

associated with synthesis¹⁵ and transfer¹⁶ of substances into the extranucleolar surroundings. It is unlikely that in the quiescent cotyledon such configuration should imply any activity, but could possibly represent reminiscence of past events. Presence of RNA and protein can be demonstrated in both types of nucleoli by pyronin and Millons stain. In view of the quiescence of the embryonic cells this ribonucleoprotein may be considered as structural to the nucleolus and may not have any direct physiological role.

The lack of the granular component in these nucleoli are related to quiescence. Quiescent root meristem cells of the bulb show a definite segregation of the granular component, which disappears with aging¹⁷. Similar lack of granules has been noted in actinomycin D blocked interphase nucleoli of root meristem cells⁴.

From this study it appears that essential constituents that maintain the continuity of the nucleolus in quiescent cells of the embryo include the nucleolar chromatin and the associated ribonucleoprotein fibrillar component. Further studies on the evaluation of enzymes in the protein fraction of the quiescent nucleoli are in progress.

Zusammenfassung. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Küchenzwiebel *Allium cepa* L. haben einen unterschiedlichen Aufbau der Nukleoli aus Wurzelspitzenzellen und derjenigen aus Kotyledonenspitzenzellen ergeben.

A. K. BAL and J. F. PAYNE¹⁸

*Department of Biology,
Memorial University of Newfoundland, St. John's
(Newfoundland, Canada), 8 November 1971.*

¹⁵ R. DELTOUR and R. BRONCHART, *Planta* 97, 197 (1971).

¹⁶ J. GONZALEZ-RAMIREZ, M. ZUÑIGA and B. A. NUÑEZ, *Bol. Inst. Estud. med. biol. Univ. nac. Méx.* 17, 51 (1959).

¹⁷ A. K. BAL, in preparation.

¹⁸ The authors wish to acknowledge the technical help of Mr. I. ATKINSON and Mrs. M. BRASSARD. Supported by a grant from National Research Council of Canada No. 6207. Studies in Biology, Memorial University of Newfoundland No. 307.

Hemmung der cancerogenen und toxischen Wirkung von Diäthylnitrosamin auf die Rattenleber¹

Intraperitoneale Injektionen von allogenen Geweben sensibilisierten die Transplantatabwehr gegen die nachfolgende Implantation von Impftumoren bei Mäusen und Ratten so eindrucksvoll², dass versucht wurde, dieses Verfahren prophylaktisch auch gegen Tumoren anzuwenden, die chemisch induziert werden. Bei Verwendung verschiedener Gewebe hat sich Thymus besonders bewährt.

Im folgenden werden Versuche beschrieben, die beweisen, dass i.p. Injektionen von homologem Thymusgewebe Ratten sowohl weitgehend gegen den toxischen Einfluss von Diäthylnitrosamin (DÄNA) auf die Leber schützen als auch die Carcinogenese durch diese Substanzen in der Leber hemmen.

Versuchsordnung. 33 männlichen Sprague-Dawley-Ratten von etwa 150 g Körpergewicht wurden jeweils der ganze Thymus einer gleichartigen Ratte im Abstand von 1 Woche dreimal i.p. injiziert. Dazu wurde der Thymus einem frisch getöteten Tier entnommen und mit einer Tuberkulinspritze mit Hilfe von etwa 1/2 ml physiologischer Kochsalzlösung durch eine Flügelnadel Nr. 14 in die freie Bauchhöhle injiziert. 1 Woche nach der letzten Thymusinjektion bekamen die so vorbehandelten Ratten gleichzeitig mit 30 gleichen, aber unbehandelten Kontrolltieren 400 mg DÄNA per kg Rattengewicht in Trinkwasser.

Dazu wurde das DÄNA zu 75 mg in je 1 l Wasser gelöst. Entsprechend dem Gesamtgewicht der 63 Ratten von 9,4 kg wurden 3,76 g DÄNA in 50 l Trinkwasser verbraucht. Diese Menge wurde in 30 Tagen ausgetrunken und es entfielen auf jede Ratte von 150 g Gewicht 60 mg DÄNA. Die Trinkmenge und damit die Dosis des Carcinogens war in der unbehandelten und in der vorbehandelten Gruppe gleich. Danach bekamen alle Ratten reines Trinkwasser. Als Futter dienten Altromin-Presslinge.

Während der DÄNA-Trinkperiode blieb das Gewicht in beiden Tiergruppen konstant. Nach Absetzen des DÄNA, also nach 1 Monat, nahmen alle Tiere bei beiden Gruppen langsam an Gewicht zu. Diese Tiere wurden zu verschiedenen Zeiten danach getötet, die inneren Organe in Formalin fixiert und histologisch untersucht.

Die Untersuchung der Leber zeigte bei den 30 unbehandelten Kontrolltieren 14 Carcinome und schwere De-

¹ Die Arbeit wurde durch die Ludwig-Boltzmann-Gesellschaft zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung in Österreich unterstützt.

² M. WEISSBERG, *Öst. Z. Erforsch. Bekämpf. Krebskrankheit* 26, 92 (1971).

Zahl der Ratten, Geschlecht, Gewicht, Behandlung	Leberdegeneration	Anzahl der Carcinome	Tag der Tötung nach Beginn des Trinkwasserversuches mit DÄNA*
33, ♂, 150 g, vorbehandelt	leicht bis mässig	0	280, 285, 295, 295, 300, 300, 305, 315, 320, 330, 330, 360, 360, 365, 365, 365, 365, 365, 365, 370, 370, 370, 370, 370, 380, 400, 405, 410, 410, 415, 430
30, ♂, 150 g, unbehandelt	schwer	14	270, 270, 270, 270, 270, 270, 275, 275, 275, 275, 275, 275, 280, 280, 315, 330, 335, 335, 360, 365, 365, 365, 370, 370, 370, 370, 370, 375, 380

*Unterstrichen sind Tage, an denen die Carcinome bei den unbehandelten Kontrollen aufgefunden wurden.

generationen, wie sie in der Literatur nach DÄNA beschrieben sind^{3,4}. Bei den mit Thymusinjektionen vorbehandelten Ratten fanden sich keine Carcinome, ein nur geringes Ausmass an Degenerationen und als Zeichen einer abgelaufenen Parenchymschädigung atrophische Bezirke und Leberregenerate. Diese Befunde sind in der Tabelle zusammengestellt. Die Untersuchung zeigte, dass toxische Leberdegenerationen noch progredient sind, wenn die Vergiftungsperiode viele Monate oder 1 Jahr zurückliegt und nicht nur von der Dosis abhängen. Denn die Leberschädigungen sind bei den später getöteten Tieren schwerer und ausgedehnter als bei den früher getöteten.

Es ist eine gewisse Reaktionslosigkeit des Organismus dem angewandten Carcinogen gegenüber erkennbar, während die vorbehandelten Tiere gegenüber der toxischen Einwirkung stärkere Reaktivität und Regenerationsbereitschaft der Leber zeigten. Es führen nämlich die Degenerationen des Leberparenchyms zu Nekrobiosen, ohne dass eine zelluläre Reaktion darauf erkennbar wäre, während bei den vorbehandelten Tieren in solchen Fällen eher eine Ansammlung von Kupferschen Sternzellen und Regenerate von Zellbalken zu finden sind. Der Schutz, den die beschriebene Vorbehandlung hinsichtlich des Leberparenchymschadens und der Carcinomentstehung ausübt, ist möglicherweise einer immunologischen Sensibilisierung gegen neu auftretende Zellmutanten zuzuschreiben. Denn die hier beobachteten praecancerösen Parenchymveränderungen wurden in der Literatur wiederholt

beschrieben als Folge von Mutationen im genetischen Apparat der Zelle, welche zu Regulationsstörungen wie Enzymdefekten und Spezifitätsänderungen führen⁵⁻⁷.

Summary. Rats treated by i.p. injections of a homologous thymus are protected, probably by greater reactivity, against the toxic and carcinogenic influence of diethylnitrosamine on the liver, effects that increase with time in untreated controls, long after cessation of drug administration, as is shown by the greater extent of degeneration in animals killed at longer than at shorter intervals.

M. WEISSBERG

*Institut für Krebsforschung der Universität Wien,
Borschkegasse 8a, A-1090 Wien (Österreich),
16. Dezember 1971.*

³ R. GRUNDMANN und H. SIEBURG, *Beitr. path. Anat.* 126, 57 (1962).

⁴ G. BADER, D. STILLER, K. ULLRICH, *Arch. Geschwulstforsch.* 37, 327 (1971).

⁵ W. GÖSSNER und FRIEDRICH-FREKSA, *Z. Naturforsch.* 19b, 1862 (1964).

⁶ A. SCHAUER und E. KUNZE, *Z. Krebsforsch.* 70, 252 (1968).

⁷ P. BANNASCH, *Cytoplasm of Hepatocytes* (Springer Verlag, Berlin 1968).

The Effect of Membrane-Active Agents on the Mitotic Frequency in Normal and Carcinogen-Treated Epithelium

In previous studies, the effect of membrane-active substances on hamster cheek pouch carcinoma induced with 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) was investigated and it was shown that topical vitamin A palmitate resulted in increased tumour formation¹⁻⁴. It was proposed that this co-carcinogenic effect might be related to the membrane-labilizing properties of this vitamin, resulting in activation and release of lysosomal enzymes, which may play an important role in the initial stages of cell division and tumorigenesis^{5,6}.

Subsequent studies, using the membrane-stabilizing agents cortisone acetate and chlorpromazine, known to suppress mitotic activity^{7,8}, demonstrated inhibition of DMBA carcinogenesis in the hamster cheek pouch^{9,10}. This effect was interpreted as being related to the membrane-stabilizing properties of these agents.

In the present study, the effect of the above membrane-active substances on the mitotic frequency was investigated in normal and DMBA-treated hamster cheek pouch epithelium, in order to determine whether there is a relation between the effect of these substances on the mitotic frequency, and their promotion or inhibition of tumour formation.

Material and methods. Groups of 4 male Syrian golden hamsters, 55–65 g body wt., were treated during 12 weeks with the following substances or combinations: liquid paraffin; DMBA 0.5% in liquid paraffin; vitamin A palmitate 20% in liquid paraffin; cortisone acetate 0.05% in liquid paraffin; chlorpromazine 1.2% in liquid paraffin; DMBA 0.5% and vitamin A palmitate 20% in liquid paraffin; DMBA 0.5% and cortisone acetate 0.05% in liquid paraffin; DMBA 0.5% and chlorpromazine 1.2% in liquid paraffin.

The solutions and suspensions were administered 3 times per week to the right cheek pouch with a paint brush. At the end of the experimental period the animals were sacrificed. Groups of untreated animals served as controls. 4 h prior to sacrifice each animal received an i.p. injection of vinblastine (0.5 mg/100 g body weight, as a 0.1% solution in saline), which facilitates easier visualization of mitoses in the epithelium¹¹.

Histological sections of the treated cheek pouches were stained with hematoxylin and eosin, and were studied at a magnification of $\times 400$. The epithelial layer was brought in the equator of the microscopic field, and the number of mitoses in this field was counted. This was repeated for 20 consecutive microscopic fields, excluding fields containing tumour tissue.

Results. The number of mitoses per microscopic field was determined in each animal, and the average values per microscopic field for each group (i.e. the average number of mitoses in 20 microscopic fields in each of 4 animals)

¹ A. POLLIACK and I. S. LEVIJ, *Nature, Lond.* 216, 187 (1967).

² I. S. LEVIJ and A. POLLIACK, *Cancer* 22, 300 (1968).

³ A. POLLIACK and I. S. LEVIJ, *Cancer Res.* 29, 327 (1969).

⁴ I. S. LEVIJ, J. W. RWOMUSHANA and A. J. POLLIACK, *Invest. Dermat.* 53, 228 (1969).

⁵ A. C. ALLISON, *Eur. J. Cancer* 3, 481 (1968).

⁶ A. C. ALLISON and L. MALLUCI, *Lancet* 2, 1371 (1964).

⁷ W. S. BULLOUGH, *J. Endocr.* 8, 265 (1952).

⁸ M. H. VAN WOERT and S. H. PALMER, *Cancer Res.* 29, 1952 (1969).

⁹ A. POLLIACK, I. S. LEVIJ and J. W. RWOMUSHANA, *Arch. Path.* 90, 494 (1970).

¹⁰ I. S. LEVIJ and A. POLLIACK, *Nature, Lond.* 228, 1096 (1970).

¹¹ I. N. CHERNOZEMSKI, *Cancer Res.* 28, 992 (1969).