

(Aus dem Biologischen Laboratorium der I. G. Farbenindustrie Aktiengesellschaft  
Ludwigshafen a. Rh., Werk Oppau.)

## **Der Einfluß der Einfrierung bei tiefen Temperaturen auf die Verimpfbarkeit transplantabler Tumoren von Maus, Ratte und Kaninchen.**

I. Mitteilung.

### **Untersuchungen am Ehrlich-Mäusesarkom.**

Von

**J. Klinke.**

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 15. September 1937.)

### **I.**

Die Tatsache, daß transplantables Säugetiergeschwulstmaterial erheblichen Kältegraden ausgesetzt werden kann, ohne daß es zu einer völligen Aufhebung der Transplantabilität des vorbehandelten Tumorgewebes kommt, wurde bereits früher (*Ehrlich, Jensen, Apolant, Uhlenhuth und Weidanz* u. a.) beobachtet. Während zur Erhaltung einer erfolgreichen Verimpfbarkeit in solchen Versuchen Temperaturen von etwa  $-35^{\circ}$  kaum unterschritten wurden, zeigte *Gaylord*<sup>1</sup>, daß mit den Zellen eines transplantierten Mäusecarcinoms auch nach fast  $1\frac{1}{2}$  stündiger Einfrierung in flüssiger Luft noch Tumoren erzeugt werden konnten. Auch *Salvin, Moore* und *Barrat*<sup>2</sup> erhielten nach etwa 30 Minuten langer Einfrierung von Material aus einem Mäusecarcinomstamm bei Übertragung noch positive Impfangänge. *Koose* und *Lemmel*<sup>3</sup> untersuchten in ausgedehnten Versuchsreihen bei Benutzung von flüssiger Luft als Gefriermittel den Einfluß der Einfrierung auf die Verimpfbarkeit zweier verschiedener Mäusecarcinomstämme. Sie konnten diese Stämme nach 30minutenlanger Einfrierung erfolgreich weiterverimpfen. Den zweiten Tumor, einen „unter dem histologischen Bild eines Rundzellensarkoms wachsenden Mäusecarcinomstamm“, gelang es noch nach 4tägiger Einfrierung erfolgreich weiterzutransplantieren. *W. Cramer*<sup>4</sup> prüfte 7 verschiedene Geschwulststämme auf ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber der mehrmaligen Einfrierung mit Kohlensäureschnee auf dem Gefriermikrotom. Die verimpften Sarkomgewebe ergaben nach dieser Vorbehandlung wieder Tumor, während die Carcinommaterialien keinen Geschwulstangang mehr bewirkten. Von 3 untersuchten Sarkomstämmen ergab nur 1 bei der Verimpfung keinen Tumorangang mehr, wenn der Autor die vorherige mehrmalige Einfrierung statt in Kohlensäureschnee mit flüssiger Luft als Kältemittel durchführte. Auch in

*Aulers*<sup>5</sup> Versuchen mit Kohlendäureschnee blieb die Transplantabilität der untersuchten Geschwulstgewebe nach unterschiedlich langdauernder, einmaliger Einfrierung teilweise erhalten.

Es ist somit nach den bisher vorliegenden Ergebnissen, trotz der teilweise unterschiedlichen Resultate der einzelnen Autoren, kaum zweifelhaft, daß die erfolgreiche Verimpfbarkeit transplantabler Tumoren auch nach Einwirkung hoher Kältegrade erhalten bleiben kann. Diese Tatsache würde an sich bereits einen sehr interessanten Befund darstellen. Sie schien besonders geeignet, die Frage nach dem für die erfolgreiche Verimpfbarkeit der Säugetiertumoren verantwortlichen ursächlichen Faktor von einer anderen Seite her zu beantworten.

Doch die Auffassungen in der Frage, auf welche Weise sich aus den kältevorbehandelten Geschwulstgeweben neue Geschwülste entwickeln, sind, wie die Literatur zeigt, noch nicht einheitlich. Während *Cramer*, *Koose* und *Lemmel* annehmen, daß möglicherweise aus den durch die Kälte zerstörten Geschwulstzellen ein malignes Agens austritt und zur Geschwulstbildung führt, nimmt *Auler* die Existenz kälteresistenter Geschwulstelemente an, und *Rössle*<sup>6</sup> sah in Versuchen mit Tumorgewebe, das vorher in flüssigem Stickstoff eingefroren war, die Geschwulstbildung von einzelnen, die Gefrierung überlebenden Zellen des Implantatrandes ausgehen. Die Untersuchungen *Borsts*<sup>7</sup> und seiner Schüler weisen auf eine möglicherweise hohe Resistenz spezifischer kleiner Zellelemente, der „Klein-Zellen“ hin. Jedenfalls erfährt die wichtige Frage der Kältewiderstandsfähigkeit des Geschwulstgewebes zur Zeit im *Borstschen* Institut eine eingehende Bearbeitung\*. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß *Vollmar*<sup>8</sup> an kleinen Tumorzellen eine hohe Röntgenstrahlen-Unempfindlichkeit feststellte. Auch wir werden auf diese Fragen noch später eingehen. An dieser Stelle darf jedoch gesagt werden, daß auch mir die erfolgreiche Verimpfbarkeit kältevorbehandelter Geschwulstfragmente, über die im folgenden berichtet werden soll, als eine Möglichkeit erschien, Säugetierneoplasmen unter Ausschluß lebender Geschwulstzellen erfolgreich zu verimpfen\*\*. Doch die zahlreichen Versuche, die gleichen Geschwulststämme nun analog dem *Rous-Sarkom* mittels Ultrafiltraten erfolgreich zu übertragen, schlugen fehl<sup>9</sup>, und machten die ursprünglich den Gefrierversuchen gegebene Deutung unwahrscheinlich.

\* Gelegentlich der 30. Tagung der Deutschen Pathologischen Gesellschaft in Frankfurt a. M. vom 15.—18. September 1937 berichtete *Hörner* in Bestätigung der hier gemachten Angaben, daß ihm die Verimpfung von vorher in flüssigem Stickstoff eingefrorenem Mäusecarcinom ebenfalls gelungen sei.

\*\* Dies auch deshalb, weil in meinen Versuchen der Züchtung der kältevorbehandelten Geschwülste in vitro ähnlich wie bei *Cramer*, *Koose* und *Lemmel* keine Wachstumsphänomene mehr kenntlich waren. Über diese Versuche soll an anderer Stelle berichtet werden.

## II.

Der Versuch, die eingangs erwähnten Arbeiten der verschiedenen Autoren in bezug auf die an einzelnen bestimmten Geschwulststämmen gewonnenen Ergebnisse zu vergleichen, ist reizvoll. Er stößt jedoch auf Schwierigkeiten, denn die an den einzelnen Stämmen erhaltenen Resultate sind teilweise mit sehr unterschiedlichen Methoden gewonnen worden. Langdauernde Einfrierung bei geringen Kältegraden, kurzdauernde bei sehr tiefen Temperaturen, einmalige Einfrierung in einem bestimmten Gefriermittel, mehrmalige mit einem anderen Kältemittel wurde angewendet, um die Kältewiderstandsfähigkeit zu prüfen. Es wurden einmal unterschiedlich große zusammenhängende Geschwulstpartien, dann kleinere Tumorzellaggregate der Einfrierung ausgesetzt. Dabei muß weiterhin berücksichtigt werden, daß schon innerhalb der gleichen Forschungsstätte bei der Verimpfung von frischem Geschwulstgewebe bemerkenswerte Unterschiede in der Impfausbeute und der Wachstumsgeschwindigkeit, teilweise in starker Abhängigkeit von jahreszeitlichen Schwankungen der Resistenz der Versuchstiere\* zu beobachten sind.

Von den verschiedensten Faktoren kann demnach eine Beeinflussung der Resultate solcher Kälteresistenzversuche an Tumorgewebe erwartet werden. *Denn jede Form der Einfrierung ist im Grunde genommen kaum etwas anderes als eine bei den benutzten verschiedenen Methoden wechselnd starke Schädigung eines vielfach schon innerhalb des gleichen Tumorstammes unterschiedlich erfolgreich verimpfbares Frischgewebes.* Es schien uns daher notwendig, bei der Prüfung unserer verschiedenen Geschwulststämme der einzelnen Tierarten auf ihre Kältewiderstandsfähigkeit stets die gleiche Methode der Einfrierung, und zwar *die direkte Einfrierung der verschiedenen Tumorgewebe in flüssigem Stickstoff* anzuwenden. Erst wenn der Nachweis der Kältewiderstandsfähigkeit in Grundversuchen gelungen war, wurden bei einigen Geschwulststämmen Einzelheiten der Methodik der Einfrierung und des Tierversuchs variiert. Es ist nicht bezweckt, eine vollständige Wiedergabe aller angestellten Experimente durchzuführen. Wir werden uns darauf beschränken, die an den geprüften Säugertumorstämmen innerhalb eines etwa 4jährigen Zeitraumes erhobenen Befunde, soweit sie auf das gewählte Thema Bezug haben, in einer kleineren Anzahl von Mitteilungen kurz wiederzugeben.

Die Tumorstämme, an denen in unserem Laboratorium der Einfluß der direkten Einfrierung in flüssigem Stickstoff untersucht wurde, waren:

---

\* Hierzu siehe „Statistische Untersuchungen über das Wachstum von Impftumoren“. C. Dittmar u. W. Schäfer, Z. Krebsforsch. **45**, 449 (1937).

*Mäuse:* Ehrlichsches Sarkom, Ehrlichsches Carcinom, Collierscher Ascites-Tumor, Passetysches Melanom\*, Ehrlich-Putnoky-Tumor, Chondrosarkom\*\*, Spontane Mammacarcinome.

*Ratten:* Jensen-Sarkom, Flexner-Jobling-Carcinom, Ehrlich-Putnoky-Tumor (der Maus) auf Ratten.

*Kaninchen:* Brown-Pearce-Carcinom.

Die Versuche wurden nach den im folgenden wiedergegebenen allgemeinen methodischen Angaben durchgeführt. Auf Abweichungen wird innerhalb der entsprechenden Experimente hingewiesen werden.

#### *Allgemeine Methodik.*

*Flüssiger Stickstoff.* Er wurde von uns aus der Lufttrennungsanlage des Werkes Oppau bezogen. Temperatur etwa  $-196^{\circ}$ . Gehalt an flüssigem  $O_2$  etwa 1—2%. Wir ließen ihn in kugelige Dewargefäße von etwa 2 l Fassungsvermögen, die vorher sterilisiert wurden, abfüllen. Zum Versuch wurden unterschiedlich große zylindrische Dewargefäße, in die die Gewebe eingebracht wurden, damit gefüllt. Teilweise erfolgte die Einfrierung in Petrischalen oder Platingefäßen. Während kurz-dauernder Versuche erfährt der flüssige Stickstoff eine relative, in unseren Experimenten praktisch zu vernachlässigende Zunahme an flüssigem  $O_2$ , da der kältere  $N_2$  infolge seines höheren Dampfdruckes schneller verdampft als der flüssige Sauerstoff. Bei länger dauernden Versuchen kann diese Sauerstoffanreicherung durch Wahl entsprechend großer Volumina, Abdecken der Versuchsgefäße und weitere isolierende Maßnahmen wirksam vermieden werden. Wir haben diese Tatsachen berücksichtigt und sind daher berechtigt anzunehmen, daß unsere Experimente als Gefrierversuche mit flüssigem Stickstoff zu gelten haben. In entsprechenden Versuchen wurden in Parallele Geschwulstfragmente in flüssigem Stickstoff bzw. in reinem flüssigem Sauerstoff eingefroren. Die Verimpfbarkeit blieb in beiden Versuchen erhalten. Eine Filtration des flüssigen Stickstoffs durch bakteriendichte Kerzen erübrigte sich nach unserer Erfahrung.

*Tumorausgangsmaterial.* Zu den Versuchen wurden, soweit mit soliden Tumoren gearbeitet wurde, im allgemeinen die peripheren Partien benutzt; die bekanntlich fast regelmäßig nekrotischen zentralen Anteile wurden nicht verwendet. Das gilt nicht nur für die aus der Subcutis gewonnenen Geschwülste, sondern sinngemäß auch für aus der Bauchhöhle entnommenes Tumormaterial. Bei unseren Frisch-

\* Diesen Tumor sandte uns liebenswürdigerweise Herr Dr. K. Sugiura, New York. Wir danken ihm bestens für die Überlassung.

\*\* Das Laboratorium erhielt diesen Tumor von Herrn Dr. Fritz Silberstein, Wien, dem wir für seine Freundlichkeit bestens danken.

transplantationen solider Gewächse an Maus und Ratte schieben wir durch eine Schnittwunde der Haut das entsprechend große Implantat in einen Sondenkanal. Dann wird die Haut vernäht und die Naht mit Jodkollodium abgedeckt. In gleicher Weise wurde mit vorher gefrorenen Transplantaten verfahren. Für die Gefrierversuche wurde das Frischmaterial in eine Anzahl Implantate zerlegt und ein Teil dieser Stückchen der Einfrierung unterworfen. Der Rest wurde als Kontrollmaterial in frischem Zustand transplantiert. Zur Gefrierung wurden die Geschwulststückchen einzeln in den flüssigen Stickstoff gebracht. Sie schwimmen eine kurze Zeit auf der Oberfläche und sinken dann zu Boden. Die Verdampfung des flüssigen Stickstoffs geht noch eine unterschiedlich lange Zeit vor sich, je nach der Größe und Menge der eingebrachten Implantate. Allmählich hört die grobe Blasenbildung auf, das eingebrachte Material hat die Temperatur des flüssigen Stickstoffs erreicht. Von diesem Zeitpunkt begann unsere „Zeit der Einfrierung in flüssigem Stickstoff“. Sie ist kürzer als die Gesamtzeit, die das Tumormaterial in Kontakt mit dem flüssigen Stickstoff war. Die folgenden Zeitangaben über die Dauer der Gefrierung beziehen sich lediglich auf die „Zeit der Einfrierung in flüssigem Stickstoff“. Geschwulstbrei wurde entweder in kleinen Portionen analog den Implantatstückchen oder in dünner Schicht ausgebreitet eingefroren. Die Pulverisierung des gefrorenen Materials in Mörsern wurde unter dauernder Zugabe des flüssigen Stickstoffs aus dem Vorratsgefäß durchgeführt. Flüssigkeiten (Suspensionen usw.) wurden stets in den flüssigen Stickstoff eingetroptft. Nach beendeter Einfrierung wurde meist der überstehende Stickstoff abgegossen und die gefrorenen Materialien zum Tauen in sterile Gefäße überführt. Implantate wurden in Petrischalen ausgelegt und unter Schutz vor Luftinfektion bei Z.T.° aufgetaut. Die getauten Tumorstückchen sind weicher als das gleiche Gewebe in frischem Zustand. Sie sehen gequollen und in gewissem Grade durchscheinend aus. Die Verimpfung wurde meist unmittelbar an das vollständige Auftauen angeschlossen. Es wurde vermieden, größere zusammenhängende Mengen gefrorenen Materials aufzutauen. Lagen solche vor, so wurden sie vorher zerkleinert. Gefrorene Tropfen wurden gesammelt und entsprechend aufgetaut. Die Tauzeit wurde verschiedentlich variiert; darauf wird an entsprechender Stelle hingewiesen werden. Es entsprach jedoch meist dem Zweck der Versuche, die getauten Materialien umgehend zur Verimpfung zu bringen, da eine möglichst hohe Impfausbeute erreicht werden sollte.

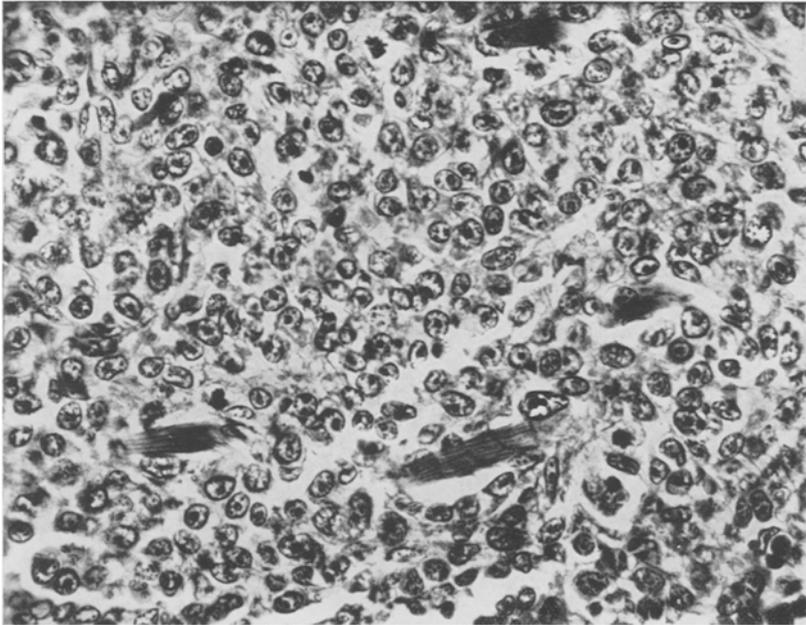
*Ohne den noch wiederzugebenden einzelnen Befunden vorwegzugreifen, soll an dieser Stelle bereits mitgeteilt werden, daß es grundsätzlich gelang, die eingangs aufgezählten Geschwulststämme von Maus, Ratte und Kaninchen mit vorher in flüssigem Stickstoff eingefrorenem Material erfolgreich*

zu verimpfen. Auf die zwischen den einzelnen Stämmen bestehenden, teilweise charakteristischen Unterschiede in der Kältewiderstandsfähigkeit wird später eingegangen werden.

### III.

#### Versuche mit dem Ehrlichschen-Mäusesarkom.

Die Versuche mit diesem Tumor wurden im Sommer 1933 begonnen. Der Stamm schien uns für die Überprüfung der Frage besonders geeignet. Er gab bei der subcutanen Stückchen-Transplantation klinisch



Ehrlichs Sarkom der Maus bei 462facher Vergrößerung.

im allgemeinen auf allen Tieren schon nach kurzer Zeit Anschlag. Die entstandenen Geschwülste wuchsen schnell zu großen Tumoren an, die bei entsprechender Ausdehnung häufig Einbruch in den Bauchraum zeigten. Hierbei fand sich dann u. a. meist die Bauchspeicheldrüse von Tumormassen unterschiedlich stark durchsetzt. Spontane Rückbildung wurde fast nie beobachtet.

Die Abb. 1 zeigt den benutzten Tumorstamm, ein polymorphzelliges Geschwulstgewebe bei Vorherrschen des Typs des Rundzellen-Sarkoms.

Die ersten Experimente, die Kältewiderstandsfähigkeit dieses Stammes zu überprüfen, wurden an Implantaten durchgeführt, an denen entsprechend den bereits gemachten Ausführungen die „Zeit der Ein-

frierung in flüssigem Stickstoff“ 3 Minuten betrug. Dann wurde die Dauer der Gefrierung verlängert. Wir beschränken uns auf die Wiedergabe einzelner charakteristischer Versuche.

*Versuch der kurzdauernden Einfrierung.*

Aus dem subcutanen Tumor der Spendermaus wurden 16 gleichgroße Implantate hergestellt. 8 Fragmente wurden auf die Dauer von 3 Minuten eingefroren, danach bei Zimmertemperatur aufgetaut und subcutan verimpft. Die restlichen 8 Transplantate dienten als Kontrolle des Angangs des Frischmaterials. Die benutzten Tiere waren 16 unvorbehandelte Normalmäuse. Versuch vom 7. IX. 1933. Versuchsbezeichnung V<sub>g</sub>M 125—140.

Das Ergebnis dieses Versuches war folgendes:

Die mit getautem Sa.-Gewebe beimpften 8 Tiere ergaben etwa 16 Tage nach der Beimpfung klinisch deutliche, beginnende Geschwulstbildung. An allen Tieren wuchsen die Tumoren weiter. Ein Tier verendete mit gut kirschgroßem Tumor, an den anderen Tieren wurden die Geschwülste etwa bis walnußgroß. Dann gingen die Mäuse ein. In einem Zeitraum von 29—45 Tagen waren alle Tiere tot. Die histologische Untersuchung\* ergab in allen Fällen Sarkome vom Typ des Ausgangstumors. Die mit Frischmaterial beimpften Kontrollmäuse ergaben ebenfalls 8mal Geschwulstbildung. Der Angang der Implantate war klinisch nach 9 Tagen feststellbar. Im weiteren Zeitraum von 12 bis 30 Tagen waren alle Tiere mit großen Sarkomen verendet. Es zeigte sich somit, daß die Sarkomimplantate nach vorheriger Einfrierung auf den beimpften Tieren wiederum Sarkome erzeugt hatten, und daß die Geschwulstentwicklung an den Versuchstieren deutlich verzögert erfolgte. Wie die laufend durchgeführten Messungen der Tumorgößen ergaben, waren an den Versuchstieren die Sarkome nicht ganz so groß geworden wie an den mit Frischimplantaten beimpften Kontrollmäusen. Das Resultat des wiedergegebenen Versuchs wurde durch die Ergebnisse anderer Serien bestätigt. Doch gelang es nicht immer, die vorher kurzdauernd eingefrorenen Implantate mit der gleich hohen Impfausbeute zu verimpfen. Wurde die Impfung der Tiere mit einer von *Borrel* angegebenen Implantationskanüle durchgeführt, in die nur kleine Tumorstückchen nach dem Auftauen mit Hilfe eines Stempels aufgezogen werden können, dann erfuhr die Zahl der Geschwulstgänge ebenfalls eine geringe Einbuße.

\* Die Durchsicht der histologischen Präparate wurde von unserem Mitarbeiter, Herrn Prof. *R. Hanser*, durchgeführt, der die zahlreichen Präparate ohne Kenntnis der Versuchsanordnung eingehend überprüfte. Auch die Präparate der Versuche mit den noch folgenden Geschwulststämmen wurden auf diese Weise diagnostiziert.

*Die bis zu  $\frac{1}{2}$  Stunde ausgedehnte Einfrierung* zeigte grundsätzlich ein gleiches Ergebnis wie der oben mitgeteilte Versuch.

Es wurden (am 8. IX. 1933 und 25. IX. 1933) 2 Versuchsserien zu je 20 Normalmäusen eingesetzt. Die Disposition dieser beiden Versuchsserien war die gleiche. Je 5 Tiere erhielten Sa.-Implantate nach 3, 10 und 30 Minuten langer Einfrierung. Die Auftauung erfolgte bei Zimmertemperatur. Die restlichen 5 Tiere wurden zur Kontrolle mit Frischmaterial beimpft.

In der ersten Versuchsreihe zeigten mit vorher 3 Minuten lang eingefrorenem Material 4 Tiere von 5 nach einem Zeitraum von etwa 14 Tagen sicheren Anschlag. Die Geschwülste wuchsen weiter und führten den Tod der Tiere herbei. Die 10 Minuten lang eingefrorenen Implantate ergaben an 3 Tieren nach etwa 20 Tagen klinisch nachweisbare Tumorbildung. Ein Tier war erfolglos beimpft. Das 5. Tier zeigte etwa 2 Monate (!) nach der Transplantation am Orte der Implantatapplikation beginnendes Geschwulstwachstum. Auch hier verendeten alle Tumorträger mit unterschiedlich großen Sarkomen. Die Gruppe der Tiere, welche die 30 Minuten lang gefrorenen Implantate erhalten hatte, zeigte ebenfalls etwa 20 Tage nach der Implantation 5mal beginnendes Tumorwachstum. Alle Mäuse bekamen große Sarkome. Im Verlauf von weiteren 21 Tagen waren alle Tiere verendet. An den 5 Kontrolltieren setzte etwa 11 Tage nach der Beimpfung klinisch starkes Tumorwachstum ein. Auch diese Tiere gingen mit großen Sarkomen ein. Es zeigte sich demnach durch die Gefrierung eine eindeutige Verzögerung des klinisch nachweisbaren Beginns eines expansiven Geschwulstwachstums. Eine klare Abhängigkeit der Stärke dieser Verzögerung von der Dauer der Einfrierung ist nicht deutlich. Durchaus gleichsinnige Resultate ergab der 2. Versuch dieser Art. Von insgesamt 15 mit vorher gefrorenem Sarkommaterial beimpften Mäusen zeigten 12 ausgedehnte Geschwulstbildung. (In jeder der 3 Gruppen war 1 Tier erfolglos beimpft.) Auch hier war bei Vergleich mit den Kontrolltieren eine völlig eindeutige für alle Gruppen etwa gleich starke Verzögerung des klinischen Zeitpunktes des Geschwulstanges nachweisbar. Die Tumoren der Versuchstiere blieben gegenüber den Kontrollen, die etwa walnußgroße Sarkome hatten, etwas kleiner.

*Der Einfluß protrahierter Einfrierung auf die Verimpfbarkeit von Mäuse-Sa.-Suspension.*

*Jensen* wies darauf hin, daß das Zerreiben von Geschwulstgewebe eine erhebliche Minderung der Impfausbeute bewirken kann. Wir wußten jedoch, daß der benutzte Mäuse-Sa.-Stamm bei subcutaner Verimpfung an Mäusen auch in Suspensionsform eine genügend hohe Zahl Tumorangänge hervorruft. Des Vorteils einer abfüllbaren und gut

dosierbaren Tumorsuspension bedienten wir uns, um den Einfluß protrahierter Einfrierung auf suspendierte Sa.-Zellen zu untersuchen.

Es wurden für 2 Versuchsreihen (Versuche vom 8. XI. 1934) 55 Mäuse, und zwar 39 Versuchs- und 16 Kontrolltiere benutzt. 2 Tiere konnten nicht ausgewertet werden. Auf die 1. Versuchsserie entfielen 18 Versuchs- und 8 Kontrolltiere. Für die zweite Reihe lauteten die entsprechenden Zahlen 19 und 8 Tiere. Für die Herstellung der Suspension zur Injektion in die Mäuse der ersten Serie wurden 2 subcutane Mäusesarkome steril entnommen, mit der Schere grob zerkleinert, die gleiche Menge steriler gewaschener Quarzsand dazu gefügt und das Tumorsandgemenge unter Zugabe von 3 Teilen Tyrodelösung im Mörser unter Kühlung verrieben, bis eine sehr gleichmäßige Suspension entstand. Von dem Quarzsandsediment wurde die Tumorsuspension abdekantiert und zu je 2 ccm in Ampullen, die zugeschmolzen wurden, abgefüllt. Die verzögerte Einfrierung der Suspension wurde wie folgt, durchgeführt: Die beschickten Ampullen kamen für  $\frac{1}{2}$  Stunde in einen Kühlraum von  $-6^{\circ}$ , danach für die gleiche Zeit in einen zweiten von  $-20^{\circ}$ . 10 Minuten wurden sie in einem Dewargefäß bei  $-100^{\circ}$  gehalten und dann für weitere 10 Minuten direkt in flüssigen Stickstoff getaucht. Nach der Einfrierung wurde der Ampulleninhalt bei Zimmertemperatur aufgetaut und in Dosen von je 0,6 ccm an die Versuchstiere subcutan verimpft. In Parallele wurden einige Ampullen mit Suspension für 10 Minuten direkt in flüssigen Stickstoff eingebracht. Als Kontrolle dienten Mäuse, die mit Implantaten, welche 3 Minuten lang direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren gewesen waren, beimpft wurden. Die Methodik für die zweite Versuchsserie war die gleiche, nur wurde der Aufschluß der beiden Ausgangstumoren ohne Zusatz von Quarzsand durchgeführt.

Nach Beendigung der Versuche ergab sich das folgende Bild. In der 1. Versuchsreihe zeigten 13 von 18 mit vorher eingefrorenem Material beimpfte Versuchstiere sicheren Geschwulstangang. An 9 mit schnell eingefrorenem Tumor beimpften Tieren erhielten wir 6 große Tumoren, 3 Tiere blieben geschwulstfrei; das langsam gefrorene Material erzeugte an 9 Tieren 7mal teilweise mächtige Sarkome, 2 Tiere wurden erfolglos beimpft. Ein deutlicher Unterschied in bezug auf den klinischen Beginn des Geschwulstwachstums wurde durch das unterschiedliche Tempo der Einfrierung nicht bewirkt. Dies scheint in gewisser Beziehung um so auffälliger, als das langsam eingefrorene Gewebe länger als das schnell eingefrorene, einer zunehmenden Kälteeinwirkung ausgesetzt war. Lediglich bei Vergleich mit den, mit vorher gefrorenen Implantaten beimpften 8 Kontrolltieren, die 7mal große Sarkome zeigten, ergab sich ein Unterschied. Denn an diesen Tieren begann das Geschwulstwachstum klinisch etwas früher und die Tumor-

entwicklung führte zu relativ gleich großen Sarkomen. Die zweite Versuchsreihe, in der die Tumorsuspension ohne Quarzsandbeimengung gewonnen worden war, zeigte ein gleichsinniges Ergebnis. An 19 mit nachträglich gefrorener Suspension beimpften Versuchstieren entwickelten sich 18 Sarkome und die 8 mit Implantaten geimpften Kontrollmäuse zeigten 8mal Geschwulstangang. In dieser Versuchsreihe bestand der Eindruck, als ob die Tumoren der mit langsam eingefrorener Suspension beimpften Mäuse im Mittel einige Tage später aufkamen, als an den anderen Versuchstieren, doch war das Verhalten der einzelnen Tiere uneinheitlicher. Gegenüber den Kontrollen ergab sich keine deutliche Zeitdifferenz. Somit führte die subcutane Verimpfung der unterschiedlich schnell eingefrorenen Suspensionen des Mäuse-Sa. an 37 Versuchsmäusen 31mal zum Angang sicherer Sarkome, während die insgesamt 16 mit vorher gefrorenen Implantaten beimpften Kontrollen 15mal Sa.-Angang zeigten. Die Verimpfung von Suspensionen hatte demnach nur eine unwesentliche Verminderung der Impfausbeute zur Folge und der Zusatz des Quarzsandes war praktisch ohne Einfluß auf das Ergebnis. Ein deutlicher Einfluß der protrahierten Einfrierung zeigte sich auch an dieser Versuchsreihe nicht. Das liegt nach unseren Erfahrungen an den relativ hohen Dosen, die an die Versuchstiere verimpft worden waren.

*Die Pulverisierung von Mäuse-Sa. unter flüssigem Stickstoff und der Einfluß protrahierten Auftauens auf die Verimpfbarkeit.*

Die Darstellung dieser Versuche schließen wir unmittelbar an, da ihre Technik mit der eben geschilderten Methodik gewisse Ähnlichkeit hat.

Für die *Pulverisierung* des Sa.-Gewebes unter flüssigem Stickstoff wurde grob zerschmipstes Tumorgewebe in einen vorher eisgekühlten Mörser gebracht, durch Aufgießen von flüssigem Stickstoff völlig durchgefroren, mit einem Pistill zerstoßen und unter ständiger Zugabe von flüssigem N<sub>2</sub> zu einem äußerst feinen Pulver zerrieben. Einen Teil dieses Pulvers ließen wir bei Zimmertemperatur auftauen und setzten 3 Gewichtsteile eisgekühlte Ringerlösung zu. Ein anderer Teil des gleichen Materials wurde nicht sofort aufgetaut, sondern verblieb je 30 Minuten bei  $-50^{\circ}$ ,  $-20^{\circ}$ ,  $-6^{\circ}$  und etwa  $+2^{\circ}$ . Das Material war noch völlig gefroren. Es wurde auf Zimmertemperatur gebracht und nach völligem Auftauen ebenfalls mit 3 Gewichtsteilen Ringerlösung versetzt zur Injektion verwendet. Die Suspensionen wurden in Dosen von 0,6 ccm pro Tier subcutan injiziert. Als Kontrolle dienten subcutan verimpfte Implantate nach vorheriger 3 Minuten langer Einfrierung in flüssigem N<sub>2</sub>. Insgesamt wurden 40 Versuchsmäuse und 16 Kontrolltiere benutzt. Die Versuche wurden am 9. XI. 1934 begonnen.

Die abgeschlossenen Versuche ergaben folgendes: Von 40 Versuchsmäusen, die mit Suspension aus vorher unter flüssigem Stickstoff pulverisiertem Sarkomgewebe beimpft worden waren, konnten 39 ausgewertet werden. An diesen wurde 34mal Sarkombildung beobachtet, 31 Tiere hatten teilweise mächtige Tumoren, 3mal war die Diagnose

nur aus den histologischen Befunden zu stellen. Insgesamt 5 Versuchstiere waren erfolglos beimpft. Aber das Resultat zeigt, daß die *Pulverisierung des gefrorenen Sarkoms* keinen nennenswerten Einfluß auf die Verimpfbarkeit hatte. An den 16 Kontrolltieren wurde 16mal sicherer Sarkomgang beobachtet. Die protrahierte Auftauung des Tumorpulvers bewirkte bei Vergleich mit dem Ergebnis am schnell getauten Material an einer Anzahl von Tieren eine gewisse Verzögerung des klinisch erkennbaren Geschwulstanges.

#### **Der Einfluß von Hautbrandschorfen auf das Angehen vorher eingefrorenen Sarkomgewebes.**

Unabhängig von der Prüfung des Angehens von mit flüssigem Stickstoff vorbehandeltem Mäusesarkom an *Normalmäusen* wurde untersucht, ob die Verimpfung solcher Sarkommaterialien *unter* Hautbrandschorfe einen Einfluß auf die Impfausbeute oder die Zeit bis zum Anschlag bewirkt. In den unter verschorften Hautstellen liegenden Partien der Subcutis kommt es bekanntlich ebenfalls zu reaktiven Prozessen. Es gelingt nun nach den beschriebenen Transplantationsverfahren bei einiger Übung, das Geschwulstgewebe relativ sicher an dem gewünschten Ort, d. h. unter dem Hautbrandschorf abzulegen. Die Wiedergabe dieser Versuche erfolgt hier, weil eine Anzahl späterer Versuche sowohl an Normalmäusen, wie an Tieren mit experimentellen Schorfen durchgeführt wurden.

Um gleich große Verbrennungen zu erzielen, wurde stets ein Glüh-eisen mit einer flachen runden Kuppe von etwa 1 cm Durchmesser benutzt, das in der Flamme glühend gemacht wurde. Die Verbrennung erfolgte durch kurzes Auflegen der glühenden Kuppe auf die rasierte Haut. Die Stärke der Einwirkung wurde variiert durch unterschiedlich starke Erhitzung des Eisens.

#### *Verimpfung langdauernd eingefrorener Sarkom-Implantate unter frische Brandschorfe.*

In einer Versuchsreihe von 20 Tieren (vom 26. IX. 1933) wurden je 5 Implantate verimpft, die *3 Minuten, 30 Minuten bzw. 3 Stunden* in flüssigem Stickstoff eingefroren waren. Das Resultat war 13mal sichere Sarkombildung an 15 Versuchsmäusen; 12 davon hatten große Sarkome. Bei Vergleich des Zeitpunktes des klinischen Geschwulstanges mit den 5 erfolgreich mit frischem Tumor beimpften Kontrolltieren zeigte sich eine eindeutige Verzögerung an allen Versuchstieren. Aber diese Verzögerung hat mit den Brandschorfen, wie früher gezeigt werden konnte, nichts zu tun.

In anderen Versuchsreihen wurde die Stärke der Brandschorfe variiert oder bis zu 30 Minuten eingefrorene Implantate erst 1—8 Tage

nach der Verbrennung der Haut implantiert. Diese Versuche, die in der Zeit vom 30. VIII. 1933 bis 20. IX. 1933 durchgeführt wurden, umfaßten insgesamt 115 Versuchs- und 85 Kontrollmäuse. Ein Teil der Tiere verendete bald nach Versuchsbeginn. Zur Auswertung gelangten 98 Versuchs- und 80 Kontrollmäuse. Die Tiere zeigten in den Versuchsgruppen 90mal, in den Kontrollgruppen 71mal Sarkombildung. Grundsätzlich neue Befunde wurden nicht festgestellt. Es zeigte weder die Stärke noch das Alter der gesetzten Verbrennungen in unseren Versuchen einen klaren Einfluß auf die Impfsausbeute oder den Zeitpunkt des klinischen Geschwulstangeses.

#### **Einfluß verschiedenartiger Nachbehandlung auf die Verimpfbarkeit des Mäusesarkoms.**

Die Versuche gliedern sich in Experimente, in denen gefrorenes Sarkomgewebe nach wochenlanger Aufbewahrung bei  $-20^{\circ}$  verimpft wurde. Auch die erfolgreiche Verimpfbarkeit nach tagelangem Lagern der getauten Fragmente bei Eisschranktemperatur bzw. nach Autolyse bei Körpertemperatur ( $38^{\circ}$ ) wurde untersucht. Die Ergebnisse mit den 2 Tage lang eingefrorenen Fragmenten werden in Parallele mitgeteilt werden.

#### *Die Aufbewahrung von in flüssigem Stickstoff eingefrorenem Sarkomgewebe bei $-20^{\circ}$ .*

Nach 3 Minuten langem Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurde das Sarkomgewebe in Ampullen eingebracht, diese verschlossen und im Kühlschrank von  $-20^{\circ}$  unterschiedlich lange aufbewahrt. Die Ampullen wurden nach 1, 2, 3, teilweise 4 und 6 Wochen geöffnet und der Inhalt subcutan an Mäuse mit frischen Brandschorfen verimpft. Versuchsbeginn 10. XI. 1933 bis 29. XII. 1933.

Die Versuche hatten folgendes Resultat: In der 1. Serie zeigten 5 von 5 Tieren Sarkombildung durch Gewebe nach 1wöchigem Aufenthalt in  $-20^{\circ}$ , nach 2wöchigem Verbleib im Eisschrank zeigten 4 von 5 Tieren Geschwulstengang, das 3 und 4 Wochen eingefrorene Material wurde erfolglos verimpft. Die zweite Versuchsserie ergab grundsätzlich ein gleiches Ergebnis, nach 2 Wochen Aufbewahrung in  $-20^{\circ}$  wurde jedoch nur 1 von 5 Tieren erfolgreich transplantiert. Das 3 und 4 Wochen eingefrorene Material ergab keinen Anschlag. Die 3. Versuchsreihe, in der das Ausgangsmaterial nach 1, 2, 3 bzw. 4 Wochen verimpft worden war, verlief negativ, desgleichen eine Serie mit Sarkomgewebe nach 2, 4 und 6wöchiger Aufbewahrung im Eisschrank. Die Versuche ergaben somit kein völlig einheitliches Resultat. Sie zeigten jedoch, daß die Verimpfbarkeit in den Versuchen, in denen sie anfangs erhalten war, bei weiterer Ausdehnung der Zeit der Aufbewahrung verloren ging.

*Die Lagerung aufgetauten Sarkomgewebes bei etwa +2°.*

Nach kurzdauernder (3 Minuten) Einfrierung von Tumorimplantaten wurde das Material bei Zimmertemperatur getaut und die Implantate bei etwa +2° im Eisschrank gehalten. Sofort und nach 13, 19, 24 und 43 Stunden wurden je 6 Mäuse mit den Implantaten beimpft. Als Kontrolle dienten Frischtumorstückchen, die aus den gleichen Sarkomen gewonnen und jeweils gleich lange Zeit im Eisschrank aufbewahrt worden waren. 30 Versuchs- und 30 Kontrollmäuse wurden subcutan beimpft (Beginn des Versuchs 11. IV. 1934).

Das Resultat dieser Serie war folgendes: Von 30 Versuchstieren ergaben 29 sicheren Geschwulstgang. Ein Einfluß der Lagerung der aufgetauten Fragmente auf die Impfausbeute war demnach nicht erkennbar. Die 29 Mäuse bekamen durchschnittlich mächtige Tumoren, an denen sie eingingen. Von den 30 Kontrolltieren verendete 1 unmittelbar nach Versuchsbeginn, die 29 Überlebenden bekamen 29mal unterschiedlich große Sarkome. Die Lebensdauer der Tiere der einzelnen Gruppen zusammengestellt, ergab die Tab. 1.

Tabelle 1.

Versuchstiere beimpft mit getautem Tumormaterial nach Lagerung bei etwa +2°	Anzahl der Tumorträger bei Ende des Versuchs	Mittlere Lebensdauer in Tagen	Zeitraum seit Versuchsbeginn, innerhalb dessen die Tumorträger eingingen in Tagen
sofort	5	22	18—27
13 Stunden	6	29	20—37
19 „	6	28	21—33
24 „	6	45	29—77
43 „	6	36	28—47
Frischtumor nach Lagerung bei etwa +2°			
sofort	6	18	16—20
13 Stunden	6	20	18—28
19 „	6	17	10—21
24 „	6	21	9—31
43 „	5	20	17—28

Diese Tabelle ist charakteristisch für den Ausfall einer großen Zahl von Versuchen mit vorher eingefrorenem Gewebe. Die Angabe einer mittleren Lebensdauer, die auf Grund einer so geringen Anzahl von Tieren errechnet wurde, darf nur mit Vorbehalt erfolgen. Die Zeiträume, in denen die Tiere verendeten, zeigten starke Unterschiede. Nur bei dem langdauernd gelagerten Material war die Zeit bis zu dem klinischen Anschlag teilweise eindeutig verlängert. Das kurzdauernd eingefrorene Sarkomgewebe konnte somit nach dem Auftauen noch nach annähernd 2tägiger Lagerung im Eisschrank bei etwa +2° mit unverminderter Impfausbeute verimpft werden.

*Die Autolyse aufgetauten Sarkomgewebes bei 38°.*

Es interessierte besonders, den Einfluß der Körpertemperatur (38°) auf die erfolgreiche Verimpfbarkeit des getauten Mäusesarkoms zu untersuchen, das seine Übertragbarkeit, wie die eben angeführten Versuche zeigen, bei Eisschranktemperatur längere Zeit bewahrte.

Es wurden die Implantate ohne weiteren Zusatz zum Auftauen bei Zimmertemperatur ausgelegt und der Autolyse teils im Wasserbad, teils im Brutschrank unterworfen. Nach verschiedenen Zeiten wurde jeweils eine entsprechende Anzahl von Mäusen subcutan beimpft. Insgesamt wurden 7 Versuche (9. XI. 1933 bis 27. III. 1934) mit 126 Mäusen angesetzt.

Das Resultat der Experimente war kurz folgendes: In einem Versuch, in dem 45 Minuten autolysiert worden war, zeigte sich keine Minderung der Impfausbeute. Das gleiche Ergebnis brachte die Ausdehnung der Autolysedauer auf 4 Stunden. An zwei anderen Versuchsreihen ergab das 4 und 6 Stunden bzw. 2 und 6 Stunden autolysierte Gewebe keinen Tumorangang mehr. Bei Wiederholung ergab das 2 Stunden autolysierte Gewebe Angang, während die 4 und 6 Stunden lange Erwärmung nur eine Minderung der Impfausbeute bewirkte. Ein klareres Bild zeigte ein Versuch, in dem eine Anzahl getauter Implantate 17 Stunden autolysiert wurde, während ein anderer Teil ebenfalls vorher eingefrorener Stückchen die gleiche Zeit nach dem Tauen im Eisschrank verblieb. Frischimplantate bildeten das entsprechende Material zur Kontrollimpfung. Es zeigte sich, daß die getauten Implantate nach 17stündiger Autolyse keinen Angang mehr bewirkten. Doch erfuhr auch das 17 Stunden im Eisschrank gehaltene, getaute Material in diesem Versuch eine Minderung der Impfausbeute. Es gelang demnach nicht, einen für alle Versuche geltenden Zeitpunkt für diejenige *kürzeste* Autolysedauer festzustellen, die regelmäßig eine Aufhebung der erfolgreichen Verimpfbarkeit der getauten Sarkomimplantate bewirkte.

*Bis zu 47 Stunden ausgedehnte Einfrierung der Implantate in flüssigem Stickstoff.*

Sie schließt sich sinngemäß als eine Erweiterung an die auf Seite 446 mitgeteilten Versuche an, und soll an dieser Stelle den Vergleich mit den beiden eben besprochenen Reihen von Experimenten erleichtern.

15 Mäuse wurden auf 3 Versuchsgruppen verteilt. Die I. Gruppe wurde mit einem Material beimpft, das 23 Stunden in flüssigem Stickstoff verblieben war. 47 Stunden eingefrorene Implantate erhielt die II. Gruppe, während Frischtumor nach 47stündiger Aufbewahrung im Eisschrank an die Kontrolltiere verimpft wurde. Alle Tiere trugen frische schwache Brandschorfe.

Das Resultat dieses Versuchs war in Gruppe I 5mal, in Gruppe II ebenfalls 5mal und in der Kontrollgruppe 4mal Sarkombildung. Die Tatsache der Einfrierung machte sich an dem um einige Tage verzögert auftretenden klinischen Anschlag bemerkbar. Eine Abhängigkeit der Größe der auftretenden Tumoren von der Vorbehandlung wurde nicht beobachtet. Die langdauernde Einfrierung stellte in diesem Versuch demnach *innerhalb des geprüften Zeitraums* ein günstiges Verfahren für die Erhaltung erfolgreicher Verimpfbarkeit des Mäuse-Sarkoms dar.

*Vergleich der Einfrierung in flüssigem Stickstoff und flüssigem Sauerstoff.*

Es lag nahe, nach den teilweise sehr günstigen Resultaten, die in bezug auf die Erhaltung der erfolgreichen Verimpfbarkeit, trotz der intensiven Kälteeinwirkung des flüssigen Stickstoffs, gewonnen worden waren, nun auch den Einfluß des flüssigen Sauerstoffs zu untersuchen.

Wir erhielten flüssigen Sauerstoff aus der Lufttrennungsanlage des Werkes Oppau. Er wurde analog dem flüssigen Stickstoff angewendet. Wir prüften den Einfluß der Einfrierung von Geschwulstfragmenten und als besonders wirksame Methode des Kontaktes die Pulverisierung des Sarkomgewebes unter flüssigem Sauerstoff nach dem bereits an flüssigem Stickstoff geschilderten Verfahren. In Parallele wurde ein Teil des Ausgangsmaterials mit flüssigem Stickstoff behandelt. Das Auftauen geschah jeweils in der Atmosphäre der zur Einfrierung benutzten Gase. Die beimpften Tiere waren Normalmäuse. Die Untersuchungen wurden an insgesamt 49 Versuchs- und 17 Kontrolltieren durchgeführt (Versuche vom 5. II. 1934 bis 22. VI. 1934). Die Verimpfungen erfolgten stets subcutan.

Nach Beendigung der Versuche konnten folgende Befunde erhoben werden: Die kurzdauernde Einfrierung (3 Minuten) ergab an 4 Mäusen, die mit in flüssigem Sauerstoff eingefrorenen Implantaten beimpft worden waren, 4mal Angang großer Sarkome. 5 entsprechende „Stickstoffimplantate“ gingen 5mal an. Nach 3stündiger Einfrierung brachten die getauten Fragmente nach Sauerstoffeinwirkung an 5 Mäusen 5mal unterschiedlich große Sarkome hervor, 3 entsprechende Implantate nach Stickstoffeinfrierung führten an den Mäusen 3mal zur Entwicklung großer Geschwülste. Von 8 mit Frischtumor beimpften Kontrollmäusen gingen 7 mit großen Sarkomen ein. Ein Unterschied in der Anzahl der Angänge war somit nicht nachweisbar, woraus geschlossen wird, daß die verschiedenen flüssigen Gase innerhalb des geprüften Zeitraums keine klinisch nachweisbare unterschiedlich schädigende Wirkung ausübten. Es wurde bereits hervorgehoben, daß in der völligen Pulverisierung des Sarkomgewebes ein Verfahren gesehen wurde, das den denkbar innigsten Kontakt des Gases mit dem Geschwulstmaterial herbeiführt. Dies gilt besonders für den Zeitraum, in dem das sehr fein

zerriebene Pulver auftaut. Unterschiede zwischen der Wirkung von flüssigem Sauerstoff bzw. Stickstoff konnten möglicherweise dabei nachgewiesen werden, zumal wir von dem gleichen Ausgangsmaterial ausgingen. Die erste an 15 Versuchs- und 5 Kontrolltieren durchgeführte Versuchsserie ergab an den 7 mit unter flüssigem Sauerstoff pulverisiertem Sarkom beimpften Mäusen 7mal Geschwulstangang; die 7 mit dem entsprechenden mit flüssigem Stickstoff vorbehandelten Material beimpften Mäuse zeigten 6mal Sarkombildung, 1 Tier verendete frühzeitig. Das Frischtumormaterial auf 5 Mäusen ergab 5mal Tumorangang. Die Versuchsgruppen zeigten keinen Unterschied in bezug auf den Zeitpunkt des Beginns der klinisch erkennbaren Geschwulstentwicklung. Ein grundsätzlich gleichsinniges Resultat zeigte eine zweite Serie von 10 Versuchs- und 4 Kontrolltieren. 1 Versuchstier verendete vorzeitig, die 4 restlichen Tiere mit Sarkom nach Sauerstoffgefrierung beimpft, zeigten 4mal Sarkombildung; die 5 mit stickstoffvorbehandeltem Material beimpften Mäuse ergaben 5mal Sarkombildung. Auch hier ließ sich ein Unterschied in der Wirkung der verschiedenen Gase demnach klinisch nicht feststellen. Dieses Resultat scheint für das untersuchte Mäusesarkom, gerade bei Vergleich mit den später wiederzugebenden Versuchen an Mäuse-Adenocarcinom, eine gewisse Eigentümlichkeit darzustellen.

*Einfluß der mehrmaligen Einfrierung in flüssigem Stickstoff auf die erfolgreiche Verimpfbarkeit.*

Es hatte sich gezeigt, daß die *einmalige* Einfrierung des Sarkomgewebes in flüssigem Stickstoff bei Vergleich mit dem Frischtumorgewebe im allgemeinen keine Minderung der Anzahl der Geschwulstgänge bewirkte, und daß die Dauer dieser einmaligen Einfrierung innerhalb der geprüften Zeiträume keine wesentliche Veränderung dieses Resultates ergab. Es soll zuerst über den Einfluß kurzdauernder *mehrmaliger* Einfrierung berichtet werden.

Der Versuch war in der Weise angesetzt worden, daß 3 Gruppen zu je 5 Mäusen mit Sarkomimplantaten beimpft wurden, die 1mal, 2mal bzw. 3mal für 3 Minuten in flüssigem Stickstoff eingefroren waren. Nach jeder Einfrierung wurde bei Zimmertemperatur aufgetaut. 5 Kontrollen wurden mit frischem Tumormaterial beimpft.

Der Versuch zeigte an den 5 mit einmal gefrorenem Material beimpften Tieren 4mal Sarkombildung, 1 Tier war erfolglos beimpft. In der II. Gruppe verendete 1 Tier vor dem klinisch gesicherten Anschlag, 4 Tiere bekamen Sarkome. Das gleiche Ergebnis hatte die III. Gruppe von Tieren, an den Kontrollen zeigten sich 5 Sarkome. Ein Einfluß auf die Impfausbeute ließ sich nicht erkennen, trotzdem äußerte sich die unterschiedliche Vorbehandlung der Implantate in charakte-

ristischer Weise. In der Tab. 2 wurde das Ergebnis der Messungen *in dem wesentlichen Zeitintervall* des Versuches wiedergegeben. Die angegebenen Zahlen bedeuten Länge  $\times$  Breite der Tumoren in Zentimetern ausgedrückt.

Es trat also, wie die Tabelle zeigt, eine erhebliche Verzögerung des klinisch nachweisbaren Geschwulstanges durch die mehrmalige Einfrierung auf, die eine direkte Abhängigkeit von der Zahl der Einfrierungen aufwies. In einer weiteren Versuchsreihe blieben die Sarkomimplantate 24 Stunden in flüssigem Stickstoff und wurden nach dem Auftauen für die gleiche Zeit noch einmal eingefroren. Die Impfung war in beiden Versuchsgruppen an je 5 Mäusen 5mal erfolgreich, doch der Geschwulstangang erfolgte auch hier an den mit 2mal eingefrorenen Implantaten beimpten Tieren zu einem späteren Zeitpunkt. Die mehrmalige Einfrierung in einer Kühlkammer von  $-20^{\circ}$  ergab ebenfalls keine Verminderung der Impfausbeute. Die Abhängigkeit des Zeitpunktes des Anganges der Tumoren von dem 1-, 2- bzw. 3mal durchgeführten Einfrieren und Auftauen war nur undeutlich ausgeprägt.

Der Zweck der vorliegenden Mitteilung scheint uns durch die wiedergegebenen Versuche erreicht. Es sollte an einem breiteren Material nachgewiesen werden, daß die erfolgreiche Verimpfung von *in flüssigem Stickstoff* eingefrorenen Mäusesarkomgewebe grundsätzlich gelingt. Eine allgemeine Bemerkung zu dem Ausfall der Versuche ist nötig. Es fällt auf, daß nur in wenigen Fällen durch die Einfrierung eine Minderung der Impfausbeute erzielt wurde und daß demnach die Schäden, die durch die Anwendung des flüssigen Stickstoffs auftraten, anscheinend nur gering waren. Diese letztere Annahme stellt insoweit einen Trugschluß dar, als in den späteren Versuchen an einer Anzahl anderer Geschwulststämme gezeigt werden wird, daß die anscheinend hohe Kältewiderstandsfähigkeit ein Kennzeichen gewisser Sarkome darstellt, während die geprüften Carcinomstämme eine geringere Kälteresistenz zeigten. Die Gründe für dieses unterschiedliche Verhalten müssen bei Anwendung der gleichen Gefriermethode in dem Ausgangsmaterial gesucht werden. Es läßt sich nun der bemerkenswerte Einfluß der Virulenz der untersuchten Geschwulststämme auf das Ergebnis der Verimpfung von mit flüssigem Stickstoff vorbehandelten Tumorgewebe, wie später deutlich gezeigt werden wird, nicht übersehen. Die Kälteresistenz der verschiedenen Geschwulstformen scheint jedenfalls umso größer zu sein, je kleinere Mengen Tumorgewebe ausreichen, um bei der Verimpfung auf ein anderes Tier eine Geschwulst zu erzeugen und je schneller die entstandenen Tumoren weiterwachsen. Das gilt für frisches Ausgangsmaterial und läßt sich sinngemäß auf das kaltevorbehandelte Tumorgewebe übertragen. Auf die hohe Virulenz des untersuchten Mäuse-Sarkom-Stammes wurde bereits eingangs hingewiesen.

Tabelle 2.

Vorbehandlung der Sarkom- implantate	Versuchs- bezeichnung	Medtage (Versuchsbeginn am 27. IX. 1933)							Mit Tumor verendet am
		3. X.	6. X.	10. X.	13. X.	17. X.	20. X.	24. X.	
1 mal einge- frozen, 1 mal aufgetaut	V <sub>8</sub> M441	—	1,9 × 0,9	1,8 × 0,9	1,8 × 1,5	2,2 × 1,6	2,6 × 2,4	2,8 × 2,7	28. X. 1933
	442	erbsgrößer	1,2 × 1,1	1,7 × 1,4	2,6 × 1,7	†	1,2 × 1,2	1,5 × 1,6	17. X. 1933
	443	linsengr.	erbsgr.	erbsgr.	bohngengr.	1,0 × 0,8	2,8 × 2,0	†	6. XI. 1933
	444	—	erbsgr.	2,0 × 1,2	2,5 × 1,5	2,7 × 1,7	erbsgr.	—	23. X. 1933
	445	erbsgr.	erbsgr.	bohngengr.	g. bohngengr.	erbsgr.	erbsgr.	—	(8. VI. 1934 o. B.)
1 mal einge- frozen, dann aufgetaut, wied. eingefr. u. aufgetaut	446	—	linsengr.	g. erbsgr.	1,2 × 0,9	1,5 × 1,0	2,2 × 1,7	2,4 × 1,9	4. XI. 1933
	447	—	linsengr.	g. erbsgr.	erbsgr.	erbsgr.	bohngengr.	1,1 × 1,0	15. XI. 1933
	448	—	linsengr.	g. erbsgr.	1,4 × 1,1	1,7 × 1,0	2,8 × 1,9	3,2 × 2,4	29. X. 1933
	449	—	linsengr.	†	†	—	—	—	9. X. 1933
	450	—	linsengr.	1,3 × 1,2	2,4 × 1,6	2,5 × 2,0	3,1 × 2,4	3,0 × 2,6	27. X. 1933
3 mal einge- frozen und 3 mal auf- getaut	451	—	linsengr.	g. linsengr.	erbsgr.	1,0 × 1,0	1,5 × 1,4	2,1 × 1,9	26. X. 1933
	452	—	linsengr.	linsengr.	g. linsengr.	bohngengr.	1,5 × 1,3	1,8 × 1,4	26. X. 1933
	453	—	—	—	—	erbsgr.	bohngengr.	1,6 × 1,4	31. X. 1933
	454	—	—	—	—	erbsgr.	g. bohngengr.	1,6 × 1,3	31. X. 1933
	455	—	—	—	—	—	—	—	(4. II. 1934 o. B.)
Frischtumor	456	bohngengr.	2,0 × 1,4	2,8 × 2,0	3,0 × 2,1	†	3,0 × 2,1	†	17. X. 1933
	457	bohngengr.	2,2 × 1,3	2,2 × 1,5	2,7 × 2,0	2,9 × 2,7	3,3 × 2,4	†	22. X. 1933
	458	bohngengr.	1,1 × 1,1	1,6 × 1,5	2,8 × 1,8	2,9 × 1,9	†	†	23. X. 1933
	459	bohngengr.	g. bohngengr.	2,4 × 1,5	3,0 × 1,8	3,2 × 1,9	†	†	20. X. 1933
460	bohngengr.	2,0 × 1,2	2,6 × 1,5	3,3 × 1,8	3,4 × 1,9	—	—	18. X. 1933	

*Es trat nun in fast allen mitgeteilten Versuchen, gleichgültig ob innerhalb eines bestimmten Zeitraumes für kurze oder längere Zeit eingefroren wurde, eine im allgemeinen eindeutige Verzögerung des Beginns der klinisch nachweisbaren Geschwulstbildung bei Verimpfung des aufgetauten Gewebes auf. Das weist darauf hin, daß die (erste) intensive Schädigung des Materials durch die Einfrierung, d. h. durch den Prozeß der Abkühlung an sich gesetzt wird, während in weiteren Grenzen die zeitliche Dauer des Verweilens in flüssigem Stickstoff lediglich als zusätzlich schädigendes Moment zur Geltung kommt. Für den Übergang von dem eingefrorenen in den getauten Zustand gilt insoweit das gleiche, als der Tau-prozeß, wie später nachgewiesen werden wird, ebenfalls und ähnlich wie die Einfrierung als (zweiter) besonders schädigender Faktor auftritt. Es war daher durch mehrmaliges Einfrieren, auch wenn die Gesamtzeit des Verweilens in flüssigem Stickstoff kürzer ist, als die einer einmaligen Einfrierung, eine stärkere Schädigung des Geschwulstgewebes zu erwarten.*

Diese Deutung des Gefrierprozesses hat die Annahme zur Voraussetzung, daß das Einfrieren und Auftauen eine direkte Schädigung von Geschwulstzellen darstellt und daß bereits im frischen Ausgangsmaterial zellige Elemente vorhanden waren, die nach der Kälteeinwirkung unter den durch die Verimpfung auf ein neues Tier geschaffenen Bedingungen zum Ausgangspunkt für das neuerliche Geschwulstwachstum wurden. Hieraus folgt aber auch, daß für die Gefrierversuche der Qualität des Ausgangsmaterials und der Reaktion des geimpften Tieres eine ungleich entscheidendere Rolle für die erfolgreiche Verimpfung zukommen wird, wie in Transplantationsversuchen mit frischen ungeschädigten Geschwulstgeweben, in denen im allgemeinen die Einbringung genügender Zellmengen den Erfolg der Transplantation bei den meisten Geschwulststämmen sichert.

#### *Zusammenfassung.*

Es wird über Versuche zur Kältewiderstandsfähigkeit transplantabler Säugergeschwülste berichtet. Als Gefriermittel wurde flüssiger Stickstoff (etwa  $-196^{\circ}$ ) verwendet. Es wird mitgeteilt, daß die erfolgreiche Verimpfung vorher eingefrorenen Geschwulstmaterials von Ehrlich-Sarkom, Ehrlich-Carcinom, Collierschem Ascites Tumor, Passesyschem Melanom, Chondrosarkom, Ehrlich-Putnoky-Tumor und spontanem Mammatumor an der Maus gelang. Jensen-Sarkom und Flexner-Carcinom sowie der Ehrlich-Putnoky-Tumor der Maus ließen sich nach der Einfrierung auf Ratten erfolgreich verimpfen. Auch das Brown-Pearcesche Carcinom des Kaninchens war nach vorheriger Einfrierung erfolgreich zu verimpfen. Auf die teilweise charakteristischen Unterschiede in der Kältewiderstandsfähigkeit der genannten Geschwulststämme wird in weiteren Mitteilungen eingegangen werden.

Das *Ehrlichsche* Mäusesarkom ließ sich bis zu 47 Stunden einfrieren, ohne grundsätzlich einen Verlust der erfolgreichen Verimpfbarkeit zu erleiden.

Bei Verimpfung vorher eingefrorenen Materials ergab sich bei Vergleich mit dem Frischtumor im allgemeinen regelmäßig eine Verlängerung des Zeitraumes bis zum klinisch nachweisbaren Geschwulstangang.

Verzögertes Einfrieren oder verzögertes Auftauen verlängerte diesen Zeitraum weiterhin.

Die mehrmalige (2- bzw. 3malige) Einfrierung hob die erfolgreiche Verimpfbarkeit nicht auf. Sie führte jedoch zu einer weiteren Verzögerung des Geschwulstanges.

Die Pulverisierung des Mäusesarkoms unter flüssigem Stickstoff oder flüssigem Sauerstoff hob die spätere erfolgreiche Verimpfbarkeit nicht auf.

Kurzdauernd eingefrorenes Sarkomgewebe ließ sich nach 2 Wochen langem Aufenthalt bei  $-20^{\circ}$ , in getautem Zustand nach 43stündiger Lagerung im Eisschrank und nach einige Stunden dauernder Autolyse erfolgreich weiterverimpfen.

Hautbrandschorfe zeigten keinen merklichen Einfluß auf die Impfausbeute oder die Geschwindigkeit des Geschwulstanges.

Der Prozeß der Einfrierung als geschwulstzellschädigender Eingriff wurde kurz besprochen.

---

#### Literaturverzeichnis.

<sup>1</sup> Gaylord, J. inf. Dis. **5**, 443 (1908). — <sup>2</sup> Salvin-Moore u. Barrat, Lancet **1**, 227 (1908). — <sup>3</sup> Koose u. Lemmel, Bruns' Beitr. **141**, 489 (1927). — <sup>4</sup> Cramer, W., Imp. Cancer Res. F. **9**, 21 (1930). — <sup>5</sup> Auler, Z. Krebsforsch. **35**, 103 (1932). — <sup>6</sup> Rössle, R., Sitzgsber. preuß. Akad. Wiss., Physik.-math. Kl. III **1936**. — <sup>7</sup> Borst, Dtsch. med. Wschr. **1937**, 1249. — <sup>8</sup> Vollmar, zit. nach Borst, loc. cit. — <sup>9</sup> Klinke, Arch. klin. Chir. **188** (1937).

---