

Verlängerte Überlebenszeit von Hauthomotransplantaten bei Mäusen durch ein Methylhydrazinderivat

Kürzlich wurde die Hemmwirkung der Methylhydrazine auf das Wachstum transplantabler Tiertumoren beschrieben¹. Weitere Untersuchungen mit dieser neuen Stoffklasse von Cytostatica zeigten, dass deren Vertreter 1-Methyl-2-*p*-(isopropylcarbamoyl)-benzyl-hydrazinhydrochlorid (Ro 4-6467/1)² auch die Immunreaktion gegen heterologe Tumortransplantate bei Ratten unterdrückte³. In ersten klinischen Anwendungen erwies sich Ro 4-6467/1 vor allem bei malignen Lymphomen als wirksam⁴. Der Stoff greift Zellen mit hoher Proliferationsrate an und bewirkt Lymphopenie und Involution anatomischer Strukturen des lymphatischen Systems. Er beeinträchtigt also Elemente, die eine Rolle bei der Immunreaktion gegen fremde Gewebe spielen. Die Frage war daher naheliegend, ob Methylhydrazine nicht auch die Transplantationsimmunität gegenüber Organtransplantaten hemmen würden. Bei letzteren ist allerdings die Barriere der genetischen Histokompatibilität schwerer zu durchbrechen als im Falle von Transplantaten neoplastischer Gewebe. Im folgenden wird gezeigt, dass Ro 4-6467/1 auch die Immunreaktion gegen Hauthomotransplantate deutlich beeinflusst.

Methode. Wir verwendeten 10-15 Wochen alte Mäuse aus Inzuchttümern in folgenden vier Empfänger-Spender-Kombinationen: $C_{57}Br\varphi \leftarrow C_3H\varphi$, $C-\varphi \leftarrow C_3H\varphi$, $CBA\delta \leftarrow A\delta$ und $CBA\delta \leftarrow C_3H\varphi$. Die Hauttransplantationen wurden als «fitted pinch grafts» nach der Methode von BILLINGHAM und MEDAWAR durchgeführt⁵. Die transplantierten runden Hautstücke hatten einen Durchmesser von ca. 7 mm. Die Abnahme der Verbände erfolgte am 8. Tag nach der Operation. In der Folge wurden die Transplantate täglich durch Inspektion beurteilt. Als Überlebenszeit werteten wir die Zeitspanne vom Transplantationstag bis zu jenem, an dem das transplantierte

Hautstück erstmals keine Zeichen überlebenden Epithels mehr aufwies.

Ro 4-6467/1 wurde in physiologischer NaCl-Lösung s.c. täglich außer an Sonntagen injiziert. Die Mäuse erhielten das Mittel in den Dosierungen von 100 und 300 mg/kg nach drei verschiedenen zeitlichen Dispositiven: (1) nur vor der Transplantation, (2) vor und nach der Transplantation und (3) nur nach der Transplantation. Die Vorbehandlung begann am 9. Tag vor der Transplantation; den nicht vorbehandelten Tieren wurde die Verbindung vom Tag nach der Transplantation an verabfolgt. Am Transplantationstag (Tag 0) behandelten wir nicht. Die Dosis von 100 mg/kg wurde täglich bis zum Abstossungstag injiziert; jene von 300 mg/kg führte zu Abmagerung der Mäuse und wurde deshalb ab Tag + 1 auf 100 mg/kg herabgesetzt. Die nicht vorbehandelten Tiere erhielten die höhere Dosis bis zum 17. bzw. 20. Tag.

Ergebnisse. Die Überlebenszeit von Hauthomotransplantaten konnte durch Ro 4-6467/1 deutlich verlängert werden. In der Tabelle sind die durchschnittlichen Überlebenszeiten für Gruppen verschieden behandelter Mäuse eingetragen.

Vorbehandlung mit 100 mg/kg (ab Tag -9) und Fortführung der Behandlung nach der Transplantation führte in den Kombinationen $C_{57}Br\varphi \leftarrow CBA\varphi$ und $C-\varphi \leftarrow C_3H\varphi$ zu Verlängerungen der mittleren Überlebenszeiten von 77 bzw. 62%. Wurde der Stoff in der gleichen Dosierung erst nach dem Transplantationstag gegeben, so lebten die Transplantate nur wenig länger als bei den unbehandelten Kontrollen. Die Vorbehandlung mit 300 mg/kg und die

¹ W. BOLLAG und E. GRUNBERG, Exper. 19, 130 (1963).

² Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel.

³ W. BOLLAG, Exper. 19, 304 (1963).

⁴ A. D'ALESSANDRI, H. J. KEEL, W. BOLLAG und G. MARTZ, Schweiz. med. Wschr. 93, 1018 (1963).

⁵ R. E. BILLINGHAM und P. B. MEDAWAR, J. exp. Biol. 28, 385 (1951).

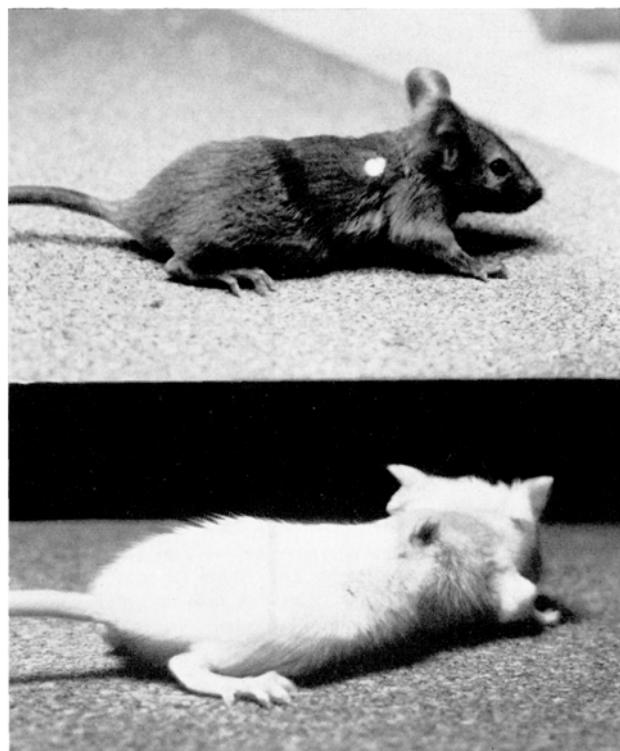
Überlebenszeiten der Hauthomotransplantate unter Behandlung mit Ro 4-6467/1. Die Bewertung erfolgte bis zum 45. Tag nach der Transplantation

Empfänger \leftarrow Spender	Anzahl Mäuse	Dosis Ro 4-6467/1	Mittlere Überlebenszeit der Transplantate (Tage)	Verlängerung in %	P	Überlebende Transplantate am Tag +15 bzw. +30
$C_{57}Br\varphi \leftarrow CBA\varphi$	11	Kontrollen ^a	9,8 (8-13) ^b	0		0/11
	11	100 mg/kg ab Tag -9	17,3 (12-29)	77	<0,01	6/11
	6	100 mg/kg ab Tag +1	10,7 (9-13)	9	n.s.	0/6
	7	300 mg/kg Tag -9 bis -1	17,6 (9-30)	79	<0,01	4/7
		100 mg/kg ab Tag +1				
	8	300 mg/kg Tag +1 bis +20	17,1 (9-27)	74	<0,01	5/8
	6	300 mg/kg Tag -9 bis -1	10,2 (8-11)	4	n.s.	0/6
$C-\varphi \leftarrow C_3H\varphi$	9	Kontrollen	9,4 (8-11)	0		0/9
	9	100 mg/kg ab Tag -9	15,2 (10-24)	62	<0,01	4/9
	4	100 mg/kg ab Tag +1	13 (10-15)	38	<0,05	0/4
	4	300 mg/kg Tag -9 bis -1	>19 (10->45)	>102	n.s.	1/4
		100 mg/kg Tag +1 bis +17				
	7	300 mg/kg ab Tag +1	13,8 (10-18)	47	<0,01	2/7
	6	300 mg/kg Tag -9 bis -1	9 (8-10)	-1	n.s.	0/6
$CBA\delta \leftarrow A\delta$	6	Kontrollen	9,5 (8-11)	0		0/6
	6	100 mg/kg ab Tag +1	10,2 (8-14)	7	n.s.	0/6
	6	300 mg/kg Tag -1 bis +17	>29,5 (16->45)	>210	<0,01	6/6
$CBA\delta \leftarrow C_3H\varphi$	5	Kontrollen	21,4 (13-32)	0		4/5
	6	100 mg/kg ab Tag +1	>31,7 (19->45)	>48	<0,05	6/6
	5	300 mg/kg Tag +1 bis +20	>45	>110	<0,01	5/5

^a Alle Kontrolltiere erhielten täglich 1 ml NaCl phys./100 g s.c. ab Tag -9 bzw. +1. ^b Extremwerte.

n.s. = Signifikanz für Unterschied nicht nachweisbar.

Weiterführung der Medikation mit 100 mg/kg ab Tag +1 wirkte bei der Hälfte der Tiere deutlich; möglicherweise verhinderte in den anderen Fällen die hochdosierte Vorbehandlung das primäre normale Einwachsen der Transplantate. Mit 300 mg/kg ab Tag +1 liess sich ein klarer Effekt erzielen. In der Kombination CBA♂ → A♂ verlängerte hierbei das Mittel die Überlebenszeit von 9,5 Tagen bei den Kontrollen auf über 29,5 Tage. Am 30. Tag, 13 Tage nach dem Absetzen des Stoffes waren 2 von 6 Transplantaten noch intakt (Figur). Auch in der genetisch allerdings nahe verwandten Kombination CBA♂ → C₅₇H♀ zeigten die Transplantate 45 Tage nach der Transplantation noch keine Zeichen der Abstossung, bei einer Überlebenszeit der Kontrolltransplantate von 21,4 Tagen. Wohl auch als Folge der cytotoxischen Eigenschaften der Methylhydrazine wiesen die genügend lange überlebenden Transplantate teilweise nur subnormalen Haarwuchs auf. Immerhin konnten sich selbst in der genetisch stark diskrepanten Paarung C-♀ (albino) → C₅₇H♀ (agouti) Büschel spender-spezifisch pigmentierter Haare ausbilden (Figur). Wurden die Mäuse nur vorbehandelt, so verlängerte dies die Überlebenszeit der Transplantate nicht.



Oben: CBA♂ → A♂, 300 mg/kg, Tag +1 bis +17; 30 Tage nach der Transplantation. Unten: C-♀ → C₅₇H♀, 300 mg/kg Tag -9 bis -1, 100 mg/kg Tag +1 bis +17; 25 Tage nach der Transplantation. Das C₅₇H-Hauttransplantat hat einen kräftigen Büschel dunkler Haare auf der Albino-Empfängermaus hervorgebracht.

PRO EXPERIMENTIS

Messung der Kapillarität in engsten Röhrchen¹

Wird ein enges, gleichmässiges, luftenthaltendes Glasröhren plötzlich senkrecht in Wasser eingetaucht, so beobachtet man ein Ansteigen der Flüssigkeit in demselben. Die Steiggeschwindigkeit dh/dt nimmt mit der Anstiegshöhe h ab und wird nach einer bestimmten Zeit

Diskussion. Applikation von Methylhydrazinderivat nach der Transplantation hatte einen dosisabhängigen Effekt: 100 mg/kg wirkten nur schwach, 300 mg/kg hatten eine beträchtliche Verlängerung der Überlebenszeit zur Folge. Vorbehandlung der Mäuse mit 100 mg/kg ab Tag -9 führte zu ähnlichen Verlängerungen wie Behandlung mit 300 mg/kg nur nach der Transplantation. Bei ausschliesslich vorbehandelten Tieren waren jedoch die Überlebenszeiten der Hauttransplantate nicht verlängert. Dies steht im Gegensatz zu Befunden mit heterologen Tumortransplantaten, deren Angehen durch alleinige Vorbehandlung mit niedrigeren Dosen des gleichen Stoffes ermöglicht wurde³. Dieser Unterschied kann als Ausdruck der geringeren Intensität oder auch einer qualitativen Verschiedenheit der Immunreaktion gegen Tumortransplantate gesehen werden. Die Lymphopenie und die Involution der lymphatischen Strukturen nach 8 mal 300 mg/kg genügen nicht, um zur Toleranz für Normaltransplantate zu führen. Die Annahme, dass lymphocytäre Elemente in der Frühphase der Homotransplantatreaktion eine wesentliche Rolle spielen, lässt sich durch diese Befunde nicht stützen. Die Abhängigkeit der Intensität der Immunreaktion vom Grad der genetischen Histokompatibilität zeigt sich in unseren Versuchen nur teilweise (zum Beispiel längere Überlebenszeit bei C₅₇Br♀ → CBA♀ als bei C-♀ → C₅₇H♀). In der Kombination zweier Stämme mit verschiedenen H₂-Histokompatibilitätsantigenen (CBA → A) konnten durch 300 mg/kg längere Überlebenszeiten bewirkt werden als in der am Gen des «starken» H₂-Locus nicht differierenden Kombination C₅₇Br → CBA.

Bei Mäusen ist die Hauthomotransplantatreaktion besonders resistent gegenüber pharmakologischer Beeinflussung. Corticosteroide sind hier nahezu wirkungslos und unter einer grösseren Anzahl geprüfter Cytostatica fanden wir einzig für Cyclophosphamid (Endoxan) in der hohen Dosierung von 40 mg/kg/Tag eine dem Ro 4-6467/1 vergleichbare Wirkung. Die Methylhydrazinderivate stellen daher eine willkommene neue Möglichkeit dar, die Immunreaktion gegen Organtransplantate und – wie anzunehmen ist – andere Formen zellulärer Immunität vom verzögerten Typ herabzusetzen.

Summary. Extended survival of skin homografts in mice was obtained by treatment with a methylhydrazine derivative (1-methyl-2-*p*-(isopropylcarbamoyl)-benzylhydrazine hydrochloride), representative of a new class of cytotoxic agents. Administration of 100 mg/kg prior to and continuously after the transplantation led to similar survival times as when 300 mg/kg was given daily only after the transplantation. In mice, the compound seems to be more effective than most of the drugs so far known to suppress transplantation immunity.

G. L. FLOERSHEIM

Pharmakologische Anstalt der Universität, Basel (Schweiz),
30. August 1963.

$t_m = 0$. Zu dieser Zeit ist Gleichgewicht zwischen der Kapillarität und dem Gewicht der bis h_m = der maximalen Anstiegshöhe aufgestiegenen Flüssigkeitssäule eingetreten. Ursache für diese Erscheinung ist die Oberflächenspannung, deren Auswirkung von der Form des Meniskus abhängt.

¹ Meinem Freunde A. v. MURALT zum 60. Geburtstag.