

*Sonderdruck aus*

ABHANDLUNGEN DER DEUTSCHEN AKADEMIE  
DER WISSENSCHAFTEN ZU BERLIN

Klasse für Medizin, Jahrgang 1960 Nr. 3

**Berliner Symposion über Fragen der Carcinogenese**  
vom 11. bis 16. Dezember 1959

AKADEMIE-VERLAG · BERLIN

1960

Aus dem Institut für Pathologische Anatomie und Pathohistologie  
der Medizinischen Universität Szeged

Gerbsäure, ein neuer carcinogener Stoff  
(Beiträge zum Wirkungsmechanismus derselben)

von

B. KORPÁSSY

Wegen ihrer adstringenten Wirkung wurde die Gerbsäure früher als Heilmittel weit und breit verwendet. Die lokale Behandlung von Brandwunden wurde 1925 von DAVIDSON empfohlen, und das Verfahren wurde in Ungarn während des zweiten Weltkrieges allgemein angewendet.

Unsere Forschungen, die schließlich mit der Entdeckung der hepatotoxischen, cirrhogenen und hepatocarcinogenen Eigenschaften dieses Stoffes endeten, wurden während des zweiten Weltkrieges mit Beobachtungen am Sektionstisch begonnen. Während dieser Zeit hatte ich Gelegenheit, die Pathologie der Verbrennungen an einem verhältnismäßig großen Leichenmaterial zu studieren. In einigen Fällen fanden wir bei der histologischen Untersuchung der aus Verbrennungsfällen entnommenen Gewebe schwere zentrale Nekrose in der Leber, blutige focale Nekrose in den Nebennieren; in anderen Fällen waren diese Veränderungen wenig ausgeprägt, oder sie waren nicht zu finden. Die Fälle, bei denen Leber- und Nebennierennekrosen vorhanden waren, waren ausnahmslos mit Gerbsäure lokal behandelt worden, die anderen nur mit Vaseline oder anderen Salben. Auf Grund dieser Beobachtungen vermutete ich die hepatotoxische Wirkung der Gerbsäure schon im Jahre 1943. Damals wurde das Mittel sonst überall als unschädlich angesehen.

Mein Verdacht wurde durch Tierversuche vollkommen bestätigt. Zunächst verabreichte ich die Verbindung i. v., und die Tiere, Hunde und Kaninchen, verendeten in einigen Minuten. Wurde die Gerbsäurelösung Ratten s. c. in Dosen injiziert, die die Tiere innerhalb einiger Stunden nicht töteten, kam es bei ihnen zu Lebernekrose. Leider konnten diese Ergebnisse wegen des Krieges erst im Jahre 1949 mitgeteilt werden. Weiterhin mußten wir auch die Versuche wiederholen, da die Präparate und Aufzeichnungen aus demselben Grund verloren gingen. Ich habe dann nachgewiesen, daß die Gerbsäure ein selektives Lebergift darstellt, dessen Wirkung sich in Abhängigkeit von der Dosierung und der Art der Verabreichung in einer verschieden schweren acinozentralen Nekrose äußert [5].

Die parenterale Verabreichung der Gerbsäure hatte auch einen beträchtlichen *systematischen Stress* zur Folge [18, 20]. Später fanden wir während der chronischen Gerbsäurebehandlung in den Kernen des vorderen Hypothalamus die cytologischen Zeichen einer gesteigerten neurosekretorischen Aktivität [19]. Männliche Ratten waren gegenüber Gerbsäure hinsichtlich der tödlichen Wirkung empfindlicher als die Weibchen. Eiweißreiche (30% Casein enthaltende) Kost gewährte einen gewissen Schutz gegen die letale und hepato-

toxische Wirkung der Gerbsäure [11]. Akute Vergiftungen waren sehr oft mit Magenerosionen verbunden [10]. Nach der protrahierten Behandlung lag bei etwa 70% der Tiere ein Geschwür in Pylorusnähe oder an anderer Stelle im Magen vor [22].

Der nächste Schritt war, den Nachweis zu erbringen, daß die Gerbsäure *Cirrhose* hervorruft. Der Stoff wurde weißen Ratten s. c. mit mehrtägigen Intervallen gegeben. Steigende Dosen von 10 bis 70 mg (in wäßriger Lösung) wurden verabreicht. Diese Behandlung führte zu einem Umbau der Leberstruktur. In der ersten Periode — bis zum 40. Tag — erfolgte der Untergang der Parenchymzellen mit darauffolgender Regeneration, oft mit dem acinozentralen Collaps des argyrophilen fibrösen Netzes. Eine andere Frühererscheinung war die Schwellung und Vermehrung der das Reticulo-Histiozytensystem bildenden Zellen. Im dritten Behandlungsmonat war die diffuse Proliferation des Bindegewebes schon auffällig. Pseudobuli erschienen, und die Proliferation der kleinen Gallenwege wurde beobachtet. Die Leber war bei den Ratten, die den 100. Tag überlebten, geschrumpft, die Oberfläche grobhöckerig. Die Leber zeigte also nach der Gerbsäurebehandlung ein ähnliches Bild wie bei der postnekrotischen oder posthepatitischen Cirrhose [9].

Wir prüften auch die Frage, ob die per os eingeführte Gerbsäure *aus dem Verdauungskanal resorbiert wird*. Hunde und Ratten erhielten durch eine Magensonde wäßrige Gerbsäurelösungen verschiedener Konzentration, ferner Tee und Rotwein. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde Blut entnommen und mit einer auf der Reduktion der Arsenowolframsäure fußenden photometrischen Mikromethode untersucht. Nach der parenteralen Einfuhr der Gerbsäure nahm ihre Konzentration im Blut rasch zu, der Höhepunkt trat nach 3 Stunden ein, danach fiel die Konzentration allmählich ab und nach 24 Stunden war das Blut gerbsäurefrei [7]. Die histologische Untersuchung zeigte, daß die hepatotoxische Wirkung der Gerbsäure nach der peroralen Einfuhr ebenso eintrat wie nach der parenteralen [8]. Die chronische, über 6 Monate anhaltende Behandlung hatte eine leichte Cirrhose zur Folge, wenn die innere Dosis die übliche parenterale vielfach überstieg [4].

Die subcutane Behandlung hat den Nachteil, daß das Mittel auch eine lokale Reizwirkung entfaltet, wodurch es oft zur Nekrose und Exulceration der Haut kommt. Aus diesem Grund waren viele Tiere vor Abschluß der Versuche eingegangen. Dennoch überlebten 30 bis 50% der Tiere die Behandlung um 200 Tage, 5 bis 10% sogar um 300 Tage, wenn sie fünftägig 150 bis 200 mg/kg s. c. erhielten. Bei 56% der Ratten, die diese Behandlung mindestens um 100 Tage überlebten, waren Lebergeschwülste zu finden: Hepatom, Cholangiom, oder beide. Die in dieser Weise induzierten Geschwülste sind immer multipel und zumeist gutartig, obwohl in einigen Fällen der Übertritt von Geschwulstzellen in die Lebervenen und die ausgesprochene celluläre Atypie auf einen mäßigen Grad der Malignität hinweisen [6, 12, 13]. Ich möchte noch eine vielleicht nicht unwichtige Tatsache erwähnen: Während in der Frühperiode des Versuchs Leberzellmitosen in einer großen Anzahl zu finden sind, kommen diese im zweiten bis dritten Monat nicht mehr vor, man findet aber Leberriesenzellen, die oft eine enorme Größe erreichen und manchmal zwei Kerne besitzen. In dieser Periode fällt auch die Proliferation der sogenannten Ovalzellen auf.

Später haben wir festgestellt, daß die hepatocarcinogene Aktivität der Gerbsäure auch von diätetischen Faktoren abhängt. Eiweißreiche, fettarme Kost (25% Casein, 5% Öl) übte auf diese Aktivität einen hemmenden Einfluß aus, hingegen wurde die Carcinogenese durch eine 3% Protein und 20% Sonnenblumenöl enthaltende Kost gefördert. Die gerbsäurebedingte Cirrhose konnte aber durch den Casein- und Fettgehalt der Nahrung nicht beeinflußt werden. Obwohl die mit einer caseinreichen, fettarmen Kost ernährten Ratten etwas länger lebten als die mit wenig Casein und viel Fett ernährten, kamen Lebergeschwülste in der letzten Gruppe zweimal so oft vor, wie in der vorigen: in 67% bzw. 29%. Die caseinarme, fettreiche Diät hatte keine carcinogene oder Cirrhose herbeiführende Wir-

kung [14, 15]. Vitamin B<sub>12</sub> übte auf die carcinogene Wirksamkeit der Gerbsäure keinen Einfluß aus.

Obwohl die subcutanen Gerbsäureinjektionen oft zur Hautnekrose und Geschwürbildung Anlaß gaben, heilten diese Geschwüre schnell und restlos, wenn die Behandlung vorübergehend abgesetzt oder die Injektion an einer anderen Stelle gegeben wurde. Weder vom Rand solcher Geschwüre, noch von der Narbe der geheilten Geschwüre ging ein Tumor aus. Eine lokale carcinogene Wirkung wurde auch dann nicht beobachtet, wenn ein durch Thermokauter hervorgerufenes Geschwür 1 Jahr lang mit Gerbsäure regelmäßig gepinselt wurde [12, 13]. Eine lokale carcinogene Wirkung des Stoffes konnte auch an weißen Mäusen nicht nachgewiesen werden, wenn ihre Haut mit Gerbsäure eine längere Zeit hindurch behandelt wurde. Lebertumoren kamen bei diesen Mäusen nicht zustande.

Wird gleichzeitig mit der parenteralen Gerbsäurebehandlung 2-Acetylamino-fluoren [AAF] mit der Nahrung verabreicht, dann wird der carcinogene Effekt des AAF von der Gerbsäure gefördert. Am 180. Tag der Versuche fanden wir Lebergeschwülste bei 92% der mit beiden Stoffen, aber nur bei 28% der nur mit AAF behandelten Ratten. Überdies waren in der mit beiden Stoffen behandelten Gruppe auch Metastasen zu finden. Bei den nur mit Gerbsäure behandelten Ratten betrug die Tumorfrequenz ungefähr 50%. In der mit beiden Stoffen behandelten Gruppe kam eine fortgeschrittene Lebercirrhose oft vor, im Gegensatz zu den schwachen Leberveränderungen der nur mit AAF behandelten Tiere. Diese Versuche sprechen dafür, daß eine Lebercirrhose bei der Entwicklung des Leberkrebses einen wesentlichen, fördernden Faktor darstellt [16, 21].

In der Leber der mit Gerbsäure per os oder parenteral durch eine längere Zeit behandelten Ratten war die myeloide Metaplasie in kleinen Herden eine häufige Erscheinung. Das Knochenmark ist in solchen Fällen sehr zellreich. Bei einigen Tieren trat eine *leukämische Myelose* auf, die Milz war beträchtlich vergrößert, ihre normale Struktur verloren gegangen. Ferner war eine myeloide Infiltration der Leber und anderer Organe festzustellen. Die hochgradige Anaplasie und die enorme Mitosenzahl sprachen für eine Paramyeloblastenleukämie. Die massenhafte Ablagerung von gelblichbraunem, zum Teil eisenhaltigem Pigment, besonders in der Leber, der Milz und den Lymphknoten, wird als *ein Zeichen der Eisenstoffwechselstörung* angesprochen [17].

Ich möchte hervorheben, daß bei dem von uns gezüchteten Rattenstamm, den wir seit 10 Jahren verwenden, Spontantumoren sehr selten auftreten, und zwar nur mesenchymale Lebergeschwülste oder Spontanleukämien haben wir nie beobachtet.

Es soll nun einiges zur *Chemie der Gerbsäure* gesagt werden. Zunächst sei bemerkt, daß alle Versuche mit gewöhnlichem Tannin (*gallotannic acid*) ausgeführt wurden. Der Stoff wird aus Gallapfel, einem Auswuchs junger Eichenzweige, hergestellt. Diese Tanninart ist nur eine von vielen, die in der Natur vorkommen. Sie lassen sich in zwei Hauptgruppen teilen: hydrolysierbare und kondensierte Tannine (Pyrokatechine). Die ersten haben eine Esterbindung, sie zerfallen leicht unter der Einwirkung schwacher anorganischer Säuren in Zucker, Gallussäure oder Ellagsäure. Die Pyrokatechine liefern dagegen bei Abbau unlösliche, kaum definierbare Verbindungen, die Phlobaphene genannt werden. Das gewöhnliche Tannin gehört in die erste Gruppe, Önotannin aber, das im Rotwein zu finden ist, in die zweite. Die biologische Wirkung einiger kondensierter Tannine wurde zuerst von ARMSTRONG, CLARKE und COTCHIN im Jahre 1956 studiert. Sie haben festgestellt, daß die kondensierten Tannine erheblich weniger toxisch sind als die hydrolysierbaren. Die Mitteilung erbrachte aber keinen Beweis dafür, daß diese Verbindungen in der Leber zur centrolobulären Nekrose Anlaß geben.

Es war mir eine Freude zu erfahren, daß unsere Ergebnisse von KIRBY im Chester Beatty Krebsforschungsinstitut in London ausnahmslos bestätigt wurden. Weiterhin konnte KIRBY beobachten, daß die kondensierten Tannine bei Mäusen an der Injektionsstelle Sarkome her-

vorrufen, während die hydrolysierbaren nur zu Lebertumoren Anlaß gaben. Bei den Ratten, die er mit Gerbsäure s. c. behandelte, fand er Milzvergrößerung und Veränderungen, die wir als präleukämische beschrieben hatten.

Die mit der gerbsäurebedingten Carcinogenese einhergehenden *Stoffwechselveränderungen* sind nicht bekannt. THUNBERG hat 1936 nachgewiesen, daß Gerbsäure in gewissen Extrakten unreifer Samen und tierischer Gewebe die Hydrogenaseaktivität hemmt.

Vom *Wirkungsmechanismus* der hepatotoxischen Stoffe ist wenig sicheres bekannt. Um dieses Problem zu untersuchen, injizierten wir jungen erwachsenen männlichen und weiblichen Ratten s. c. eine einzige toxische, aber nichttödliche Dosis (250 mg per kg) und verfolgten die Leberveränderungen in kurzen Abständen. Die Tiere wurden durch Ausblutung  $\frac{1}{2}$ , 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 Stunden und 1 Woche nach der Behandlung getötet. Die Leber wurde mittels histomorphologischer, histochemischer und biochemischer Methoden untersucht.

Die ersten histologischen Veränderungen erschienen nach 12 Stunden, sie wurden immer schwerer, bis zur 48. Stunde Verquellung und hydropische Degeneration der Leberzellen und centrolobuläre Nekrosen gefunden wurden. Hierauf folgte die Regeneration, in einer Woche verschwanden die Nekroseherde, der Aufbau der Leber war wieder normal.

Die *histochemischen Veränderungen* traten früher auf, als die grobmikroskopischen. 30 bis 60 Min. nach der Injektion war die Aktivität der Succinodehydrogenase und der Lipase vermindert, desgleichen der Glykogen- und Eiweißgehalt. Interessanterweise war der Fettgehalt der Leber während der ganzen Beobachtung nie vermehrt. In dieser Hinsicht ist also die durch Tannin hervorgerufene Vergiftung von der Wirkung des Chloroforms oder des Tetrachlorkohlenstoff wesentlich verschieden.

24 bis 48 Stunden nach der Gerbsäurebehandlung war der Gehalt der Leber an freien Aminosäuren vermehrt. Überdies traten außer den normalerweise gefundenen Aminosäuren auch Norvalin, Methionin, Leucin, Tyrosin und gelegentlich auch Asparagin auf. Die histochemischen und chemischen Veränderungen gehen aber schnell zurück, und 1 Woche nach der Behandlung ist die chemische Zusammensetzung der Leber anscheinend vollkommen normal.

Hingegen konnte durch Papierelektrophorese eine wesentliche Änderung in der *Zusammensetzung der Serumeiweißkörper* festgestellt werden. Nach 24 bis 48 Stunden war die Menge der Albumine erheblich verringert, die der  $\alpha_2$ -Globuline auf das Vierfache, die der  $\alpha_1$ -Globuline auf das Doppelte erhöht. Die Menge der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globuline war kaum verändert. Nach einer Woche war die Albuminkonzentration ungefähr normal, die der  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Globuline war zu dieser Zeit noch stark erhöht.

Schließlich soll einiges von der *Histogenese* der durch Gerbsäure angeregten Lebertumoren gesagt werden. Anscheinend hängen diese Tumoren mit der intensiven Regeneration und der Gallenwegsproliferation zusammen, die als Folgen des Parenchymunterganges betrachtet werden können. Die histologisch verfolgbaren Vorgänge lassen mehrere Stadien unterscheiden. In den ersten Wochen fällt die hochgradige mitotische Aktivität der Leberzellen und hiermit in Verbindung die Proliferation der reticuloendothelialen Elemente auf. Später verschwinden die Mitosen, an ihrer Stelle erscheinen die Leberriesenzellen. Anscheinend ist also die mitotische Aktivität in der ersten Phase gesteigert, in der zweiten gehemmt. In der dritten Phase herrschen Gallenwegsproliferation, Cholangiofibrose und diffuse Fibrose vor. Diese Cholangiofibrose ist schon als eine Präblastomatose anzusehen.

Man könnte sagen, daß in der Gruppe der aus Hunderten von Verbindungen bestehenden Carcinogene das Hinzukommen der Gerbsäure kein aufsehenerregendes Ereignis darstellt. Ich glaube aber, daß in dieser Beziehung zwei Tatsachen eine besondere Beachtung verdienen:

1. Die Tannine sind komplexe Verbindungen, und auch die gereinigten Präparate enthalten mehrere, zum Teil unbekannt organische Stoffe;
2. gewisse Getränke — Tee, Kaffee, Kakao, Rotwein — enthalten verschiedene Tanninmengen.

## Summary

Our research work which resulted in the discovery that tannic acid is a hepatotoxic, cirrhotogenic and hepatocarcinogenic agent, started from postmortem observations of human material. We could later show that the hepatocarcinogenic activity of tannic acid is influenced by dietetic factors. The simultaneous administration of tannic acid and 2-acetylaminofluorene showed that tannic acid greatly enhanced the hepatocarcinogenic action of AAF.

The tannins may be divided in 2 classes: hydrolysable and condensed tannines. All our experiments were carried out with gallotannic acid which is a member of the first group.

In order to study the mechanism of action of gallotannic acid we examined the liver by histomorphological, histochemical and biochemical methods at short intervals after a single subcutaneous injection of a non lethal, toxic dose to young adult rats. Histochemical changes in the liver were found much earlier than histomorphological lesions. 30 to 60 minutes after the injection decreases in the succinic dehydrogenase and lipase activities, in the glycogen and protein contents are well demonstrable. At no stage of tannic acid intoxication could an increase in the fat content of the liver be demonstrated. There is a remarkable change in the composition of the serum proteins as determined by paper electrophoresis.

In the sequence of histologically recognizable events one can clearly distinguish several stages. During the first weeks the most obvious phenomenon is the great mitotic activity among the hepatic cells. Later the mitotic cells disappear and give place to giant liver cells. In the 3rd phase proliferation of bile ducts, cholangio-fibrosis and diffuse fibrosis dominates the picture. Massive deposition of a partly iron containing pigment, especially in the spleen, may be considered a sign of disturbed iron-metabolism.

## Literatur

- [1] ARMSTRONG, D. M. G., CLARKE, E. G. C., and COTCHIN, E.: A note on the acute toxicity of hydrolysable and condensed tannins. *J. Pharm. and Pharmacol.* **9**, 98—101 (1957).
- [2] DAVIDSON, E. C.: Tannic acid in the treatment of burns. *Surg. Gynec. & Obst.* **41**, 202 (1925).
- [3] KIRBY, K. S., quoted by HADDOW, A.: Chemical carcinogens and their modes of action. *Brit. Med. Bull.* **14**, 84 (1958).
- [4] KOLTAY, N., and KORPÁSSY, B.: Esperimenti per provocare cirrosi epatica in ratti mediante soluzione di acido tannico somministrato per via orale durante un periodo prolungato. *Arch. „de Vecchi“.* **17**, 307—28 (1951).
- [5] KORPÁSSY, B.: Leberschädigung durch Gerbsäure. *Schweiz. Ztschr. Path. u. Bakt.* **12**, 13—23 (1949).
- [6] KORPÁSSY, B.: Hepatomes et cholangiomes provoqués chez le rat par administration sous-cutanée d'acide tannique. *Bull. du Cancer* **37**, 52—56 (1959).
- [7] KORPÁSSY, B., HORVAT, R., and KOLTAY, N.: On the absorption of tannic acid from the gastro-intestinal tract. *Arch. Internat. Pharmacodyn.* **88**, 368—77 (1951).
- [8] KORPÁSSY, B., KOLTAY, N., and HORVAY, R.: Toxizität peroral verabreichter Gerbsäure. *Wien. klin. Wschr.* **62**, 270—71 (1950).
- [9] KORPÁSSY, B., and KOVÁCS, K.: Experimental liver cirrhosis in rats produced by prolonged subcutaneous administration of tannic acid. *Brit. J. Exper. Path.* **30**, 266—72 (1949).
- [10] KORPÁSSY, B., and KOVÁCS, K.: Haemorrhagic gastric erosions and duodenum pigmentation in rats following parenteral administration of solutions of tannic acid. *Acta physiol. Hung.* **1**, 125—30 (1950).
- [11] KORPÁSSY, B., KOVÁCS, K., and SZTANOJEVITS, A.: Influence of sex and dietary casein content upon lethal and liver injurious effect of tannic acid. *Acta Physiol. Hung.* **3**, 233—41 (1952).
- [12] KORPÁSSY, B., and MOSONYI, M.: The carcinogenic activity of tannic acid. Liver tumours induced in rats by prolonged subcutaneous administration of tannic acid solutions. *Brit. J. Cancer.* **4**, 411—20 (1950).
- [13] KORPÁSSY, B., and MOSONYI, M.: The carcinogenic action of tannic acid. Effect of casein on the development of liver tumours. *Acta Morph. Hung.* **1**, 37—54 (1951).
- [14] KORPÁSSY, B., and MOSONYI, M.: Influence of dietetic factors on carcinogenic activity of tannic acid. *Lancet.* **1**, 1416 (1951).

- [15] KÖRPÁSSY, B., and MOSONYI, M.: Influence of dietary protein on the carcinogenic activity of tannic acid. *Acta Morph. Hung.* **3**, 353—62 (1953).
- [16] KÖRPÁSSY, B., MOSONYI, M., SZTANOJEVITS, A., and TRAUB, A.: Chronic local irritation and acetylamino-fluorene carcinogenesis. *Ceskoslovenska Oncologia.* **2**, 308—16 (1955).
- [17] KÖRPÁSSY, B., SZTANOJEVITS, A., and KOLTAY, N.: A preliminary study on haemoblastoses produced in rats by tannic acid. *Acta Morph. Hung.* **4**, 91—102 (1954).
- [18] KÖRPÁSSY, B., TÖRÖK, J., und KOVÁCS, K.: Endokrine Veränderungen bei experimenteller akuter Gerbsäurevergiftung mit besonderer Rücksicht auf die Nebennierenrinde. *Acta Physiol. Hung.* **1**, 113—24 (1950).
- [19] KOVÁCS, K., BACHRACH, D., JAKOBOVITS, A., HORVÁTH, É., SZTANOJEVITS, A., and KÖRPÁSSY, B.: Histomorphological changes following a specific damage in the anterior hypothalamic nuclei of rats. *Acta Morph. Hung.* **4**, 409—416 (1954).
- [20] KOVÁCS, K., and KÖRPÁSSY, B.: Effect of dietary protein content on the hypophysial adrenocortical system and the lymphatic organs of normal rats and of rats in alarm reaction. *Acta Physiol. Hung.* **3**, 243—53 (1952).
- [21] MOSONYI, M., and KÖRPÁSSY, B.: Rapid production of malignant hepatomas by simultaneous administration of tannic acid and 2-acetylamino-fluorene. *Nature.* **171**, 791 (1953).
- [22] SZTANOJEVITS, A., MÓNUS, B. Z., and KÖRPÁSSY, B.: Experimentally induced gastric ulcer in rats. Problems of the pathogenesis. *Acta med. Hung.* **5**, 251—65 (1954).
- [23] THUNBERG, T.: Tannin und Dehydrogenasen. Ein Beitrag zur Frage der biologischen Wirkungen der Gerbstoffe. *Skand. Arch. Physiol.* **73**, 199—210 (1936).