

HH_{18+1,C} and HH_{20+1,C}. As there was no significant difference between the TSH content of adenohipophyses incubated with and without the fractions⁷, it seems unlikely that the differences in TSH content in the media were caused by a block of TSH break-down⁸.

Zusammenfassung. Die elektrophoretisch isolierte Fraktion des hypothalamischen Extraktes, die die adenohipophysären sauren Phosphatasen *in vitro* und die Sekretion des TSH aktiviert, wurde mittels Gel-Filtration an einer Sephadex G-25 Säule weiter gereinigt. Elektrochromatographische Analyse der gereinigten Fraktion zeigte, dass sie in nativem Zustand Ninhydrin-negativ ist und dass nach der sauren Hydrolyse folgende Aminosäuren aus ihr entstehen: Lysin, Serin, Glycin, Alanin, Asparagin, Glutaminsäure, Valin, Isoleucin und Leucin. Dieselbe Fraktion erhöht die Sekretion des TSH aus Rattenhypophyse *in vitro*. Die Fraktion enthält also wahrscheinlich den hypothalamischen Peptid, der die Sekretion des TSH

aus der Hypophyse stimuliert (thyreotrophin releasing factor, TRF).

V. SCHREIBER, M. RYBÁK,
A. ECKERTOVÁ, V. JIRGL, J. KOČÍ,
Z. FRANC, and V. KMENTOVÁ

Laboratory for Endocrinology and Metabolism, 3rd Medical Clinic, Faculty of General Medicine, Charles University, Prague; Institute of Haematology and Blood Transfusion; Research Institute for Pharmacy and Biochemistry, Prague (Czechoslovakia), March 29, 1962.

⁷ V. SCHREIBER, A. ECKERTOVÁ, M. RYBÁK, V. JIRGL, Z. FRANC, J. KOČÍ, and V. KMENTOVÁ, *Physiol. Bohemoslov.*, in press.

⁸ *Acknowledgment.* The Sephadex G 25 used for the experiments was supplied by Pharmacia, Uppsala (Sweden). Detection of the chromatograms for phenolic acids and indol compounds was carried out by Dr. J. DUBOVSKÝ and Dr. J. PETRÁŠEK, 3rd Medical Clinic, Fac. Gen. Med., Charles University, Prague.

Interactions of a Chemical Carcinogen with Neuro-Endocrine Factors in Mouse Breast Cancer¹

Interactions in breast cancer development between pituitary implants²⁻⁵, the hypothalamus⁶, and a chemical carcinogen⁷⁻¹⁵ were explored in recipients of the inbred Dilute Brown subline 8 (D₈) stock, while male D₈ mice, 24–28 weeks of age, served as donors. Three groups, each composed of 30 female, 5–6 week old mice, received once one of the following treatments by trocar into the right axilla: (a) three pieces of brain surface—the control treatment; (b) three pituitaries and three pieces of brain surface; or (c) three pituitaries and three 'hypothalami'⁶.

Starting about 1–1½ months after these implantations, 20 mice of each treatment group were force-fed six times, at intervals of about one week, with 1 mg of 3-methylcholanthrene in 0.2 cm³ of olive oil per 20 g body weight. The remaining 10 animals of each group served as controls and received only 0.2 ml olive oil per 20 g of body weight, also by oral intubation.

Thereafter, twice a week, the animals were inspected and palpated, if indicated, for breast tumors. The mice were killed for complete autopsy when the tumors extended at least in one dimension over more than 1.0 cm. Tumors and other gross pathology were also examined histologically¹⁶.

The effect of 3-methylcholanthrene on cancer incidence in the pituitary isografted D₈ mouse is shown in Table I,

Tab. I. Breast cancer development in groups investigated

Tissue inserted	Tumor incidence	
	with MCh ^a	without MCh ^b
Brain surface only	2/20	0/10
Pituitary only	19/20	0/10
Pituitary and hypothalamus	9/20	0/10

^a 1 mg 3-methylcholanthrene/0.2 cm³ olive oil/20 g body weight; oral intubation, 1/week, for six weeks.

^b 0.2 cm³ olive oil/20 g body weight; oral intubation, 1/week, for six weeks.

summarizing results obtained within 227 days after implantation and 160 days after the last intubation. By this time, all animals in the group given pituitary plus brain surface as well as the carcinogen had developed breast cancer, except for one mouse that died noncancerous at the age of 251 days. A significantly smaller number of mice had developed breast cancer in the other carcinogen-fed groups whether they were implanted with both pituitary and hypothalamus or only with brain surface. During the same time period, no tumors were observed in the several implanted control groups fed only olive oil (Table I).

The first breast cancers of the 3-methylcholanthrene treated isografted mice appeared at about the same time in the pituitary-hypothalamus group and in the pituitary-brain surface group. Nonetheless, within the period of study, the addition of hypothalamic tissue to the pituitary

¹ This investigation was aided by U.S.P.H.S. grants (C-5748, C-4359), the American Cancer Society (Minnesota Division and E-155), and Elsa U. Pardee Foundation.

² L. LOEB and M. M. KIRTZ, *Amer. J. Cancer* **36**, 56 (1939).

³ R. SILBERBERG and M. SILBERBERG, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **70**, 510 (1949).

⁴ O. MÜHLBOCK and L. M. BOOT, *Cancer Res.* **19**, 402 (1959).

⁵ F. HALBERG, J. J. BITTNER, and H. L. COLE, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **102**, 650 (1959).

⁶ E. HAUS, F. HALBERG, D. D. SMITH, and K. S. MICHELS, *Univ. of Minn. Med. Bull.* **32**, 134 (1960).

⁷ J. MAISIN and M. L. CODLEN, *C. R. Soc. Biol.* **123**, 159 (1936).

⁸ J. V. PROHASKA, A. BRUNSCHWIG, and H. WILSON, *Arch. Surg.* **38**, 328 (1939).

⁹ J. W. ORR, *J. Path. Bact.* **55**, 483 (1943).

¹⁰ L. C. STRONG, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **59**, 217 (1945).

¹¹ H. B. ANDERVONT and T. B. DUNN, *J. Nat. Cancer Inst.* **14**, 2 (1953).

¹² C. HUGGINS, G. BRIZIARELLI, and H. SUTTON JR., *J. Exp. Med.* **109**, 25 (1959).

¹³ C. BIANCHIFIORI, G. M. BONSER, and F. CASCERA, *Brit. J. Cancer* **13**, 662 (1959).

¹⁴ T. L. DAO and H. SUNDERLAND, *J. Nat. Cancer Inst.* **23**, 567 (1959).

¹⁵ T. L. DAO, F. G. BOCK, and M. J. GREINER, *J. Nat. Cancer Inst.* **25**, 991 (1960).

¹⁶ Further details including tumor morphology and additional results from background experiments in keeping with the present data will be published elsewhere.

Table II. Breast cancer age in groups investigated

Group ^a	Number of mice with cancer	Cancer age (days)	
		Range	Mean $\pm$ S.E.
Control (a, m, or b)	33	440-731	611 $\pm$ 13
Pituitary (P, P + m, or P + b)	25	334-648	497 $\pm$ 24
1 $\times$ 2-3 P Pituitary and Methylcholanthrene	19	181-271	227 $\pm$ 5

^a a = no tissue inserted; m = muscle; b = brain surface; P = pituitary, one ectopic implantation of 2-3 glands; 1 mg of 3-methylcholanthrene/0.2 cm³ olive oil/20 g body weight; oral intubation, 1/week for six weeks.

implants significantly reduced cancer incidence ($X^2 = 9.64$; $P = 0.002$). It seems important that this effect of hypothalamic tissue was not reproduced by other brain tissue^{5,6}.

The mean tumor age of the methylcholanthrene treated mice given hypophyses and pieces of brain surface is compared in Table II with the tumor ages of pituitary and control animals from earlier experiments in this laboratory done under similar conditions on the same inbred stock. With the qualifying restriction that these data are from experiments set up at different times, it can be suggested that the additional administration of 3-methylcholanthrene to D₈ mice bearing 3 isografted pituitaries reduces

the cancer age of the latter to less than one-half the value expected in the absence of carcinogen treatment.

One can thus study in D₈ mice, i.e. in one and the same experimental animal model, interactions in breast cancer development between genetic and/or endocrine factors, the Bittner mammary tumor agent and a chemical carcinogen. One can also explore in the same model hypothalamus effects counteracting mammary carcinogenesis. Moreover, in work based upon overt breast cancer as the endpoint under study, the methylcholanthrene-treated D₈ mouse with ectopic pituitary isografts and the Bittner agent allows for a much shortened period of bioassay, since tumor age is but one-half of that recorded in the absence of the chemical carcinogen.

Zusammenfassung. Die Brustkrebsentwicklung bei intakten Mäusen des DBA₈-Inzuchtstammes, welchen Hypophysen implantiert wurden, zeigt durch die perorale Verabreichung von 3-Methylcholanthren eine signifikante Beschleunigung. Entsprechend früheren Ergebnissen an einem anderen Krebsmodell⁵ hemmt auch in der Methylcholanthren-behandelten DBA-Maus der Zusatz von Hypothalamusgewebe die carcinogene Wirkung der implantierten Hypophyse.

E. HAUS and F. HALBERG

Department of Pathology, University of Minnesota, Medical School, Minneapolis (Minnesota U.S.A.), March 19, 1962.

PRO EXPERIMENTIS

Nouveau principe de stimulation électrique:
L'excitation ambipolaire par courant alternatif,
sinusoïdal pur, de fréquence moyenne

L'impulsion stimulatrice d'une durée totale inférieure à une milliseconde est produite par un courant alternatif sinusoïdal de 20000 périodes, dont l'amplitude est modulée, à partir de zéro, selon une enveloppe progressivement croissante et décroissante (Figure 1). Cette impulsion est appliquée à un nerf myélinisé (sciatique de grenouille, pneumogastrique de lapin) par deux électrodes de même efficacité stimulatrice et distantes de 15 à 20 mm, à la cadence d'environ 1/sec. Le courant d'action est dérivé à une distance de conduction d'environ 20 mm, de l'extrémité du nerf, entre deux électrodes écartées de 10 mm. L'artefact du stimulus est réduit à l'aide d'un pont de compensation résistances-capacités.

La stimulation supraliminaire déclenche à la fois deux courants d'action (Figure 2) dont la différence de temps latent est égale, à moins d'un dixième de milliseconde près, à celle qu'on obtient au moyen de stimuli ordinaires appliqués dans les deux sens aux mêmes électrodes stimulatrices. Cette différence de temps latent correspond dans les deux cas au temps que prend l'influx nerveux pour parcourir le trajet entre les deux électrodes stimulatrices.

Au fur et à mesure qu'on augmente l'intensité du stimulus, la riposte partant de l'électrode se trouvant plus proche de la dérivation l'emporte sur celle provenant de l'électrode plus éloignée, de sorte que cette dernière riposte s'efface totalement par un stimulus maximum. Le courant d'action ainsi obtenu (Figure 3a) atteint la valeur maxima de celui déclenché à partir de la même électrode par un

stimulus cathodique d'intensité maxima ou supra-maxima (Figure 3b). En stimulant un nerf au milieu de sa longueur et en dérivant les courants d'action des deux extrémités, on obtient par un stimulus d'intensité maxima ou supra-maxima les deux courants d'action de valeur maxima qui prennent leur départ de part et d'autre des électrodes stimulatrices.

Ces résultats permettent de conclure qu'une impulsion stimulatrice composée d'une fréquence «porteuse» de l'ordre de 20000 périodes, modulée de la manière décrite plus haut et dont l'intensité est maxima, excite toutes les fibres nerveuses aux deux pôles et que, de ce fait, la stimulation doit être considérée comme exempte de polarité, voire *ambipolaire*.

Ces résultats ne s'obtiennent qu'à condition d'employer un courant sinusoïdal pur, exempt de distorsion harmonique. Toute atteinte à la symétrie de la sinusoïde par rapport à la ligne de zéro, en particulier l'harmonique du second ordre déphasé de 90°, introduit une composante de polarité, due sans doute à un effet de rectification dans le circuit d'excitation (comparable à l'effet Fleischl). Cette polarité se manifeste par un abaissement considérable du seuil à l'une des deux électrodes et une élévation à l'autre, phénomène qui s'inverse lorsqu'on intervertit les connexions des électrodes stimulatrices. Ce dernier procédé sert d'ailleurs de test pour prouver l'absence de composante de polarité, à savoir la symétrie du courant alternatif modulé.

Le principe de l'excitation ambipolaire permet de réaliser une stimulation transversale du nerf sans composantes longitudinales. L'emploi d'un courant sinusoïdal pur dont l'artefact est facilement compensable, sert à enregistrer dans ces conditions, le courant d'action à l'endroit de son origine.