

ÜBER DIE VERÄNDERUNG DER SUPRAVITALFÄRBUNG DER EHRLICHSCHEN ASZITESZELLEN AUF WIRKUNG GESCHWULSTWACHSTUMSHEMMENDER SUBSTANZEN

ÉVA GÁTI

(Eingegangen am 14. Januar 1956)

Zum Testen chemotherapeutischer Substanzen wurde das Ehrlichsche Asziteskarzinom zuerst von LOEVENTHAL und JAHN [4] angewandt. Die auf Wirkung verschiedener chemischer Substanzen eintretende Zellzerstörung wird gewöhnlich auf Grund der Zellzahlsenkung und der Anzahl der im morphologischen Bild sichtbaren degenerierten Zellen beurteilt. HAGEN und SEEGER [1], SCHREK [8], MACDOWELL [5], PAPPENHEIMER [6] und RICHTER [7] suchten die lebenden Zellen von den auf die Wirkung der chemischen Substanzen zugrunde gehenden Zellen mit Hilfe der Supravitalfärbung zu differenzieren. Über die Brauchbarkeit dieses Testes besteht keine einheitliche Auffassung.

In Fortsetzung der einschlägigen Untersuchungen erprobten wir zwecks Differenzierung der lebenden und zugrunde gehenden Zellen zahlreiche Farbstoffe. Diese gelangten in der Verdünnung 1 : 2000 bei pH 7 in Tyrode-Lösung zur Anwendung. Die Farbstofflösungen inkubierten wir in Petri-Schalen bei Zimmertemperatur in der Verdünnung 20 : 1 mit unbehandelten und in vitro mit Senfnitrogen, Podophyllin, Colchicin in verschiedener Konzentration intoxicierten Ehrlichschen Aszites-Karzinomzellen. Nach 30 Minuten wurde ein Tropfen aus dem Gemisch herausgenommen und das prozentuale Verhältnis der gefärbten Zellen in der Bürkerschen Kammer gezählt (Tabelle I).

Die Verbindungen der Azo-, Azin- und Oxamin-Farbstoffgruppen färbten nach 30 Minuten Stehen bei Zimmertemperatur sämtliche Zellen sowohl der Kontroll wie der intoxicierten Gruppe. Von der Pyronin-Gruppe erwiesen sich am geeignetsten für unsere Untersuchungen Eosin A und Eosin gelb. Wurden die Zellen mit Eosin gelb und Eosin A gefärbt, beobachteten wir zwischen der behandelten und unbehandelten Gruppe einen scharfen Unterschied. Die farbstoffaufnehmenden Zellen färbten sich hellrosa, während die intakten Zellen völlig farblos blieben. Bei der Untersuchung mit dem Fluoreszenzmikroskop fluoreszieren die gefärbten Zellen lebhaft, dagegen wiesen die im Lichtmikroskop ungefärbt erscheinenden Zellen Fluoreszenz auf.

Unsere Untersuchungsergebnisse bestätigen die Feststellung von SCHREK [8] und KLEIN [3], die Eosin zur Differenzierung der lebenden und zugrunde gehenden Zellen geeignet fanden. Auf Grund dieser Feststellungen untersuchten wir

die Verwendbarkeit der Supravitalfärbung mit Eosin zum Testen chemotherapeutischer Substanzen nach der Methode von SCHREK.

Tabelle I

Farbstoff	Unbehandelte Aszites, gefärbte Zellen %	In vitro mit HN_2 intoxizierte Aszites, gefärbte Zellen %
<i>Azo</i>		
Janusgrün	100	100
Kongorot	100	100
<i>Azin</i>		
Neutralrot	100	100
<i>Oxamin</i>		
Methylenblau	100	100
Nilblau	100	100
Trypanblau	100	100
Brillantkresylblau	100	100
<i>Pyronin</i>		
Erytrosin	25	20
Fluorescein Na	20	30
Eosin A	4	48
Eosin gelb	5	50

Material und Methode

Für die Versuche benutzten wir 3 Monate alte, aus Inzucht stammende weisse Mäuse von gleichem Gewicht. Die Tiere wurden i. p. mit 10×10^6 Ehrlichschen Aszitestumorzellen inokuliert und nach 10 Tagen steril punktiert; aus einem Teil des Punktates wurde die Zellzahlbestimmung vorgenommen, in der Bürkerschen Kammer das prozentuale Verhältnis der mit Eosin gefärbten Zellen festgestellt, sowie in gefärbten Ausstrichen das Prozentverhältnis der Geschwulstzellen und anderer nicht geschwulstartigen Zellelemente. Aus dem andern Teil des Punktates wurden Schnitte hergestellt, die wir mit HE bzw. nach *Feulgen* und *Unna—Pappenheim* färbten. Hier-nach wurden die Tiere mit der LD_{50} von 20 verschiedenen chemischen Substanzen intoxiziert (s. Tabellen). Für jede Substanz verwendeten wir je 2 Tiere. 1, 3, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach der Intoxikation der Tiere wurden die erwähnten Angaben bestimmt. Die im morphologischen Bild in Erscheinung tretende Wirkung der einzelnen Substanzen, über die wir in einer andern Mitteilung berichten wollen, wurde auf eingebetteten Schnitten untersucht.

Besprechung

Die Ergebnisse sind in Tabellen zusammengefasst.

Auf Wirkung der einmaligen LD_{50} der in den Tabellen II und III angeführten Substanzen nimmt die Anzahl der eosinophilen Zellen wesentlich zu, während sich gleichzeitig die Zellzahl vermindert. Auf Wirkung der in Tabelle

Tabelle II

Substanz	Dosis	Stunde	0	1	3	6	12	24	48	72
Colchicin	8γ/gr	gef. Zellen %	7	14	16	38	77	60	67	52
		Zellzahl 10 ⁶	52,5	50	46	37	32,5	42	47	50
Colcemid	1γ/gr	gef. Zellen %	7	10	14	16	19	26	33	37
		Zellzahl 10 ⁶	100	92	82,5	75	65	45	39,5	34
Podophyllin	20γ/gr	gef. Zellen %	12	20	40	60	49	38	—	—
		Zellzahl 10 ⁶	75	48	40	33,2	38,8	44	—	—
Senfstickstoff	20γ/gr	gef. Zellen %	8	28	36	40	49	50	50	16
		Zellzahl 10 ⁶	87,4	80	75	71	44	27	41	57,7
TEM	5γ/gr	gef. Zellen %	7	15	20	23	25	28	31	—
		Zellzahl 10 ⁶	100	90	84	80	78	75	72	—
Teroplerin	30γ/gr	gef. Zellen %	8	38	35	40	44	49	14	—
		Zellzahl 10 ⁶	42	27	14,5	23	23	23	38	—
6-Mercaptopurin	50γ/gr	gef. Zellen %	9	13	25	23	17	24	8	—
		Zellzahl 10 ⁶	132	130	128	126,5	124,5	88	93	—
Urethan	100γ/gr	gef. Zellen %	8	12	30	32	36	36	14	—
		Zellzahl 10 ⁶	44,8	40	23	27	29,5	32	45	—

Tabelle III

Substanz	Dosis	Stunde	0	1	3	6	12	24	48	72
Testosteronpropionat	125γ/gr	gef. Zellen %	8	19	39	61	28	21	8	—
		Zellzahl 10 ⁶	42,5	40	17,5	25	20	30	41	—
Syntestrin	140γ/gr	gef. Zellen %	7	19	25	35	49	23	7	—
		Zellzahl 10 ⁶	51	46	37	34	23	38	50	—
R ₁	100γ/gr	gef. Zellen %	11	19	38	48	66	54	42	38
		Zellzahl 10 ⁶	45	50	32,5	30	27,5	27	35	42
R ₂	500γ/gr	gef. Zellen %	7	22	48	60	75	89	—	—
		Zellzahl 10 ⁶	102	96	90	85	64	53	—	—
R ₄	100γ/gr	gef. Zellen %	10	39	44	50	48	47	—	—
		Zellzahl 10 ⁶	51	43	38	32,5	27,5	33	—	—

Tabelle IV

Substanz	Dosis	Stunde	0	1	3	6	12	24	48	72
Cortisonazetat	50 γ /gr	gef. Zellen %	9	10	12	18	15	12	9	—
		Zellzahl 10 ⁶	45	42,5	38	38	38	42	45	—
Sol. Fowleri	50 γ /gr	gef. Zellen %	5	19	19	20	21	17	—	—
		Zellzahl 10 ⁶	47,5	42	41,4	41	43	45	—	—
Fluorethan	10 γ /gr	gef. Zellen %	4	8	14	16	14	8	—	—
		Zellzahl 10 ⁶	140	131	124	120	110	130	—	—
R ₃	200 γ /gr	gef. Zellen %	9	9	3	14	20	19	19	15
		Zellzahl 10 ⁶	45	44	42,5	29	31	35	40	46
R ₅	100 γ /gr	gef. Zellen %	12	17	20	21	18	14	—	—
		Zellzahl 10 ⁶	55	50	47	50	52	54	—	—
R ₆	25 γ /gr	gef. Zellen %	8	18	21	19	16	12	—	—
		Zellzahl 10 ⁶	62,2	60	59	54	58,2	58	—	—
Na citricum	2 γ /gr	gef. Zellen %	9	10	10	10	10	9	9	9
		Zellzahl 10 ⁶	33,6	36	37	36	35	34	34	34

IV angeführten Substanzen steigt die Anzahl der eosinophilen Zellen nicht wesentlich, gleichzeitig ist auch die Zellzahlverminderung nicht ausgeprägt.

Unsere Versuchsergebnisse stehen offenbar in Einklang mit den Feststellungen von THUMN [9] über Trypanblau. Bei der Nachprüfung der Arbeit von HAGEN und ZEEGER [1] beobachtete THUMN, dass in der Färbung der mit Trypanblau gefärbten unbehandelten und mit Sinalost intoxizierten Zellen kein Unterschied bestehe.

Die Schreksche Methode weist scheinbar den Vorteil auf, dass die Eosinaufnahme der unbehandelten Tumorzellen ziemlich gleichmässig erfolgt; der Wert schwankt zwischen 5—12%. Das prozentuale Verhältnis der gefärbten Zellen bleibt auch nach 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur unverändert. Nach 5 Minuten Erhitzung auf 70° nehmen sämtliche Zellen Farbstoff auf. Dies dient zur Kontrolle der Brauchbarkeit der Farbstofflösung.

Aus unseren Untersuchungen folgt, dass die Farbstoffaufnahmefähigkeit der nach einmaliger Injektion der halben letalen Dosis einzelner chemischer Substanzen zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnenen Tumorzellen, auffallend zunimmt. Diese Wirkung ist jedoch stets reversibel, nach Abklingen der Wirkung sinkt die Anzahl der gefärbten Zellen auf den ursprünglichen Wert. In allen Fällen fanden wir eine Parallele zwischen der Zunahme der Anzahl der lädierten Zellen und der quantitativen Verringerung der Tumorzellen. Diese chemischen

Substanzen werden auch zur Therapie von Geschwulstkrankheiten benutzt und gehören zu den in Tierversuchen tumorwachstumshemmend wirkenden Substanzen. Aus der Analyse des zeitlichen Verlaufs der Farbstoffbindungsfähigkeit der Zellen geht hervor, dass das Maximum dieser Fähigkeit mit dem im morphologischen Bild in Erscheinung tretenden Wirkungsmaximum zusammenfällt.

Die Untersuchungsergebnisse scheinen ferner zu bekräftigen, dass die massive Dosis der experimentell Tumorwachstum nicht hemmenden Substanzen — welche die Tiere innerhalb von 1—3 Tagen tötet —, die Farbstoffaufnahme-fähigkeit der Tumorzellen nicht wesentlich beeinflusst.

Um uns über die praktische Brauchbarkeit der Methode zu orientieren, testeten wir auch einige uns vom Forschungsinstitut der Arzneimittelindustrie zur Verfügung gestellte neue Senfzuckerverbindungen. Die hier gewonnenen Ergebnisse stimmten mit ihrer experimentellen Wirkung überein (B. KELLNER, L. NÉMETH, C. SELLEI, 2).

Zusammenfassung

Mit der Schrekschen Supravitalfärbungsmethode wurde die Anzahl der nekrobiotischen Geschwulstzellen nach einmaliger Injektion der halben letalen Dosis von 20 verschiedenen chemischen Substanzen zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Es wurde festgestellt, dass nach Intoxikation mit wirksamen chemotherapeutischen Substanzen parallel mit der Zellzahlverminderung, die Anzahl der nekrobiotischen Zellen zunimmt.

LITERATUR

1. HAGEN, J. und SEEGER: (1938) Die Abhängigkeit der Übertragbarkeit des Tumoraszites von der Vitalität der Zelle und der Temperatur. *Z. Krebsforsch.*, 47, 395. — 2. KELLNER, B., NÉMETH, L. u. SELLEI, C.: (1955) Die biologische hämatologische und geschwulsthemmende Wirkung eines neuen Stickstoff-Lost-Derivates (1-6-Bis-(β -chloraethylamino)-1,6-desoxy-D-manit-dichlorhydrat (BCM). *Naturwiss.* 21, 582. — 3. KLEIN, G. u. FORSSBERG: (1954) Studies on the effect of x ray on the biochemistry and cellular composition of ascites tumors. *Exp. Cell. Res.* 7, 480. — 4. LOEVENTHAL, H. u. JAHN, G.: (1932) Übertragungsversuche mit karzinomatöser Mäuse-Aszitesflüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und chemische Einwirkung. *Z. Krebsforsch.* 37, 439. — 5. MACDOWELL, E. C. zit. *Schrek, R.*: (1936) A method for counting the viable cells in normal and in malignant cell suspensions. *Amer. J. Cancer*, 28, 389. — 6. PAPPENHEIMER, R. zit. *Schrek, R.*: (1936) A method for counting the viable cells in normal and in malignant cell suspensions. *Amer. J. Cancer*, 28, 389. — 7. RICHTER, L. zit. *Schrek, R.*: (1936) A method for counting the viable cells in normal and in malignant cell suspensions. *Amer. J. Cancer*, 28, 389. — 8. SCHREK, R.: (1936) A method for counting the viable cells in normal and in malignant cell suspensions. *Amer. J. Cancer*, 28, 389. — 9. THUMN, Z.: (1954) Kann Trypanblauspeicherung zur Bestimmung der Vitalität der Tumorzellen dienen? *Z. Krebsforsch.* 60, 92.

ИЗМЕНЕНИЕ СУПРАВИТАЛЬНОЙ ОКРАСКИ КЛЕТОК АСЦИТНОГО РАКА ЭРЛИХА НА ДЕЙСТВИЕ ВЕЩЕСТВ, ТОРМОЗЯЩИХ РОСТ ОПУХОЛЕЙ

Э. ГАТИ

Автор определил с помощью суправитальной окраски Шрека число некrobiотических опухолевых клеток после однократного инъецирования полусмертельной дозы 20 различных химических веществ в различные сроки. Он установил, что после отравления эффективными гемотерапевтическими веществами параллельно уменьшению числа клеток повышается число окрашиваемых эозином опухолевых клеток.

LES VARIATIONS DE LA COLORATION SUPRAVITALE DES CELLULES CANCÉREUSES
DE L'ASCITE D'EHRlich SOUS L'INFLUENCE DE L'ACTION DE SUBSTANCES
INHIBANT LA CROISSANCE TUMORALE

É. GÁTI

Nous avons déterminé le nombre des cellules nécrobiotiques à l'aide de la coloration supravitale de Schrek à des intervalles différents, après administration unique de la moitié de la dose mortelle de 20 substances chimiques différentes. Nous avons constaté, qu'après intoxication par des substances chimiques actives, parallèlement avec la diminution du nombre des cellules, le nombre des cellules tumorales se colorant par l'éosine augmente.

Dr. Éva GÁTI, Budapest, II., Ráth Gy. u. 5. Ungarn.