

The observations reported herein show a discrepancy between the acute effects of elevated blood pressure as produced by angiotensin II and epinephrine on the granularity of the juxtaglomerular apparatus and confirms the previously reported observations of KATZ et al.<sup>11</sup>. Although both compounds are vasoconstrictive agents<sup>8,10,16-18</sup> their effects on various vascular beds appear to differ inasmuch as angiotensin II has a preferential constrictor action on renal vessels which is not possessed equally by epinephrine. McQUEEN and MORRISON<sup>10</sup> have shown that angiotensin produces marked depression of glomerular filtration rate, whereas epinephrine causes no significant change in this parameter despite considerable reduction in renal plasma flow. On the other hand, ASSALI and WESTERSTEN<sup>12</sup>, HERRICK et al.<sup>8</sup> and DEL GRECO and PAGE<sup>15</sup> have reported that angiotensin also produces reduced renal blood flow in the dog. In view of TOBIAN's proposal that juxtaglomerular cell granularity is inversely proportional to the renal perfusion pressure it is possible that the changes observed in the JGI in the present study may be causally related to different hemodynamic responses of the renal vasculature to angiotensin II and epinephrine.

The contraction of interlobular and small arcuate arteries in rats infused with angiotensin correlates well with the findings of KATZ et al.<sup>11</sup>, but evidence of degenerative changes in the vessel walls was not observed. The changes which this substance produces in renal hemodynamics suggests that the pre-glomerular vascular contraction may reduce the pressure impinging on the juxtaglomerular cells, thereby providing the stimulus for granule accumulation. The hyperemia and congestion of glomerular capillaries, the dilatation of post-glomerular veins and pre-glomerular arteries and arterioles seen in the rats infused with epinephrine suggest that vaso-resistance may be post-glomerular, thereby elevating pre-glomerular arterial pressure and volume, this producing stretch which would then act as the stimulus for the slight fall in the JGI.

The rapidity of the change in juxtaglomerular cell granularity under the condition of angiotensin II infusion

in this experiment suggests also that a direct feedback mechanism may be involved, quite independent of hemodynamic effects. Elucidation of this possibility, however, must await further experimentation in which hemodynamic changes are controlled.

These findings show that, although both angiotensin II and epinephrine are highly active direct vasoconstrictors capable of maintaining elevated systolic blood pressure, they differ in their effects on individual vascular beds and juxtaglomerular cell granularity.

**Zusammenfassung.** In Ratten wurde durch Injektion von Angiotensin II und Epinephrin akuter systemischer Hochdruck erzeugt. Angiotensin II verursachte Kontraktion der kleinen Arterien mit Zylindern in distalen Abschnitten und Sammelröhrchen. Der Juxtaglomeruläre Index (JGI) war leicht erhöht ( $p < 0.02$ ). Epinephrin verursachte erhebliche Hyperämie und Dilatation der kleinen Arterien; der JGI war etwas erniedrigt ( $p < 0.1$ ). Die Ergebnisse zeigen, dass, obwohl Angiotensin II und Epinephrin hochaktive Vasokonstriktoren sind und auch erhöhten Blutdruck aufrechtzuerhalten vermögen, sie verschiedene Effekte auf individuelle Gefäßbereiche haben.

S. KAMURA, T. NIWA,  
F. R. SKELTON, and L. L. BERNARDIS

*Department of Pathology, State University of New York at Buffalo, Buffalo (New York, USA),  
March 28, 1966.*

<sup>15</sup> F. DEL GRECO and I. H. PAGE, *Circulation* 24, 917 (1961).

<sup>16</sup> M. J. MANDEL and L. A. SAPIRSTEIN, *Circulation Res.* 10, 807 (1962).

<sup>17</sup> B. G. ZIMMERMAN, F. M. ABBOD, and J. W. ECKSTEIN, *Am. J. Physiol.* 206, 701 (1964).

<sup>18</sup> J. C. ROSE, P. A. KOT, J. N. COHN, E. D. FREIS, and G. E. ECKERT, *Circulation* 25, 247 (1962).

## Über den zeitlichen Ablauf der Aktivierung von Cyclophosphamid im Menschen und die Testung der zytostatisch aktiven Form an Ehrlich-Mäuse-Aszites-Tumorzellen

Die Aktivierung von Cyclophosphamid im menschlichen Organismus ist unter den verschiedensten Gesichtspunkten erforscht worden. Untersuchungen der therapeutischen Eigenschaften des Cyclophosphamids unter Anwendung des Transportform-Wirkform-Prinzips stammen insbesondere von DRUCKREY et al.<sup>1</sup>.

Über die Biochemie der Cyclophosphamidaktivierung gibt es zahlreiche Publikationen mit zum Teil noch unterschiedlichen Meinungen. Nach Ansicht von ARNOLD<sup>2</sup> und BROCK et al.<sup>3</sup> ist die Aktivierung von Cyclophosphamid ein Oxydationsprozess, der an mikrosomale Enzymsysteme, vor allem der Leber, gebunden ist. Nach RAUEN et al.<sup>4,5</sup> sind N- $\beta$ -Chloräthylloxazolidon und N- $\beta$ -Chloräthylaziridin die Endprodukte der Aktivierung von Cyclophosphamid.

Mit dem Mechanismus der zytostatischen Wirkung von aktivem Cyclophosphamid beschäftigte sich HOLZER<sup>6</sup>,

der die Wirkung alkylierender Substanzen am Beispiel Trenimon an der Hemmung der Milchsäuregärung von Ehrlich-Mäuse-Aszites-Tumorzellen untersuchte. Nach LISS et al.<sup>7,8</sup> ist die Hemmung der Milchsäuregärung durch alkylierende Substanzen die Folge einer primären Schädigung der Nukleinsäuresynthese der Zellen.

Für die in vitro Testung der Sensibilität menschlicher Tumoren gegenüber Cyclophosphamid benötigen wir

<sup>1</sup> H. DRUCKREY, D. STEINHOFF, M. NAKAYAMA, R. PREUSSMANN und K. ANGER, *Chemotherapie maligner Tumoren* (Schattauer Verlag, Stuttgart 1964), p. 11.

<sup>2</sup> H. ARNOLD, *Chemotherapie maligner Tumoren* (Schattauer Verlag, Stuttgart 1964), p. 37.

<sup>3</sup> N. BROCK und H. J. HOHORST, *Arzneimittelforsch.* 13, 1021 (1963).

<sup>4</sup> H. M. RAUEN, A. REISCH und H. SCHRIEWER, *Arzneimittelforsch.* 14, 161 (1964).

<sup>5</sup> H. M. RAUEN und K. NORPOTH, *Naturwissenschaften* 52, 477 (1965).

<sup>6</sup> H. HOLZER, in *Chemotherapy of Cancer* (Ed. PL. H. PLATTNER; Elsevier IX Amsterdam 1964), p. 44.

<sup>7</sup> E. LISS und G. PALME, *Naturwissenschaften* 50, 672 (1963).

<sup>8</sup> E. LISS und G. PALME, *Z. f. Krebsforsch.* 66, 196 (1964).

menschliches Serum mit einer möglichst hohen zytostatischen Aktivität. Deshalb interessiert uns das Profil der zytostatischen Aktivität im menschlichen Serum nach einer Cyclophosphamidinjektion. Angaben dazu finden sich bei Brock et al.<sup>3</sup>; für unsere Problematik bedurfte es jedoch noch weiterer Kenntnisse.

Wir testeten deshalb die zytostatische Wirksamkeit von menschlichem Serum zu verschiedenen Zeiten nach einer Cyclophosphamidinjektion. Als Testsystem dienten uns in vitro-Kulturen von Ehrlich-Mäuse-Aszites-Tumorzellen, deren Vermehrung und Milchsäuregärung wir verfolgten. Es wurde die von NEGELEIN<sup>9</sup> vorgeschlagene manometrische Technik benutzt.

**Material und Methode.** Wachstum der EMAC-Zellen in vitro in einem teilsynthetischen Medium mit 20 Vol% menschlichem Serum: Die Versuche wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. In zylindrischen Manometriegefäßen befanden sich jeweils 12,5 ml eines modifizierten, bikarbonathaltigen Parker-Mediums (NEGELEIN<sup>9</sup>), welches 20 Vol% des zu testenden Serums enthielt. Gestartet wurden die Versuche mit etwa  $2 \cdot 10^6$  Asziteszellen pro Gefäß. Die Zellen wurden jeweils am 6. Tag nach der Beimpfung der Mäuse entnommen und mit isotoner NaCl-Lösung in geeigneter Weise verdünnt. Der Gasraum der Manometriegefäße enthielt eine Mischung von 1,5 Vol% Sauerstoff und 5 Vol% Kohlendioxyd in Stickstoff. Die Gefäße wurden im Wasserthermostaten bei 35°C langsam schaukelnd bewegt, die zeitliche Zunahme der Milchsäuregärung wurde am Manometer abgelesen. Bei Beginn und am Ende des Versuchs wurde die Zellmenge gezählt.

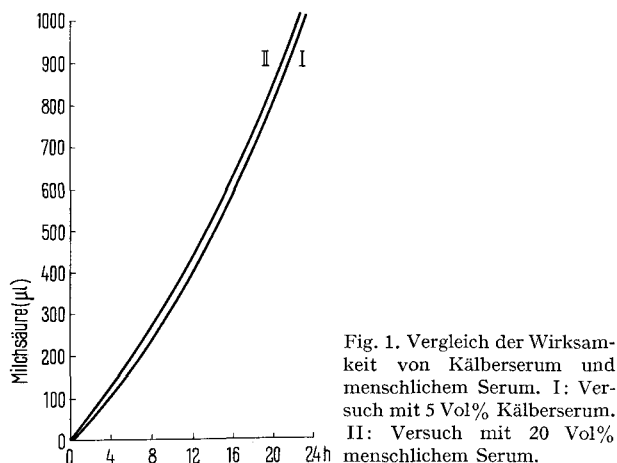
**Aufarbeitung der Blutproben:** Wir entnahmen Blutproben unter Zugabe von jeweils 2–3 Tropfen Heparin-Lösung (25 000 IE/ml) auf jeweils 10 ml Blut, welche unmittelbar nach der Entnahme zentrifugiert wurden. Das überstehende Blutplasma wurde 4 min bei 56°C inaktiviert und blieb anschliessend 1 h im Eisbad stehen. Dadurch wurde bei weitestgehender Schonung des aktiven Cyclophosphamids eine Ausfällung später störender Bluteiweisse erreicht. Die Proben wurden dann durch Zugabe von jeweils 9,6 ml Wasser zu 8,0 ml Serum verdünnt und zur Klärung 10 min hochtourig (15 000 U/min) zentrifugiert. Anschliessend wurde durch ein Bakterienfilter MG 5 sterilfiltriert. Das Verdünnen mit Wasser war zur Erleichterung der Filtration notwendig.

**Bestimmung der zytostatischen Aktivität:** Wir entnahmen jeweils zu den Zeiten 0, 15, 60, 120, 210 min nach intravenöser Injektion von 10 mg/kg Cyclophosphamid Blutproben, die nach dem obigen Modus aufgearbeitet wurden.

**Ergebnisse.** Zunächst verglichen wir Wachstum und Milchsäuregärung von EMAC-Zellen unter dem Einfluss von 20 Vol% normalem menschlichem Serum und den in üblicherweise benutzten 4 Vol% Kälberserum. Das Ergebnis ist in Figur 1 dargestellt. Die Zellvermehrung war in beiden Fällen etwa gleich gross. Im Versuch mit Kälberserum hatten sich die Zellen nach 23 h um 198% und im Versuch mit menschlichem Serum um 185% vermehrt. Wie aus der Abbildung zu ersehen ist, war die Milchsäuregärung im Versuch mit menschlichem Serum anfangs 13% grösser als im Versuch mit Kälberserum. Die absolute Zunahme der Milchsäuregärung war in beiden Versuchen gleich gross. Die relative Zunahme war mit menschlichem Serum etwas geringer als mit Kälberserum.

Nachdem sich gezeigt hatte, dass normales menschliches Serum nach der beschriebenen Vorbehandlung und Inaktivierung keinen zytostatischen Effekt ausübt, wurde die zytostatische Aktivität des Serums nach Cyclophosphamidgaben in Abhängigkeit von der Zeit post injectionem untersucht.

Das Ergebnis eines repräsentativen Versuches ist in Figur 2 dargestellt. Aus dieser geht hervor, dass nach intravenöser Gabe von Cyclophosphamid die zytostatische Aktivität im menschlichen Serum etwa 2 h nach der Injektion ihr Maximum erreichte, danach nahm die zytostatische Aktivität wieder ab. Ein ähnliches Bild zeigte der Verlauf der gebildeten Milchsäuremenge.



#### Zellvermehrung

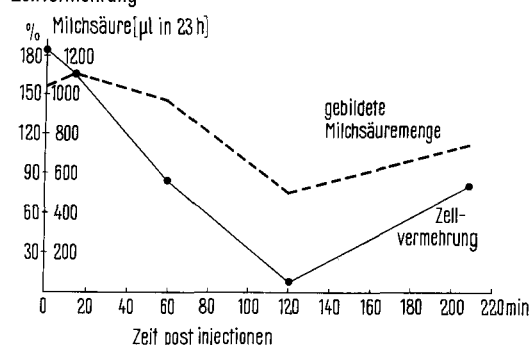


Fig. 2. Zytostatische Aktivität im menschlichen Serum nach intravenöser Gabe von Cyclophosphamid zu verschiedenen Zeiten post injectionem, gemessen an der Wirkung auf Ehrlich-Mäuse-Aszites-Tumorzellen.

**Summary.** The cytostatic action of human blood serum, following intravenous injection of cyclophosphamid, on cell proliferation and lactic production of Ehrlich mouse ascites tumour cells in vitro was tested. The maximum cytostatic activity was found 2 h after injection.

ST. TANNEBERGER und E. NEGELEIN

Institut für Krebsforschung, Abteilung Chemotherapie und Institut für Zellphysiologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, 1115 Berlin-Buch (DDR), 7. März 1966.

<sup>9</sup> E. NEGELEIN, I. LEISTNER und L. JÄHNICHEN, vorgetragen auf der Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Biochemie der DDR, Magdeburg 1965, Acta biol. med. germ., im Druck (1966).