

saturated ring systems<sup>14,15</sup>. In the ester group at C(19) as well, the oxygen atom O(5) is *cis* to the alcoholic carbon C(19). The oxygen atom O(2) is in a 'sheltered' position, as a result of the conformation around the C(9)–O(2) and O(2)–C(24) bonds<sup>16</sup>.

<sup>14</sup> A. McL. MATHIENSON, *Tetrahedron Lett.* 46, 4137 (1965).

<sup>15</sup> M. BRUFANI, W. FEDELI, G. GIACOMELLO and A. VACIAGO, *Experientia* 23, 508 (1967).

<sup>16</sup> This work was supported in part by the Italian National Research Council (CNR).

<sup>17</sup> Permanent address: Centro di Studio per la Strutturistica Chimica (CNR), Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica della Università degli Studi, Roma (Italy).

**Riassunto.** Con l'uso combinato di metodi chimici, spettroscopici, e di strutturistica chimica diffrattometrica è stato possibile assegnare la struttura I alla fusicoccina A, metabolita fitopatogeno del fungo *Fusicoccum amygdali* Del.

A. BALLIO, M. BRUFANI<sup>17</sup>,  
C. G. CASINOV, S. CERRINI<sup>17</sup>,  
W. FEDELI<sup>17</sup>, R. PELLICCIARI,  
B. SANTURBANO and A. VACIAGO<sup>17</sup>

*Laboratori di Chimica Biologica e Centro Internazionale di Chimica Microbiologica, Istituto Superiore di Sanità, Roma; and Laboratorio di Chimica delle Sostanze Naturali, Istituto Chimico dell'Università degli Studi, Napoli (Italy), 19 March 1968.*

## Frühe Stadien der Erholung bei bestrahlten Ratten und Mäusen

Mit der sogenannten Split-Dosis-Technik untersucht man häufig den Erholungsverlauf nach Einwirkung ionisierender Strahlen. Das Ausmass der Erholung von einer Erstbestrahlung wird dabei getestet an dem Schaden, den eine zweite Bestrahlung verursacht. Das Kriterium dieses Schadens, die LD50(30), setzt den Rahmen fest, innerhalb dessen «Erholung» hier gemessen werden kann. Die LD50(30) ist bekanntlich diejenige Strahlendosis, die 50% einer Population innerhalb von 30 Tagen tötet. Nur diejenigen Strahlenschäden, die zum tödlichen Ausgang innerhalb von 30 Tagen beitragen, werden also erfasst. Wenn die LD50(30) ein Mass für alle Strahlenschäden darstellt, deren Summe innerhalb von 30 Tagen tödlich wirkt, so kann die Split-Dosis-Methode als Mass für die Erholung von eben diesen Strahlenschäden gelten. Das ermöglicht eine formale Definition der Erholung als Abnahme eines von einer Erstdosis herrührenden Restschadens, der durch die Differenz der LD50(30)-Werte von vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Tieren messbar wird<sup>1</sup>.

Zunächst suchte man experimentelle Bestätigung für die theoretisch naheliegende Hypothese eines mit der Zeit exponentiell abnehmenden Strahlenschadens. Das Ergebnis hing weitgehend von der Wahl der Testzeiten nach Erstbestrahlung ab. Die Beobachtungen waren mit der Hypothese vereinbar, wenn sie etwa 2 Tage bis 3 Wochen nach der Erstbestrahlung gesammelt wurden<sup>2-4</sup>. Sie wichen aber in den ersten 48 h deutlich vom exponentiellen Verlauf ab<sup>3,5-8</sup>. Es kam dann zu einer Fluktuation des von der Erstbestrahlung zurückgebliebenen Restschadens, wobei regelmässig zuerst ein Minimum und dann ein Maximum auftrat. Das fand allgemeine Beachtung, nachdem ELKIND und SUTTON<sup>9</sup> an bestrahlten Hamsterzellkulturen *in vitro* eine ähnliche Fluktuation gefunden und durch das «Repair-and-progression»-Modell<sup>10</sup> gedeutet hatten. Seither wurden solche Verläufe bei bestrahlten zellulären Systemen vielfach nachgewiesen<sup>11</sup>.

Im vorliegenden Split-Dosis-Experiment ging es um die formale Beschreibung der Erholungsvorgänge bei jungen Wistar-Ratten. Es war zu prüfen, ob die bisher nur an Mäusen beschriebene frühe Wellenbewegung sich auch an Ratten nachweisen liess.

**Methodik.** Als Versuchstiere dienten Wistar-Ratten eigener Zucht, die in transparenten Plastik-Käfigen gehalten und mit Altromin Pellets und Wasser ernährt

wurden. Zusätzlich gab es bis zum 30. Lebenstag rohes Fleisch und gelegentlich Möhren oder Salat. Die Raumtemperatur lag bei 22–26°C, die relative Luftfeuchtigkeit bei 50–65%.

Die Bestrahlung erfolgte im Alter von 12, 24 oder 32 Tagen. Es kamen nur Würfe zum Versuch, die am Tag 12 mindestens 7 gesunde Jungtiere enthielten. Diese wurden am Tag 12 oder 24 zusammen bestrahlt und danach der Mutter zurückgegeben. In der ältesten Gruppe wurden die Muttertiere 4 Tage vor der Bestrahlung entfernt und die Jungen gleichzeitig nach dem Geschlecht getrennt und randomisiert.

Die Bestrahlungsbedingungen sind anderswo ausführlich beschrieben<sup>12</sup>. Die Tiere erhielten 1 oder 2 Röntgen-ganzbestrahlungen (200 kV, 20 mA, HWS 0,81 mm Cu, 108–116 R/min), wobei die Dosis zur Hälfte im dorsoventralen, zur Hälfte im ventrodorsalen Strahlengang appliziert wurde. Die Dosierungsinhomogenität des Bestrahlungsfeldes lag während der Versuchsdauer (April bis Oktober 1965) bei  $\pm 1,75\%$  Standardabweichung von einer Testdosis 65 R (der Messfehler betrug  $\pm 1,86\%$ ).

In jedem Alter wurde ein unbestrahltes, ein einmal bestrahltes und ein zweimal bestrahltes Kollektiv benötigt. Das erste diente zur Schätzung der «natürlichen» Sterblichkeit, das zweite zur Schätzung der LD50(30) ohne Vorbestrahlungsdosis, das dritte zur Schätzung der

<sup>1</sup> G. A. SACHER in *Radiation Biology and Medicine* (Ed. W. D. CLAUS; Addison-Wesley Publ. Co., Reading, Massachusetts 1958).

<sup>2</sup> H. I. KOHN und R. F. KALLMAN, *Radiat. Res.* 7, 85 (1957).

<sup>3</sup> R. H. MOLE, *Br. J. Radiol.* 29, 563 (1956).

<sup>4</sup> J. B. STORER, *Radiat. Res.* 14, 206 (1961).

<sup>5</sup> R. KALLMAN, *Nature* 197, 557 (1963).

<sup>6</sup> R. F. KALLMAN und G. SILINI, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 114, 173 (1964).

<sup>7</sup> R. F. KALLMAN, G. SILINI und H. M. TAYLOR, *Radiat. Res.* 29, 362 (1966).

<sup>8</sup> J. B. STORER, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 114, 126 (1964).

<sup>9</sup> M. M. ELKIND und H. SUTTON, *Radiat. Res.* 13, 556 (1960).

<sup>10</sup> M. M. ELKIND, *J. cell. comp. Physiol.* 58, 113, (1961).

<sup>11</sup> M. M. ELKIND und G. F. WHITMORE, *Radiology of Cultured Mammalian Cells* (Gordon and Breach, New York 1967).

<sup>12</sup> U. REINCKE, J. MELLMANN und M. ROTHER, *Strahlentherapie* 129, 622 (1966).

LD50(50) nach einer Vorbestrahlung mit 200 oder 260 R. Die Vorbestrahlungsdosis sollte der halben LD50(30) entsprechen. Die 32 Tage alten Ratten zeigten sich aber weniger strahlenresistent als nach dem Vorversuch erwartet; die Vorbestrahlungsdosis von 260 R war daher etwas zu hoch im Vergleich mit den jüngeren Altersgruppen.

Die verwendeten Tierzahlen gehen aus der Tabelle hervor. Immer wenn im vorbestrahlten Kollektiv eine Dosis zu verabreichen war, kamen gleichzeitig auch einige nicht vorbestrahlte Tiere zur Exposition.

Die Absterbehäufigkeiten innerhalb von 30 Tagen nach der letzten Bestrahlungsdosis waren zunächst bezüglich der «natürlichen» Sterblichkeit zu korrigieren. Dazu wurde die ABBOTTSche Formel<sup>13</sup> benutzt. Dosis-Wirkungs-Kurven wurden dann mittels Probitanalyse<sup>13</sup> unter Verwendung eines FORTRAN-Programmes auf der IBM 7040 des Rechenzentrums (Universität Freiburg) geschätzt<sup>14</sup>. Wir verzichteten dabei auf logarithmische Transformation der Dosis, da sie nicht zu besserer Anpassung der Probitgeraden an die Beobachtungsdaten führte. Die Differenz der LD50(30)-Werte von vorbestrahlten und nicht vorbestrahlten Tieren entspricht dem sogenannten Restschaden

$$R = LD50(30)_{normal} - LD50(30)_{vorbestr.}$$

Ausgedrückt in Prozent der Vorbestrahlungsdosis ergibt sich dann ein Restschaden von

$$R\% = 100 \frac{LD50(30)_{normal} - LD50(30)_{vorbestr.}}{Vorbestrahlungsdosis}$$

**Ergebnisse.** Die Daten von Männchen und Weibchen konnten gemeinsam ausgewertet werden, da ein Geschlechtsunterschied der Strahlenempfindlichkeit nicht bestand<sup>15</sup>. Die LD50-Schätzungen sind mit den zugehörigen 95%-Vertrauensgrenzen in der Tabelle zusammengestellt. In 3 Fällen war wegen Heterogenität der Beobachtungsdaten keine LD50-Schätzung möglich; in 3 weiteren Fällen konnten keine Vertrauensbereiche angegeben werden, weil die Steigung der Probitgeraden nicht signifikant von Null verschieden war. Die nicht vorbestrahlten Kollektive sind mit einer gemeinsamen LD50(30)-Schätzung für jedes Alter zusammengefasst. Wenn man Dosis-Wirkungs-Kurven für jeden einzelnen Versuchsabschnitt berechnete, ergaben sich bei nicht vorbestrahlten Tieren LD50-Unterschiede bis zu 50 oder 80 R, was im Bereich der zu erwartenden Uneinheitlichkeit lag. Diese Teilergebnisse sind in anderem Zusammenhang bereits dargestellt und diskutiert<sup>15</sup>.

Der sogenannte Restschaden wurde für jedes Alter geschätzt und in der Figur graphisch dargestellt. In allen 3 untersuchten Altersgruppen trat 12 h nach Vorbestrahlung ein Minimum auf. Das darauffolgend erwartete Maximum des Restschadens zeigte sich um die 18. oder 24. h. Es wird in der 32-Tage-Gruppe scheinbar vermisst, weil hier ein sehr hoher Restschaden um die 48. h nach Vorbestrahlung den 24-h-Wert überschattet. 48 h nach der Erstdosis hatten wir bessere Erholung vorausgesetzt und die Testdosen der Zweitbestrahlung daher zu hoch gewählt. Wegen der grossen Sterblichkeit waren die LD50-Schätzungen unsicher. Der Restschaden kann deshalb zu dieser Testzeit nur als «hoch» betrachtet werden, den errechneten Beträgen kommt jedoch keine quantitative Bedeutung zu.

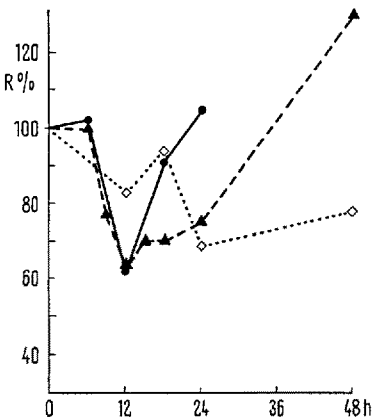
Ein Minimum des Restschadens um die 12. h, gefolgt von einem Maximum um die 18. bzw. 24. h nach Vorbestrahlung war gleichfalls festzustellen, wenn die Berechnung nicht von einem gemeinsamen Schätzwert der LD50(30)<sub>normal</sub>, sondern von den zu jedem Versuchsab-

schnitt getrennt bestimmten Werten ausging. Die beobachtete Fluktuation konnte also nicht einfach auf zufällige Schwankungen der LD50(30)<sub>normal</sub> zurückgeführt werden, wenn auch solche Schwankungen die Eindeutigkeit der Versuchsergebnisse und ihrer Interpretation zu beeinträchtigen vermögen<sup>15</sup>.

LD50(30) bei normalen und vorbestrahlten Ratten im Alter von 12, 24 oder 32 Tagen

Alter Tage	Tierzahl	Vorbestrahlung und Zeitintervall	LD50(30) R	95%-Vertrauensbereich R	Restschaden %
12	550	keine	413	393-431	-
	89	200 R + 6 h	210	0-242	102
	83	200 R + 12 h	289	267-300	62
	80	200 R + 18 h	231	172-252	91
	174	200 R + 24 h	204	0-245	105
	121	200 R + 48 h	*	*	*
24	734	keine	434	391-505	-
	114	200 R + 6 h	*	*	*
	172	200 R + 9 h	*	*	*
	221	200 R + 12 h	268	247-282	83
	116	200 R + 18 h	247	233-259	94
	102	200 R + 24 h	297	270-313	69
	234	200 R + 48 h	278	*	78
32	383	keine	446	427-461	-
	118	260 R + 6 h	186	0-239	100
	140	260 R + 9 h	247	*	77
	110	260 R + 12 h	282	220-306	63
	110	260 R + 15 h	263	192-287	70
	139	260 R + 18 h	264	236-291	70
	119	260 R + 24 h	252	121-280	75
	110	260 R + 48 h	107	*	130

\* Schätzung nicht möglich.



Restschaden nach Vorbestrahlung mit 200 R am Tag 12 oder 24 bzw. mit 260 R am Tag 32. Auf der Abszisse ist die Zeit nach Vorbestrahlung in Stunden angegeben. ●-●-● Alter 12 Tage, ◇-◇-◇ Alter 24 Tage, ▲-▲-▲ Alter 32 Tage.

<sup>13</sup> D. J. FINNEY, *Probit Analysis*, 2nd edn (University Press, Cambridge 1952).  
<sup>14</sup> Wir danken Herrn Dr. H. J. JESDINSKY (Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation, Freiburg/Br) für die Durchführung der Analysen und für viele hilfreiche Diskussionen.  
<sup>15</sup> U. REINCKE, E. GOLDMANN, J. MELLMANN und H. J. JESDINSKY, *Strahlentherapie*, im Druck (1968).

**Diskussion.** Der erwartete wellenförmige Erholungsverlauf trat innerhalb von 24 h nach Vorbestrahlung auch bei jungen Wistar-Ratten auf. Es kam in allen 3 untersuchten Altersgruppen 12 h nach der Vorbestrahlung zu einem Minimum des sogenannten Restschadens, dem später ein erneuter Anstieg folgte. Gemessen an den 95%-Vertrauensgrenzen der geschätzten LD50-Werte (Tabelle) war die Fluktuation im Alter von 12 Tagen zu den entscheidenden Testzeiten zwischen 6 und 18 h signifikant. In der Altersgruppe 24 Tage unterschied sich nur der 24-h-Wert signifikant von den übrigen, und mit 32 Tagen konnten anhand der Vertrauensbereiche keine Unterschiede mehr gesichert werden. Jedoch lässt die qualitative Übereinstimmung der 3 Kurven in der Zeit zwischen 6 und 18 h nach Vorbestrahlung ein grundsätzlich gleichartiges Geschehen vermuten. Die späteren Schätzwerte bis 48 h nach der Vorbestrahlung scheinen eine weitere Welle anzudeuten, erlauben aber wegen der ungenügenden Sicherung nur den Schluss, dass 2 Tage nach der Vorbestrahlung offenbar noch keine nennenswerte Erholung über den 12-h-Wert hinaus eingetreten war.

Es musste freilich noch ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Variationen nur auf Tageszeiteffekte zurückgingen, da die 2. Bestrahlung ja zu verschiedenen Tag- und Nachtstunden stattgefunden hatte. Ein entsprechender Versuch an 288 Ratten liess aber keinen nachweisbaren Einfluss der 4 untersuchten Tageszeiten 06.00, 12.00, 18.00 und 24.00 auf die Strahlenempfindlichkeit erkennen<sup>16</sup>.

Unterschiede im Verlauf der Split-Dosis-Reaktionen, die mit Sicherheit dem Alter zuzuschreiben wären, sind aus dieser Untersuchung nicht zu entnehmen. Am Tag 24 weicht zwar die Kurve etwas ab von dem im Alter von 12 und 32 Tagen erhaltenen Befunden, aber im Rahmen der gegebenen Reproduzierbarkeit können daraus keine Folgerungen gezogen werden. Es bleibt also bei dem allen 3 Altersgruppen gemeinsamen Ergebnis, dass 12 h nach der Vorbestrahlung ein grösserer Erholungseffekt messbar war als einige h später.

Seitdem AURAND<sup>17</sup> die Wellenbewegung der mittleren Überlebenszeiten und MOLE<sup>3</sup> die des sogenannten Restschadens bei zweimal bestrahlten Mäusen beschrieben hatten, wurde das Phänomen immer wieder beobachtet, wenn man die Testzeiten nur früh und häufig genug wählte<sup>5-8,18-21</sup>. Alle diese Untersucher arbeiteten mit Mäusen. Regelmässig ergab sich nach der Vorbestrahlung eine zunächst schnell ansteigende Strahlenresistenz, worauf ein Stadium vermehrter Empfindlichkeit folgte. Der schnellen Erholung in der ersten Phase entspricht das Minimum des sogenannten Restschadens. Es wurde frühestens 4<sup>8,21</sup> und spätestens 12-24 h nach der Vorbestrahlung gefunden<sup>3,19</sup>. Das darauffolgende Stadium trat frühestens 8<sup>8,21</sup> und spätestens 24-48 h nach der Vorbestrahlung ein<sup>3,19</sup>. In allen anderen Untersuchungen lagen die Zeiten zwischen diesen Extremen. Wurden die Versuche ausgedehnt, so konnte man weitere Fluktuationen sehen, die sich an die erste anschlossen<sup>7,18,19,21</sup>.

Die bei kleinen Laboratoriumstieren bekannte Uneinheitlichkeit der Strahlenreaktion wird allerdings immer zu Schwankungen führen, wenn man Absterberaten mehrmals hintereinander untersucht. Solche zufälligen Schwankungen könnten echte Unterschiede vortäuschen, womit der für typisch gehaltene Erholungsverlauf in Frage gestellt wäre. Die Reproduzierbarkeit der Daten scheint bei den verschiedenen Untersuchern etwa im selben Bereich zu liegen, ganz gleich ob das Phänomen der «Fluktuation» bestritten<sup>18</sup>, mit Autokorrelationsverfahren statistisch nachzuweisen gesucht<sup>7</sup> oder auch gar nicht beachtet wird<sup>21</sup>. Optisch entscheidet manchmal nur der gewählte

Zeichenmaßstab darüber, ob die «Fluktuation» als zufällige Streuung um einen mittleren Wert<sup>18</sup> oder als periodische Abweichung von einem mittleren Wert<sup>7</sup> erscheint. Es spricht aber für die nicht-zufällige Bedeutung dieser Wellenbewegung, dass die Reihenfolge der Phasen mit zunächst schnell fortschreitender Erholung und danach erhöhter Strahlenempfindlichkeit in bisher allen Beobachtungen übereinstimmt.

In bestrahlten Zellkulturen der verschiedensten Herkunft wurden seit 1960 wellenförmige Erholungsverläufe nachgewiesen<sup>11</sup>. Auch hier geht eine strahlenresistente Phase einer strahlenempfindlichen voraus. Das Phänomen ist an Zellkulturen mit sehr viel grösserer Präzision nachweisbar und experimentell modifizierbar als an Tierkollektiven, und es interessierte am Säugetier auch erst, nachdem es an Zellkulturen entdeckt war<sup>9</sup>. ELKIND formulierte 1961<sup>10</sup> sein «Repair-and-progression»-Modell zur Erklärung der Vorgänge. Danach kommt es zunächst zur Erholung (repair) der durch die Strahleneinwirkung nicht tödlich getroffenen Zellen. Diese überlebenden Zellen rücken nun in den Phasen des Zellzyklus vor (Progression), gelangen aber während der Dauer der strahlenbedingten Teilungsverzögerung nur bis zum prämitotischen Stadium, das strahlenempfindlicher ist als das vorlaufende Stadium der DNS-Synthese. Da Zellen in resistenteren Zyklusstadien eher überleben als Zellen in empfindlichen, führt die Bestrahlung ausserdem zu einer Auslese von DNS-Synthesezellen und damit zur Synchronisation der Kultur: Die Zellen befinden sich alle oder grösstenteils in der gleichen Zyklusphase anstatt auf die verschiedenen Phasen zufällig verteilt zu sein. So wird das prämitotische Stadium von vielen Zellen gleichzeitig erreicht, womit die ganze Kultur strahlenempfindlicher wird. Das ist die Erklärung für den zweiten Teil der «Fluktuation».

Auf die experimentellen Beweise für die Richtigkeit des Modells ist hier nicht einzugehen (vgl.<sup>11</sup>). Die Ähnlichkeit des frühen Erholungsverlaufs bei Zellkulturen und Tierkollektiven musste aber zu wichtigen Folgerungen führen. Es ist seither nicht mehr von der Hand zu weisen, dass sich zelluläre Vorgänge in den Reaktionen ganzer Säugetierkollektive abzeichnen, wenn auch vergrößert und vielleicht verzerrt. Vor allem lässt sich die schnelle Erholung vom Strahlenschaden, die im allgemeinen schon nach 4-12 h nachzuweisen ist, einleuchtend durch den ELKINDschen Erholungstyp erklären. Zu dieser frühen Zeit können schon wegen der strahlungsbedingten Teilungsverzögerung noch keine Proliferationsvorgänge in den dezimierten Zellpopulationen eingesetzt haben. Die messbar erhöhte Resistenz der Tiere wird also durch Erholung der geschädigten, aber nicht abgetöteten Zellen zustandekommen. So deuten CORP und MOLE<sup>18</sup> die frühe Erholungsphase bei bestrahlten Mäusen in einem Modell, das die Erholungsvorgänge während der ersten Wochen zusammenfassend beschreibt. KALLMAN<sup>5,7</sup> meint demgegenüber die gesamte Wellenbewegung auf Synchronisierungserscheinungen im Zellzyklus zurückführen zu können. Danach kommt es zunächst zur Auslese von Zellen in resistenten Zyklusstadien, da die Zellen in den strahlenempfindlicheren Stadien häufiger abgetötet werden («passive Synchronisation»). Sodann sammeln sich die über-

<sup>16</sup> U. REINCKE, Z. Naturf., im Druck (1968).

<sup>17</sup> K. AURAND, Fortschr. Röntgenstrahlen, Beiheft zu Bd. 87, 50 (1954).

<sup>18</sup> J. M. CORP und R. H. MOLE, Int. J. Radiat. Biol. 11, 69 (1966).

<sup>19</sup> P. GECK, Biophysik-Kongress, Wien 1964.

<sup>20</sup> S. P. JARMONENKO, Dok. Akad. Nauk SSSR 168, 1411 (1966).

<sup>21</sup> S. A. TYLER und S. P. STEARNER, Radiat. Res. 21, 16, (1964).

lebenden Zellen in der prämitotischen Phase, wobei die zuerst ankommenden auf die später eintreffenden warten («aktive Synchronisation»). Nach Abklingen der Teilungsverzögerung treten alle Zellen zugleich in die Mitose und die folgenden Zyklusphasen ein, so dass die Strahlenempfindlichkeit der Population entsprechend dem gerade durchlaufenen Zyklusstadium schwankt. Bis die Synchronisation sich zurückgebildet hat und die Zellen wieder zufällig auf die verschiedenen Phasen verteilt sind, kann eine Reihe von Fluktuationen ablaufen. Diese spiegeln sich nach KALLMAN in periodischen Schwankungen der Strahlenempfindlichkeit von vorbestrahlten Mäusen.

Beide Modelle gehen davon aus, dass der Strahlentod beim Säugetier nach Dosen im LD50(30)-Bereich durch die Dezimierung einer einzigen Zellpopulation, nämlich der Knochenmarkstammzellen, zustande kommt und dass das Geschehen in dieser Population die Erholung der Tiere bestimmt. An bestrahlten Knochenmarkstammzellen der Maus konnte der fluktuierende Erholungsverlauf des ELKINDschen Typs auch nachgewiesen werden<sup>22</sup>, wobei das frühe Erholungsmaximum nach 5–6 h und das darauffolgende Minimum nach 11–12 h eintrat. Die Erkenntnis, dass Vorgänge in einer einzigen lebenswichtigen Zellpopulation durch die Erholungskurven ganzer Tierkollektive widergespiegelt und dargestellt werden können, ist ein neues und wichtiges Ergebnis der Untersuchungen auf diesem Gebiet seit 1960. Diskussionen, ob die Erholung der Zellen vom subletalen Schaden oder ob ihre Synchronisation im Zellzyklus für den frühen Resistenzanstieg

bestrahlter Tiere verantwortlich sind, konnten erst auf dem gemeinsamen Boden dieser Anschauung entstehen. Man wird strahlenbiologische Untersuchungen an Säugetieren deshalb künftig nicht ohne Berücksichtigung des zellulären Aspekts durchführen können<sup>23</sup>.

**Summary.** A split dose experiment was performed in 12-, 24- or 32-day-old Wistar rats. About 4000 animals were used. The first dose given was 200 R whole-body X-irradiation in the 2 younger groups, and 260 R in the oldest group. At intervals from 6–48 h after the first, a second irradiation was given in order to estimate the LD50(30). No recovery was seen in terms of the LD50(30) differences between preirradiated and normal animals 6 h after the first dose. At the 12 h interval marked recovery was found in all 3 age groups, but less recovery was apparent at the later intervals.

URSULA REINCKE und J. MELLMANN

*Klinisches Strahleninstitut der Universität,  
78 Freiburg im Breisgau (Deutschland),  
21. Dezember 1967.*

<sup>22</sup> J. B. TILL und E. A. McCULLOCH, *Radiat. Res.* 18, 96 (1963).

<sup>23</sup> Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

## PRO EXPERIMENTIS

### Resolution of DL-Amino Acids by Preferential Crystallization Procedure, I. Preparation of Optically Active Alanines

Although a number of optical resolutions of DL-amino acids have been reported, most of them have employed chemical or enzymatic procedures, and reports of optical resolution by physicochemical procedure have appeared less often.

If successfully applied, physicochemical resolution, especially the resolution by preferential crystallization, is considered to be one of the most advantageous procedures for the practical production of optically active amino acids<sup>1</sup>. However, satisfactory application of this type of simple procedure has been limited for several amino acids such as histidine<sup>2</sup>, threonine<sup>3</sup> and glutamic acid<sup>4</sup>, and it is also conceivable that there have been many failures, in spite of all efforts to apply this method to amino acids generally. So far as alanine is concerned, no report has appeared on the successful total optical resolution by preferential crystallization procedure. This communication describes a direct optical resolution of DL-alanine which has been carried out as a first approach to establish the general method for the optical resolution of amino acids.

DL-Alanine itself was proved to be unsuitable for direct resolution due to its properties of forming the racemic compound and also its solubility. Therefore, DL-alanine was converted to readily obtainable salts and derivatives, and the properties of these compounds were investigated. As a result, possibility of direct resolution was indicated in the case of alanine benzene sulphonate. Namely, the

solubility of optically active alanine benzene sulphonate was much less than that of DL-modification, although its IR-spectra indicated the formation of racemic compound.

Thus conditions required for optical resolution of DL-alanine benzene sulphonate were studied in detail. As a result, pure optical isomers could be obtained from a supersaturated solution containing excess of desired antipode by seeding the solution with the crystals of the respective antipode and by filtering the precipitated crystals when the amount of the separated crystals attained was approximately twice that of the antipode initially in excess.

Alanine benzene sulphonate was prepared by dissolving DL-, D- or L-alanine in an aqueous solution of benzene sulphonic acid.

Typical resolution procedures are as follows: DL-alanine benzene sulphonate, 52.0 g, and D-alanine benzene sulphonate, 1.30 g, were dissolved in 200 ml of 97% aqueous acetone at elevated temperature and cooled slowly to 25°. The solution was seeded with 0.20 g of finely pulverized D-alanine benzene sulphonate and allowed to stand

<sup>1</sup> R. M. SECOR, *Chem. Rev.* 63, 297 (1963).

<sup>2</sup> R. DUSCHINSKY, *Chemy Ind.* 53, 10 (1934).

<sup>3</sup> L. VELLUZ and G. AMIARD, *Bull. Soc. chim. Fr.* 20, 903 (1953).

<sup>4</sup> T. AKASHI, *J. chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sec.* 83, 417 (1962).