

Cytogenetische Untersuchungen mit zwei N-substituierten Endoxanabkömmlingen an menschlichen Leukocyten in vitro

I. Dosis-Wirkungs-Beziehungen*

KLAUS ERICH HAMPEL, DIETER STOPIK und MICHAEL FRITZSCHE

I. Medizinische Klinik der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. H. Frhr. von KRESS)

Eingegangen am 24. Januar 1968

Cytogenetic Studies with two N-Substituted Cytoxan Derivatives on Human Leukocytes in vitro

I. Dose-Efficiency-Levels

Summary. Unlike cyclophosphamide (Endoxan®, Cytoxan®) N,N,N'-tris-(2-chloroethyl)-N',O-propylene phosphoric acid ester diamide and N-(2-chloroethyl)-N'-(2-chloroethyl)-N',O-propylene phosphoric acid ester diamide induced chromosomal aberrations in human leukocytes in vitro. The majority of these lesions consisted of chromatid breaks, acentric fragments, and isochromatid breaks. Infrequently interchanges and ring chromosomes were observed. The percentage of metaphases with chromosomal damage increased exponentially, the mean breakage frequency per metaphase, however, rose approximately linearly with the applied concentration. A possible cleavage of the nitrogen-phosphorus bond and the breakdown of the inactive cyclic forms of the two investigated compounds in vitro is discussed.

Einleitung

N,N-Bis-(2-chloräthyl)-N',O-propylen-phosphorsäureester-diamid (Cyclophosphamid, Endoxan®, Cytoxan®) erwies sich bekanntlich unter In vitro-Bedingungen als nicht wirksam. Auch bei hohen Konzentrationen ließ sich an verschiedenen Tumorzellstämmen durch den Inkubationstest nach SCHMÄHL u. DRUCKREY eine meßbare cytostatische Aktivität der Substanz nicht erkennen (BROCK, 1958; BROCK u. HOHORST). Unter In vivo-Bedingungen hingegen ließen sich beim Säuger cytostatisch wirksame Folgeprodukte aus Serum, Urin und Galle gewinnen (BROCK u. HOHORST, 1963; HOHORST, ZIEMANN u. BROCK, 1965, 1966), deren Entstehung an intaktes Lebergewebe bzw. bei Leberhomogenaten an die Mikrosomenfraktion gebunden ist (BROCK u. HOHORST).

An *Drosophila* wurden bei intraabdomineller Injektion einer 0,5—1%igen Cyclophosphamidlösung im Muller-5-Test in 1,6—5,3% recessiv geschlechtsgekoppelte Letalmutationen (Spontanrate 0,35%) von BERTRAM u. HÖHNE gefunden.

Cytogenetische Untersuchungen an *Vicia faba* von MICHAELIS u. RIEGER ergaben bei 24stündiger Einwirkung und anschließender gleich langer Erholungsphase von Cyclophosphamidkonzentrationen zwischen 1,6 und 25 mmol einen

* Herrn Professor Dr. HANS Frhr. von KRESS zum 65. Geburtstag gewidmet.

dosisabhängigen Anstieg der Metaphasen mit Chromosomenaberrationen. CON-STANTINESCU u. Mitarb. erzielten solche auch am Weizenwurzelmeristem bei gleichzeitigem Zusatz von Coffein.

ARRIGHI, HSU u. BERGSAGEL wie auch CASTOLDI u. MALACARNE beobachteten nach i.p.-Applikationen bei der Maus chromosomale Schädigungen. Dies wurde unter *in vivo*-Bedingungen auch am Lettré-Ascitestumor (ARRIGHI, HSU u. BERGSAGEL) und an den Ascitestumoren L 4946 und C 1498 (KOVACS u. Mitarb.) nachgewiesen.

Über Chromosomenveränderungen beim Menschen nach Cyclophosphamidtherapie berichteten ARRIGHI, HSU u. BERGSAGEL. Bei insgesamt vier Patienten wurde eine mittlere Aberrationsquote pro Metaphase von 0,17—1,56 (Stichprobenumfang 34—51) gefunden, wobei allerdings die in drei Fällen vorausgegangene Strahlentherapie (insgesamt 4850, 5000 bzw. 17410 rad) zu berücksichtigen ist.

Nach einer 48stündigen Inkubation von HeLa-Zellen mit Cyclophosphamid beobachtete VRBA bei Konzentrationen zwischen 210—840 mg/l Chromosomenaberrationen bei 15,1—29,6% der Metaphasen. Durch Rattenpassage gewonnene Cyclophosphamidmetabolite induzierten unter verschiedenen experimentellen Bedingungen ebenfalls chromosomale Schädigungen. Am gleichen Testobjekt konnten VOGEL u. VBRA darüber hinaus zeigen, daß Chloramphenicol (Zusatz 18 Std vor Abbruch) die Zahl der Reunionsfiguren, die bei alleiniger Applikation von Endoxanfolgeprodukten 46 Std vor Abbruch zu erwarten waren, signifikant verminderte.

Chromosomale Veränderungen bei direktem Zusatz von 200—400 µg/ml Cyclophosphamid zu Leukocytenkulturen ließen sich bei eigenen Versuchen nicht darstellen, doch wurden diese in 26—87% der Metaphasen gefunden, wenn die Kulturen 0,1—0,5 ml Plasma cyclophosphamidbehandelter Ratten (500 bis 1000 mg/kg i.p. bzw. i.v.) erhielten. Demnach führten die *in vivo* entstandenen Spaltprodukte des Cyclophosphamids *in vitro* zu Chromosomenveränderungen. Demgegenüber konnte bereits bei direktem Zusatz von N,N-Bis-(2-chloräthyl)-O-(3-amino-propyl)-phosphorsäureamidoester (A 2, Strukturformel II) zu Leukocytenkulturen nachgewiesen werden, daß in einem Dosisbereich von 1—50 µg/ml Chromosomenaberrationen induziert wurden, deren Ausmaß konzentrationsabhängig war (HAMPEL, KOBER, RÖSCH, GERHARTZ u. MEINIG). Diese Substanz ist als Spaltprodukt von Cyclophosphamid bzw. als dessen ringoffenes Analog zu betrachten (ARNOLD u. BOURSEAUX).

Nach diesen Ergebnissen erschien es angebracht, zwei neuartige N-substituierte Endoxanabkömmlinge mit einer ähnlichen Versuchsanordnung zu prüfen.

Material und Methode

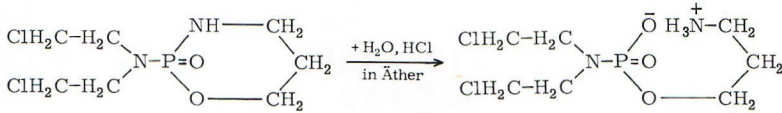
Als Testsubstanzen dienen:

1. N,N,N'-Tris-(2-chloräthyl)-N',O-propylen-phosphorsäureester-diamid, Asta Z 4828, Charge 427¹ (Strukturformel III) und
2. N-(2-Chloräthyl)-N'-(2-chloräthyl)-N',O-propylen-phosphorsäureester-diamid, Asta Z 4942, Charge 420¹ (Strukturformel IV).

Die Verbindung 1 stand zu 10%, die Verbindung 2 zu 20% gelöst in dem Imidazolidonderivat Oximazon¹ (Strukturformel V) zur Verfügung.

¹ Die genannten Substanzen wurden uns von den Asta-Werken AG, Brackwede, zur Verfügung gestellt.

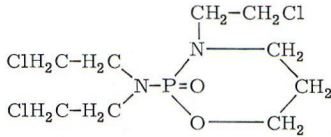
Strukturformeln



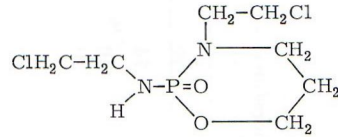
I N,N-Bis-(2-chloräthyl)-N',O-propylen-phosphorsäureester-diamid (Cyclophosphamid)

II N,N-Bis-(2-chloräthyl)-O-(3-amino-propyl)-phosphorsäureamidoester (Asta A 2)

Testsubstanzen

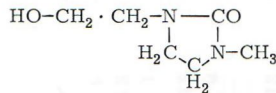


III N,N,N'-Tris-(2-chloräthyl)-N',O-propylen-phosphorsäureester-diamid (Asta Z 4828)



IV N-(2-Chloräthyl)-N'-(2-chloräthyl)-N',O-propylen-phosphorsäureester-diamid (Asta Z 4942)

Lösungsvermittler:



V Oximazon

Der Ansatz und die Bearbeitung von insgesamt 65 Leukocytenkulturen erfolgte nach der Methode von MOORHEAD u. Mitarb. unter Verwendung bereits früher angegebener Modifikationen (HAMPEL, KOBER, RÖSCH, GERHARTZ u. MEINIG). Desacetylmethylkolchizin (Colcemid®, Ciba) wurde in einer Endkonzentration von 4 µg/ml Medium 90 min vor Abbruch den Kulturen zugesetzt.

Verschiedene Kulturserien (vier bis sechs Kulturen) wurden jeweils unter möglichst konstanten Bedingungen angesetzt (einheitliche Spender, 30% autologes Plasma, initial exakt 1×10^7 Leukocyten auf insgesamt 10 ml Kulturmedium, 72 Std Bebrütungsdauer bei $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$). Jeweils 24 Std vor Abbruch wurden den Kulturen variable Dosen der genannten Testsubstanzen entweder direkt oder im Fall der Substanz 1 auch in Form von „Aktivierungsprodukten“ nach vorausgegangener Rattenpassage zugesetzt. Zu diesem Zwecke erhielten insgesamt 26 Wistarratten (Gewicht ca. 220–310 g) 25–100 mg/kg N,N,N'-Tris-(2-chloräthyl)-N',O-propylen-phosphorsäureester-diamid intraperitoneal. Konstant 60 min nach der Injektion wurde unter Äthernarkose bei eröffnetem Thorax durch Punktion der rechten Herzkammer Blut unter sterilen Bedingungen in eine heparinisierte Glasspritze aspiriert, anschließend bei 4000 UpM zentrifugiert und das Plasma den Leukocytenkulturen zugesetzt. Die quantitative Bewertung der Chromosomenaberrationen erfolgte nach bereits früher angegebenen Richtlinien (HAMPEL).

Ergebnisse

Bereits bei direktem Zusatz der zwei Testsubstanzen 24 Std vor Abbruch der Leukocytenkulturen waren Chromosomenaberrationen nachweisbar. Aus der Tabelle 1 geht hervor, daß es sich dabei vorwiegend um Chromatidbrüche und gedoppelte azentrische Fragmente (Abb. 1), seltener Isochromatidbrüche und nur vereinzelt um Interchanges (Abb. 2) und Ringchromosomen handelte. Die Bewertung von Kulturen, die N,N,N'-Tris-(2-chloräthyl)-N',O-propylen-phosphorsäureester-diamid in einer Konzentration von 1 mg/ml Kulturmedium erhielten,

Tabelle 1

	Kontrollkulturen			N,N,N'-Tris-(2-chloräthyl)-N',O-propylen-phosphorsäureester-diamid (Asta Z 4828)											
				mg/ml Kulturmedium											
				0,1	0,2			0,4			0,6		1,0		
Chromatidbrüche	—	1	—	4	3	13	10	8	44	24	74	71	65	—	—
Isochromatidbrüche	—	—	—	—	—	—	6	2	2	—	10	14	2	—	—
Bruchfrequenz	—	—	—	—	—	—	12	4	4	—	20	28	4	—	—
Fragmente einzelne	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	—	—	—
gedoppelte	1	—	1	3	5	6	6	7	11	7	27	39	32	—	—
Bruchfrequenz	2	—	2	6	10	12	12	14	22	14	54	78	64	—	—
Interchanges	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	3	3	—	—
Bruchfrequenz ca.	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	6	6	—	—
Ringchromosomen	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
Bruchfrequenz ca.	—	—	—	—	—	—	—	—	4	—	—	—	—	—	—
Nicht klassifizierbare Brüche	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	7	1	10	—	—
Bruchfrequenz ca.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	7	1	10	—	—
Mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase	0,02	0,01	0,02	0,10	0,13	0,25	0,36	0,26	0,74	0,70	1,55	1,88	1,49	—	—
Prozent Metaphasen mit Chromosomenaberrationen	1	1	1	7	8	18	21	16	41	44	57	72	67	95	98
Zahl der bewerteten Metaphasen	100	100	100	100	100	100	100	100	100	54	100	100	87	37	55

	Kontrollkulturen			N-(2-Chloräthyl)-N'-(2-chloräthyl)-N',O-propylen-phosphorsäureester-diamid (Asta Z 4942) mg/ml Kulturmedium									
				0,13		0,25		0,5		1,0			
Chromatidbrüche	—	—	—	1	3	4	5	11	4	21	6	44	79
Isochromatidbrüche	—	—	1	—	—	2	1	2	2	2	3	5	1
Bruchfrequenz	—	—	2	—	—	4	2	4	4	4	6	10	2
Fragmente einzelne	—	—	—	—	—	—	—	1	1	2	1	—	10
gedoppelte	—	—	2	2	1	7	9	8	11	12	11	27	34
Bruchfrequenz	—	—	4	4	2	14	18	16	22	24	22	54	68
Interchanges	—	—	—	1	—	1	—	—	—	1	—	—	3
Bruchfrequenz ca.	—	—	—	2	—	2	—	—	—	2	—	—	6
Ringchromosomen	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	2
Bruchfrequenz ca.	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	2	4
Mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase	0	0	0,06	0,07	0,05	0,24	0,25	0,34	0,66	0,54	0,66	1,12	1,69
Prozent Metaphasen mit Chromosomenaberrationen	0	0	2	4	4	12	14	18	34	31	36	47	67
Zahl der bewerteten Metaphasen	100	100	100	100	100	100	100	100	47	100	53	100	100



Abb. 1. Chromatidbrüche und Fragmente in Leukocytenmetaphase bei Zusatz von 0,6 mg N,N,N'-Tris-(2-chloräthyl)-N',O-propylen-phosphorsäureester-diamid pro Milliliter Kulturmedium (2600×)

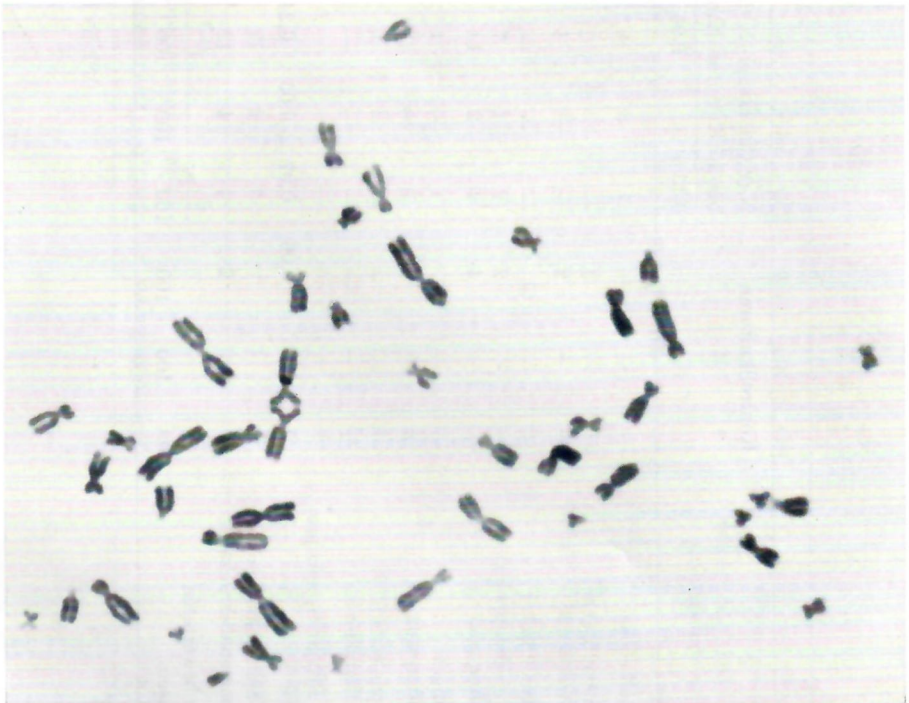


Abb. 2. Somatisches crossing over im Bereich der C-Gruppe? Dieser Aberrationstyp wurde nur einmal beobachtet, sonst handelte es sich um reziproke Translokationen. Zusatz von 0,5 mg N-(2-Chloräthyl)-N'-(2-chloräthyl)-N',O-propylen-phosphorsäureester-diamid pro Milliliter Kulturmedium. Vergrößerung: 2300×

war nicht möglich. Neben einer hochgradigen Schrumpfung der Chromosomen war die Bruchfrequenz in ihnen so hoch, daß nur noch die Ermittlung des Prozentsatzes der von Chromosomenaberrationen betroffenen Metaphasen — wegen der geringen Mitoserate annähernd — möglich war. Die Werte für die mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase wurden stets auf 100 Metaphasen bezogen.

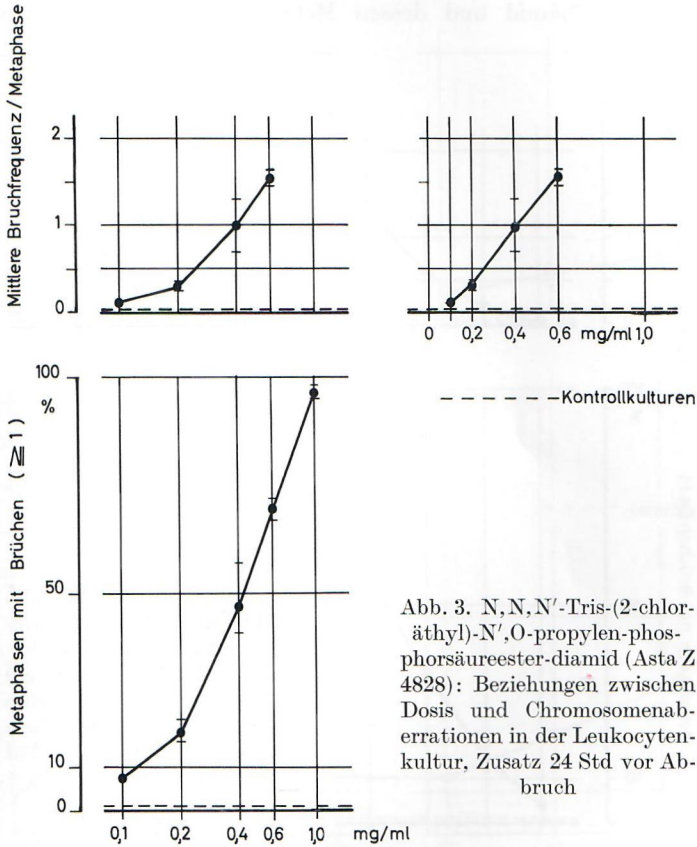


Abb. 3. N,N,N'-Tris-(2-chloräthyl)-N',O-propylen-phosphorsäureester-diamid (Asta Z 4828): Beziehungen zwischen Dosis und Chromosomenaberrationen in der Leukocytenkultur, Zusatz 24 Std vor Abbruch

Die Dosis-Wirkungs-Beziehungen wurden graphisch in den Abb. 3 und 4 dargestellt. Der Prozentsatz der von einem oder mehr Brüchen betroffenen Metaphasen ergab in einem Konzentrationsbereich von 0,13—1,0 mg/ml N-(2-Chloräthyl)-N'-(2-chloräthyl)-N',O-propylen-phosphorsäureester-diamid und von 0,2 bis 1,0 mg/ml Kulturmedium N,N,N'-Tris-(2-chloräthyl)-N',O-propylen-phosphorsäureester-diamid einen annähernd exponentiellen Anstieg, wie aus dem semilogarithmischen Bezugssystem der Abbildungen zu entnehmen ist. Hingegen bestand eine annähernd lineare Beziehung zwischen der mittleren Bruchfrequenz pro Metaphase und der jeweiligen Konzentration beider Testsubstanzen.

Darüber hinaus wurden die chromosomalen Veränderungen analysiert, die durch N,N,N'-Tris-(2-chloräthyl)-N',O-propylen-phosphorsäureester-diamid und dessen unter In vivo-Bedingungen (bei der Ratte) zu erwartenden Umwandlungsprodukten an menschlichen Leukocyten in vitro induziert wurden.

Dabei wurde von folgenden Versuchsanordnungen ausgegangen:

Versuch I: Bei einer konstanten Dosis der Testsubstanz von 100 mg/kg Körpergewicht der Ratten i.p. wurden die gewonnenen und den Kulturen zugesetzten Plasmamengen variiert.

Versuch II: Bei jeweils konstantem Ratten-Plasmavolumen von 0,1 ml/ml Medium der Leukozytenkulturen variierte die der Ratte i.p. applizierte Dosis der Testsubstanz.

Die durch „indirekten“ Zusatz von N,N,N'-Tris-(2-chloräthyl)-N',O-propylenphosphorsäureester-diamid und dessen Metabolite induzierten Chromosomen-

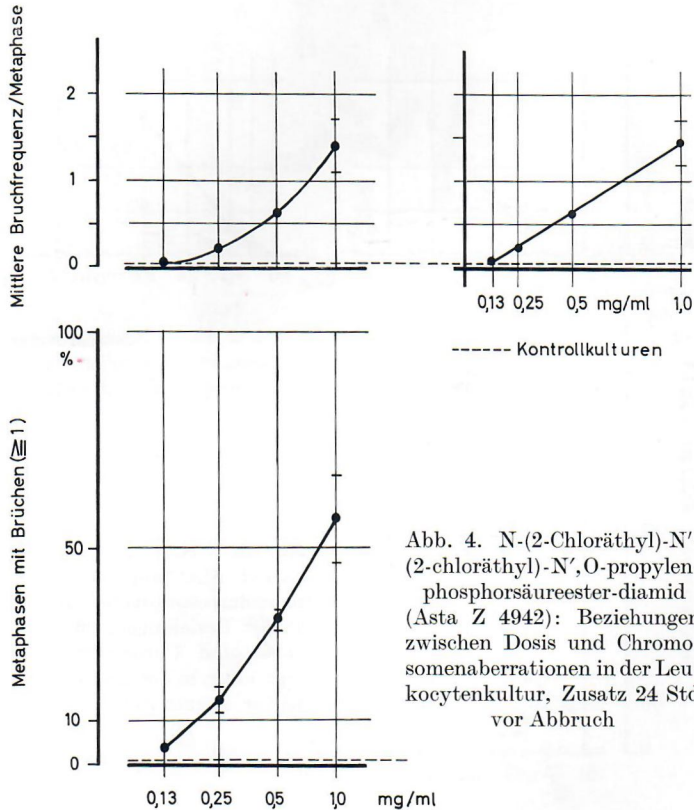


Abb. 4. N-(2-Chloräthyl)-N'-(2-chloräthyl)-N',O-propylenphosphorsäureester-diamid (Asta Z 4942): Beziehungen zwischen Dosis und Chromosomenaberrationen in der Leukozytenkultur, Zusatz 24 Std vor Abbruch

veränderungen wurden in der Tabelle 2 zusammengestellt. Die Verteilung der verschiedenen Chromosomenaberrationen im Versuch I und II ließ im Vergleich zu den Ergebnissen nach direktem Zusatz der Substanz (s. Tabelle 1) keine nennenswerten Unterschiede erkennen. Vergleicht man lediglich die Zahl der induzierten Interchanges bei entsprechenden Prozentsätzen (41—57 bei direktem Zusatz und 50—52 in Versuch I) der geschädigten Metaphasen, so fällt die relativ hohe Interchangefrequenz (10) des Versuchs I gegenüber den entsprechenden drei Kulturen bei direktem Zusatz auf. Genügend hohe Interchangefrequenzen beider Versuchsserien standen jedoch für eine quantitative Beurteilung gegebenenfalls vorhandener Unterschiede nicht zur Verfügung, da der begrenzende Faktor im Versuch I in der anwendbaren Rattendosis der Testsubstanz lag. Es zeigte sich, daß die Schwellendosis für generalisierte Krampfanfälle bei dem benutzten Rattenstamm

zwischen 100—150 mg/kg i.p. N,N,N'-Tris-(2-chloräthyl)-N',O-propylen-phosphorsäureester-diamid lag. Bei 200 mg/kg kam es innerhalb weniger Minuten zum Exitus letalis, vermutlich durch Atemlähmung.

Die erwähnten Ergebnisse der Tabelle 2 sind in der Abb. 5 graphisch wiedergegeben. Die Beziehungen sowohl der mittleren Bruchfrequenz pro Metaphase

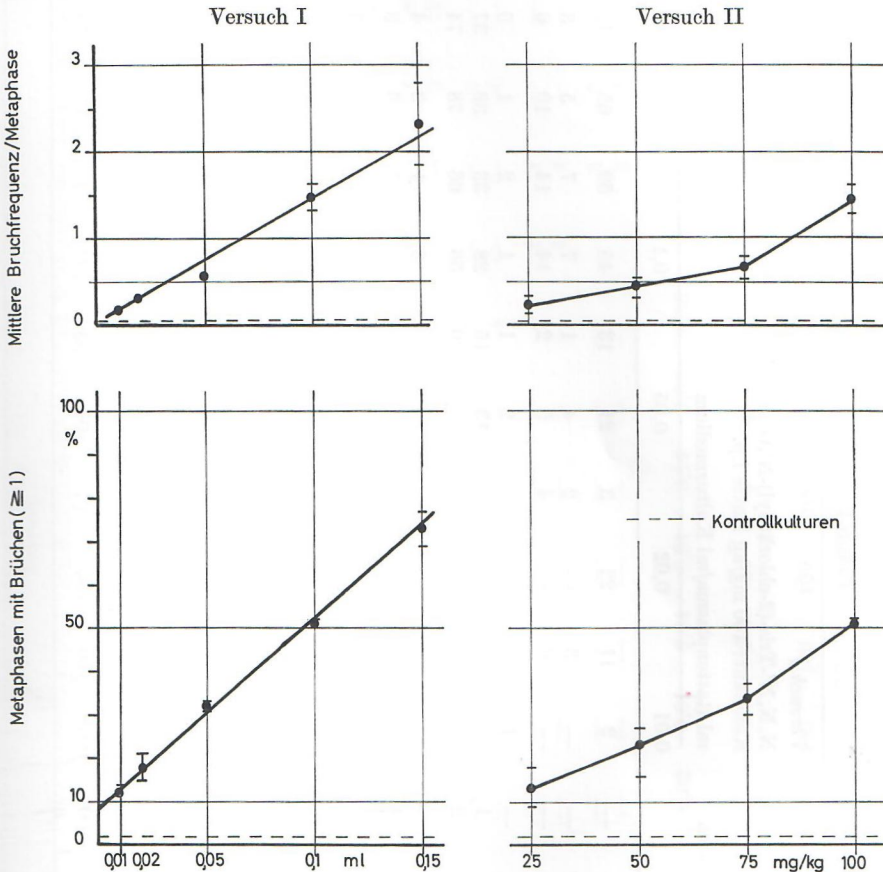


Abb. 5. N,N,N'-Tris-(2-chloräthyl)-N',O-propylen-phosphorsäureester-diamid (Asta Z 4828) nach einstündiger Rattenpassage: Beziehungen zwischen Dosis und Chromosomenaberrationen, Zusatz 24 Std vor Abbruch. Versuch I: Konst.: Rattendosis = 100 mg/kg i.p., Var.: Rattenplasmavolumen. Versuch II: Konst.: Rattenplasmavolumen = 0,1 ml pro Milliliter Kulturmedium, Var.: Rattendosis

als auch des Prozentsatzes der geschädigten Metaphasen zur jeweiligen Dosis erwiesen sich im Versuch I als annähernd linear. Dagegen ließen sich derartige Beziehungen im Versuch II nicht mit genügender Sicherheit darstellen, zumal aus den oben angegebenen Gründen eine Dosissteigerung bei der Ratte über 100 mg/kg i.p. der Substanz 1 hinaus nicht möglich war.

Die Mittelwerte der Spontanaberrationen verglichen mit denen von Kontrollserien unter verschiedenen Bedingungen ergaben keine Unterschiede, insbesondere auch nicht bei hohen Oximazonkonzentrationen (Tabelle 3).

Tabelle 2

Kontrollkulturen		Versuch I N,N,N'-Tris-(2-chloräthyl)-N',O-propylen-phosphorsäureester-diamid (Asta Z 4828) Konstant: 100 mg/kg Ratte i.p.												
		ml Rattenplasma/ml Kulturmedium												
		0,01	0,02	0,05	0,1	0,15	0,01	0,02	0,05	0,1	0,15	0,01	0,02	0,05
Chromatidbrüche	—	1	—	2	11	22	3	21	13	45	50	65	45	28
Isochromatidbrüche	—	—	—	—	3	—	2	4	1	7	7	5	3	3
Bruchfrequenz	—	—	—	—	6	—	4	8	2	14	14	10	6	6
Fragmente einzelne	—	—	—	1	—	—	—	2	1	1	2	1	5	5
gedoppelte	2	2	1	8	1	5	7	13	15	28	33	39	37	15
Bruchfrequenz	4	4	2	16	2	10	14	26	30	56	66	78	74	30
Interchanges	—	—	—	1	2	—	—	—	—	6	1	3	4	2
Bruchfrequenz ca.	—	—	—	2	4	—	—	—	—	12	2	6	8	4
Nicht klassifizierbare Brüche	—	—	—	—	—	1	—	—	1	1	14	—	7	11
Bruchfrequenz ca.	—	—	—	—	—	1	—	—	1	1	14	—	7	11
Dizentrische Chromosomen	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	—
Bruchfrequenz ca.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	4	—	—
Mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase	0,04	0,05	0,02	0,21	0,23	0,33	0,31	0,57	0,56	1,29	1,52	1,65	1,86	2,80
Prozent Metaphasen mit Chromosomenaberrationen	2	3	1	10	14	21	15	33	31	52	50	52	69	77
Zahl der bewerteten Metaphasen	100	100	100	100	100	100	67	100	84	100	100	100	78	30

	Kontrollkulturen					Versuch II										
						N,N,N'-Tris-(2-chloräthyl)-N',O-propylen-phosphorsäureester-diamid (Asta Z 4828) Konstant: 0,1 ml Rattenplasma/ml Kulturmedium										
						mg/kg Ratte i.p.										
						25	50			75		100				
Chromatidbrüche	—	—	—	1	—	7	6	18	—	7	7	5	45	50	65	
Isochromatidbrüche	—	—	—	—	1	1	—	—	1	3	5	—	7	7	5	
Bruchfrequenz	—	—	—	—	2	2	—	—	2	6	10	—	14	14	10	
Fragmente einzelne	—	—	—	—	—	—	—	—	1	2	—	1	1	2	1	
gedoppelte	4	—	1	—	1	11	4	9	9	6	17	13	28	33	39	
Bruchfrequenz	8	—	2	—	2	22	8	18	18	12	34	26	56	66	78	
Interchanges	—	—	—	—	—	—	—	—	6	—	—	1	6	1	3	
Bruchfrequenz ca.	—	—	—	—	—	—	—	—	12	—	—	2	12	2	6	
Ringchromosomen	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1	—	—	—	
Bruchfrequenz ca.	—	—	—	—	—	—	—	—	4	—	—	4	—	—	—	
Dizentrische Chromosomen	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	—	1	1	
Bruchfrequenz ca.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	4	—	—	4	4	
Nicht klassifizierbare Brüche	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	3	1	14	—	
Bruchfrequenz ca.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	3	1	14	—	
Mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase	0,08	0	0,02	0,01	0,04	0,31	0,14	0,51	0,55	0,31	0,57	0,77	1,29	1,52	1,65	
Prozent Metaphasen mit Chromosomenaberrationen	3	0	1	1	2	18	9	27	25	17	30	37	52	50	52	
Zahl der bewerteten Metaphasen	100	87	100	100	100	100	100	70	67	100	100	49	100	100	100	

Tabelle 3

Kontrollen	Prozent Metaphasen mit Chromosomen- aberrationen	Mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase	Gesamtzahl der bewerteten Metaphasen
Mittelwerte unbehandelter Kontrollkulturen	1	0,02	1387
Streubreite:	0—3	0—0,08	
Mittelwerte von Kontrollkulturen mit Zusatz von 1 ml Plasma unbehandelter Ratten	2	0,04	300
Streubreite:	0—3	0—0,06	
Mittelwerte von Kontrollkulturen mit direktem Zusatz von 0,005—0,02 ml Oximazon pro Milliliter Kulturmedium (24 Std vor Abbruch der Kulturen)	2	0,02	251
Streubreite:	0—4	0—0,04	
Mittelwerte von Kontrollkulturen mit Zusatz von 0,1 ml Rattenplasma pro Milliliter Kulturmedium (entnommen 1 Std nach i.p. Injektion von 1 ml Oximazon/kg Körpergewicht, 24 Std vor Abbruch der Kulturen)	1	0,01	200
Streubreite:	0—2	0—0,02	

Diskussion

Bei der Betrachtung der Versuchsergebnisse ist zu berücksichtigen, daß im Vergleich zu der Arbeit von VRBA eine geringfügig abweichende Bewertung der Aberrationstypen vorgenommen wurde. Die bei der benutzten Versuchsanordnung selten auftretenden achromatischen Läsionen wurden nicht bewertet. Einzelne von VRBA noch als lokale Achromasien beschriebene Aberrationen (akrozentrische Chromosomen der Abb. 2a der Arbeit VRBA) wurden wegen der geringfügigen Dislokation bereits zu den Chromatidbrüchen gerechnet, wobei im Einzelfall die Zuordnung strittig sein kann. Die zusätzliche Registrierung der gaps ist bei Verwendung unterschiedlicher Inkubationszeiten sicher unentbehrlich.

Im Gegensatz zu Cyclophosphamid (Endoxan®) induzierten bei der verwandten Versuchsanordnung die zwei getesteten N-substituierten Cyclophosphamid-abkömmlinge chromosomale Aberrationen bereits bei direktem Zusatz zu den Leukocytenkulturen. Früher konnte, wie erwähnt, nachgewiesen werden, daß N,N-Bis-(2-chloräthyl)-O-(3-aminopropyl)-phosphorsäureamidoester (Strukturformel II) bei direktem Zusatz in vitro unter den gleichen Versuchsbedingungen ebenfalls Chromosomenbrüche in Abhängigkeit von der jeweils verwendeten Konzentration auslöste (HAMPEL u. Mitarb.). Voraussetzung für die Induktion chromosomaler Schädigungen war somit die hydrolytische Phosphamidspaltung des hexacyclischen Ringsystems von Cyclophosphamid. Bei den hier getesteten N-substituierten Cyclophosphamidabkömmlingen (Formeln III u. IV) handelt es sich um Verbindungen, bei denen am cyclischen Stickstoffatom jeweils eine

Chloräthylgruppe angeheftet ist (ARNOLD, 1967). Im Vergleich zu Cyclophosphamid war bei diesen Testsubstanzen zunächst nicht zu erwarten, daß diese bereits bei direktem Zusatz chromosomale Veränderungen an Leukocyten *in vitro* hervorrufen würden. Daß derartige konzentrationsabhängige Veränderungen bei der gewählten Versuchsanordnung dennoch nachgewiesen werden konnten, ließe sich am ehesten darauf zurückführen, daß im Gegensatz zu Endoxan® *in vitro* bereits eine Ringspaltung erfolgt. Diese Annahme ist um so wahrscheinlicher, als ARNOLD (1967) bereits zeigen konnte, daß die Einführung einer Chloräthylgruppe in das Endoxanmolekül an das cyclische Stickstoffatom unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse in ätherischer Lösung eine erhebliche Lockerung der Bindung zwischen Phosphor und Stickstoff verursacht. Es muß offenbleiben, ob sich derartige Spaltprodukte in dem von uns benutzten und anderen *In vitro*-Systemen nachweisen lassen werden. Zu diskutieren wäre darüber hinaus die Möglichkeit, daß die beiden Testsubstanzen auch ohne vorherige Ringspaltung Chromosomenmutationen auslösen. Allerdings fand BROCK (1967), daß beide Verbindungen unter *In vitro*-Bedingungen zytostatisch weitgehend inaktiv blieben. Ähnlich wie bei anderen, früher unter gleichen Versuchsbedingungen getesteten Cytostatika erwiesen sich auch hier die Dosis-Wirkungs-Beziehungen bei der Analyse des Prozentsatzes der von chromosomalen Schäden betroffenen Metaphasen und der mittleren Bruchfrequenz pro Metaphase (Abb. 3 u. 4). Die davon abweichenden Kurvenverläufe der *in vivo* zu erwartenden Metabolite von N,N,N'-Tris-(2-chloräthyl)-N',O-propylen-phosphorsäureester-diamid sind offenbar als Ausdruck von Aktivierungs- und Zerfallsvorgängen aufzufassen, wie sie analog zu den bei Cyclophosphamid eingehender untersuchten bekannt sind. Das zur Stabilisierung der geprüften Substanzen und als Lösungsvermittler notwendige Oximazon allein induzierte keine über das Ausmaß der unbehandelten Kulturen hinausgehende Chromosomenaberrationen, wie aus der Zusammenstellung in Tabelle 3 zu entnehmen ist.

Literatur

- ARNOLD, H.: Über die Chemie neuer zytostatisch wirksamer N-Chloräthyl-phosphorsäure-esterdiamide. Verh. V. intern. Kongr. Chemother. Wien, Bd. II, 751—757 (1967).
- , u. F. BOURSEAUX: Synthese des N,N-Bis-(2-chloräthyl)-O-(3-amino-propyl)-phosphorsäureamidoesters. Arzneimittel-Forsch. **13**, 927—928 (1963).
- 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**, 545—549 (1962).
- BERTRAM, C., u. G. HÖHNE: Über die radiomimetische Wirkung einiger Zytostatika im Mutationsversuch an *Drosophila*. Strahlentherapie **43**, 388—391 (1959).
- BROCK, N.: Zur pharmakologischen Charakterisierung zyklischer N-Lost-Phosphamidester als Krebschemotherapeutica. Arzneimittel-Forsch. **8**, 1—9 (1958).
- Pharmakologische Untersuchungen mit neuen N-Chloräthyl-phosphorsäureester-diamiden. Verh. V. intern. Kongr. Chemother. Wien, Bd. II, 155—161 (1967).
- , u. H.-J. HOHORST: Über die Aktivierung von Cyclophosphamid *in vivo* und *in vitro*. Arzneimittel-Forsch. **13**, 1021—1031 (1963).
- CASTOLDI, G. L., et P. MALACARNE: Aspects cytochimiques et cytogénétiques du gigantisme cellulaire provoqué par les antimétabolites. Nouv. Rev. franç. Hémat. **4**, 395—408 (1964).
- CONSTANTINESCU, D. G., M. RETEZEANU, R. OTELEANU u. M. CONSTANTINESCU: Eine phyto-biologische Methode zur Testung der zytostatischen Wirkung von N,N-Bis-(2-chloräthyl)-N',O-propylenphosphorsäureester-diamid. Arzneimittel-Forsch. **15**, 1184—1186 (1965).
- HAMPEL, K. E.: Über die Wirkung von Zytostatika auf die Chromosomen des Menschen. Habilitationsschrift, Berlin 1967.

- HAMPPEL, K., B. KOBER, D. RÖSCH, H. GERHARTZ, and K. H. MEINIG: The action of cytostatic agents on the chromosomes of human leukocytes in vitro (preliminary communication). *Blood* **27**, 816—823 (1966).
- HOHORST, H.-J., A. ZIEMANN u. N. BROCK: Alkylierende Substanzen im Serum und Urin nach Injektion von Cyclophosphamid. *Arzneimittel-Forsch.* **15**, 432—434 (1965).
- — — Herkunft und Spiegel von N,N-Bis-(2-chloräthyl)-amin im Serum nach Injektion von N,N-Bis-(2-chloräthyl)-N',O-propylenphosphorsäureester-diamid. *Arzneimittel-Forsch.* **16**, 1529—1533 (1966).
- KOVACS, E. T., S. OHNO, and R. KINOSITA: Studies on cyclophosphamide, antitumor alkylating compound. I. Effects on mouse leukemias. *J. nat. Cancer Inst.* **24**, 759—766 (1960).
- MICHAELIS, A., u. R. RIEGER: Die Induktion von Chromosomenaberrationen durch Mitomen® und Endoxan® bei *Vicia faba* und der Transportform-Wirkform-Mechanismus. *Biol. Zbl.* **80**, 301—317 (1961).
- MOORHEAD, P. S., P. C. NOWELL, W. J. MELLMAN, D. M. BATTIPS, and D. A. HUNGERFORD: Chromosome preparations of leukocytes cultered from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* **20**, 613—616 (1960).
- SCHMÄHL, D., u. H. DRUCKREY: Beiträge zum Wirkungsmechanismus von N-Oxyd-Lost. *Naturwissenschaften* **43**, 199 (1956).
- VOGEL, F., and M. VRBA: Influence of chloramphenicol on the reunion frequency of cytoxan-induced chromosome breaks in HeLa cells. *Mutat. Res.* **4**, 874—875 (1967).
- VRBA, M.: Wirkung von Endoxan auf die Chromosomen von HeLa-Zellen. *Humangenetik* **4**, 362—370 (1967).

Priv.-Doz. Dr. K. E. HAMPPEL
Cytogenetisches Labor
I. Medizinische Klinik
der Freien Universität Berlin
1000 Berlin 19, Spandauer Damm 130