

Sonderdruck

4/68

Seiten 322—371

**Internationale Zeitschrift
für
Klinische Pharmakologie,
Therapie und Toxikologie**

**International Journal
of
Clinical Pharmacology,
Therapy and Toxicology**

K. E. HAMPEL

Über die Wirkung von Zytostatica
auf die Chromosomen des Menschen

**URBAN & SCHWARZENBERG
MÜNCHEN - BERLIN - WIEN**

© Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1968
Alle Rechte, auch die des Nachdrucks, der photomechanischen
Wiedergabe und der Übersetzung, vorbehalten.

K. E. HAMPEL

Über die Wirkung von Zytostatika auf die Chromosomen des Menschen^{1,2}

Manuskript eingegangen am 25. 1. 1968 (Nr. 51)

Zusammenfassung (Translation see index-card)

Der Einfluß verschiedener Zytostatika auf die Chromosomenmorphologie menschlicher Leukozyten wurde *in vitro* und *in vivo* untersucht. Induzierte Strukturveränderungen an den Chromosomen wurden qualitativ und quantitativ erfaßt.

Amethopterin und Natulan lösten keine Chromosomenmutationen aus, ebenso wie Zyklophosphamid, dessen Umwandlungsprodukte nach Rattenpassage jedoch zu einer deutlichen Steigerung der Bruchfrequenz menschlicher Leukozytenchromosomen führten.

Alkylierende Substanzen, wie TEM, Trenimon, Thiotepea und A 2, wie auch Fluordesoxyuridin (FUDR) verursachten in der gegebenen Versuchsanordnung multiple Strukturschädigungen der Chromosomen, wie Chromatidbrüche, Isochromatidbrüche, Fragmente, Interchanges u. a. Bei diesen Verbindungen konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg der quantitativ faßbaren Chromosomenmutationen nachgewiesen werden, wobei der Prozentsatz der betroffenen Metaphasen exponentiell, die mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase linear anstieg.

Ein Vergleich der mittels Chromosomenanalysen quantitativ erfaßten zytogenetischen Wirkung zytostatischer Substanzen mit der jeweiligen therapeutischen Dosis beim Menschen bzw. der DL_{50}^1 der Ratte ergab eine größenordnungsmäßige Übereinstimmung. Qualitativ unterschiedliche Chromosomenmutationen wurden für alkylierende Substanzen einerseits und FUDR andererseits nachgewiesen. Die durch FUDR eintretenden chromosomalen Schädigungen wurden zusätzlich durch die Verwendung verschiedener Inkubationszeiten und durch die Kombination mit Thymidin, Uridin und Adenosin präzisiert.

Einige Möglichkeiten der Interchangebildung und verschiedene Anaphaseveränderungen werden erläutert.

Die Lokalisation der durch die verschiedenen Zytostatika induzierten Chromatidbrüche in drei gleich großen Chromatidsegmenten ergab eine ungleichmäßige Bruchverteilung nicht nur in den einzelnen Chromosomen bzw. Chromosomengruppen, sondern auch innerhalb der jeweiligen Chromatidsegmente. Distal vom Zentromer traten Brüche im allgemeinen am häufigsten, proximal am seltensten auf.

Bei zytostatisch behandelten Patienten ergaben Chromosomenanalysen ebenfalls eine über das Ausmaß der Kontrollen erhöhte Bruchfrequenz der Chromosomen.

Auf die Gefährdung des Erbgutes zytostatisch behandelter Patienten in fortpflanzungsfähigem Alter wurde besonders verwiesen.

¹ Aus der I. Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin (Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. H. Frhr. v. Kress).

² Der Hohen Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin vorgelegt als Habilitationsschrift.

Inhalt

| | |
|--|-----|
| Zusammenfassung | 322 |
| Einleitung | 324 |
| Literaturübersicht | 324 |
| Untersuchungen an menschlichen Chromosomen | 325 |
| Materialien und Methodik | 330 |
| Bewertung und Definition der Chromosomenanomalien | 331 |
| Ergebnisse | |
| Die Wirkung von Zytostatika auf menschliche Chromosomen in vitro | 334 |
| 1. Kontrollen | 334 |
| 2. Quantitative Chromosomenanalyse nach Einwirkung von Zytostatika | 334 |
| 3. Die Beeinflussung der FUDR-Wirkung durch Nukleoside | 342 |
| 4. Vergleichende zytogenetische Wirkung der Zytostatika | 344 |
| 5. Einige Möglichkeiten der Entstehung von Interchanges | 348 |
| 6. Die Wirkung von Endoxan und dessen Aktivierungsprodukten | 349 |
| 7. Die Wirkung von Amethopterin | 350 |
| 8. Die Lokalisation der durch Zytostatika induzierten Brüche | 351 |
| 9. Anaphasestudien | 355 |
| Die Wirkung von Zytostatika auf menschliche Chromosomen in vivo | 356 |
| Diskussion | 361 |
| Literatur | 365 |

Einleitung

Die Chromosomenanalyse kann als Teilgebiet der Zytologie aufgefaßt werden. MASSHOFF [168] schrieb unlängst: „Es ist kein Zweifel daran, daß die sich uns heute darbietenden Möglichkeiten zur Analyse zellulärer Erscheinungen und Äußerungen undenkbar wären ohne die systematische Forschung der der exakten Naturwissenschaft näherstehenden biologischen Fächer.“

Wenn daher im folgenden der Versuch unternommen wurde, einige Chromosomenveränderungen bei menschlichen Leukozyten unter der Einwirkung von Zytostatika zu schildern, so wird man sich vergegenwärtigen müssen, daß diese Untersuchungen einmal auf den zahlreichen Ergebnissen vorwiegend der Zytogenetik, insbesondere an pflanzlichen und tierischen Organismen und Zellen, fußen. Andererseits ist der Genetiker imstande, an geeignetem Material (z. B. *Drosophila* oder bestimmten Bakterienstämmen) mit geeigneten Methoden Ergebnisse zu liefern, die einen exakten und weitaus intensiveren Einblick in die durch Zytostatika induzierten Veränderungen ergeben, als dies zur Zeit bei menschlichen Chromosomen möglich ist. Daher sollen sich die folgenden Untersuchungen im wesentlichen auf klinisch gebräuchliche Zytostatika sowie auf Fragestellungen beschränken, die für Mediziner von Interesse sein mögen.

Literaturübersicht

Unter dem Begriff „Zytostatika“ werden Substanzen zusammengefaßt, die das Zellwachstum zu hemmen vermögen [107]. Übersichten über Testmethoden bei 36, 38, 61, 88, 230 u. a., über Wirkungsweise bei 36, 38, 50, 61, 62, 80, 106, 122, 145, 151, 155, 163, 200, 201, 205, 219, 220, 234, 244, 250, 251 u. a.

Seit der Entdeckung von AUERBACH [5] im Jahre 1943, wonach Senfgas bei *Drosophila* die spontane Mutationsrate erheblich zu steigern vermag, wurden zahlreiche Zytostatika an tierischen und pflanzlichen Testobjekten mit verschiedenen genetischen und zytologischen Methoden geprüft, so u. a.: Senfgas: 7, 9, 11, 54, 110, 136, 147, 166, 169, 183, Hydrolyseprodukte des Senfgases: 10, Stickstofflost: 8, 31, 81, 120, 137, 139, 156, 157, 180, 208, 250, 252, Dichlordiäthylmethylaminhydrochlorid: 98, 109, Sarkolysin: 29, 72, N,N-Di-(chloräthyl)-p-toluidin bzw. -anisidin: 29, Chlorambuzil: 180, Melphalan: 73, Di-(chloräthyl)-thienyl-2-amin und Di-(chloräthyl)-5-methylthienyl-2-amin: 142, verschiedene Lostderivate: 73–75, 137, 202, Endoxan: 3, 26, 123, 172, Mitomen: 108, 172, Thiotepa: 162, 180, Chinon I: 15, 108, 161, E 39: 26, 60, TEM: 13, 28, 41, 42, 43, 44, 66, 67, 68, 69, 70, 121, 123, 158, 173, 180, 182, 196, 203, 204, 248, 249, 250, Trimetholmelamin: 218, Myleran: 171, 176, 177, 180, 199, 215, Dimethylmyleran: 216, 217, Epoxide: 29, 30, 144, 156, 181, 208, 210, 250, β -Propiolakton: 228, 229, 239, 2-Äthylenimino-4,6-dimethoxy-5-triazin: 28, Methansulfonate: 71, 72, 77–79, 152, 153, 156, 184, 199, 214, N-Nitroso-N-methylurethan: 128, 129, 1-Methyl-2-benzyl-hydrazinphosphat: 222, Aktinomycin D: 3, 114, 178, 238, Mitomycin C: 170, Amethopterin: 125, 163, Aminopterin: 242, 5-Bromurazil: 14, 24, 163, 237, 5-Bromdesoxyuridin: 112, 113, 122, 133, 140, 141, 232, 5-Fluorodesoxyuridin: 17, 25, 64, 123, 124, 130, 131, 133, 241, 242, 243, Desoxyadenosin: 132.

Untersuchungen an menschlichen Chromosomen

Chromosomenaberrationen menschlicher Zellen nach Einwirkung von *ionisierenden Strahlen* sind häufig beschrieben worden.

Einige Veröffentlichungen sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

Nachgewiesen wurden Chromatid-Chromosomen-Brüche, azentrische Fragmente, dizentrische und Ringchromosomen sowie Interchanges. Wie bereits auch schon an Chortophaga-Neuroblasten und bei *Tradescantia* von LEA [146] nachgewiesen wurde, konnten BENDER u. GOOCH [22] auch bei menschlichen Leukozyten *in vitro* zeigen, daß die Häufigkeit strahleninduzierter Brüche linear mit der Dosis ansteigt.

An embryonalen Lungenzellen (Lu 106 und HEL) wurde nachgewiesen, daß *Kälteeinwirkung* auf Langzeitkulturen zu Chromosomenaberrationen führen kann (HAMPEL u. LEVAN 1964 [103]).

Auch *Viren* induzierten Strukturveränderungen an den Chromosomen menschlicher Zellen. So wiesen NICHOLS, LEVAN, HALL u. ÖSTERGREN 1962 [192] an peripheren Leukozyten von *Masern*patienten nach, daß hier die Bruchfrequenz deutlich erhöht war (33–72 % aller Metaphasen wiesen einen oder mehrere Brüche auf), wobei es sich zumeist um Isochromatidbrüche (verzögerte Isolokusbrüche nach ÖSTERGREN u. WAKONIG [197]) gehandelt haben soll. Am 3. bis 8. Tag der Masernerkrankung wurde das Maximum der Veränderungen gesehen. NICHOLS 1963 [186] konnte darüber hinaus auch nachweisen, daß die Applikation von Masernvaccine bei nachweisbar immunisierten oder nicht immunisierten Patienten die Bruchhäufigkeit der Leukozytenchromosomen gegenüber den Kontrollen ebenfalls erhöht. Dies galt auch für Kulturen, die mit Masernviren infiziert wurden (Lu 106, HEL, embryonale Nierenzellen sowie Kurzzeitkulturen von Leukozyten: NICHOLS, LEVAN, AULA u. NORRBY 1964 [189]). Die Verteilung der durch Masernviren induzierten Brüche in den einzelnen Chromosomen bzw. in deren Segmenten wurde von NICHOLS, LEVAN u. KIHLMAN 1964 [193] untersucht. Demgegenüber konnten TANZER, HAREL u. BOIRON [240] bei Masernkranken und 644 ausgewerteten Metaphasen keine gesteigerte Bruchfrequenz der Chromosomen nachweisen. Im Gegensatz zu NICHOLS u. Mitarbeitern benutzten sie die Lufttrockentechnik. Auch bei anderen Virusarten wurde eine er-

höhte Bruchrate der menschlichen Chromosomen gefunden, z. B. *Herpes-simplex-Virus* (STICH, HSU u. RAPP [236]) und *Varizellenvirus* (AULA [12]).

JACKSON [116] fand nach Zusatz von *8-Äthoxykoffein* zu Leukozytenkulturen in einer Konzentration von 4–5 mMol und einer Einwirkungszeit von 12 Stunden mit anschließender Erholungsphase von 24 Stunden zahlreiche Chromatidbrüche, mehrere azentrische Fragmente, vereinzelt Monosomie etc. sowie Interchanges. Bei einer Konzentration von 4 mMol wurden 38 %, bei 5 mMol 52 % der bewerteten Metaphasen von Strukturanomalien betroffen.

Chromosomenmutationen durch *Zytostatika* sind auch bei menschlichen Zellen wiederholt beschrieben worden.

Folgende Publikationen konnten gefunden werden.

1. Im Jahre 1961 berichteten CONEN u. LANSKY [52] über das Auftreten von Chromatidbrüchen, Fragmenten und dizentrischen Chromosomen bei einem Patienten mit Bronchuskarzinom, der 4 Tage jeweils 12 mg Stickstofflost erhalten hatte. Es ist allerdings zu erwähnen, daß der Patient zuvor eine geringe Strahlendosis durch Röntgenaufnahmen des Thorax einschließlich Tomogramm und vielleicht auch durch einen Radiojodtest erhalten hatte, da bei ihm eine Hypothyreose diagnostiziert worden war.

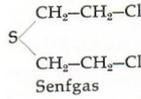
2. ARRIGHI, HSU u. BERGSAGEL [4] veröffentlichten 1962 Ergebnisse von Chromosomenanalysen bei 4 Endoxanbehandelten Patienten mit malignen Erkrankungen. Von diesen hatten jedoch drei eine der zytostatischen Behandlung vorausgehende Strahlentherapie (4850, 14910 u. 5000 ROD), so daß die bei ihnen gefundenen Strukturveränderungen nicht allein auf die Chemotherapie zurückgeführt werden können. Übrig bleibt daher lediglich ein nicht zuvor bestrahlter Patient mit undifferenziertem Sarkom, der allein mit Endoxan behandelt worden war. Bei unbekannter Applikationsform betrug die Gesamtdosis 3,5 g bei einer Tagesdosis von 250 mg im Verlaufe von 14 Tagen. Nach weiteren 14 Tagen wurde nochmals 1 g intravenös verabfolgt. 23 Tage nach dieser letzten Gabe wurde Blut zur Leukozytenkultur entnommen. Es handelte sich somit um eine nicht optimale und intermittierende Therapie. Bei der quantitativen Auswertung von 35 Metaphasen wurden einmal ein dizentrisches Chromosom, zweimal ein

Tabelle 1. Strukturformeln.

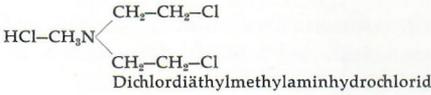
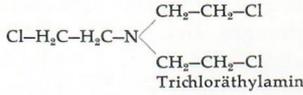
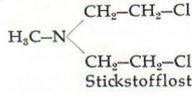
Alkylierende Substanzen

Di- bzw. trifunktionelle Verbindungen

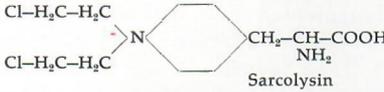
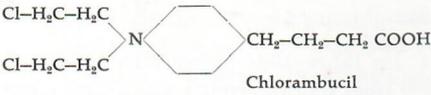
a) Chloräthylsulfidgruppe (S-mustards):



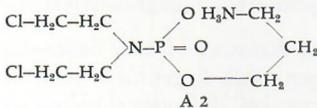
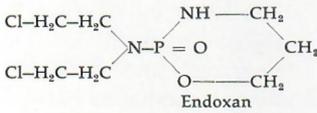
b) Chloräthylamingruppe (N-mustards, Lostderivate):
aliphatische



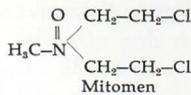
aromatische



Cyclophosphamide

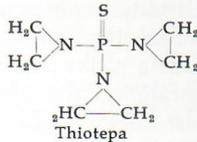


N-Oxyd-Lost

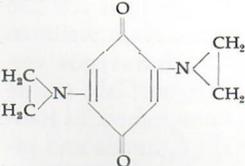


c) Äthylenimine:

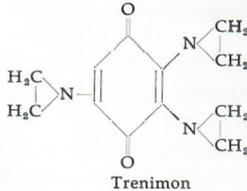
Phosphoramide



Chinone

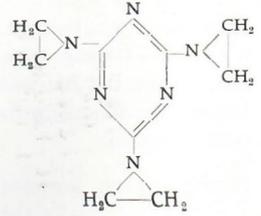


Chinon I
davon abgeleitet: E 39:
zusätzlich 2 Propoxygruppen
in 2,5 Position



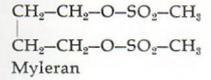
Trenimon

Triazine

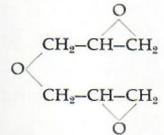


TEM

d) Methansulfonyxyde:



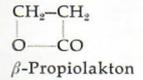
e) Epoxide:



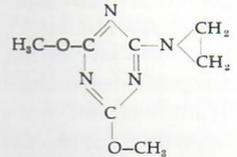
2,3,2',3'-Diepoxypropyläther

Monofunktionelle Verbindungen

a) β -Propiolakton:

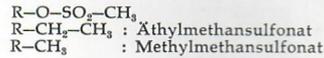


b) Äthylenimide:



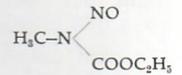
2-Äthylenimino-4,6-dimethoxy-5-triazin

c) Methansulfonate:

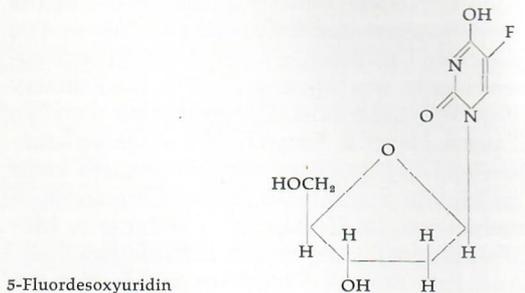
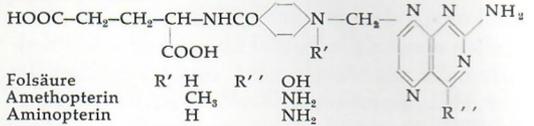


d) N-nitroso-N-methylurethan.

N-nitroso-N-methylurethan



Antimetaboliten



5-Fluorodesoxyuridin

azentrisches Fragment, 2 Chromatidbrüche und eine nicht näher differenzierte Abnormität gefunden. Die mittlere Aberrationsrate pro Metaphase betrug 0,17. Die Bruchfrequenz bei den mit ionisierenden Strahlen vorbehandelten Patienten war erwartungsgemäß deutlich höher. Ein Vergleich mit unbehandelten Kontrollen wird nicht gegeben.

3. Ebenfalls im Jahre 1962 beschrieben WAHRMAN, SCHAAP u. ROBINSON [246] vielfältige Chromosomenaberrationen bei einer Patientin mit fraglicher chronischer myeloischer Leukämie. Im Jahre 1947 wurde zunächst eine Polyzythämie diagnostiziert, die im selben Jahre und nochmals 1952 mit einer Ganzkörperbestrahlung unbekannter Dosis behandelt wurde. 1953 wurde Radiophosphor und 1957 zusätzlich Radiojod wegen einer Thyreotoxikose gegeben. Seit 1958 entwickelte sich eine Leukozytose bis 30 000/mm³, davon 63 % Segmentkernige, 11 % Stabkernige, 3 % Metamyelozyten, 2 % Promyelozyten. 1958/59 wurden insgesamt 2700 R OD auf ein Feld der Milz verabreicht. August bis Oktober 1960 wurden 4 mg/die Myleran gegeben. Februar und Juli 1961 wurde Blut zur Chromosomenanalyse entnommen. Zu dieser Zeit war die alkalische Leukozytenphos-

phatase zwar erniedrigt, da aber das Knochenmark als hypoplastisch angegeben wurde, ein Ph¹-Chromosom nicht nachgewiesen werden konnte und eine Knochenbiopsie mit entsprechender Färbung der Schnitte zum Ausschluß einer Osteomyelofibrose nicht durchgeführt wurde, kann man die gestellte Diagnose nicht als gesichert bezeichnen.

Sämtliche analysierten Metaphasen wiesen Strukturveränderungen der Chromosomen auf, z. B. „Riesenchromosomen“ mit abnormen Armproportionen, azentrische Fragmente, dizentrische Chromosomen usw. Von den Autoren wurde diskutiert, ob es sich um primäre Veränderungen der von ihnen angenommenen Leukämie oder um sekundäre Veränderungen nach Strahlenbehandlung und Myleran handelte.

Während der Zeit, in der die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente durchgeführt wurden (Anfang 1963 bis Mitte 1965), erschienen folgende Arbeiten:

4. COHEN [47] beschrieb Chromosomenaberrationen bei menschlichen Leukozyten in vitro durch Streptonigrin, einem Präparat aus *Streptococcus flocculus*, welches klinisch wegen der hohen Toxizität bei geringer therapeutischer

Tabelle 2. Arbeiten über Chromosomenmutationen beim Menschen durch ionisierende Strahlen.

| Autoren | Bestrahlungsmodus | Strahlenquelle | untersuchtes Material |
|--|---------------------------|--|---|
| AMAROSE 1964 [1] | in vivo-Therapie | Röntgen | Leukozyten |
| BELL u. BAKER 1962 [16] | in vitro | Röntgen | Leukozyten |
| BENDER 1957 [18] | in vitro | Röntgen | „epitheloide Nierenzellen“ |
| BENDER u. GOOCH 1962 [19] | in vitro | Röntgen | Leukozyten |
| BENDER u. GOOCH 1962 [20] | in vivo Strahlenunfall | Gamma- u. Neutronenzerfallsstr. | Leukozyten |
| BENDER u. GOOCH 1963 [21] | in vivo Strahlenunfall | Gamma- u. Neutronenzerfallsstr. | Leukozyten |
| BENDER, GOOCH u. PRESCOTT 1962 [23] | in vitro | Röntgen | Leukozyten |
| BLOOM u. TIJO 1964 [31] | in vivo-Diagnostik | ³ H-markierte Nukleoside | Leukozyten |
| BÖÖCK, FRACCARO, FREDGA u. LINDSTEN 1962 [33] | in vitro | Röntgen | Leukozyten |
| BOYD, BUCHANAN u. LENNOX 1961 [35] | in vivo-Therapie | Radiojod | embryonale Lungen- u. Gehirnzellen |
| BUCKTON, JACOBS, COURT BROWN u. DOLL 1962 [40] | in vivo-Therapie | Röntgen | Leukozyten |
| CHU, GILES u. PASSANO 1961 [46] | in vitro | Röntgen | fibroblastenähnliche Zellen aus chirurg. Material |
| CONEN 1961 [51] | in vivo-Diagnostik | Röntgen | Leukozyten |
| DE GROUCHY, VALLÉE u. LAMY 1963 [57] | in vitro | Röntgen | Leukozyten |
| LINDGREN u. NORRYD 1962 [150] | in vivo-Therapie | Röntgen | Leukozyten |
| NEWCOMBE u. COHEN 1963 [185] | in vivo-Therapie | Röntgen | Leukozyten |
| STEWART u. SANDERSON 1961 [190] | in vivo-Diagnostik | Röntgen | Leukozyten |
| TOUGH, BUCKTON, BAIKIE u. COURT BROWN 1960 [245] | in vivo-Therapie | Röntgen | Leukozyten |
| WAHRMAN u. ROBINSON 1963 [247] | in vivo-Therapie | Röntgen | Leukozyten |
| WAHRMAN, SCHAAP u. ROBINSON 1962 [246] | in vivo-Therapie | Radiophosphor Radiojod | Leukozyten |

Breite bisher in größerem Umfang nicht verwandt worden ist. 500 Brüche der Chromosomen 1, 2 und 3 wurden ausgewertet, dabei waren 142 Zellen einer 6stündigen und 288 einer 12- bis 36stündigen Einwirkung der Substanz ausgesetzt. Die Auswertung erfolgte visuell bei 1500facher Vergrößerung im Phasenkontrastverfahren. Die betrachteten Chromosomen wurden in 11 gleich große Segmente unterteilt (5 für jeden Arm und eines für die perizentrische Region). Die erwartete und die tatsächlich gefundene Bruchfrequenz der Segmente wurde bestimmt. Im Gegensatz zu den röntgenbestrahlten Kulturen wurde keine gleichmäßige Verteilung der Brüche in den untersuchten Chromosomen gefunden. Vielmehr zeigte sich eine über den auf Grund der relativen Länge erwarteten Wert hinausgehende Zahl von Brüchen im Chromosom Nr. 1 bei einem entsprechenden Mangel im Chromosom Nr. 3. Die untersuchten Chromosomensegmente verhielten sich wie folgt: Im Chromosom Nr. 1 entfielen die meisten Brüche (51 %) auf die perizentrische Region, d. h. in die Gegend der sekundären Konstriktion der langen Arme. Auch bei dem Chromosom Nr. 2 war das perizentrische Segment mit 39 % am häufigsten von Brüchen betroffen. Als relativ bruchresistent erwies sich der kurze Arm, der bei einem Chromatinanteil von 35 % nur einen Bruchteil von 9,5 % aufwies. Die Bruchverteilung im Chromosom Nr. 3 war nicht signifikant verschieden von einer gleichmäßigen Verteilung, lediglich die Telomerregionen erwiesen sich als relativ bruchresistent.

5. In einer weiteren Arbeit berichteten COHEN, SHAW u. CRAIG [49] über folgende streptonigrininduzierte Strukturanomalien:

a) Chromatidbrüche, b) Isochromatidbrüche, c) azentrische Fragmente, d) dizentrische Chromosomen, e) Translokationen, f) Zentromerveränderungen, g) End-zu-End-Fusionen der Chromatide eines Chromosoms, h) „Chromosomenstickiness“, i) Spiralisationsstörungen und k) schwere allgemeine Fragmentation des gesamten Chromatidmaterials.

Bei einer Konzentration von 0,001 µg/ml und 24stündiger Einwirkung war die mittlere Bruchfrequenz pro Zelle 0,4, bei 0,01 µg/ml gleich 1,42, bei 12stündiger Einwirkung von 0,1 µg/ml 2,82. Die Bruchfrequenz stieg mit der Konzentration und der Dauer der Einwirkung. Relativ selten wurden Brüche in den Chromosomen der

Gruppen 19–20 und 21–22, Y gefunden (erwartet: 34, gefunden: 7).

6. ELVES, BUTTOO, ISRAELS u. WILKINSON 1963 [63] sahen bei drei Patienten mit akuter Myeloblastenleukämie nach 6-Azauridin-Therapie (10 mg die) eine verstärkte Aneuploidie, vereinzeltes Auftreten von Fragmenten und dizentrischen Chromosomen sowie in mehreren Metaphasen hochgradig geschrumpfte und strukturell veränderte Chromosomen mit „Brückenbildungen“, die sich nicht näher analysieren ließen.

7. JACKSON 1963 [115] setzte Leukozytenkulturen β -Merkaptoäthanol zu und beobachtete dadurch induzierte C-Mitosen, Polyploidie, Endoreduplikation und strukturelle Chromosomenveränderungen, wie Fragmentation, Translokationen und die von LEVAN [147] bei *Allium cepa* beschriebenen Erosionen.

8. Auch β -Merkaptopyruvat (JACKSON u. LINDAHL-KIESSLING 1963 [118]) verursachte in derselben Versuchsanordnung eine Neigung der Zellen zu Polyploidie und Endoreduplikation.

9. KIHLMAN, NICHOLS u. LEVAN 1963 [134] konnten zeigen, daß Desoxyadenosin und Zytosinarabinosid bei menschlichen Leukozytenkulturen multiple Chromatidbrüche auslöst, und zwar nach 1- bis 8stündiger Einwirkung von Zytosinarabinosid und 2- bis 8stündiger Einwirkung von Desoxyadenosin. Das Maximum der Veränderungen lag bei 4stündiger Applikation. Vereinzelt traten auch Interchanges auf. Obwohl quantitative Angaben nicht gemacht wurden, fiel den Untersuchern auf, daß die meisten Brüche an den Chromosomenenden auftraten. Setzte man gleichzeitig mit Desoxyadenosin auch Desoxyzytidin oder Desoxyguanosin den Kulturen zu, so war die Bruchfrequenz nach Desoxyadenosin deutlich herabgesetzt.

10. KRONE, WOLF u. FOULADWAND 1963 [143] setzten menschliche Fibroblasten in Langzeitkultur 2–10 Tage und Leukozytenkulturen 72 Stunden einer Konzentration von 10–25 µg/ml Hydroxylamin bzw. 10–100 µg/ml Bromdesoxyuridin (BUDR) aus. Folgende gleich große Segmente der Chromosomen wurden unterschieden: Nr. 1: je drei für die langen und die für die kurzen Arme; Nr. 2: 3 für die langen, 2 für die kurzen Arme; Nr. 3: je drei für die langen und die kurzen Arme; Nr. 4–5, 6–12, X und 13–15 je drei für die langen Arme.

Es ergab sich, daß die Brüche wiederum nicht gleichmäßig über den Chromosomen verteilt waren. So waren beispielsweise die Chromosomen Nr. 1–3 weniger häufig betroffen, als auf Grund ihrer relativen Länge zu erwarten war. Nach Hydroxylamin war die perizentrische Region dieser Chromosomen häufiger befallen als nach BUDR. Die Maxima der Bruchfrequenz der Gruppen 6–12, X und 13–15 lagen bei beiden Substanzen im mittleren Abschnitt der langen Arme. Im Bereich der sekundären Konstriktion des Chromosoms Nr. 1 lagen die meisten hydroxylamininduzierten, in der Konstriktion der kurzen Arme der B-Gruppe lagen die meisten BUDR-induzierten Brüche.

11. Von COHEN u. SHAW 1964 [48] wurde das Antibiotikum Mitomycin C aus *Streptomyces caesepitosus* an menschlichen Leukozyten getestet. Bei 24stündiger Einwirkung betrug die verwandten Konzentrationen 0,1, 1,0 und 5,0 $\mu\text{g/ml}$ Kulturmedium. Es wurden ein Abfall der Mitoserate, Brüche (bei 0,1 $\mu\text{g/ml}$ 0,75 und bei 1,0 $\mu\text{g/ml}$ 2,3 Brüche pro Metaphase im Durchschnitt) und Interchanges beobachtet. Die Brüche bevorzugten die sekundären Konstriktionen, wobei im Chromosom Nr. 1 56 %, Nr. 9 87 % und Nr. 16 58 % der Brüche des jeweiligen Chromosoms im Bereich der sekundären Konstriktion lokalisiert waren. Innerhalb der Chromosomen traten Brüche häufiger in Nr. 1, 9, 16 und seltener in Nr. 2, 4–5, 13–15, 21–22, Y auf, als auf Grund der relativen Längen zu erwarten war. 60,2 % der Interchanges betrafen homologe Chromosomen, wobei an die Wahrscheinlichkeit eines somatischen Crossing over gedacht wurde.

12. HAMPPEL u. GERHARTZ 1964 [101] untersuchten die durch TEM verursachten Strukturveränderungen bei Leukozytenchromosomen. Über die Ergebnisse wird unten berichtet.

13. Dies gilt auch für die Arbeit HAMPPEL u. PALME 1964 [104] über Chromosomenaberrationen bei 2 behandelten Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie, wobei noch zu bemerken ist, daß es sich bei den damals beschriebenen „Sternfiguren“ um Interchanges handelt.

14. In einer weiteren Arbeit berichteten JACKSON u. LINDAHL-KIESSLING 1964 [119] über die Wirkung von Sulfhydrylgruppendonatoren (β -Merkaptoäthanol, β -Merkaptopyruvat, l-Zy-

stein und β -Merkaptoäthylamin). β -Merkaptoäthanol induzierte in einer Konzentration von $1 \times 10^{-4} \text{ ml/ml}$ (etwa $1,3 \times 10^{-3} \text{ Mol}$) Brüche, β -Merkaptoäthylamin und β -Merkaptopyruvat eine gehäufte Polyploidie bei Leukozytenchromosomen.

15. JACKSON u. KILLANDER 1964 [117] schließlich konnten zeigen, daß der mikrophotometrisch gemessene DNS-Gehalt der Zellen nach β -Merkaptoäthanol mit dem Ploidiegrad der Mitosen korrelierte, d. h. der DNS-Gehalt verhielt sich proportional zur Chromosomenzahl.

16. MAKINO und AWA 1964 [167] untersuchten die Leukozytenchromosomen von 4 zytostatisch behandelten Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie. Bei einer Patientin, die zuvor 12 g Endoxan, 100 mg Toyomycin, 46 mg Mitomycin, 910 mg Predomin, 270 mg Rinderon und 1030 E ACTH erhalten hatte, wiesen 12,8 % (5 von 39) der Metaphasen Brüche auf. Ein weiterer Patient, der eine unbekannte Dosis Mitomycin erhalten hatte, zeigten in 51,5 % (17 von 33) der Metaphasen Brüche. Der dritte Patient hatte eine Milzbestrahlung von 2400 R OD erhalten, die vierte Patientin schließlich wies nach insgesamt 504 mg Myleran bei 332 Metaphasen einen Prozentsatz von 55,5 mit Strukturanomalien auf. Hier fand man Chromatid- und Isochromatidbrüche, dizentrische Chromosomen, azentrische Fragmente und Interchanges.

17. MOORE, VAN CAMPENHOUT u. BRANDKAMP 1964 [174] untersuchten die Bruchfrequenz der Chromosomen folgender Patientengruppen:

a) Kontrollen: bei 250 Metaphasen keine Strukturanomalie, b) strahlenbehandelte Patienten (2500–9212 R): 0,18–1,25 % der Chromosomen wiesen Strukturveränderungen auf, c) bestrahlte und anschließend zytostatisch behandelte Patienten: 0–3,12 %, d) Patienten im Verlaufe einer zytostatischen Therapie (TEPA, TEPA u. Chlorambuzil, Chlorambuzil, Vincaläublastin, Phenylalaninlost, bei 2- bis 7monatiger Behandlungsdauer): keine Aberrationen, e) Patienten im Anschluß an eine zytostatische Therapie (Chlorambuzil, Phenylalaninlost, Methotrexat, Lost und Methotrexat und Phenylalaninlost, TEPA, 2 Wochen bis 4 Jahre nach der letzten Dosis): keine Aberrationen. Es wurden jeweils 35 Metaphasen pro Patient bewertet.

18. NICHOLS 1964 [187] wies bei menschlichen Leukozyten *in vitro* nach, daß Arabinosyladenin in einer Konzentration von 1×10^{-4} Mol bei 14–46 % und 3×10^{-4} Mol bei 54–66 % der Metaphasen „gaps and open breaks“ verursachte. Interchanges waren sehr selten.

19. Ähnliche Ergebnisse erzielten NICHOLS u. HENEEN 1964 [188] an einem diploiden Zellstamm aus embryonalem Lungengewebe bei Einwirkung von Arabinosylzytosin. Bei einer Konzentration von 1×10^{-5} Mol wiesen 62 bis 64 % der Metaphasen Brüche auf (Kontrollen 2–8 %). 2^{1/2} Monate nach einem 24stündigen Zusatz von 5×10^{-4} Mol waren immer noch zahlreiche Translokationen nachweisbar.

20. NICHOLS, LEVAN u. KIHLMAN 1964 [193] untersuchten die Bruchlokalisation nach Desoxyadenosin und Zytosinarabinosid an menschlichen Leukozytenchromosomen. Die Chromosomen wurden – soweit möglich – in 6 Segmente (1–6) unterteilt, drei für die kurzen und drei für die langen Arme. Sowohl bei den kurzen als auch bei den langen Armen war das telomernahe Segment bei vielen Chromosomen am häufigsten von Brüchen betroffen; dies wurde besonders deutlich in den Chromosomen Nr. 1, 2, 4–5, 6–12, X und 16.

21. NOWELL 1964 [194] prüfte die Wirkung von Mitomycin C an menschlichen Leukozytenchromosomen. Nach einstündiger Einwirkung wurde die Substanz durch Waschen entfernt. Vom Beginn der Kultur an gerechnet, wurde Mitomycin C nach 1, 24, 52 und 62 Stunden zugesetzt sowie 4 Stunden vor dem Abbruch der Kulturen. Die Behandlung mitotisch inaktiver Zellen mit Mitomycin C ergab Strukturanomalien der Chromosomen, jedoch keine Mitosehemmung. Vor oder während der DNS-Synthese-Phase behandelte Zellen wiesen wenige Chromosomenveränderungen und eine Mitosehemmung auf. In der G-2-Phase behandelte Zellen schließlich zeigten keine nachweisbaren Veränderungen. An Strukturanomalien wurden Chromatid- und Chromosomenbrüche, azentrische Fragmente und Interchanges nachgewiesen.

22. OSTERTAG u. KERSTEN 1965 [198] berichteten über Chromosomenaberrationen von Proflavin- und Aktinomycin-D-behandelten Zellkulturen. Untersucht wurden Kurzzeitkulturen menschlicher Leukozyten sowie Fibroblasten- und He-

La-Zellkulturen. Beide Substanzen führten bei einstündiger Einwirkung und Bearbeitung der Kulturen 24 Stunden danach zu zahlreichen Chromatidveränderungen einschließlich Translokationen. Die Aktinomycininduzierten Brüche betrafen vorwiegend die perizentrischen Regionen. Die Bruchfrequenz stieg annähernd linear mit der Dosis.

23. SHAW u. COHEN 1965 [227] wiesen an Leukozytenkulturen, die 24 Stunden mit 0,1 oder 1,0 µg/ml Mitomycin C behandelt worden waren, nach, daß 50 % der Interchanges tatsächliche oder vermutliche homologe Chromosomen meist der Nummern 1 oder 9 betrafen und daß vermutlich ein somatisches Crossing over vorliege.

Kurz erwähnt werden sollen noch zwei Beobachtungen bei zytostatisch behandelten Patienten, die eine erhöhte Bruchfrequenz der Leukozytenchromosomen aufwiesen, wo jedoch keine quantitativen Angaben über die vorher erhaltenen Zytostatika vorliegen: REISMAN u. TRUJILLO 1963 [206]: ein Kind mit chronischer myelöischer Leukämie nach 200 R Telekobaltbestrahlung der Milz, Myleran und 6-Merkaptopurin und SANDBERG, ISHIHARA, KIKUCHI u. CROSSWHITE 1964 [224]: ein Fall mit Lymphosarkomatose nach Vinkristin- und Chlorambuziltherapie. Hier wurden u. a. auch Ringchromosomen, Translokationen und „Markerchromosomen“ nachgewiesen.

Bei der Beurteilung der Bruchhäufigkeit leukämischer Leukozytenchromosomen ist schließlich die Arbeit von LÜERS, STRUCK u. ALBRECHT 1963 [165] zu beachten, die bei einer akuten Paramyeloblastenleukose ein Ringchromosom und mehrere dizentrische beobachten konnten, ohne daß eine Behandlung mit ionisierenden Strahlen oder Zytostatika vorausgegangen war. Die Autorinnen diskutierten daher die Möglichkeit, daß die Tendenz zu Chromosomenbrüchen eine Eigenschaft leukämischer Zellen sein könne.

Materialien und Methodik

Folgende Substanzen und Lösungen wurden verwendet:

Heparin (Liquemin, Deutsche Hoffmann-La Roche)
Bakto-Phythämagglutinin M (Difco)
TC Medium 199 (Difco)
Lösung nach HANKS

Natriumbikarbonatlösung (Salvia-Werk, Homburg)
 Orcein (Merck)
 Colcemide (Demekolzin, Desazetylmethylkolchizin, Ciba)
 Thymidin (Fluka)
 Hycel (Hycel Inc.)
 Uridin (Biochemical Research, Los Angeles 63)
 Adenosin (Biochemical Research, Los Angeles 63)

Getestet wurden folgende Zytostatika:

2, 4, 6-Triäthylenimino-1, 3, 5 triazin, Triäthylenmelamin, TEM (Hoechst) (über TEM wurde bereits in einer Arbeit berichtet ^[101]), 2, 3, 5-Tris-Äthyleniminobenzochinon-(1, 4), Trenimon (Bayer) N, N', N''-Triäthylthiophosphoramid, Thiotepa, TESP A (Lederle) N, N-Bis-(2-chloräthyl-) N', 0-propylenphosphorsäureesterdiamid, Zyklophosphamid, Endoxan, Cytosin (Asta)
 N, N-Bis-(2-chloräthyl)-0-(3-aminopropyl) phosphorsäureamidester, A 2 (Asta)
 4-Amino-N¹⁰-methylpteroylglutaminsäure, Amethopterin, Methotrexat (Lederle)
 5-Fluorodesoxyuridin, FUDR (Deutsche Hoffmann-La Roche) und N-isopropyl-alpha-(2-methylhydrazin) p-toluamid-hydrochlorid, Natulan, Ro 4-6467 (Deutsche Hoffmann-La Roche). Insgesamt 418 Kurzzeitkulturen menschlicher Leukozyten wurden unter Verwendung der von MOORHEAD u. Mit. ^[175] und ROTHFELS u. Mit. ^[221] angegebenen Methoden angesetzt und bearbeitet.

Als Spender sogenannter normaler Leukozyten dienten insgesamt 50 Patienten mit folgenden Krankheitsbildern: Ulcus ventriculi aut duodeni, chronische Hepatitis, Leberzirrhose, Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz verschiedener Genese, Hypertonie verschiedener Genese, Ornithose, Apoplexie, Asthma bronchiale, chronische Pankreatitis, Colitis ulcerosa, Diabetes mellitus und Hyperthyreose. Bevor die genannten Kranken als Spender für die vorliegenden Untersuchungen ausgewählt wurden, wurde durch Kontrollkulturen die spontane Bruchfrequenz ermittelt, um gegebenenfalls erhöhte Bruchzahlen, z. B. im Verlaufe von Virusinfekten, auszuschließen. Patienten mit Hämoblastosen, insbesondere wegen der Ausschwemmung leukämischer Zellen in das periphere Blut, ferner Kranke, bei denen eine Vorbehandlung mit ionisierenden Strahlen und Zytostatika vorge-

nommen worden war, wurden nicht als Spender herangezogen. Ebenso wurden jene Patienten ausgeschlossen, welche angeborene, mit Chromosomenanomalien einhergehende Krankheitsbilder aufwiesen. Zur Testung der Wirkung von Zytostatika auf menschliche Leukozyten in vivo wurden ebenfalls Kurzzeitkulturen peripherer Leukozyten von Patienten angesetzt, die behandelte chronische Myelosen sowie nicht-leukämische Hämoblastosen und Neoplasien anderen Ursprungs aufwiesen.

Jede Kultur erhielt zu Beginn möglichst exakt 10⁷ Leukozyten. Das Kulturmedium bestand aus 30 % autologem Plasma und 70 % Kulturmedium TC 199. Kulturen leukämischer Leukozyten erhielten parallel auch homologes Plasma gleicher Blutgruppe und wurden teilweise bereits nach 48 Stunden bearbeitet, während sonst die Bebrütungszeit 72 Stunden betrug. Kulturen sogenannter normaler Leukozyten erhielten zu wechselnden Zeitabständen, meist 24 Stunden vor der Bearbeitung, in 0,1 bis 0,5 ml Aqua bidest. gelöste Zytostatika in verschiedenen Konzentrationen. Es wurde darauf geachtet, daß die Substanzen vollständig in Lösung gingen.

Bei 24stündiger Einwirkung von Zytostatika wurde 4 Stunden, bei kürzerer Einwirkung (12, 8, 6, 3 Stunden) 1,5 Stunden vor Abbruch den Kulturen 0,004 mg/ml Desazetylmethylkolchizin zugesetzt.

Bewertung und Definition der Chromosomenanomalien

Jeweils 100 gut ausgebreitete Metaphasen wurden bei jeder einzelnen Kultur ausgewertet. Die Analyse erfolgte vorwiegend visuell bei 1280-facher Vergrößerung, wie dies bereits früher (HAMPEL u. LEVAN ^[103]) geschehen war. In der Zuordnung der Chromosomen zu folgenden Gruppen: 1, 2, 3, 4–5, 6–12, X, 16, 17–18, 19–20, 21–22, Y differierten die Ergebnisse der beiden Untersucher um einen Prozentsatz, der unter 1 lag, wobei der eine lediglich die mikroskopische Klassifizierung, der andere eine Zeichnung mittels Camera lucida vornahm. Metaphasen mit unklaren Veränderungen wurden photographisch festgehalten, um eine weitere Aussage in einzelnen Fällen zu ermöglichen, nachdem eine Handzeichnung der fraglichen Veränderung unter der Sicht des Auges vorher angefertigt worden war.

Unter maximalen Dosen von Zytostatika konnten in mehreren Kulturen lediglich 20 und mehr Metaphasen gefunden werden. Kulturen, bei denen weniger als 20 auswertbare Metaphasen gefunden wurden, galten als nicht auswertbar. Quantitativ erfaßt wurden die mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase, der Prozentsatz der von Strukturanomalien betroffenen Metaphasen sowie die Zahl der Chromatid-, Isochromatid- bzw. Chromosomenbrüche, die Zahl der Fragmente, die Interchanges und deren gezählte oder angenommene Bruchzahl, die dizentrischen Chromosomen und die vereinzelt auftretenden Ringchromosomen. Chromatidbrüche wurden als einfaches Bruchereignis ebenso wie einzelne Fragmente bewertet. Gedoppelte, azentrische Fragmente und dizentrische Chromosomen wurden als doppeltes Bruchereignis, Ringchromosomen als vierfaches angesehen. Bei Interchanges wurde zwischen analysierbaren und nicht analysierbaren unterschieden. Die Zahl der hinsichtlich ihrer Bruchfrequenz nicht analysierbaren Interchanges wurde mit einem Faktor multipliziert, der sich empirisch aus der mittleren Bruchfrequenz der analysierbaren Interchanges ergab. Bei höchsten Dosen zeigten einzelne Metaphasen eine so hochgradige Zerstörung der Chromosomenstruktur (Abb. 5), daß lediglich eine Schätzung ihrer Bruchfrequenz erfolgen konnte.

Im einzelnen wurden bei der quantitativen und qualitativen Analyse der Strukturveränderungen folgende Anomalien bewertet:

1. Chromatidbrüche und Chromosomenbrüche

Als Brüche wurden zytologisch sichtbare Veränderungen der Chromosomen angesehen, die zur vollständigen Unterbrechung der Linearstruktur eines oder beider Chromatide unter Ausbildung eines optisch als leer erscheinenden Bruchspaltes in der Querschnittebene oder bei Fragmentbildung zur entsprechenden Verkürzung des Chromatids oder nach Fusion zu entsprechenden Translokationen führt. In einzelnen Fällen war eine Abgrenzung von achromatischen Läsionen (gaps) und auch von sekundären Konstriktionen (besonders des Chromosoms Nr. 9) nicht möglich, obwohl bereits in einer früheren Arbeit [103] bei kälteinduzierten Chromosomenveränderungen gerade besonders auf die Abgrenzung von Brüchen und Konstriktionen geachtet worden war. Nach CHU [145] sind achromatische Läsionen nicht oder nur schwach

gefärbte Bezirke, die sich gleichmäßig über die Chromosomen verteilen und die spontan oder bei behandelten Zellen auftreten. Sie unterscheiden sich von primären und sekundären Konstriktionen, ein schwacher Verbindungsfaden kann sichtbar sein. CHU berücksichtigt achromatische Läsionen bei der Zählung von Chromatidaberrationen nicht, andere, wie z. B. NICHOLS [187], pflegen dies jedoch zu tun. Da achromatische Läsionen möglicherweise keine echten Brüche darstellen, wurden fragliche Chromatidveränderungen, ebenso natürlich auch sekundäre Konstriktionen, bei der quantitativen Auswertung nicht berücksichtigt. ÖSTERGREN u. WAKONIG [197] beschrieben nach Einwirkung von Kumarin und Röntgenbestrahlung auf *Allium cepa* Subchromatidbrüche oder auch Bruchkonstriktionen, die für Brüche gehalten wurden, deren Bruchenden durch eine hypothetische Proteinmatrix verbunden geblieben sind. Eine weitere Schwierigkeit stellten Störungen des Spiralisationsgrades der Chromosomen dar, wie sie z. B. nach Aktinomycin D bei Zellen des Chinesischen Hamsters (ARRIGHI u. HSU [3]) beschrieben wurden. So bezeichneten nämlich die Autoren derartige Veränderungen in einer Legende (zu Abb. 5) als „possible breaks“. Derartige, bei hoher Konzentration von Zytostatika und vereinzelt auch bei Kontrollkulturen mit schlechter Wachstumstendenz auftretende Veränderungen wurden ebenfalls hier nicht als Brüche gewertet.

Als Chromatidbrüche gelten Strukturunterbrechungen eines Chromatids (Abb. 14). Isochromatidbrüche sind zwei Chromatidbrüche auf gleicher Höhe, sie können z. B. im Bereich der sister loci gelegen sein. Chromosomenbrüche unterscheiden sich zytologisch nicht von Isochromatidbrüchen, sind jedoch bereits als einzelner Bruch vor der Reduplikation entstanden und bei der anschließenden Längsteilung auf beide Chromatide übertragen worden.

2. Fragmente

Unterschieden wurden gedoppelte azentrische und einzelne Fragmente. Die Zuordnung zu den entsprechenden zentrischen Bruchstücken war fast nie möglich, da es sich fast ausschließlich um kleinere Fragmente handelte. Es wurden nur Fragmente gewertet, die ohne Beziehung zum Chromosomengrundkörper frei in der Metaphase lagen.

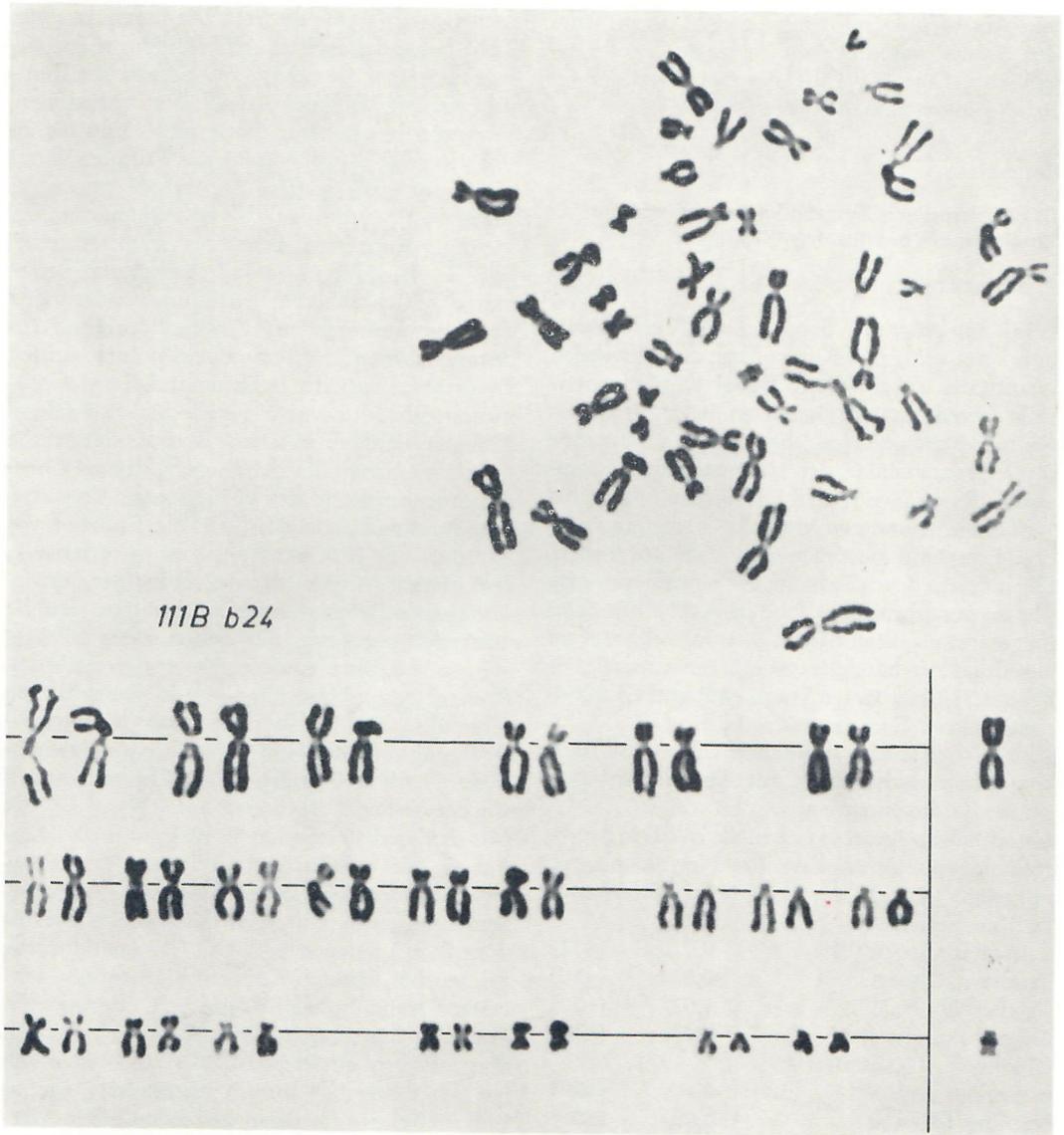


Abb. 1. Spontaner Chromatidbruch in Chromosom Nr. 1. Karyotyp eines unbehandelten Leukozytenspenders.

3. Translokationen

Sie sind Reunionsprodukte von zwei und mehr Bruchenden und umfassen den Austausch zweier Chromatidsegmente zwischen homologen oder inhomologen Chromosomen – auch reziproke Translokationen oder Interchanges genannt – und Segmentumlagerungen innerhalb eines Chromosoms. Hierzu zählen die Intrachanges. Diese sind Strukturumbauten innerhalb eines Chromosoms nach Eintritt mehrerer

Brüche auf chromosomaler oder chromatidaler Basis (RIEGER u. MICHAELIS [212]).

Lediglich bei TEM traten ganz vereinzelt Veränderungen auf, die möglicherweise Chromatidintrachanges darstellten. Sie waren den von REVELL 1954 (S. 246, Figur 1 d, Typ 1 [209]) beschriebenen fraglichen Intrachanges bei *Vicia faba* nach Röntgenbestrahlung sehr ähnlich. Da sie sich aber von Chromatidinterchanges nicht sicher abgrenzen ließen und bei der quantitati-

ven Auswertung nicht ins Gewicht fielen, wurden sie zusammen in der Gruppe der Interchanges aufgeführt (2 Fälle), wobei jeweils zwei Brüche angenommen wurden.

Ergebnisse

Die Wirkung von Zytostatika auf menschliche Chromosomen in vitro

1. Kontrollen

Insgesamt 56 der bei den einzelnen Versuchsreihen notwendigen Kontrollkulturen wurden quantitativ ausgewertet. Dabei wurden ebenfalls jeweils 100 Metaphasen jeder einzelnen Kultur erfaßt und gegebenenfalls auftretende Strukturanomalien der Chromosomen registriert. Es ergab sich, daß im Mittel 6,2 % (1 bis 12 %) der bewerteten Metaphasen spontan entstandene Chromosomenanomalien aufwiesen. Die mittlere Bruchfrequenz der einzelnen Metaphase wurde mit 0,068 (0,01–0,12) bei 5600 insgesamt erfaßten Metaphasen errechnet. Fast ausschließlich handelte es sich um Chromatidbrüche, seltener traten Fragmente und Chromosomen- bzw. Isochromatidbrüche auf.

Abb. 1 läßt einen spontanen Chromatidbruch des Chromosoms Nr. 1 mit Ausbildung einer breiten Lücke erkennen.

Verschiedene Autoren haben die mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase bei Normalkulturen mitgeteilt (Anzahl der bewerteten Metaphasen in Klammern):

| | | |
|--|-------|--------|
| BENDER u. GOOCH [19] | 0,025 | (401) |
| BENDER u. GOOCH [20] | 0,024 | (458) |
| COHEN [47] | 0,027 | (150) |
| COHEN u. SHAW [48] | 0,03 | (626) |
| MOORE, V. CAMPENHOUT u. BRANDKAMP [174] | 0 | (250) |
| NICHOLS [187] | 0,05 | (100). |

NICHOLS, LEVAN, HALL u. ÖSTERGREN [192] wiesen 3,3 % von 163 und KIHLMAN [134] 6,3 (2–12) % von 300 Metaphasen mit einem oder mehreren Brüchen nach. Von 100 Metaphasen sah JACKSON [116] 8 % mit Brüchen.

Wegen der hohen spontanen Bruchrate eignen sich menschliche Leukozyten nur zur Testung relativ starker Mutagene.

2. Quantitative Chromosomenanalyse nach Einwirkung von Zytostatika

Wegen seiner intensiv lymphoklastischen Wirkung (GERHARTZ [87]) wurde zunächst *Triäthy-*

lenmelamin (TEM) getestet. Die Ergebnisse von TEM-behandelten Kulturen wurden in der Arbeit HAMPEL u. GERHARTZ [101] bereits veröffentlicht. Sie sind aus der Tabelle 3 zu entnehmen. Während bei höherer Dosierung (2 µg bis 20 µg pro ml Kulturmedium) die Kulturen meist nicht angingen, zeigten die übrigen eine weitgehende quantitative Übereinstimmung bei gleichen Konzentrationen des Zytostatikums. Bei der gewählten Versuchsanordnung setzte sich die Mehrzahl der Strukturveränderungen der Chromosomen aus Chromatidbrüchen zusammen, was auch für die übrigen untersuchten Zytostatika zutrifft. Isochromatid- bzw. Chromosomenbrüche waren vergleichsweise selten. Zumeist wird es sich um Isochromatidbrüche gehandelt haben, da chemisch induzierte Chromosomenbrüche in der vorliegenden Versuchsanordnung (Zusatz des TEM 24 Stunden vor Abbruch der Kulturen) nicht zu erwarten waren. Einmal ist nämlich bei 24stündiger Einwirkung eines Zytostatikums zu erwarten, daß die Veränderungen nur die Zellen eines Mitosezyklus betreffen. Andererseits traten nach den Beobachtungen von CHU [45] an menschlichen Chromosomen 25 Stunden nach Röntgenbestrahlung in vitro lediglich Chromatidaberrationen, nach 30 Stunden jedoch Chromatid- und Chromosomenaberrationen auf.

Mit der applizierten Dosis stieg auch die Häufigkeit der azentrischen und einzelnen Fragmente. Vereinzelt traten dizentrische Chromosomen auf, was sich auch durch Anaphasestudien (s. u.) belegen ließ. Die Chromatidbrüche zeigten bei höheren Konzentrationen eine verstärkte Neigung zur Bildung von Interchanges. Fragliche Interchanges wurden ganz vereinzelt ebenfalls beobachtet (vgl. S. 333). In einigen Fällen komplizierter Interchangefiguren war es nicht möglich, die diese bedingende Bruchfrequenz abzuschätzen. Hier wurde die Zahl der nicht analysierbaren Interchanges mit einem Faktor multipliziert, der sich empirisch aus der mittleren Bruchfrequenz der analysierbaren Interchanges ableiten ließ. Bei TEM lag die mittlere Bruchfrequenz der analysierbaren Interchanges bei 2,8. In einzelnen Metaphasen traten Sternfiguren (Quadriradials) von regelmäßiger Ausbildung auf (Abb. 3 und 4), die ebenfalls als Chromatidinterchanges zu deuten waren. Bei Metaphasen mit weitgehender Zerstörung der Chromosomenstruktur (Abb. 5) konnte die Bruchfrequenz nur grob geschätzt werden. Eine Klassifizierung der hier sichtbaren Anomalien

Tabelle 3. Quantitative Analyse der strukturellen Chromosomenveränderungen TEM-behandelter Leukozytenkulturen. (Aus HAMPEL u. GERHARTZ [101].)

| | Kontrollen | | | | TEM ($\mu\text{g/ml}$ Kulturmedium) | | | | | | | | | | | |
|--|------------|-----|-----|-----|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|--|
| | | | | | 0,02 | | | 0,2 | | | 1 | | 2 | | | |
| Chromatidbrüche | 8 | 10 | 12 | 8 | 20 | 19 | 25 | 90 | 98 | 78 | 77 | 208 | 232 | 454 | 446 | |
| Isochromatid- u. Chromosomenbrüche Bruchfrequenz | 1 | — | — | — | 1 | 1 | 4 | 7 | 10 | 7 | 3 | 8 | 12 | 20 | 6 | |
| | 2 | — | — | — | 2 | 2 | 8 | 14 | 20 | 14 | 6 | 16 | 24 | 40 | 12 | |
| azentrische Fragmente Bruchfrequenz | 1 | — | — | — | 1 | 1 | 2 | 11 | 15 | 12 | 11 | 14 | 12 | 24 | 38 | |
| | 2 | — | — | — | 2 | 2 | 4 | 22 | 30 | 24 | 22 | 28 | 24 | 48 | 76 | |
| einzelne Fragmente | — | 1 | — | — | 2 | 1 | — | 10 | 9 | 10 | 10 | 12 | 16 | 58 | 62 | |
| Interchanges und Intrachanges Bruchfrequenz ca. | — | — | — | — | — | — | 2 | 29 | 33 | 17 | 14 | 32 | 32 | 142 | 110 | |
| | — | — | — | — | — | — | 4 | 78 | 83 | 51 | 39 | 88 | 85 | 383 | 298 | |
| dizentrische Chromosomen Bruchfrequenz | — | — | — | — | — | — | — | 2 | 1 | — | 2 | 1 | — | 2 | 4 | |
| | — | — | — | — | — | — | — | 4 | 2 | — | 4 | 2 | — | 4 | 8 | |
| fraglich dizentrische Bruchfrequenz ca. | — | — | — | — | — | — | — | 1 | 7 | — | 1 | 2 | — | — | — | |
| | — | — | — | — | — | — | — | 2 | 14 | — | 2 | 4 | — | — | — | |
| nicht klassifizierbare Strukturanomalien Bruchfrequenz ca. | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 39 | — | 310 | 248 | |
| Strukturanomalien pro Metaphase | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 0,4 | 2,2 | 2,6 | 1,8 | 1,6 | 4,0 | 3,8 | 13,0 | 11,5 | |
| % der Metaphasen mit Strukturanomalien | 9 | 10 | 11 | 7 | 19 | 17 | 20 | 69 | 73 | 62 | 61 | 80 | 84 | 98 | 100 | |
| Zahl der ausgewerteten Metaphasen | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 50 | 50 | 50 | 50 | |



Abb. 2. Metaphase mit zwei Interchanges nach 0,2 µg/ml TEM, 120 B 2 EF 39. (Aus HAMPEL u. GERHARTZ [101].)

war nicht möglich, ebenso wie in einzelnen Fällen von überlagerten Chromosomen. Die geschätzte Bruchfrequenz dieser Metaphasen lag zwischen 39 und 60. In der Tab. 2 sind diese als nicht klassifizierbare Strukturanomalien aufgeführt. Durch die hohe Bruchfrequenz derartig zerstörter Metaphasen wurde bei höheren



Abb. 3. Metaphase mit drei Interchanges, davon zwei vom Typ der vierarmigen Sternfigur nach 0,2 µg/ml TEM, 119 C 3 TU 56/57. (Aus HAMPEL u. GERHARTZ [101].)

Tabelle 4. Mitoseindizes TEM-behandelter Kulturen. (Aus HAMPEL u. GERHARTZ [101].)

| TEM (µg/ml) | Mitoseindizes (‰) |
|-------------|-------------------|
| 20 | 1 |
| 2 | 14 ± 3 |
| 1 | 24 ± 1 |
| 0,2 | 67 ± 17 |
| 0,02 | 133 ± 17 |
| Kontrollen | 180 ± 46 |

Konzentrationen die Schwankungsbreite der mittleren Bruchfrequenz pro Metaphase innerhalb der Kulturen deutlich vergrößert. Als fraglich dizentrische Chromosomen wurden solche angesehen, bei denen nicht sicher zu entscheiden war, ob nicht zufällig übereinandergelagerte Chromatide eine Reunion vortäuschten. Obwohl bei Kurzzeitkulturen peripherer Leukozyten selbst bei möglichst exakt eingehaltenen und weitgehend konstanten Kulturbedingungen die Mitoseindizes der einzelnen Kulturen deutlichen Schwankungen unterliegen, ist doch eine Abhängigkeit von der Konzentration des Zytostatikums erkennbar (Tab. 4).

Auf Grund der Zählwerte können die mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase und der Prozentsatz der von Strukturanomalien betroffenen Metaphasen erfaßt werden (s. u.).

A 2 (Strukturformel s. Tab. 1) wurde als Modellschubstanz eines in vivo möglicherweise entstehenden Abbauprodukts und somit Wirkform



Abb. 4. Chromatid-, Isochromatidbrüche sowie zwei Interchanges nach 0,03 mg/ml Thiotepa 154 B 6 K 20.

von Endoxan synthetisiert. Es handelt sich um ein nach partieller Ringspaltung der zyklischen Phosphamidgruppe entstehendes intramolekular stabilisiertes Zwitterion (ARNOLD u. BOURSEAUX [2]), welches bisher lediglich zu experimentellen Zwecken verwandt worden ist. Da nun Endoxan selbst nicht in vitro wirksam ist und auch bei direktem Zusatz zu den Leukozytenkulturen keine gesteigerte Bruchfrequenz verursachte (s. S. 349 f.), war es interessant, experimentell zu klären, ob A 2 Chromosomenanomalien auslöst.

Aus Tab. 5 und Abb. 8 ist nun zu entnehmen, daß A 2 in ähnlicher Weise wie TEM zu Chromosomenaberrationen bei direktem Zusatz zu Leukozytenkulturen führt. Im Gegensatz zu Endoxan ist es mithin auch in vitro wirksam.

Die in Tab. 5 zusammengestellten quantitativen Ergebnisse beziehen sich wiederum auf eine 24stündige Einwirkungszeit der Substanz, vom Zeitpunkt des Abbruchs zurückgerechnet. Die Werte zeigten wiederum eine gute Übereinstimmung bei Kulturen mit gleichen Konzentrationen. Es wurden dabei jeweils drei Kulturen bei den einzelnen Konzentrationen angesetzt, die aus Leukozyten verschiedener Spender bereitet wurden. Auch fanden sich nach A 2 wiederum zumeist Chromatidbrüche. Mehrere Isochromatid- bzw. Chromosomenbrüche und Fragmente wurden beobachtet. Dagegen waren Interchanges vergleichsweise selten. Auch traten gegenüber TEM weniger komplizierte In-

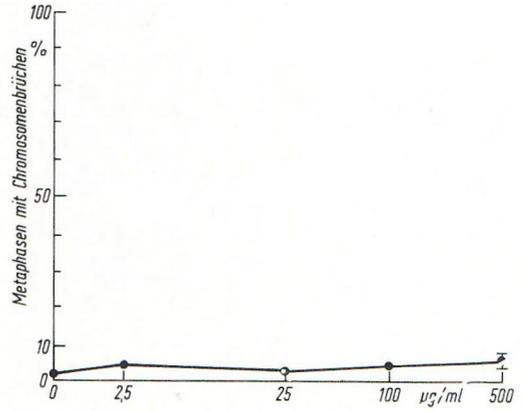
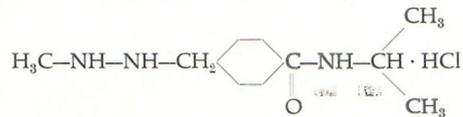


Abb. 5a. Quantitative Analyse struktureller Chromosomenanomalien menschlicher Leukozyten in vitro nach 24stündiger Einwirkung von Natulan.

terchangefiguren auf, so daß der Anteil der nicht analysierbaren Interchanges gering war. Die mittlere Bruchfrequenz der analysierbaren Interchanges lag bei 2,8. Vereinzelt wurden auch Ringchromosomen beobachtet. Mit der steigenden Konzentration wurden die mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase und der Prozentsatz der von Strukturanomalien betroffenen Metaphasen in den Abb. 8 und 9 graphisch dargestellt, wie dies auch bei Trenimon, Thiopepa und Methotrexat geschah.

Am Ehrlich-Aszites-Tumor der Maus erwies sich 1-Methyl-2-benzyl-hydrazinphosphat (MBH) als mutagen. Zahlreiche Strukturanomalien der Chromosomen einschließlich Interchangebildung wurden beobachtet (RUTISHAUSER u. BOLLAG [222]).

Natulan (N-Isopropyl-alpha-(2-methylhydrazin)-p-toluamid-hydrochlorid, Ro 4-6467), ein weiteres Methylhydrazinderivat, wird neuerdings auch klinisch verwandt (GERHARTZ, BLUM u. COPER [93]).



Strukturformel von Natulan

Wie aus Abb. 5a hervorgeht, traten auch unter maximalen Natulankonzentrationen keine Strukturveränderungen an den Chromosomen menschlicher Leukozyten auf. Wenn theoretisch die Einzeldosis von TEM 2 mg i. v. in vivo un-

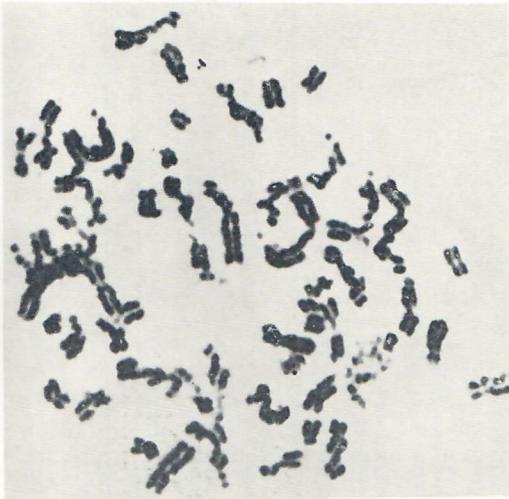


Abb. 5. Weitgehende Zerstörung der Chromosomenstruktur bei höherer TEM-Dosis, 2 µg/ml 119 B 1 G 56. (Aus HAMPEL u. GERHARTZ [101]).

Tabelle 5. Quantitative Analyse der strukturellen Chromosomenveränderungen A-2-behandelter Leukozytenkulturen.

| | Kontrollen | | | | | | A 2 ($\mu\text{g/ml}$ Kulturmedium) | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|------------|------|------|------|------|------|--------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 1 | | 3 | | 5 | | 10 | | | 20 | | | 50 | | | | | | | | | | |
| Chromatidbrüche | 5 | 4 | 3 | 2 | 6 | 8 | 14 | 15 | 44 | 25 | 37 | 45 | 58 | 45 | 92 | 87 | 84 | 67 | 78 | 85 | 276 | 350 | 195 |
| Isochromatid- u. Chromosomenbrüche | 2 | 1 | — | — | — | 1 | 1 | — | — | 2 | 3 | 1 | — | 4 | 6 | 5 | 4 | 4 | 14 | 3 | 20 | 30 | — |
| Bruchfrequenz | 4 | 2 | — | — | — | 2 | 2 | — | — | 4 | 6 | 2 | — | 8 | 12 | 10 | 8 | 8 | 28 | 6 | 40 | 60 | — |
| azentrische Fragmente | — | — | — | — | — | 1 | 5 | 2 | 3 | 6 | 2 | 5 | 4 | 8 | 10 | 9 | 9 | 21 | 15 | 13 | 35 | 40 | 39 |
| Bruchfrequenz | — | — | — | — | — | 2 | 10 | 4 | 6 | 12 | 4 | 10 | 8 | 16 | 20 | 18 | 18 | 42 | 30 | 26 | 70 | 80 | 78 |
| einzelne Fragmente | — | — | — | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 5 | 5 | — | 4 | 2 | 4 | 6 | 7 | 7 | 11 | 3 | 15 | 35 | 21 | 33 |
| Interchanges analysierbar | — | — | — | — | — | — | — | — | 2 | — | 2 | 3 | 6 | 1 | 4 | 1 | 6 | — | — | 1 | 10 | 10 | 12 |
| Bruchfrequenz | — | — | — | — | — | — | — | — | 4 | — | 8 | 6 | 16 | 2 | 12 | 2 | 12 | — | — | 4 | 30 | 30 | 36 |
| nicht analysierbar | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 5 | — | 6 |
| Bruchfrequenz ca. | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 15 | — | 18 |
| dizentrische Chromosomen | — | — | — | — | — | — | 1 | — | — | — | — | 1 | 4 | 1 | — | 1 | — | 1 | — | 3 | 6 | — | — |
| Bruchfrequenz | — | — | — | — | — | — | 2 | — | — | — | 2 | 2 | 8 | 2 | — | 2 | — | 2 | — | 6 | 12 | — | — |
| nicht klassifizierbare Strukturanomalien | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 30 | — | — | — | — | — | 55 | — | — | 260 | 385 | 474 |
| Ringchromosom | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 1/4 | — | — |
| Strukturanomalien pro Metaphase | 0,09 | 0,06 | 0,03 | 0,03 | 0,07 | 0,14 | 0,29 | 0,21 | 0,59 | 0,46 | 0,57 | 0,99 | 0,86 | 0,77 | 1,42 | 1,36 | 1,29 | 1,85 | 1,39 | 1,42 | 7,42 | 9,26 | 8,34 |
| % der Metaphasen mit Strukturanomalien | 7 | 5 | 3 | 3 | 7 | 12 | 15 | 16 | 39 | 34 | 40 | 48 | 46 | 45 | 64 | 59 | 65 | 70 | 68 | 72 | 100 | 100 | 100 |
| Zahl der ausgewerteten Metaphasen | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 50 | 100 | 50 | 100 | 100 | 73 | 37 | 60 | 20 | 21 | 31 |

Tabelle 6. Quantitative Analyse der strukturellen Chromosomenveränderungen nach 24stündiger Einwirkung von FUDR.

| | Kontrollen | | | | | FUDR ($\mu\text{g/ml}$ Kulturmedium) 24 Stunden, 4 Stunden Colcemid | | | | | | | | | |
|---|------------|------|------|------|------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|--|
| | | | | | | 10 | | 50 | | 200 | | 500 | | | |
| Chromatidbrüche | 10 | 3 | 7 | 6 | 5 | 18 | 17 | 10 | 32 | 38 | 55 | 56 | 95 | 111 | |
| Isochromatid- u. Chromosomenbrüche | — | — | — | — | — | — | 2 | 2 | 2 | 3 | 7 | 4 | 10 | 23 | |
| Bruchfrequenz | — | — | — | — | — | — | 4 | 4 | 4 | 6 | 14 | 8 | 20 | 46 | |
| azentrische Fragmente | — | 2 | — | — | — | — | 3 | 6 | 19 | 18 | 29 | 28 | 50 | 63 | |
| Bruchfrequenz | — | 4 | — | — | — | — | 6 | 12 | 38 | 36 | 58 | 56 | 100 | 126 | |
| einzelne Fragmente | — | — | 1 | — | 1 | — | — | — | 4 | 3 | 2 | 4 | 15 | 12 | |
| Interchanges | — | — | — | — | — | — | — | 1 | — | — | — | — | — | — | |
| Bruchfrequenz | — | — | — | — | — | — | — | 2 | — | — | — | — | — | — | |
| dizentrische Chromosomen | — | — | — | — | — | — | — | — | 2 | 1 | — | 2 | — | — | |
| Bruchfrequenz | — | — | — | — | — | — | — | — | 4 | 2 | — | 4 | — | — | |
| nicht klassifizierbare Strukturanomalien | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 50 | 70 | |
| Strukturanomalien pro Metaphase | 0,10 | 0,07 | 0,08 | 0,06 | 0,06 | 0,18 | 0,27 | 0,28 | 0,82 | 0,95 | 1,29 | 1,28 | 2,80 | 3,65 | |
| % der Metaphasen mit Strukturanomalien | 10 | 5 | 7 | 5 | 5 | 16 | 18 | 20 | 45 | 48 | 67 | 68 | 90 | 86 | |
| Zahl der ausgewerteten Metaphasen | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 50 | 100 | 100 | 100 | 50 | 20 | 35 | |

Tabelle 7. Quantitative Analyse der strukturellen Chromosomenveränderungen nach 6stündiger Einwirkung von FUDR.

| | Kontrollen | | | | FUDR (mg/ml Kulturmedium) 6 Stunden, 1,5 Stunden Colcemid | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|------------|------|------|------|--|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--|--|
| | | | | | 0,01 | | 0,02 | | 0,05 | | 0,1 | | 0,5 | | 1,0 | | 3,0 | | | |
| Chromatidbrüche | 2 | 5 | 8 | 5 | 20 | 15 | 22 | 18 | 41 | 28 | 30 | 46 | 32 | 35 | 31 | 50 | 66 | 77 | | |
| Isochromatid- u. Chromosomenbrüche | — | — | — | — | 2 | 2 | 10 | 2 | 8 | 5 | 2 | 4 | 8 | 2 | 5 | 14 | 14 | 7 | | |
| Bruchfrequenz | — | — | — | — | 4 | 4 | 20 | 4 | 16 | 10 | 4 | 8 | 16 | 4 | 10 | 28 | 28 | 14 | | |
| azentrische Fragmente | — | — | — | 1 | 15 | 6 | 11 | 9 | 13 | 10 | 20 | 21 | 18 | 18 | 17 | 14 | 21 | 25 | | |
| Bruchfrequenz | — | — | — | 2 | 30 | 12 | 22 | 18 | 26 | 20 | 40 | 42 | 36 | 36 | 34 | 28 | 42 | 50 | | |
| einzelne Fragmente | — | — | — | — | 2 | — | — | 2 | — | 1 | 4 | — | — | 3 | 3 | 1 | 2 | — | | |
| Interchanges | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 1 | — | — | — | — | — | — | | |
| Bruchfrequenz | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 2 | — | — | — | — | — | — | | |
| dizentrische Chromosomen | — | — | — | — | — | — | 1 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | | |
| Bruchfrequenz | — | — | — | — | — | — | 2 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | | |
| nicht klassifizierbare Strukturanomalien | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 30 | — | — | — | — | — | | |
| Strukturanomalien pro Metaphase | 0,02 | 0,05 | 0,08 | 0,07 | 0,56 | 0,59 | 0,66 | 0,42 | 0,83 | 0,59 | 0,78 | 0,98 | 1,14 | 0,78 | 0,78 | 1,07 | 1,38 | 1,41 | | |
| % der Metaphasen mit Strukturanomalien | 2 | 5 | 8 | 6 | 20 | 23 | 33 | 30 | 44 | 39 | 43 | 44 | 38 | 41 | 41 | 43 | 47 | 47 | | |
| Zahl der ausgewerteten Metaphasen | 100 | 100 | 100 | 100 | 69 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 81 | 50 | 100 | 100 | 50 | 100 | 64 | | |

Tabelle 8. Die Beeinflussung der FUDR-Wirkung auf die Chromosomen menschlicher Leukozyten durch Thymidin-zusatz.

| | 0,1 mg/ml FUDR 6 Std., Col. 1,5 Std. | | | | | |
|--|---|------|--------|------|------|------|
| | Thymidin (mg/ml) | | | | | |
| | 6 Std. | | 3 Std. | | | |
| | a | b | 0,1 | 0,5 | 0,1 | 0,1 |
| | | | a | b | a | b |
| Metaphasen mit Struktur-anomalien in Prozent | 43 | 44 | 8 | 5 | 33 | 28 |
| mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase | 0,78 | 0,98 | 0,12 | 0,06 | 0,44 | 0,48 |
| Chromatidbrüche (%) | 30 | 44 | 6 | 2 | 23 | 16 |
| Isochromatidbrüche (%) | 2 | 4 | — | 1 | 3 | — |
| Fragmente (%) | 24 | 17 | 3 | 1 | 8 | 16 |
| ausgezählte Metaphasen | 100 | 81 | 100 | 88 | 100 | 50 |

weitgehende Parallelen (Abb. 8). Im Vordergrund der induzierten Veränderungen standen wiederum Chromatidbrüche, bei relativ geringer Anzahl von Isochromatidbrüchen nach 6-stündiger Einwirkung im Vergleich mit den Ergebnissen nach 24stündigem Zusatz. Die Zahl der gefundenen azentrischen Fragmente stieg mit der Dosis bei 24stündigem Zusatz stärker an als nach 6stündigem. Dasselbe gilt auch für die einzelnen Fragmente. Dizentrische Chromosomen traten selten auf, Interchanges nur ganz vereinzelt. Hiermit tritt also ein wesentlicher Unterschied der Wirkung von FUDR auf menschliche Chromosomen im Vergleich zu den alkylierenden Substanzen auf: Es bestand keine nennenswerte Tendenz zur Interchangebildung. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Untersuchungen an *Vicia faba* (TAYLOR, HAUT u. TUNG [243]). Einen weiteren Hinweis für den unterschiedlichen Wirkungsmechanismus ergaben Experimente an *Vicia faba* mit kombinierter Anwendung von Röntgenstrahlen und FUDR. Man erhielt dabei einen Anstieg der freien Fragmente gegenüber den Wurzelspitzen, die mit Röntgenstrahlen oder FUDR allein behandelt worden waren (TAYLOR [242]).

Ein weiterer wesentlicher Unterschied im Kurvenverlauf der quantitativen Ergebnisse einer Chromosomenanalyse nach 6- und 24stündiger Behandlung der Kulturen mit FUDR ist aus Abb. 7 zu entnehmen. Auf der Abszisse wurden die Logarithmen der FUDR-Konzentrationen aufgetragen, auf der Ordinate die jeweilige Bruchfrequenz pro Metaphase und der mittlere Prozentsatz der von Strukturanomalien betroffenen Metaphasen. Aus Abb. 7 geht hervor, daß bei 6stündiger Einwirkung von FUDR zwar die mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase mit

der Dosis anstieg, daß aber der Prozentsatz der von Strukturanomalien betroffenen Metaphasen einem Grenzwert von ca. 40 % zustrebte und dann auch bei Konzentrationserhöhung um das 60fache konstant blieb. Dies bedeutet somit eine wesentliche Abweichung von den Ergebnissen, die nach 24stündiger Einwirkung erzielt wurden. Hier wies der Prozentsatz der von Strukturanomalien betroffenen Metaphasen mit der FUDR-Konzentration einen exponentiellen Anstieg auf.

Hieraus läßt sich folgendes ableiten:

- Nur ein Teil der Metaphasen (ca. 40 %) wurde nach 6stündiger Einwirkung von FUDR von Strukturanomalien der Chromosomen betroffen.
- Dieser Teil der Metaphasen wurde um so stärker geschädigt, je höher die verwandte FUDR-Konzentration war.
- Ein anderer Teil der Metaphasen (ca. 60 %) wurde in der verwandten Versuchsanordnung von chromosomalen Strukturveränderungen nicht betroffen, auch nicht bei einer 60fachen Erhöhung der FUDR-Konzentration.
- Mithin induzierte FUDR nur bei denjenigen Metaphasen Strukturanomalien, deren Kernsubstanz zum Zeitpunkt der beginnenden FUDR-Einwirkung sich in einer „sensiblen Phase“ befand.
- Bei der gegebenen Versuchsanordnung und bei der bekannten Wirkungsweise von FUDR als Thymidylatsynthetase-Hemmer ist somit zu erwarten, daß lediglich Zellen, die sich in der späten DNS-Synthese-Phase oder möglicherweise auch in der frühen prämitotischen Ruhephase befanden, von Chromosomenaberrationen betroffen wurden. Zellen, die zu Beginn des FUDR-Zusatzes bereits die DNS-Synthese-Phase abgeschlossen hatten, also Zellen in der mittleren bis späten prämitotischen Ruhephase, erwiesen sich gegenüber FUDR auch bei hohen Konzentrationen als resistent.

Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit denen von NOWELL 1964 [194], der nach Zusatz von Mitomycin C in der G-2-Phase keine Strukturanomalien erzielen konnte (s. S. 330).

3. Die Beeinflussung der FUDR-Wirkung durch Nucleoside

Unter der Einwirkung von 5-Fluordesoxyuridin wird die Umwandlung von Desoxyuridylat in

Thymidylat blockiert. Da dies jedoch der einzige biochemisch gangbare Weg ist, der zur Bildung von Thymidylat und damit von DNS führt, auf der anderen Seite der Pool an Thymidylat in der Zelle gering zu sein pflegt, wird durch Zusatz von FUDR die DNS-Synthese ziemlich abrupt blockiert. Durch den Zusatz von Thymidin zu FUDR-behandelten Wurzelspitzen von *Vicia faba* sollen komplette Brüche dadurch verhindert werden, daß die eingetretenen Läsionen durch erneute DNS-Synthese geschlossen werden, bevor sie in der Metaphase als offene Brüche erscheinen können (TAYLOR [241, 242], TAYLOR, HAUT u. TUNG [243]). Bei denselben Experimenten wurde auch beobachtet, daß Thymidin noch 1 Stunde vor der Zellteilung zur Restitution FUDR-induzierter Brüche führen kann.

Eigene Versuche bei menschlichen Leukozytenchromosomen ergaben, daß ein Thymidinzusatz im Überschuß bei Kulturen, die 6 Stunden vor Abbruch mit 0,1 mg/ml FUDR behandelt worden waren, die Bruchfrequenz auf Werte zurückgehen ließ, die diejenigen der unbehandelten Kontrollen nicht überstiegen (Tab. 8). Wurde Thymidin 3 Stunden vor dem Abbruch FUDR-behandelter Kulturen zugesetzt, so war die Bruchfrequenz der Chromosomen noch deutlich niedriger als bei den Kulturen, die allein FUDR erhalten hatten.

Nun ergab sich hieraus die Frage, ob Thymidin tatsächlich a) bereits entstandene Läsionen der Chromosomen zur Restitution bringt, wie dies bei *Vicia faba* beschrieben wurde, oder ob Thymidin b) lediglich die Wirkung von FUDR aufhebt, so daß von vornherein weniger oder keine Brüche entstehen können.

Zur Klärung dieser Fragen wurden zwei weitere Kulturserien (a und b) angesetzt (Tab. 9).

Tabelle 9. Die Beeinflussung der FUDR-Wirkung auf die Chromosomen menschlicher Leukozyten durch Thymidinzusatz.

| | Kon-trollen | | 0,2 mg/ml FUDR 24 Std. | | | |
|--|---------------------------------|------|---------------------------------|------|------|------|
| | 0,5 mg/ml Thymidin 6 Std. | | 0,5 mg/ml Thymidin 6 Std. | | | |
| | a | b | a | b | a | b |
| Metaphasen mit Struktur-anomalien in Prozent | 6 | 7 | 68 | 76 | 52 | 74 |
| mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase | 0,06 | 0,07 | 1,26 | 1,10 | 1,03 | 1,44 |
| Chromatidbrüche (%) | 6 | 7 | 69 | 66 | 72 | 82 |
| Isochromatidbrüche (%) | — | — | 6 | 6 | 1 | 4 |
| Fragmente (%) | — | — | 23 | 16 | 15 | 26 |
| ausgezählte Metaphasen | 100 | 100 | 100 | 50 | 100 | 51 |

Tabelle 10. Der Einfluß einer kombinierten Behandlung von Leukozytenkulturen mit TEM und Thymidin.

| | Kon-trollen | | TEM 0,2 µg/ml 6 Std. | | | |
|--|---------------------------------|------|---------------------------------|------|------|------|
| | Thymidin 0,5 mg/ml 6 Std. | | Thymidin 0,5 mg/ml 6 Std. | | | |
| | a | b | a | b | a | b |
| Metaphasen mit Struktur-anomalien in Prozent | 2 | 5 | 17 | 20 | 19 | 15 |
| mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase | 0,02 | 0,05 | 0,22 | 0,21 | 0,27 | 0,15 |
| Chromatidbrüche (%) | 2 | 4 | 14 | 18 | 20 | 12 |
| Isochromatidbrüche (%) | — | — | — | — | — | — |
| Fragmente (%) | — | 1 | 4 | 2 | 4 | 3 |
| ausgezählte Metaphasen | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

Die Kontrollen erhielten jeweils nur Thymidin, um die Möglichkeit auszuschließen, daß das bereits zu Strukturveränderungen der Chromosomen bei Zusatz im Überschuß führt. Zwei weitere Kulturen wurden 24 Stunden einer Einwirkung von 0,2 mg/ml FUDR ausgesetzt, und schließlich erhielten zwei weitere Kulturen zusätzlich zu derselben FUDR-Konzentration und derselben FUDR-Einwirkungszeit 6 Stunden vor dem Abbruch der Kulturen 0,5 mg/ml Thymidin (s. Tab. 9). Da nun bei *Vicia faba* Thymidin selbst noch eine Stunde vor der Teilung zur Restitution der Brüche führte (TAYLOR, HAUT u. TUNG [243]), war bei diesem Versuch zu erwarten, daß die durch FUDR induzierten Brüche nach Thymidinzusatz 6 Stunden vor Abbruch der Kulturen weitgehend oder zumindest teilweise restituiert sein würden. Dies trat jedoch tatsächlich nicht ein. Wie aus der Tab. 9 hervorgeht, war die Bruchfrequenz der allein mit FUDR und der mit FUDR+Thymidin behandelten Kulturen gleich. Zumindest war Thymidin nicht in der Lage, bei Zusatz 6 Stunden vor dem Abbruch der Kulturen und 1,5stündiger Colcemidblockierung der Mitosen die durch FUDR vorher verursachten Brüche zu restituieren. Es ist somit wahrscheinlich, daß Thymidin die Wirkung von FUDR aufhebt. Endgültig war diese Frage durch die vorliegenden Experimente nicht zu klären, da die Möglichkeit besteht, daß FUDR zu einer in ihrem Mitosezyklus verschobenen Zellpopulation führt und die Verhältnisse dadurch unübersichtlich werden. Weitere Versuche unter Verwendung ³H-markierten Thymidins könnten zur Klärung beitragen.

Wie aus Tab. 10 hervorgeht, war Thymidin jedoch nicht in der Lage, die durch die alkalyrende Substanz TEM verursachten Brüche zu

Tabelle 11. Die Beeinflussung der FUDR-Wirkung auf die Chromosomen menschlicher Leukozyten durch Uridinzusatz.

| | Kon- | 0,05 mg/ml FUDR | |
|--------------------------|-----------|-----------------|-----------|
| | trolle | 24 Std. | |
| | 24 Std. | 24 Std. | 24 Std. |
| | 0,5 mg/ml | 0,5 mg/ml | 0,5 mg/ml |
| | Uridin | Uridin | Uridin |
| Metaphasen mit Struktur- | | | |
| anomalien in Prozent | 8 | 48 | 24 |
| mittlere Bruchfrequenz | | | |
| pro Metaphase | 0,08 | 0,95 | 0,35 |
| Chromatidbrüche (%) | 8 | 56 | 19 |
| Isochromatidbrüche (%) | — | 2 | 1 |
| Fragmente (%) | — | 18 | 7 |
| Interchanges | — | 1 | — |
| ausgezählte Metaphasen | 100 | 100 | 100 |

modifizieren. Aus dieser Beobachtung läßt sich vermuten, daß hier ein anderer Mechanismus der Bruchentstehung vorliegt.

Der Übergang von FUDR in Fluoruridylat ist in vivo möglich. Somit ist auch eine teilweise Inkorporation in die RNS gegeben. Dies ist durch Zusatz von Uridin im Überschuß weitgehend zu verhindern (TAYLOR, HAUT u. TUNG [243]).

Wie nun aus Tab. 11 zu entnehmen ist, vermochte Uridin bei gleichzeitiger Gabe von FUDR und 24stündiger Einwirkungszeit auf menschliche Leukozyten in vitro das Ausmaß der durch FUDR induzierten Chromosomenveränderungen deutlich zu reduzieren. So war der Prozentsatz der von Struktur-anomalien betroffenen Metaphasen um die Hälfte, die mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase von 0,95 auf 0,35 bei Uridinzusatz herabgesetzt. Dies könnte dafür sprechen, daß auch bei menschlichen Leukozyten FUDR teilweise in die RNS inkorporiert wird und daß primäre RNS-Veränderungen sekundär zu Brüchen führen können.

Ebenso war ein deutlicher Rückgang der Strukturveränderungen der Chromosomen nach 6-

stündiger Einwirkung von FUDR bei gleichzeitigem Zusatz von Uridin zu verzeichnen. Wurde hingegen Uridin 3 Stunden vor Abbruch der Kultur und FUDR bereits 6 Stunden vor Abbruch der Kultur zugesetzt, so ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede gegenüber den Kulturen, die lediglich FUDR erhalten hatten (Tab. 12). Aus der Tabelle ist weiter zu entnehmen, daß der Zusatz von Adenosin nicht zu einer merkbaren Reduktion der durch FUDR verursachten Struktur-anomalien führte.

4. Vergleichende zytogenetische Wirkung der Zytostatika¹

Ein Überblick über die Ergebnisse der quantitativen Analysen der durch die einzelnen Zytostatika verursachten Chromosomenanomalien wird in Abb. 8 gegeben. Die Werte gelten jeweils für eine 24stündige Einwirkungszeit der Substanzen, die vom Zeitpunkt des Abbruchs der Kulturen zurückzurechnen ist. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in einem semilogarithmischen Koordinatensystem. Auf der Abszisse wurden die Logarithmen der jeweils den Kulturen verabfolgten Konzentrationen in µg/ml Kulturmedium aufgetragen. In Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration wurden für jede ausgewertete Kultur erstens die Zahl der von Chromosomenaberrationen betroffenen Metaphasen in Prozent und zweitens die mittlere Bruchfrequenz der einzelnen Metaphase einer Kultur erfaßt. Aufgetragen wurden die Mittelwerte von 2–5 identisch behandelten Leukozytenkulturen, wobei die maximale Streuung ebenfalls graphisch dargestellt wurde.

¹ Die Ergebnisse dieses Abschnitts sollen später in einer Kurzmitteilung (HAMPEL, KOBER, RÖSCH, GERHARTZ u. MEINIG) erscheinen.

Tabelle 12. Die Beeinflussung der FUDR-Wirkung auf die Chromosomen menschlicher Leukozyten durch Uridin und Adenosin.

| | Kontrollen | | | | 0,1 mg/ml FUDR 6 Stunden | | | | | |
|--------------------------|-------------------------|------|------|------|-----------------------------|------|-------------------------|------|---------------------------|------|
| | 0,5 mg/ml Uridin 6 h | | a | | 0,5 mg/ml Uridin 6 h | | 0,5 mg/ml Uridin 3 h | | 0,5 mg/ml Adenosin 6 h | |
| | a | b | a | b | a | b | a | b | a | b |
| Metaphasen mit Struktur- | | | | | | | | | | |
| anomalien in Prozent | 5 | 8 | 49 | 45 | 18 | 33 | 48 | 43 | 49 | 47 |
| mittlere Bruchfrequenz | | | | | | | | | | |
| pro Metaphase | 0,06 | 0,11 | 0,85 | 0,79 | 0,24 | 0,43 | 0,82 | 0,65 | 0,72 | 0,88 |
| Chromatidbrüche (%) | 5 | 5 | 45 | 44 | 11 | 30 | 38 | 31 | 30 | 36 |
| Isochromatidbrüche (%) | — | — | 6 | 5 | — | — | 3 | 5 | 3 | 3 |
| Fragmente (%) | 1 | 3 | 14 | 16 | 6 | 7 | 18 | 14 | 18 | 24 |
| ausgezählte Metaphasen | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 65 | 77 | 39 | 62 |

Aus Abb. 8 geht hervor, daß der Prozentsatz der von chromosomalen Strukturanomalien betroffenen Metaphasen in Abhängigkeit von der verwandten Konzentration einen *exponentiellen Anstieg* aufweist. Lediglich bei dem schon in sehr niedrigen Konzentrationen wirksamen Trenimon ist bei höheren Dosen eine asymptotische Annäherung der Kurve an den Maximalwert von 100% zu erkennen. Der Kurvenverlauf der für die mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase aufgetragenen Werte hingegen scheint annähernd linear zu sein. Die Ergebnisse der quantitativen Chromosomenanalyse zeigten somit eine gute Überein-

tische Annäherung der Kurve an den Maximalwert von 100% zu erkennen. Der Kurvenverlauf der für die mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase aufgetragenen Werte hingegen scheint annähernd linear zu sein. Die Ergebnisse der quantitativen Chromosomenanalyse zeigten somit eine gute Überein-

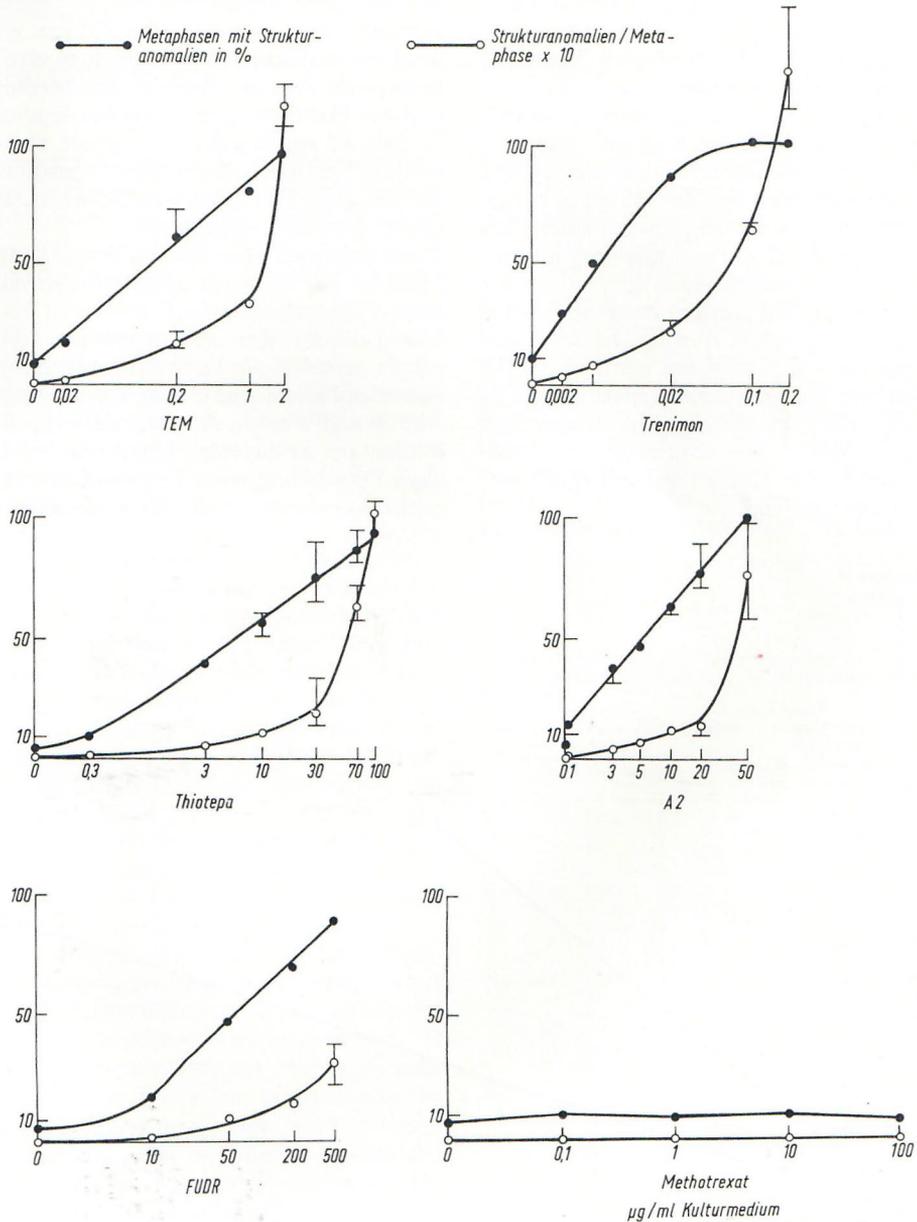


Abb. 8. Quantitative Analyse struktureller Chromosomenanomalien menschlicher Leukozyten in vitro nach 24stündiger Einwirkung verschiedener Zytostatika.

stimmung der alkylierenden Substanzen untereinander. Auch bei dem Antimetaboliten FUDR wurden ähnliche Resultate erzielt. Wegen des starken Rückgangs der Mitoseindizes FUDR-behandelter Leukozytenkulturen ließen sich die beiden Kurven für diese Substanz nicht noch weiter unter höheren Konzentrationen verfolgen. Eine Ausnahme bildete jedoch der Folsäureantagonist Methotrexat und auch das Methylhydrazinderivat Natulan, die Chromosomenaberrationen bei der benutzten Versuchsanordnung nicht induzierten.

Darüber hinaus wurden in einem linearen Koordinatensystem die den Kulturen zugesetzten Konzentrationen tumorhemmender Mittel, in μMol umgerechnet, auf der Abszisse aufgetragen (Abb. 9). Die mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase wurde hierzu in Beziehung gesetzt. Wie bei der semilogarithmischen Darstellung bereits vermutet, ließ sich bei linearem System ein annähernd linearer Anstieg der mittleren Bruchfrequenz pro Metaphase nachweisen. Bei Trenimon war die wirksame Konzentration so gering, daß diese graphisch nicht darzustellen war und in Abb. 9 scheinbar nicht vom Nullpunkt abweicht. Der Kurvenverlauf bei A 2 war nicht sehr überzeugend.

Somit konnte bei den getesteten Zytostatika mit den bereits erwähnten Ausnahmen nachgewiesen werden, daß a) der Prozentsatz der von Strukturanomalien betroffenen Metaphasen exponentiell, b) die mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase annähernd linear in Abhängigkeit von der Konzentration anstieg. Es ergibt sich auch, daß die zytogenetischen oder besser zytologischen Veränderungen der tumorhemmenden Mittel nicht in jedem Falle in vitro mit ihrer zytostatischen Wirksamkeit in vivo korrelieren, wie dies am Beispiel des Methotrexats und des Natulans gezeigt werden konnte.

In Tab. 13 wurden die intravenöse Einzeldosis und die Remissionsdosis beim Menschen sowie die DL_{50} der Ratte bei einmaliger intraperitonealer Injektion eingetragen.

Diese empirisch gewonnenen Werte können als Maßstab der relativen zytostatischen Aktivität eines Präparates dienen.

Zur Prüfung der zytogenetischen Aktivität wurde zunächst die Festlegung von Bezugsgrößen erforderlich. Auf Grund der Ergebnisse der Abb. 8 und 9 boten sich zwei derartige Bezugsgrößen an: a) diejenige Dosis, die bei 24stündiger Einwirkung eines Zytostatikums in Kurzzeitkulturen menschlicher Leukozyten bei 50 %

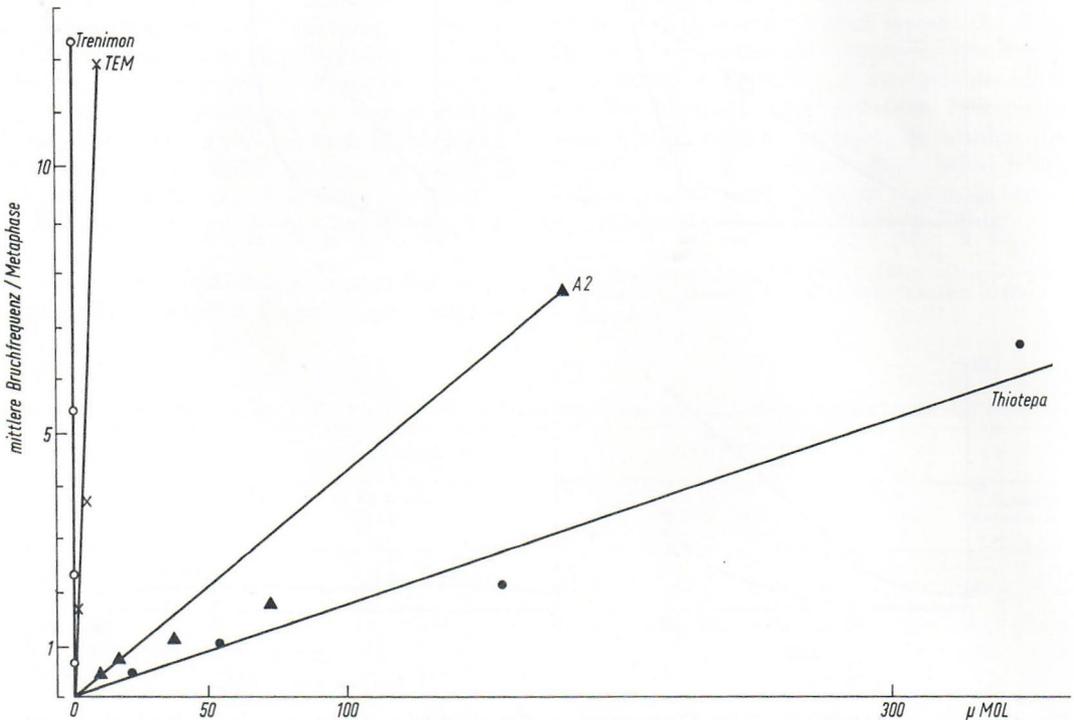


Abb. 9. Bruchfrequenz menschlicher Leukozytenchromosomen in vitro nach Zusatz von Zytostatika.

Tabelle 13. Dosisvergleich der relativen zytostatischen und zytogenetischen Wirksamkeit tumorhemmender Mittel.

| | TEM | Trenimon | Thiotepa | A 2 | FUDR |
|--|----------|-----------|----------|----------|----------|
| Einzeldosis beim Menschen i. v. in mg [91] | 2 | 0,5–1,0 | 10 | — | ca. 250 |
| Remissionsdosis beim Menschen i. v. in mg [91] | 35–70 | 5–7 | 180 | — | ca. 6000 |
| DL ₅₀ der Ratte i. p. in mg/kg | 1,1 [90] | 0,25 [90] | 8,4 [90] | 600 [37] | 350 [59] |
| Konzentration, die bei 50 % der Metaphasen zu Strukturveränderungen der Chromosomen führt, in µg/ml | 0,1 | 0,045 | 5 | 5,5 | 60 |
| Konzentration, die im Mittel 5 Brüche pro Metaphase induziert | 4 | 0,3 | 280 | 120 | 3000 |

der bewerteten Metaphasen Strukturanomalien (eine oder mehrere) der Chromosomen auslöst, und b) diejenige Dosis, die bei 24stündiger Einwirkung der Substanzen im Durchschnitt 5 Brüche pro Metaphase zu induzieren vermag. Vergleicht man nun die Ergebnisse, die in der Tab. 13 zusammengestellt wurden, so ergibt sich eine grobe größenordnungsmäßige Übereinstimmung der zytostatischen und der zytogenetischen Aktivität bei den alkylierenden Substanzen. Bei A 2 liegen keine Ergebnisse einer Testung am Menschen vor. Auffallend ist, daß die DL₅₀ der Ratte bei A 2 um 1–2 Zehnerpotenzen höher liegt als erwartet, denn die zytogenetische Aktivität dieser Substanz entsprach etwa der des Thiotepa. Dies könnte dadurch bedingt sein, daß A 2 nicht die eigentlich zytostatisch wirksame Substanz in vivo darstellt. Die für FUDR angegebenen Werte waren deshalb nicht vergleichbar, weil das Kulturmedium (synthetisches Nährmedium plus Spenderplasma) Thymin bzw. Thymidin enthielt, welches die FUDR-Wirkung, wie bereits geschildert, beeinflusst.

Die Häufigkeit von Interchanges, azentrischen und einzelnen Fragmenten bei verschiedenen Zytostatika in Abhängigkeit von der Konzentration ist aus Tab. 14 zu entnehmen. Es handelt sich hierbei jeweils um die Mittel- und Extremwerte der Ergebnisse verschiedener Kulturen. Die Einwirkungszeit der verschiedenen Substanzen betrug wiederum jeweils 24 Stunden. Wegen des geringen Stichprobenumfangs und wegen der relativ breiten Streuung der Zählergebnisse war eine kurvenmäßige Darstellung bzw. eine statistische Auswertung nicht möglich. Aus Tab. 14 ist jedoch zu entnehmen, daß die Interchangehäufigkeit nach Zugabe von TEM am höchsten war. Dieses Ergebnis deckt sich mit zytogenetischen Unter-

suchungen bei TEM-behandelten Mäusen, wobei die Häufung von Translokationen auffiel (CATTANACH [42]), steht jedoch im Gegensatz zu Befunden bei Drosophila, bei der die nach TEM entstandenen Brüche wenig Neigung zur Interchangebildung aufwies (AUERBACH [7]). In der Interchangehäufigkeit folgten die trenimonbehandelten Kulturen. Auch unter Thiotepa und A 2 ist eine geringere, etwa gleich große Neigung zur Interchangebildung erkennbar. FUDR jedoch bildete bei den untersuchten Substanzen eine interessante Ausnahme. Das sehr seltene Vorkommen von Interchanges könnte auf einen unterschiedlichen Wirkungsmecha-

Tabelle 14. Vergleich der Interchange- und Fragmentfrequenz von Leukozytenchromosomen in vitro nach verschiedenen Zytostatika.

| Präparat | Dosis (µg/ml) | Interchanges | Mittelwerte von 100 Metaphasen (Extremwerte in Klammern) | | |
|----------|---------------|---------------|--|--------------------|--|
| | | | azentrische Fragmente | einzelne Fragmente | |
| TEM | 0,02 | 0,7 (0–2) | 1 (1–2) | 1 (1–2) | |
| | 0,2 | 23 (39–83) | 12 (11–15) | 10 (9–10) | |
| | 1 | 32 (32–32) | 13 (12–14) | 14 (12–16) | |
| | 2 | 126 (110–142) | 31 (24–38) | 60 (58–62) | |
| Trenimon | 0,002 | 0,25 (0–1) | 10 (4–13) | 9 (7–11) | |
| | 0,004 | 1,5 (0–3) | 14 (11–16) | 18 (15–20) | |
| | 0,02 | 14 (11–19) | 47 (41–57) | 28 (23–33) | |
| | 0,1 | 13 (10–16) | 122 (79–164) | 65 (62–67) | |
| Thiotepa | 0,2 | 30 (33–26) | 127 (84–170) | 99 (84–120) | |
| | 0,3 | 0,8 (0–1) | 1 (1–1) | 1 (1–2) | |
| | 3 | 4 (2–6) | 6 (4–9) | 7 (3–10) | |
| | 10 | 3 (1–5) | 5 (4–6) | 9 (6–11) | |
| | 30 | 5 (1–11) | 10 (5–20) | 15 (8–18) | |
| | 70 | 15 (15–15) | 29 (26–37) | 34 (22–41) | |
| A 2 | 100 | 17 (15–18) | 41 (37–45) | 62 (54–70) | |
| | 1 | — | 3 (1–5) | 2 (1–2) | |
| | 3 | 2 (0–2) | 4 (2–6) | 3 (0–5) | |
| | 5 | 3 (1–6) | 6 (4–8) | 3 (2–4) | |
| | 10 | 4 (1–6) | 9 (9–10) | 7 (6–7) | |
| | 20 | 0,3 (0–1) | 16 (13–21) | 10 (3–15) | |
| FUDR | 50 | 14 (10–18) | 38 (35–40) | 30 (21–35) | |
| | 10 | 0,3 (0–1) | 3 (0–6) | — | |
| | 50 | — | 19 (18–19) | 4 (3–4) | |
| | 200 | — | 29 (28–29) | 3 (2–4) | |
| | 500 | — | 57 (50–63) | 14 (12–15) | |

nismus hindeuten. Auch bei *Vicia faba* konnte nachgewiesen werden, daß FUDR die sonst vorhandene Neigung zu Translokationen verhindert (KIHLMAN [131], TAYLOR, HAUT u. TUNG [243]).

In der Häufigkeit der Fragmentbildung hingegen steht das Trenimon an erster Stelle. Es folgen FUDR sowie TEM. Betrachtet man das Verhältnis von azentrischen und einzelnen Fragmenten, so wird leicht erkennbar, daß FUDR im Gegensatz zu den anderen Substanzen vorwiegend azentrische und nur wenig einzelne Fragmente induzierte. Nach TEM-Einwirkung scheinen einzelne Fragmente häufiger als azentrische vorzukommen, während das Umgekehrte für Trenimon, Thiotepa und A 2 zu gelten scheint.

Aus der Tabelle der Interchange- und Fragmenthäufigkeit (Tab. 14) ist demnach zu entnehmen, daß verschiedene Zytostatika offenbar auch verschiedene Häufigkeitsverteilungen der untersuchten Formen chromosomaler Strukturveränderungen aufweisen können.

Nun sind die Möglichkeiten einer Zellschädigung durch Zytostatika vielfältig und reichen von der Störung biochemischer Reaktionsabläufe bis zu morphologisch faßbaren Veränderungen. Die Absterberate könnte beispielsweise u. a. auch durch die mit zytologischen Methoden erkennbare Interchangefrequenz beeinflußt werden. Eine der vielen Deutungsmöglichkeiten für die klinisch bekannte Wirkungsselektivität

zytostatischer Substanzen (GERHARTZ [89]) könnte neben der Beeinflussung zytoplasmatischer Faktoren auch die unterschiedliche Schädigung der Kernsubstanz darstellen.

5. Einige Möglichkeiten der Entstehung von Interchanges

Die Bildung von Interchanges wird ermöglicht durch die Verschmelzung von Bruchenden nach der räumlichen Näherung zweier Chromosomen. Einige Möglichkeiten, die für die Entstehung von Interchanges am untersuchten Material typisch sein könnten, sind in den Abb. 10 und 11 zusammengefaßt. Hierzu ist einschränkend zu bemerken, daß es sich lediglich um mögliche, keineswegs jedoch um bewiesene Vorgänge handeln kann.

Aus der schematischen Zeichnung der Abb. 10 ist zu entnehmen, daß die Bruchenden zweier Chromatide kreuzweise (Fig. B) verschmelzen können. Dabei wird angenommen, daß die Interchanges die Tendenz haben, sich zu statistisch optimalen Figuren (meist 3- oder 4armigen Sternfiguren, s. Abb. 3, 4 und 11) umzubilden, da durch die Zellmobilität und Zytoplasmaviskosität sowie durch Spindelfaserzug Kräfte mit Hebelwirkung möglicherweise ansetzen können. Auch bei der angenommenen Figur C ist durch die verbliebene Überkreuzung der fusionierten Chromatide noch eine Spannung innerhalb des entstandenen Gebildes denkbar, die erst durch eine nochmalige Drehung in der Achsenrichtung in der Figur D ausgeglichen sein könnte. Die jetzt entstandene Überkreuzung der Chromatidarme stellt eine statisch bessere Lösung dar. REVELL [209, 211] sah nach Röntgenbestrahlung von Wurzelspitzen der *Vicia faba* ganz ähnliche Überkreuzungen von Chromatiden bei Interchanges (Abb. 7 u. 8). In den Figuren der Abb. 11 (D 1-4) sind die überkreuzten Chromatide jeweils nach unten gerichtet. Das Kreuzungsphänomen war photographisch nur schwer darstellbar. Nur bei direktem mikroskopischem Einblick unter Betätigung der Mikrometerschraube konnte dieses sicher erkannt werden. Handelt es sich bei dieser Interchangeform zufällig um zwei homologe Chromosomen, so wäre ein somatisches Crossing over in diesem Falle durchaus denkbar, wie dies auch für einen Teil der nach Stickstofflostbehandlung von *Vicia faba* aufgetretenen Translokationen bereits vermutet worden ist (REVELL [208]). Außerdem haben SHAW u. COHEN [227] bei menschl-

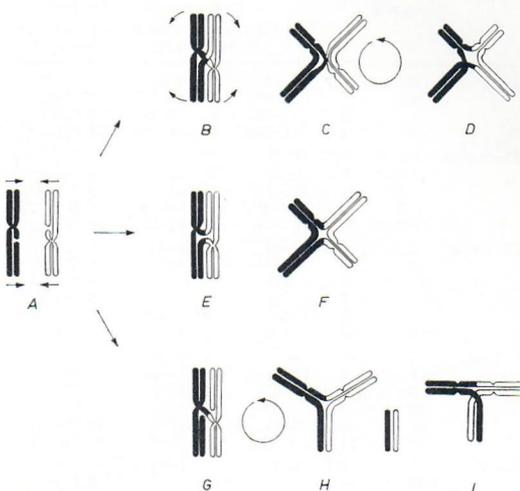


Abb. 10. Einige Möglichkeiten der Entstehung von Interchanges (Erklärung s. Text).

chen Leukozytenchromosomen nach Mitomyzin C sowie GERMAN [94] und GROPP u. ODUNJO [97] bei unbehandelten Leukozyten in vitro das somatische Crossing over beschrieben.

Eine weitere Möglichkeit der Interchangebildung ist in Abb. 10, Figur E und F, bzw. in Abb. 11, Figur F 5–9, dargestellt. Hier erfolgte die End-zu-End-Verschmelzung nicht kreuzförmig, sondern direkt (Figur E), woraus durch Abbiegung der Chromatidarme wiederum die statisch günstigere Figur F resultieren könnte. Derartige Formen wurden häufig beobachtet.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, daß nur jeweils zwei statt vier Bruchenden fusionieren (Abb. 10, Figur G–I). Durch Drehung sind wiederum zwei statisch günstige Figuren, diesmal unter Bildung von Fragmenten, zu erwarten, nämlich einmal die Figur H in Abb. 10 bzw. H 10–12 in Abb. 11 und die Figur I in Abb. 10 bzw. I 13 in Abb. 11, die durch nochmalige Achsendrehung entstanden sein könnte.

Mehrere Formen der Interchanges waren nicht deutbar. Sie sind in einigen Beispielen aus Abb. 11, Nr. 14–18, zu ersehen. Meist traten sie unter höheren Konzentrationen in vitro auf, vereinzelt auch bei zytostatisch behandelten Patienten mit anschließend durchgeführter Kultur der peripheren Leukozyten (Figur 17). Die Bruchfrequenz derartiger Interchanges war nicht festzulegen.

Es ist denkbar, daß durch die Kondensation bzw. stärkere Spiralisierung der Chromosomen in der Metaphase, die durch den Kolchizinzusatz verstärkt wurden, die in der Prophase noch erhaltene Verformbarkeit der Chromatide abnimmt und diese dann ein in sich relativ starres Gebilde darstellen, an dem die vermuteten Kräfte ansetzen können, die ihrerseits zur Formung der Interchangefiguren beitragen könnten. Ob diese Deutungen zutreffen, müßten Lebendbeobachtungen ergeben.

6. Die Wirkung von Endoxan und dessen Aktivierungsprodukten

Zyklophosphamid erwies sich in vitro als weitgehend stabil und bei Testung an Tumorzellen als unwirksam (BROCK [36], BROCK u. HOHORST [38]). Die zytostatisch aktive Substanz entsteht vielmehr erst in vivo nach Leberpassage und läßt sich dann im Plasma, Galle und Urin beim Menschen und bei Säugetieren nachweisen. Lebermikrosomen können in Gegenwart von Sauer-

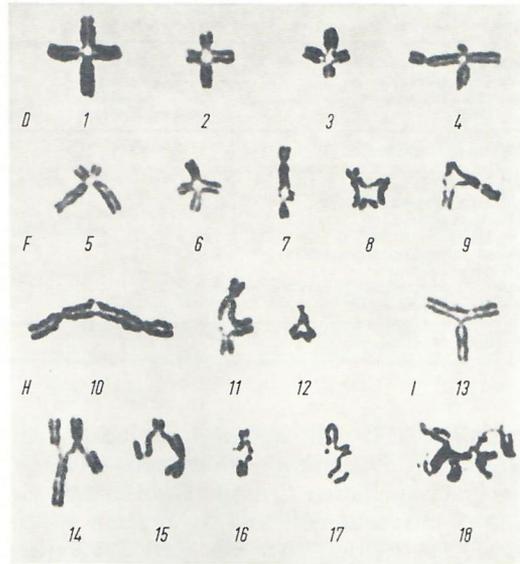


Abbildung 11. Interchangeformen nach Einwirkung von Zytostatika auf menschliche Chromosomen.

TEM: Nr. 1, 3, 8, 10, 11, 18
Thiotepa: Nr. 2, 4, 13, 15
Trenimon: Nr. 5, 6, 7, 9, 14, 16
A 2: Nr. 12
Endoxan (in vivo): Nr. 17.

stoff Endoxan aktivieren, nicht jedoch zellfreie Leberhomogenisate (BROCK u. HOHORST [38]). Eigene Versuche ergaben, daß Endoxan bei direktem Zusatz zu Leukozytenkulturen keine strukturellen Chromosomenveränderungen induzierte (Tab. 15). Die Bruchfrequenz dieser

Tabelle 15. Bruchfrequenz menschlicher Chromosomen in vitro nach Zusatz von aktiviertem und nicht aktiviertem Endoxan.

| | | % Meta- phasen mit Struktur- anomalien | Bruch- frequenz pro Meta- phase |
|-----------|---|--|---|
| Kontrolle | (+ 1 ml Kontrollplasma einer unbehandelten Ratte) | 6 | 0,06 |
| Kontrolle | | 5 | 0,06 |
| 1) | 0,2 mg/ml Endoxan direkt der Kultur zugesetzt | 13 | 0,14 |
| 2) | 0,2 mg/ml " | 5 | 0,07 |
| 3) | 0,4 mg/ml " | 3 | 0,03 |
| 4) | 0,4 mg/ml " | 4 | 0,04 |
| 5) | Ratte 1: Endoxan 500 mg/kg i.p. 0,1 ml Rattenplasma | 26 | 0,32 |
| 6) | Ratte 1: 0,2 ml Rattenplasma | 34 | 0,50 |
| 7) | Ratte 2: 1000 mg/kg Endoxan i.p. 0,2 ml Rattenplasma | 29 | 0,69 |
| 8) | Ratte 3: 500 mg/kg Endoxan i.v. 0,5 ml Rattenplasma | 56 | 0,98 |
| 9) | Ratte 4: 1000 mg/kg Endoxan i.v. 0,5 ml Rattenplasma | 87 | 2,58 |

Bewertete Metaphasen: 27 in Nr. 7, sonst 100 pro Kultur.

Tabelle 16. Analyse der Strukturanomalien menschlicher Chromosomen *in vitro* nach Zusatz von aktiven Endoxan-Umwandlungsprodukten.

| Strukturanomalien der Chromosomen auf 100 Metaphasen | Ratte 1 | Ratte 1 | Ratte 2 | Ratte 3 | Ratte 4 |
|--|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| | 500 mg/kg i.p. 0,1 ml Plasma | 500 mg/kg i.p. 0,2 ml Plasma | 1000 mg/kg i.p. 0,2 ml Plasma | 500 mg/kg i.v. 0,5 ml Plasma | 1000 mg/kg i.v. 0,5 ml Plasma |
| Chromatidbrüche | 25 | 33 | 47 | 70 | 76 |
| Isochromatid- u. Chromosomenbrüche | 2 | 5 | 1 | 3 | 9 |
| azentrische Fragmente | 2 | 2 | 6 | 7 | 31 |
| einzelne Fragmente | — | 1 | 4 | 3 | 5 |
| Interchanges | — | 1 | 1 | — | 6 |
| Bruchfrequenz | — | 2 | 2 | — | 16 |
| dizentrische Chromosomen | 1 | — | — | — | 3 |
| Ringchromosomen | — | — | 1 | — | 1 |
| nicht klassifizierbare Strukturanomalien | — | — | — | — | — |
| Bruchfrequenz ca. | — | — | — | — | 65 |
| Bewertete Metaphasen | 100 | 100 | 100 | 27 | 100 |

Kulturen hielt sich vielmehr im Bereich der Kontrollen. Daraufhin wurden 500–1000 mg/kg Endoxan Ratten (Wistar, Gewicht 200 bis 240 g) intraperitoneal und in anderen Fällen intravenös injiziert und nach einer Stunde heparinisieretes Blut mittels Herzpunktion gewonnen. Nach scharfem Zentrifugieren wurde unmittelbar anschließend Rattenplasma in verschiedenen Mengen Kurzzeitkulturen menschlicher Leukozyten 24 Stunden vor der Verarbeitung zugesetzt. Aus Tab. 15 und 16 ist zu entnehmen, daß die im Rattenplasma enthaltenen zytostatisch aktiven Umwandlungsprodukte des Zyklophosphamids nunmehr ebenfalls Strukturveränderungen an den menschlichen Chromosomen verursachten, wie sie in

ähnlicher Weise auch bei anderen Zytostatika nachgewiesen wurden. Maximale Veränderungen wurden nach 1000 mg/kg Endoxan intravenös und 0,5 ml Rattenplasma beobachtet: 87 % der ausgewerteten Metaphasen wiesen Strukturveränderungen der Chromosomen auf, die mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase betrug 2,6. Zahlreiche Fragmente, relativ wenig Interchanges, vereinzelt dizentrische und Ringchromosomen wurden nachgewiesen (Tab. 16).

7. Die Wirkung von Amethopterin

Bei direktem Zusatz von Amethopterin (Methotrexat) zu den Leukozytenkulturen wurden auch bei maximaler Dosierung keine über das Maß der Kontrollen hinausgehende Chromosomenanomalien beobachtet (s. Tab. 17). Die therapeutische Einzeldosis beim Menschen diente als Anhaltspunkt für die einer Kultur zuzusetzende Menge eines Zytostatikums. Setzt man nämlich voraus, daß *in vivo* eine gleichmäßige Verteilung der Substanz in ca. 10 l Lösungswasser bei Normalgewicht stattfindet, und vernachlässigt man zugleich den Konzentrationsabfall, wie er *in vivo* durch Abbau bzw. Ausscheidung eintritt, so entsprechen z. B. 2 mg TEM (therapeutische Einzeldosis) *i. v.* etwa 0,2 µg/ml TEM *in vitro*. Die zehnfache TEM-Konzentration führte in der Kultur bereits zu maximalen Bruchfrequenzen. Überträgt man diese Überlegungen auch auf Methotrexat, so wäre die entsprechende Dosis *in vitro* 1 µg/ml Kulturmedium, da die therapeutische Einzeldosis mit 10 mg angegeben wird. Methotrexat wurde nun jedoch nicht nur bei 10facher, sondern sogar bei 100facher Konzentration in der Kultur getestet, ohne daß jedoch vermehrt Strukturanomalien der Chromosomen auftraten (Abb. 8).

Tabelle 17. Testung von Amethopterin (Methotrexat) an den Chromosomen menschlicher Leukozyten *in vitro*.

| | % Metaphasen mit Strukturanomalien | Bruchfrequenz pro Metaphase |
|--|------------------------------------|-----------------------------|
| Amethopterinzusatz: 24 Std. vor Fixierung | | |
| 1) 6 Std. vor Fixierung: HANKS-Lösung + 1 µg/ml Hycl Kontrolle | 8 | 0,08 |
| 2) 6 Std. vor Fixierung: HANKS-Lösung + 1 µg/ml Hycl + 1 µg/ml Amethopterin | 9 | 0,11 |
| 3) 24 Std. vor Fixierung: HANKS-Lösung + 1 µg/ml Hycl + 1 µg/ml Amethopterin | 11 | 0,2 |
| 4) 5 mg Amethopterin Ratte <i>i. v.</i> , nach 1 Std. 0,5 ml Plasma 24 Std. vor Fixierung den Kulturen zugesetzt | 13 | 0,13 |
| 5) wie 4 | 22 | 0,32 |
| 6) 20 mg Amethopterin Ratte <i>i. v.</i> , nach 1 Std. 1,0 ml Plasma 24 Std. vor Fixierung den Kulturen zugesetzt | 7 | 0,07 |
| 7) wie 6 | 3 | 0,03 |

Zahl der bewerteten Metaphasen bei 4: 45, sonst 100.

Da das bei diesen Versuchen verwandte Kulturmedium (TC 199 und autologes Plasma) Folsäure enthielt, wurde 6 bzw. 24 Stunden vor der Verarbeitung das Kulturmedium gegen eine Elektrolytlösung nach HANKS unter gleichzeitigem Zusatz von Methotrexat ausgetauscht. Es zeigte sich jedoch, daß der Mitoseindex derartig behandelte Kulturen rapide absank, so daß es nur einmal gelang, eine zusätzlich mit Hycel (KCN) behandelte Kulturserie auszuwerten.

Kaliumzyanid wurde deswegen zugesetzt, um die Fusion von Brüchen weitgehend zu verhindern. Denn das Fehlen der unter Methotrexatwirkung zu erwartenden Brüche konnte zweierlei Ursachen haben: a) Methotrexat induziert keine Brüche; b) die entstandenen Brüche wurden restituiert, so daß in der Metaphase keine gesteigerte Bruchfrequenz nachweisbar war.

Tab. 17 läßt erkennen, daß auch bei kombinierter Verwendung von HANKS-Lösung, Hycel und Methotrexat keine Vermehrung der Chromosomenanomalien nachgewiesen wurden.

Da nun die Möglichkeit nicht auszuschließen war, daß ähnlich wie bei Endoxan die zytostatisch aktive Form erst durch chemische Umwandlung *in vivo* entsteht, und da darüber hinaus neuerdings bei Mäusen mit L-1210-Asziteslymphom gefunden wurde, daß bei Injektion von ³H-markiertem Methotrexat die größte Aktivität in der Leber nachzuweisen ist (BRODIE, ENG, WALLERSTEIN u. SCHORR [39]), wurde Amethopterin auch nach Passage durch Ratten getestet. Die dabei verwandte Methode wurde bereits bei der Prüfung von Endoxan beschrieben. Es zeigte sich (Tab. 17), daß auch bei hoher Dosierung, die von den Ratten auch während einer Stunde nur schlecht toleriert wurde, keine Vermehrung von Brüchen in den Chromosomen der kultivierten Leukozyten auftrat. Somit konnte das Rattenplasma ein Umwandlungsprodukt von Methotrexat mit ausgeprägter mutagener Wirkung nicht enthalten.

Als nicht mutagen erwies sich Methotrexat auch bei *Drosophila* (LÜERS u. RÖHRBORN [144]), sowie beim ELD-Aszitestumor der Maus (KATO [109]).

Aus den geschilderten Ergebnissen geht somit hervor, daß bei der gegebenen Versuchsanordnung zytostatisch wirksame Substanzen wie folgt gruppiert werden können:

- a) Zytostatika, die Chromosomenmutationen auslösen (TEM, Trenimon, Thiotepa, A 2 und FUDR).

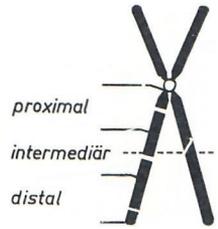


Abb. 12. Lokalisation der Chromatidbrüche.

- b) Zytostatika, bei denen Chromosomenmutationen in größerem Ausmaß nicht nachgewiesen werden konnten (Natulan und Methotrexat).
- c) Zytostatika, die erst nach Aktivierung *in vivo* Chromosomenmutationen induzieren (Endoxan).

Zu b): LÜERS [162] wies an *Drosophila* nach, daß Aminopterin und Sanamycin nicht mutagen wirksam sind. Das gleiche gilt für Amethopterin und weitere Antimetabolite (LÜERS u. RÖHRBORN [163]).

8. Die Lokalisation der durch Zytostatika induzierten Brüche

Die Lokalisation der Brüche wurde nur an Zellen vorgenommen, die keine Interchanges enthielten. Es wurden folgende Chromosomen bzw. Chromosomengruppen unterschieden: Nr. 1, 2, 3, 4–5, 6–12, X, 13–15, 16, 17–18, 19–20, 21–22, Y.

Die Klassifizierung entsprach der Denver Nomenklatur [56]. Es galt jedoch über eine derartige Klassifizierung hinaus eine feinere und praktisch anwendbare Unterteilung der Chromatide zu finden. Es zeigte sich dabei, daß die Unterteilung der Chromatide in drei gleich große Segmente die beste Lösung darzustellen schien. Es wurde daher vorgeschlagen, folgende Segmente zu unterscheiden (HAMPEL u. PALME 1963 [104]), s. Abb. 12:

ein Segment *proximal* vom Zentromer gelegen, ein Segment *distal* vom Zentromer gelegen und ein Segment *intermediär* gelegen.

GLÄSS [95] benutzte eine ähnliche Einteilung zum Studium röntgeninduzierter Brüche bei *Bellevalia romana*. Er unterschied proximale, mediane und distale Schenkel. NICHOLS, LEVAN u. KIHLMAN [193] teilten die Chromatide gleichfalls in drei Segmente gleicher Größe ein und gaben den Segmenten der langen Arme die Nummern 1–3 und denen der kurzen die Nummern 4–6.

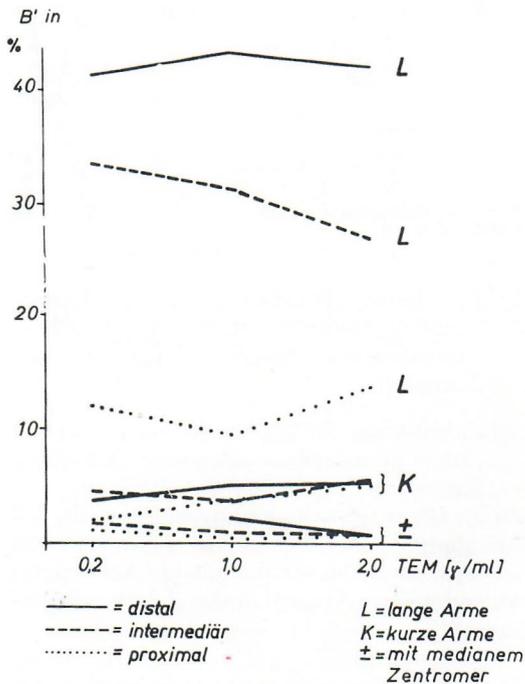


Abb. 13. Lokalisation TEM-induzierter Chromatidbrüche menschlicher Leukozyten in vitro. (Aus HAMPEL u. GERHARTZ [101].)

Wo möglich, wurde zwischen langen und kurzen Armen unterschieden. Bei median gelegenen Zentromer, d. h. bei annähernd gleichlangen Armen der Chromosomen 3 und 19–20, ließ sich diese Unterscheidung nicht durchführen.

Ferner konnten natürlich bei den akrozentrischen Chromosomen die Chromatide der kurzen Arme nicht weiter unterteilt werden. Das war bei den Chromosomen der Gruppen 13–15 und 21–22, Y der Fall.

Beispiele für verschiedene Formen der Chromatid- und Chromosomen- bzw. Isochromatidbrüche sind in Abb. 14 zusammengestellt. Aus der Abbildung sind folgende Formen ersichtlich:

1. proximaler Chromatidbruch am langen Arm;
2. intermediärer Chromatidbruch am langen Arm;
3. distaler Chromatidbruch am langen Arm;
4. intermediärer Chromatidbruch eines akrozentrischen Chromosoms der Gruppe 13 bis 15 mit Achsendrehung, einer möglichen Form der Dislokation;

5. Translokation eines Chromatids bei offengebliebener Bruchlücke des anderen, wie aus der Karyotypanalyse zu entnehmen war;
6. intermediärer Chromosomen- oder Isochromatidbruch und distaler Chromatidbruch bei einem Diplochrosom;
7. distaler Chromosomen- oder Isochromatidbruch der langen Arme;
8. intermediärer Chromatidbruch der kurzen Arme mit sekundärer Konstriktion auf gleicher Höhe. Früher wurde dabei eine Bruchkonstriktion (ÖSTERGREN u. WAKONIG [197]) angenommen. Bei quantitativen Analysen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden derartige Veränderungen nicht als Brüche bewertet;
9. das gleiche gilt für diese Veränderung mit Dislokation;
10. distaler Chromatidbruch mit Verlust eines Bruchstücks;
11. azentrisches, gedoppeltes Fragment.

Die Veränderungen 8–10 traten bei In-vitro-Versuchen sehr selten auf, wurden jedoch häufiger bei 2 Patienten mit chronischer Myelose beobachtet (HAMPEL u. PALME [104]).

Am Beispiel des TEM wurde zunächst eine grobe Bruchlokalisierung vorgenommen, um den Einfluß der verschiedenen Konzentrationen des Zytostatikums auf die Bruchverteilung zu studieren (HAMPEL u. GERHARTZ [101]). Wie aus Abb. 13 hervorgeht, konnte gezeigt werden, daß die Verteilung der Brüche in den Chromatidsegmenten im wesentlichen von der Konzentration unabhängig ist. Über eine Dosisvaria-

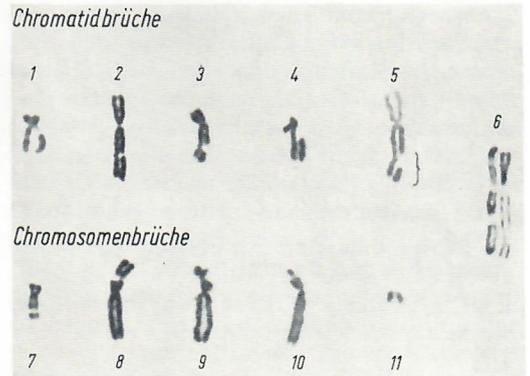


Abb. 14. Beispiele chromosomaler Strukturanomalien bei der zytostatisch behandelten chronischen Myelose. (Aus HAMPEL u. PALME [104].)

tion von einer Zehnerpotenz blieb die Verteilung der Brüche in den Segmenten annähernd konstant. Weitaus an der Spitze der Bruchfrequenz standen die distalen Segmente der langen Arme mit über 40 % aller Brüche, gefolgt von den intermediären und den proximalen. Auffallend war schon zu dieser Zeit, daß die sehr kleinen Chromosomen der Gruppen 16–22, Y auffällig selten von Brüchen betroffen wurden. Setzt man nun für die Gesamtlänge aller Chromosomen einer Metaphase einen Wert von 1000 Einheiten ein, so sind die relativen Längen der Chromosomen durch Messung zu ermitteln (LEVAN u. NICHOLS [149]). Dabei wurden die Chromosomen in der bereits geschilderten Weise in Gruppen zusammengefaßt und die relative

Länge nicht nur für das Einzelchromosom bzw. die Chromosomengruppe, sondern auch jeweils für die langen und kurzen Arme der Chromatide angegeben. Teilt man nun die Werte der einzelnen Chromatide durch drei und markiert je ein distales, intermediäres und proximales Segment, so erhält man auch die Länge der einzelnen Chromatidsegmente in Teilen von 1000 (Tab. 18, Spalten 1–2.) Unter der Voraussetzung, daß eine gleichmäßige Verteilung von Chromatidbrüchen in den Chromosomen vorliegt, wäre die relative Länge der Chromatide bzw. deren Segmente der Zahl der in dieser Längeneinheit vorkommenden Brüche proportional. Unter einer weiteren Voraussetzung, nämlich wenn pro Längenein-

Tabelle 18. Lokalisation der durch Zytostatika induzierten Brüche.

| Chromosomen Nummer | Arm | Segment | relative Länge = Bruchfrequenz bei gleichmäßiger Verteilung | | TEM 24 h | Trenimon 24 h | Thiotepa 24 h | A 2 24 h | FUDR 24 h | FUDR 6 h |
|------------------------------|------|-----------|--|------|-------------|------------------|------------------|-------------|--------------|-------------|
| | | | m | w | w | m | w | m | m | m |
| 1 | lang | distal | 15 | 15 | 45 | 49 | 73 | 52 | 38 | 32 |
| | | intermed. | 15 | 15 | 25 | 28 | 25 | 37 | 23 | 24 |
| | | proximal | 15 | 15 | 10 | 7 | 12 | 9 | 20 | 3 |
| | kurz | d. | 14 | 14 | 20 | 14 | 30 | 15 | 16 | 13 |
| | | i. | 14 | 14 | 10 | 11 | 8 | 16 | 5 | 12 |
| | | p. | 14 | 14 | 2 | 6 | 6 | 6 | 2 | 3 |
| 2 | lang | d. | 16 | 16 | 39 | 36 | 36 | 23 | 54 | 32 |
| | | i. | 16 | 16 | 25 | 25 | 22 | 28 | 16 | 29 |
| | | p. | 16 | 16 | 11 | 12 | 4 | 10 | 14 | 6 |
| | kurz | d. | 11 | 11 | 20 | 10 | 18 | 7 | 7 | 22 |
| | | i. | 11 | 11 | 11 | 12 | 15 | 8 | 2 | 10 |
| | | p. | 11 | 11 | 13 | 6 | 5 | 2 | — | 7 |
| 3 | ± | d. | 23 | 23 | 28 | 23 | 21 | 28 | 28 | 41 |
| | | i. | 23 | 23 | 8 | 17 | 14 | 20 | 13 | 7 |
| | | p. | 23 | 23 | 8 | 2 | 2 | 2 | 5 | 6 |
| 4–5 | lang | d. | 30 | 29 | 45 | 29 | 45 | 30 | 72 | 60 |
| | | i. | 30 | 29 | 32 | 35 | 28 | 75 | 34 | 40 |
| | | p. | 30 | 29 | 8 | 11 | 9 | 6 | 9 | 13 |
| | kurz | d. | 11 | 11 | 12 | 11 | 12 | 8 | 5 | 4 |
| | | i. | 11 | 11 | 8 | 8 | 8 | 12 | 5 | 24 |
| | | p. | 11 | 11 | 2 | 5 | 2 | 2 | 7 | 2 |
| 6–12, X | lang | d. | 80 | 85 | 204 | 169 | 213 | 125 | 235 | 232 |
| | | i. | 80 | 85 | 98 | 109 | 93 | 123 | 82 | 72 |
| | | p. | 80 | 85 | 46 | 48 | 30 | 37 | 39 | 46 |
| | kurz | d. | 40 | 43 | 49 | 72 | 46 | 24 | 54 | 35 |
| | | i. | 40 | 43 | 31 | 23 | 28 | 37 | 41 | 32 |
| | | p. | 40 | 43 | 18 | 18 | 14 | 11 | 5 | 16 |
| 13–15 | lang | d. | 30 | 29 | 70 | 42 | 59 | 54 | 71 | 78 |
| | | i. | 30 | 29 | 35 | 63 | 21 | 62 | 27 | 24 |
| | | p. | 30 | 29 | 11 | 8 | 6 | 12 | 5 | 13 |
| 16 | lang | d. | 13 | 13 | — | 3 | 3 | 1 | — | — |
| | | i. | 6 | 6 | 4 | 19 | 16 | 22 | 13 | 6 |
| | | p. | 6 | 6 | 4 | 5 | 7 | 18 | 2 | 3 |
| 17–18 | kurz | d. | 6 | 6 | 3 | 3 | 1 | 7 | — | — |
| | | i. | 12 | 12 | 6 | 7 | 5 | 11 | 2 | 2 |
| | | p. | 14 | 14 | 10 | 15 | 15 | 12 | 5 | 24 |
| | lang | d. | 14 | 14 | 9 | 4 | 6 | 15 | 5 | 3 |
| | | i. | 14 | 14 | 3 | 2 | — | 4 | 2 | — |
| | | p. | 15 | 15 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | — |
| 19–20 | ± | d. | 15 | 15 | 9 | 13 | 9 | 3 | 5 | 6 |
| | | i. | 15 | 15 | 2 | 1 | 10 | 7 | — | 2 |
| | | p. | 15 | 15 | — | 1 | — | 1 | 2 | — |
| 21–22, Y | lang | d. | 11 | 8 | 1 | 11 | 17 | 8 | 21 | 15 |
| | | i. | 11 | 8 | 1 | 2 | 2 | 4 | 2 | — |
| | | p. | 11 | 8 | 1 | 3 | 3 | 7 | — | 3 |
| kurz | d. | 9 | 7 | — | — | 1 | — | — | — | |
| | i. | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| Summe | | | 997 | 1004 | 998 | 1000 | 1001 | 1002 | 995 | 1002 |
| Zahl der gezählten Brüche | | | — | — | 905 | 944 | 1028 | 1044 | 558 | 681 |

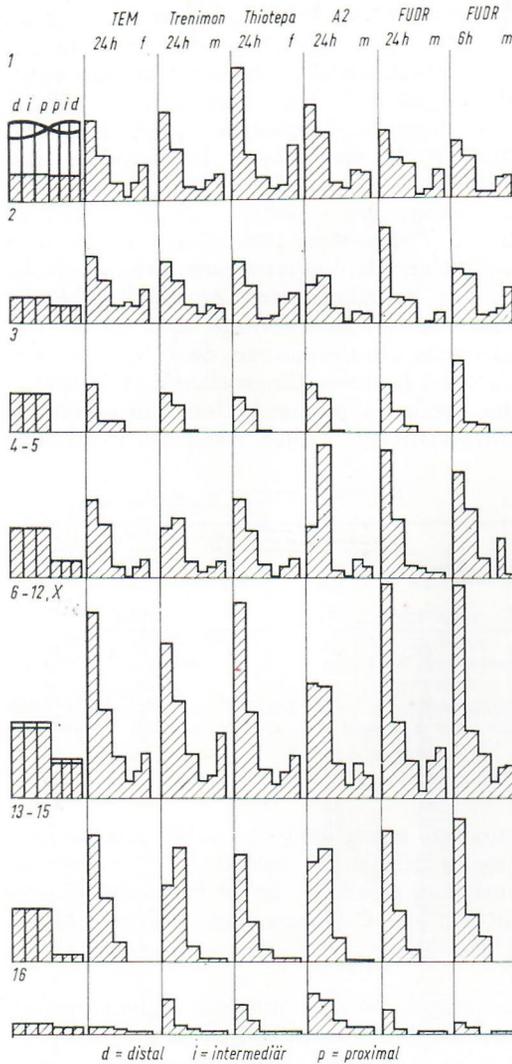


Abb. 15. Lokalisation der durch Zytostatika induzierten Brüche.

heit 1 Bruch bei gleichmäßiger Verteilung aufträte, wäre die relative Chromatidlänge gleich der darin auftretenden Bruchzahl. Diese Voraussetzungen wurden in den ersten beiden Spalten der Tab. 18 geschaffen, indem nicht nur die relativen Längen der Chromatidsegmente, sondern auch die in diesen Segmenten gezählten Brüche jeweils in Promille ausgedrückt wurden. Somit ist die relative Segmentlänge in den ersten beiden Spalten gleich der darin zu erwartenden Bruchfrequenz bei gleichmäßiger Verteilung und damit direkt vergleichbar mit den tatsächlich gefundenen Bruchfrequenzen.

Vergleicht man nun die hypothetischen Werte in den ersten beiden Spalten der Tab. 18 mit den Werten, die nach zytostatischer Behandlung der Kulturen in den einzelnen Chromatidsegmenten tatsächlich gefunden wurden, so läßt sich unschwer erkennen, daß es sich nicht um eine gleichmäßige Verteilung der Brüche in den Chromatidsegmenten handeln kann. Vielmehr ist aus Tab. 18 und aus Abb. 15, die eine graphische Darstellung der gefundenen Werte enthält, zu entnehmen, daß die Mehrzahl der Chromosomen in den distalen Chromatidsegmenten die meisten Brüche aufweist. In den intermediären Segmenten waren wesentlich weniger Brüche zu lokalisieren, mit Ausnahme der nach A-2-Einwirkung in den Chromosomen der Gruppe 6-12, X und 16 sowie nach Trenimon in Nr. 16 gefundenen Werte. Trotz einiger signifikanter Unterschiede in der Bruchverteilung auf die einzelnen Segmente nach verschiedenen Zytostatika (alpha gleich oder unter 0,01 bzw. 0,05) könnte es sich jedoch auch bei der relativ großen Streuung der Ergebnisse in denselben Segmenten um zufällige Meßergebnisse handeln. Geringere Bruchzahlen entfielen auf die proximalen Segmente. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Kulturen mit 6- und 24stündiger FUDR-Einwirkung ließ sich nicht nachweisen. Brüche in den kleineren Chromosomen waren relativ selten, ein Bewertungsfehler ist jedoch hier nicht auszuschließen, da Brüche in diesen Chromosomen z. T. nur schwierig erkennbar waren.

Faßt man alle Meßergebnisse der Chromosomen Nr. 1-15 zusammen, so ist, wie aus Abb. 16 ersichtlich wird, die Häufigkeit der Brüche pro Längeneinheit der Chromatidsegmente von distal nach proximal fallend, bei einer relativ hohen Standardabweichung der Mittelwerte.

Trägt man nun die Anzahl der pro Längeneinheit identischen Bruchfrequenzen für die proximalen, intermediären und distalen Chromatidsegmente getrennt auf (Abb. 17), so läßt sich unschwer die ungleichmäßige Verteilung der Brüche nach Zytostatika auf die einzelnen Segmente erkennen. Bei gleichmäßiger Verteilung wäre in allen Segmenten das Maximum der Meßergebnisse bei 1 gelegen, die Werte würden in einer Gaußschen Kurve um diesen Wert streuen. Tatsächlich lag jedoch das Maximum der proximalen Segmente deutlich unter 1, eine Bruchfrequenz pro Längeneinheit von über 1 war unwahrscheinlich. In den intermediären

Segmenten streuten die Ergebnisse breit um den Wert 1, während es in den distalen Abschnitten weitaus wahrscheinlicher war, Werte über 1 als darunter zu finden. Wegen der großen Streubreite der Ergebnisse bei der Bewertung von insgesamt 5160 Brüchen war die mathematische Definition der Kurvenverläufe nicht möglich. (Die statistische Berechnung verdanke ich Herrn Dipl.-Phys. KARL HEINZ MEINIG, Nuklearmedizinische Abteilung der Freien Universität Berlin.)

9. Anaphasestudien

Quantitative Studien über Anaphaseveränderungen bei menschlichen Leukozyten *in vitro* konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Wahrscheinlich ist der Grund darin zu suchen, daß in den Präparaten nur ganz vereinzelt auswertbare Anaphasen auftreten. Meist werden

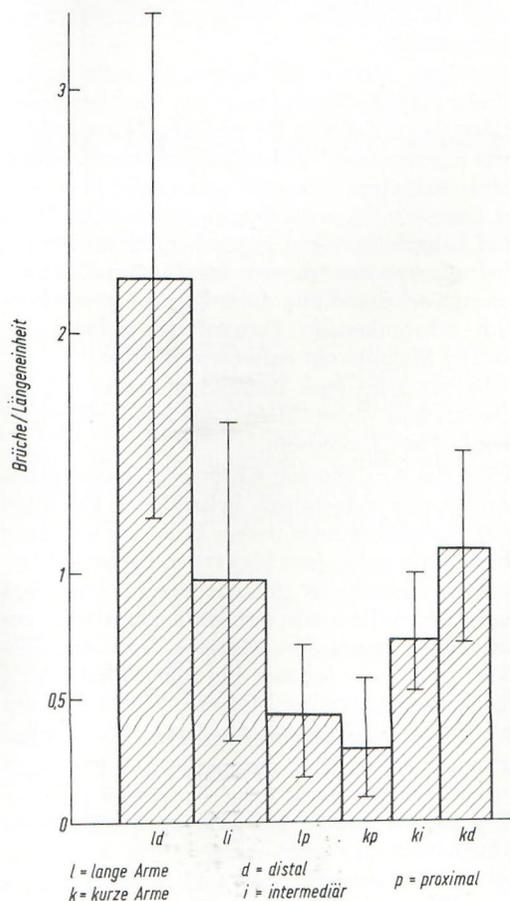


Abb. 16. Mittlere Bruchfrequenz pro Längeneinheit mit Standardabweichung der Mittelwerte (Chromosomen Nr. 1–15).

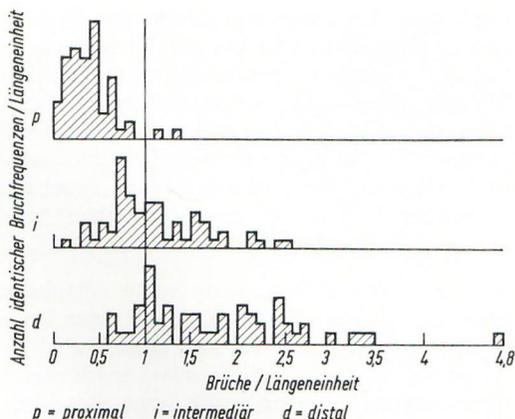


Abb. 17. Meßergebnisse identischer Bruchfrequenzen pro Längeneinheit in den einzelnen Chromatidsegmenten.

frühe Anaphasen gesehen, deren Chromosomen jedoch noch nicht weit genug polwärts gezogen worden sind, als daß möglicherweise bestehende Anaphaseveränderungen sichtbar würden. KOLLER [135] veröffentlichte ein Einteilungsschema der durch Zytostatika verursachten Anaphaseveränderungen beim Walkerkarzinom der Ratte, die durch dizentrische Chromosomen verursacht worden waren. BÖÖK, FRACCARO, FREDGA u. LINDSTEN [33] beschrieben Anaphaseveränderungen röntgenbestrahlter menschlicher Embryonalzellen in Langzeitkultur und gaben in einer Skizze einen Überblick über die Pathomorphologie derartig behandelte Anaphasen. Anaphaseveränderungen bildeten NICHOLS u. HENEEN [188] nach Einwirkung von Arabinosylzytosin auf embryonale Lungenzellen und HAMPEL u. LEVAN [103] nach Kälteeinwirkung auf Lu 106 in Langzeitkultur ab. Anaphasestudien an pflanzlichem und tierischem Material hingegen sind so zahlreich mitgeteilt worden, daß dieses Schrifttum kaum zu übersehen ist.

Methode: Die Kulturen wurden bis auf folgende Abweichungen wie die Metaphasenpräparate behandelt: Der Zusatz von Colcemid und die hypotonische Vorbehandlung entfielen, TEM wurde den Kulturen 24 Stunden vor der Fixierung in einer Konzentration von 0,2 bzw. 1,0 µg/ml Kulturmedium zugesetzt. Bewertet wurden späte Anaphasen. Es war aber nicht auszuschließen, daß es sich teilweise auch um frühe Telophasen gehandelt haben könnte, da die beginnende Abschnürung des Zytoplasmas bei der Orceinfärbung z. T. nicht sichtbar war.

Segmenten streuten die Ergebnisse breit um den Wert 1, während es in den distalen Abschnitten weitaus wahrscheinlicher war, Werte über 1 als darunter zu finden. Wegen der großen Streubreite der Ergebnisse bei der Bewertung von insgesamt 5160 Brüchen war die mathematische Definition der Kurvenverläufe nicht möglich. (Die statistische Berechnung verdanke ich Herrn Dipl.-Phys. KARL HEINZ MEINIG, Nuklearmedizinische Abteilung der Freien Universität Berlin.)

9. Anaphasestudien

Quantitative Studien über Anaphaseveränderungen bei menschlichen Leukozyten *in vitro* konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Wahrscheinlich ist der Grund darin zu suchen, daß in den Präparaten nur ganz vereinzelt auswertbare Anaphasen auftreten. Meist werden

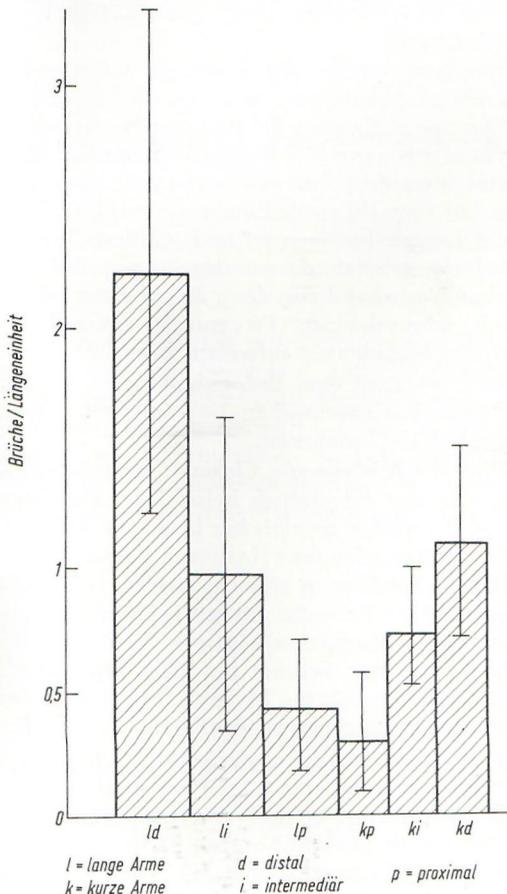


Abb. 16. Mittlere Bruchfrequenz pro Längeneinheit mit Standardabweichung der Mittelwerte (Chromosomen Nr. 1–15).

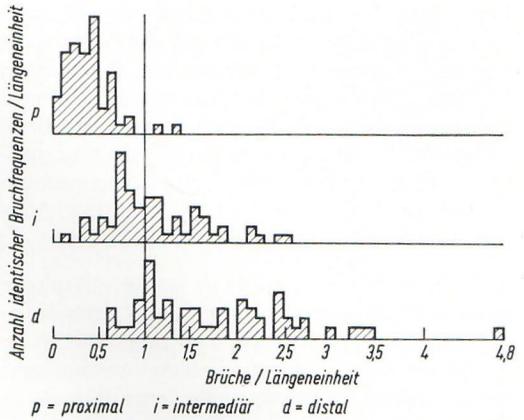


Abb. 17. Meßergebnisse identischer Bruchfrequenzen pro Längeneinheit in den einzelnen Chromatidsegmenten.

frühe Anaphasen gesehen, deren Chromosomen jedoch noch nicht weit genug polwärts gezogen worden sind, als daß möglicherweise bestehende Anaphaseveränderungen sichtbar würden. KOLLER [135] veröffentlichte ein Einteilungsschema der durch Zytostatika verursachten Anaphaseveränderungen beim Walkerkarzinom der Ratte, die durch dizentrische Chromosomen verursacht worden waren. BÖÖK, FRACCARO, FREDGA u. LINDSTEN [33] beschrieben Anaphaseveränderungen röntgenbestrahlter menschlicher Embryonalzellen in Langzeitkultur und gaben in einer Skizze einen Überblick über die Pathomorphologie derartig behandelter Anaphasen. Anaphaseveränderungen bildeten NICHOLS u. HENEEN [188] nach Einwirkung von Arabinosylzytosin auf embryonale Lungenzellen und HAMPEL u. LEVAN [103] nach Kälteeinwirkung auf Lu 106 in Langzeitkultur ab. Anaphasestudien an pflanzlichem und tierischem Material hingegen sind so zahlreich mitgeteilt worden, daß dieses Schrifttum kaum zu übersehen ist.

Methode: Die Kulturen wurden bis auf folgende Abweichungen wie die Metaphasenpräparate behandelt: Der Zusatz von Colcemid und die hypotonische Vorbehandlung entfielen, TEM wurde den Kulturen 24 Stunden vor der Fixierung in einer Konzentration von 0,2 bzw. 1,0 µg/ml Kulturmedium zugesetzt. Bewertet wurden späte Anaphasen. Es war aber nicht auszuschließen, daß es sich teilweise auch um frühe Telophasen gehandelt haben könnte, da die beginnende Abschnürung des Zytoplasmas bei der Orceinfärbung z. T. nicht sichtbar war.

Ergebnisse: Bei fehlendem Zusatz von Desazetyl-methylcolchizin war einmal die Mitoserate gering. Andererseits befanden sich die meisten Mitosen im Stadium der Metaphase, mehrere Prophasen und frühe Anaphasen waren ebenfalls sichtbar. Nur ganz vereinzelt konnten späte Anaphasen bzw. frühe Telophasen nachgewiesen werden, so daß eine quantitative Auswertung der Ergebnisse nicht möglich war.

Abb. 18 a läßt eine normale späte Anaphase eines menschlichen Leukozyten aus einer Kontrollkultur erkennen. Abb. 18 b zeigt eine frühe Anaphase mit liegendebliebenen, anscheinend längsgeteilten Fragmenten, die vermutlich durch das Fehlen eines Kinetochors von den Spindelfasern nicht polwärts gezogen werden konnten. Abb. 18 c läßt eine dreipolige Anaphase erkennen, wobei ebenfalls ein liegendebliebenes Fragment und eine fragliche Brückenbildung sichtbar sind. Abb. 18 d schließlich zeigt eine Brückenbildung, vielleicht auf Grund einer Interchangebildung.

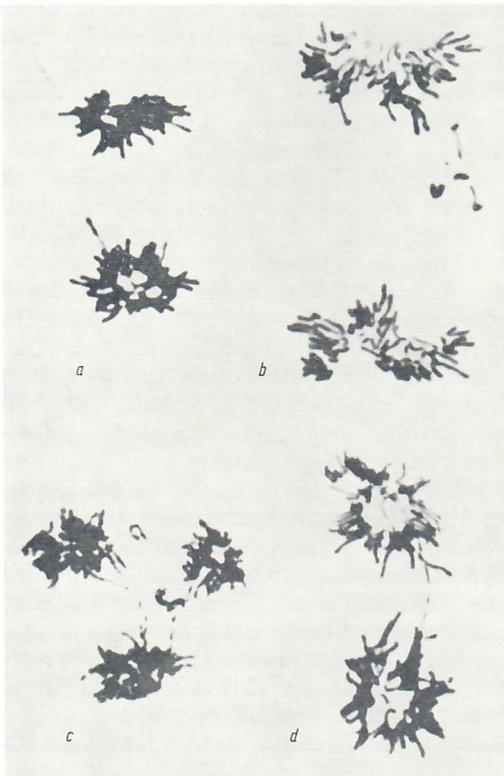


Abb. 18. Anaphaseveränderungen nach TEM.

Die Wirkung von Zytostatika auf menschliche Chromosomen in vivo

Veröffentlichungen, aus denen Ergebnisse einer Chromosomenanalyse zytostatisch behandelter Patienten hervorgehen, wurden bereits in der Literaturübersicht berücksichtigt. Die *Endoreduplikation*, bei der eine zusätzliche Duplikation der Chromosomen in der Ruhephase stattfindet, ist an den Diplochrosomen in der Metaphase leicht zu erkennen. Dieses Phänomen ist in normalen Kurzzeitkulturen menschlicher Leukozyten selten zu beobachten. OBE [195] fand bei Auswertung von 2593 Metaphasen unbehandelter Kulturen in 0,31 % Endoreduplikationen. Als bemerkenswert sollte das Auftreten der Endoreduplikation nur dann bezeichnet werden, wenn die Häufigkeit dies rechtfertigt (FRACCARO u. LINDSTEN [82]).

Berichte über das Auftreten einer Endoreduplikation in bemerkenswertem Umfange sind, soweit sie zugänglich waren, in Tab. 19 zusammengestellt.

Dagegen dürften die vereinzelt auftretenden Endoreduplikationen, wie sie von FRIEDMAN, SAENGER u. KREINDL [86] und von HOUSTON, LEVIN u. RITZMANN [111] beschrieben wurden, nicht von speziellem Interesse sein (siehe FRACCARO u. LINDSTEN [82] sowie Ergebnisse von OBE [195]). Bei Langzeitkulturen ist noch größere Zurückhaltung geboten, da aus ungeklärten Gründen ohne Vorbehandlung diese Zellen einen erheblich schwankenden Prozentsatz endoreduplizierter Metaphasen aufweisen können.

Abb. 19 zeigt eine Endoreduplikation bei der chronischen myeloischen Leukämie mit einem Diplo-Ph¹-Chromosom.

Über die Analyse von Chromosomenaberrationen zweier zytostatisch behandelter Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie soll kurz berichtet werden (aus HAMPPEL u. PALME [104]): Einmal handelte es sich um eine im Juni 1963 verstorbene Patientin mit seit Februar 1961 bestehender chronischer Myelose. Von April bis Mai 1961 bzw. Februar bis März 1963 erhielt sie insgesamt 500 mg Myleran. Seit Beginn des Myeloblastenschubs im April 1963 bis zum Beginn der ersten Leukozytenkultur im Mai 1963 erhielt sie insgesamt 1,2 g Purinethol in einer Tagesdosis von 50 mg. Von 4200 peripheren Leukozyten pro mm³ waren 35 % Myeloblasten, 2 % Promyelozyten und 21 % Myelozyten. Tab. 20 läßt eine erhebliche Streuung um die modale Chromosomenzahl erkennen, wobei

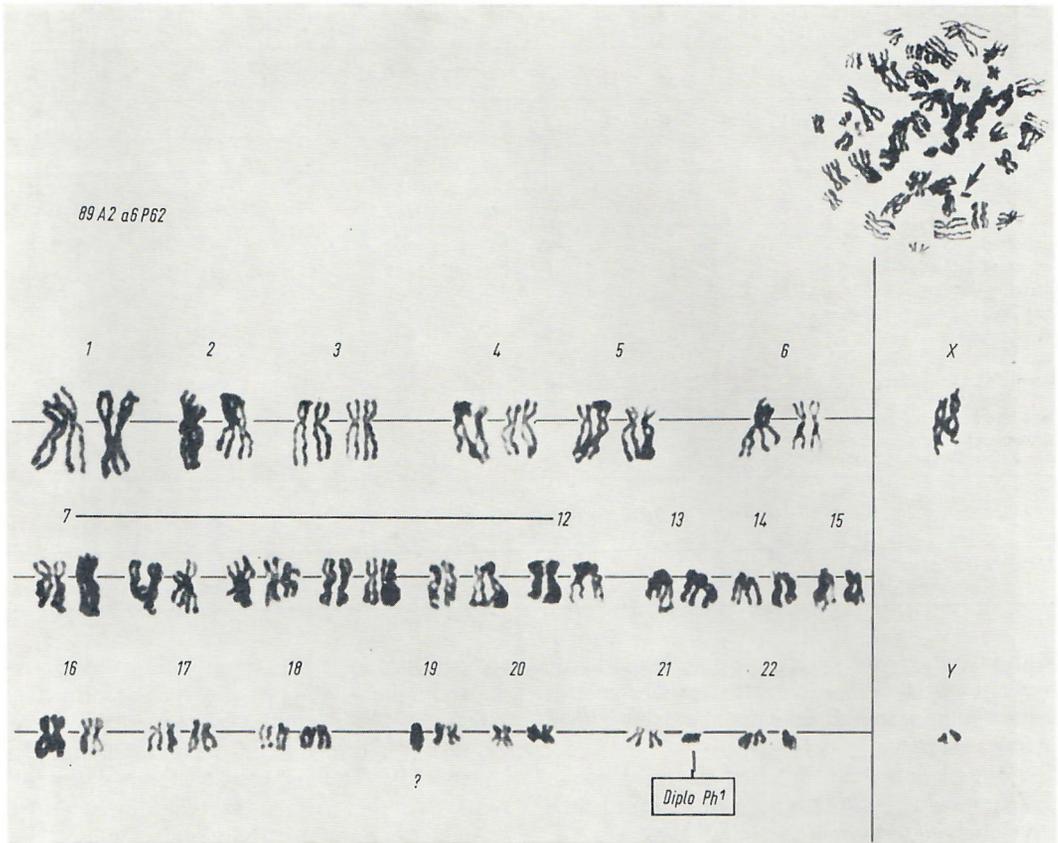


Abb. 19. Diplo-Ph¹-Chromosom bei der chronischen Myelose. (Aus HAMPEL [100].)

die Endoreduplikation mit 19 % der bewerteten Metaphasen besonders auffällt. Dieses Phänomen war in sämtlichen der drei angesetzten Leukozytenkulturen nachzuweisen. Mehrere dizentrische Chromosomen waren sichtbar. Komplexe Chromosomenaberrationen waren vermutlich durch Interchangebildung bedingt.

Bei insgesamt 174 ausgewerteten Metaphasen wiesen insgesamt 83 oder 48 % Chromosomenanomalien auf. Zieht man davon die 16 Zellen mit nachweisbarem Ph¹-Chromosom ab, so zeigten noch 32 % der Metaphasen Strukturanomalien, von denen angenommen werden kann, daß sie teilweise durch die vorausgehende zytosta-

Tabelle 19.

| Autoren | Material | Behandlung | Kultur |
|--|--|-----------------------------------|----------|
| BELL u. BAKER 1962 [16] | normale Leukozyten | Röntgenstrahlen | Kurzzeit |
| BOTTURA u. FERRARI 1963 [34] | Leukozyten bei akuter Leukose | 6-Merkaptopurin in vivo | Kurzzeit |
| JACKSON u. LINDAHL-KIESSLING 1963 [118] | normale Leukozyten | β -Merkaptopyruvat in vitro | Kurzzeit |
| JACKSON u. LINDAHL-KIESSLING 1963 [119] | normale Leukozyten | β -Merkaptoäthanol in vitro | Kurzzeit |
| REISMAN, ZUELZER u. MITANI 1963 [207] | Leukozyten bei akuter monozytoider Paramyeloblastenleukose | 6-Merkaptopurin in vivo | Kurzzeit |
| HAMPEL 1963 [99] HAMPEL u. PALME 1964 [104] | Leukozyten bei chron. myeloischer Leukämie | verschiedene Zytostatika in vivo | Kurzzeit |

Tabelle 20. Chromosomenanalyse bei der zytostatisch behandelten chronischen Myelose. Pat. E. G. (Aus HAMPEL u. PALME [104].)

| <44 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 50 | 54 | 56 | 58 | 92 | >92 | Endoredu- plikation | total | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|------------------|---|---------------------------------------|------------|----|----|----|----|------------------|----|-----|------------------------|-------|-----------------|--|-------------------|--|--|------------|------------|------------|------------|----------|---|--|---|--|-------------|---|-----------|---|---|--------|---|-----------|---|----|-----------------------------|--|--|--|---|-----------------|--|--|---|---|-------------------|--|---|--|--|-----------------------|--|---|--|----|---------------------|--|--|---|--|---|--|--|---|--|----------------------------------|------------------|---|---------------------------------------|--|
| 6 | 7 | 10 | 106 | 11 | 6 | 1 | 1 | 1 | 1 | 4 | 1 | 19 | 174 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th colspan="2">Chromatidbrüche</th> <th colspan="2">Chromosomenbrüche</th> </tr> <tr> <th></th> <th>kurzer Arm</th> <th>langer Arm</th> <th>kurze Arme</th> <th>lange Arme</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>proximal</td> <td>2</td> <td></td> <td>1</td> <td></td> </tr> <tr> <td>intermediär</td> <td>2</td> <td>1 (Nr. 1)</td> <td>2</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>distal</td> <td>1</td> <td>1 (Nr. 1)</td> <td>3</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>mit breiter achromat. Lücke</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>—</td> </tr> <tr> <td>mit Dislokation</td> <td></td> <td></td> <td>1</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>mit Translokation</td> <td></td> <td>1</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>azentrische Fragmente</td> <td></td> <td>—</td> <td></td> <td>16</td> </tr> <tr> <td>isolierte Fragmente</td> <td></td> <td></td> <td>6</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Chromatid- und Chromosomenbruch bei einem Diplochrosom</td> <td></td> <td></td> <td>1</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Ph¹-Chromosom 16</td> <td>dizentrisch 8</td> <td>abnorm lange Satelliten (Nr. 13–15) 3</td> <td colspan="2">komplexe Chromosomenaberrationen 1</td> </tr> </tbody> </table> | | | | | | | | | | | | | | Chromatidbrüche | | Chromosomenbrüche | | | kurzer Arm | langer Arm | kurze Arme | lange Arme | proximal | 2 | | 1 | | intermediär | 2 | 1 (Nr. 1) | 2 | 4 | distal | 1 | 1 (Nr. 1) | 3 | 12 | mit breiter achromat. Lücke | | | | — | mit Dislokation | | | 1 | 1 | mit Translokation | | 1 | | | azentrische Fragmente | | — | | 16 | isolierte Fragmente | | | 6 | | Chromatid- und Chromosomenbruch bei einem Diplochrosom | | | 1 | | Ph ¹ -Chromosom 16 | dizentrisch 8 | abnorm lange Satelliten (Nr. 13–15) 3 | komplexe Chromosomenaberrationen 1 | |
| | Chromatidbrüche | | Chromosomenbrüche | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | kurzer Arm | langer Arm | kurze Arme | lange Arme | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| proximal | 2 | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| intermediär | 2 | 1 (Nr. 1) | 2 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| distal | 1 | 1 (Nr. 1) | 3 | 12 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| mit breiter achromat. Lücke | | | | — | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| mit Dislokation | | | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| mit Translokation | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| azentrische Fragmente | | — | | 16 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| isolierte Fragmente | | | 6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Chromatid- und Chromosomenbruch bei einem Diplochrosom | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ph ¹ -Chromosom 16 | dizentrisch 8 | abnorm lange Satelliten (Nr. 13–15) 3 | komplexe Chromosomenaberrationen 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Metaphasen, gesamte mit Chromosomenaberrationen | | | | | | | | | 174 83 = 48 % | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

tische Therapie ausgelöst wurden. Bemerkenswert war, daß die Mehrzahl der Chromatid- bzw. Chromosomenbrüche distal an den langen Armen auftrat.

Bei einem anderen, 38 Jahre alt gewordenen Patienten wurde die Diagnose einer chronischen myeloischen Leukämie im Jahre 1957 gestellt. Wegen einer Osteochondrose erhielt er 1954 insgesamt 1350 R Röntgenbestrahlung der Lumbosakralregion und 1958 bis 1960 insgesamt 3025 R auf Milz und verschiedene Knochenmarkabschnitte zur Behandlung der Myelo-

se. Von Juni 1961 bis Januar 1963 wurde er zytostatisch behandelt. In dieser Zeit erhielt er insgesamt 42 g Mannit-Myleran, 4,87 g Azetepa, 95 mg Vincalokoblastin und 598 mg Myleran. In den letzten 4 bzw. 6 Monaten vor dem Ansatz der beiden Leukozytenkulturen erhielt er lediglich 8 mg Methylprednisolon pro die. Zur Zeit der zweiten Kultur machte sich eine beginnende Entdifferenzierung mit Übergang in einen Myeloblastenschub bemerkbar.

Die numerische und strukturelle Analyse der Chromosomenveränderungen ergab ähnliche

Tabelle 21. Chromosomenanalyse bei der zytostatisch behandelten chronischen Myelose. Pat. H. H. (Aus HAMPEL u. PALME [104].)

| <44 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 52 | 60 | 66 | 78 | 84 | 86 | 92 | Endoredu- plikation | total | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-------------------|------------|---------------------------------------|------------|----|----|----|----|------------------|----|----|----|------------------------|-------|--|-----------------|--|-------------------|--|--|------------|------------|------------|------------|----------|--|--|---|---|-------------|---|--|---|---|--------|--|--|---|----|-----------------------------|--|--|---|---|-----------------------|--|--|---|----|---------------------|--|--|--|--|---------------|--|--|---|---|----------------------------------|-------------------|--|---------------------------------------|--|
| 5 | 3 | 9 | 60 | 6 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 8 | 102 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th colspan="2">Chromatidbrüche</th> <th colspan="2">Chromosomenbrüche</th> </tr> <tr> <th></th> <th>kurzer Arm</th> <th>langer Arm</th> <th>kurze Arme</th> <th>lange Arme</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>proximal</td> <td></td> <td></td> <td>2</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>intermediär</td> <td>1</td> <td></td> <td>3</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>distal</td> <td></td> <td></td> <td>4</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>mit breiter achromat. Lücke</td> <td></td> <td></td> <td>2</td> <td>—</td> </tr> <tr> <td>azentrische Fragmente</td> <td></td> <td></td> <td>—</td> <td>11</td> </tr> <tr> <td>isolierte Fragmente</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Ringchromosom</td> <td></td> <td></td> <td>7</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Ph¹-Chromosom 17</td> <td>dizentrische 5</td> <td></td> <td colspan="2">komplexe Chromosomenaberrationen 4</td> </tr> </tbody> </table> | | | | | | | | | | | | | | | | Chromatidbrüche | | Chromosomenbrüche | | | kurzer Arm | langer Arm | kurze Arme | lange Arme | proximal | | | 2 | 3 | intermediär | 1 | | 3 | 2 | distal | | | 4 | 10 | mit breiter achromat. Lücke | | | 2 | — | azentrische Fragmente | | | — | 11 | isolierte Fragmente | | | | | Ringchromosom | | | 7 | 1 | Ph ¹ -Chromosom 17 | dizentrische 5 | | komplexe Chromosomenaberrationen 4 | |
| | Chromatidbrüche | | Chromosomenbrüche | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | kurzer Arm | langer Arm | kurze Arme | lange Arme | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| proximal | | | 2 | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| intermediär | 1 | | 3 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| distal | | | 4 | 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| mit breiter achromat. Lücke | | | 2 | — | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| azentrische Fragmente | | | — | 11 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| isolierte Fragmente | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ringchromosom | | | 7 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ph ¹ -Chromosom 17 | dizentrische 5 | | komplexe Chromosomenaberrationen 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Metaphasen, gesamte mit Chromosomenaberrationen | | | | | | | | | 102 45 = 45 % | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

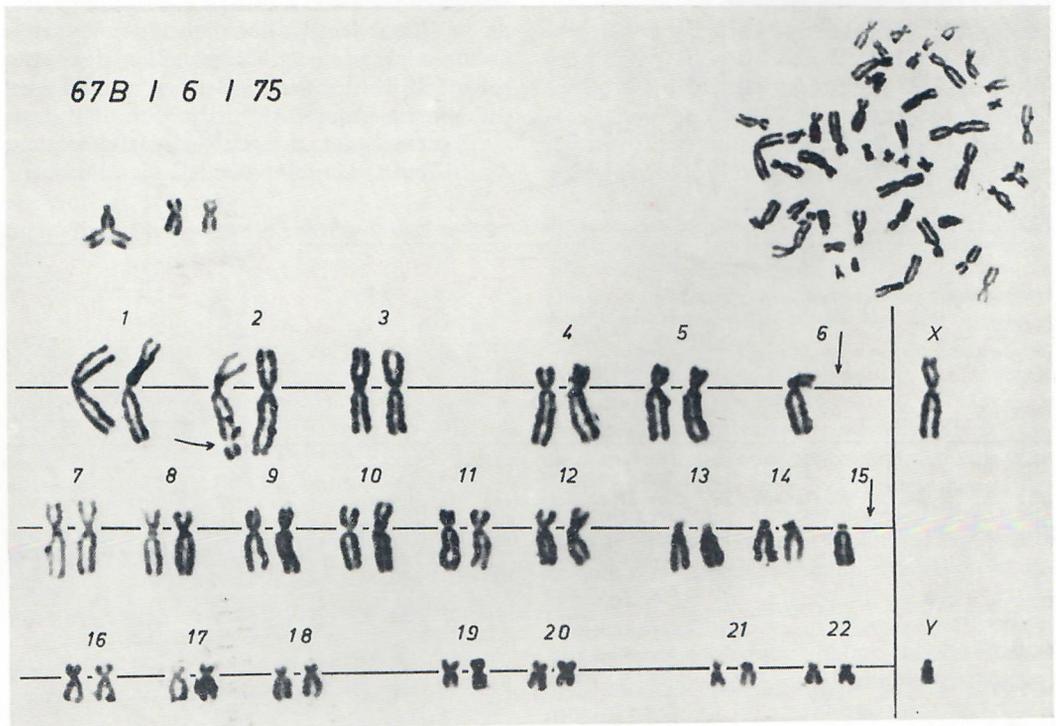
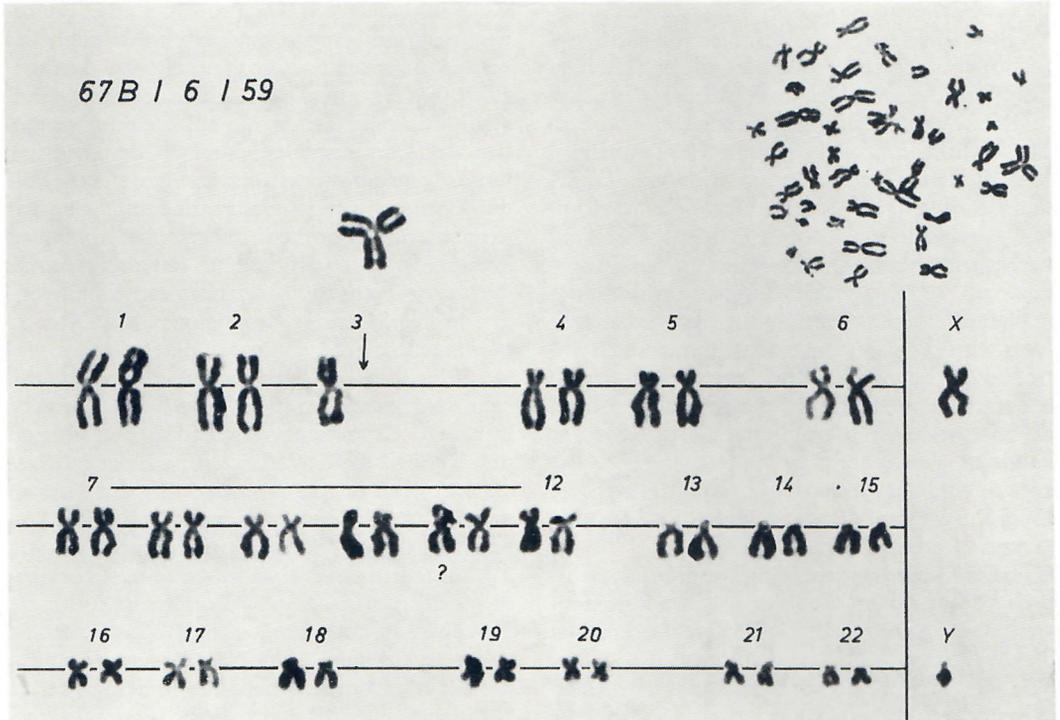


Abb. 20 und 21. Komplexe Chromosomenaberrationen bei behandelter chronischer Myelose; Karyotypanalyse. (Aus HAMPEL u. PALME [104].)

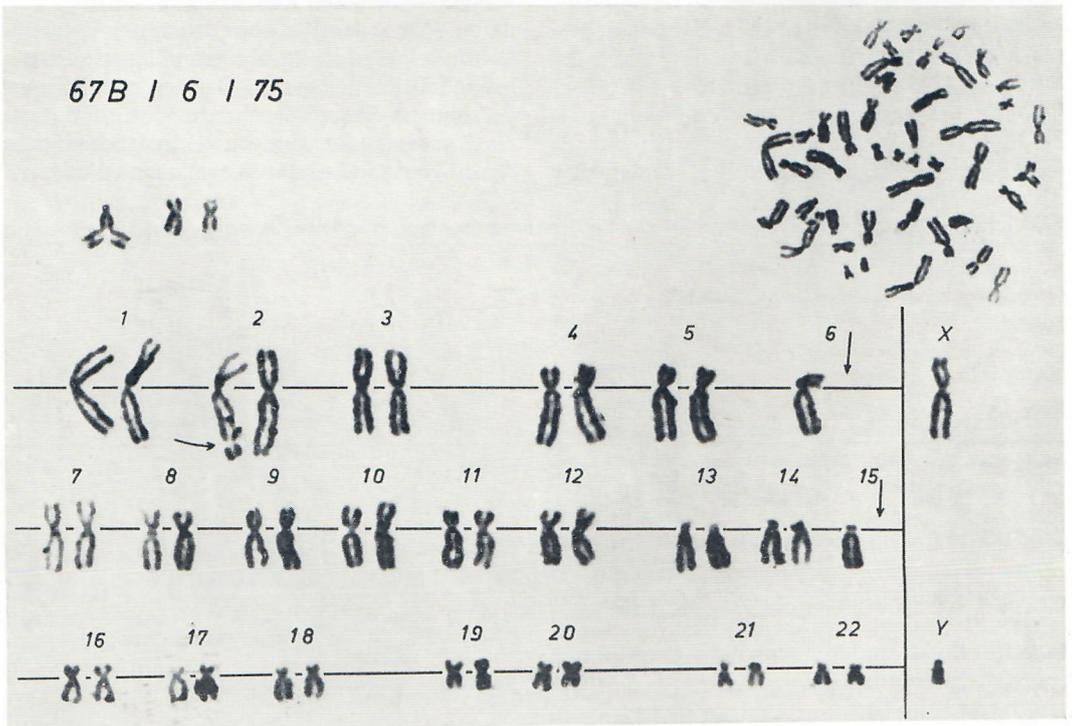
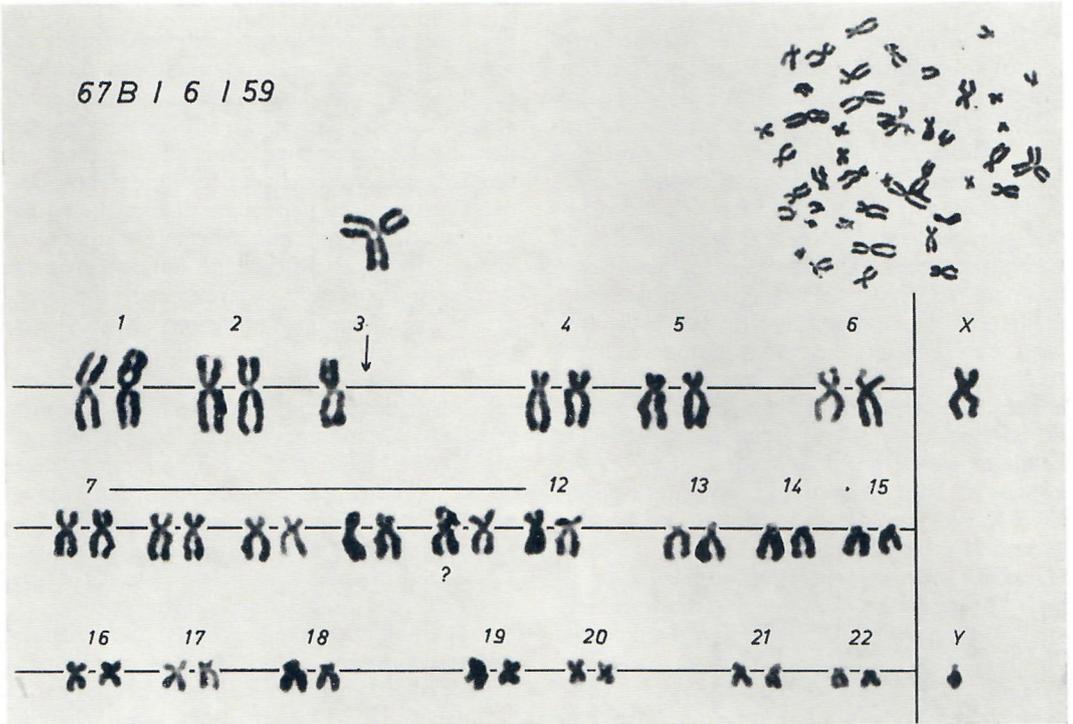


Abb. 20 und 21. Komplexe Chromosomenaberrationen bei behandelter chronischer Myelose; Karyotypanalyse. (Aus HAMPEL u. PALME [104].)

Befunde, wie sie bereits bei der anderen Patientin beobachtet wurden. Auch hier war die Endoreduplikation mit 8 % der Metaphasen ein häufiges Vorkommnis. Distale Abschnitte der Chromatide waren auch hier am häufigsten von Brüchen betroffen. Von insgesamt 102 bewerteten Metaphasen waren 45 % von Strukturanomalien befallen (s. Tab. 21). Unter Berücksichtigung der darin enthaltenen 17 Metaphasen mit nachgewiesenem Ph¹-Chromosom enthielten demnach 28 % der Metaphasen Strukturanomalien, die wahrscheinlich auf die Vorbehandlung zurückgeführt werden können. Dizen-trische Chromosomen und Interchanges traten ebenfalls auf. Letztere wurden in der Veröffentlichung noch als Sternfiguren beschrieben, es handelte sich jedoch um Interchanges. Auch konnte ein Ringchromosom beobachtet werden. Zwei Karyotypen dieses Patienten sind in Abb. 20 und 21 erkennbar.

Daraufhin wurden neuerdings auch bei zytostatisch behandelten Patienten Chromosomenanalysen an nicht leukämischen Leukozyten durchgeführt.

Wie aus Tab. 22 hervorgeht, konnte bei allen behandelten Patienten bis auf eine Ausnahme (W. K.), bei dem dies nicht so deutlich wurde, eine Erhöhung des Prozentsatzes der von Strukturanomalien betroffenen Metaphasen und der mittleren Zahl der Strukturanomalien pro Metaphase gesehen werden. Die Werte lagen deutlich über denen der Kontrollkulturen. Es wurden nur Patienten berücksichtigt, bei denen eine

Chemotherapie als Dauerbehandlung zumindest mehrere Monate hindurch konsequent vor dem Ansatz der Leukozytenkulturen durchgeführt worden war. Da es sich bei den Metaphasen kultivierter Zellen, die auf Strukturanomalien der Chromosomen durchgesehen wurden, um Folgegenerationen der in vivo zirkulierenden Lymphozyten handelte, erlauben die vorliegenden quantitativen Chromosomenstudien keineswegs einen Rückschluß auf das Ausmaß der durch Zytostatika verursachten Schädigungen in vivo. Geringe Restmengen von Zytostatika im Plasma der Patienten dürften keine wesentliche Rolle spielen, da diese die Blutbahn sehr rasch verlassen. So wurde durch Versuche mit TEM-C¹⁴ nachgewiesen, daß bei Mäusen und Ratten bereits 4 Minuten nach der intravenösen Injektion nur noch 5–10 % der gegebenen Aktivität im Blut zu finden waren, beim Menschen waren es 7,8–7,9 % nach einer Zeit von 3 Minuten (SMITH, NADKARNI, TRAMS u. DAVISON [230]). Bei oraler Applikation ist zwar die Verzögerung durch die Resorption der Substanz zu berücksichtigen, jedoch lag die letzte Einnahme des Medikaments bei allen Patienten ca. 24 Stunden vor der Blutentnahme. Minimale Verunreinigungen der Kulturgefäße schieden aus, da die Werte deutlich über denen der Kontrollkulturen lagen, die im übrigen völlig gleichartig behandelt worden waren. Bei den beobachteten Brüchen ist es somit wahrscheinlich, daß diese als Ausdruck der zytogenetischen Schädigung durch Zytostatika in vivo entstanden sind bzw.

Tabelle 22. Die Wirkung von Zytostatika auf die Leukozytendchromosomen von behandelten Patienten.

| Patienten | Diagnose | Zytostatika: Gesamtdosis bis zum Beginn der Kultur | Zytostatika: Tagesdosis in den letzten 3 Monaten (oral) mg/die | Strukturanomalien in der Chromosomen % der Metaphasen | mittlere Zahl der Strukturanomalien pro Metaphase | insgesamt bewertete Metaphasen |
|-----------------|-------------------------|--|---|--|---|-----------------------------------|
| 1. W. S., 67 J. | γ -1-Plasmozytom | Februar 1964 – 6. 10. 1964 33,5 g Endoxan | 100–200 | 23 | 0,34 | 100 |
| 2. M. S., 59 J. | γ -2-Plasmozytom | Juni 1962 – 6. 10. 1964 101,3 g Endoxan | 150–200 | 20 | 0,40 | 100 |
| 3. K. H., 72 J. | Retothelsarkom | Mai 1961 – 17. 10. 1961 18,85 g Endoxan 18. 10. 1961 – 23. 9. 1964 321,5 g Mitarsen | 400 | 22 | 0,41 | 72 |
| 4. A. D., 70 J. | β -2A-Plasmozytom | August 1960 – 23. 9. 1964 120,15 g Endoxan | 150 | 29 | 0,78 | 89 |
| 5. H. H., 61 J. | β -2A-Plasmozytom | November 1962 – 8. 12. 1964 56,35 g Endoxan | 50–100 | 26 | 0,51 | 85 |
| 6. J. W., 60 J. | Prostatakarzinom | August – 8. 12. 1964 10,8 g Endoxan | 150–200 | 20 | 0,32 | 200 |
| 7. W. K., 56 J. | Retothelsarkom | Oktober 1963 – 6. 1. 1965 64,9 g Endoxan | 100 | 15 | 0,21 | 100 |

in vitro manifest wurden. Dafür sprach auch, daß vereinzelte Metaphasen jener Patienten schwerere Strukturveränderungen der Chromosomen aufwiesen. So zeigt z. B. Abb. 22 eine Metaphase mit drei Interchanges. Abb. 23 läßt eine Metaphase mit 3 azentrischen Fragmenten erkennen, wobei zumindest das größte ein Fusionsprodukt darstellen dürfte. Derartige größere Fragmente wurden bei In-vitro-Versuchen nie beobachtet. Abb. 24 zeigt eine Metaphase mit multiplen Fragmentationen der Chromosomen; derartige Veränderungen wurden ebenfalls bei Kontrollkulturen nie beobachtet. Da häufig kleine und sehr kleine azentrische Fragmente beobachtet wurden, war einmal die Möglichkeit gegeben, daß diese teilweise übersehen wurden, und zum anderen, daß in einzelnen Fällen Artefakte irrtümlich für Fragmente angesehen wurden. Obwohl die quantitative Auswertung dieser Kulturen dadurch an Wert einbüßt, bleibt es doch sehr wahrscheinlich, daß Zytostatika auch in vivo die Bruchfrequenz zu steigern vermögen.

Diskussion

Auf Grund der zahlreichen Ergebnisse, die mit zytologischen und genetischen Methoden an pflanzlichen, tierischen und auch an menschlichen Chromosomen unter der Einwirkung zytostatischer Substanzen erzielt worden sind, war es zu erwarten, daß auch die hier untersuchten Zytostatika zu Chromosomenmutationen führen würden. Ausnahmen bildeten lediglich Natulan und Methotrexat; während sich 1-Me-

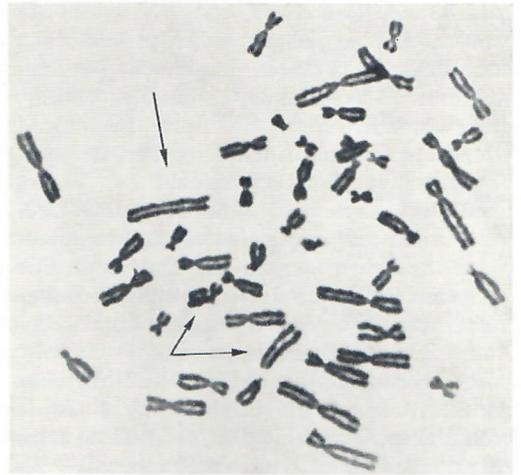


Abb. 23. Derselbe Patient wie bei Abb. 22. 3 azentrische Fragmente, z. T. Fusionsprodukt.

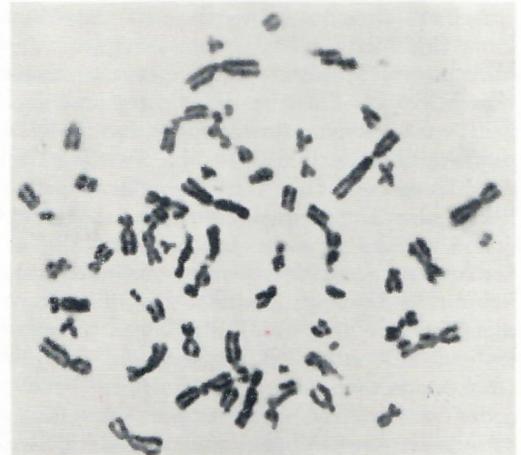


Abb. 24. Patient A. D., β -2A-Plasmozytom, Tagesdosis 150 mg, Gesamtdosis 120, 15 g Endoxan. Multiple Fragmentationen der Chromosomen.



Abb. 22. Patient M. S., γ -2-Plasmozytom, Tagesdosis 150 bis 200 mg, Gesamtdosis 101, 3 g Endoxan, 3 Interchanges (Pfeile).

thyl-2-benzyl-hydrazinphosphat (MBH) am Ehrlich-Aszites-Tumor als mutagen erwies (RUTISHAUSER u. BOLLAG [222]), konnte diese Wirkung für Natulan an menschlichen Leukozyten nicht beobachtet werden. Während Aminopterin bei *Vicia faba* zu zahlreichen Strukturveränderungen der Chromosomen führte (TAYLOR [242]) und während es sich demgegenüber bei *Drosophila* als nicht mutagen erwies (LÜERS [159]), konnte dies für Amethopterin (Methotrexat), welches sich strukturell nur geringfügig von Aminopterin unterscheidet, weder bei *Drosophila* (LÜERS u. RÖHRBORN [163]) noch beim

ELD-Aszites-Tumor (KATO [109]) noch bei menschlichen Leukozyten nachgewiesen werden. Beide Substanzen blockieren Fermente, welche zur Reduktion der Folsäure zu Tetrahydrofolsäure führen, so daß durch die fehlende Übertragung des Formylrestes der Übergang von Desoxyuridinmonophosphat zu Desoxythymidinmonophosphat und damit die DNS-Synthese unterbrochen werden. Es ist zunächst nicht einzusehen, warum sich die beiden Substanzen zytologisch unterschiedlich verhalten. Versuche mit beiden Substanzen am selben Ausgangsmaterial sind notwendig.

Während Bromdesoxyuridin in die DNS inkorporiert wird und die Strahlensensibilität der behandelten Zellen heraufsetzt (SOMERS u. HUMPHREY [232]; Chines. Hamster, KIHLMAN [130, 133]; *Vicia faba*), wird Fluordesoxyuridin in die DNS nicht, wohl aber nach partieller Umwandlung in Fluoruridylat *in vivo* teilweise in die RNS eingebaut (GORDON u. STAHELIN [96]). Die Wirkung des Thymidylatsynthetasehemmers, der über einen anderen Wirkungsmechanismus ebenfalls wie die Folsäureantagonisten den Übergang von Desoxyuridinmonophosphat zu Desoxythymidinmonophosphat blockiert, kann durch exogene Zufuhr von Thymidin aufgehoben werden. Entsprechende Versuche mit FUDR und Thymidin, wie sie oben an menschlichen Leukozyten geschildert wurden, befinden sich hiermit in Übereinstimmung. Da eine Interchangebildung nach FUDR nicht eintritt, veranlaßte dies TAYLOR [242] anzunehmen, daß die DNS-Synthese zur Verschmelzung von Bruchenden notwendig ist. Es war nun interessant, daß durch einen Überschuß von Uridin, der vermutlich *in vivo* die Umwandlung von Fluordesoxyuridin in Fluoruridylat herabsetzte, die Zahl der durch FUDR allein induzierten Strukturanomalien der Leukozytenchromosomen deutlich zurückging. Dieser Befund könnte dafür sprechen, daß zytologisch nachgewiesene Strukturanomalien der Chromosomen auch sekundär über eine Beeinträchtigung der RNS oder der Plasmaproteinsynthese entstehen können. Die Differenzierung der Zelle wird durch ihre morphologische Struktur und spezielle Stoffwechselleistung des Zytoplasmas bestimmt. Die klinisch bekannte Erscheinung einer Selektivität zytostatischer Effekte (GERHARTZ [89, 90]) könnte einmal durch eine Beeinträchtigung zytoplasmatischer Faktoren und auch durch eine unterschiedliche Strukturschädigung der Chromosomen (s. S. 348) bedingt sein.

MUELLER [179] führte Versuche an synchronisierter He-La-Zellen mit Amethopterin (DNS-Synthesehemmer), Aktinomycin D (RNS-Synthesehemmer) und Puromycin (Plasmaproteinsynthesehemmer) durch und konnte zeigen, daß nicht nur die DNS-Synthese, sondern auch die Synthese neuer RNS und Plasmaproteine notwendig ist, damit die Replikation spät markierender DNS-Abschnitte in den Chromosomen erfolgen kann.

ARRIGHI u. HSU [3] vermuteten: „Wenn eine bestimmte Messenger-RNS erforderlich ist, um Zellen in der G-2- (prämitotischen) Phase zur Mitose zu veranlassen, dann würde die Blockierung der RNS-Synthese durch Aktinomycin D erwartungsgemäß den Eintritt derartiger Zellen in die Mitose blockieren.“ Nun konnten die zitierten Autoren nachweisen, daß Aktinomycin D darüber hinaus auch zu morphologisch sichtbaren Chromosomenveränderungen („Dekondensation“ und fragliche Brüche) mit Ausnahme der spät markierenden X- und Y-Chromosomen beim Chinesischen Hamster führt. Deshalb dürfte die geäußerte Vermutung, wonach Brüche nicht nur durch primäre DNS-Veränderungen, sondern auch sekundär über Störungen der RNS- und Plasmaproteinsynthese entstehen können, möglicherweise nicht ganz unbegründet sein. Zusätzliche Experimente sind jedoch notwendig.

Komplizierter sind die Verhältnisse bei den unspezifisch wirkenden alkylierenden Substanzen. In Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration können verschiedene Gruppen (z. B. Karboxylgruppen, SH-Gruppen, alpha-Aminogruppen etc.) der Proteine sowie die Nukleinsäuren direkt mit den reaktiven Gruppen alkylierender Zytostatika (z. B. Karbenium-Ionen) reagieren. Es ergibt sich daraus eine Vielzahl von Möglichkeiten, nicht nur Zellproteine, sondern auch die eiweißhaltigen Fermente zu schädigen und damit zelluläre Stoffwechselforgänge zu beeinflussen.

Eine zytostatische Wirksamkeit von Zyklophosphamid (Endoxan) ließ sich *in vitro* nicht nachweisen (BROCK [36], BROCK u. HOHORST [38]). Dementsprechend konnten bei direktem Zusatz auch keine Strukturveränderungen bei menschlichen Chromosomen *in vitro* beobachtet werden. Es war jedoch bemerkenswert, daß nach Aktivierung der Substanz in der Ratte und anschließendem Zusatz zu den Kulturen die bei alkylierenden Substanzen üblichen Chromosomenaberrationen auftraten. Wenn dies auch

auf Grund der vorliegenden Beobachtungen an verschiedenen biologischen Materialien zu erwarten war, so stützt dieser Befund doch die geäußerte Vermutung, daß die zytostatische Aktivität von alkylierenden Substanzen dem Ausmaß der chromosomalen Veränderungen in etwa entspricht.

Auf die Problematik einer quantitativen Auswertung von chromosomalen Strukturveränderungen wurde bereits auf S. 332 eingegangen. Wenn auch die sichtbaren Chromosomenmutationen einen Anhaltspunkt für das Ausmaß der Schädigung des genetischen Materials bieten mögen, so ist jedoch stets zu bedenken, daß es sich hierbei um relativ grobe Schädigungen handelt. Bedenkt man ferner, daß beispielsweise beim X-Chromosom von *Drosophila* die sichtbaren Chromosomenmutationen zu den Letalmutationen nach Zytostatika sich wie 1 : 10 verhalten (FAHMY u. FAHMY [72]), so ist das tatsächliche Ausmaß der genetischen Schädigung beim Menschen um ein Vielfaches, vielleicht um Zehnerpotenzen, höher anzusetzen. In diesem Zusammenhang wird deutlich, daß genetische Methoden zur Erfassung von Mutationen nach zytostatischer Behandlung (z. B. MULLER-5-Test) eingehendere Analysen erlauben, wie sie beim Menschen nicht möglich sind.

Trotz dieser Einschränkungen geht aus den Versuchen hervor, daß bei alkylierenden Substanzen und FUDR gesetzmäßige Beziehungen zwischen der Konzentration *in vitro* und dem Ausmaß der Strukturanomalien der Chromosomen (s. Abb. 8 und 9) bestehen. BENDER u. GOOCH [22] konnten bei röntgenbestrahlten Kulturen menschlicher Leukozyten gleichfalls einen linearen Anstieg der Bruchfrequenz mit steigender Strahlendosis nachweisen. OSTERTAG u. KERSTEN [198] erhoben ähnliche Befunde nach Aktinomyzin D. An röntgenbestrahlten Chortphaga-Neuroblasten und an *Tradescantia microspores* wurde von LEA [146] die gleiche lineare Dosisabhängigkeit gefunden.

Lokalisationsuntersuchungen der Bruchverteilung bei Mutagenen sind vielfach veröffentlicht worden. So wurden bereits 1949 von LEVAN [147] „zonation effects“ der Bruchverteilung in den Chromosomen von *Allium cepa* nach Einwirkung verschiedener Chemikalien beschrieben. Durch weitere Versuche vorwiegend an *Vicia faba* konnte nachgewiesen werden, daß die durch Zytostatika induzierten Brüche sich nicht wie nach Röntgenbestrahlung gleichmäßig über die Chromosomen verteilen, sondern daß die

heterochromatinreichen Zonen besonders häufig von Brüchen betroffen werden, wie dies z. B. bei Stickstofflost (FORD [81], LOVELESS u. REVELL [155], REVELL [208]), bei Diepoxiden (REVELL [208]), bei Äthylmethansulfonat und Hydroxylamin (NATARAJAN [184]), bei Maleinsäurehydrazid (DARLINGTON u. McLEISH [55]) u. a. nachgewiesen wurde. Während z. B. bei *Vicia faba* unter der Voraussetzung einer gleichmäßigen Bruchverteilung über den Chromosomensatz das Verhalten der Brüche in den S : M-Chromosomen gleich 2,2 : 1 betragen müßte (REVELL [208]), wurden tatsächlich für einige chemische Mutagen die in Tab. 23 aufgeführten Werte gefunden.

Bei BUDR-Einwirkung auf Zellen des chinesischen Hamsters wurde am Chromosom Nr. 1 gefunden, daß Brüche vorwiegend in Adenin-Thymin und Guanin-Zytosin-reichen Zonen auftraten (HSU u. SOMERS [113]). Vorwiegend in der Zentromerregion konnten Brüche bei *Tradescantia bracteata* nach Lostbehandlung (DARLINGTON u. KOLLER [54]) und bei *Zebrina pendula*, *Rhoeo discolor* und *Allium cepa* nach BUDR (KOO [140, 141]) lokalisiert werden.

Unterschiedlich sind die Ergebnisse einer Lokalisation von durch Zytostatika induzierten Brüchen bei menschlichen Chromosomen. So fand COHEN [47] nach Streptonigrin die meisten Brüche in der Region der sekundären Konstriktionen der Chromosomen Nr. 1 und 2, während im Chromosom Nr. 3 anscheinend eine gleichmäßige Verteilung vorlag. KRONE, WOLF u. FOULADWAND [143] beobachteten nach Hydroxylamin besonders häufig Brüche in der sekundären Konstriktion des Chromosoms Nr. 1, in der der kurzen Arme der Chromosomen Nr. 4–5 fanden sich die meisten Brüche nach BUDR-Behandlung. Mitomycin C induzierte gehäuft Brüche in den sekundären Konstriktionen der Chromosomen 1, 9 und 16 (COHEN u. SHAW [48]). KIHLMAN, NICHOLS u. LEVAN [134] konnten bei Desoxyadenosin und Zytosinarabinsid zeigen, daß überwiegend die Chromosomen-

Tabelle 23.

| | S : M | Autoren |
|----------------------------------|----------|-----------------------|
| 2,2 Dichlor-N-methyl-diäthylamin | 24,8 : 1 | FORD [81] |
| 2,3,2',3'-Diepoxipropyläther | 18,5 : 1 | REVELL [208] |
| β -Propiolakton | 6,0 : 1 | SWANSON u. MERZ [239] |
| Äthylurethan | 2,37 : 1 | DEUFEL [58] |
| N-Nitroso-N-methylurethan | 2,2 : 1 | KIHLMAN [127] |

enden von Brüchen betroffen wurden, ebenso wie dies NICHOLS, LEVAN u. KIHLMAN [193] in einer weiteren Arbeit quantitativ für die Chromosomen Nr. 1, 2, 4-5, 6-12, X und 16 bei denselben Substanzen zeigen konnten. Auch bei TEM-Einwirkung wurden die meisten Brüche in den distalen Segmenten der Chromosomen beobachtet (HAMPPEL u. GERHARTZ [101]). Wenn es sich bei den von SAKSELA u. MOORHEAD [223] und SASAKI u. MAKINO [225] mit verschiedenen Methoden dargestellten sekundären Konstriktionen menschlicher Chromosomen tatsächlich um heterochromatinreiche Bezirke handeln sollte, wären nach den zahlreichen Ergebnissen, z. B. bei Pflanzen mit bekannter Heterochromatinlokalisation, in diesen Abschnitten die meisten Brüche, z. B. nach alkylierenden Substanzen, auch beim Menschen zu erwarten. SCHMID [226] konnte darüber hinaus nachweisen, daß die sekundären Konstriktionen menschlicher Chromosomen ebenso wie das spät markierende X-Chromosom ³H-Thymidin erst am Ende der DNS-Synthese einbauen. Warum nun bei den hier untersuchten Zytostatika und nach Desoxyadenosin und Zytosinarabinosid (NICHOLS, LEVAN u. KIHLMAN [193]) die Brüche die distalen Segmente bevorzugten und auch im allgemeinen an Häufigkeit nach proximal abnahmen, ist nicht bekannt. Zu diskutieren wären methodisch bedingte Artefakte, z. B. bei der von NICHOLS, LEVAN u. KIHLMAN [193] benutzten Quetschtechnik. Die bei den vorliegenden Untersuchungen verwandte Lufttrockentechnik ergab jedoch ganz ähnliche Resultate, so daß diese Annahme nicht sehr wahrscheinlich ist. Die rein hypothetische Annahme einer vielleicht unter Kolchizin mitverursachten, von proximal nach distal zunehmenden, intensiveren Spiralisierung ist ebenfalls zu diskutieren. Dies könnte dazu führen, daß Brüche eher im distalen als im proximalen Segment erkennbar wären. Außerdem wäre denkbar, daß aus unbekanntem Gründen ein Konzentrationsgefälle innerhalb der Chromatide entstände. Diese drei Überlegungen sind jedoch unbefriedigend. Es ist nämlich nicht einzusehen, warum dann beispielsweise gewisse oben erwähnte Zytostatika gehäuft Brüche in den sekundären Konstriktionen induzierten. Streptonigrin und Mitomycin C hemmen die DNS-Synthese. Während der Wirkungsmechanismus der ersteren Substanz noch nicht gesichert ist, bewirkt Mitomycin

C eine Depolarisierung der DNS durch Aktivierung der DNase. Diese Substanzen induzierten Brüche gehäuft in den sekundären Konstriktionen. Nucleoside, wie FUDR, Desoxyadenosin und Zytosinarabinosid, betrafen vorwiegend die distalen Segmente. Wenn nun auf Grund der unterschiedlichen Struktur und Wirkungsweise dieser beiden Gruppen eine unterschiedliche Bruchverteilung noch akzeptabel wäre, so ist wiederum nicht einzusehen, warum die alkylierenden Substanzen ebenfalls die distalen Segmente bevorzugt betreffen. Auch die Überlegung, ob nicht vielleicht der Heterochromatingehalt bzw. die Konzentration der nukleophilen Gruppen menschlicher Chromosomen generell von proximal nach distal zunimmt, ist wenig überzeugend.

In diesem Zusammenhang könnten Versuche¹ mit ³H-Thymidin unter Verwendung der gleichen Methodik interessieren, die in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. G. PALME, Nuklearmedizinische Abteilung der I. Medizinischen Klinik der Freien Universität, durchgeführt wurden. Es kann sich nur um eine vorläufige Mitteilung handeln, da die bisherigen Ergebnisse lediglich von einem Leukozytenspender stammen. Aus technischen Gründen wurden bei der quantita-

Tabelle 24. ³H-Thymidin-Einbau in die einzelnen Chromosomensegmente menschlicher Leukozyten.

| Chromosomen-Nr. | | relative Länge (%) | 4 Std. (Ag-Zahl in %) | 18 Std. (Ag-Zahl in %) |
|-----------------|-----|--------------------|-----------------------|------------------------|
| 1 | l d | 2,3 | 2,3 | 3,0 |
| | p | 2,3 | 1,8 | 2,6 |
| | k d | 2,1 | 1,2 | 2,0 |
| 2 | p | 2,1 | 1,1 | 1,9 |
| | l d | 2,5 | 3,2 | 2,8 |
| | p | 2,5 | 3,0 | 2,1 |
| 3 | k d | 1,6 | 1,1 | 2,4 |
| | p | 1,6 | 1,4 | 1,1 |
| | ± d | 3,5 | 4,5 | 3,4 |
| 4-5 | p | 3,5 | 3,9 | 3,3 |
| | l d | 4,5 | 5,1 | 4,0 |
| 6-12, X | p | 4,5 | 4,5 | 3,9 |
| | k | 3,4 | 4,5 | 2,7 |
| 13-15 | l d | 12,1 | 13,5 | 14,1 |
| | p | 12,1 | 14,0 | 12,3 |
| | k | 12,1 | 12,6 | 12,5 |
| 16 | l d | 4,4 | 4,9 | 5,1 |
| | p | 4,4 | 4,6 | 4,3 |
| | k | 1,3 | 0,9 | 1,4 |
| 17-18 | l | 1,9 | 1,8 | 2,5 |
| | k | 1,2 | 0,9 | 1,6 |
| 19-20 | l | 4,2 | 3,9 | 3,3 |
| | k | 1,5 | 0,8 | 1,1 |
| 21-22 | l | 2,6 | 1,5 | 2,7 |
| | k | 2,0 | 2,0 | 1,2 |
| Y | l | 2,5 | 0,6 | 1,7 |
| | k | 0,8 | 0,6 | 0,9 |
| Y | l | 0,8 | 1,0 | 1,2 |
| | k | 0,1 | 0,2 | 0,4 |

l = langer Arm k = kurzer Arm
d = distales Chromosomensegment
p = proximales Chromosomensegment

¹ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

tiven Auswertung der relativen Silberkornzahl über den Chromosomen nur 2 gleich große Segmente, ein distales und ein proximales, unterschieden. Tab. 24 zeigt neben der berechneten relativen Länge der Chromatidsegmente die gefundene Silberkornzahl ausgedrückt in Prozent der Gesamtsilberkornzahl nach einer 10-minütigen Kurzzeitmarkierung 4 und 18 Stunden vor Abbruch der Kulturen. Es ergab sich, daß der ^3H -Thymidin-Einbau der distalen Segmente meistens höher war als der der proximalen. Zu diskutieren wäre, unter der Voraussetzung, daß diese Ergebnisse zu reproduzieren sind, ob der ^3H -Thymidineinbau in den distalen Segmenten höher ist, ob lediglich eine stärkere Spiralisierung vorliegt, oder ob es sich um einen sonstigen Artefakt handeln kann. Weitere Versuche sind daher notwendig.

Die Ergebnisse der zitierten Autoren sowie die vorliegenden Ergebnisse über die Wirkung von Zytostatika auf menschliche Chromosomen *in vitro* und *in vivo* führen auch zu Schlußfolgerungen, die bei der praktischen Anwendung dieser Substanzen am Patienten von Bedeutung sein können. Bereits 1955 ist von LÜERS [160] betont worden, daß die Nachkommenschaft zytostatisch behandelter Patienten noch mindestens bis zu einem Monat nach Absetzen des Präparates gefährdet ist. Derselbe Autor sieht jedoch heute, nach 12 Jahren zusätzlicher Erfahrung mit zytostatischen Substanzen, diese Gefahr noch erneuert, wobei zusätzlich die unterschiedliche Keimzellenreifung bei der Frau und

beim Manne berücksichtigt werden müßten. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, wie lange nach Absetzen derartiger Medikamente mit Strukturveränderungen der Chromosomen zu rechnen ist. Wegen der notwendigen Dauertherapie von Tumorkranken war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, diese Frage zu klären. Bei strahlenbedingten Chromosomenanomalien ist es jedenfalls gesichert, daß diese noch lange Zeit, sogar über Jahre, bestehen können (BENDER u. GOOCH [21]: $3^{1/2}$ Jahre nach Strahlenunfall). Ferner sollten Schwangere möglichst nicht mit zytostatischen Substanzen behandelt werden, da die Absterberate und die Wahrscheinlichkeit von Mißbildungen erhöht sein dürften. Außerdem besteht in späteren Entwicklungsstadien die Gefahr einer Zerstörung der fötalen Gonaden (BOLLAG [32]).

Punktmutationen sind in noch größerem Ausmaß als die hier beschriebenen Chromosomenmutationen zu erwarten. Auch sind rezessive Mutationen zu bedenken, die erst nach Generationen bei Zusammentreffen zweier Partner mit der gleichen erblichen Belastung manifest werden können (LÜERS [159]).

Obwohl sich unter längerer zytostatischer Therapie in ausreichender Dosis, wie sie bei malignen Erkrankungen als Dauertherapie gefordert wird (GERHARTZ [88]), nach einiger Zeit Amenorrhöe bzw. Azoospermie einzustellen pflegen, sind Patienten in fortpflanzungsfähigem Alter dennoch stets auf die Gefahren einer Schädigung ihrer Erbsubstanz hinzuweisen.

Literatur

- [1] AMAROSE, A. P.: Chromosomal patterns in cancer patients during treatment. *N.Y. State J. Med.* 64 (1964), 2407.
- [2] ARNOLD, H., u. F. BOURSEAUX: Synthese des N,N-Bis-(2-chloräthyl)-0-(3-amino-propyl) - phosphorsäureamido-ester. *Arzneimittelforsch.* 13 (1963), 927.
- [3] ARRIGHI, F. E., and T. C. HSU: Experimental alteration of metaphase chromosome morphology. Effect of actinomycin D. *Exp. Cell Res.* 39 (1965), 305.
- [4] ARRIGHI, F. E., T. C. HSU and D. E. BERGSAGEL: Chromosome damage in murine and human cells following cytoxan therapy. *Texas Rep. Biol. Med.* 20 (1962), 545.
- [5] AUERBACH, C.: *D. melanogaster*: New mutants. Chemically induced mutations and rearrangements. *Dros. Inform. Serv.* 17 (1943), 48.
- [6] AUERBACH, C.: The induction by mustard gas of chromosomal instabilities in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Roy. Soc. (Edinb.)* 67 (1947), 307.
- [7] AUERBACH, C.: Mutagenic effects of alkylating agents. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 68 (1958), 731.
- [8] AUERBACH, C., and D. S. FALCONER: A new mutant in the progeny of mice treated with nitrogen mustard. *Nature* 63 (1949), 678.
- [9] AUERBACH, C., and H. MOSER: The effect of oxygen concentration on the mutagenic action of mustard gas. *Experientia* 7 (1951), 341.
- [10] AUERBACH, C., and H. MOSER: Production of mutations by monochloro-“mustards”. *Nature* 166 (1950), 1019.
- [11] AUERBACH, C., and J. M. ROBSON: Chemical production of mutations. *Nature* 157 (1946), 302.
- [12] AULA, P.: Chromosome breaks in leukocytes of chickenpox patients. Preliminary communication. *Hereditas* 49 (1963), 451.
- [13] BATEMAN, A. J.: The induction of dominant lethals in rats and mice by triethylenemelamine. *Genet. Res.* 1 (1960), 381.
- [14] BAUTZ, E., and E. FREESE: On the mutagenic effect of alkylating agents. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 46 (1960), 1585.
- [15] BELITZ, H. J.: Chromosomenfragmente, Minutes und sichtbare Mutationen bei *Drosophila* nach Behandlung mit Chinon I. *Z. Vererbungsl.* 90 (1959), 223.
- [16] BELL, A. G., and D. G. BAKER: Irradiation-induced chromosome aberrations in normal human leukocytes in culture. *Canad. J. Genet. Cytol.* 4 (1962), 340.

- [17] BELL, S., and S. WOLFF: Studies on the mechanism of the effect of fluorodeoxyuridine on chromosomes. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 51 (1964), 195.
- [18] BENDER, M. A.: X-ray-induced chromosome aberrations in normal diploid human tissue cultures. *Science* 126 (1957), 974.
- [19] BENDER, M. A., and P. C. GOOCH: Types and rates of X-ray-induced chromosome aberrations in human blood irradiated in vitro. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 48 (1962), 522.
- [20] BENDER, M. A., and P. C. GOOCH: Persistent chromosome aberrations in irradiated human subjects. *Radiation Res.* 16 (1962), 44.
- [21] BENDER, M. A., and P. C. GOOCH: Persistent chromosome aberrations in irradiated human subjects. II. Three and one-half year investigation. *Radiation Res.* 18 (1963), 389.
- [22] BENDER, M. A., and P. C. GOOCH: Chromatid-type aberrations induced by X-rays in human leukocyte cultures. *Cytogenetics* 2 (1963), 107.
- [23] BENDER, M. A., P. C. GOOCH and D. M. PRESCOTT: Aberrations induced in human leukocyte chromosomes by ³H-labeled nucleosides. *Cytogenetics* 1 (1962), 65.
- [24] BENZER, S., and E. FREESE: Induction of specific mutations with 5-bromouracil. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 44 (1958), 112.
- [25] BERGER, H.: Genetic analysis of T 4 D phage heterozygotes produced in the presence of 5-fluorodeoxyuridine. *Genetics* 52 (1965), 729.
- [26] BERTRAM, C., u. G. HÖHNE: Über die radiomimetische Wirkung einiger Zytostatika im Mutationsversuch an *Drosophila*. *Strahlentherapie* 43 (1959), 388.
- [27] BERTRAM, C., G. HÖHNE u. G. SCHUBERT: Der Einfluß von Röntgenstrahlen u. Zytostatika auf die Mutationsrate von *Drosophila*. *Strahlentherapie* 112 (1960), 70.
- [28] BIESELE, J. J., F. S. PHILIPS, J. B. THIERSCH, J. H. BURCHENAL, S. M. BUCKLEY and C. C. STOCK: Chromosome alteration and tumour inhibition by nitrogen mustards: the hypothesis of cross-linking alkylation. *Nature* 166 (1950), 1112.
- [29] BIRD, J.: The production of mutations in *Drosophila* using two classes of compounds, the "aromatic nitrogen mustards" and the epoxides. *Heredity* 4 (1950), 273.
- [30] BIRD, M. J., and O. G. FAHMY: Cytogenetic analysis of the action of carcinogenes and tumour inhibitors in *Drosophila melanogaster*. I. 1:2, 3:4-Diepoxybutane. *Proc. Roy. Soc. (Edinb.)* 140 (1953), 556.
- [31] BLOOM, A. D., and J. H. TIJO: In vivo effects of diagnostic X-irradiation on human chromosomes. *New Engl. J. Med.* 270 (1964), 1341.
- [32] BOLLAG, W.: Cytostatika in der Schwangerschaft. *Schweiz. med. Wschr.* 84 (1954), 393.
- [33] BÖÖK, J. A., M. FRACCARO, K. FREDGA and J. LINDSTEN: Radiation induced chromosome aberrations in human foetal cells grown in vitro. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 9 (1962), 356.
- [34] BOTTEGA, C., and I. FERRARI: Endoreduplication in acute leukemia. *Blood* 21 (1963), 207.
- [35] BOYD, E., W. W. BUCHANAN and B. LENNOX: Damage to chromosomes by therapeutic doses of radioiodine. *Lancet* I (1961), 977.
- [36] BROCK, N.: Zur pharmakologischen Charakterisierung zyklischer N-Lost-Phosphamidester als Krebs-Chemotherapeutika. *Arzneimittelforsch.* 8 (1958), 1.
- [37] BROCK, N.: Persönliche Mitteilung.
- [38] BROCK, N., u. H. J. HOHORST: Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vivo und in vitro. *Arzneimittelforsch.* 13 (1963), 1021.
- [39] BRODIE, S. S., B. ENG, H. WALLERSTEIN and J. B. SCHORR: The distribution of methotrexate in mice bearing L 1210 ascites lymphoma. X. *Kongr. Intern. Ges. Hämatol. Stockholm* 1964 (Abstr.).
- [40] BUCKTON, E. K., P. A. JACOBS, W. M. COURT BROWN and R. DOLL: A study of the chromosome damage persisting after X-ray therapy for ankylosing spondylitis. *Lancet* II (1962), 676.
- [41] BUIATTI, M., and V. N. RONCHI: Chromosome breakage by triethylenemelamine (TEM) in *Vicia faba* in relation to the mitotic cycle. *Caryologia* 16 (1963), 397.
- [42] CATTANACH, B. M.: Induction of translocations in mice by triethylenemelamine. *Nature* 180 (1957), 1364.
- [43] CATTANACH, B. M.: The sensitivity of the mouse testis to the mutagenic action of triethylenemelamine. *Z. Vererbungslehre.* 90 (1959), 1.
- [44] CATTANACH, B. M., and R. G. EDWARDS: The effects of triethylenemelamine on the fertility of male mice. *Proc. Roy. Soc. (Edinb.)* 67 (1958), 54.
- [45] CHU, E. H. Y.: Dose relations in the induction of human chromosomal aberrations. In: WOLFF, S.: *Radiation-induced chromosome aberrations*. New York and London 1963.
- [46] CHU, E. H. Y., N. H. GILES and K. PASSANO: Types and frequencies of human chromosome aberrations induced by X-rays. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 47 (1961), 830.
- [47] COHEN, M. M.: The specific effects of streptonigrin activity on human chromosomes in culture. *Cytogenetics* 2 (1963), 271.
- [48] COHEN, M. M., and M. W. SHAW: Effects of mitomycin C on human chromosomes. *J. Cell Biol.* 23 (1964), 386.
- [49] COHEN, M. M., M. W. SHAW and A. P. CRAIG: The effects of streptonigrin on cultured human leukocytes. *Proc. nat. Acad. Sci.* 50 (1963), 16.
- [50] COHEN, S. S., J. G. FLAKS, H. D. BARNER, M. R. LOEB and J. LICHTENSTEIN: The mode of action of 5-fluorouracil and its derivatives. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 44 (1958), 1004.
- [51] CONEN, P. E.: Chromosome damage in an infant after diagnostic X-irradiation. *Lancet* II (1961), 47.
- [52] CONEN, P. E., and G. S. LANSKY: Chromosome damage during nitrogen mustard therapy. *Brit. med. J.* 2 (1961), 1055.
- [53] COURT BROWN, W. M., P. A. JACOBS, I. M. TOUGH and A. G. BAIKIE: Manifest chromosome abnormalities in leukaemia. *Lancet* I (1962), 1242.
- [54] DARLINGTON, C. D., and P. C. KOLLER: The chemical breakage of chromosomes. *Heredity* 1 (1947), 187.
- [55] DARLINGTON, C. D., and J. MCLEISH: Action of maleic hydrazide on the cell. *Nature* 167 (1951), 407.
- [56] *Denver study group*: A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes. *J. Amer. med. Ass.* 174 (1960), 159.
- [57] DE GROUCHY, J., G. VALLÉE et M. LAMY: Analyse chromosomique de cellules humaines sanguines et médullaires après irradiation in vitro. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 257 (1963), 278.
- [58] DEUFEL, J.: Auslösung von Chromosomenmutationen durch Äthylurethan in Abhängigkeit von der Konzentration. *Chromosoma* 4 (1952), 611.
- [59] *Deutsche Hoffmann-La Roche, Grenzacht*: Persönliche Mitteilung.
- [60] DEYSSON, G., et R. TRUHAUT: Etude sur la cellule végétale des caractéristiques de l'activité antimitotique de divers éthyléiminoquinones. *Ann. Pharm. Franc.* 20 (1962), 670.
- [61] DRUCKREY, H.: Chemotherapie des Krebses. *Med. Klin.* 56 (1961), 1421.
- [62] ELMORE, D. T., J. M. GULLAND, D. O. JORDAN and H. F. W. TAYLOR: The reactions of nucleic acids with mustard gas. *Biochem. J.* 42 (1948), 308.
- [63] ELVES, M. W., A. S. BUTTOO, M. C. G. ISRAELS and J. F. WILKINSON: Chromosome changes caused by 6-azauridine during treatment of acute myeloblastic leukaemia. *Brit. med. J.* 1 (1963), 156.
- [64] ESPOSITO, R. E., and R. HOLLIDAY: The effect of 5-fluorodeoxyuridine on genetic replication and mitotic crossing over in synchronized cultures of *Ustilago maydis*. *Genetics* 50 (1964), 1009.
- [65] FAHMY, M. J., and O. G. FAHMY: Chemical mutagenesis in *Drosophila* and its cytogenetic analysis. *Brit. Emp. Cancer Campgn* (1952), 16.
- [66] FAHMY, O. G., and J. M. BIRD: Chromosome breaks among recessive lethals induced by chemical mutagens

- in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 6, Suppl. (1952), 149.
- [67] FAHMY, O. G., and M. J. FAHMY: Cytogenetic analysis of the action of carcinogens and tumour inhibitors in *Drosophila melanogaster*. II. The mechanism of induction of dominant lethals by 2:4:6-tri (ethyleneimino)-1:3:5-triazine. *J. Genet.* 52 (1954), 603.
- [68] FAHMY, O. G., and M. J. FAHMY: Cytogenetic analysis of the actions of carcinogens and tumour inhibitors in *Drosophila melanogaster*. III. Chromosome structural changes induced by 2:4:6-tri (ethyleneimino) 1:3:5-triazine. *J. Genet.* 53 (1955), 181.
- [69] FAHMY, O. G., and M. J. FAHMY: Cytogenetic analysis of the action of carcinogens and tumour inhibitors in *Drosophila melanogaster*. IV. The cell stage during spermatogenesis and the induction of intra- and intergenic mutations by 2:4:6-tri (ethyleneimino)-1:3:5-triazine. *J. Genet.* 53 (1955), 563.
- [70] FAHMY, O. G., and M. J. FAHMY: Cytogenetic analysis of the action of carcinogens and tumour inhibitors in *Drosophila melanogaster*. V. Differential genetic response to the alkylating mutagens and X-radiation. *J. Genet.* 54 (1956), 146.
- [71] FAHMY, O. G., and M. J. FAHMY: Mutagenic response to the alkyl methanesulphonates during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 180 (1957), 31.
- [72] FAHMY, O. G., and M. J. FAHMY: Mutagenic effects of alkylating agents. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 68 (1958), 736.
- [73] FAHMY, O. G., and M. J. FAHMY: Cytogenetic analysis of the action of carcinogens and tumour inhibitors in *Drosophila melanogaster*. VI. The mutagenic cell stage response of the male germ line to the "nitrogen mustard" derivatives of amino acids, carboxylic acids and amines. *Genet. Res.* 1 (1960), 173.
- [74] FAHMY, O. G., and M. J. FAHMY: Cytogenetic analysis of the action of carcinogens and tumour inhibitors in *Drosophila melanogaster*. VII. Differential induction of visible lethal mutations by related nitrogen mustards. *Genetics* 45 (1960), 419.
- [75] FAHMY, O. G., and M. J. FAHMY: Cytogenetic analysis of the action of carcinogens and tumour inhibitors in *Drosophila melanogaster*. VIII. Selective mutagenic activity of S-2-chloroethylcysteine on the spermatogonial stages. *Genetics* 45 (1960), 1191.
- [76] FAHMY, O. G., and M. J. FAHMY: Mutagenicity in the sperm of *Drosophila* and the structure of the "nitrogen mustard" molecule. *Heredity* 15 (1960), 115.
- [77] FAHMY, O. G., and M. J. FAHMY: Cytogenetic analysis of the action of carcinogens and tumour inhibitors in *Drosophila melanogaster*. IX. The cell-stage response of the male germ line to the mesyloxy esters. *Genetics* 46 (1961), 361.
- [78] FAHMY, O. G., and M. J. FAHMY: Cytogenetic analysis of the action of carcinogens and tumour inhibitors in *Drosophila melanogaster*. X. The nature of the mutations induced by the mesyloxy esters in relation to molecular crosslinkage. *Genetics* 46 (1961), 447.
- [79] FAHMY, O. G., and M. J. FAHMY: Cytogenetic analysis of the action of carcinogens and tumour inhibitors in *Drosophila melanogaster*. XI. Mutagenic efficiency of the mesyloxy esters on the sperm in relation to molecular structure. *Genetics* 46 (1961), 1111.
- [80] FEINE, U.: Radiomimetische Stoffe. In: SCHINZ: Ergebnisse der Strahlenbiologie (1952–58), 944.
- [81] FORD, C. E.: Chromosome breakage in nitrogen mustard treated *Vicia faba* root tip cells. *Proc. 8th Int. Congr. Genet.* 1948. *Hereditas*, Suppl. (1949), 570.
- [82] FRACCARO, M., and J. LINDSTEN: Endoreduplication of chromosomes. *Lancet* II (1964), 822.
- [83] FREESE, E.: Molecular mechanism of mutations: Molecular genetics, part I, p. 207. New York and London 1963.
- [84] FREESE, E., E. BAUTZ and E. B. FREESE: The chemical mutagenic specificity of hydroxylamine. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 47 (1962), 845.
- [85] FREESE, E. B., and E. FREESE: On the mutagenic effect of alkylating agents. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 46 (1961), 1584.
- [86] FRIEDMAN, B. I., E. L. SAENGER and M. S. KREINDLER: Endoreduplication in leukocyte chromosomes. Preliminary report of its relation to cancer and wholebody irradiation. *Lancet* II (1964), 494.
- [87] GERHARTZ, H.: Indikationen und Komplikationen einer Therapie der Leukosen mit TEM. *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.* 60 (1954), 919.
- [88] GERHARTZ, H.: Zytostatika und ihre Wirkung auf Haemopoese, Haemoblastosen und Geschwülste. *Habilitationsschrift* Berlin 1958.
- [89] GERHARTZ, H.: Richtlinien der Selektivität zytostatischer Effekte. *Krebsforsch. u. Krebsbekämpfung*, Bd. IV, S. 126. München-Berlin 1961.
- [90] GERHARTZ, H.: Vergleichende Untersuchungen zur Toxizität und Seitenwirkung moderner Zytostatika. *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.* 68 (1962), 251.
- [91] GERHARTZ, H.: Chemotherapie der Hämoblastosen und bösartigen Geschwülste. *Fortschr. Med.* 81 (1963), 607.
- [92] GERHARTZ, H., U. BIERBRAUER u. K.-U. BLUM: Experimentelle und klinische Ergebnisse mit dem Zytostatikum Tris-Aethyleniminobenzochinon. In: F. MAYTHALER: Chemotherapeutische Probleme maligner Tumoren. 2. Kolloquium über Zytostatika, Höchenschwand 1960, S. 177. Stuttgart 1960.
- [93] GERHARTZ, H., K.-U. BLUM u. H. COPER: Zur Chemotherapie mit dem Methylhydrazinderivat Ro-4-6467 bei Hämoblastosen und Carcinomen. *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.* 70 (1964), 244.
- [94] GERMAN, J.: Cytological evidence for crossing over in vitro in human lymphoid cells. *Science* 144 (1964), 298.
- [95] GLÄSS, E.: Nicht zufallsgemäße Verteilung röntgen-induzierter Brüche auf den Chromosomen von *Bellevalia romana*. *Port. Acta biol.* A 8 (1964), 153.
- [96] GORDON, M. P., and M. STAEHELIN: zitiert nach TAYLOR, HAUT u. TUNG 1962 [243].
- [97] GROPP, A., u. F. ODUNJO: Beobachtungen zur morphologischen Konkordanz homologer Chromosomen somatischer Zellen. *Exp. Cell Res.* 30 (1963), 577.
- [98] GUSTAFSSON, Å., and J. MACKEY: The genetical effects of mustard gas substances and neutrons. *Hereditas* 34 (1948), 371.
- [99] HAMPEL, K. E.: Endoreduplikation bei der chronischen myeloischen Leukämie. *Naturwiss.* 50 (1963), 619.
- [100] HAMPEL, K. E.: Diplo-Ph¹-Chromosom bei der myeloischen Leukämie. *Klin. Wschr.* 42 (1964), 522.
- [101] HAMPEL, K. E., u. H. GERHARTZ: Strukturanomalien der Chromosomen menschlicher Leukozyten in vitro durch Triäthylenmelamin. *Exp. Cell Res.* 37 (1965), 251.
- [102] HAMPEL, K. E., B. KOBER, D. RÖSCH, H. GERHARTZ and K. H. MEING: The action of cytostatic agents on the chromosomes of human leukocytes in vitro (preliminary communication). *Blood* (in Vorbereitung).
- [103] HAMPEL, K. E., and A. LEBAN: Breakage in human chromosomes induced by low temperature. *Hereditas* 51 (1964), 315.
- [104] HAMPEL, K. E., u. G. PALME: Chromosomenstudien bei akuter und chronischer myeloischer Leukämie. *Neoplasma* II (1964), 113.
- [105] HARTMANN, K.-U., and C. HEIDELBERGER: Studies on fluorinated pyrimidines. XIII. Inhibition of thymidylate synthetase. *J. biol. Chem.* 236 (1961), 3006.
- [106] HEIDELBERGER, C., N. K. CHAUDHURI, P. DANNEBERG, D. MOOREN, L. GRIESBACH, R. DUSCHINSKY, R. J. SCHNITZER, E. PLEVEN and J. SCHEINER: Fluorinated pyrimidines, a new class of tumor-inhibitory compounds. *Nature* 179 (1957), 663.
- [107] HEILMEYER, L.: Grundlagen und Praxis chemischer Tumorbehandlung. Heidelberg 1954.
- [108] HENKE, H., G. HÖHNE u. H. A. KÜNDEL: Untersuchungen über mutagene Wirkung einiger Zytostatika. *Z. Krebsforsch.* 62 (1958), 347.

- [109] HERSKOWITZ, J. H.: Tests for chemical mutagens in *Drosophila* using the larval feeding technique. *Genetics* 35 (1950), 113.
- [110] HOROWITZ, N. H., M. B. HOULAHAN, M. G. HUNGATE and B. WRIGHT: Mustard gas mutations in *neurospora*. *Science* 104 (1946), 233.
- [111] HOUSTON, E. W., W. C. LEVIN and S. E. RITZMANN: Endoreduplication in untreated early leukaemia. *Lancet* II (1964), 496.
- [112] HSU, T. C.: Longitudinal differentiation of chromosomes and the possibility of interstitial telomeres. *Exp. Cell Res.* 9 (1963), 73.
- [113] HSU, T. C., and C. E. SOMERS: Effect of 5-bromodeoxyuridine on mammalian chromosomes. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 47 (1961), 396.
- [114] IZAWA, M., J. G. ALLFREY and A. E. MIRSKY: The relationship between RNA synthesis and loop structure in lampbrush chromosomes. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 49 (1963), 544.
- [115] JACKSON, J. F.: Polyploidy and endoreduplication in human leukocyte cultures treated with β -mercaptoethanol. *Exp. Cell Res.* 31 (1963), 194.
- [116] JACKSON, J. F.: Chromosome aberrations in cultured human leukocytes treated with 8-ethoxycaffeine. *J. Cell Biol.* 22 (1964), 291.
- [117] JACKSON, J. F., and D. KILLANDER: DNA synthesis in phytohemagglutinin-stimulated human leukocyte cultures treated with β -mercaptoethanol. *Exp. Cell Res.* 33 (1964), 459.
- [118] JACKSON, J. F., and K. LINDAHL-KIESSLING: Polyploidy and endoreduplication in human leukocyte cultures treated with β -mercaptopyruvate. *Science* 141 (1963), 424.
- [119] JACKSON, J. F., and K. LINDAHL-KIESSLING: Action of sulfhydryl compounds on human leukocyte mitosis in vitro. *Exp. Cell Res.* 34 (1964), 515.
- [120] JENSEN, K. A., I. KIRK and M. WESTERGAARD: Mutagenic activity of some "mustard gas" compounds. *Nature* 166 (1950), 1020.
- [121] JURAND, A.: Action of triethanmelamine (TEM) on early and later stages of mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 7 (1959), 526.
- [122] KAPLAN, H. S., K. C. SMITH and P. TOMLIN: Effect of halogenated pyrimidines on radiosensitivity of *E. coli*. *Radiation Res.* 16 (1962), 98.
- [123] KARNOFSKY, D. A., and C. R. LACON: Survey of cancer chemotherapy service center compounds for teratogenic effect in the chick embryo. *Cancer Res.* 22, Suppl. (1962), 84.
- [124] KARNOFSKY, D. A., and E. B. SIMMEL: Effects of growth-inhibiting chemicals on the sand-dollar embryo, *Echinarchnius Parma*. *Progr. exp. Tumor Res.* 3 (1963), 254.
- [125] KATO, R.: Persönliche Mitteilung.
- [126] KIHLMAN, B. A.: Factors affecting the production of chromosome aberrations by chemicals. *J. biophys. biochem. Cytol.* 2 (1956), 543.
- [127] KIHLMAN, B. A.: The radiomimetic effect of N-nitroso-N-methylurethan in *Vicia faba*. *Exp. Cell Res.* 20 (1960), 657.
- [128] KIHLMAN, B. A.: Aberrations induced by radiomimetic compounds and their relations to radiation-induced aberration (1961). In: WOLF, S.: Radiation-induced chromosome aberrations. New York and London 1963.
- [129] KIHLMAN, B. A.: Biochemical aspects of chromosome breakage. *Adv. Genet.* 10 (1961), 1.
- [130] KIHLMAN, B. A.: Different effects of 5-fluorodeoxyuridine and 5-bromodeoxyuridine on the frequencies of chromatid aberrations obtained in *Vicia faba* after irradiation with X-rays. *Exp. Cell Res.* 27 (1962), 604.
- [131] KIHLMAN, B. A.: The production of chromatid aberrations by 5-fluorodeoxyuridine alone and in combination with X-rays and 8-ethoxycaffeine. *Caryologia* 15 (1962), 261.
- [132] KIHLMAN, B. A.: Deoxyadenosine as an inducer of chromosomal aberrations in *Vicia faba*. *J. cell. comp. Physiol.* 62 (1963), 267.
- [133] KIHLMAN, B. A.: The effect of 5-halogenated deoxyuridines on the frequency of X-ray-induced chromosomal aberrations in *Vicia faba*. *Hereditas* 49 (1963), 353.
- [134] KIHLMAN, B. A., W. NICHOLS and A. LEVAN: The effect of deoxyadenosine and cytosine arabinoside on the chromosomes of human leukocytes in vitro. *Hereditas* 50 (1963), 139.
- [135] KOLLER, P. C.: Dicentric chromosomes in a rat tumour induced by an aromatic nitrogen mustard. *Heredity* 6 (1953), 181.
- [136] KOLLER, P. C.: Chromosome breakage. *Progr. Biophys. Biophys. Chem.* 4 (1954), 195.
- [137] KOLLER, P. C.: Comparative effects of alkylating agents on cellular morphology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 68 (1958), 783.
- [138] KOLLER, P. C.: Comparative effects of alkylating agents on cellular morphology. *Ann. N.Y. Acad. Sci. (Wash.)* 68 (1958), 783.
- [139] KOLLER, P. C., and A. CASARINI: Comparison of cytological effects induced by X-rays and aromatic nitrogen mustards. *Brit. J. Cancer* 6 (1952), 173.
- [140] KOO, F.: Actions of 5-bromouracil deoxyriboside on plant chromosomes (abstract). XI. Congr. of Genet., Hague (1963).
- [141] KOO, F.: Synergistic effect of 5-bromodeoxyuridine and gamma rays on chromosome. *Science* 141 (1963), 361.
- [142] KOWALENKO, S. P.: Dokl. Akad. Nauk SSSR 158 (1964), 960.
- [143] KRONE, W., U. WOLF u. B. FOULADWAND: Einfluss mutagener Substanzen auf die Chromosomenmorphologie. 8. Tagg. dtsh. Ges. Anthropol. Köln 1963. *Homo, Suppl.* (1965), 46.
- [144] LANE, G. R.: Chromosome breakage by diepoxide and by X-rays. *Proc. Radiobiol. Symp. Liège, 1954*, p. 265. London 1955.
- [145] LAWLEY, P. D.: The action of alkylating agents on deoxyribonucleic acid. *J. Chim. Phys.* 58 (1961), 1011.
- [146] LEA, D. E.: Actions of radiations on living cells. Cambridge 1955.
- [147] LEVAN, A.: The influence on chromosomes and mitosis of chemicals, as studied by the Allium test. *Proc. int. Congr. Genet.* 8th Congr. Stockholm. *Hereditas, Suppl.* (1949), 325.
- [148] LEVAN, A.: Chemically induced chromosome reactions in *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol.* 16 (1951), 233.
- [149] LEVAN, A., and W. W. NICHOLS: Human chromosome lengths for use in distribution studies. *Hereditas* 51 (1964), 378.
- [150] LINDGREN, M., and C. NORRYD: Chromosome aberrations in one of a pair of identical twins after roentgen irradiation of the spine. *Hereditas* 48 (1962), 688.
- [151] LISS, E.: *Biochemische Grundlagen der Chemotherapie des Krebses*. Wissen u. Praxis, Heft 37. Berlin 1964.
- [152] LOVELESS, A.: Mutation of bacteria at high levels of survival by ethyl methane sulphonate. *Nature* 184 (1959), 1780.
- [153] LOVELESS, A.: The influence of radiomimetic substances on deoxyribonucleic acid synthesis and function studied in *Escherichia coli*/phage systems. 3. Mutation of T2 bacteriophage as a consequence of alkylation in vitro: the uniqueness of ethylation. *Proc. Roy. Soc. (Edinb.)* 150 (1959), 497.
- [154] LOVELESS, A.: The involvement of deoxyribonucleic acids in chemical mutagenesis. *Biochem. Pharmacol.* 4 (1960), 29.
- [155] LOVELESS, A., and S. REVELL: New evidence on the mode of action of "mitotic poisons". *Nature* 164 (1949), 938.
- [156] LOVELESS, A., and J. C. STOCK: The influence of radiomimetic substances on deoxyribonucleic acid synthesis and function studied in *Escherichia coli*/phage systems. 4. Colony-forming ability and phagesynthetic capacity of *Escherichia coli* strain B and two of its mutants following alkylation. *Proc. Roy. Soc. (Edinb.)* 151 (1959), 129.

- [157] LOVELESS, A., and J. C. STOCK: The influence of radiomimetic substances on deoxyribonucleic acid synthesis and function studied in *Escherichia coli*/phage systems. II. Properties of coliphage T 2 treated with di (2-chloroethyl) methylamine. Proc. Roy. Soc. (Edinb.) 150 (1959), 486.
- [158] LÜERS, H.: Untersuchungen über die Mutagenität des Triäthylmelamin (TEM) an *Drosophila melanogaster*. Arch. Geschwulstforsch. 6 (1953), 77.
- [159] LÜERS, H.: Genetische Spätschäden nach Behandlung mit zytostatischen Stoffen. 9. Österr. Ärzetagg, Salzburg 1955, S. 120. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956.
- [160] LÜERS, H.: Zur Frage der Erbschädigung durch tumortherapeutische Cytostatika. Z. Krebsforsch. 60 (1955), 528.
- [161] LÜERS, H.: Chinon I und Sanamycin im Mutationsversuch. Naturwissenschaften. 43 (1956), 206.
- [162] LÜERS, H.: The mutagenicity of triethylene thiophosphoramide (Thio-Tepa). Dros. Inf. Serv. 33 (1959), 145.
- [163] LÜERS, H., u. G. RÖHRBORN: Genetische Schäden durch Chemotherapeutika. Wissen u. Praxis, Heft 22. Berlin 1961.
- [164] LÜERS, T.: Die Chromosomen des Menschen. Z. naturwiss.-med. Grundlagenforsch. 2 (1964), 1.
- [165] LÜERS, T., E. STRUCK u. M. ALBRECHT: Strukturanaomalien der Chromosomen bei einer akuten Paramyeloblastenleukämie (Blutkulturmethode). Med. Welt (1963), 948.
- [166] LÜNING, K. G.: Mustard gas and gynandromorph production in *Drosophila melanogaster*. Hereditas 37 (1951), 488.
- [167] MAKINO, S., and A. H. AWA: Chromosome breakages in four chronic myeloid leukemia patients. Hereditas 52 (1964), 253.
- [168] MASSHOFF, W.: Das morphologische Prinzip in der allgemeinen Pathologie. Dtsch. med. Wschr. 90 (1965), 589.
- [169] MEHTAB, M.: Chromosomal re-arrangements in the progeny of *Drosophila* males treated with mustard gas. Nature 171 (1953), 262.
- [170] MERZ, T.: Effect of mitomycin-C on lateral root-tip chromosomes of *Vicia faba*. Science 133 (1961), 329.
- [171] MICHAELIS, A., u. R. RIEGER: Einige experimentelle Ergebnisse zur Wirkung von Myleran auf die Chromosomen von *Vicia faba*. Züchter 30 (1960), 150.
- [172] MICHAELIS, A., u. R. RIEGER: Die Induktion von Chromosomenaberrationen durch Mitomen und Endoxan bei *Vicia faba* und der Transportform-Wirkform-Mechanismus. Biol. Zentralbl. 80 (1961), 302.
- [173] MICHAELIS, A., u. R. RIEGER: Interaction of chromatid breaks induced by three different radiomimetic compounds. Nature 199 (1963), 1014.
- [174] MOORE, J. G., J. L. VAN CAMPENHOUT and W. M. BRANDAMP: Effects of ionizing irradiation and chemotherapeutic agents on human chromosomes. Amer. J. Obstet. Gynec. 88 (1964), 985.
- [175] MOOREHEAD, P. S., P. C. NOWELL, W. J. MELLMAN, D. M. BATTIPS and D. A. HUNGERFORD: Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Exp. Cell Res. 20 (1960), 613.
- [176] MOUSCHEN-DAHMEN, J., et M. MOUSCHEN-DAHMEN: L'action du myleran (di-méthanefulsulfonyloxy-butane) sur les chromosomes chez *Hordeum sativum* et chez *Vicia faba*. Hereditas 44 (1958), 415.
- [177] MOUSCHEN-DAHMEN, J., and M. MOUSCHEN-DAHMEN: Chromosome deficiencies induced with myleran. Experimentia 15 (1959), 310.
- [178] MUKHERJEE, R.: Actinomycin D effects on the frequency of radiation-induced mutations in *Drosophila*. Genetics 51 (1965), 363.
- [179] MUELLER, G. C.: Molecular events in replication of nuclei. Exp. Cell Res. 9 (1963), 144.
- [180] MURPHY, M. L., A. D. MORO and C. LACON: The comparative effects of five polyfunctional alkylating agents on the rat fetus, with additional notes on the chick embryo. Ann. N.Y. Acad. Sci. 68 (1958), 762.
- [181] NAKAO, Y., and C. AUERBACH: Test of a possible correlation between cross-linking and chromosome breaking abilities of chemical mutagens. Z. Vererbungsl. 92 (1961), 457.
- [182] NAKAO, Y. E. YAMAGUCHI and I. MACHIDA: Further test of possible correlation between cross-linking and chromosome breakage abilities of chemical mutagens. Jap. J. Genet. 39 (1964), 155.
- [183] NASRAT, G. E., W. D. KAPLAN and G. AUERBACH: A quantitative study of mustard gas induced chromosome breaks and rearrangements in *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abst. Vererbungsl. 86 (1954), 249.
- [184] NATARAJAN, A. T., and M. D. UPADHYA: Localized chromosome breakage induced by ethyl-methane-sulfonate and hydroxylamine in *Vicia faba*. Chromosoma 15 (1964), 156.
- [185] NEWCOMBE, D. S., and A. S. COHEN: Chromosome patterns in irradiated and nonirradiated patients with rheumatoid spondylitis. Ann. int. Med. 59 (1963), 859.
- [186] NICHOLS, W. W.: Relationships of viruses, chromosomes and carcinogenesis. Hereditas 50 (1963), 53.
- [187] NICHOLS, W. W.: In vitro chromosome breakage induced by arabinosyladenine in human leukocytes. Cancer Res. 24 (1964), 1502.
- [188] NICHOLS, W. W., and W. K. HENEEN: Chromosomal effects of arabinosylcytosine in a human diploid cell strain. Hereditas 52 (1964), 402.
- [189] NICHOLS, W. W., A. LEVAN, P. AULA and E. NORRBY: Extreme chromosome breakage induced by measles virus in different in vitro systems (preliminary communication). Hereditas 51 (1964), 380.
- [190] NICHOLS, W. W., A. LEVAN, L. L. CORIELL, H. GOLDNER and C. G. AHLSTRÖM: Chromosome abnormalities in vitro in human leukocytes associated with Schmidt-Ruppin Rous sarcoma virus. Science 146 (1964), 248.
- [191] NICHOLS, W. W., A. LEVAN, B. HALL and G. OESTERGREIN: Measles-associated chromosome breakage. Hereditas 48 (1962), 367.
- [192] NICHOLS, W. W., A. LEVAN, R. KATO, S. KRUGMAN and J. P. GILES: Measles-associated chromosome breakage during disease and under influence of life attenuated vaccine. Abstr. Soc. Pediatr. Res. Atlantic City 1963.
- [193] NICHOLS, W. W., A. LEVAN and B. A. KIHLMAN: Chromosome breakage associated with viruses and DNA inhibitors. Symp. internat. Soc. Cell Biol. 3 (1964), 255.
- [194] NOWELL, P. C.: Mitotic inhibition and chromosome damage by mitomycin in human leukocyte cultures. Exp. Cell Res. 33 (1964), 445.
- [195] OBE, G.: Chromosome endoreduplication in normal controls. Lancet II (1965), 53.
- [196] OCKEY, C. H.: A quantitative comparison between the cytotoxic effects produced by proflavine, acetyl-ethyleneimine and triethylene melamine on root-tips of *Vicia faba*. J. Genet. 55 (1957), 525.
- [197] OESTERGREN, G., and T. WAKONIG: True or apparent sub-chromatid breakage and the induction of labile states in cytological chromosome loci. Botaniska Notiser (Lund) 4 (1954), 357.
- [198] OSTERTAG, W., and W. KERSTEN: The action of proflavin and actinomycin D in causing chromatid breakage in human cells. Exp. Cell Res. 39 (1965), 261.
- [199] PARTINGTON, M., and H. JACKSON: The induction of dominant lethal mutations in rats by alkane sulphonic esters. Genet. Res. 4 (1963), 333.
- [200] PRICE, C. C.: Fundamental mechanisms of alkylation. Ann. N.Y. Acad. Sci. 68 (1958), 663.
- [201] PÜTTER, J.: Stoffwechselwirkungen von Äthyleniminochinonen. Arzneimittelforsch. 10 (1960), 8.
- [202] PURDOM, C. E.: Mutagenic effects of nitrogen mustard derivatives of azobenzene compounds in *Drosophila melanogaster*. Biochem. Pharm. 5 (1960), 206.
- [203] READ, J.: Chromosome damage and growth reduction produced in roots of *Vicia faba* by X-rays and by triethylene melamine. Int. J. Radiat. Biol. 3 (1961), 95.

- [204] REDDI, O. S., and C. AUERBACH: Sensitivity of the *Drosophila* testis to tri-ethylene melamine (TEM). *Genet. Res.* 2 (1961), 63.
- [205] REICH, E., R. M. FRANKLIN, A. J. SHATKIN and E. L. TATUM: Effect of actinomycin D on cellular nucleic acid synthesis and virus production. *Science* 134 (1961), 556.
- [206] REISMAN, L. E., and J. M. TRUJILLO: Chronic granulocytic leukemia of childhood. *J. Pediat.* 62 (1963), 710.
- [207] REISMAN, L. E., W. W. ZUELZER and M. MITANI: Endoreduplication in a patient with acute monocytic leukaemia. *Lancet* II (1963), 1038.
- [208] REVELL, S. H.: Chromosome breakage by X-rays and radiomimetic substances in *Vicia*. *Heredity* 6, Suppl. (1953), 107.
- [209] REVELL, S. H.: A new hypothesis for "chromatid" changes. *Proc. 2. Radiobiol. Symp. Liège 1954*, p. 243. London 1955.
- [210] REVELL, S. H.: A new hypothesis for the interpretation of chromatid aberrations, and its relevance to theories for the mode of action of chemical agents. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 68 (1958), 802.
- [211] REVELL, S. H.: The accurate estimation of chromatid breakage, and its relevance to a new interpretation of chromatid aberrations induced by ionizing radiations. *Proc. Roy. Soc. (Edinb.)* 150 (1959), 563.
- [212] RIEGER, R., u. A. MICHAELIS: Genetisches und zytogenetisches Wörterbuch. 2. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958.
- [213] RIEGER, R., u. A. MICHAELIS: Vergleichende Untersuchungen zur Verteilung durch verschiedene Mutagen induzierter Brüche über den Chromosomensatz von *Vicia faba* L. *Chromosoma* 10 (1958), 163.
- [214] RIEGER, R., u. A. MICHAELIS: Chromatidenaberrationen nach Einwirkung von Aethylmethansulfonat (Methansulfonsäureäthylester) auf Primärwurzeln von *Vicia faba* L. *Kulturpfl.* 8 (1960), 230.
- [215] RÖHRBORN, G.: Untersuchungen zur Frage der genetischen Wirksamkeit von Myleran an *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abst. Vererbungsl. 90 (1959), 116.
- [216] RÖHRBORN, G.: Mutagenitätsuntersuchungen mit 1,4-Dimethylsulfonyloxy-1,4-dimethylbutan an *Drosophila melanogaster*. Z. Vererbungsl. 90 (1959), 457.
- [217] RÖHRBORN, G.: Mutagene Wirkung von alkylierenden Substanzen. In: Chemotherapie maligner Tumoren. 3. Bielefelder Symposium 1962, S. 183. Stuttgart 1964.
- [218] RÖHRBORN, G.: Chemische Konstitution und mutagene Wirkung. II. Triazinderivate. Z. Vererbungsl. 93 (1962), 1.
- [219] ROSS, W. C. J.: Biological alkylating agents. London 1962.
- [220] ROSS, W. C. J.: In vitro reactions of biological alkylating agents. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 68 (1958), 669.
- [221] ROTHFELS, K. H., and L. SIMINOVITCH: An air-drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown in vitro. *Stain Technol.* 33 (1958), 73.
- [222] RUTISHAUSER, A., and W. BOLLAG: Cytological investigations with a new class of cytotoxic agents: methylhydrazine derivatives. *Experientia* 19 (1963), 130.
- [223] SARSELA, E., and P. S. MOORHEAD: Enhancement of secondary constrictions and the heterochromatic X in human cells. *Cytogenetics* 1 (1962), 225.
- [224] SANDBERG, A. A., T. ISHIHARA, J. KIKUCHI and L. H. CROSSWHITE: Chromosomes of lymphosarcoma and cancer cells in bone marrow. *Cancer* 17 (1964), 738.
- [225] SASAKI, M. S., and S. MAKINO: The demonstration of secondary constrictions in human chromosomes by means of a new technique. *Am. J. hum. Genet.* 15 (1963), 24.
- [226] SCHMID, W.: DNA replication patterns of human chromosomes. *Cytogenetics* 2 (1963), 175.
- [227] SHAW, M. W., and M. M. COHEN: Chromosome exchanges in human leukocytes induced by mitomycin C. *Genetics* 51 (1965), 181.
- [228] SMITH, H. H., and T. LOTFY: Effects of beta-propiolactone and cupryon on chromosomes of *Vicia* and *Allium*. *Amer. J. Bot.* 42 (1955), 750.
- [229] SMITH, H. H., and A. M. SRB: Induction of mutations with β -propiolactone. *Science* 114 (1951), 490.
- [230] SMITH, P. K., M. V. NADKARNI, E. G. TRAMS and C. DAVISON: Distribution and fate of alkylating agents. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 68 (1958), 834.
- [231] SOMERS, C. E., and T. C. HSU: Chromosome breakage induced by hydroxylamine in mammalian cells. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 48 (1962), 937.
- [232] SOMERS, C. E., and R. M. HUMPHREY: A chromosome study of radiation sensitization by 5-bromodeoxyuridine. *Exp. Cell Res.* 30 (1963), 208.
- [233] SPRIGGS, A.: Karyotype changes in human tumor cells. *Brit. J. Radiol.* 37 (1963), 210.
- [234] STACEY, K. A., M. COBB, S. F. COUSENS and P. ALEXANDER: The reactions of the "radiomimetic" alkylating agents with macromolecules in vitro. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 68 (1958), 682.
- [235] STEWART, J. S. S., and A. R. SANDERSON: Chromosomal aberrations after diagnostic X-irradiation. *Lancet* I (1961), 978.
- [236] STICH, H. F., T. C. HSU and F. RAPP: Virus and mammalian chromosomes. I. Localization of chromosome aberrations after infection with herpes simplex virus. *Virology* 22 (1964), 439.
- [237] STRELZOFF, E.: DNA-synthesis and induced mutations in the presence of 5-bromouracil. II. Induction of mutations. Z. Vererbungsl. 93 (1962), 301.
- [238] SUZUKI, D.: Studies on the chemical nature of crossing-over in *Drosophila melanogaster*. I. Preliminary results on the effect of actinomycin D. *Can. J. Genet. Cytol.* 5 (1963), 482.
- [239] SWANSON, C. P., and T. MERZ: Factors influencing the effect of β -propiolactone on chromosomes of *Vicia faba*. *Science* 129 (1959), 1364.
- [240] TANZER, J., Y. STOITCHKOV, P. HAREL and M. BOIRON: Chromosomal abnormalities in measles. *Lancet* II (1963), 1070.
- [241] TAYLOR, J. H.: Effects of inhibitors of thymidylate synthetase on chromosome breakage and reunion. *Symp. Int. Soc. Cell Biol.* 2 (1963), 161.
- [242] TAYLOR, J. H.: DNA synthesis in relation to chromosome reproduction and the reunion of breaks. *J. cell. comp. Physiol.* 62 (1963), 73.
- [243] TAYLOR, J. H., W. F. HAUT and J. TUNG: Effects of fluorodeoxyuridine on DNA replication, chromosome breakage and reunion. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 48 (1962), 190.
- [244] TIMMIS, G. M.: Antagonists of purine and pyrimidine metabolites and of folic acid. *Adv. Cancer Res.* 6 (1961), 369.
- [245] TOUGH, I. M., K. E. BUCKTON, A. G. BAIKIE and W. M. COURT BROWN: X-ray induced chromosome damage in man. *Lancet* II (1960), 849.
- [246] WAHRMAN, J., T. SCHAAP and E. ROBINSON: Manifest chromosome abnormalities in leukaemia. *Lancet* I (1962), 1098.
- [247] WAHRMAN, J., and E. ROBINSON: Chromosome damage after X-ray therapy. *Lancet* I (1963), 505.
- [248] WAKONIG, R., and T. J. ARNASON: Chromosome breakage induced in *Vicia faba* root tips by 2,4,6-triethylenimine-1,3,5-triazine. *Canad. J. Botany* 37 (1959), 403.
- [249] WATSON, W. A. F.: Evidence of an essential difference between the genetic effects of mono- and bi-functional alkylating agents. Z. Vererbungsl. 95 (1964), 374.
- [250] WESTERGAARD, M.: Chemical mutagenesis in relation to the concept of the gene. *Experientia* 13 (1957), 224.
- [251] WILMANN, W.: Der Wirkungsmechanismus von Folsäureantagonisten bei der Leukämiebehandlung. Xth Congr. Int. Soc. of Haematol., Stockholm 1964 (Abstr.).
- [252] WITTINGHILL, M.: The effects of methyl-bis (b-chloroethyl) amine upon recombination values in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 33 (1948), 634.