

which the *Xenopus laevis* 'lymphoid tumour' agent could be fitted.

In addition, our attempts to demonstrate the presence of 'viral particles' in tumour cells by electron microscopy⁹ and the search for a 'viral agent' in the extracts prepared from the affected tissues and submitted to different methods of fractionation (unpublished data) have so far been unsuccessful.

The results mentioned above are not in complete agreement with the observations on this tumour agent made by BALLS and RUBEN¹⁰. While our unsuccessful search for viral particles does not suggest a viral origin of this tumour, BALLS and RUBEN^{10,11} have advanced a possible viral etiology mostly based on their experiments with ultracentrifugation and filtrations. More experiments ought to clarify the nature of the agent and the etiology of the 'lymphoid tumour' of *Xenopus laevis*.

Résumé. L'infectivité des extraits tissulaires de la «tumeur lymphoïde» de *Xenopus laevis* diminue après traitement à l'éther, au chloroforme, et à la température de 56 °C, tandis qu'elle reste inchangée après traitement au pH acide. Ces caractéristiques ne permettent pas de placer l'agent tumoral parmi les virus des animaux connus à l'heure actuelle.

I. HADJI-AZIMI¹²

Station de Zoologie expérimentale, Université de Genève, CH-1224 Genève (Switzerland), 30 January 1970.

¹⁰ M. BALLS and L. N. RUBEN, Cancer Res. 27, 654 (1967).

¹¹ M. BALLS and L. N. RUBEN, Prog. exp. Tumor Res. 10, 238 (1968).

¹² I wish to thank Professor M. FISCHBERG for his interest in this work and the facilities he provided.

Änderung der Wachstumskinetik von Ehrlich-Aszitestumoren verschiedener Ploidie nach Röntgen-Bestrahlung

Der diploide (EAT_{dipl.}) beziehungsweise hyperdiploide (ELD) und der hypertetraploide (ELT) Ehrlich-Aszitestumoren zeigen ein unterschiedliches Wachstumsverhalten^{1,2}. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass sich der Generationszyklus des EAT_{dipl.} und ELT nach Gabe von Cyclophosphamid (100 mg/kg) in verschiedenem Masse verändert³. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob bei diesen verschieden-ploiden Tumorzellstämmen auch Unterschiede in der Beeinflussung des Generationszyklus und seiner Teilphasen nach Röntgen-Bestrahlung nachweisbar sind.

Untersuchungsgut und Methodik. Männlichen NMRI-Mäusen (Institut für Versuchstierzucht Hannover; 23–25 g; Brovo-Versuchstierfutter) wurden ca. 18×10^6 Zellen des EAT_{dipl.} beziehungsweise ELT i.p. inokuliert. Am 5. Tag nach Inokulation wurde eine Röntgen-Bestrahlung der Tumormäuse durchgeführt (500 R, 110 R/min, 200 kV, 10 mA, 0,5 mm Cu; Röhreneigenfilterung 0,1 mm Cu; 3 cm Glastubus, FHA 25 cm; rein abdominales Bestrahlungsfeld, Siemens Stabilipyan). 24 h nach Röntgen-Bestrahlung (Rö) wurde die Häufigkeit der absterbenden beziehungsweise nekrotischen Zellen (Nekroseindex) durch Lissamin-Green-Färbung nach HOLMBERG⁴ ermittelt. Der Generationszyklus der EAT_{dipl.} beziehungsweise ELT-Zellen wurde durch das Doppelmarkierungsverfahren^{5,6} (DMV) und nach der %-markierte-Mitosen-Methode⁷ (%-MM-Methode) analysiert (Näheres zur Methodik siehe bei²).

%-MM-Methode. 62 EAT_{dipl.}-Mäuse und 60 ELT-Mäuse erhielten am 5. Tag nach Inokulation und 1 h nach Rö einmalig Thymidin-Methyl-³H i.p. (50 µCi; 2,0 Ci/mmol, NEN Corp. USA). Tötung der Tiere in gestaffelten Zeitintervallen (2–44 h) nach ³H-TdR-Injektion. Bestimmung des Prozentsatzes der markierten Mitosen auf von Aszitesausstrichen hergestellten Autoradiogrammen (ARG) mit K2-Emulsion (Ilford, London; Exposition 8 Tage).

Doppelmarkierungsverfahren. 7 mit EAT_{dipl.} und 11 mit ELT beimpfte Mäuse erhielten am 5. Tag nach Inokulation und 4 h nach Rö eine erste i.p.-Injektion von Thymidin-2-¹⁴C (10 µCi; 30 mCi/mmol, NEN Corp. USA) und 1 h später eine zweite i.p.-Injektion von Thymidin-Methyl-³H (100 µCi; 2,0 Ci/mmol). Auf den von

Aszitesausstrichen hergestellten ARG (G5-Emulsion, Ilford, London; Exposition 2–5 Tage) wurde das Verhältnis aller ¹⁴C-markierten Kerne (mit und ohne ³H) zu den rein ³H-markierten Kernen und der ³H-Markierungsindex (³H-I) bestimmt. Aus dem Häufigkeitsverhältnis der unterschiedlich markierten Kerne (= v) und dem ³H-I wurden die DNS-Synthesezeit (T_s) und die Generationszeit (T_c) berechnet, nachdem G₂ + M (= prämitotische Ruhephase + Mitosedauer) durch die %-MM-Methode bestimmt worden war (Berechnungsverfahren siehe bei²).

³H-TdR-Dauermarkierung. An je 4 mit EAT_{dipl.} beziehungsweise ELT beimpften Mäusen (5. Tag nach Inokulation, 2 h nach Rö) wurden Dauermarkierungsversuche mit wiederholter Gabe von ³H-TdR (i.p.-Injektion von je 40 µCi pro Maus; 2,0 Ci/mmol) durchgeführt. Die einzelnen Injektionen erfolgten im Zeitabstand von 8 h über eine Versuchsdauer von 32 h. Bestimmung des Prozentsatzes der markierten Tumorzellen auf K2-ARG.

Tumorzellzählung. 72 h nach Rö wurde für den EAT_{dipl.} und den ELT die Gesamtzellzahl des Tumoraszites bestimmt und mit den Werten für den unbestrahlten Tumor verglichen.

Ergebnisse. Tabelle 1, b, enthält die wesentlichen Ergebnisse. Es fand sich 24 h nach Rö für die EAT_{dipl.}-Zellen ein Nekroseindex (LG-Index) von 12%, für die ELT-Zellen von 35%. Der Generationszyklus der beiden Tumorzellstämme zeigte unterschiedliche Veränderungen: Beim EAT_{dipl.} war die DNS-Synthesezeit T_s nach Rö

¹ T. S. HAUSCHKA, S. T. GRINNEL, L. RÉVÉSZ und G. KLEIN, J. natn. Cancer Inst. 19, 13 (1957).

² K. J. LENNARTZ, W. MAURER und M. EDER, Z. Krebsforsch. 71, 267 (1968).

³ K. J. LENNARTZ, K. D. SIEMONEIT, K. U. BAHNTJE und M. EDER, Z. Krebsforsch. 73, 110 (1969).

⁴ B. HOLMBERG, Expl. Cell Res. 22, 406 (1961).

⁵ W. HILSCHER und W. MAURER, Naturwissenschaften 49, 352 (1962).

⁶ D. E. WIMBER und H. QUASTLER, Expl. Cell Res. 30, 8 (1963).

⁷ H. QUASTLER und F. G. SHERMAN, Expl. Cell Res. 17, 420 (1959).

Tabelle Ia

Tumorstamm		LG-I %	M-I %	³ H-I %	T _s (h)		T _c (h)	G2 _{min}	(G2 + M) _m (h)	(G2 + M) _{max}
					DMV	%-MM				
EAT _{dip.} (5. Tag)	Rö	12 (24 h p. rad.)	0,9 (6 h p. rad.)	44,3 (6 h p. rad.)	22,4 (v = 19,1)	22	47,7	2	10	18
	K	4	2,8	36	9 ^a	11 ^a	24 ^a	1 ^a	4 ^a	7 ^a
ELT (5. Tag)	Rö	35 (24 h p. rad.)	0 (6 h p. rad.)	50,6 (6 h p. rad.)	24,6 (v = 20,7)	23	49,9	8	15	22
	K	11	1,3	44,4	19,5 ^a	21 ^a	42 ^a	2 ^a	7 ^a	12 ^a

Zeichenerklärung: EAT_{dip.}, diploider Ehrlich-Aszitestumor; ELT, hypertetraploider Ehrlich-Aszitestumor; Rö, Röntgenbestrahlung (500 R); p. rad., nach Bestrahlung; K, unbestrahlter Kontrolltumor; LG-I, Lissamin-Green-Index (= Nekroseindex); M-I, Mitoseindex; ³H-I, ³H-Markierungsindex; DMV, Doppelmarkierungsverfahren; v, Verhältnis aller ¹⁴C-Kerne zu rein ³H-Kernen; %-MM, %-markierte-Mitosen-Methode; T_s, DNS-Synthesezeit; T_c, Generationszeit; G2_{min}, minimale Zeitdauer der prämitotischen G2-Phase; (G2 + M)_m, mittlere Zeitdauer für (G2-Phase und Mitose); (G2 + M)_{max}, maximale Zeitdauer für (G2-Phase und Mitose). ^a Nach LENNARTZ, MAURER und EDER².

Tabelle Ib. Tumorzellzahl (× 10⁶)

Tumorstamm		5. Tag	7. Tag
EAT _{dip.}	Rö	268 ± 19,0	430 ± 55,5
	K		538 ± 99,5
ELT	Rö	258 ± 25,0	282 ± 14,1
	K		400 ± 34,1

auf etwa das Doppelte verlängert (von 9 auf 22,4 h nach dem DMV, von 11 auf 22 h nach der %-MM-Methode). Für den ELT wurde dagegen nur eine geringe Verlängerung von T_s gemessen (von 19,5 auf 24,6 h nach dem DMV, von 21 auf 23 h nach der %-MM-Methode).

Der ELT zeigte nach Rö eine deutliche Verlängerung der minimalen Dauer der prämitotischen G2-Phase (G2_{min}) von 2 auf 8 h. Diesem verübergehenden Block in G2/Mitose entspricht der 6 h nach Rö für den ELT ermittelte Mitoseindex (M-I) von 0%. Beim EAT_{dip.} war der Block in G2/Mitose nicht so ausgeprägt. Die maximale Dauer für das Zeitintervall G2-Phase und Mitose (G2 + M)_{max} war nach Rö beim EAT_{dip.} von 7 auf 18 h, beim ELT von 12 auf 22 h verlängert. Dies entspricht einer stark verminderten Einwanderung von Tumorzellen in die Mitose. Die Generationszeit T_c verlängerte sich nach Rö beim EAT_{dip.} um etwa den Faktor 2 (von 24 auf 47,7 h), wohingegen die des ELT keine so deutliche Veränderung zeigte (49,9 h nach Rö gegenüber 42 h beim unbestrahlten ELT).

Nach Dauermarkierung mit ³H-TdR waren nach Rö beim EAT_{dip.} und ELT nach einer Versuchsdauer von 32 h ca. 95% der Tumorzellen markiert. Das besagt, dass auch nach Rö während der Versuchszeit annähernd alle Tumorzellen in DNS-Synthese waren beziehungsweise eingetreten sind.

Die Versuchsergebnisse zeigen insgesamt, dass die durch Rö verursachte, durch Tumorzellzählung quantitativ bestimmte Wachstumshemmung (vgl. Tabelle b) beim EAT_{dip.} entsprechend dem relativ niedrigen Nekroseindex (LG-Index) im wesentlichen durch Generationszeit-Verlängerung der Tumorzellen bedingt ist (Tabelle Ia). Auch von anderen Autoren⁸⁻¹⁰ wird über eine Verlänge-

rung des Generationszyklus nach Rö berichtet. Beim ELT dagegen ist die Depression der Wachstumsrate in erster Linie offenbar die Folge einer rasch nach Rö eintretenden Tumorzellnekrose, wobei der Generationszyklus der – noch vitalen – Tumorzellen sich nur wenig verändert (Tabelle Ia). Hierdurch wird gezeigt, dass sich die untersuchten verschieden-ploiden Tumorstämme, die auch unbehandelt eine unterschiedliche Proliferationskinetik aufweisen², in ihrer Reaktion auf Rö unterschiedlich verhalten. Ähnliche Ergebnisse fanden sich für diese beiden Tumorstämme nach Applikation von Cyclophosphamid (100 mg/kg)³. Die nach Rö festgestellten Unterschiede in der Wachstumskinetik der noch vitalen Tumorzellen können für eine nachfolgende zusätzliche radiologische oder auch cytostatische Tumorbehandlung und deren Erfolg von Bedeutung sein¹¹.

Summary. The effect of irradiation (500 R) on the cell cycle of the diploid (EAT_{dip.}) and the hypertetraploid (ELT) Ehrlich ascites tumor growing in the peritoneal cavity of male NMRI mice has been studied autoradiographically by the double labelling technique (³H- and ¹⁴C-thymidine) and the method of labelled mitoses. The results suggest that the proliferation kinetics of tumor cells after irradiation depends on the type of tumor cell strain tested. Identical results were obtained after application of the alkylating agent cyclophosphamide (100 mg/kg).

K. J. LENNARTZ, D. ADLER,
U. BLANKENSTEIN, M. EDER
und G. FRIEDMANN

Pathologisches Institut,
Radiologisches Institut und Poliklinik der Universität Köln,
D-5 Köln-Lindenthal (Deutschland), 24. Februar 1970.

⁸ O. S. FRANKFURT und L. P. LIPCHINA, Dokl. Akad. Nauk. SSSR 154, 207 (1964).

⁹ J. H. KIM und T. C. EVANS, Radiat. Res. 27, 129 (1964).

¹⁰ C. B. LOZZIO, Int. J. Radiat. Biol. 14, 133 (1968).

¹¹ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Herrn Prof. Dr. L. RÉVÉSZ (Karolinska Institut Stockholm) danken wir für die Überlassung des ELT.