

Une méthode simple d'hypothermie expérimentale

Le principe de la méthode exposée est de faire perdre de la chaleur à l'animal par contact sous-cutané avec un volume d'eau froide s'écoulant à vitesse variée et séparé des tissus environnants par une couche mince de latex.

L'animal anesthésié (nous avons utilisé des chats) est placé sur la table d'opération et un trocart est introduit dans le tissus sous-cutané abdominal. Après avoir retiré le mandrin, on connecte le tube à une pompe de bicyclette ou tout autre appareil de compression. On insuffle ainsi de l'air comprimé dans les tissus, de manière à provoquer le décollement de la peau et la formation d'une poche assez volumineuse (500 ml environ). Le réfrigérateur consiste en un condom ordinaire, aux deux bouts opposés duquel sont fixés deux tubes métalliques de quelques centimètres de longueur. Le réfrigérateur est introduit dans la poche à air par la ponction du trocart et par une seconde ponction, on fait ressortir un des tubes du côté opposé. De cette façon le condom tout entier se trouve dans la poche sous-cutanée.

Il ne reste plus qu'à munir les deux embouts de tubes en caoutchouc, l'un d'eux étant relié au robinet à eau.

Une fois le système réfrigérateur rempli d'eau, la vitesse d'écoulement et le volume du condom sont réglés en manipulant le robinet et une pince de Hoffmann montée sur le tube de sortie.

Pendant la plus grande partie de l'année, l'eau de Sofia a une température de 6 à 8°, amplement suffisante pour amener une baisse de la température rectale de 8 à 9° en l'espace d'une heure environ. On peut, naturellement, obtenir une réfrigération complémentaire de l'eau moyenant un recipient de glace introduit dans le circuit.

La simplicité de la méthode permet son application dans n'importe quel laboratoire. En variant le debit d'eau, la vitesse de la réfrigération peut être réglée à volonté. En outre, à la fin de l'expérience, il suffit pour réchauffer l'animal de faire passer de l'eau à 38° par le même circuit.

Summary. Experimental hypothermia is induced by circulating cold tap water through a latex reservoir introduced subcutaneously in the abdominal region.

I. MEZAN

Institut Neuro-psychiatrique, Sofia (Bulgarie), le 7 juillet 1961.

Quantitative Bestimmung der Zellwachstums-hemmung

Bekanntlich gelingt es nach der Methode von PUCK und MARCUS¹, die dann von uns vereinfacht wurde (EDLINGER²), aus einzelnen Säugetierzellen makroskopische Kolonien zu erhalten. Damit kann – ähnlich wie bei Bakterien – nun auch bei menschlichen Zellen die Hemmung der Koloniebildung durch ein Agens (zum Beispiel Schlangengift, EDLINGER und DIETEL³; Röntgenstrahlen, DIETEL-MAUERSBERGER und EDLINGER⁴) als Indikator der cytotatischen Wirkung des Agens verwendet werden.

Wir untersuchten, ob mit Hilfe dieser Methode eine quantitative *in-vitro*-Prüfung von chemischen Verbindungen auf ihre zellwachstumshemmende Fähigkeit möglich wäre.

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir den Zellstamm Detroit 6 (der aus einer Knochenmarkmetastase eines menschlichen Lungencarcinoms von BERMAN und STULBERG⁵ isoliert wurde), aus dem wir durch mehrfache Passagen in Koloniekulturen eine Zellpopulation selektierten, die sich dadurch auszeichnete, dass ständig ein hoher Prozentsatz von isoliert ausgesäten Zellen Kolonien bilden konnte (Koloniebildungsvermögen). Das von uns verwendete Medium bestand aus einem leicht modifizierten Eagle-Medium (EAGLE⁶) mit 20% Kälberserum.

Zur Prüfung verwendeten wir fünf Substanzen, die uns in dankenswerter Weise von der CIBA Aktiengesellschaft, Basel, Pharmazeutische Abteilung, überlassen worden sind: Actidion (Antibioticum), 9820 (Aethoxydinaphylmethan), 6005 (Phenanthryl-imidazolin), 7134 (Diphenylimidazolino-methylamin), 3124/51 (Tolyl-imidazolino-methylamin) (KRADOLFER und SCHÄR⁷). Es wurden in Nährmedium 1prozentige Stammlösungen hergestellt und durch weitere Verdünnung im Medium die Versuchskonzentrationen erreicht.

Die aus 4–5 Tage alten dichten Zellkulturen durch Trypsinieren und einmaliges Waschen in PBS erhaltene Zellsuspension wurde durch mehrmaliges Auszählen in der Fuchs-Rosenthal'schen Zählkammer auf ihre Zellzahl bestimmt und dann bei stetigem Durchpipettieren in Nährmedium so verdünnt, dass 10 ml Medium einige Hundert Zellen enthielten.

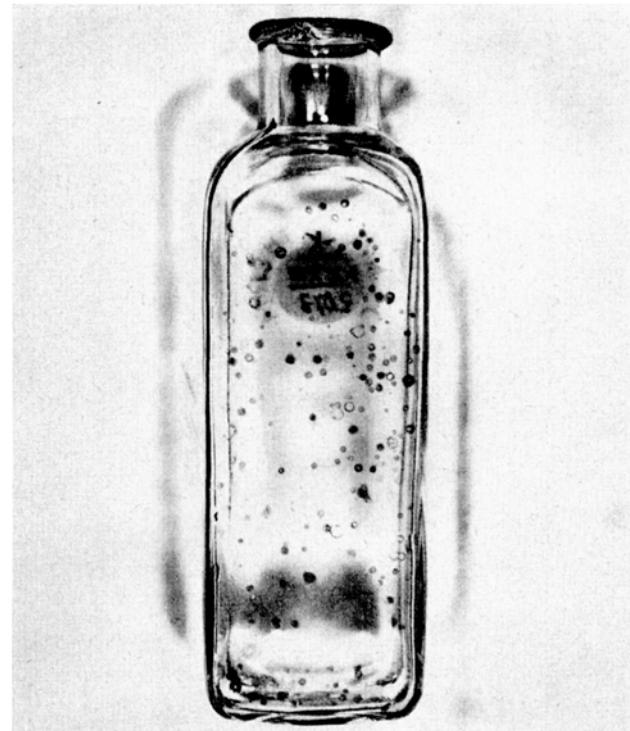


Fig. 1. Demeterflasche mit 400 Detroitzellen beimpft nach 12 Tagen Kultur bei 37°C. Das Medium wurde entfernt und die Zellkolonien mit Methylenblau angefärbt.

¹ T. T. PUCK und P. J. MARCUS, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 41, 432 (1955).

² E. EDLINGER, Naturwissenschaften 45, 425 (1958).

³ E. EDLINGER und B. DIETEL, Naturwissenschaften 46, 516 (1959).

⁴ B. DIETEL-MAUERSBERGER und E. EDLINGER, Naturwissenschaften 48, 105 (1961).

⁵ L. BERMAN und S. C. STULBERG, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 92, 730 (1956).

⁶ H. EAGLE, Science 130, 432 (1959).

⁷ F. KRADOLFER und B. SCHÄR, Arch. ges. Virusforsch. 7, 297 (1957).

Mit Gummistopfen verschlossene Demeterflaschen erhielten je 10 ml Medium. Ein Teil der Kulturen blieb als Kontrolle unbehandelt, die anderen erhielten verschiedene Konzentrationen der zu prüfenden Substanz. Pro Versuch verwendeten wir jeweils 5 Kulturflaschen für die Kontrolle

und für jede geprüfte Konzentration. Nach 10–12 Tagen bei 37° wurden die makroskopisch sichtbaren Kolonien ausgezählt (Figur 1).

In den Kontrollflaschen konnte der grösste Teil der ausgesäten Zellen Kolonien bilden. Im Vergleich zu den mit Substanz behandelten Kulturen wurde die Koloniezahl der Kontrollen als 100% angegeben und dann der Prozentsatz der entstandenen Kolonien in den Versuchsflaschen bestimmt. Die erhaltenen Resultate wurden nach dem Probitverfahren behandelt und die mittlere wachstums-hemmende Dosis (MCD_{50}) bestimmt (Figur 2). Die Substanzen 6005 und 9820 sind besonders wirksam: MCD_{50} 20 bzw. 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Wir sind der Ansicht, dass sich die beschriebene Methode für ein «*in vitro* screening» cytostatischer Substanzen sehr gut eignen kann. Sie ist relativ einfach und benutzt als Masseinheit die Vermehrungsfähigkeit der Zelle selbst. Allerdings kann sie nicht zwischen cytostatischer und cytotoxischer Wirkung unterscheiden, da die Verhinderung der Koloniebildung sowohl durch Wachstumshemmung als auch durch den Zelltod entsteht⁸.

Summary. The influence of five cytostatic substances on the colony-forming capacity of cells of the strain Detroit 6 was examined, and the advantages of this method for the *in vitro* screening of cytostatic substances was pointed out.

E. EDLINGER

Institut für Virologie der Humboldt-Universität (Charité), Berlin (Deutschland), 12. Juni, 1961.

⁸ Fr. Chr. KORB danken wir für ihre wertvolle technische Mitarbeit.

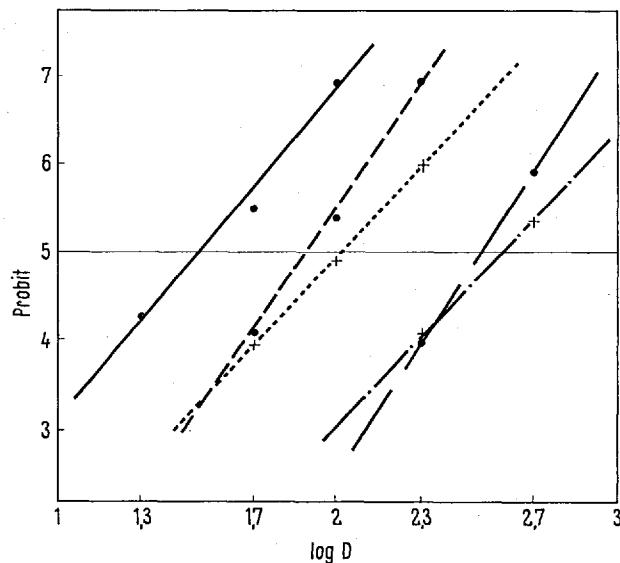


Fig. 2. In Abscisse log der Dosis in $\mu\text{g}/\text{ml}$, in der Ordinate der Prozentsatz des Koloniebildungsvermögens in Probitanordnung.
 5 = mittlere cytostatische Wirkung (MCD_{50}); — = 6005; --- = 3124/51; - - - = 9820; - · - = 7134; - - - - = Actidion.