

SEJTTULÉLÉS ÉS FÁZISÉRZÉKENYSÉG VIZSGÁLATOK CITOTOXIKUS CUKORALKOHOL SZÁRMAZÉKOKKAL KEZELT SEJT TENYÉSZETEKEN*

PÁLYI ISTVÁN

Onkopathológiai Kutató Intézet, Budapest

A cukoralkoholok, köztük a hexitolok különböző származékai jelentős sejtkárosító, citotoxikus, illetve citosztatikus hatással rendelkeznek [12, 13, 15]. E származékok közül több vegyületet (Degranol, Myelobromol, Dibromdulcit stb.) a daganatos betegségek gyógyszeres terápiájában is felhasználnak [20]. A gyakorlati alkalmazással párhuzamosan tovább folytatódnak azok a vizsgálatok, amelyek e gyógyszerek sejtbológiai hatását, intracelluláris támadáspontját, hatásmechanizmusát igyekeznek felderíteni. Az összehasonlító vizsgálatokhoz szükséges először az egymásnak megfelelő, ún. ekvitoxikus dózist meghatározni. A PUCK és MARCUS [19] által kidolgozott módszerrel (telepképző képesség, colony forming ability) kvantitatív módon mérhető: *a*) az egyes szerek különböző dózisainak sejtkárosító hatása, *b*) a vegyületek stabilitása oldatban, *c*) van-e a daganatsejt életciklusának fokozottabban érzékeny fázisa a szerrel szemben.

Ma már a legtöbb hatásos citosztatikumról tudjuk, van-e „fázis-specifikus” hatása [1, 7]. Az alább ismertetendő vizsgálatainkban 2—2 sztereoizomer citosztatikum, a Myelobromol (Dibrommannit, DBM) és Dibromdulcit (DBD), illetve a Dianhidromannit (DAM) és Dianhidrodulcit (DAD) különböző dózisainak a sejttulélésre gyakorolt hatását hasonlítottuk össze. Tanulmányoztuk a DBD és DAD stabilitását a feloldás után. Továbbá megvizsgáltuk, hogy a sejt életciklusának egyes fázisai egyformán érzékenyek-e a DAD hatásával szemben.

Anyag és módszer

A vizsgálatokat HeLa sejteken végeztük. A tenyésztési módszer azonos volt azzal, amit előzőleg NIAS [11] írt le. A Paterson Laboratoriumban (Manchester) klónozott törzs sejteit 100 ml-es orvosságos üvegekben tenyésztettük. Átoltáskor, heti két alkalommal 1×10^5 sejtet vittünk át 10 ml tápfolyadékba.

* E munka a Nemzetközi Rákellenes Unió (U.I.C.C.) által adományozott, Eleanor Roosevelt International Cancer Fellowship (American Cancer Society) keretében, a Paterson Laboratories, Christie Hospital and Holt Radium Institute-ban (Manchester) készült.

A tápfolyadék összetétele: Dulbecco által módosított Eagle tápfolyadék, 10% emberi kevert vérsavóval kiegészítve. Ilyen körülmények között a sejtek logaritmusos fázisban nőttek.

A vegyületeket jéghideg fiziológiás NaCl-oldatban oldottuk fel és $0,22 \mu$ pórusnagyságú Millipore membránszűrővel sterilizáltuk. A DBD-t először dimetilacetamidban oldottuk, majd fiz. sóoldattal hígítottuk. Hosszantartó, többszöri kezelés esetén az oldatot szétampulláztuk és -20°C -on tároltuk.

A túlélési görbéket PUCK és MARCUS [19] módszerével határoztuk meg: 1000—1000 sejtet vittünk be 1—1 tenyésztő edénybe. A vizsgált anyagot 0,05—0,2 ml-nyi oldatban adtuk a 10 ml tápfolyadékhoz. A kontroll tenyészetekhez fiz. sóoldatot adtunk. 10 nap múlva minden ép sejtől 1—1 telep, kolónia nőtt ki. A kezelést túlélő sejtek arányának megállapítása céljából a kontroll minták túlélését 100%-nak tekintettük. Minden vizsgálathoz 3—3 paralelt használtunk és minden vizsgálatot megismételtünk.

A DBD és DAD bomlását úgy vizsgáltuk, hogy feloldás után időközönként (5, 10, 20, 30, 45 perc, 1, 2, 3 . . . óra) mintákat vettünk és azokkal kezeltük a tenyészeteket. A toxicitás csökkenését a túlélő sejtek arányának állandó növekedése jelezte.

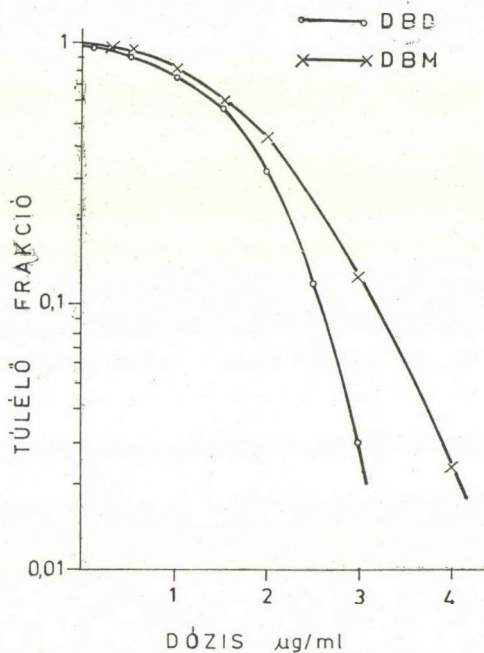
A fázisérzékenység megállapításához a sejteket TERASIMA és TOLMACH [21] mitózis-szelekciós módszerével szinkronizáltuk. A szinkronia fokát úgy ellenőriztük, hogy meghatároztuk: *a*) a mitózis indexet rögtön a mitotikus sejtek összegyűjtése után, *b*) az átlagos sejt-kettőződést (average cellular multiplicity) óránként, és a jelölődési indexet ^3H -timidinnel óránként. A sejt-kettőződést úgy ellenőriztük, hogy a szinkronizált populációból Falcon tenyésztő edényekbe vitt mintákban óránként megszámloltuk az egyedi és páros sejteket. A kísérleti flaskákban levő szinkron sejteket a szinkronizálás után 2 óránként kezeltük $25 \mu\text{g/ml}$ DAD-dal 15 percig. Ez a dózis nem-szinkron tenyészetekben 10% túlélést eredményezett. Külön módszert dolgoztunk ki az M és G_2 fázis érzékenységének tanulmányozására: az aszinkron, egyrétegű tenyészeteket 15 percig kezeltük $25 \mu\text{g/ml}$ DAD-dal, majd a mitózisban levő sejteket a kezelés után azonnal (M fázis), illetve 1, 3 és 5 óra múlva (G_2 fázis) leráztuk, és centrifugálással összegyűjtve túlélési vizsgálatra állítottuk be.

„Jelölt mitózis” módszerrel határoztuk meg, hogyan befolyásolja a DAD a sejtek tovahaladását a sejtcikluson keresztül. A Leighton csövekbe, fedőlemezre ülepített sejteket másnap $2 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -timidinnel (spec. akt.: 5 Ci/mM ; Radiochemical Centre, Amersham, England) 15 percig jeleztük, majd alapos öblítés után $10 \mu\text{g/ml}$ „hideg” timidinnel gátoltuk a további jelölődést. A csövek egyik felét $50 \mu\text{g/ml}$ DAD-dal kezeltük 15 percig. Ezután 2 óránként 1—1 mintát fixáltunk, orceinnel festettük, Ilford L4 emulzióval lefedtük és 9 napig exponáltuk $+4^\circ\text{C}$ -on. A mintákban meghatároztuk a jelölt és jelöletlen mitózisok arányát. A jelölődési indexet hasonló módszerrel, a jelölt interfázis sejtek arányának megállapításával vizsgáltuk.

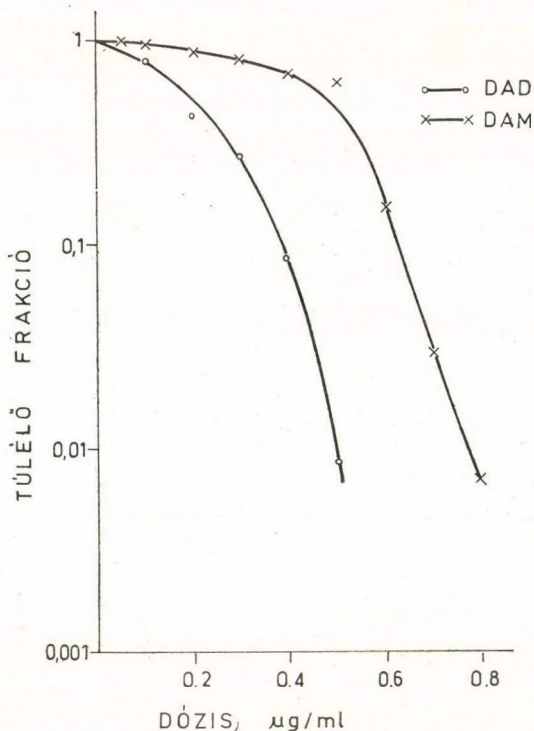
Eredmények

A DBM s DBD az aszinkron HeLa sejtek túlélését 3–4 $\mu\text{g/ml}$ dózisban 3%-ra csökkentette, „folyamatos” kezelés esetén (1. ábra). A két vegyület közötti toxicitáskülönbség a dózis emelésével egyre szembetűnőbbé vált. A DBD fokozottabb károsító hatását az oldószer ilyen nagy hígításban (1 : 13 000) nem befolyásolta. Az alacsonyabb dózistartományban mindegyik vegyülettel nyert görbe alakja vállhoz (shoulder) hasonlít, mielőtt az exponenciális szakasz következne. A sejtek túlélése a dianhidro-származékoknál 1 $\mu\text{g/ml}$ alatt 1% alá csökkent. A két-két sztereoiszomer közül a dulcitol-módosulatok toxikusabbak, mint a mannitol-származékok (2. ábra).

A DBD és DAD bomlásának vizsgálatánál a dózist úgy választottuk ki, hogy a friss oldat nagyfokú sejtpusztulást idézzon elő. Ezután az oldatot állni hagytuk. A DBD 3 $\mu\text{g/ml}$ dózisa a feloldás után csaknem az összes sejtet elpusztította, folyamatos kezelés esetén. 4 és 10 óra között a toxicitás jelentősen csökkent, de a 48 és 72 órás oldat hatására a túlélés még mindig csak 60–70%-ot ért el (3. ábra). A DAD toxicitása egyenletesen csökkent és 72 óra alatt hatástalanná vált. Fiziológiás NaCl-oldatban való oldás, valamint a hőmérséklet csökkentése a szer bomlását lassította (4. ábra). Egy másik kísérleti szériában



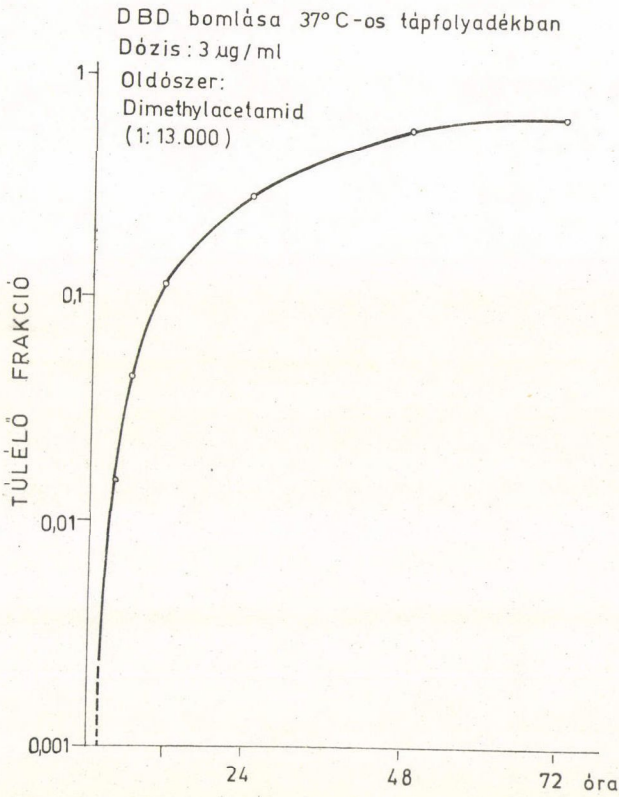
1. ábra. HeLa sejtek túlélési görbéi Dibrommannit (DBM) és Dibromdulcitol (DBD) különböző dózisaival történő kezelés után



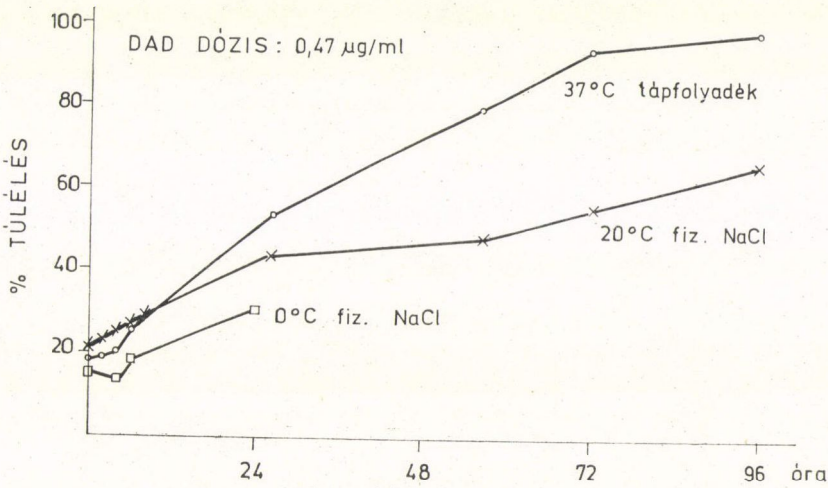
2. ábra. HeLa sejtek túlélési görbéi Dianhidromannit (DAM) és Dianhidrodulcit (DAD) különböző dózisaival történő kezelés után

a bomlási görbe lépcsőzetes volt (5. ábra), amelyből a bomlás kinetikájára, a keletkező intermedierek változó toxicitására lehet következtetni.

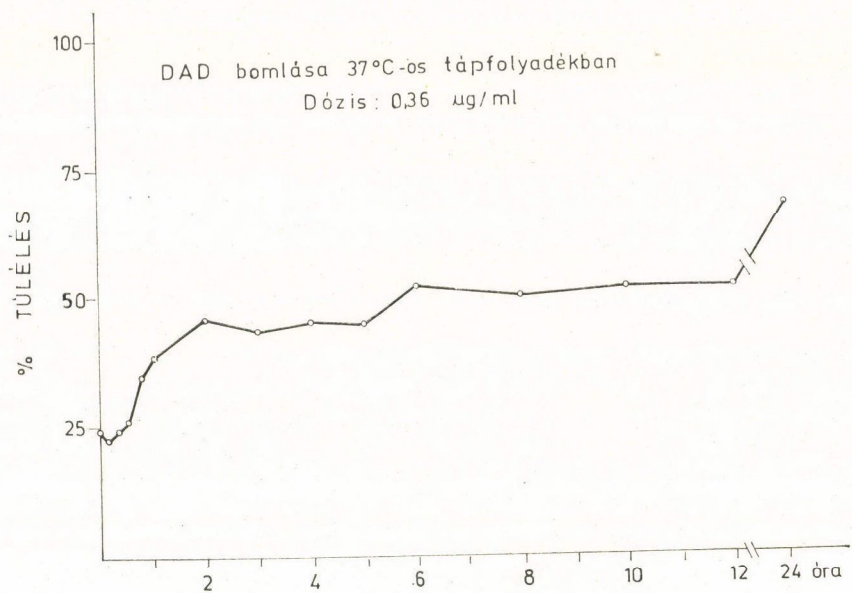
A fázis-érzékenységre vonatkozó vizsgálatok előtt megállapítottuk, hogy a nem-szinkron kontroll HeLa sejtek telepképző képessége 70–80%. Ugyannyi volt a szinkronizált sejteké is. A szinkronizált sejtekkel történő vizsgálatokhoz rövid, 15 perces kezelési időt választottunk, hogy az eredeti, bomlatlan molekula hatását követhessük. Ilyen rövid kezelés esetén a sejtpusztulás 10–30 µg/ml között következett be (6. ábra). 25 µg/ml DAD hatására a túlélés 10%-ra csökkent. Közvetlenül a szinkronizálás után a mitózis index 84% volt. Az átlagos sejtkeletkezés az első 18 óra folyamán állandó szinten maradt, átlagosan 1,8 sejtet tartalmazott minden telep. Ez annyit jelent, hogy a „telepek” 80%-a tartalmazott két leánysejtet, amelyek a mitotikus sejtekből származtak (7. ábra). A jelölődési indexek azt mutatták, hogy az első 8 óra folyamán igen alacsony százalékban fordultak elő S fázisban levő sejtek. A jelölődési index alapján megállapítható, hogy a G₁ fázis átlagos időtartama 10 óra, az S fázisé 11 óra (7. ábra). Az átlagos sejtciklus időből (24–25 óra) kivonva az M + G₁ + S időtartamát, megkapjuk a G₂ fázis hosszát (4–5 óra).



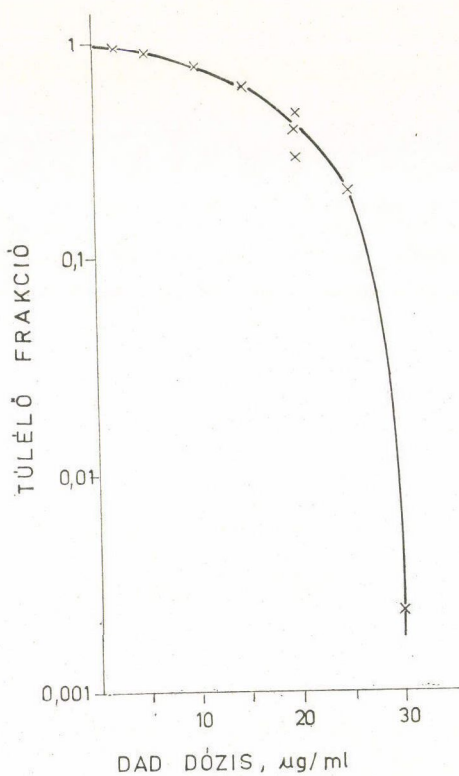
3. ábra. DBD sejtkárosító hatásának csökkenése a feloldás után különböző időpontokban vett mintákban



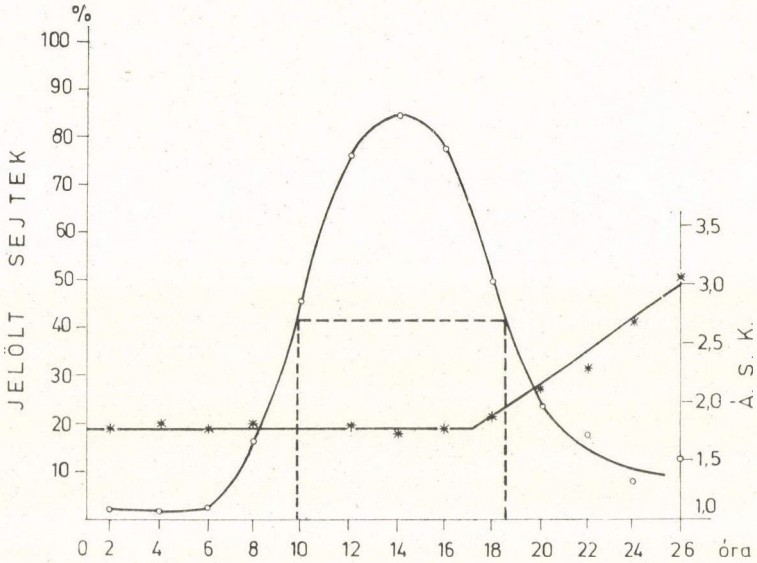
4. ábra. DAD sejtkárosító hatásának csökkenése a feloldás után, különböző kísérleti körülmények között



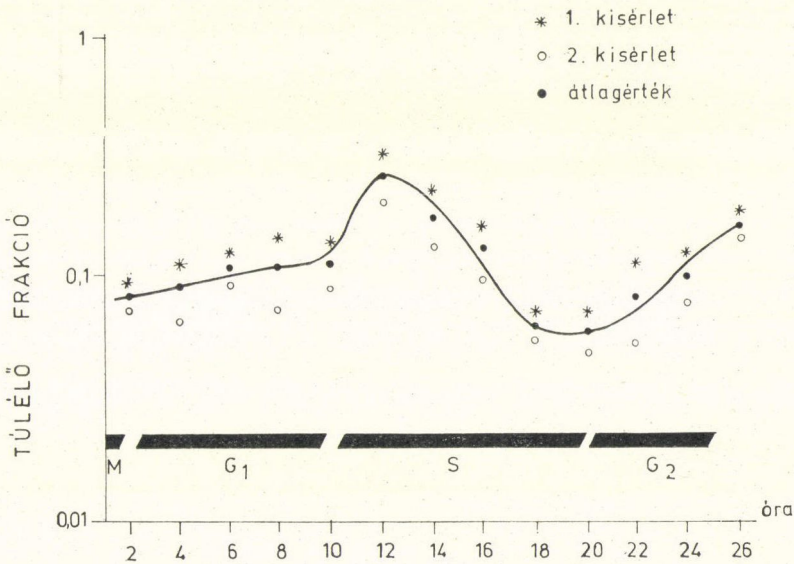
5. ábra. DAD sejtkárosító hatásának csökkenése a feloldás utáni korai időpontokban



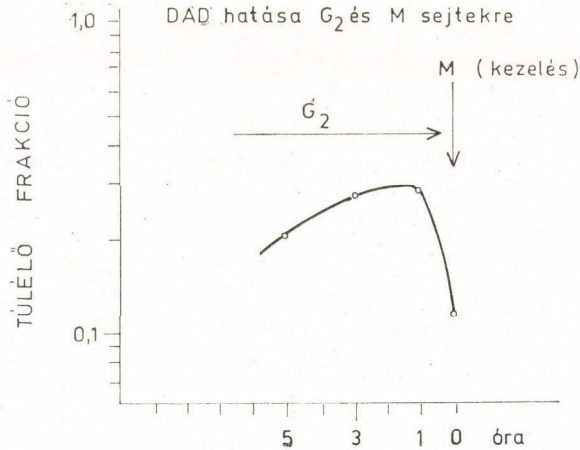
6. ábra. HeLa sejtek túlélési görbéje DAD-dal történő rövid, 15 perces kezelés után



7. ábra. Szinkronizált HeLa sejtek jelölődési indexe (—○—○—) és átlagos sejtkettőződése (Á.S.K., —*—*) a szinkronizálás után különböző időpontokban vett mintákban



8. ábra. Szinkronizált HeLa sejtek túlélése DAD-kezelés után. A kezelés az abszcisszán feltüntetett időpontokban, 25 $\mu\text{g/ml}$ dózissal, 15 percig történt. A görbe két külön kísérlet átlagos eredményét reprezentálja



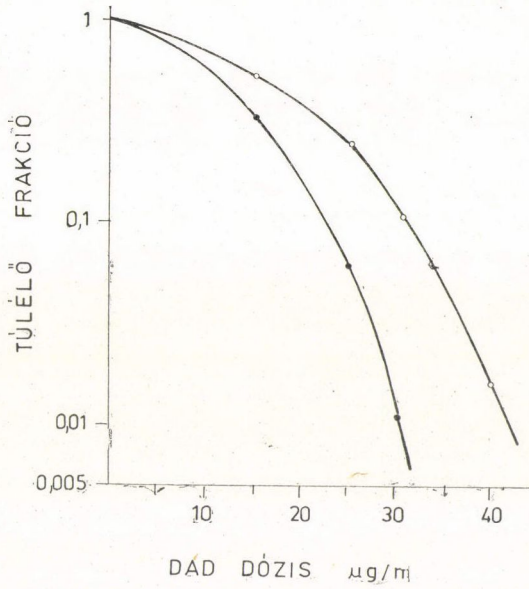
9. ábra. M és G₂ fázisban kezelt HeLa sejtek túlélési görbéje. Kezelés módja: 25 µg/ml DAD, 15 perc

Erre a közvetett meghatározásra azért van szükség, mert a kiülepített szinkron populáció a szinkronizálás után 20–22 órával kezdi elveszíteni szinkroniáját.

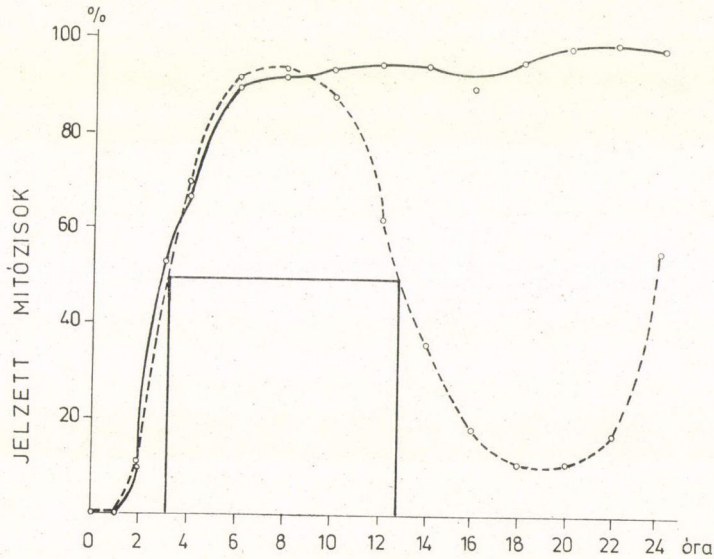
A DAD-dal végzett fázis-érzékenység vizsgálatból megállapítható, hogy a G₁ fázis folyamán a túlélési szint nem változott jelentősen. Az S fázis korai szakaszának megfelelő 12. órában a sejtek rezisztenciája hirtelen megnőtt, majd ezt követően fokozatosan csökkent 20. óráig, amely időpont az S—G₂ átmenetnek felel meg. Ezután a görbe emelkedése a sejtrezisztencia lassú növekedését jelezte a G₂ fázis folyamán (8. ábra). A G₂ és M fázis érzékenységét külön kísérletben tanulmányozva megállapíthattuk, hogy a mitotikus sejtek sokkal érzékenyebbek a DAD iránt, mint a késői G₂ sejtek. A G₂ fázis korábbi időpontjaiban a sejtek rezisztenciája csökkent (9. ábra).

A G₁ fázis középső szakasza és az S fázis korai periódusa között mutatkozó érzékenységbeli különbséget külön kísérletben is megerősítettük. Szinkronizált sejteket a szinkronizálás után 5 és 12 órával különböző DAD-koncentrációkkal kezeltünk. A két időpontban felvett görbék lefutása egyértelműen bizonyította a két fázis között fennálló érzékenységbeli különbséget (10. ábra).

A sejteknek az M fázisba történő haladását vizsgálva megállapíthattuk, hogy a jelzett mitózisok arányának emelkedése az első 8 óra folyamán azonos volt a kontroll és DAD-kezelt tenyészetekben. Ez arra utalt, hogy a G₂ és az S fázis kései szakaszában levő sejtek normális ütemben haladtak az M fázisba. A DNS szintézis korábbi szakaszaiban levő sejtek haladása kezelés hatására jelentősen lelassult. A kezeléskor G₁ fázisban tartózkodó sejtek nem jutottak el az M fázisig a 24 órás kísérlet folyamán, amint azt a 10. és 24. óra között csaknem 100%-ban jelenlevő jelzett mitózisok bizonyították (11. ábra).



10. ábra. Szinkronizált HeLa sejtek túlélése DAD-kezelés után. —●— = 5 órával a szinkronizálás után, —○— = 12 órával a szinkronizálás után



11. ábra. Jelzett mitózis görbe kezeletlen (---○---) és 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAD-dal kezelt (—○—) aszinkron HeLa tenyészetekben

Megbeszélés

A sztereoiszomerek összehasonlító vizsgálatából kitűnt, hogy mind a Br-szubsztituált derivátumok, mind a dianhidro-származékok esetében a dulcitol-konfiguráció rendelkezik magasabb toxicitással. A dianhidro-származékok körülbelül egy nagyságrenddel toxikusabbak a Br-derivátumoknál. A két dianhidro-származék között állatkísérletekben is csak kvantitatív különbség mutatkozott: a DAD-ból felényi dózis volt szükséges ugyanakkora daganatgátló hatás eléréséhez, mint a DAM-ból (INSTITÓRIS és mtsai 4). A Br-származékok viszont a tumorspektrumra való hatásukban is eltértek egymástól (KELLNER és mtsai 5).

A DBD és DAD kémiai felezési idejét a több lépésben történő lebomlás miatt nem lehetett meghatározni. A bomlási görbe lépcsőzetes alakja valószínűvé tette toxikus közti-termékek képződését. Így egy adott időpontban valószínűleg több komponens együttes hatásának eredményét figyelhettük meg. Eltérőnek mutatkozik a DAD és DBD bomlási végterméke, mivel a DAD 72 órás állás után hatástalanná vált, míg a DBD-oldat még jelentős sejt-károsító hatással rendelkezett.

A túlélési vizsgálatok igazolták azokat a citomorfológiai megfigyeléseket, melyek szerint az eddig tanulmányozott cukoralkohol-származékok közül a DAD a legtoxikusabb [5, 10, 12]. A túlélési görbén a „shoulder” arra utal, hogy a sejtekben a károsító hatás a dózis emelésével halmozódik, amely végül is a sejt pusztulásához vezet [3]. Az ilyen „sigmoid”-típusú görbék az ionizáló sugárzásokra és a legtöbb alkilező szerre jellemzőek. A „shoulder” jelenléte másrészt egy olyan küszöbdózist is jelenthet, amelynél egy elégtelen drog-mennyiség kerül be a sejtbe, és az érzékeny ponthoz kötődve fejt ki hatását.

A DAD-dal kezelt aszinkron HeLa sejtek túlélési görbéje magasabb dózisonál sem mutat olyan változást, mint a fázis-specifikus szerek, amelyeknél „plateau” alakul ki. A szinkronizált sejtekkel végzett kísérleteink szerint a sejtek változó érzékenységet tanúsítottak életciklusuk különböző fázisaiban. Az M és G₁ fázisok fokozottabb érzékenysége épp úgy jellemző a DAD-ra, mint más alkilező szerekre [1, 7]. Az S fázis korai szakaszának kisebb érzékenysége arra utal, hogy a már beindult DNS szintézis rezisztensebb a droggal szemben, mint a preparatív szakasz. MUELLER [8] szerint az ún. „transcription-controlled” sejtek, mint pl. a HeLa törzs, leginkább korai S fázisban igénylik az RNS szintézisét. Nem zárható ki annak lehetősége, hogy éppen ebben a periódusban folyó RNS szintézis az a metabolikus folyamat, amely a többihez képest jobban ellenáll a szer hatásának. Az S fázis második szakaszára viszont a fokozott érzékenység jellemző, amelybe a későn replikálódó DNS szintézise is beleesik. Aktinomycin D-vel és p-fluorofenilalaninnal végzett vizsgálatokban kimutatták [9], hogy a HeLa sejtek DNS szintézisének utolsó harmada rendkívül érzékeny ezekre az RNS- és fehérje inhibitorokra.

A HeLa sejtek változó érzékenysége az S fázis folyamán egy másik megfigyeléssel is összefüggésbe hozható, amely szerint a DNS szintézis mértéke az S fázis folyamán HeLa sejtekben nem állandó. KOZUKA és MOORE [6] azt találták, hogy az első szakaszt (S_1) lassú, a második szakaszt (S_2) pedig igen gyors ^3H -timidin felvétel jellemzi. Hasonló megfigyelést tett CLEAVER [2] L-sejteken. A korai S fázis csökkentebb DAD-érzékenysége a csökkent intenzitású DNS szintézissel is összefüggésbe hozható. A G_2 fázis kisebb érzékenységet mind a szinkronizált sejtekkel végzett kísérletek, mind a jelzett mitózis kísérlet egyértelműen kimutatták. A G_2 sejtek haladása az M fázisba DAD kezelés hatására sem változott. A G_2 fázis más alkilezőkkel szemben is rezisztensebb, mint a sejtciklus többi fázisa [1, 7].

Más citosztatikus hatású cukoralkohol származékokkal, így a Degranolal és Dibromdulcittal végzett vizsgálataink [14, 16, 17, 18] a sejtciklus időtartamának, elsősorban az S és G_1 fázisok hosszának megnyúlását mutatták ki. A DAD esetében egyetlen fázison belül tapasztaltunk változó érzékenységet. A DNS szintézis fázisának különböző érzékenységgű szakaszokra való felosztása hozzájárulhat a DAD hatásának szubcelluláris szinten történő jobb megismeréséhez.

Összefoglalás

Szerző összehasonlította 4 citosztatikus hatású cukoralkohol származék, a Myelobromol (Dibrommannit, DBM), a Dibromdulcit (DBD), a Dianhidromannit (DAM) és Dianhidrodulcit (DAD) hatását HeLa sejtek túlélésére szövetnyészetben. A dulcit-vázzal rendelkező vegyületek toxikusabbak, mint a megfelelő sztereoizomerjeik, a mannit-származékok. Másrészt, az anhidro-vegyületek körülbelül egy nagyságrenddel toxikusabbak a megfelelő Br-derivátumoknál.

A DBD és DAD bomlását összehasonlítva megállapítható volt, hogy a DAD a tenyésztő folyadékban, 37°C -on 72 óra alatt hatástalanná válik, míg a DBD hasonló körülmények között még jelentős toxicitással rendelkezik. A „bomlási görbe” alakjából toxikus közti termékek képződésére lehetett következtetni.

A HeLa sejtek életciklusának fázisai közül az M, a G_1 és az S fázis késői szakasza, az S— G_2 átmenet fokozottabban érzékeny volt a DAD hatásával szemben, mint a sejtciklus többi szakasza. A DNS szintézis fázisa a DAD hatásával szemben két szakaszra osztható: egy korai, rezisztensebb, és egy kései, érzékenyebb szakaszra. A kísérletből megállapítható, hogy a DAD nem fázis-specifikus alkilező szer, azonban a sejtciklus egyes fázisai változó érzékenységet tanúsítanak a szerrel szemben.

IRODALOM

1. BHUYAN, B. K. and FRASER, T. J.: Cytotoxicity of antitumor agents in a synchronous mammalian cell system. *Cancer Chemother. Rep.* **58**, 149—155 (1974).
2. CLEAVER, J. E.: Thymidine metabolism and cell kinetics. In: *Frontiers of Biology*. Vol. 6. A. Newberger and E. L. Tatum (eds.). North Holland, Amsterdam (1967).
3. ELKIND, M. M. and WHITMORE, G. F.: *The radiobiology of cultured mammalian cells*. Chapter 6. Gordon and Breach, New York (1967).
4. INSTITÓRIS, L., NÉMETH, L., SOMFAI, S., GÁL, F., HERCSEI, I., ZAKA, S. and KELLNER, B.: Investigation into the correlation of cytostatic activity with the *in vitro* diepoxide formation on some terminally substituted hexitols. *Neoplasma* **17**, 15—24 (1970).
5. KELLNER B., NÉMETH L., SUGÁR J., GÁTI E., PÁLYI I., and DÖBRÖSSY L.: Pharmacology of 1,6-dibromo-1,6-dideoxy-dulcitol and its cytostatic effect on transplantable tumours. *Arzneimittel-Forsch.* **17**, 1037—1043 (1967).
6. KOZUKA, S. and MOORE, G. E.: Microcinematographic and autoradiographic study on the pattern of ³H-thymidine uptake in the life cycle of the individual cell of the HeLa strain *in vitro*. *J. nat. Cancer Inst.* **36**, 623—630 (1966).
7. MAURO, F. and MADOC-JONES, H.: Age responses of cultured mammalian cells to cytotoxic drugs. *Cancer Res.* **30**, 1397—1408 (1970).
8. MUELLER, G. C.: Biochemical perspectives of the G₁ and S intervals in the replication cycle of animal cells: a study in the control of cell growth. In: *The Cell Cycle and Cancer*. 269—307. R. Baserga (ed.). M. Dekker, Inc., New York (1971).
9. MUELLER, G. C. and KAJIWARA, K.: Actinomycin D and p-fluorophenylalanine, inhibitors of nuclear replication in HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta* **119**, 557—565 (1966).
10. NÉMETH, L., INSTITÓRIS, L., SOMFAI, S., GÁL, F., PÁLYI, I., SUGÁR, J., CSUKA, O., SZENT-IRMAX, Z., and KELLNER, B.: Pharmacologic and antitumor effects of 1,2 : 5,6-dianhydrogalactitol (NSC-132313). *Cancer Chemother. Rep.* **56**, 593—602 (1972).
11. NIAS, A. H. W.: Clone size analysis: a parameter in the study of cell population kinetics. *Cell Tissue Kinet.* **1**, 153—165 (1968).
12. PÁLYI, I.: Effect of antitumour agents: Degranol, Mannitol-myleran, Dibromomannitol and Dibromodulcitol on cell morphology in tissue cultures. *Neoplasma* **14**, 159—166 (1967).
13. PÁLYI, I.: Phase cinemicrographic studies of the cytological effects of Degranol on HeLa cell cultures. In: *Fourth Hung. Conference on Therapy and Pharmacological Research*. Publishing House of the Hung. Acad. Sci. 307—308 Budapest (1968).
14. PÁLYI, I.: Sejtciklus vizsgálatok daganatellenes szerekkel kezelt sejt kultúrákon. *MTA Biol. Oszt. Közl.* **12**, 125—128 (1969).
15. PÁLYI, I.: Screening method for antineoplastic agents by tissue culture. In: J. Vikol and C. Sellei, eds., „Twenty-five Years in the Fight Against Cancer.” 345—349 Akad. Nyomda, Budapest (1966).
16. PÁLYI, I., GYESKÓ, A. and SUGÁR, J.: Effect of mannitol mustard (NSC-9698) on nuclear DNA content and birefringence of HeLa and Chinese hamster cells. *Cancer Chemother. Rep.* **53**, 115—120 (1969).
17. PÁLYI, I., OLÁH, E., and PÁLYI, V.: Effect of dibromodulcitol on the life cycle of cells in culture. In: M. Heijzlar, M. Semonsky and S. Masak, eds.: „Advances in Antimicrobial and Antineoplastic Chemotherapy.” Vol. 2, 423—424 Urban and Schwarzenberg, München—Berlin—Wien (1972).
18. PÁLYI, I. and PÁLYI, V.: Cell cycle changes induced by mannitol mustard in cell cultures. Tenth International Cancer Congress, Abstracts 434—435 Houston (1970).
19. PUCK, T. T. and MARCUS, P. I.: Action of X-rays on mammalian cells. *J. Exp. Med.* **103**, 653—666 (1956).
20. SELLEI, C., ECKHARDT, S. and NÉMETH, L.: *Chemotherapy of Neoplastic Diseases*. Akad. Kiadó, Budapest (1970).
21. TERASIMA, T. and TOLMACH, L. J.: Changes in X-ray sensitivity of HeLa cells during the division cycle. *Nature* 1210—1211 (1961).