

Quantitative Untersuchungen über Chromosomenmutationen bei menschlichen Leukocyten durch Cyclophosphamid nach Aktivierung an Leberschnitten

KLAUS ERICH HAMPEL, MICHAEL FRITZSCHE und DIETER STOPIK

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

Eingegangen am 8. Juli 1968

Quantitative Analysis of Chromosome Mutations in Human Leukocytes Induced by Cyclophosphamide after Activation by Liver Slices

Summary. Comparable results of chromosomal damage were obtained in human leukocyte cultures by cyclophosphamide after its incubation with liver slices in Warburg vessels. The dose-rate-effects of the activation products and the distribution of 1000 breaks in different chromosome segments were similar to other cyclophosphamide derivatives already analysed. The nonrandom distribution of breaks was statistically significant.

Einleitung

Die Mutagenität von Cyclophosphamid-Folgeprodukten wurde wiederholt durch cytologische und genetische Methoden an verschiedenen Testobjekten nachgewiesen. Die an anderer Stelle (BRITTINGER; HAMPEL, STOPIK u. FRITZSCHE) eingehender referierten Arbeiten sollen daher, soweit sie zugänglich waren, in der Tabelle 1 zusammengefaßt werden.

Trotz der bereits vorliegenden umfangreichen Untersuchungen erschien es angebracht, die Dosis-Wirkungs-Beziehungen und die Bruchverteilung an menschlichen Leukocytenchromosomen nach Einwirkung von Cyclophosphamid-Folgeprodukten näher zu analysieren.

Material und Methode

Die Aktivierung von Cyclophosphamid (N,N-Bis-(2-choräthyl)-N', O-propylen-phosphorsäureester-diamid, Endoxan®, Cytosan®) erfolgte an Leberschnitten der Ratte (Wistar, Inzuchtstamm, konventionelle Aufzucht, 180—250 g, männlich, Altromin-Mischfutter, Macrolon-Käfige, 22°C, 50% Luftfeuchtigkeit) im Warburg-Apparat im wesentlichen nach der von BROCK u. HOHORST angegebenen Methode und unter sterilen Bedingungen. In den Hauptraum der Warburg-Gefäße mit 2,5 ml Ringer-Locke-Lösung (Zusammensetzung: NaCl 1,24 $\times 10^{-1}$ M, KCl 2,58 $\times 10^{-3}$ M, CaCl₂ 1,84 $\times 10^{-3}$ M, NaHCO₃ 2,58 $\times 10^{-2}$ M, Glucose 1,11 $\times 10^{-1}$ M) wurden 100—600 mg Leber (Frischgewicht) bei einer Schnittdicke von etwa 0,5—1 mm und in den Seitenraum 0,7—70 mg Cyclophosphamid eingewogen. Bei Inkubationsbeginn (37°C) wurden die Gefäße der jeweiligen Versuchsreihe zunächst 10 min mit einem Gasgemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂ durchströmt und danach geschlossen. Nach einer Vorinkubation von 40 min wurde das Cyclophosphamid in den Hauptraum einbezogen. Nach weiteren 60 min wurde die Inkubation abgebrochen und die Suspensionsflüssigkeit 10 min bei 4000 UpM zentrifugiert. Von dem Überstand wurden jeweils 0,5 ml abgehoben und serienmäßig angesetzten Leukocytenkulturen (Volumen = 5 ml) 24 Std, bei einzelnen Versuchen

Tabelle 1
Einige Mutagenitätsprüfungen von Cyclophosphamid und dessen Aktivierungsprodukten

1959 BERTRAM u. HÖHNE	Dros.	recessiv geschlechtsgeb. Letalmutationen
1960 FRYE	Dros.	recessiv geschlechtsgeb. Letalmutationen
1960 KOVACS, OHNO, and KINOSITA	Maus, Leukämie L 4946	Chromosomenmutationen
1961 MICHAELIS u. RIEGER	Vicia f.	Chromosomenmutationen
1962 ARRIGHI, HSU, and BERGSAGEL	Maus, Lettré-Ascites-T. Knochenmark	Chromosomenmutationen
	Mensch, Leukocyten in vivo-Applikation	Chromosomenmutationen (?)
1964 CASTOLDI et MALACARNE	Maus, Knochenmark	Chromosomenmutationen
1965 CONSTANTINESCU, RETEZEANU, OTELEANU u. CONSTANTINESCU	Weizenwurzel-Meristem	Chomosomenmutationen bei Koffeinzusatz
1965 RÖHRBORN	Dros.	recessiv geschlechtsgeb. Letalmutationen, Stadiensensibilität der Spermatogenese
1966 BRITTINGER	Maus, Schädigung der Spermatogenese	dominante Letalmutationen
1966 HAMPEL, KOBER, RÖSCH, GERHARTZ, and MEINIG	Mensch, Leukocyten, in vitro-Applikation, aktiviertes Cyclophosphamid	Chromosomenmutationen
1966 SCHLEIERMACHER	Maus, Meiose	Chromosomenmutationen
1967 VOGEL und VRBA	He-La-Zellen, aktiviertes Cyclophosphamid	Chromosomenmutationen — Einfluß von Chloramphenikol auf die Reunionshäufigkeit
1967 VRBA	He-La-Zellen, aktiviertes Cyclophosphamid	Chromosomenmutationen

auch 12 und 48 Std vor deren Abbruch zugegeben. Der Ansatz und die Bearbeitung der Kulturen erfolgte nach der von MOORHEAD u. Mitarb. angegebenen und geringfügig modifizierten Methode. Als Kontrollen dienten außer Kulturen ohne jeglichen Zusatz bei jeder Serie auch solche, die 0,5 ml/5 ml Suspensionsflüssigkeit aus einem Warburg-Ansatz mit 100, 200 oder 600 mg Gewebsschnitten jedoch ohne Cyclophosphamid erhielten. Die quantitative Bewertung der Chromosomenveränderungen erfolgte nach bereits früher angegebenen Richtlinien (HAMPEL). Bei Versuchen mit zeitlicher Variation des Zusatzes von Cyclophosphamid-Folgeprodukten wurden zusätzlich auch achromatische Läsionen (gaps) bewertet. Als Ausgangsmaterial für die Bruchlokalisierung dienten nur Kulturen, die 24 Std vor Abbruch aktiviertes Cyclophosphamid erhielten. Das Vorgehen bei der Bruchlokalisierung wurde bereits an anderer Stelle geschildert (STOPIK u. HAMPEL). Zur Berechnung der Längenrelationen der einzelnen Chromatidsegmente wurden die von LEVAN u. NICHOLS mitgeteilten Meßdaten herangezogen, wobei die Gesamtlänge der Chromosomen einer Metaphase des Mannes auf 1000 Längeneinheiten festgesetzt wurde.

Tabelle 2. *Dosisabhängigkeit chromosomaler Aberrationen nach Zusatz von Cyclophosphamid-Folgeprodukten zu menschlichen Leukocyten in vitro (einstündige Inkubation im Warburg-Ansatz, 100 mg Rattenleber, 2,5 ml Ringer-Locke-Lösung)*

	Kontrollkulturen unbehandelt								mit 0,5 ml Leberinkubat (100—200 mg) mg Cyclophosphamid (initiale Gesamtdosis im Warburg-Ansatz) mg/ml Kulturmedium										
	(0,7)		0,028		(7)		0,28		(21)		0,84		(35)		1,4		(70)		2,8
Chromatidbrüche	—	—	1	1	1	—	—	1	—	1	17	21	39	51	70	38	49	64	
Isochromatidbrüche	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	1	10	5	10	2	10	8	
Bruchfrequenz	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	2	20	10	20	4	20	16	
Fragmente einzelne	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2	2	1	2	3	
gedoppelte	—	—	—	1	1	—	1	—	1	2	14	14	54	38	35	30	22	45	
Bruchfrequenz	—	—	—	2	2	—	2	—	2	4	28	28	108	76	70	60	44	90	
Reunionsfiguren	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	10	12	7	2	9	19	
Bruchfrequenz ca.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	22	24	14	4	18	57	
Dizentrische Chromosomen	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	—	1	—	—	1	
Bruchfrequenz	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	4	—	—	4	—	—	4	
Ringchromosomen	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	2	—	—	2	1	
Bruchfrequenz ca.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	8	—	—	8	4	
Nicht klassifizierb. Aberr.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	13	1	4	1	5	9
Bruchfrequenz ca.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	13	1	4	1	5	9
Mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase	0	0	0,01	0,03	0,03	0	0,02	0,01	0,02	0,05	0,27	0,30	1,04	0,86	0,92	1,17	1,46	2,47	
% Metaphasen mit Aberr.	0	0	1	2	2	0	1	1	1	3	16	18	37	39	42	47	55	64	
Zahl der bewerteten Metaphysen	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	200	200	200	200	200	93	100	100	

Ergebnisse

1. Dosis-Wirkungs-Beziehungen

Bei der benutzten Versuchsanordnung boten sich zwei Möglichkeiten der Dosisvariation bei sonst möglichst gleichbleibenden Bedingungen an:

a) Variation der initialen Cyclophosphamidkonzentration bei konstantem Lebergewicht,

b) Variation des Lebergewichts bei konstanter initialer Cyclophosphamidkonzentration im Warburg-Ansatz.

1 a) Die bei Variation der Initialdosis von Endoxan beobachteten Chromosomenaberrationen wurden in Tabelle 2 zusammengestellt. Die häufigsten Aberrationstypen waren Chromatidbrüche und azentrische Fragmente. Seltener traten Translokationsfiguren, Isochromatidbrüche, dizentrische — und Ringchromosomen auf. Wie aus dem semilogarithmischen Bezugssystem der Abb. 1 a hervorgeht, stieg der

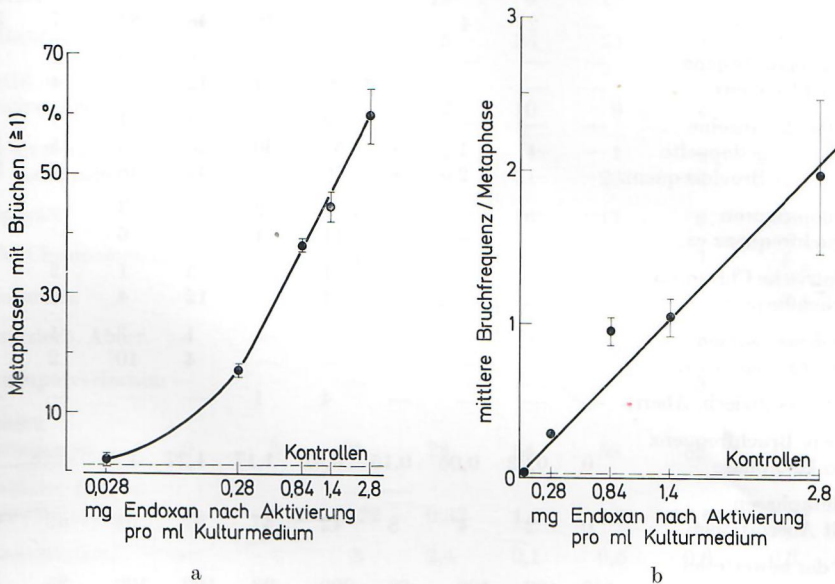


Abb. 1 a u. b. Dosisabhängigkeit der Chromosomenaberrationen nach aktiviertem Cyclophosphamid bei menschlichen Leukozyten in vitro

Prozentsatz der von Chromosomenmutationen betroffenen Metaphasen annähernd exponentiell in einem Konzentrationsbereich der Cyclophosphamid-Folgeprodukte an, der einer initialen Endoxankonzentration im Warburg-Ansatz von 7—70 mg/2,5 ml Suspensionsflüssigkeit, d. h. einem Bereich von 0,28—2,8 mg Cyclophosphamid (vor dessen Aktivierung) pro Milliliter Kulturmedium entspricht. Die mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase hingegen stieg annähernd linear, wie die Abb. 1 b erkennen läßt. Vergleicht man die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollkulturen mit denen der Kulturen, die 0,5 ml/5 ml Suspensionsflüssigkeit aus Warburg-Ansätzen mit 100 bzw. 200 mg Lebergewebe jedoch ohne Endoxanzusatz erhielten, sind Unterschiede nicht erkennbar. Die Suspensionsflüssigkeit

der Leberschnitte führte bei dem eingesetzten Gewicht nach Inkubation offenbar nicht zu einer Erhöhung der spontanen Bruchrate.

1 b) Die Ergebnisse einer Variation des Lebergewichts bei konstanter initialer Endoxankonzentration im Warburg-Ansatz wurden in Tabelle 3 zusammengestellt. Das Ausmaß der chromosomalen Schädigung durch aktiviertes Cyclophosphamid

Tabelle 3. *Abhängigkeit der chromosomalen Aberrationen menschlicher Leukocyten in vitro vom eingesetzten Lebergewicht bei konstanter Cyclophosphamidkonzentration im Warburg-Ansatz (einstündige Inkubation, 35 mg initiale Cyclophosphamiddosis pro 2,5 ml Ringer-Locke-Lösung, entsprechend 1,4 mg/ml Kulturmedium)*

	Kontrollkulturen				mg Rattenleber					
	un- behandelt		mit 0,5 ml Leber- inkubat, 600 mg		100	200	600			
Chromatidbrüche	—	2	4	2	70	38	48	82	7	20
Isochromatidbrüche	—	—	—	—	10	2	6	16	2	2
Bruchfrequenz	—	—	—	—	20	4	12	32	4	4
Fragmente einzelne	—	—	—	—	2	1	1	1	1	1
gedoppelte	—	—	1	4	35	30	23	23	5	18
Bruchfrequenz	—	—	2	8	70	60	46	46	10	36
Reunionsfiguren	—	—	—	—	7	2	2	3	—	1
Bruchfrequenz ca.	—	—	—	—	14	4	4	6	—	2
Dizentrische Chromosomen	—	—	—	—	1	—	3	1	2	1
Bruchfrequenz	—	—	—	—	4	—	12	4	8	4
Ringchromosomen	—	—	—	—	—	—	1	3	1	1
Bruchfrequenz ca.	—	—	—	—	—	—	4	10	2	4
Nicht klassifizierb. Aberr.	—	—	—	—	4	1	—	—	—	—
Mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase	0	0,02	0,06	0,15	0,92	1,17	1,27	1,81	1,28	1,36
% Metaphasen mit Aberrationen	0	2	4	8	42	47	57	61	52	62
Zahl der bewerteten Metaphasen	100	100	100	68	200	93	100	100	25	52

nahm bei einer Steigerung der Lebermenge von 100 auf 200 mg noch deutlich zu. So stieg der Mittelwert der mittleren Bruchfrequenzen pro Metaphase von 1,05 auf 1,54, der Mittelwert der Metaphasen mit Chromosomenaberrationen von 45 auf 59%. Die Erhöhung des Lebergewichts auf 600 mg führte bei annähernd konstanter Schichtdicke der Scheiben nicht zu einer weiteren Zunahme der Chromosomenmutationen in der Leukocytenkultur. Bei dieser höchsten Gewebsmenge waren die Metaphasenindices der Kulturen aber deutlich erniedrigt, gleichgültig ob diese zusätzlich aktiviertes Cyclophosphamid erhielten oder nicht. Auch war nicht auszuschließen, daß eine Lebermenge von 600 mg die Suspensionsflüssigkeit nach Inkubation ohne Cyclophosphamid derart veränderte, daß bereits dadurch die spontane Bruchfrequenz in den Leukocytenkulturen geringfügig gesteigert wurde.

2. Zeitvariation

Bei konstant gehaltener Lebermenge und initialer Cyclophosphamidkonzentration wurde der Zeitpunkt des Zusatzes der Inkubationslösung zu den Leukocytenkulturen variiert. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse nach Zugabe des aktivierten Endoxans 12, 24 und 48 Std vor Abbruch der Kulturen enthalten. Das Ausmaß der chromosomalen Veränderungen in den 24-Std- und 48-Std-Kulturen

Tabelle 4. *Abhängigkeit der chromosomalen Aberrationen menschlicher Leukocyten in vitro vom Zeitpunkt des Zusatzes der Cyclophosphamid-Folgeprodukte (Cyclophosphamid Initialdosis 70 mg/2,5 ml Ringer-Locke-Lösung, 100 mg Leber im Warburg-Ansatz)*

	Kontrollen unbehandelt		Zeitpunkt des Zusatzes in Stunden vor Abbruch der Kulturen					
			12	12	24	24	48	48
Achromatische Läsionen	—	—	9	12	4	11	5	7
Chromatidbrüche	—	1	3	5	35	24	8	23
Isochromatid- und Chromosomenbrüche	—	—	1	2	10	9	4	12
Fragmente einzelne	—	—	1	2	4	1	1	2
gedoppelte	—	1	7	9	31	26	16	19
Reunionsfiguren	—	—	—	1	16	11	8	14
Dizentrische Chromosomen	—	—	1	—	3	2	3	4
Ringchromosomen	—	—	—	2	2	5	—	5
Nicht klassifizierb. Aberr.	—	—	—	—	15	1	2	16
Chromosomenpulverisation	—	—	—	—	—	—	3	—
% Metaphasen mit Aberrationen	0	2	21	28	54	52	52	43
Mittlere Zahl der Aberra- tionstypen/Metaphase	—	0,02	0,22	0,33	1,2	0,9	>0,87	1,02
gaps/Chromatidbrüche	—	—	3	2,4	0,1	0,5	0,6	0,3
Zahl der bewerteten Metaphasen	100	100	100	100	100	100	54	100

zeigte keine sichtbaren Unterschiede. Dagegen waren bei einem Zusatz 12 Std vor Abbruch der Prozentsatz der von Strukturanomalien betroffenen Metaphasen um etwa 50%, die mittlere Frequenz der Aberrationstypen pro Metaphase um etwa 75% niedriger. Während sich bei der Verteilung der Aberrationstypen bei den 24-Std- und 48-Std-Kulturen schon wegen des geringen Stichprobenumfangs keine nennenwerten Unterschiede erkennen ließen, waren achromatische Läsionen (gaps) bei 12-Std-Kulturen relativ häufiger.

So war der Quotient aus achromatischen Läsionen/Brüchen mit 2,4—3,0 bei den 12-Std-Kulturen deutlich höher als bei den 24-Std- und 48-Std-Kulturen (Quotient zwischen 0,1 und 0,6).

Tabelle 5. Verteilung der durch Cyclophosphamid-Folgeprodukte induzierten Chromatidbrüche

Chromosomensegmente			Relative Länge = erwartete Bruch- frequenz bei gleich- mäßiger Verteilung (E)	Beobachtete Bruchfrequenz (B)	B/E	χ^2
1	l	d	15,25	44	2,88	54,30
		i	15,25	27	1,77	9,05
		p	15,25	15	0,99	0,004
	k	d	13,84	10	0,72	1,06
		i	13,84	9	0,65	1,69
2	l	p	13,84	10	0,72	1,06
		d	16,57	45	2,71	48,77
		i	16,57	28	1,68	7,88
	k	p	16,57	7	0,42	5,52
		d	10,64	10	0,93	0,03
3	±	i	10,64	5	0,46	2,98
		p	10,64	12	1,13	0,17
		d	23,20	21	0,90	0,21
	k	i	23,20	8	0,34	9,95
		p	23,20	6	0,25	12,75
4—5	l	d	23,20	6	0,25	12,75
		i	28,80	42	1,45	6,05
		p	28,80	45	1,56	9,11
	k	d	28,80	10	0,34	12,27
		i	11,69	23	1,96	10,94
6—12, X	l	p	11,69	15	1,28	0,93
		d	11,69	3	0,25	6,45
		i	80,46	209	2,59	205,35
	k	i	80,46	82	1,01	0,03
		p	80,46	29	0,36	32,91
13—15	l	d	40,39	57	1,41	6,83
		i	40,39	35	0,86	0,72
		p	40,39	12	0,29	19,95
	k	d	29,49	57	1,93	25,66
		i	29,49	26	0,88	0,41
16	l	p	29,49	14	0,47	8,13
		d	13,18	—	—	13,18
		i	6,19	12	1,93	5,45
	k	i	6,19	10	1,61	2,34
		p	6,19	2	0,32	2,83
17—18	l	d	12,36	6	0,48	3,27
		i	13,81	24	1,73	7,51
		p	13,81	3	0,22	8,46
	k	i	13,81	3	0,22	8,46
		p	14,90	—	—	14,90
19—20	±		45,66	9	0,19	29,43
21—22, Y	l	k	34,14	15	0,43	10,73
		k	8,77	—	—	8,77
			1000,00	1000		$\Sigma\chi^2=616,494$
						FG=41
						P < 0,0001

l = langer Arm, k = kurzer Arm, d = distales Segment, i = intermediäres Segment, p = proximales Segment.

3. Bruchverteilung

Die Verteilung von 1000 Chromatidbrüchen in den verschiedenen Chromosomensegmenten nach Einwirkung von aktiviertem Cyclophosphamid ist in Tabelle 5 dargestellt. Unter der Voraussetzung, daß die Gesamtlänge aller Chromosomensegmente, wie geschehen, auf den Wert von 1000 Einheiten festgesetzt wird und der Stichprobenumfang (beobachtete Brüche) den gleichen Wert erreicht, ist die relative Länge eines gegebenen Segments gleich der darin enthaltenen Bruchzahl, wenn eine *gleichmäßige inter- und intrachromosomale Bruchverteilung* vorliegt. Die bei der Annahme einer derartigen Bruchverteilung erwartete Bruchzahl (E) der einzelnen Segmente wurde mit der nach aktiviertem Cyclophosphamid beobachteten (B) verglichen. Bei einem χ^2 -Wert von 616,494, F.G. = 41 ließ sich die Wahrscheinlichkeit (Nullhypothese) einer rein zufälligen Verteilung der beobachteten Brüche in den verschiedenen Chromosomensegmenten mit einer Wahrscheinlichkeit von $P < 0,01\%$ ablehnen. Besonders auffallende Abweichungen der beobachteten von den erwarteten Bruchzahlen ergaben sich bei folgenden Segmenten:

Überschuß: distale Segmente der langen Arme der Chromosomen Nr. 1, 2, 4—5, 6—12 und X, 13—15, 16, 17—18 sowie der kurzen Arme der Gruppe 4—5. Ferner intermediäres Segment der langen Arme der Gruppe 4—5.

Defizit: proximale Segmente der langen und kurzen Arme der Chromosomen Nr. 4—5, 6—12 und X.

Bei der interchromosomalen Bruchverteilung fiel das Defizit in den kleinen Chromosomen 19—22 und Y auf. Wo die Möglichkeit bestand, wurden in der Gruppe 21—22 und Y Brüche des Y-Chromosoms gesondert festgehalten. Sein Längenanteil beträgt 9,08 gegenüber 42,91 der Gesamtgruppe. Von 15 gefundenen Brüchen in dieser Gruppe mußten bei gleichmäßiger interchromosomaler Verteilung erwartungsgemäß 3,2 auf das Y-Chromosom entfallen, beobachtet wurden vier Brüche.

Diskussion

Die relativ geringe Streuung der Aberrationsausbeuten verschiedener Versuchsserien sprach für eine reproduzierbare Aktivierung von Cyclophosphamid im Warburg-Ansatz. Dadurch wurde die Aussage über Dosis-Wirkungs-Beziehungen und deren Vergleich mit anderen cytostatisch wirksamen Verbindungen ermöglicht. Die Dosis-Wirkungs-Beziehungen von Cyclophosphamid-Folgeprodukten waren bei der benutzten Versuchsanordnung ähnlich wie die bei direktem Zusatz von Triäthyleniminobenzoehinon — Trenimon[®], Triäthylenmelamin — TEM[®], Triäthylenthio-phosphoramid — Thio-tepa[®], A 2 — ringoffenes Analog des Cyclophosphamids sowie Z 4828 und Z 4942 — zwei N-substituierte Cyclophosphamid-abkömmlinge (HAMPEL; HAMPEL, STOPIK u. FRITZSCHE). Auch die intra- und interchromosomale Bruchverteilung nach Cyclophosphamid wie auch nach den oben erwähnten N-substituierten Cyclophosphamidabkömmlingen zeigte eine weitgehende Übereinstimmung. Bei einem χ^2 -Wert nach Z 4828 von 464,991 und von 486,879 nach Z 4942 (STOPIK u. HAMPEL) lag der entsprechende Wert nach Endoxanspaltprodukten bei 616,494. Danach dürfte die Wahrscheinlichkeit einer rein zufälligen Verteilung der Brüche nach aktiviertem Cyclophosphamid noch geringer sein als bei den bereits untersuchten Endoxananalogenen. Hierbei ist die hohe Zerfallsrate von Cyclophosphamid-Folgeprodukten in der Leukocytenkultur

zu berücksichtigen. Nach BROCK u. HOHORST (1964) beträgt die Anfangsgeschwindigkeit der Cyclophosphamidaktivierung durch Leberschnitte im Warburg-Ansatz $0,85 \text{ CE/min} \times \text{ml}$, die Zerfallsrate der cytostatisch aktiven Folgeprodukte bei einer Ausgangsaktivität von 32 CE/ml nach 30 min Inkubation jedoch $0,4 \text{ CE/min} \times \text{ml}$. Es kann daher angenommen werden, daß die cytostatische Aktivität der Folgeprodukte durch ihre hohe Zerfallsrate in der Leukocytenkultur rasch absinkt. Es ist vorstellbar, daß die Zeitspanne, in der eine gegebene Verbindung zur Alkylierung bzw. zur Induktion chromosomaler Aberrationen zur Verfügung steht, neben der Aberrationsausbeute auch die Bruchverteilung beeinflussen kann. Darüber hinaus wäre es denkbar, daß die Steigerung der Aktivierungsrate in dem benutzten System bei einer eingesetzten Gewebsmenge von $200 \text{ mg}/2,5 \text{ ml}$ Suspensionsflüssigkeit einen Grenzwert erreicht und möglicherweise sich anreichernde Produkte aus dem Leberstoffwechsel die Induktion chromosomaler Veränderungen beeinflussen. Um eine vergleichbare Auswertung der Kulturen mit zeitlich unterschiedlichem Zusatz von aktiviertem Endoxan zu ermöglichen, wurde nicht die mittlere Bruchfrequenz/Metaphase, sondern der Mittelwert der Aberrationstypen pro Metaphase angegeben, da bei Zusatz 48 Std vor Abbruch z. T. nicht zu entscheiden war, ob es sich bei den induzierten Veränderungen um Brüche auf chromosomaler oder chromatidaler Basis handelte.

Literatur

- ARRIGHI, F. E., T. C. HSU, and D. E. BERGSAGEL: Chromosome damage in murine and human cells following cytoxin therapy. *Tex. 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).
- BRITTINGER, D.: Die mutagene Wirkung von Endoxan bei der Maus. *Humangenetik* **3**, 156—165 (1966).
- BROCK, N., u. H.-J. HOHORST: Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vivo und in vitro. *Arzneimittel-Forsch.* **13**, 1021—1031 (1963).
- — Über die Aktivierung von Cyclophosphamid im Warmblüterorganismus. In: *Chemotherapie maligner Tumoren*, hrsg. von H. WILMANN, S. 41—52. Stuttgart: Schattauer 1964.
- CASTOLDI, G. L., et P. MALACARNE: Aspects cytochimiques et cytogénétiques du gigantisme cellulaire provoqué par les antimitotiques. *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-chloroethyl)-N', O-propylenphosphorsäureester-diamid. *Arzneimittel-Forsch.* **15**, 1184—1186 (1965).
- FRYE, S.: Tests of endoxan for mutagenicity in *Drosophila*. *Brit. Emp. Canc. Campaign*, 38th ann. Rep., 670 (1960).
- HAMPEL, K. E.: Über die Wirkung von Zytostatika auf die Chromosomen des Menschen. *Int. J. clin. Pharmacol.* **1**, 322—371 (1968).
- , 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).
- , D. STOPIK u. M. FRITZSCHE: Cytogenetische Untersuchungen mit zwei N-substituierten Endoxanabkömmlingen an menschlichen Leukocyten in vitro. I. Dosis-Wirkungs-Beziehungen. *Humangenetik* **5**, 321—334 (1968).
- 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).
- LEVAN, A., and W. W. NICHOLS: Human chromosome lengths for use in distribution studies. *Hereditas (Lund)* **51**, 378—380 (1964).

- 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 cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* **20**, 613—616 (1960).
- RÖHRBORN, G.: Über die mutagene Wirksamkeit von Pharmaka unter besonderer Berücksichtigung von Chloräthylaminderivaten. Habilitationsschrift, Heidelberg 1965.
- SCHLEIERMACHER, E.: Über den Einfluß von Trenimon und Endoxan auf die Meiose der männlichen Maus. II. Cytogenetische Befunde nach Behandlung mit Trenimon und Endoxan. *Humangenetik* **3**, 134—155 (1966).
- STOPIK, D., u. K. E. HAMPEL: Cytogenetische Untersuchungen mit zwei N-substituierten Endoxanabkömmlingen an menschlichen Leukocyten in vitro. II. Anaphase-Telophase-Aberrationen und Bruchlokalisation. *Humangenetik* **6**, 61—68 (1968).
- VOGEL, F., and M. VRBA: Influence of chloramphenicol on the reunion frequency of cytotoxin-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. HAMPEL
Cytogenetisches Labor
I. Medizinische Klinik
der Freien Universität Berlin
1000 Berlin 19, Spandauer Damm 130