

## DAGANATOS SEJTPOPULÁCIÓ NÖVEKEDÉSÉNEK TANULMÁNYOZÁSA

### *I. A daganat növekedési ütemének csökkenését kísérő sejtkinetikai, morfológiai és biokémiai változások vizsgálata NK/Ly ascites tumoron.*

KOPPER LÁSZLÓ, JENEY ANDRÁS, az orvostudományok kandidátusa, BENEDECZKY ISTVÁN, a biológiai tudományok kandidátusa, LAPIS KÁROLY, az MTA levelező tagja és TAKÁCS JÓZSEF

Közlésre érkezett: 1973. XII. 15.

#### *Bevezetés*

Az egységes sejtpopulációval rendelkező kísérletes tumorok illetve sejtenyészetek kialakítása, valamint az autoradiográfia, citofotometria, szövetenyészeteti filmtechnika széles körű alkalmazása nyitotta meg annak a kutatási irányzatnak a kapuit, amelyet ma *sejtpopulációs kinetika* néven ismerünk. Vizsgálati tárgya a sejttrendszereket felépítő sejtek mozgásjellemzőinek, ezek változásának és ezen keresztül az egész populáció életében lejátszódó dinamikus eseményeknek a tanulmányozása. Ezek a kérdések először azok érdeklődését keltették fel, akik a daganatos sejttrendszerek vizsgálatával foglalkoztak. Az 1950-es évek elejétől meginduló és a kísérletes és klinikai onkológia terén egyre kiterjedtebben alkalmazott sejtkinetikai vizsgálatok igen fontos és újszerű adatokat szolgáltatottak a daganatnövekedés jellemzőire vonatkozóan. E vizsgálatok során megállapították, hogy a sejtpopuláció megnagyobbodásával — a tumor fejlődésével — a növekedési ütem fokozatosan lassul, a sejtek gyors proliferációját csökkenés illetve annak megállása követi a kísérletes ascites és solid tumoroknál, valamint a szövetenyészetekben egyaránt (*Patt és mtsai 1953, Klein és Révész 1953, Patt és Blackford 1954, Patt és Straube 1956, Baserga 1963, Lala és Patt 1966, Young és mtsai 1969, Tannock 1969, Lapis és Kopper 1969*).

Vizsgálataink megkezdésekor úgy gondoltuk, hogy a tumoros sejtpopuláció növekedését kísérő sejtproliferációs jellemzők meghatározása, valamint a sejtproliferáció változásait kísérő morfológiai, biokémiai és gyógyszerérzékenységbeli tulajdonságok tanulmányozása lehetővé teszi a daganatok biológiai viselkedésének jobb megismerését. A tumor-biológiai ismeretek gazdagodása pedig elősegíti a daganatok növekedésének befolyásolását célzó terápiás beavatkozások célszerűbb alkalmazását.

A sejtpopuláció proliferációs aktivitása változásának a tanulmányozása onkológiai jelentősége mellett számos, a sejtbológia tárgykörébe tartozó kérdés megválaszolására is lehetőséget nyújt. Egy olyan biológiai rendszer, amely-

ben a sejtpopuláció proliferációs aktivitása közel fiziológias körülmények között reprodukálható módon és törvényszerűen változik, módot nyújt arra, hogy a DNS szintézisének változásával összefüggő jelenségeket tanulmányozhassuk. Így megismerhetőkké válhatnak azok az extra- vagy intracellularis tényezők, melyek szabályozzák a sejtek oszlási aktivitását, ezen belül a DNS szintézisének beindítását illetve leállítását.

### *Anyag és módszer*

Kísérleteinkhez NK/Ly ascites tumort (*Németh és Kellner 1961*) használtunk, melyet 7 naponként  $5 \times 10^6$  sejttszámmal transzplantáltunk átlagosan 20—25 g-os egerek hasüregébe. A tumor közel diploid (42) kromoszómaszámú fővonallal rendelkezik, míg a sejtek 7—10%-a a polyploid (tetraploid) régióba tartozik. Jellemzően két marker kromoszóma is megfigyelhető (*Lapis 1962, Seidlová és Horák 1971*).

A tumorsejtek *összmenyiségének* meghatározásakor az egerek hasüregét 0,9% natriumkloriddal mostuk át, majd az összegyűjtött sejteket Bürkerhaematocytométerben számoltuk meg (összsejtszám = sejtszám/ml  $\times$  ml ascites). Az elhalt sejtek arányát 1%<sub>00</sub> eozin-tartalmú Tyrode-oldattal határoztuk meg.

#### *— Sejtkinetikai módszerek*

— *A jelölési index* (timidin index, T. I.) = jelölt sejt (100 sejt) vizsgálatakor az állatoknak 30  $\mu$ Ci  $^3$ H-timidint (spec. akt.: 5 Ci/mM, Radiochemical Centre, Amersham) adtunk i. p., majd 60 perc múlva az egereket leöltük, és az ascitesből keneteket készítettünk.

— *A sejtciklus hosszának* (Tc) meghatározásakor a „jelölt mitózisok” módszerét (*Quastler és Sherman 1959*) alkalmaztuk. A vizsgált időpontokban (2—4—7—10 nap) az állatok 30  $\mu$ Ci  $^3$ H-timidint kaptak i. p., majd a 2 és 4 napos tumor vizsgálatakor 2—4 óránként 2—3 állatot leöltünk, míg a 7 és 10 napos tumorok esetében 3—4 óránként az állatokból 0,1—0,1 ml ascitest szívtunk le és keneteket készítettünk.

— *A növekedési frakciót* (GF = growth fraction) szakaszos jelzéssel vizsgáltuk. A transzplantáció utáni 7. és 10. napon az állatoknak 8 óránként 15  $\mu$ Ci  $^3$ H-timidint adtunk, majd vizsgálati pontonként 0,1—0,1 ml ascitest szívtunk le és keneteket készítettünk.

— *A jelzett sejtek transzplantációjának* vizsgálatakor az állatoknak 90 perccel a leölés előtt 30  $\mu$ Ci  $^3$ H-timidint adtunk, majd az átoltás utáni 2. és 4. napon 3—3 állatot leöltünk, az ascitesből keneteket készítettünk, és meghatároztuk a DNS specifikus aktivitását.

— *Autoradiográfia.* Az előzetesen zsírtalanított tárgylemezeken készített keneteket metilalkohol-jégecetben (3 : 1 v/v) rögzítettük 20 percig, száradás után pedig Ilford K5 emulzióval (45 C°-on, 1 : 1 hígítás desztillált vízzel) vontuk be. A 6—15 napig exponált autoradiogramokat Microdol X-el hívtuk elő (18 C°, 5 perc), normál savanyú fixálóban rögzítettük (18 C°, 1—2 perc) és bő mosás, majd szárítás után metilzöld-pironnal festettünk. Az értékelés során jelöltnek azokat a sejteket tekintettük, amelyek magja felett 5-nél több szemcsét tudtunk megfigyelni.

— *Citofotometria.* A tumorsejtek relatív DNS-tartalmának meghatározásakor a metilalkoholban fixált (20 perc) keneteket Feulgennel festettük meg: hidrolízis NHCl-ben 60 C°-on 7 percig — Schiff-reagens: 60 perc szobahőmérsékleten. A méréseket 550 nm-nál Barr és Stroud gyártmányú GN2 típusú mikrodenzitométerrel végeztük.

#### — Elektronmikroszkópos módszerek

— OsO<sub>4</sub> fixálás céljára 0,25—0,5 ml ascites tumort használtunk és a mintákat *Palade* (1952) szerint pufferolt 3 ml 2%-os OsO<sub>4</sub>-ben rögzítettük 60 percig 4 C°-on.

— Kettős fixálás esetében a tumorsejteket először 2,5%-os pufferolt (pH 7,4) glutáraldehidben rögzítettük 60 percig 4 C°-on, majd háromszor 10 percig mostuk 7,5% szacharózt tartalmazó foszfát pufferben. Az OsO<sub>4</sub> fixálást ugyanúgy végeztük, mint az előző esetben.

— A citokémiai vizsgálatok egy részében, így EDTA-„festés”-kor az anyagot csak glutáraldehidben rögzítettük.

— A ruténium-vörös festést 2,5%-os glutáraldehid tartalmú nátriumkakodiláttal pufferolt (pH 7,4) rögzítőben végeztük, amely 500 µg/ml ruténium-vöröst tartalmazott. A kakodilát-pufferes mosás után további 3 órán keresztül rögzítettük és festettük anyagainkat ruténium-vörös tartalmú (300 mg/ml) OsO<sub>4</sub>-ben, sötétben, szobahőmérsékleten.

— A fixálás után a vizsgálati mintákat felszálló alkoholsorban és propiléndioxidban víztelenítettük, majd Durcupanba ágyasztuk be. Az ultravékony metszeteket uranilacetát telített vizes oldatában 30 percig festettük, majd *Reynolds* (1963) szerint kontrasztoltuk további 2 percig. Az EDTA-festést *Bernhard* (1969) által leírt módon végeztük. A felvételeket JEM 7A elektronmikroszkópon készítettük.

#### — Biokémiai módszerek

— A <sup>3</sup>H-uridin beépülésének vizsgálatokor az ascites tumor transzplantációját követő különböző napokon az állatok 20 µCi <sup>3</sup>H-uridint (spec. akt.: 20 Ci/Mm, Radiochemical Centre, Amersham) kaptak i. p. 60 perc múlva

a tumort leszívtuk és a sejteket centrifugálással kiülepítettük (1000 g, 5 perc, 5 C°), majd 0,9% nátriumkloriddal mostuk.

— A sejtszuspenzió egy részéből a nukleotida pool-t, valamint az RNS-t vontuk ki és meghatároztuk azokban a <sup>3</sup>H-uridin specifikus aktivitását. — A nukleotida pool-t hidegen 0,5 N perklórsavval vontuk ki, majd a lipid-frakció alkohol-éter eleggyel történő eltávolítása után az RNS-t 0,5 N perklórsavval extraháltuk (70 C°, 20 perc). — A nukleotida-pool mennyiségét Unicam spektrofotométeren a 260 nm-en mért abszorpció alapján, az RNS-t pedig az orcinol reakcióval határoztuk meg (*Brown* 1946).

— A sejtszuspenzió másik részéből *Berkowitz* és *mtsai* (1969) által leírt módon 0,3% Triton-X 100 alkalmazásával sejtmagot izoláltunk. A magból a neutrális szolubilis fehérjéket, valamint a magi riboszómákat tartalmazó frakciókat 3 mM CaCl<sub>2</sub>-ot tartalmazó 0,01 M Tris-HCl pufferral (pH 7,4) extraháltuk hidegen 10 percig. Ezután a hisztonokat 0,2 N HCl-al hidegen, a nuklein-savakat pedig 0,5 N perklórsavval extraháltuk 70 C°-on 15 percig. A maradék-fehérjét N NaOH-ban oldottuk. A fehérjetartalmat *Lowry* és *mtsai* (1951) módszerével — RNase standard alkalmazásával — határoztuk meg.

— A kromatin frakciókat és a nukleoluszt *Mattochia* és *Comings* (1971) módszere szerint izoláltuk a tisztított sejtmagból. A magi üledéket 0,33 M szacharózban szuszpendáltuk és 4 C°-on 5 másodpercig ultrahangoztuk Braunsonic 300 S ultrahanggenerátor 30 jelzésű fokozatának beállítása mellett. A fel nem tárt sejteket centrifugálással távolítottuk el (400 g, 3 perc). A felülúszót 4000 g-vel 20 percig centrifugáltuk, és ezután az üledék a heterokromatint és a nukleoluszt, a felülúszó pedig az eukromatint tartalmazta. A heterokromatint és nukleoluszt tartalmazó üledéket 0,1% digitoninba vettük fel és ultrahangoztuk 4 C°-on 2—3 percig — ugyancsak a 30-as fokozat beállítása mellett. A nukleoluszt 0,88 M szacharozén keresztül ülepítettük 2000 g-vel 10 percig. Az RNS izolálása céljából az egyes frakciókhoz 0,5% végkoncentrációban nátrium-laurilszulfátot és azonos térfogatú 0,1% 8-OH-kinolint tartalmazó 80%-os fenolt adtunk és 55 C°-on 15 percig extraháltuk.

A fenolos és vizes fázist centrifugálással választottuk el, a vizes fázist kloroform-butanol (3 : 1 v/v) keverékével ismételtelen fehérjementesítettük, majd az RNS-t két térfogat 2% kalium-acetátot tartalmazó etanollal kicsaptuk. Az RNS-tartalmat orcinol reakcióval határoztuk meg.

— A DNS izolálását és mennyiségének mérését *Burton* (1956) módszere szerint végeztük.

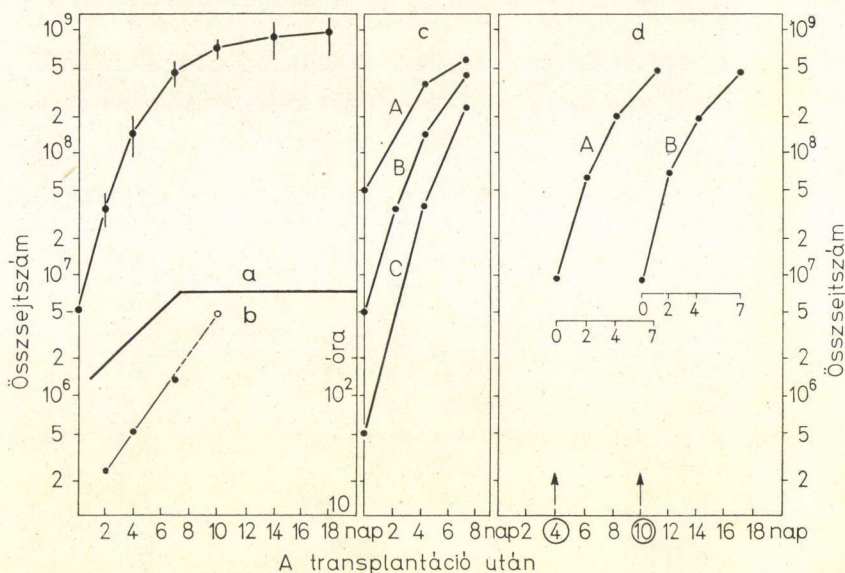
— A radioaktivitás meghatározásához a 0,5 ml-es mintákat 10 ml scintillációs folyadékkal (PPO : 2 g, POPOP: 0,02 g, 2-etoxietanol: 168 ml, toluol: 288 ml) kevertük össze. A radioaktivitást Packard Tricarb spektrométeren határoztuk meg.

## Eredmények

## 1. A sejtpopulációs-kinetikai vizsgálatok eredményei

## a) A növekedési görbe változásai

$5 \times 10^6$  NK/Ly ascites tumorsejt i. p. transzplantációját követően a daganatos sejtek száma vizsgálati periódusunk végéig (18. nap) állandóan emelkedett. Az *összsejtszám* kezdetben közel exponenciálisan nőtt, majd a nö-



1. ábra. Összsejtszám és kettőződési idő változása NK/Ly ascites tumor átoltása után  
 1. a. Összsejtszám alakulása  $5 \times 10^6$  tumorsejt átoltása után  
 1. b. Kettőződési idő változása  $5 \times 10^6$  tumorsejt átoltása után  
 1. c. Összsejtszám alakulása különböző sejtszámmal végzett átoltás után (A =  $5 \times 10^7$ , B =  $5 \times 10^6$ , C =  $5 \times 10^5$ )  
 1. d. Összsejtszám alakulása 4(A) és 10(B) napos NK/Ly ascites tumor  $10^7$  tumorsejttel történt átoltása után

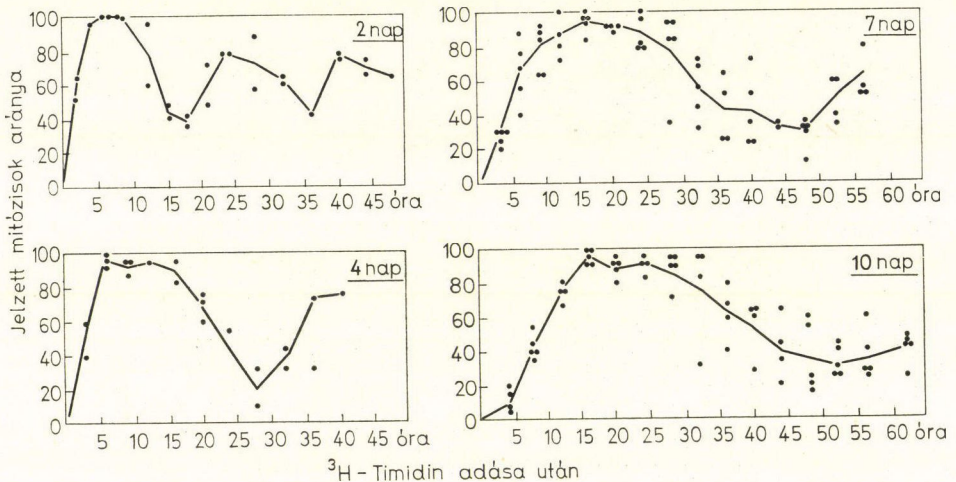
vekedési ütem fokozatosan lassult (1. a. ábra). Ezt jelzi a növekedési görbe alapján számított *kettőződési idő* (= adott sejtszám megkészsereződéséhez szükséges idő) megnyúlása is a különböző korú tumorok esetében (1. b. ábra).

Kérdés, hogy a transzplantált sejtek száma, vagy a daganat kora mennyiben befolyásolja a tumor növekedési ütemét. Nagyságrendileg különböző sejtszámmal végezve a transzplantációt, illetve különböző korú tumorok azonos sejtszámmal történő átoltása esetében egyaránt a proliferáció sebességének lassulását észleltük a tumor növekedése során. *Különböző sejtszám* transzplantálása esetében azonban a növekedési ütemben eltérés mutatkozott, mégpedig gyorsabb proliferációt észleltünk az alacsonyabb sejtszám és lassabbat a ma-

gasabb sejtszám átváltása után (1. c. ábra). A *különböző korú* tumorok azonos sejtszámmal történt átváltása azonos jellegű összsejtszám-emelkedést hozott létre (1. d. ábra).

b) N ö v e k e d é s i ü t e m e t b e f o l y á s o l ó t é n y e z ő k v á l t o z á s a

A növekedési ütem változását befolyásoló tényezők közül vizsgáltuk  $5 \times 10^6$  tumorsejt átváltása utáni különböző időpontokban a proliferáló sejtek átlagos ciklusidejét. A jelzett mitózisok módszerével meghatározott átlagos



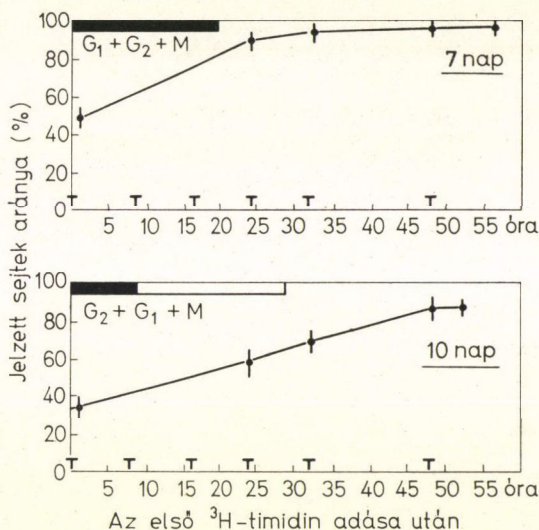
2. ábra. Az átlagos sejtciklusidő változása az NK/Ly ascites tumor növekedése során

ciklusidő a tumor növekedése során fokozatosan megnyúlt (I. táblázat), a cikluson belül az egyes fázisok időtartama szintén meghosszabbodott (2. ábra).

A sejtciklus változása mellett a sejtszám növekedési ütemét befolyásolja a „nem-proliferáló” sejtek jelenléte, illetve a *proliferáló sejtek aránya* (= *növekedési frakció*, GF). A növekedési frakció kísérletesen  $^3\text{H}$ -timidin folyamatos vagy  $G_1 + G_2 + M$  időtartamnál rövidebb időközönként ismételt adásával határozható meg, míg a timidin-index, illetve a sejtciklus és S-fázis hosszának ismeretében kiszámítható ( $GF = T. I. Ts/Tc$ ). Utóbbi eljárást alkalmazva eredményeink alapján a növekedési frakció a transzplantációt követően kismértékben bár, de fokozatosan csökkent (I. táblázat). — 7 és 10 napos tumor esetében szakaszos jelzést alkalmazva kísérletesen is meghatároztuk a proliferáló sejtek arányát, amelyet ebben az esetben a jelölt sejtek arányának maximális értéke mutat. A maximális jelölődés az idősebb tumoroknál alacsonyabbnak mutatkozott, azonban mindkét tumoroknál az elméletileg

számított értékeknél magasabb szinten állandósult a jelzett sejtek aránya (3. ábra).

A sejtpopulációból történő *sejtvesztés* mértéke a harmadik olyan tényező, amely lényegesen befolyásolhatja a növekedés ütemét. NK/Ly ascites tumorban a pusztuló sejtek aránya a transzplantáció utáni korai időszakban (0–2. nap) észlelt magasabb értékek után a 10. napig 10% körül mozgott, majd ez-



3. ábra. A növekedési frakció vizsgálata. Jelzett sejtek arányának változása <sup>3</sup>H-timidin (T) szakaszos adása után

után ismételten emelkedett. — A számítás útján kifejezhető *sejtvesztési ráta* ( $k_L$ ) képviseli a populációból ugyanazon idő alatt keletkezett sejtek frakciója (születési ráta —  $k_B$ ) és a növekedést ténylegesen megvalósító sejtfrakció (növekedési ráta —  $k_C$ ) különbségét. Megállapíthattuk, hogy az NK/Ly ascites tumor növekedésének 10. napjáig e sejtvesztési ráta lényegesen nem változik. — Ugyancsak számításokkal határozhatjuk meg a sejtvesztési faktort (Steel 1967), amely esetünkben a tumor növekedése során mérsékelt emelkedést mutatott (I. táblázat).

A sejtpopuláció életképessége meghatározásának további lehetősége transzplantálhatóságuk, illetve repopulációs képességük vizsgálata. A proliferációs tulajdonságaikban eltérő 4 és 10 napos NK/Ly ascites tumort 90 percig <sup>3</sup>H-timidinnel jelöltük, majd azonos sejtszámmal átoltottuk. Az átoltás után mind a jelölt sejtek aránya, mind a DNS specifikus aktivitása fokozatosan csökkent (4. b. c. ábra). Tekintettel arra, hogy a jelölődés hígulása jól tükrözi a proliferációs aktivitást, valamint, hogy a 4 és 10 napos tumornál a DNS specifikus aktivitásának csökkenése azonos jelleggel következett be, az át-

## I. táblázat

Az NK/Ly ascites tumor növekedési jellemzői a transzplantáció utáni napokban

		2. nap	4. nap	7. nap	10. nap
Kettőződési idő ( $T_D$ )	óra	22,8	48,0	132,0	450,0
Átlagos sejtciklus idő ( $T_C$ )	óra	17,5	30,5	47,5	61,0 <sup>1</sup>
— $G_1$ fázis tartama ( $T_{G1/2}$ )	óra	3,5	7,5	14,0	21,0 <sup>1</sup>
— S fázis tartama ( $T_S$ )	óra	12,5	20,5	28,5	32,5
— $G_2$ fázis tartama ( $T_{G2}$ )	óra	1,5	3,0	5,0	8,5
Timidin index (T. I.)	%	64,8	55,0	42,5	36,5
$T_S/T_C$		71,5	65,5	60,0	53,3 <sup>1</sup>
Növekedési frakció (GF)					
— számított <sup>3</sup>		0,907	0,840	0,709	
— mért (szakaszos jelzés)				0,82–0,95	0,67–0,88
Születési ráta ( $K_B/4$ )	$h^{-1}$	0,0371	0,0201	0,0113	0,0077
Növekedési ráta ( $K_G/4$ )	$h^{-1}$	0,0303	0,0144	0,0052	0,0015
Sejtvesztési ráta ( $K_L/4$ )	$h^{-1}$	0,0068	0,0057	0,0061	0,0062
Sejtvesztési factor ( $\theta/5$ )		0,183	0,283	0,540	0,850

Megjegyzés:

$$1. \text{ számított érték } T_C = \frac{\ln(1 + GF) \times T_S}{\ln 2 \times T. I.}$$

2. az M-fázis tartalmát külön nem vizsgáltuk — a  $G_1$  valódi tartalma:  $G_1 + M/2$ , a  $G_2$ -é pedig  $G_2 + M/2$

$$3. GF = \frac{T. I.}{T_S/T_C}$$

$$4. K_B = \frac{\ln(1 + GF)}{T_C}$$

$$K_G = \frac{\ln 2}{T_D}$$

$$K_L = \frac{\ln(1 + GF)}{T_C} - \frac{\ln 2}{T_D}$$

$$5. \theta = K_L/K_B$$

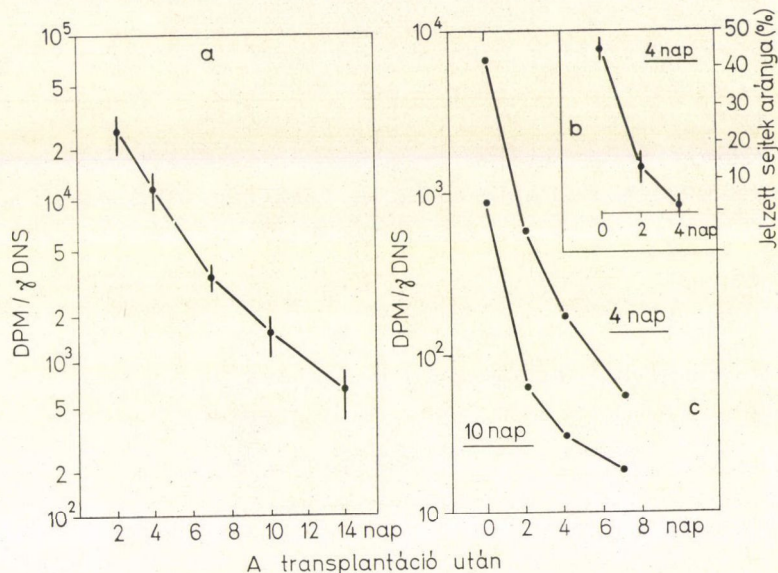
Az észlelt eredmények  $5 \times 10^6$  sejttel történt átoltás utáni növekedési jellemzőkre vonatkoznak.

oltás előtt a két sejtpopuláció között fennálló kinetikai eltérések eltűnésére következtethetünk. Továbbá azt is mutatják ezek az adatok, hogy bizonyos körülmények között a lassabban proliferáló populáció újra átalakul egy lényegesen gyorsabban proliferálóra.

## c) DNS-szintézis és -tartalom változása

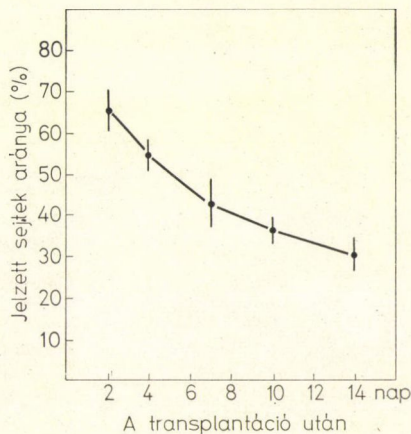
A transzplantációt követően fokozatos csökkenést figyeltünk meg az aktuálisan  $^3H$ -timidint beépítő, azaz DNS-szintézist folytató sejtek arányában (5. ábra). A tumor „előregedésével” nemcsak a jelzett sejtek aránya csökken, hanem lényegesen megkevesedik a sejtek feletti szemcseszám is (6. ábra). E két paraméter jelzi a DNS-szintézis rátájának populáció-szinten és sejtszinten egyaránt bekövetkező csökkenését.





#### 4. ábra. DNS-szintézis vizsgálata

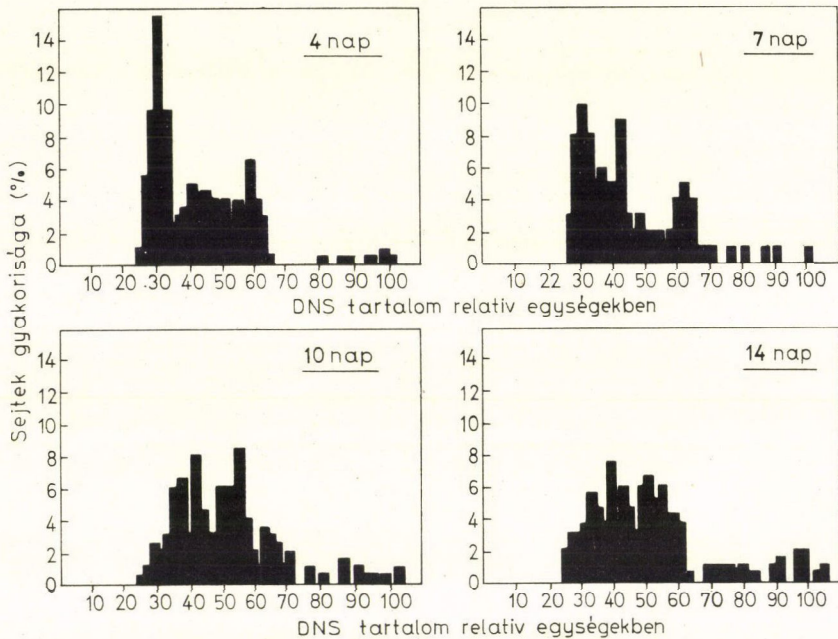
4. a. A DNS spec. akt. változása  $^3\text{H}$ -timidin adása után (60') az NK/Ly ascites tumor növekedése során  
 4. b.  $^3\text{H}$ -timidinnel jelzett 4 napos tumor átoltása után a jelzett sejtek arányának változása  
 4. c.  $^3\text{H}$ -timidinnel jelzett 4 és 10 napos NK/Ly ascites tumorsejtek átoltása után az izolált DNS spec. akt.-ának változása



5. ábra. A jelzett sejtek arányának változása az NK/Ly ascites tumor növekedése során

Ugyancsak a DNS-szintézis rátájának erőteljes csökkenését észleltük, amikor megvizsgáltuk a  $^3\text{H}$ -timidin beépülését a sejtek forró perklórsavval kivonható DNS frakciójában. Az előző adatokkal összhangban azt észleltük, hogy a DNS specifikus aktivitása fokozatosan csökkent a sejtpopuláció növekedési ütemének változásával (4. a. ábra).

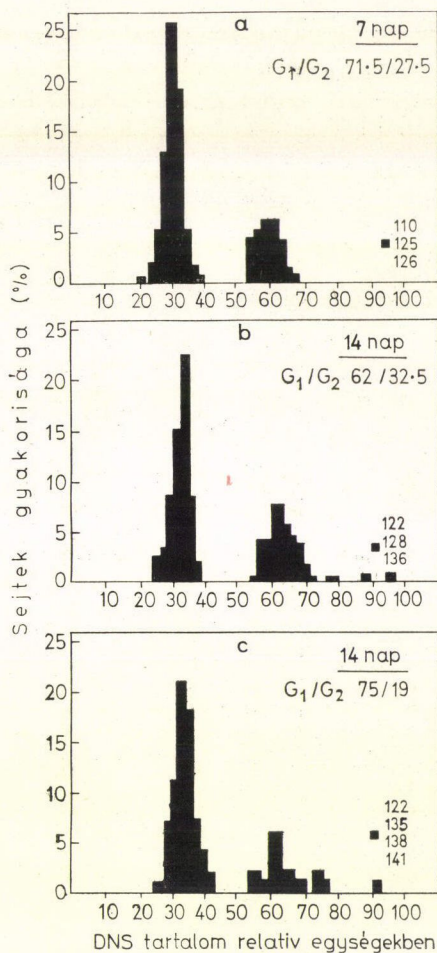
Az NK/Ly ascites tumorsejtek *relatív DNS-tartalmának* mérésekor a proliferáló sejtszrendszerekre jellemző kéthullámú eloszlást figyeltünk meg, mely hullámok a közel diploid, azaz  $G_1$  fázisban levő sejteknek, illetve a tetraploid, azaz  $G_2$  fázisban levő sejteknek felelnek meg. Közöttük helyezkednek el az aktuálisan DNS-t szintetizáló (s-fázisban levő) sejtek. A 4. naptól a 14. napig



7. ábra. Az NK/Ly ascites tumorsejtek DNS tartalmának változása a tumor növekedése során

végzett mérések azt mutatták, hogy a diploid régióban a tumor korának előrehaladtával mérsékelt csökkenés, míg a tetraploidban enyhe emelkedés figyelhető meg (7. ábra). A  $G_1$  és  $G_2$  fázisok jobb elkülönítését érhetjük el, ha az autoradiográfiát kombináljuk a DNS-tartalom méréseivel. Rövid  $^3\text{H}$ -timidinnel történő jelzés után ugyanis az S-fázisban levő sejtek jelzetté válnak, és így módunk van a jelöletlen sejtek DNS-tartalmának meghatározásával az említett fázisokban levő sejteket elkülöníteni. A 7 napos tumornál a  $G_1/G_2$  arány 71,5%/27,5% volt, míg 14 napos tumornál 62%/32,5%, azaz az idősebb tumorsejtpopulációban felszaporodtak a tetraploid régióba tartozó sejtek (8. a. b. ábra).

Ugyancsak az autoradiográfia és citofotometria kombinált alkalmazásával próbáltunk választ adni arra, hogy az ún. nem-proliferáló sejtek milyen fázisban vannak. Méréseinket 14 napos tumorsejt-populáción végeztük, még-



8. ábra. Nem-jelzett NK/Ly ascites tumorsejtek DNS-tartalmának vizsgálata

8. a. Egyszeri <sup>3</sup>H-timidin adása után a 7 napos tumorban

8. b. Egyszeri <sup>3</sup>H-timidin adása után a 14 napos tumorban

8. c. <sup>3</sup>H-timidin szakaszos adása utáni 54. órában a 14 napos tumorban

pedig <sup>3</sup>H-timidinnel történő szakaszos jelzés után. A nem jelzett sejtek zöme diploid DNS-tartalmúnak bizonyult (75%), azonban 19%-ban tetraploid sejteket is észleltünk (8. c. ábra).

## 2. A biokémiai vizsgálatok eredményei

a) <sup>3</sup>H-uridin nukleotida-pool-ba és össz-RNS-be történő beépülésének változása

Az előzőekben ismertetett sejtkinetikai kísérletek azt mutatták, hogy az NK/Ly ascites tumor növekedése során a radioaktív timidin a sejtpopuláció egyre kisebb hányadába és azokba is egyre kisebb mértékben épül be. A továb-

biakban megvizsgáltuk, hogy a sejtek replikációjával nem annyira szorosan összefüggő másik nukleinsav, az RNS radioaktív jelölődése hasonló módon változik-e a sejtpopuláció proliferációs aktivitásának csökkenése során. Megállapítottuk, hogy a  $^3\text{H}$ -uridin beépülése a sejtek savoldható frakciójába — amely a nukleotida-pool-t tartalmazza — valamint az RNS-be nagy fokban csökkent az NK/Ly ascites tumor átoltását követő napokban (II. táblázat).

## II. táblázat

$^3\text{H}$ -uridin beépülése különböző korú NK/Ly ascites tumorsejtekbe

Tumor kora napokban	$\frac{\text{OD}_{260}}{10^6 \text{ sejt}}$	$\frac{\text{dpm}}{\text{OD}_{260}}$	$\frac{\mu\text{g RNS}}{10^6 \text{ sejt}}$	$\frac{\text{dpm}}{\mu\text{g RNS}}$	$\frac{\text{dpm}}{\text{nucleotida pool RNS}}$
2	0,215 $\pm 0,04$	1 100 000 $\pm 94 000$	10,8 $\pm 3,2$	39,201 $\pm 7,600$	27
4	0,142 $\pm 0,03$	466,237 $\pm 40.600$	26,5 $\pm 4,3$	7,663 $\pm 1,800$	60
7	0,248 $\pm 0,03$	91,787 $\pm 4,360$	26,4 $\pm 3,6$	2,860 $\pm 230$	32
10	0,271 $\pm 0,04$	63,900 $\pm 4,450$	31,6 $\pm 5,1$	1,387 $\pm 258$	41

A csökkenés elemzésénél természetesen figyelembe kell venni a tumor tömegének megnagyobbodását, amelynek következtében egy sejtre kevesebb  $^3\text{H}$ -uridin jut. Ez magyarázatul szolgálhatna a nukleotida-pool és az RNS frakciókban észlelt  $^3\text{H}$ -uridin beépülés csökkenésére. A nukleotida-pool és az RNS frakció összehasonlítása azonban azt mutatja, hogy azok csökkenésének mértéke nem teljesen egyező. A transzplantálást követő 2. és 4. nap között a  $^3\text{H}$ -uridin specifikus aktivitása a nukleotida-poolban felére, míg az RNS-ben mintegy ötödére csökkent. Hasonlóképpen kifejezettebb mértékű csökkenést tapasztalhattunk az RNS frakcióban, mint a nukleotida-pool-ban, ha a második napon nyert adatokat a 10 naposakkal vetjük össze. Továbbá figyelembe kell venni azt, hogy a 10 napos ascites tumor nukleotida-pool frakciója még mindig számottevő  $^3\text{H}$ -uridint tartalmazott, így további radioaktív prekuzort tudott volna az RNS-t szintetizáló rendszer számára szolgáltatni. — Ezek az adatok — melyek még különböző mennyiségű  $^3\text{H}$ -uridinnel végzett jelzésekkel, a nukleotida-pool összetételének elemzésével és az RNS-polimeráz aktivitásának meghatározásával kiegészítésre szorulnak — arra utalnak, hogy az RNS egyre alacsonyabb radioaktív jelzése nem elsődlegesen a csökkent prekuzor-felvétel következménye.

b)  $^3\text{H}$ -uridin kromatinfrakciókba és nukleolusba történő beépülésének változása

A következő kísérletben megvizsgáltuk a sejtek kromatin frakcióiban és a nukleolusban az RNS jelölődését a tumor transzplantációja utáni 2. és 9. napon. Irodalmi adatokkal megegyezően azt találtuk, hogy az eukromatin frakció RNS-ének radioaktív jelzettsége meghaladja a heterokromatin RNS-ét (Frenster és mtsai 1963). Ez a különbség a mi kísérletünkben azonban csak a gyorsan szaporodó — 2 napos — sejtpopuláció esetében volt tapasztalható. A 9 napos tumor kromatin és nukleolaris RNS frakcióiba a  $^3\text{H}$ -uridin beépülése jóval alacsonyabb volt, mint a 2 napos tumor esetében. A csökkenés mértéke azonban nem azonos az egyes magi frakcióknál: a 2 napos tumorban az eukromatin, míg a 9 napos tumorban a nukleolaris RNS radioaktív jelölődése a legnagyobb a magi frakciók közül (III. táblázat).

III. táblázat

$^3\text{H}$ -uridin beépülése 2 és 9 napos NK/Ly ascites tumor sejtek magi frakcióinak RNS-ébe

Tumor kora	Eukromatin	Heterokromatin	Nucleolus
2	2492	388	1162
	2326	764	1874
9	301	222	429
	301	183	424

Eredmények dpm x  $\mu\text{g}$  RNS<sup>-1</sup>-ben kifejezve.

Csoportonként 4 egér, egyenként 20  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -uridint (spec. akt.: 5 Ci/mM Radiochemica Center, Amersham) kaptak 1 óráig.

c) Magi fehérjék változása

Egyes magi fehérjék (hisztonok, savanyú természetű fehérjék) fontos szerepet töltenek be az RNS-szintézis szabályozásában (Huang és Bonner 1962, Allfrey és mtsai 1963, Gilmour és Paul 1970, Wang 1970). E fehérjéknek a sejtproliferáció során bekövetkező változásaira *Umana* és mtsai (1964) mutattak rá, akik alacsonyabb hiszton-mennyiséget találtak a gyorsan szaporodó szövetekben, így a tumorokban is. Fenti megfontolás alapján meghatároztuk az NK/Ly ascites tumorsejtek magi fehérjéinek mennyiségi változását a tumor átoltását követő napokban. Mindhárom magi frakció — melyek az összes magi fehérjét képviselik — fehérjetartalmának emelkedését tapasztaltuk a tumor növekedése során. A hiszton-szint emelkedése mellett feltűnőek tartjuk a savanyú természetű fehérjék tartalmának mintegy háromszoros

fokozódását. Meg kell azonban jegyezni, hogy ez utóbbi frakció nem azonos az irodalomban non-histon, illetve savanyú természetű kromatinfehérjeként ismert frakcióval — bár feltételezhetően azt is magába foglalja (IV. táblázat).

#### IV. táblázat

*NK/Ly ascites tumorsejtek magi fehérje tartalmának változása*

Tumor kora napokban	TRIS Solubilis	Hiszton	Savanyú fehérje
2	12,3±3	10,6±1,9	11,0±3,0
4	7,4±1,9	15,4±3,9	12,4±4,7
7	16,1±2,1	16,2±2,1	17,5±1,9
10	19,5±4,2	24,9±3,4	34,9±5,0

A frakciók  $\mu\text{g}$  fehérjetartalmát  $10^6$  sejtszámra vonatkoztatva fejeztük ki.

### 3. Elektronmikroszkópos vizsgálatok eredményei

#### a) Finomszerkezeti változások $\text{OsO}_4$ fixálás esetében

A „fiatal”, 2 napos tumor sejtjeiben (9. ábra) a sejtmag vese, vagy bab alakú, a karioplazma közepesen elektrondenz. — A csak  $\text{OsO}_4$ -fixált mintákban a tumoros sejtpopuláció kisebb hányadát olyan sejtek alkotják, melyek magjában a maganyag szokatlan homogén eloszlásban van jelen, hiányoznak az elektrondenz, feltehetően kromatinnak megfelelő területek (10. ábra). — A 2 napos tumorsejtek citoplazmájában legfeltűnőbb a nagyszámú szabad riboszóma jelenléte (9. ábra). A durva felszínű endoplazmás reticulum csak kis mennyiségben, rövid tubulusok formájában figyelhető meg. A Golgi-apparátus viszonylag fejletlen (9. ábra-G), a mitochondriumok száma csekély. Elvértve egy lizoszóma-szerű test és lipidcsepp is látható a tumorsejtek citoplazmájában.

Az „idős” 10—14 napos tumor sejtjeinek alapvető ultrastrukturális organizációja lényegében megegyezik a 2 napos tumorokból származó sejtekével (11. ábra). — Szembetűnő a citoplazma szabad riboszóma-állományának megkevesbedése és a durva felszínű endoplazmás retikulum tubulusainak felszaporodása. A Golgi-apparátus rendszerint nagyobb kiterjedésű és számos lizoszóma-szerű, egyes esetekben pedig lipofuszin granulomokra emlékeztető részecskéket tartalmaz.

#### b) Finomszerkezetű változások kettős fixálás esetében

A glutáraldehid +  $\text{OsO}_4$  fixált tumorsejtek finomszerkezete jobban megőrzött, mint a csak  $\text{OsO}_4$ -el fixált sejteké. Kettős fixálás után eltérő kario-

plazmájú sejtmagokat nem tudtunk megfigyelni — ellentétben a csak  $\text{OsO}_4$ -al fixált anyaggal. Az elektrondeniz marginizált kromatin mindig egyértelműen látszott (12. ábra).

### c) RNP és DNP citokémiai vizsgálata

A szemléletesség kedvéért először a 10 napos tumor RNP, illetve DNP festődését mutatjuk be (13. ábra). Itt ugyanis a kétféle makromolekula festődése szabályos: az RNP-tartalmú nukleolusz nagy elektrondenizálásával tűnik szembe, míg a nukleoluszt körülvevő társult kromatin és a marginizált kromatin homogén, közepesen elektrondeniz, szürke mezők formájában látható.

Ezzel szemben a 2. napos tumorban az RNP-tartalmú struktúrák preferenciális festődése nem volt megfigyelhető, és a fiatal tumor sejteiben mind az RNP-tartalmú nukleolusz, mind az DNP-tartalmú kromatin egyaránt festődött (14. ábra). A módszertani hibát vagy esetlegesen vegyszerbeli különbségek okozta műtermék képződése lehetőségét kizárja az, hogy ugyanabban a metszeten egymás mellett tudtunk megfigyelni szabályos preferenciális RNP festődést egy fiatal, éretlen leukocytá magjában és erőteljes festődést mutató nukleoluszt és marginizált kromatint a szomszédos tumorsejtben (15. ábra).

### d) A sejtfelszín (sejtköpeny) vizsgálata ruténium-vörössel

A „fiatal”, 2 napos tumorsejtek felszínén ruténium-vörössel történő festés után meglehetősen vastag, 250—300 Å átmérőjű elektrondeniz réteget figyeltünk meg (16. ábra).

## Megbeszélés

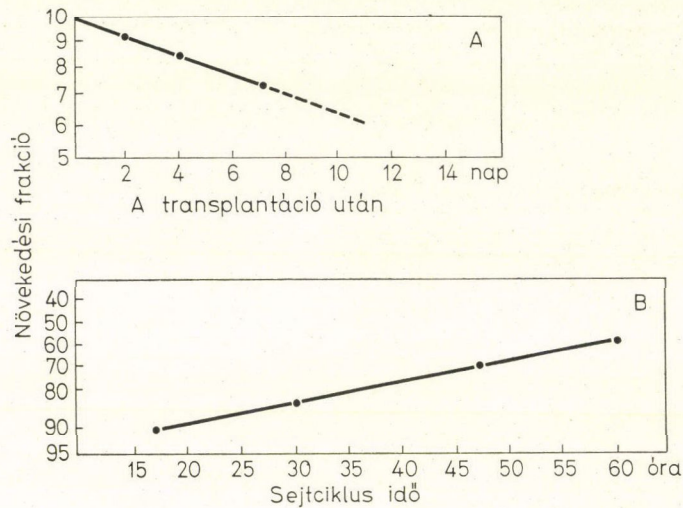
### 1. Sejtpopulációs kinetikai változások értékelése

A sejtpopuláció növekedési ütemének csökkenését a következő tényezők idézhetik elő: a) a proliferáló sejtek átlagos ciklusidejének ( $T_c$ ) meghosszabbodása; b) a proliferáló sejtek arányának (GF) csökkenése; c) a sejtvészteségi ráta ( $k_L$ ) emelkedése.

A bemutatott kísérleteinkben azt észleltük, hogy az NK/Ly ascites tumorsejtek átlagos ciklusideje és a ciklus fázisainak tartama a tumor növekedésével párhuzamosan megnyúlt. Az egyes fázisok közül szembetűnő a  $G_1$  jelentős meghosszabbodása, azonban a  $G_2$  és S is hasonló tendenciát mutatott. A „jelzett mitózis” görbék első hullámát tekintve láthatjuk, hogy azok fokozatosan elveszítik meredekségüket, ami arra utal, hogy a fázis-tartamok egyre nagyobb ingadozást mutatnak. Hasonló jelenségről — más tumorokon — Lala (1971) és Shackney (1973) is beszámolt.

A proliferáló daganatsejtek életideje tehát egyre hosszabb. Kérdés, hogy ez önmagában magyarázza-e a növekedési ütemben észlelt változásokat, vagy

számolhatunk-e olyan sejtek jelenlétével is, melyek a cikluson történő keresztülhaladásuk során annak valamelyik fázisában megrekednek. E sejteket nem-proliferáló, nyugvó vagy  $G_0$  sejteknek nevezi az irodalom (Lajtha és mtsai 1962). A nyugvó állapot jelentheti a proliferáló képesség végleges elvesztését (steril sejtek), azonban lehetséges az is, hogy a sejtek e képessége megmarad



17. ábra. Növekedési frakció változása

17. a. A növekedési frakció változásának ábrázolása szemilogaritmikus görbén  
17. b. A növekedési frakció változása a sejtciklusidő függvényében, valószínűségi görbén

és bizonyos stimulusok hatására visszalépnek a sejtciklusba. NK/Ly ascites tumor esetében a növekedési frakció számított értékei azt mutatták, hogy a tumor korával párhuzamosan a nem-proliferáló sejtek aránya emelkedik. A kísérletesen meghatározott értékek azonban — különösen hosszabb jelzés alkalmazásakor — magasabbak, mint a számítás útján nyertek (Lala 1971). Ezt tapasztaltuk magunk is 7 és 10 napos NK/Ly ascites tumor szakaszos jelzése esetében. Az eltérés magyarázatául szolgálhat egyrészt az, amit az előzőekben már említettünk, hogy ti. a fázisok tartama a tumor korának előrehaladtával egyre nagyobb ingadozást mutat, ezért az átlagos  $G_1 + G_2 + M$ , illetve a maximális  $G_1 + G_2 + M$  tartam között jelentős eltérés lehet. A két módszer közötti eltérés másik oka az lehet, hogy a tumorsejtpopulációban megjelenő nem-proliferáló sejtek képesek visszalépni a ciklusba és így jelzetté válni. Eltekintve a növekedési frakció meghatározásakor felmerülő hibaforrásoktól, eredményeink alapján rövidebb-hosszabb ideig nem-proliferáló sejtek jelenléte, illetve arányuk emelkedése az NK/Ly ascites tumor növekedése során bizonyítottan tekinthető (17. a. ábra).



Kérdés, hogy ezek a sejtek a ciklus mely fázisában szakítják meg útjukat. A  $^3\text{H}$ -timidinnel szakaszosan jelzett 10. napos NK/Ly ascites tumor nem jelöltődött sejtjeinek DNS-tartalmát mérve citofotométerrel mind  $G_1$ , mind  $G_2$  fázisnak megfelelő, közel diploid és tetraploid DNS-tartalommal rendelkező sejteket sikerült megfigyelni (arányuk: 75%/19% volt). Lehetséges tehát, hogy az NK/Ly ascites tumorban a ciklusból kilépő sejtek nemcsak  $G_1$ -ben, hanem  $G_2$ -ben is képesek megrekedni. Felvetődik azonban annak a lehetősége is, hogy a szakaszos jelzés után megfigyelt tetraploid régió a nem-proliferáló tetraploid sejteket reprezentálja. Ennek a kérdésnek eldöntése további vizsgálatokat igényel.

Az ascites tumor növekedési ütemét tehát a proliferáló sejtek ciklusidejének megnyúlásán kívül a ciklusból kilépő, illetve abba bejutó sejtek aktuális aránya is befolyásolja. A tumor korával, *a sejtciklus progresszív megnyúlásával nő a sejtek ciklusból való kikerülésének és csökken a ciklusba való visszakikerülésének valószínűsége* (17. b. ábra).

Az aktuálisan nem-proliferáló tumorsejtek bizonyos behatásokra (aspiráció, retranszplantáció stb.) igen gyorsan képesek visszalépni a ciklusba és gyorsan proliferáló sejtekké válni. A 4 és 10 napos, tehát sejtkinetikai szempontból jelentősen eltérő sajátságokkal rendelkező tumorokból azonos sejtszámmal transzplantációt végezve gyakorlatilag teljesen hasonló növekedési görbét észleltünk. Ha a retranszplantáció előtt a populációt rövid ideig  $^3\text{H}$ -timidinnel jelöltük, akkor az átoltás után a DNS specifikus aktivitása mindkét tumornál azonos tendenciával csökkent, jelezve az azonos növekedési ütemet. Fenti kísérlet eredménye arra utal, hogy az ascites tumor „öregedése” során keletkező *nem-proliferáló sejtek* nem tekinthetők végállapotban levő steril sejteknek, hanem olyanoknak, melyek *megfelelő stimulus hatására képesek visszanyerni osztódási képességüket*. Mindkét korú tumornál az átoltás után a lassabb növekedési ütemet gyorsabb növekedés váltotta fel, és ez természetesen nemcsak a nem-proliferáló sejtek proliferatívává válását, hanem a ciklusban levő sejtek felgyorsult növekedési sebességét is jelzi.

A sejtcikluson és a növekedési frakción kívül a populációból történő sejtvesztés mértéke befolyásolhatja egy adott sejtrendszer növekedési ütemét. Az NK/Ly ascites tumor növekedése során az elhalt sejtek aránya, a sejtvesztési ráta lényegesen nem változott. A sejtvesztési faktor ugyanezen idő alatt mérsékelten emelkedő tendenciát mutatott. Végeredményben azt mondhatjuk, hogy a transzplantációt követő 10—14. napig az NK/Ly ascites tumor növekedési ütemének változásáért a sejtvesztés nem, vagy csak igen kis mértékben felelős.

Felvetődik, hogy a kísérletes ascites tumorok tanulmányozásánál nyert eredmények mennyiben vethetők össze a kísérletes solid tumorok, de különösképpen az emberi daganatok sejtpopulációs kinetikai sajátosságaival. Irodalmi adatok szerint a transzplantálható solid tumorok növekedési üteme is

egyre lassul, azonban az ascites tumorokkal ellentétben ezért elsősorban a nyugvó sejtek megjelenése, illetve arányuk emelkedése a felelős. Emellett jelentős szerepet játszik a sejtvészteség nagysága, míg az átlagos ciklusidő a tumor korával lényegesen nem változik (*Mendelsohn* 1960, 1962, *Frindel* és mtsai 1967, *Simpson-Herren* és mtsai 1968, *Tannock* 1969, *Lala* 1972). Nemcsak ugyanazon tumor különböző növekedési szakaszaiban vagy ascites és solid formája között észlelhetők sejtkinetikai eltérések, hanem spontán tumorok sorozatos transzplantációja esetében is (*Steel* és mtsai 1971).

A humán tumorok sejtkinetikai jellemzőinek széles körű vizsgálatát elsősorban módszertani és etikai problémák nehezítik. Az eddigi vizsgálatok azt mutatják, hogy a humán tumorokban a sejtek ciklusideje és a fázisok tartama tumoronként változik, és nincs szoros összefüggésben a szövettani megjelenéssel. A tumorsejt ciklusideje nem szükségszerűen rövidebb — sok esetben hosszabb — mint a szervezet gyorsan megújuló populációit felépítő egészséges sejteké (*Cooper* 1968, *Levi* és mtsai 1969, *Fabrikant* 1970, *Tubiana* 1971, *Johnson* és *Wolberg* 1971, *Heenen* és mtsai 1973). A tumorok között a kettőződési időben, ugyanazon tumoron belül a valódi és potenciális kettőződési idő között figyeltek meg lényeges különbségeket, amely nagyfokú sejtvészteség jelenlétére, így a sejtvészteség fontos, növekedést befolyásoló szerepére utal (*Steel* és *Lamerton* 1966, *Steel* 1967, *Refsum* és *Berdal* 1967, *Iversen* 1967, *Frindel* és mtsai 1968). A daganatokban a normál szöveteknél magasabb a növekedési frakció, azonban nem-proliferáló sejtek jelenléte — a kísérletes tumorokhoz hasonlóan — szintén kimutatható volt (*Peckman* és *Steel* 1972). *Saunders* és mtsai (1967) leukémiás betegeknél a csontvelő daganatsejt-sűrűségének emelkedésével párhuzamosan a növekedési ütem lassulását észlelték. Citosztatikus szerrel történt kezelés után a sejtpusztulás miatt kialakult denzitás-csökkenésnél a túlélő sejtek proliferációjának gyorsulását tapasztalták (*Foadi* és mtsai 1967). *Mauer* és *Saunders* (1969) szerint a nem-proliferáló leukémiás sejtek relatíve rezisztensek a kemoterápiás beavatkozásokkal szemben, és másokkal együtt feltételezik, hogy e sejtek képezik a recidivák forrását (*Clarkson* 1969).

A kísérletes és humán tumorokon megfigyelt sejtkinetikai adatok, valamint saját eredményeink is a tumorok növekedési ütemének változékonyságát jelzik. Kérdés, hogy a populáció-szintjén észlelt eltérések milyen sejten belüli eseményekkel, biokémiai, morfológiai módszerekkel tapasztalható változásokkal hozhatók összefüggésbe.

## 2. Biokémiai változások értékelése

Az ascites tumorok növekedését kísérő anyagcsere-változásokkal napjainkig meglehetősen kevés tanulmány foglalkozott. *Harris* és mtsai (1970) számos enzim aktivitását határozták meg az Ehrlich-ascites tumor áttöltését követő különböző napokban, és bár a  $^3\text{H}$ -leucin fehérjébe történő beépülése

a timidin indexhez hasonlóan csökkent, a vizsgált enzimek aktivitásában változást nem tapasztaltak. Ezzel szemben a monoaminoxidase aktivitásának fokozódásáról számolt be *Yamanaka* (1971) ugyancsak az Ehrlich-ascites tumor vizsgálata során. A polinukleotidase-k aktivitásának a tumor korától függő változását az Ehrlich-ascites tumorban és a  $L_{51878y}$  lymphoma tumorban *Horakova* (1972) írta le. *Holoubek* (1971) a különböző hiszton-frakciók szintézisét hasonlította össze a fiatal és idős Ehrlich-ascites tumor sejtjeiben. Megállapította, hogy a  $^3\text{H}$ -leucin beépülése az  $F_1$  hiszton-frakcióba és a  $^3\text{H}$ -timidin beépülése a DNS-be csökken a tumor öregedésével. Ezzel szemben az  $F_3$  hiszton-frakció jelölődése inkább kiskokú emelkedést mutatott.

Az NK/Ly ascites tumor növekedésének különböző szakaszaiban végzett vizsgálatainak eredményei arra utalnak, hogy a tumorsejtek nukleinsav anyagcseréjében lényeges változások következnek be. A növekedés előrehaladtával meghosszabbodik a sejtek genetikai állományának replikációs ideje, csökken az időegység alatt aktuálisan DNS-t szintetizáló sejtek aránya, a  $^3\text{H}$ -timidin DNS-be történő beépülése. A DNS-szintézis üteme tehát populáció- és sejt-szinten egyaránt jelentősen csökkenő tendenciát mutat.

A  $^3\text{H}$ -uridin NK/Ly ascites tumorsejtekbe történő beépülése a tumor korának előrehaladtával szintén csökkenést mutatott. A kromatin-állományból és a nukleoluszról izolált RNS frakciók  $^3\text{H}$ -uridin jelölődésének az összehasonlítása a 2 és 9 napos tumorban rámutatott arra, hogy a különböző proliferációs aktivitású sejtpopulációkban az RNS-anyagsere jellegében is különbözik egymástól. A gyorsan proliferáló sejtekben az eukromatin, a lassabban proliferálóban pedig inkább a nukleoláris RNS jelölődése volt a legkifejezettebb. E vizsgálatok egyben arra is utalnak, hogy a növekedés során észlelt RNS jelölődés csökkenése már a szintézis helyén, a sejtmagban bekövetkezik. Így kevésbé valószínű, hogy a szintetizált RNS-ek fokozottabb lebontásának tulajdonítható az alacsonyabb szintű specifikus aktivitás. A magi fehérjék tartalmának a tumor növekedése során tapasztalt emelkedése összefüggésben látszik állni a kromatin-frakciók és a nukleolusz csökkent  $^3\text{H}$ -uridin jelölődéséhez és tükrözik a sejtmagban létrejövő változásokat.

### 3. Finomszerkezeti vizsgálatok értékelése

A különböző korú ascites tumorok ultrastrukturális vonásainak összehasonlításakor a legszembetűnőbb elváltozások a citoplazma denzitásában, a mitochondriumokban, a durva felszínű endoplazmás reticulumban és a lipid-cseppek részéről következtek be (*Selby* és *mtsai* 1955, *Lapis* 1967, *Delain* és *Frindel* 1970, *Fletcher* 1972). Saját vizsgálatainkban a 2 és 14 napos NK/Ly ascites tumor sejtjeiben a mitochondriumok finomszerkezetében és a citoplazma elektrondenitásában nem észleltünk figyelemre méltó változást. Jelentős lipid-csepp szaporulatot sem tudtunk megfigyelni a tumor öregedése során.

Vizsgálataink során igen meglepőnek tartottuk, hogy az RNP-struktúrák *Bernhard* (1969) szerinti preferenciális festődése nem következett be a 2. napos tumorban, mivel a nukleolusz és egyéb RNP-tartalmú struktúrák mellett a kromatin is festődött. A jelenség magyarázatára a következő szempontok merülnek fel: *a*) a festési eljárás nem eléggé specifikus, *b*) a 2 napos tumorsejt kromatin állományában RNP-tartalmú struktúrelemek is jelen vannak és a festődés ettől ered, *c*) maga a kromatin festődik, azaz olyan fizikokémiai állapotban van, amely az EDTA-festés számára kedvező feltételeket jelent, *d*) végül felmerül annak a lehetősége is, hogy a fenti jelenség háttérben nekrobiotikus folyamatok állnak.

### *Következtetések*

A kísérletes és részben az emberi tumorokon történt megfigyelések, valamint saját tapasztalataink is a tumorok növekedési ütemének, a tumorsejtek anyagcsere-tulajdonságainak és egyes morfológiai sajátosságainak a daganatok korával kapcsolatos változékonyságára mutatnak rá. Kérdés, hogy mely kutatási területeken hasznosíthatók ezek a megfigyelések.

A daganatok biológiai tulajdonságai megítélésénél szemléletesen is jelentősnek tartjuk azt, hogy — a korábbi felfogással szemben — a tumor növekedése során a sejtek oszlási üteme nem feltétlenül fokozódik, hanem számos — ha nem minden — esetben csökkenés tapasztalható.

A daganatos sejtpopulációk növekedési ütemét befolyásoló tényezők közül az ascites tumorok — és talán a human leukémiák esetében is — az intracellularis szintetikus folyamatok progresszív lassulása, míg az experimentalis és human solid tumoroknál a növekedési változás háttérben elsősorban a nyugvó állapotban levő sejtek arányának emelkedése és a sejtvészesség látszik a legfontosabb tényezőnek. Mindez felveti annak lehetőségét, hogy előbbieknél sejtszinten, utóbbiaknál pedig szöveti szinten érvényesül a szabályozó mechanizmusok hatása.

Feltehető, hogy biológiai törvényszerűség nyilvánul meg a daganatos sejtpopuláció „fejlődésével” járó növekedési ütem csökkenésében. E változás tanulmányozása, illetve összehasonlítása egy differenciálódást eredményező és egy daganatos növekedést mutató biológiai rendszerben lehetőséget nyújt alapvető biológiai jelenségek megfigyelésére. Így a daganatos sejtpopuláció növekedésének vizsgálatánál felmerülő kérdések egyike az, hogy a tumorokban megjelenő nem-, vagy igen lassan proliferáló sejtek funkcionális szempontból eltérnek-e a proliferatív állapotban levőktől. A gyorsan és lassan proliferáló sejtpopulációk között minőségi különbségeket jelző adatok ma még csak elvétve találhatók az irodalomban. *Becker és Stanners* (1972) a proliferáló és nyugvó állapotban levő szövettenyésztési sejtek között az újonnan szintetizált fehérjék elektroforetikus vizsgálatakor minőségi eltérést találtak. Feltételezik,

hogyan a nyugvó sejtek biokémiai állapotukat tekintve nem egyeznek meg a normál sejtciklus egyik fázisával sem.

Vizsgálataink is rámutattak arra, hogy a sejtpopuláció növekedési ütemével együtt csökken a sejtek genetikai állományának replikációja. A DNS-szintézis rátájának lassulása, reverzibilis vagy irreverzibilis megszűnése nemcsak tumorbiológiai, hanem általános sejtbológiai szempontból is jelentős kérdésnek tekinthető. E változásokat létrehozó vagy azokban szerepet játszó tényezők — elsősorban a  $G_1$  fázis végén, a  $G_1$ —S fázishatáron zajló események sorrendjének (Baserga 1968, Prescott 1968) — ismerete hozzájárulna a genetikai állomány replikációjának fízológias körülmények között történő szabályozásának megismeréséhez is. Úgy gondoljuk, hogy a DNS-szintézis természetének, valamint az azt befolyásoló tényezők működésének összehasonlítása az ascites tumorok növekedésének egyes szakaszaiban megfelelő biológiai vizsgáló rendszerrel szolgáltat a genetikai állomány szabályozórendszerének tanulmányozásához.

### Összefoglalás

Szerzők a kísérletes tumorok növekedési jellemzőivel és az azt befolyásoló tényezőkkel foglalkoznak. — Megállapították, hogy az NK/Ly ascites tumor növekedése során a sejtpopuláció kettőződési ideje fokozatosan meghosszabbodik. Ennek kialakulásában elsősorban a sejtek átlagos ciklusedejének megnyúlása és másodsorban a nem-proliferáló sejtek megjelenése játszik szerepet. A sejtosztódás ütemével együtt csökken a DNS-szintézis üteme sejt- és populáció-szinten egyaránt. Ugyancsak ezzel párhuzamosan csökkenést mutatott a  $^3\text{H}$ -uridin tumorsejtekbe, ezen belül főként az eukromatin frakcióba történő beépülése is. Elektronmikroszkópos citokémiai vizsgálatok azt mutatták, hogy a 2 és 10 napos tumorok a sejtmagok DNP- és RNP-struktúrájának EDTA-festéssel történő elkülönítése tekintetében eltérően viselkedtek.

Az eredmények onkológiai jelentőségük mellett biológiai kísérleti modellt szolgáltatnak a genetikai állomány replikációját szabályozó tényezők tanulmányozására.

Végül köszönetünket fejezzük ki a Semmelweis Orvostudományi Egyetem Radiológiai Intézete Izotóp Laboratóriuma munkatársainak a radioaktivitás-mérések elvégzéséért.

### IRODALOM

- Allfrey, V. G., Littau, G., Mirsky, A. E.: On the role of histones in regulating ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. **49**, 414—421. (1963).  
 Baserga, R.: Mitotic cycle of ascites tumour cells. Arch. Path. **75**, 156—161. (1963).  
 Baserga, R.: Biochemistry of the cell cycle: a review. Cell Tissue Kinet. **1**, 167—191. (1968).  
 Baserga, R., Gold, R.: Uptake of tritiated thymidine by newly transplanted Ehrlich ascites tumor cells. Exptl. Cell Res. **31**, 576—586. (1963).

- Becker, H., Stanners, C. P.: Control of macromolecular synthesis in proliferating and resting Syrian Hamster cells in monolayer culture. III. Electrophoretic patterns of newly synthesized proteins in synchronized proliferating cells and resting cells. *J. Cell Physiol.* **80**, 51–62. (1972).
- Berkowitz, D. M., Kakefuda, T., Sporn, B. M.: A simple and rapid method for the isolation of enzymatically active HeLa nuclei. *J. Cell Biol.* **42**, 851–854. (1969).
- Bernhard, W.: A new staining procedure for electronmicroscopical cytology. *J. Ultrastructure Res.* **27**, 250–265. (1969).
- Bhuyan, B. K., Scheidt, L. G., Fraser, T. J.: Cell cycle phase specificity of antitumour agents. *Cancer Res.* **32**, 398–407. (1972).
- Bichel, P.: Autoregulation of ascites tumour growth by inhibition of the G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> phase. *Europ. J. Cancer* **7**, 349–355. (1971).
- Brown, A. M.: Determination of pentose in the presence of large quantities of glucose. *Arch. Biochem.* **11**, 269. (1946).
- Bruce, W. R., Meeker, B. E., Valeriote, F. A.: Comparison of the sensitivity of normal hematopoietic and transplanted lymphoma colony-forming cells to chemotherapeutic agents administered in vivo. *J. Natl. Cancer Inst.* **37**, 233–245. (1966).
- Burns, E. R.: Initiation of DNA synthesis in Ehrlich ascites tumour cells in their plateau-phase of growth. *Cancer Res.* **28**, 1191–1196. (1968).
- Burns, E. R.: On the failure of self-inhibition growth of tumours. *Growth* **33** 25–45. (1969).
- Burton, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* **62**, 315–323. (1956).
- Clarkson, B. D.: Review of recent studies of cellular proliferation in acute leukaemia. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* **30**, 81–120. (1969).
- Cooper, E. H., Peckham, M. J., Millerd, R. E., Hamlin, I. M. E., Gerard-Marchant, R.: Cell proliferations in human malignant lymphomas. Analysis of labelling index and DNA content in cell populations obtained by biopsy. *Europ. J. Cancer* **4**, 286–296. (1968).
- Delain, E., Frindel, E.: Comparison of cell ultrastructure of an experimental ascites tumor of the mouse at different stages after transplantation. *Europ. J. Cancer* **6**, 203–205. (1970).
- Fabriziani, J. I.: The kinetics of cellular proliferation in human tissues. Determination of duration of DNA synthesis using double labeling autoradiography. *Brit. J. Cancer* **24**, 122–127. (1970).
- Fletcher, P. A.: Biochemical, histochemical and ultrastructural studies of changes occurring with growth of Ehrlich ascites cells in vivo. *Europ. J. Cancer* **8**, 461–469. (1972).
- Foadi, M. D., Cooper, E. H., Hardisty, R. M.: DNA synthesis and DNA content of leucocytes in acute leukaemia. *Nature (Lond.)* **216**, 134–136. (1967).
- Frenster, J. H., Allerey, V. G., Mirsky, A. E.: Repressed and active chromatin isolated from interphase lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **50**, 1026. (1963).
- Frindel, E., Malaise, E., Alpen, E., Tubiana, M.: Kinetics of cell proliferation of an experimental tumour. *Cancer Res.* **27**, 1122–1131. (1967).
- Frindel, E., Malaise, E., Tubiana, M.: Cell proliferation in five human solid tumours. *Cancer* **22**, 611–620. (1968).
- Frindel, E., Valleron, A. J., Vassort, F., Tubiana, M.: Proliferation kinetics of an experimental ascites tumour of the mouse. *Cell Tissue Kinet.* **2**, 51–65. (1969).
- Gilmour, R. S., Paul, J.: Role of non-histone components in determining organ specificity of rabbit chromatins. *FEBS Letters* **9**, 242–244. (1970).
- Harris, J. W., Meykens, F., Patt, H. M.: Biochemical studies of cytokinetic changes during tumour growth. *Cancer Res.* **30**, 1937–1946. (1970).
- Heenen, M., Achten, G., Galand, P.: Autoradiographic analysis of cell kinetics in human normal epidermis and basal cell carcinoma. *Cancer Res.* **33**, 123–127. (1973).
- Holoubek, V.: Metabolism of different histone fractions in Ehrlich ascitic cells after environmental change. *Experientia* **27**, 140–142. (1971).
- Horakova, K.: Polynucleotidases in mouse ascitic tumour cells. *Neoplasma* **19**, 459–468. (1972).
- Huang, R. C. C., Bonner, J.: Histone, a suppressor of chromosomal RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **48**, 1216–1222. (1962).
- Iversen, O. H.: Kinetics of cellular proliferation and cell loss in human carcinoma. A discussion of method available for in vivo studies. *Europ. J. Cancer* **3**, 389–394 (1967).
- Kopper, L., Szende, B., Lapis, K., Tyihák, E.: Examination of the tumor growth promoting effect of the E-N-trimethyllysine. An autoradiographic study. *Neoplasma* **18**, 251–256. (1971).
- Laird, A. K.: Dynamics of tumour growth. *Brit. J. Cancer* **18**, 490–502. (1964).

- Lajtha, L. G., Oliver, R., Gurney, C. W.: Kinetic model a bone-marrow stem cell population. *Brit. J. Haematol.* **8**, 442–460. (1962).
- Lala, P. K.: Studies on tumor cell population kinetics. In: "Methods in Cancer Research" Vol. **6**, 4–93. Ed.: *Busch, H.* — Academic Press (1971).
- Lala, P. K.: Evaluation of the mode of cell death in Ehrlich ascites tumour. *Cancer* **29**, 261–266. (1972/a).
- Lala, P. K.: Age-specific changes in the proliferation of Ehrlich ascites tumor cells grown as solid tumors. *Cancer Res.* **32**, 628–636. (1972/b).
- Lala, P. K., Patt, H. M.: Cytokinetic analysis of tumour growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **56**, 1735–1742. (1966).
- Lapis K.: Cytologiai és elektronmikroszkópos vizsgálatok NK/Ly ascites lymphoma sejteken. *Magyar Onkol.* **6**, 57. (1962).
- Lapis K.: Daganatellenes chemotherápiás szerek hatásának tanulmányozása ultrastrukturális szinten. Doktori értekezés Budapest (1967).
- Lapis K.: Cytostaticumok hatás módjának tanulmányozása. Akadémiai székfoglaló előadás. *Orvostudomány* **22**, 41–80. (1971).
- Lapis K., Kopper L.: A sejtpopuláció kinetikája és cytostaticumok hatására létrejövő változásai átoltható daganatokban. *Morph. Ig. Orv. Szemle* **10**, 171–181. (1970).
- Levi, P. E., Cooper, E. H., Anderson, C. K., Williams, R. E.: Analyses of DNA content, nuclear size and cell proliferation of transitional cell carcinoma in man. *Cancer* **23**, 1074–1085. (1969).
- Levine, E. M., Becker, Y., Boone, C. W., Eagle, H.: Contact inhibition, macromolecular synthesis and polyribosomes in cultured human diploid fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **53**, 350–356. (1965).
- Lowry, O., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, S.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275. (1951).
- Mattoccia, E., Comings, D. E.: Buoyant density of satellite composition of DNA of mouse heterochromatin. *Nature (New Biology)* **229**, 175–176. (1971).
- Mauer, A., Saunders, E. F.: Possible significance of non-proliferating leukemic cells. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* **30**, 63–79. (1969).
- Mauro, F., Madoc-Jones, H.: Age responses of cultured mammalian cells to cytotoxic drugs. *Cancer Res.* **30**, 1397–1408. (1970).
- Mendelsohn, M. L.: The growth fraction: a new concept applied tumours. *Science* **132**, 1496. (1960).
- Mendelsohn, M. L.: Autoradiographic analysis of cell proliferation in spontaneous breast cancer of C<sub>3</sub>H mouse. III. The growth fraction. *J. Natl. Cancer Inst.* **28**, 1015–1029. (1962).
- Németh, L., Kellner, B.: A new mouse ascites tumour to be used as a screening tool. *Neoplasma* **8**, 337– (1961).
- Palade, G. E.: A study of fixation for electronmicroscopy. *J. Exp. Med.* **95**, 285–297. (1952).
- Patt, H. M., Blackford, M. E.: Quantitative studies of the growth response of the Krebs ascites tumours. *Cancer Res.* **14**, 391–396. (1954).
- Patt, H. M., Straube, R. C.: Measurement and nature of ascites tumour growth. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **63**, 728–737. (1956).
- Patt, H. M., Blackford, M. E., Drallmeier, J. L.: Growth characteristics of the Krebs ascites tumor. *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.* **83**, 520–524. (1953).
- Peckman, M. J., Steel, G. G.: Cell kinetics in reticulum cell sarcoma. *Cancer* **29**, 1724–1728. (1972).
- Prescott, D. M.: Regulation of cell reproduction. *Cancer Res.* **28**, 1815–1820. (1968).
- Quastler, H., Sherman, F. G.: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exptl. Cell Res.* **17**, 420–438. (1959).
- Refsum, S. B., Berdal, P.: Cell loss in malignant tumours in man. *Europ. J. Cancer* **3**, 235–236. (1967).
- Reynolds, E. S.: The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electronmicroscopy. *J. Cell. Biol.* **17**, 208–211. (1963).
- Saunders, E. F., Lampkin, B. C., Mauer, A. M.: Variation of proliferativ activity in leukemic cell populations of patients with acute leukemia. *J. Clin. Invest.* **46**, 1356–1363. (1967).
- Seidlová, A., Horák, J.: Chromosomal characteristics of NK/Ly ascites tumour passaged on AB/Jena-Gat.-Ko. strain mice. *Neoplasma* **18**, 19–26. (1971).
- Selby, C. C., Bieseke, J. J., Grey, C. E.: Electronmicroscopic studies of ascites tumour cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **63**, 748. (1955).
- Shackney, S. E.: A cytokinetic model for heterogeneous mammalian cell populations. I. Cell growth and cell death. *J. Theor. Biol.* **38**, 305–333. (1973).

- Simpson-Herren, L., Blow, J. G., Brown, P. H.*: The mitotic cycle of sarcoma 180. *Cancer Res.* **28**, 724-726. (1968).
- Stanners, C. P., Becker, H.*: Control of macromolecular synthesis in proliferating and resting Syrian Hamster Cells in monolayer culture. I. Ribosome function. *J. Cell Physiol.* **77**, 31-42. (1971).
- Steel, G. G.*: Cell loss as a factor in the growth rate of human tumours. *Europ. J. Cancer* **3**, 381-387. (1967).
- Steel, G. G.*: Cell loss from experimental tumours. *Cell Tissue Kinet.* **1**, 193-207. (1968).
- Steel, G. G., Lamerton, L. F.*: The growth rate of human tumours. *Brit. J. Cancer* **20**, 74-86. (1966).
- Steel, G. G., Adams, K., Barrett, J. C.*: Analysis of cell population kinetics of transplanted tumours of widely-differing growth rate. *Brit. J. Cancer* **20**, 784-800. (1966).
- Steel, G. G., Adams, K., Hodgett, J., Janik, P.*: Cell population kinetics of spontaneous tumour during serial transplantation. *Brit. J. Cancer* **22**, 258-273 (1968).
- Tannock, I. F.*: The relation between cell proliferation and vascular system in a transplanted mouse mammary tumour. *Brit. J. Cancer* **22**, 258-273. (1968).
- Tannock, I. F.*: A comparison of cell proliferation parameters in solid and ascites Ehrlich tumours. *Cancer Res.* **29**, 1527-1534. (1969).
- Tannock, I. F.*: Population kinetics of carcinoma cells, capillary endothelial cells and fibroblasts in a transplanted mouse mammary tumour. *Cancer Res.* **30**, 2470-2476. (1970).
- Tannock, I. F., Steel, G. G.*: Tumor growth and cell kinetics in chronically hypoxic animals. *J. Nat. Cancer Inst.* **45**, 123-133. (1970).
- Todaro, G. J., Lazar, G. K., Green, H.*: The initiation of cell division in a contact inhibited mammalian cell line. *J. Cell Comp. Physiol.* **66**, 325-344. (1965).
- Tubiana, M.*: The kinetics of cell proliferation and radiotherapy. *Brit. J. Radiol.* **44**, 325-347. (1971).
- Umana, R., Updike, S., Randall, J., Dounce, V.*: In: "The nucleohistones" 200-229. (1964). Ed.: *Bonner, J., Ts'o, P.* - Holden Day Inc. (San Francisco)
- Wang, T. X.*: Activation of transcription in vitro from chromatin by non-histone proteins. *Exptl. Cell Res.* **61**, 455-457. (1970).
- Ward, G. A., Plagemann, P. G. W.*: Fluctuations of DNA-dependent RNA polymerase and synthesis of macromolecules during the growth cycle of Novikoff rat hepatoma cells in suspension culture. *J. Cell Physiol.* **73**, 213-232. (1969).
- Weber, M. J., Rubin, H.*: Uridine transport and RNA synthesis in growing and in density-inhibited animal cells. *J. Cell Physiol.* **77**, 157-168. (1971).
- Wiebel, F., Baserga, R.*: Cell proliferation in newly transplanted Ehrlich ascites tumour cells. *Cell Tissue Kinet.* **1**, 273-280. (1968).
- Yamanaka, Y.*: Monoaminooxidase activity in Ehrlich ascites tumour. *Hiroshima J. Med. Sci.* **20**, 1. (1971).
- Young, R. C., Devita, V. T., Perry, S.*: The thymidine- <sup>14</sup>C and <sup>3</sup>H double labeling technic in the study of cell cycle of L 1210 leukaemia ascites tumor in vivo. *Cancer Res.* **29**, 1581-1584. (1969).
- Zetterberg, A., Auer, G.*: Proliferative activity and cytochemical properties of nuclear chromatin related to local density of epithelial cells. *Exptl. Cell Res.* **62**, 262-270. (1970).