

to precede leakage of 260 nm-absorbing material and is not prevented by the osmotic stabilizer, sucrose. However, although sucrose does not protect bacteria against leakage of 260 nm-absorbing material at 60°C (Figure 2b), considerable protection is conferred at 50°C (Figure 2a). Sucrose has also been found<sup>1</sup> to have no influence on the rate of death of this organism at 50°C and 60°C. Thus, one of the initial factors causing thermal injury in *S. aureus* may be the passage of amino acids across the damaged cytoplasmic membrane into the external environment.

One other finding is of interest: the release of protein is considerably higher at 50°C than at 60°C (Figure 1a, b). The reason for this has not yet been investigated, but

could be caused by the coagulation of protein material in the cytoplasm at the higher temperature.

*Résumé.* Une analyse a été fait des substances que perdent les cellules de *Staphylococcus aureus* chauffées à 50°C et 60°C. Ces substances comprennent des acides aminés, de la protéine et des substances absorbantes à une longueur d'onde de 260 nm.

M. C. ALLWOOD and A. D. RUSSELL

Welsh School of Pharmacy, Welsh College of Advanced Technology, Cardiff (Great Britain), 10th May 1967.

## STUDIORUM PROGRESSUS

### Zellmorphologische Veränderungen im Vaginalabstrich nach Strahleneinwirkung<sup>1</sup>

Im Jahre 1928 hat der in den Vereinigten Staaten lebende griechische Arzt PAPANICOLAOU<sup>2</sup> die ersten Arbeiten über zytologisch erfassbare Karzinome veröffentlicht. Seither ist die Methode allgemein verbreitet und anerkannt. Besondere Erfolge konnten auf dem Gebiete der Frühdiagnostik der Uterus-Karzinome, Bronchial-Karzinome und anderen erreicht werden. Die Krebs-Zytodiagnostik hat sich ferner zu einer wissenschaftlichen Methode entwickelt. So werden heute Kern- und Plasmaveränderungen atypisch veränderter Epithelien mit weiterentwickelten Methoden, z.B. Zytchemie, Autoradiographie, Kernmessungen und Elektronenmikroskopie untersucht.

Eine besonders schwierige Aufgabe war es von jeher für den Zytologen, Abstriche nach durchgeführter Strahlentherapie zu beurteilen. Die Zellveränderungen nach Röntgen- und Radiumbestrahlung sind sehr verschiedenartig (siehe Figuren 1-9). Die vorliegende Arbeit befasst sich insbesondere mit der Bedeutung dieser Untersuchungsmethode hinsichtlich einer prognostischen Beurteilung und Verlauf bei karzinomatösen Veränderungen

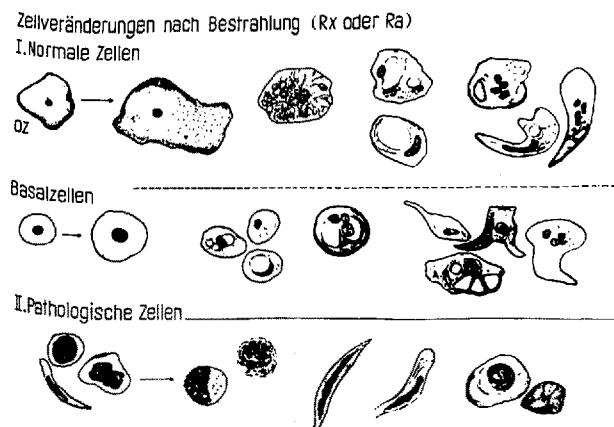


Fig. 1. Zellveränderungen nach Bestrahlung (RX oder RA), halbschematisch dargestellt.

sowie mit der Beurteilung der Strahlensensibilität einer krebsigen Veränderung.

(1) Einige den Gynäkologen, Radiologen und auch Zytologen interessierende Fragen sollen vorerst besprochen werden.

(1) Kann ein infiltrativ wachsendes Karzinom im zytologischen Abstrich nachgewiesen werden? Die Frage, ob infiltrativ wachsend oder nicht, wird immer nur durch die Histopathologie beantwortet. Zur Sicherung der Diagnose müssen bei positiven Abstrichen eine oder mehrere Biopsien mit nachfolgenden Serienschnittuntersuchungen durch den Histologen erfolgen. Zusätzlich muss der erfahrene Kliniker bei der bimanuellen Untersuchung der Patientin die Ausdehnung des Karzinoms – beim Collum-Karzinom entsprechend den 4 Stadien, aufgestellt von der Völkerbundskommission im Jahre 1920 – feststellen.

(2) Kommt es während der Bestrahlung zu Zell- und Kernveränderungen? Anhand von histologischen Präparaten kann man gewisse Rückschlüsse auf die Zellpopulation eines Abstriches gewinnen. Man kann durch wiederholte Zellentnahmen, welche für die Patientin keine Belastung bedeuten, die karzinomatösen Zellen quantitativ auszählen und über Zell- und Kerngrösse oder gewisse Kerneigenschaften eine sichere Aussage machen. Die Kern- und Zelleigenschaften erfahren während dem Einfluss aktinischer Strahlen Veränderungen. Figur 1 zeigt solche Modifikationen, die unter anderem in einem Aufblähen (blowing-up) der Zelle und des Kernes besteht. Dieses führt schlussendlich zum Zerfall der Zelle. Die Kerne können sich ihrerseits ebenfalls stark verändern. Es kann zu einer Hyperchromasie und Vergrösserung des Kernes führen bis zum Zerfall, bzw. zum Auftreten von mehrkernigen Zellen.

(3) Kann der Vaginalabstrich etwas über die Strahlensensibilität des Tumors und des anliegenden Gewebes während und nach der Einwirkung der aktinischen Therapie aussagen? Die Strahlensensibilität kann durch wieder-

<sup>1</sup> Diese Arbeit ist Herrn Prof. A. WERTHEMANN, Vorsteher der Pathologisch-Anatomischen Anstalt der Universität Basel, zum 70. Geburtstag gewidmet.

<sup>2</sup> G. N. PAPANICOLAOU, Anat. Rec. 38, 55 (1928); *Atlas of Exfoliative Cytology* (Harvard Univ. Press 1954).

holte Gewebeentnahmen beurteilt werden. Solche Biopsien sind jedoch nicht ungefährlich und können zu sekundären Infektionen, lokalen Ulcera und damit zu erschwerter klinischer Beurteilung des Falles führen. Unserer Meinung nach sollten solche wiederholte Eingriffe in Narkose und nur für wissenschaftliche Zwecke

durchgeführt werden (GLÜCKSMANN<sup>3</sup>, CUSMANO<sup>4</sup>, PUNDEL<sup>5</sup>). Wenn solche Gewebeentnahmen durchgeführt werden, so darf man nicht vergessen, dass im Grunde genommen nur die oberflächlichsten Veränderungen in unmittelbarer Nähe des Radiumträgers erfassbar sind. Deshalb empfehlen wir eher Wiederholungen der Zellabstrich-Untersuchungen während und nach der Strahlentherapie. Über Ausdehnung und Progression des Tumors im Bereich des kleinen Beckens kann aber nur der geübte Kliniker durch die bimanuelle Untersuchung eine sichere Aussage machen. Was durch die Vaginalzytologie einigermassen gut beantwortet werden kann, ist die Strahlensensibilität des umliegenden Gewebes, d.h. die sogenannte Toleranzgrenze nach FISCHER und SCHÜLLER<sup>6</sup>, CRAMER und LEHMACHER<sup>7</sup>. Diese haben die Vaginalabstrich-Methode erfolgreich zur Bestimmung einer individuellen Strahlendosierung angewandt. Da es sich um tumorfreie, nicht verhorrende Plattenepithelien handelt, kann durch die Zellveränderungen eine Aussage über das Verhalten eines normalen Gewebes während der Strahlentherapie gemacht werden.

(4) Wie verhält sich die Vaginalzytologie nach Abschluss der Strahlentherapie? Dem zytologischen Abstrich kommt bei der Erfassung von lokalen Rezidiven nach dem Abschluss der Strahlentherapie eine grosse Bedeutung zu. Wiederholte positive oder suspekte Abstriche in der Nachkontrolle von Collum-Karzinomen sollten deshalb mit dem Zytologen besprochen werden, um das weitere Procedere (histologische Abklärung) festzulegen.

<sup>3</sup> A. GLÜCKSMANN, XII. Br. Obstet. Gynaec. 234 (1949).

<sup>4</sup> L. CUSMANO, Minerva ginec. 2 (1949); Minerva ginec. 2/3, 63 (1951); Am. J. Obstet. Gynec. 57, 411 (1949).

<sup>5</sup> J. P. PUNDEL, Annls Endocr. 12, 235 (1951).

<sup>6</sup> H. FISCHER und E. SCHÜLLER, Zentbl. Gynäk. 75, 409 (1953); Strahlentherapie 89, 456 (1953).

<sup>7</sup> H. CRAMER und K. LEHMACHER, Strahlentherapie 92, 123 (1953).

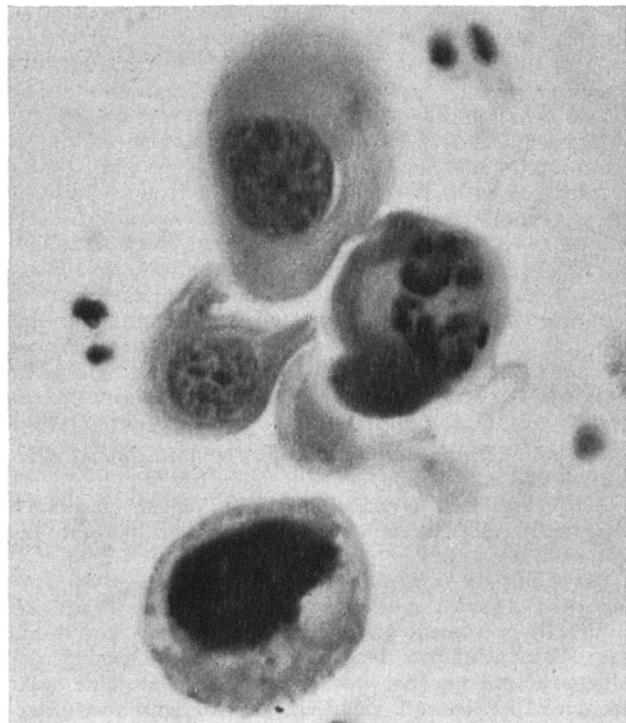


Fig. 2. Verklumpung des Chromatins, Kernzerfall (Karyorrhexis) und Pseudopodienbildung.



Fig. 3. Karyorrhexis.

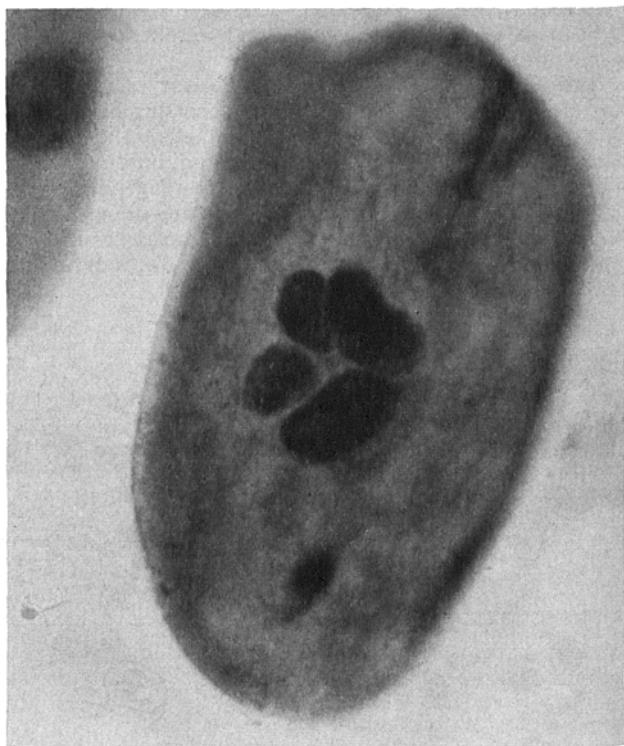


Fig. 4. Vergrösserte Intermediärzelle mit Mehrkernigkeit.

(II) *Die Strahlenveränderungen an Vaginalepithelien.* Man kann über die Bedeutung der Vaginalzytologie während und unmittelbar nach der Strahlentherapie verschiedene Meinungen vertreten. Bemerkenswert ist die Beobachtung von GRAHAM<sup>8</sup>, wonach die Abstriche von Patienten, die trotz Röntgen- und Radiumtherapie inner-

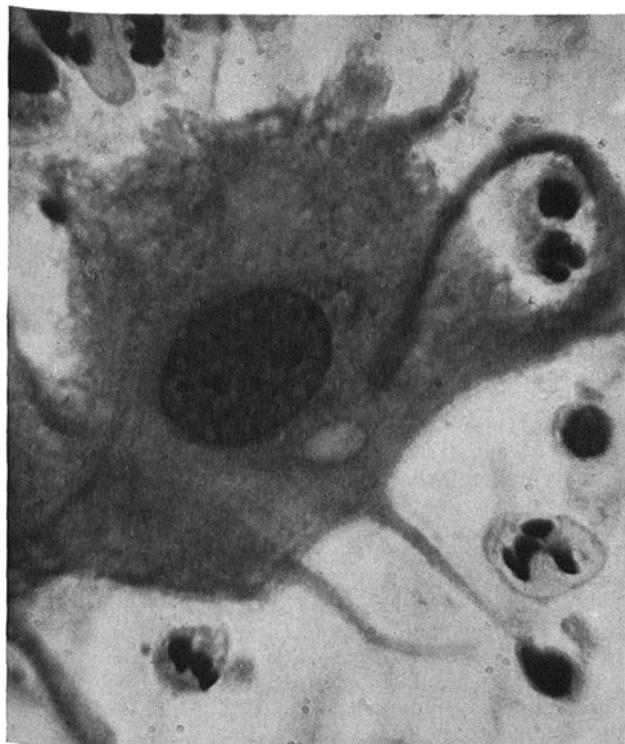


Fig. 5. Ausgesprochene Pseudopodienbildung und Vakuolen des Plasmas.

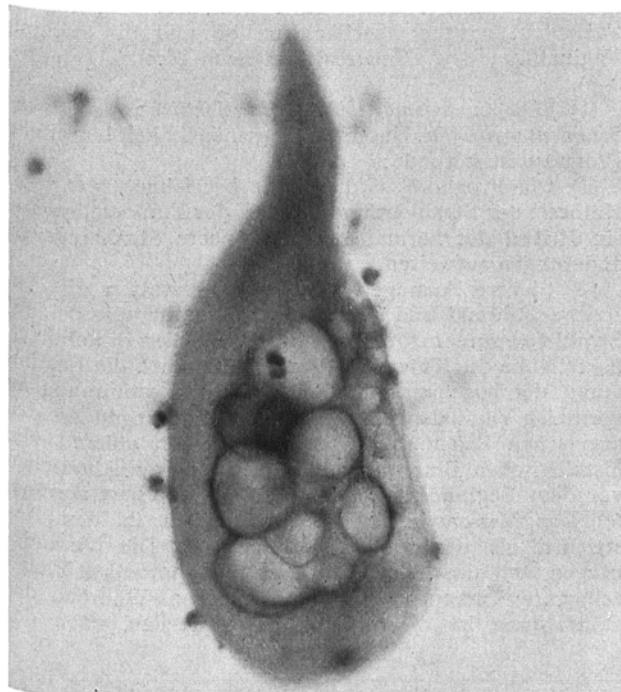


Fig. 6. Ausgesprochene Vakuolisierung des Zellplasmas.

halb eines Jahres verstarben, also strahlenresistent waren, überhaupt keine Strahlenreaktionen im Abstrich gezeigt hatten.

Ob die Röntgen- oder die Radiumbestrahlung quantitativ eine grosse Wirkung auf die Zellen hat, lässt sich nicht einwandfrei feststellen. Das zeitlich verschiedene Auftreten von Strahleneffekten dürfte durch quantitative Unterschiede bedingt sein. Durch die verschiedenen Bestrahlungsmethoden und Dosisangaben wird eine vergleichende qualitative Untersuchung fast unmöglich gemacht.

Ganz allgemein ist es so, dass sich bei etwa 50% der Patientinnen eine Woche nach der ersten Radiumeinlage von 2000–3000 mgeh die ersten deutlichen Zellveränderungen im Abstrich zeigen.

Die intakten Tumorzellen verschwinden in etwa 3 Wochen nach der 1. lokalen Einlage. So hat die 2. Radiumeinlage sicher eine grosse Bedeutung. Nach Abschluss der 3. Radiumeinlage sollten im Vaginalabstrich keine Tumorzellen mehr nachweisbar sein.

Drei Monate nach der letzten Radiumeinlage darf man noch Strahlenreaktionen an den normalen Epithelien finden. Wie lange diese Zellveränderungen anhalten, ist nicht sicher. Oft können nach Jahren noch Zellveränderungen beobachtet werden.

(1) *Zellveränderungen an den normalen Epithelien.* In der ersten Behandlungsphase wird uns das Verhalten der *Basalzellen* und *Parabasalzellen* interessieren, weil ja infolge der Strahlenreaktion eine Atrophie des Genitaltraktes eintritt.

Diese führt zu einer Verschmälerung, zum Abbau des Epithels. Ab 2. Tag der Therapie tritt eine Veränderung der Form und der Anfärbbarkeit der Basalzelle auf. Die kreisrunden und leicht ovalen basophilen Zellen erfahren eine Verlängerung, Elongation des Zell-Leibes. Diese Deformation kann soweit führen, dass sich unter Umständen differentialdiagnostische Schwierigkeiten gegenüber den sogenannten *malignen «fibre cells»* ergeben können. Das

<sup>8</sup> R. GRAHAM, *Surgery Gynec. Obstet.* 84, 153 (1947), 676 (1951).

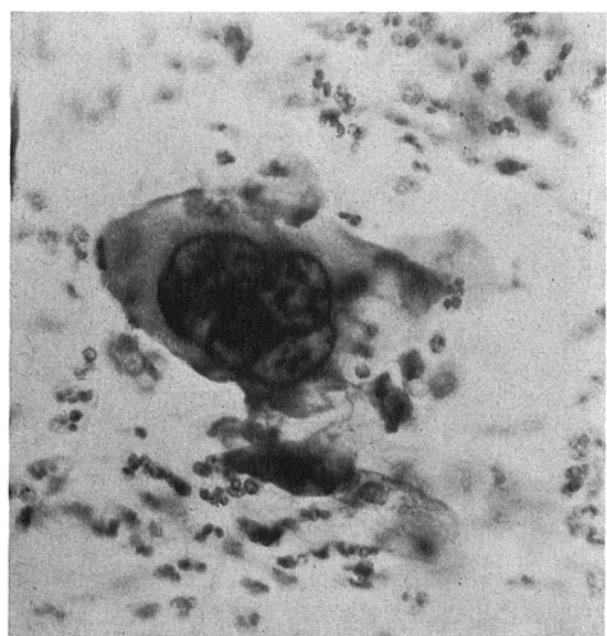


Fig. 7. Mehrkernigkeit der Zelle mit Vakuolisierung des Plasmas.

Plasma der Basalzellen verfärbt sich in eine schmutzig gelbbraune Farbe. Etwa am 10. Tag der Strahlentherapie sind diese Veränderungen am deutlichsten (s. Figur 1).

Ab 10. Tag können die Plasma- und Zellkernveränderungen beobachtet werden. Es sind dies eine ausgesprochene Pyknose, Verklumpung des Chromatins und schlussendlich ein vollständiger Kernzerfall, Karyorrhexis. In dieser Zeit ist ein *Aufblasen* der Kerne und des Zell-Leibes, das sogenannte «blowing-up» zu beobachten. Die

Kerne sind weniger granuliert, das Chromatin ist unregelmässig an der Kernmembran verteilt. Bei dieser Veränderung bleibt die Kernplasma-Relation ungestört, d.h. es kommt zu keiner Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zu Gunsten des Kernes, wie es in den malignen Zellen der Fall ist. Es treten grosse Vakuolen im Zellplasma auf. Diese können die Zellen so stark deformieren, dass die Differentialdiagnose gegenüber malignen Zellen sehr schwierig wird.

Die *Intermediärzellen* verändern sich ebenfalls. Zwischen dem 3. und 15. Tag tritt eine massive Vergrösserung des Zell-Leibes auf. Oft findet man eine auffallende Doppel- und Mehrkernigkeit. Im Plasma treten neben einer Verfärbung viele feine Fibrillen auf.

In allen Zellschichten ist eine eigenartige Plasmaveränderung auffallend, nämlich das Auftreten von pseudopodienartigen Ausläufern des Zellplasmas.

(2) *Veränderungen der malignen Zellen.* Strahlenbedingte Veränderungen an den malignen Zellen können nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Am 3. Tag tritt eine Vakuolisierung des Plasmas und des Zellkernes auf, daneben sind Veränderungen wie Pyknose, Karyorrhexis und andere degenerative Umänderungen sichtbar. Hierbei könnte es sich auch um Variationen an Tumorzellen handeln. Das wichtigste für die Beurteilung ist in den Zellabstrichen das Vorhandensein oder das Verschwinden von atypischen Zellen.

(3) *Veränderungen an nicht-epithelialen Zellen.* Je nach Stärke der sekundären Infektion kann man Leukozyten, Bakterien und andere Entzündungszellen in den Abstrichen sehen. Eindeutig ist eine starke Zunahme der Leukozyten ab 20. Tag der Therapie (sogenannte *Intermediärreaktion nach MOHR*<sup>9</sup>). Diese Leukozytose ist auch in den histologischen Präparaten auffallend. Im Tumorgewebe tritt eine Eosinophilie, d.h. eine Vermehrung der eosinophilen Leukozyten in ca. 10% der Fälle während der Strahlentherapie auf. Gegen Ende der Strahlentherapie und nach Abschluss derselben findet man vermehrt Histiocyten und Phagozyten mit einer vermehrten Phagozytenaktivität der Epithelzellen. Einige Monate nach der Strahlentherapie kommt es zur Aufhellung, d.h. der Abstrich wird sauber, und es erscheinen, je nach Alter der Patienten, wieder Oberflächenzellen und die normale Vaginalflora (sog. *Finalreaktion nach MOHR*). (Figuren 2-9).

(III) *Die Aussagemöglichkeiten hinsichtlich Prognose und Strahlensensibilität.* Unsere Aussagemöglichkeit betreffend Prognose ist folgende:

(1) Die Prognose wird als gut bezeichnet, wenn bei Halbzeit der Strahlentherapie 50% der Tumorzellen und ein Drittel der normalen Zellen sichere Strahlungsveränderungen aufweisen.

(2) Sichere Aussagemöglichkeiten gestatten die Abstriche während und nach der Strahlentherapie bei: (a) Strahlenveränderungen der normalen Zellen in unmittelbarer Nähe des Tumors. Hierzu gehört auch die Bestimmung der sogenannten Toleranzgrenze-Bestimmung an normalen Vaginalepithelien. (b) Veränderungen an den atypischen Zellen wenn die Tumorzellen anhand von histologischen Präparaten und zytologischen Abstrichen vor dem Beginn der Strahlentherapie typisiert wurden. (c) Das Verschwinden der Tumorzellen in den Abstrichen als wichtigstes Merkmal. (d) Die Veränderungen und das Wiederauftreten von normalen Basalzellen. (e) Östrogengehalt der Abstriche. Während der Bestrahlung ist dieser nicht zu beurteilen, nach der

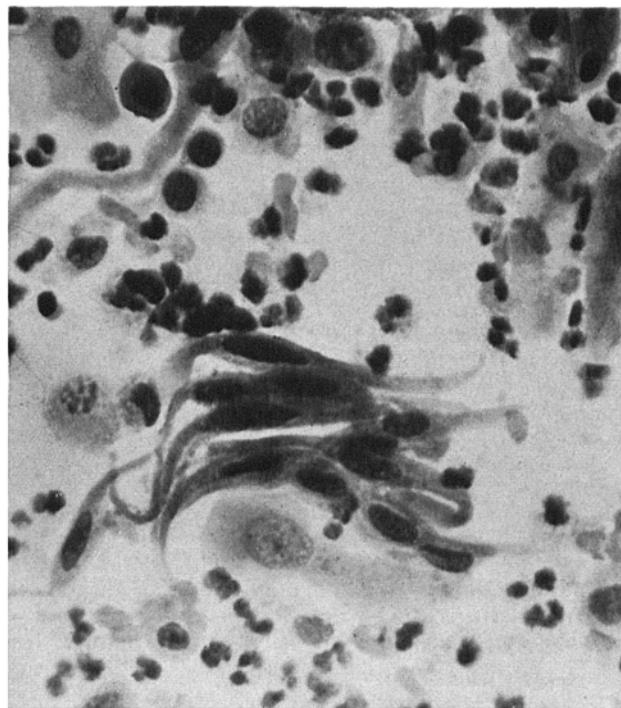


Fig. 8. Maligne «fibre cells» veränderte Basalzellen.

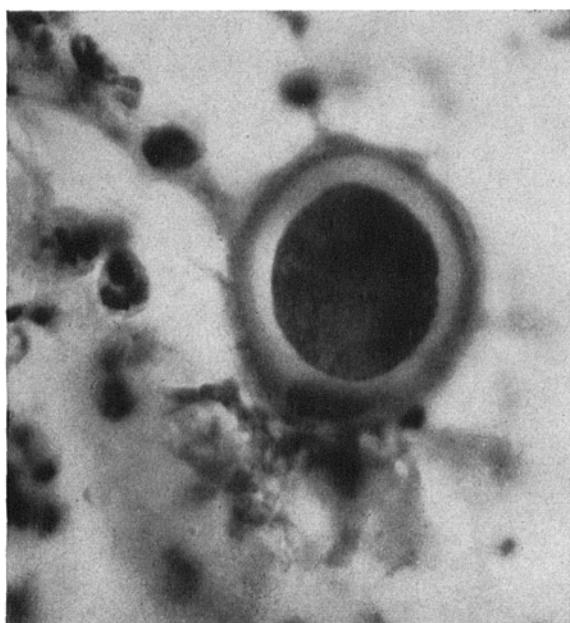


Fig. 9. Ausgesprochene Vakuolisierung des Zellplasmas und des Kernes in einer malignen Zelle.

<sup>9</sup> H. J. MOHR, Dt. med. Wschr. 74, 1399, 1463, 1531, 1565 (1949).

Strahlentherapie bietet er für die Regeneration des Epithels einen wichtigen Hinweis. (f) Nach Abschluss der Strahlentherapie ist das eventuelle Wiederauftreten von atypischen Zellen von grösster Wichtigkeit.

**Summary.** (1) The vaginal smears show no definite criteria of susceptibility to radiation except for the disappearance of the atypical cells. (2) Nothing can be said about the diagnosis. Only the clinical status may enable the experienced gynaecologist to predict the prognosis.

(3) The cytology of the vagina serves as an important guide to the progress of cases of carcinoma which had been radiated or operated. The diagnosis of recurrence of the local, highly differentiated carcinoma, following radiation may present difficulties.

J. BERGER

Universitäts-Frauenklinik, Basel (Schweiz),  
6. April 1967.

## PRO EXPERIMENTIS

### Reliability of Intraperitoneal Injections in Fish

In the study of dose-response phenomena, fishes often display large variances of response in comparison to other test animals. Of course, the sources of error differ as widely as experiments but the technique of i.p. injection is common to the majority. It is possible that a substantial part of the variance in widely different kinds of response emanates from errors of the common technique.

In most cases, it is not possible to use any depot but the i.p. Earlier it has been observed<sup>1,2</sup> that neither of the 2 approaches to the coelomic cavity is very satisfactory: both transparietal and transintestinal injections may be subject to leakage. Here, the leakage of various potentially useful volumes of a transparietally or transintestinally injected solution of radioiodine-tagged thyrotropin has been determined quantitatively. Thyrotropin was chosen because of its intermediate molecular size (mol wt. 28,000). Twenty min after injection, the radioactivity of the aquarium water was determined. It is believed that this time interval constitutes a suitable compromise; the degradation of thyrotropin should be minimal while leakage should be almost terminated.

Two means of preventing leakage were devised and evaluated.

**Materials and methods.** Thytopar (Armour) was tagged with  $^{125}\text{I}$  according to OCHI<sup>3</sup>. After careful dialysis it was diluted with 0.70% saline, pH 7.0. Each of the various volumes studied held 150  $\mu\text{g}$  hormone. The injections were given with a 1.0 ml syringe, graduated to 0.01 ml and fitted with a cannula of 0.50 mm O.D.

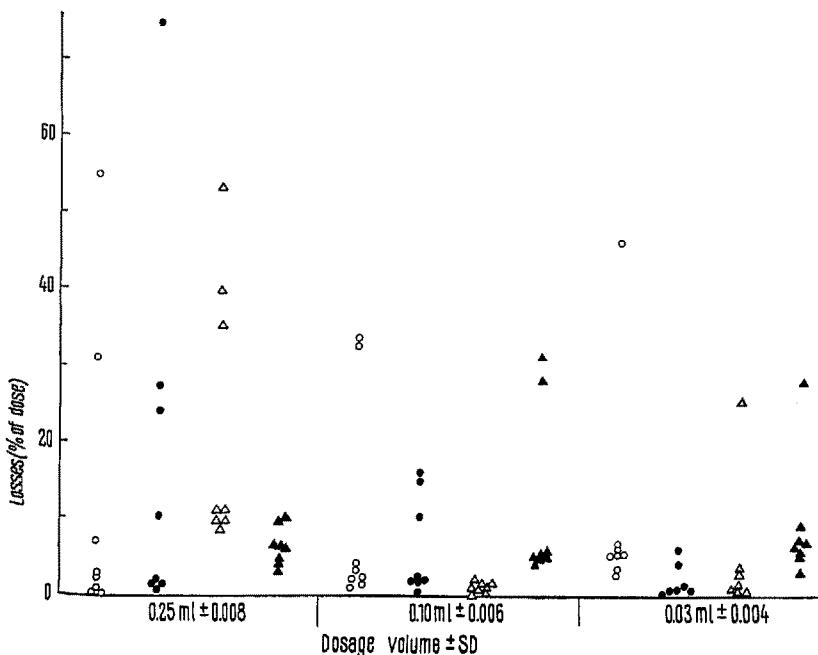
*Carassius carassius* L. with a mean weight of 14.1 g  $\pm$  2.4 (SD) were used. During experiments, they were kept in individual plastic containers with 300 ml tap water at 21 °C.

In a first screening experiment, 96 fishes were randomly allotted to 12 groups of 8 containers. Four groups were injected with 0.03 ml, another 4 with 0.10 ml and the last 4 with 0.25 ml. Within each set of 4 groups, the injections were given transparietally in 1 pair and transintestinally

<sup>1</sup> W. CHAVIN, J. exp. Zool. 133, 259 (1956).

<sup>2</sup> B. M. DOBYNS, in *The Pituitary Gland*, (Eds. G. W. HARRIS and B. T. DONOVAN; Butterworths, London 1966), vol. I, p. 411.

<sup>3</sup> Y. OCHI, Endocr. jap. 11, 275 (1964).



Percentage of dose lost during the first 20 min after injection. O denotes transintestinal injection, ● dito in siliconpretreated fish; Δ denotes transparietal injection, ▲ dito with film seal.