
 Rice (Decorticated), 56, 57.
 Rous's sarcoma, 17, 19, 127.
 — (Chemical nature of), 239.
 — (Cyanidric acid and), 243, 249, 250.
 Saccharomyces Ellipsoïdus, 28, 74.
 Saccharomyces Gerevisiae, 28, 29, 33, 75.
 Sarcoma, 139, 158.
 — (Benzoyl-amino-estryl-chinolein and) of rats, 209 a. ff.
 — by Jensen. (Cfr. Jensen's sarcoma).
 — by Rous. (Cfr. Rous's sarcoma).
 « Screening tests », 97.
 Sexuality of mutagens, 45.
 Serum.
 — (Action of normal and cancerous) on tumour cells, 223 a. ff.
 — (Amino acids in normal and cancerous) 223 a. ff.
 — (Caryolytic effect of), 228.
 — (Enzymatic dephosphorylitic action of) on Nucleoproteins, 229.

INHALTSVERZEICHNIS

- (Benzoyl-amino-estryl-chinolin und) der Ratten, 209 u. ff.
- von Jensen. (Cfr. Jensen-Sarkom).
- von Rous. (Cfr. Rous-Sarkom).
- Schilddrüsekrebs, 206, 207.
- « Screening tests », 97.
- Selbstvermehrung der Zelle, 25, 26, 142, 144, 148, 151, 155, 165, 171.
- Senfgas (Yperit), 2, 8, 23, 27, 28, 43, 80, 84, 85, 142, 144, 146, 151, 165, 170.
- Sensibilisierende Faktoren, 18.
- Serum.
 - (Aminosäuregehalt des normalen und krebsigen), 223 u. ff.
 - (Caryolytische Effekt von), 228.
 - (Enzymatische dephospholierende Wirkung von) auf Nucleoproteine, 229.
 - (pH des), 238.
 - (Wirkung des normalen und krebsigen) auf Tumorzelle, 233 u. ff.
- SH-Gruppen. (Cfr. Sulphydryl-Verbindungen).
- Shope papilloma der Kaninchen, 5, 16, 20, 48, 107, 156.
- Speck (Cancerogene Wirkung des), 128.
- Steroide (Stoffwechsel der), 93.
- Stilbamidine, 96.
- Stilboestrol, 81.
- Strahlungen, 135 u. ff.
 - cancericide, 135-137.
 - cancerogene, 135-141.
 - jonisierende, 83, 85, 88, 140, 141.
 - mutagene, 135 u. ff.
 - (Krebs durch), 136, 139, 140, 146, 151.
 - (Genetik der), 141.

INDICE ANALITICO

- Plasmageni, 26, 35, 45, 105, 149, 154, 155, 170, 171, 180, 191. (Vedere Mutazioni).
- Plutonium, 84.
- Poliploidia, 143, 145.
- Polmone. (Vedi cancro del polmone).
- Precancerogenesi, 18, 179, 204.
- Procancerogenesi, 15, 20.
- Procitogene, 26.
- Proenzimi, 25, 26, 171.
- Profilassi del cancro, 136.
- Prostata. (Vedi Cancro della).
- Proteinasi, 243.
- Proteine, 91, 94, 105, 223, 224, 242.
 - (Denaturazione delle), 239, 249, 251 e segg.
 - (SH-gruppi e), 251 e segg.
 - (Sintesi delle) e cancro, 257.
- Radiazioni (Irradiazioni), 135 e segg., 153, 155, 165.
 - cancericide, 135-137.
 - cancerogene, 135-141.
 - jonizzanti, 83, 85, 88, 140, 141.
 - mutagene, 135 e segg.
 - (Cancro da), 136, 139, 140, 146, 151.
 - (Genetica delle), 141.
 - (Teorie sull'azione delle), 88.
 - ed Eredità, 137 e segg.
- Radiomimetici (Agenti), 80, 83, 88, 96.
- Radium, 28, 84.
- Radium-razze dei lieviti, 28, 31, 43, 74.
- Radiumterapia, 80 e segg., 96, 135 e segg.
- Raggi α , 43.
 - γ , 140.
 - Roentgen, 16, 17, 23, 27, 28, 43, 49-85, 95, 135, 137, 140, 142, 144, 146, 165.

INDEX ANALITIQUE

- Rennine 196.
 Respiration des tumeurs, 85, 94, 95.
 Ribonucléases, 250.
 Ribonucléique (Acide), 250.
 Riz décortiqué, 56, 57.
 Rous (Sarcome de), 17, 19, 127.
 — (Nature chimique de l'agent du), 239.
 — (Acide cyanidrique et), 243, 249, 250.
 Saccharomyces Cerevisiae, 28-29, 33, 75.
 — Ellipsoïdus, 28, 74.
 Sang normal et cancéreux. (Aminoacides dans le), 223 et suiv.
 Sarcome, 139, 158.
 — du rat par benzoil-amino-estril-chino-leine, 209.
 — de Jensen du lapin, 226, 229, 233.
 — de Rous, 17, 19, 127, 239.
 « Screening tests », 97.
 Sein. (V. Cancer du sein chez la souris).
 Sérum.
 — (Aminoacides dans le) normal et cancéreux, 223 et suiv.
 — (Action du) normal et cancéreux sur les cellules cancéreuses, 223 et suiv.
 — (Action enzymatique déphosphorilante du) sur les nucléoprotéines, 229.
 — (Effet caryolitique du), 228.
 — (pH du), 238.
 Sexualité des gènes mutants, 45.
 SH-Groupes. (V. Sulphydryles groupes).
 Shope (Papillome de) du lapin, 5, 16, 20, 48, 107, 156.
 Stéroïdes. (Métabolisme des), 93.
 Stilbamidine, 96.
 Stilboestrol, 81.

INDEX OF SUBJECTS

- (pH of), 238.
 SH-groups. (Cfr. Sulphydryl-compounds)
 Shope's Papilloma of rabbit, 5, 16, 20, 48, 107, 156.
 Skin (Cancer of the), 5, 15, 18, 20, 46
 a. ff. 52, 55, 59, 107, 131, 139, 174, 181, 191, 198.
 Squamous cell cancer and normal epidermis, 173 a. ff.
 Steroids (Metabolism of), 93.
 Stilbamidine, 96.
 Stilboestrol, 81.
 Styryl 430, 28-34, 74-77.
 — (Mechanism of the carcinogenic action of), 216.
 — (Sarcoma produced by) in rats, 209 a. ff.
 Sulphur mustard. (Cfr. Nitrogen mustard).
 Sulphydryl compounds and Carcinogenesis, 85, 87, 251 a. ff.
 Target theory of cancer, 88, 150, 151.
 Tar, 2, 48.
 Testosterone, 82.
 Theories of Carcinogenesis.
 — Electronic Theory, 107-121, 140, 257-260.
 — Inductive Theory, 138, 153.
 — K-regions theory, 88, 90-94, 110-112, 119, 258.
 — Irritative Theory by Virchow, 148, 149.
 — Somatic cell mutation Theory, 8, 96, 137, 148, 149, 151, 180, 191.
 — Target theory, 88, 150, 151.
 Theories on the action of ionizing radiations, 88.

INHALTSVERZEICHNIS

- (Theorien auf der Strahlenwirkung), 88.
- und Vererbung, 137 u. ff.
- α -Strahlungen, 43.
- γ -Strahlungen, 140.
- Röntgenstrahlungen, 16, 17, 27, 28, 43, 49-85, 95, 135, 137, 140, 142, 144, 145, 165.
- Ultra-violets-Strahlungen, 2, 6, 23, 27, 28, 43, 77, 140, 193.
- Styryl 430, 28-34, 74-77.
- (Mechanismus von kancerogene Wirkung des), 216.
- (Rattensarkom durch), 209 u. ff.
- Sulphydryl-Verbindungen und Cancerogenese, 85, 87, 251 u. ff.

- Tar, 2, 48.
- Testosteron, 82.
- Theorien auf der Wirkung von jonisierende Strahlungen, 88.
- Theorien der Cancerogenese
- Electronische-Theorie, 107-121, 140, 257-260.
- Induktionstheorie, 138, 153.
- K-regionstheorie der cancerogenen Kohlenwasserstoffe, 88, 90-94, 110, 112, 119, 258.
- Reiztheorie von Virchow, 148, 149.
- Somatische Zellmutationen-Theorie, 8, 96, 137, 148, 149, 151, 180, 191.
- Treffertheorie, 88, 150, 151.
- Umprägungstheorie, 148, 154, 155.
- Thiols (Cfr. Sulphydryl-Verbindungen).
- Toxische Allgemeinschädigung, 138-143.
- Treffertheorie des Krebses, 88, 150, 151.
- Trycaprylin, 92, 129.
- Trypflavin, 144, 165.

INDICE ANALITICO

- ultravioletti, 2, 6, 23, 27, 28, 43, 77, 140, 193.
- Reazione alla ninidrina, 224.
- Reazione di Freund e Kaminer, 227, 238.
- Respirazione dei tumori, 85, 94, 95.
- Rennina, 196.
- Ribonucleasi, 250.
- Riso decorticato, 56, 57.

- Saccharomyces Cerevisiae, 28, 29, 33, 75.
- Saccharomyces Ellipsoïdus, 28, 74.
- Sangue normale e canceroso (Aminoacidi nel), 223 e segg.
- Sarcoma, 139, 158.
- del ratto da benzoil-amino-estril-chinoleina, 209.
- di Jensen del ratto, 226, 229, 233.
- di Rous dei polli, 17, 19, 127.
- (Natura chimica dell'agente del), 239.
- (Acido cianidrico c), 243, 249, 250.
- « Screening test », 97.
- Sdifferenziazione delle cellule del cancro, 205.
- Sensibilità magnetica degli idrocarburi, 258, 259.
- Sessualità dei geni mutanti, 45.
- SH-Gruppi. (Vedi Gruppi sulfidrilici).
- Siero di sangue.
- (Aminoacidi nel) normale e canceroso, 223 e segg.
- (Azione del) normale e canceroso sulle cellule tumorali, 223 e segg.
- (Azione enzimatica defosforilante del) sulle nucleoproteine, 229.
- (Effetto cariolitico del), 228.

INDEX ANALITIQUE

- Styryl 430, 28-34, 74-77.
 — (Mécanisme cancérogène du), 216.
 — (Sarcome du rat par), 209 et suiv.
 Sulphydryl-groupes, 85, 87.
 — e cancérogenèse, 251 et suiv.
 — Enzymes, 252 et suiv.
 Surrénales, zone corticale. (Hyperplasie des), 273.
 Systèmes homologues et hétérologues, 232.
 Testosterone, 82.
 Théorie de la mutation cellulaire somatique du cancer, 8, 96, 137, 148, 149, 151, 180, 191.
 Théorie des K-régions de la molécule des agents cancérogènes, 88, 90-94, 110, 112, 119, 258.
 Théorie du bersaille dans la cancérogenèse, 88, 150, 151.
 Théorie électronique du cancer, 107-121, 140, 257-260.
 Théorie inductive de la cancérisation, 138, 153.
 Théorie irritative de Virchow, 148, 149.
 Théories sur l'action des radiations jonisantes, 88.
 Thérapie du cancer. (V. aussi Chimiothérapie), 135-145, 172.
 Thiols. (V. Sulphydryles groupes).
 Thyroïde (Tumeur de la), 206, 207.
 Transplantations des Tumeurs, 138, 198, 199, 209 et suiv., 233, 238.
 Trycapryline, 93, 129.
 Trypaflavine, 144, 165.
 Tyroxine, 206, 207.
 Tyroxinase, 106.

INDEX OF SUBJECTS

- Therapy of cancer. (Cfr. Chemotherapy), 135, 145, 172.
 Thiols. (Cfr. Sulphydryl-compounds).
 Thyroid (Tumour of), 206, 207.
 Transplantations, 138, 198, 199, 209 a. ff. 233, 238.
 Trycaprylin, 93, 129.
 Trypaflavin, 144, 165.
 Tyroxin, 206, 207.
 Tyroxinase, 106.
 Urea, 175, 196.
 Urethane, 81, 82, 87, 95, 96, 143, 146, 151, 165, 204.
 Vicia Faba, 144.
 Virus (Carcinogenic), 20, 21, 139, 154, 191.
 — of Rous's sarcoma, 239-250.
 Vitamine A, 94.
 — B₁, 24, 29.
 — B₂, 56.
 Walker's carcinoma of rats, 97.
 Yeasts.
 — (Adaptations, modulations, mutations, environment and), 28-46, 74-77.
 — (Cultural forms of), 36-46, 76, 77.
 — (Fermentative power of), 74, 76.
 — (Mutagenic substances produced by), 43, 44.
 — (Phylogenesis of), 37-40.
 — (Radium-races of), 28, 31, 43, 74.
 Yperite. (Cfr. Mustard Gas).

INHALTSVERZEICHNIS

- Tyroxin, 206, 207.
 Tyroxinase, 106.
- Ueberpflanzungen, 138, 198, 199, 209
 u. ff., 233, 238.
- Umprägungstheorie der Krebsgenese,
 148, 154, 155.
- Urea, 175, 196.
- Urethan, 81, 82, 87, 95, 96, 143, 146,
 151, 165, 204.
- Vererbung. (Cfr. Genetik).
 — (Biochemie der), 45.
 — und Krebs, 23 u. ff., 60, 141, 142,
 148-151.
 — und Strahlungen, 137 u. ff.
- Vicia Faba, 144.
- Viras, 153, 154, 193.
 — (Cancerogene), 20, 21, 139, 154, 191.
 — (Roussarkom), 239-250.
- Vitamin A, 94.
 — B₁, 24, 29.
 — B₂, 56.
- Wachstum.
 — (Hemmung der), 21, 56, 79, 80, 86,
 94-96.
 — (Regulierungsfaktoren der), 48.
 — des Krebses, 145, 194, 199, 223.
 — und Oestrogene, 60.
- Walker-Rattenkarzinom, 97.
- Yperit. (Cfr. Senfgas).
- Zellteilung, 18, 25, 86, 88, 95, 205.

INDICE ANALITICO

- (pH del), 238.
- Sistemi omologhi ed eterologhi, 232.
- Steroidi (Metabolismo degli), 93.
- Stilbamidina, 96.
- Stilboestrol, 81.
- Styryl 430, 28-34, 74-77.
 — (Meccanismo cancerogeno dello), 216.
 — (Sarcoma del ratto da), 209 e segg.
- Teoria del bersaglio nel cancro, 88, 150,
 151.
- Teoria della mutazione somatica del can-
 cro, 8, 96, 137, 148, 149, 151, 180,
 191.
- Teoria delle K-regioni della molecola de-
 gli agenti cancerogeni, 88, 90-94,
 110, 112, 119, 258.
- Teoria elettronica del cancro, 107-121,
 140, 257-260.
- Teoria induttiva della cancerogenesi,
 138, 153.
- Teoria irritativa della cancerogenesi di
 Virchow, 148, 149.
- Teorie sull'azione delle radiazioni joniz-
 zanti, 88.
- Terapia del cancro, 135-145, 172. (Vedi
 anche Chemioterapia).
- Testosterone, 82.
- Tioli. (Vedi Gruppi sulfidrilici).
- Tiroide (Tumore della), 206, 207.
- Tiroxina, 206, 207.
- Tiroxinasi, 106.
- Trapianti, 138, 198, 199, 209 e segg.,
 233, 238.
- Tricaprilina, 93, 129.
- Tripaflavina, 144, 165.
- Urea, 175, 196.
- Uretano, 81, 82, 87, 95, 96, 143, 146,
 151, 165, 204.

INDEX ANALITIQUE

- Urée, 175, 190.
Uréthane, 81, 82, 87, 95, 96, 143, 146,
151, 165, 204.
Vicia Faba, 144.
Virus, 153, 154, 193.
— cancérigènes, 20, 21, 139, 154, 191.
— du sarcome de Rous, 239-250.
Vitamine A, 94.
— B₁, 24, 29.
— B₂, 56.
Walker (Carcinome du rat), 97.
Ypérite. (Gaz Moutarde).

INDEX OF SUBJECTS

INHALTSVERZEICHNIS

Zytolytische Wirkungen und Effekte, 137, 138, 140, 145, 165.
 Zytomorphologische Wirkungen und Effekte, 144.

INDICE ANALITICO

Vicia Faba, 144.
 Virus, 153, 154, 193.
 — cancerogeni, 20, 21, 139, 154, 191.
 — del sarcoma di Rous dei polli, 239-250.
 Virus proteico, 251.
 Vitamina A., 94.
 — B₁, 24, 29.
 — B₂, 56.
 Walker (Carcinoma di) del ratto, 97.
 Yprite. (Vedi Gas Mostarda).

INDEX DES NOMS PROPRES

Les chiffres en caractère romain se réfèrent à la partie introductive, en caractère ordinaire au texte, en caractère italique à la bibliographie; les chiffres entre parenthèses se réfèrent à la page où commencent les Relations.

- Ahlström L., 229.
 Albareda A., XI.
 Albers V. M., 187.
 Alloway, 44.
 Amaldi U., XI.
 Andervont, 271, 274.
 Ando T., 69.
 Anson, 252.
 Armellini G., XI.
 Auerbach C., 8, 10, 26, 27, 36, 43, 44, 68, 69, 80, 99, 142.
 Au M. H., 185.
 Avery O., 44, 69, 76.
 Bach, 224.
 Bacq Z. M., 256, 257, 262.
 Badger G. M., 99, 119, 122, 258, 262.
 Balakrishna Rao S., 227.
 Ball Z. B., 274, 278.
 Bang F., 2, 10.
 Barbieri G. P., 255, 263.
 Bardwell, 182.
 Bargonì N., 230, 231.
 Barnum C. P., 274, 275, 278.
 Barron E. S. G., 85, 99.
 Barry, 128.
 Bassi M., 254, 263.
 Battaglia B., VII.
 Bauer K. H., 141.
 Baumann C. A., 56, 70.
 Baumberger J. P., 182.
 Beadle G. W., 24, 28, 43, 67, 68.
 Beck, 128.
 Beekmans M. L., 52, 57, 70.
 Bell T. T., 67.
 Beltrami W., 251, 263.
 Béraud P., 28, 29, 31, 68, 74.
 Berenblum I., v, XI, (1), 2, 3, 6, 7, 8 10, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 48, 82, 99, 105, 119, 122, 126, 130, 139, 159, 170, 180, 191, 204, 267.
 Bergmann, 243, 246, 247, 248.
 Beumer J., 44, 69.
 Bielschowschky F., 6, 10.
 Biesele J. J., 182.
 Billingham, 155.
 Binder, 44, 69.
 Bittner J. J., VI, (269), 273, 274, 275, 276, 278.
 Boivin A., 44, 69, 76.
 Boldrini M., XI.
 Booth J., 100.
 Boretti G., 252, 253, 262, 263.
 Boyland E., v, VII, XI, 14, 23, 67, (79), 99, 100, 105, 106, 119, 122, 126, 134, 161, 170, 172, 195, 204, 205, 218, 253, 262.
 Brachet, 48.

- Brañez-Ceperó, 209.
 Bryan, 274.
 Brown D. M., 216, 218.
 Browning C. H., 209, 216, 218, 222.
 Buffon, 194.
 Bullet, 251, 262.
 Burk D., 70, 195.
 Burrow, 16.
 Burrows H., 128, 218.
 Buu-Hoi N. P., 110, 119, 122.
 Cabot S., 2, 10.
 Cagniant P., 122.
 Calcutt G., 254, 262.
 Caldwell A. Lee, 186.
 Calvi di Coenzo K., VII.
 Carr J. G., 26, 27, 36, 43, 68, 69, 80
 99.
 Carruthers C., 182, 183, 184, 186,
 187.
 Cesi F., III.
 Chalmers, 130.
 Chambers, 181.
 Chévremont M., 256, 262.
 Christensen, 224.
 Christiani, 21.
 Chu C. H. U., 183.
 Clegg J. W., 99.
 Clowes G. H. A., 186.
 Cohen J. B., 218.
 Colonnetti G., XI.
 Constantin Th., 33, 37, 38, 39, 42, 43,
 44, 68, 75, 77.
 Cook J. W., 108, 119, 122, 128, 255.
 Cooper K. E., 218.
 Cooper Z. K., 183, 186, 187.
 Corbellini, 20.
 Costello C. J., 184.
 Cowdry E. V., VI, VII, XI, 15, 47, 105,
 134, 170, (173), 182, 184, 185,
 186, 187, 188, 191, 204, 206, 222,
 238, 249.
 Crabtree H. G., 2, 10, 251, 262.
 Cramer W., 184, 185, 186, 187.
 Criegee R., 99.
 Cruz-Coke E., VI.
 Curman Chr., 227, 228.
 Curtiss M. R., 60, 70.
 Cuvelier E., 56, 70.
 Cuvier, 194.
 Dat, 110.
 Daudel, 88.
 Daudel P., 110.
 Daudel R., 99, 109, 110, 122, 258, 262.
 Dawson, 44.
 De Blasi D., XI.
 Declerck J., 29, 31, 33, 34, 68, 110.
 Deelman H. T., 2, 10, 11, 12, 13.
 Delaunov A., 69.
 Demerec M., 28, 68, 141, 170.
 Derom E., 2, 10.
 Dewar, 258.
 Dezza P., VII.
 Diamond L. K., 100.
 Dickens F., 93, 100, 129, 195.
 Dickmans S., 85, 99.
 Dillon, 224.
 Dixon M., 99.
 Dunning W. F., 60, 70.
 du Vigneaud V., 70.
 Eckhardt H. J., 90, 99.
 Edlbacher, 224.
 Ek B., 229.
 Ekert, 110.
 Ellingworth S., 218.

- Elson L., 94, 100.
Engelbreth-Holm J., 80, 99.
Euler, voir von Euler.
Farber S., 96, 100.
Feulgen, 228, 229.
Findlay G. M., 2, 10.
Finocchi M., VII.
Firminger, 183.
Fischer P., 256, 262.
Flaschenträger, 251, 262.
Fleming A., VI, XI.
Fond A., 230.
Francois M. A., 69.
Frankel Sam., 186.
Franklin H. C., 183.
Frederic J., 256, 262.
Freund E., 227, 228, 232.
Friebe, 79, 99.
Friedewald W. F., 3, 10.
Fujiwara T., 70.
Gaetani E., 251, 262.
Galeazzi-Lisi R., XI.
Gallico E., 253, 254, 258, 262, 263.
Gatterer A., XI.
Gemelli A., VIII, XI.
Geren B. B., 184.
Geschichter C. F., 60, 70.
Ghigi A., XI.
Giordani F., XI.
Godwin D., 227.
Goffart M., 256, 262.
Gola G., XI.
Goldacre R. J., 87, 99.
Goldschmidt, 24.
Gopal-Ayengar A. R., 185.
Green R. G., 274, 278.
Greenstein J. P., VI, XI, 15, 74, 76, 105,
170, 191, (193), 200, 204, 205,
206, 238, 249, 253, 262.
Griffith, 44.
Guilliermond A., 38, 68.
Gulbransen R., 209, 216, 218.
Haddow A., VI, 80, 81, 84, 99, 100, 141,
143, 216, 218.
Hadorn, 143.
Hall W. H., 6, 10.
Halvorson H. O., 274, 278.
Harlan I., 183.
Harris R. J. C., 99.
Hasselquist H., 229.
Helen C., 183.
Heller L., 223, 225, 226, 227, 228, 230
231.
Henry C. Jr., 184.
Henshaw P. S., 99.
Hensow, 143.
Heston, 161.
Hieger, 128.
Hirschfeld A., 228.
Hoan, 110.
Högberg B., 234.
Hogeboom G. H., 230.
Hollaender A., 28, 68.
Hollweck F., 28, 68.
Hopkins F. G., 253, 262.
Horning E. S., 23, 67, 80, 99, 161.
Horowitz N. H., 67.
Huseby R. A., 273, 275, 276, 278, 279,
281.
Iball J., 216, 217, 218.
Imagawa D., 274, 278.
Jaffe, 143.
Jacques, 110.
Jacquignon, 110.

- Jean, 110.
 Jenriette W. V., 262.
 Kamen M. D., 184, 185.
 Kaminer G., 227.
 Kasiwabara, 70.
 Kathleen, 182.
 Kekulé, 258.
 Kenneway E. L., 80, 99, 108, 122,
 127, 128.
 Kensler C. J., 70.
 Khoi, 110.
 Kidd J. G., 3, 10.
 Kinoshita, 56, 69.
 Klemm W., 259, 262.
 Koller P. C., 14, 80, 82, 99.
 Kon G. A. R., 99, 216, 218.
 Korteweg, 276.
 Kraemer D. Ziegler, 185.
 Kretz J., VI, XI, 172, 238.
 Kruis K., 45, 69.
 Kung S. K., 185.
 Lacassagne A., VI, VII, XI, 15, 16, 28,
 31, 43, 59, 62, 68, 70, 74, 77, 88,
 (107), 122, 126, 140, 204, 206.
 Lambert, 76.
 Langeron M., 38, 68.
 Lansing A. I., 185.
 Latarget R., 43, 69, 157.
 Laustsen O., 24, 45, 67, 69.
 Lavit, 110.
 Lecocq J., 110, 122.
 Lehout Y., 69.
 Leiter J., 10.
 Lepri G., XI.
 Leupold, 153.
 Levan A., 41, 68.
 Levi A. A., 100.
 L'Héritier, 155.
 Liang Hsu-Mu, 185.
 Li Chao-t'e, 185.
 Lindegren, 35, 45.
 Lindegren C. C., 26, 67, 69.
 Lindegren C. L., 67.
 Lindegren G., 67.
 Lischer C. E., 186.
 Lombardi L., XI.
 Lotti G., VII.
 Lotti H., VII.
 Loveless A., 87, 99.
 Lu D. G., 234.
 Lutwak-Mann C., 262.
 Ma C. K., 185.
 Mac Carty M., 44, 69.
 Mac Fadyen D. A., 224.
 Mac Kenzie I., 3, 10.
 Mac MacLeod C., 44, 69.
 Maisin J., VI, VII, XI, 16, (23), 57, 69,
 70, 75, 157, 204, 250.
 Manninger, 44, 69.
 Marchand B., 99.
 Margottini M., VII.
 Mark, 238.
 Marotta D., VII.
 Martin, 110.
 Marziali M., VII.
 Max Paul F., 186.
 Mayneord, 16.
 Mayr G., 258, 260, 262, 263.
 Mc Afec M., 182.
 Medawar, 155.
 Meerseman, 60.
 Mercer R. D., 100.
 Merck, 31.
 Miescher, 151.
 Miller E. C., 91, 100.
 Miller J. A., 70, 91, 100.

- Miner D. L., 70.
 Mirsky A. E., 252, 262.
 Monod J., 31, 36, 68, 171.
 Morgan E. J., 262.
 Mori K., 69, 70.
 Morigami, 70.
 Morlacchi L., VII.
 Mottram J. C., 6, 10, 11, 12, 13, 18, 100.
 Muller H. J., 79, 99.
 Murphy, 127.
 Nadson G., 28, 68.
 Nakahara W., 56, 69, 70.
 Needham D. M., 48, 99, 141.
 Nettleship A., 99, 143.
 Newhouse J. P., 254, 262.
 Nielsen, 32, 33.
 Niggli, 143.
 Niven J. S. F., 209, 216, 218.
 Nogradi, 44, 69.
 Orr, 20.
 Pacault A., 119, 258, 259, 260, 262, 264, 265, 266.
 Pacault J., 122.
 Painter T. S., 99.
 Palade G. E., 230.
 Paletta F. X., 184, 185, 186.
 Pappenheim, 228.
 Paterson E., 99.
 Peacock P. R., VI, VII, XI, 16, 75, 76, 77, 105, 126, (127), 134, 205, 206, 222, 250.
 Pentimalli F., VI, XI, 17, 74, (239), 249, 250.
 Perrault A., 10.
 Peterfi, 210.
 Petri, 229.
 Petritsch E. F., VI, XI, (291).
 Philippov G., 28, 68.
 Pie IX, III.
 Pie XI, III.
 Pie XII, VIII, XI.
 Pierantoni U., XI.
 Pinck L. A., 120, 122.
 Potter V. R., 195, 251, 262.
 Pourbaix Y., 28, 29, 31, 33, 34, 56, 68, 69, 70.
 Pozzi L., 251, 262.
 Pullman, 88, 90, 109, 110, 258, 266.
 Pullman A., 109, 122, 258, 260, 262, 263.
 Pullman B., 258, 260, 263.
 Putnoky Fr. J., 233.
 Rapaport, 143.
 Reller H. C., 183, 186.
 Rhoden E., 99.
 Ritchey M. G., 186, 188.
 Roberts E., 185, 186.
 Robertson J. M., 119, 122.
 Robson J. M., 8, 10, 26, 27, 36, 43, 44, 68, 69, 80, 99, 142.
 Roe E. M. F., 99.
 Romeis B., 231.
 Rondoni P., V, VI, XI, 20, 75, 76, 134, 181, 195, 229, (251), 251, 252, 253, 255, 257, 263, 267.
 Rosenthal T. B., 185.
 Ross W. C. J., 87, 99.
 Rous P., 3, 5, 10, 11, 12, 13, 18, 127.
 Roux W., 18.
 Royer, 110.
 Rudali G., 113, 122.
 Rush H. P., 6, 10, 11, 12, 13, 56, 70.
 Ruzicka L., VI, XI, 21, 267.
 Sall E. D., 2, 10.
 Salviucci P., V, XI.
 Samuels, 276, 279, 280, 281.

- Samuels B. K., 278.
 Samuels L. T., 278.
 Sansome E. R., 28, 68.
 Sanz Ibañez J., VI, XI, 14, (209), 222,
 249.
 Satava J., 45, 69.
 Schiff Alice, 183.
 Schinz H. R., VI, XI, 21, 75, (135),
 149, 170, 172, 207, (295).
 Schmidt Otto, 107, 108, 122, 123, 124,
 125, 139, 257, 258, 260, 263, 266.
 Schneider W. C., 230.
 Schoen, 74.
 Schoen M., 68.
 Schoen W., 28.
 Scott C. M., 99.
 Scott J. D., 99.
 Segaloff A., 60, 70.
 Severi F. XI.
 Shear, 119, 129.
 Shear M. J., 10, 122.
 Shear N., 10.
 Shoenthal, 130.
 Shope, 20.
 Shubik P., 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 119,
 122.
 Shuzo, 70.
 Sia, 44.
 Simoes R. D., 184.
 Simpson W. L., 184, 186, 187.
 Singer T. P., 85, 99.
 Skovsted A., 41, 68.
 Smith F., 273.
 Snapper I., 96, 100.
 Soave Fr., 233.
 Solodkowska W., 229.
 Sonneborn T. M., 67, 154.
 Spanglee J. M., 70.
 Speeman, 48, 152.
 Spiegelman S., 26, 35, 67, 68, 155, 170,
 171.
 Stein J., XI.
 Stern K., 195, 227.
 Stotz, 195.
 Stowell R. E., 184, 185, 187.
 Strong L. C., 80, 99, 141.
 Sugiura K., 70.
 Suntzeff V., 182, 183, 184, 186, 187,
 188.
 Svartholm N., 109, 122.
 Sylvester R. F., 100.
 Talice R. V., 38, 68.
 Tannenbaum A., 6, 10, 16.
 Tatum E. L., 24, 28, 43, 67, 68, 186,
 188.
 Thomas I. A., 99.
 Thompson, 184.
 Tishkoff Garson H., 186.
 Toniolo A. R., XI.
 Trabacchi G. C., VII.
 Tulasme R., 69.
 Vallauri G., XI.
 Van Dyke J. H., 184.
 Van Slyke D. D., 224.
 Vendrely R., 69.
 Vercelli F., XI.
 Vigneaud, 56.
 Vincent, 16.
 von Euler VI, XI, 21, 106, (223), 223,
 225, 226, 227, 228, 229, 230, 234,
 235, 238.
 Vroelant, 110.
 Waddington, 141.
 Wannowius H., 99.
 Warburg O., 194, 200.
 Warwick O. H., 99.

Watkinson J. M., 99.

Weigert F., 100, 253, 262.

Weil, 44, 69.

Weil-Malherbe H., 93, 100, 129.

Weiss P., 9, 10, 31, 36, 68, 171.

White J., 262.

Wicks L. F., 186, 188.

Willheim, 227.

Winge O., 24, 45, 67, 69.

Wolf G., 100.

Wolfe L., 227.

Wolf J. A., 100.

Woolley, 273.

Wildiers, 28.

Young L., 100.

Zajela, 113.

Ziegler D. M., 188.

Zimmer E., 28, 68.

TABLE DES MATIÈRES

	PAG.
PRÉFACE	III
L'AUDIENCIE ET LE DISCOURS DU SAINT-PÈRE	IX

TRAVAUX SCIENTIFIQUES

The biological mechanism of carcinogenesis. (Prof. I. BERENBLUM, Oxford)	I
Adaptations cellulaires, modulations et mutations dans leurs rapports avec l'environnement et le cancer expérimental (Prof. J. MAISIN, Louvain)	23
The biochemistry of carcinogenesis and experimental chemotherapy of cancer. (Prof. E. BOYLAND, London)	79
Étude du pouvoir cancérogène de nouvelles benzacridines angulaires. - Essai de contrôle de la théorie électronique. (Prof. LACASSAGNE, Paris)	107
The Influence of solvents on tissue response to chemical carcinogens. (Dr. P. R. PEACOCK, Glasgow)	127
Cancerogene, cancericide, mutagene und morphogene Strahlen und Stoffe im Mitoseversuch. (Prof. H. R. SCHINZ, Zürich)	135
Properties of squamous cell cancer compared with those of normal epidermis. (Prof. E. V. COWDRY, St. Louis)	173
Some biochemical aspects of cancer. (Prof. J. P. GREENSTEIN, Washington)	193
Producción experimental de sarcoma en el ratón par la simple inyección subcutánea de una benzoil-amino-estiril-quinoleína. (Prof. J. SANZ IBAÑEZ, Madrid)	209
Actions of normal and sarcomatous sera on tumour cells. (Prof. H. VON EULER, Stockholm)	223
Nature of the agent of Rous sarcoma. (Prof. F. PENTIMALLI, Napoli) . .	239

	PAG.
The mode of action of the carcinogenic hydrocarbons. (Prof. P. RONDONI, Milano)	251
The etiology of mammary cancer in mice. (Prof. J. J. BITNER, Minnesota)	269
CONCLUSIONS	283
Die Einwirkung von Ultraschall auf Krebsgewebe. (Prof. E. F. PETRITSCH, Wien). Appendice	291
La metastasizzazione elettiva ematogena nei malignomi. (Prof. H. R. SCHINZ, Zürich). Appendice	295
INDEX ANALITIQUE	306
Index of subjects	306
Inhaltsverzeichnis	307
Indice analitico	307
INDEX DES NOMS PROPRES	339