

Beeinflussung des Generationszyklus und seiner Teilphasen bei Ehrlich-Aszitestumoren verschiedener Ploidie durch Cyclophosphamid

In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass zwischen dem diploiden (EAT dipl.) und hypertetraploiden Ehrlich-Aszitestumor (ELT) deutliche Unterschiede im Zellzyklus (Generationszeit und Teilphasen) bestehen¹. In den vorliegenden Untersuchungen wurde geprüft, wie sich die zytostatische Wirkung von Cyclophosphamid (Endoxan®) auf diese in ihrem Zellzyklus unterschiedlichen Tumorzellstämme auswirkt. Die Bestimmung des Zellzyklus erfolgte nach der Methode der markierten Mitosen (%-MM-Methode) nach QUASTLER und SHERMAN² sowie nach dem Doppelmarkierungsverfahren^{3,4}. Einzelheiten zur Methode siehe bei LENNARTZ, MAURER und EDER⁵.

Untersuchungsgut und Methodik. Zur Tumorerzeugung wurden männlichen NMRI-Mäusen (Institut für Versuchstierzucht, Hannover; Gewicht: ca. 25 g) jeweils 20×10^6 Tumorzellen i.p. appliziert. Cyclophosphamid (CPh) wurde einmalig i.p. verabreicht (100 mg/kg).

%-MM-Methode. 120 Mäuse erhielten 2 h nach CPh-Injektion einmalig Thymidin-Methyl-³H i.p. (50 μ Ci; 2,0 Ci/mmol; NEN Corp., USA). Die Thymidin-Injektion mit nachfolgender Tötung der Versuchstiere in gestaffelten Zeitintervallen entsprechend der %-MM-Methode erfolgte beim EAT dipl. am 4., beim ELT am 2. bzw. 4. Tag post inoc. Bestimmung des Prozentsatzes der markierten Mitosen bezogen auf alle Mitosen auf den von Aszitesausstrichen hergestellten Autoradiogrammen (K₂-Emulsion, Ilford, London).

Doppelmarkierungsverfahren. 10 EATdipl.-Tiere erhielten am 5., je 10 ELT-Tiere am 2. bzw. 5. Tag post inoc. 2 h nach CPh-Zufuhr eine erste i.p.-Injektion von Thymidin-2-¹⁴C (10 μ Ci; 25–30 mCi/mmol; NEN Corp., USA) und 1 h später eine zweite i.p.-Injektion von Thymidin) Methyl-³H (100 μ Ci; 2,0 Ci/mmol).

Bestimmung des Verhältnisses aller ¹⁴C-markierten Kerne (mit und ohne ³H-Markierung) zu den rein ³H-markierten Kernen sowie des ³H-Markierungs-Index (Prozentsatz aller ³H-markierten Zellen bezogen auf alle Zellen) auf den von Aszitesausstrichen hergestellten Autoradiogrammen (G₂-Emulsion, Ilford, London). Aus der Häufigkeit der verschiedenen markierten Kerne und dem ³H-Markierungs-Index wurde die DNS-Synthesezeit (S) und Generationszeit (T) berechnet, nachdem $G_2 + M$ (= prämitotische Ruhephase + Mitosedauer) durch die %-MM-Methode bestimmt worden war. Berechnungsmethode siehe bei LENNARTZ, MAURER und EDER⁵.

Ergebnisse. Die Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengefasst. Beim EATdipl. findet sich im Stadium des exponentiellen Wachstums (5. Tag) nach Verabreichung von CPh eine Verlängerung der DNS-Synthesezeit von 9 auf 22,5 h nach dem Doppelmarkierungsverfahren (DMV), von 11 auf 23,5 h nach der %-MM-Methode. Die verschiedenen Methoden lieferten somit gut übereinstimmende Werte. Die mittlere Zeitdauer für ($G_2 + M$) zeigt nach CPh ebenfalls eine Verlängerung, und zwar von 5 auf 12 h. Die Generationszeit dieses Tumorstammes wurde nach CPh-Behandlung von 24 auf 46 h verlängert.

Beim hypertetraploiden Ehrlich-Aszitestumor (ELT) findet sich nach CPh-Behandlung im frühen Stadium des exponentiellen Wachstums (2. Tag) nach dem Doppelmarkierungsverfahren eine Verlängerung der S-Phase von 19 auf 27 h; nach der %-MM-Methode ergibt sich nach CPh-Behandlung eine DNS-Synthesezeit von ca. 25 h. Die Untersuchung des ELT am 5. Tag post inoc. (nicht mehr streng exponentielles Wachstum) erbrachte nach dem Doppelmarkierungsverfahren zwischen dem unbehandelten Tumor (S = 19,5 h) und dem behandelten (S = 19,8 h)

keinen Unterschied in der Länge der DNS-Synthesezeit. Mit der %-MM-Methode wurde zu diesem Untersuchungszeitpunkt am ELT nach Behandlung mit CPh eine DNS-Synthesephase von 25 h ermittelt. Gegenüber der früher bestimmten DNS-Synthesezeit des unbehandelten Aszitestumors zum gleichen Untersuchungszeitpunkt weicht dieser Wert nur um 4 h ab. Während in der frühen exponentiellen Wachstumsphase (2. Tag) nach dem Doppelmarkierungsverfahren beim ELT eine Verlängerung der Generationszeit von 37,5 auf 52,5 h gefunden wurde, war dies zu einem späteren Untersuchungszeitpunkt (5. Tag) nicht mehr nachweisbar.

Soweit die Untersuchungsergebnisse anderer Autoren^{6,7} mit den eigenen Befunden vergleichbar sind, ergibt sich eine Übereinstimmung. Die eigenen Untersuchungsergebnisse zeigen aber, dass, wie aus der Tabelle hervorgeht, unabhängig von der in anderen unveröffentlichten Untersuchungen beim diploiden und tetraploiden Ehrlich-Aszitestumor festgestellten Wachstumshemmung beträchtliche Unterschiede in der Auswirkung der CPh-Behandlung auf die Proliferationskinetik von Tumorzellen in Abhängigkeit vom Tumorzellstamm bestehen⁸.

Zusammenstellung der für den diploiden (EAT_{dipl.}) und hypertetraploiden (ELT) Ehrlich-Aszitestumor erhaltenen Ergebnisse nach dem Doppelmarkierungsverfahren (DMV) und der Methode der markierten Mitosen (%-MM) nach Cyclophosphamid-Behandlung (CPh) und bei Kontrolltieren (K)

Tumorart		DNS-Synthesezeit (S) h		Generationszeit (T) h	
		DMV	%-MM	(T) h	($G_2 + M$) _m h
EAT diploid	CPh	22,5	23,5	45	12
5. Tag	K	9	11 ^a	24	5 ^a
ELT hypertetraploid	CPh	27	25	52,5	13
2. Tag	K	19	—	37,5	ca. 7
ELT hypertetraploid	CPh	19,8	25	41,5	12
5. Tag	K	19,5 ^a	21 ^a	41,2 ^a	7 ^a

($G_2 + M$)_m = mittlere Zeitdauer für prämitotische G_2 -Phase + Mitose.

^a Nach LENNARTZ, MAURER und EDER¹.

¹ K. J. LENNARTZ, W. MAURER und M. EDER, Z. Krebsforsch. 71, 267 (1968).

² H. QUASTLER und F. G. SHERMAN, Expl Cell Res. 17, 420 (1959).

³ W. HILSCHER und W. MAURER, Naturwissenschaften 49, 352 (1962).

⁴ D. E. WIMBER und H. QUASTLER, Expl Cell Res. 30, 8 (1963).

⁵ K. J. LENNARTZ, W. MAURER und M. EDER, Histochemie 13, 84 (1968).

⁶ G. PALME und E. LISS, Eur. J. Cancer 1, 245 (1965).

⁷ E. LISS, G. PALME und K. OEFF, 5th International Congr. of Chemother. Wien (26. Juni bis 1. Juli 1967). Proceedings vol. II/1, p. 183.

⁸ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Herrn Prof. Dr. L. RÉVÉSZ (Karolinska Institut Stockholm) danken wir für die Überlassung des ELT.

Summary. The effect of the alkylizing agent cyclophosphamide (100 mg/kg i.p.) on the cell cycle of the diploid (EAT dipl.) and hypertetraploid (ELT) Ehrlich ascites tumor growing in the peritoneal cavity of male NMRI-mice has been studied by autoradiography with H^3 - and C^{14} -thymidine (double labelling technique and method of labelled mitoses). The results suggest that the proliferation kinetics of tumor cells after administration

of cyclophosphamide is dependent essentially on the type of tumor strain tested.

K. J. LENNARTZ, K. D. SIEMONEIT,
K. U. BAHNTJE und M. EDER

*Pathologisches Institut der Universität Köln
(Deutschland), 11. Dezember 1968.*

Immunoglobulins in Human Fetal Sera at Different Stages of Gestation

The synthesis of IgM has been demonstrated in the human fetus on the twelfth week of gestation, and that of IgG somewhat later^{1,2}. Cells producing IgA have not been found prenatally, although at least one-third of neonates have this immunoglobulin in the serum^{3,4}. IgG in the fetal circulation is derived almost totally from the mother, and its level rises evenly towards birth⁵⁻⁸. The occurrence of IgD at birth is doubtful⁹. Information about IgM and IgA in the fetal serum at different stages of development is scanty and merely qualitative⁵; only VAN FURTH et al.¹ have reported IgM levels from 0.010 to 0.146 mg/ml in 11 out of 15 fetuses with a crown-heel length of 22.5–39.5 cm.

We have studied IgM, IgA, IgG and IgD in a group of fetal umbilical cord sera from different stages of gestation, in a group of cord sera from putatively healthy full-term new-borns taken at delivery, and in corresponding maternal sera taken on the same day as the fetal and neonatal samples. The fetal sera were from legal abortions and premature births without any evidence of infection. They were collected carefully avoiding contamination with the maternal blood. The sera were stored at -40°C until examined. The level of IgM, IgA and IgG was determined by radial immunodiffusion in agar¹⁰. Commercial specific antisera were used: rabbit anti-IgM and anti-IgG from Behringwerke AG (lot Nos. 1374 C and 1334 B) and goat anti-IgA from Hyland Laboratories (lot No. GP 9-65). Afterwards we became aware that these antisera might give some cross reactions; all results less than 0.1 mg/ml have been confirmed by the use of antisera prepared by us. Our antiserum to IgM has already been described¹¹, anti-IgA and anti-IgG were prepared by immunizing rabbits with the respective immunoglobulins. IgA was isolated from human colostrum by a combined procedure^{12,13}. IgG was purified by DEAE-cellulose chromatography of serum¹⁴. Anti-IgA was made monospecific by absorption with IgM and IgG, anti-IgG with IgM and IgA. The occurrence of IgD was examined by double diffusion in agar with rabbit anti-IgD from Behringwerke AG (lot No. 1310). Reference sera containing known amounts of IgM, IgA and IgG were supplied by Behringwerke AG and Hyland Laboratories. The variation coefficient for IgM quantitation was 15%, for IgA 18% and for IgG 8.3%, each calculated from 4–6 determinations of one fetal sample on different plates.

The results are shown in the Figures 1 and 2. The smallest fetus with determinable IgM was of a crown-heel length of 14.0 cm and weighed 75 g. Out of 26 fetuses below 25 cm, IgM was demonstrated in 13. It was always found in the fetuses greater than 25 cm (after the 20th week of gestation), and in the full-term new-borns. The neonatal level was 0.13 ± 0.14 mg/ml (mean $\pm$ S.D.) being one-eighth of the maternal concentration. A correlation between the fetal length and log IgM concentra-

tion could be observed ($r = 0.85$, $P < 10^{-6}$). IgA was demonstrated in the sera of 3 prematures; at the earliest in one of 41 cm and 1680 g. In the neonates it was found in 30 from 81 (37%). The neonatal mean value, including zeroes, was 0.02 ± 0.10 mg/ml. The maternal level was one hundred times greater. Concordant cord/maternal ratios and cord concentrations for IgM and IgA have been reported previously^{4,15}. Neither the neonatal IgM nor IgA value was dependent on the maternal one. No correlation could be observed between the levels of IgM and IgA in the neonates.

Linear correlation was established between the fetal length and log IgG concentration ($r = 0.81$, $P < 10^{-6}$). IgG was found in all sera studied. The neonatal mean 12.0 ± 4.3 mg/ml was significantly higher than that of their own mothers, 8.6 ± 3.2 mg/ml ($P < 0.01$ by Student's t -test). These observations are consistent with previous results based on electrophoretic^{5,6} and immunochemical^{16,17} IgG determinations as well as with the transfer from mother to fetus of specific viral and bacterial antibodies of IgG class¹⁸. Agreement was also found with the conclusion^{17,18} that maternal and neonatal antibody levels are not directly correlated.

¹ R. VAN FURTH, H. R. E. SCHUIT and W. HIJMAN, *J. exp. Med.* 122, 1173 (1965).

² D. BUFFE and P. BURTIN, *Annls Inst. Pasteur*, Paris 112, 468 (1967).

³ O. VIVELL, T. SICK and G. LIPS, *Klin. Wschr.* 38, 721 (1960).

⁴ E. R. STIEHM and H. H. FUDENBERG, *Pediatrics* 37, 715 (1966).

⁵ G. DE MURALT, *Helv. med. Acta* 29, suppl. 42 (1962).

⁶ H. E. SCHULTZE and J. F. HEREMANS, *Molecular Biology of Human Proteins with Special Reference to Plasma Proteins* (Elsevier, Amsterdam 1966), vol. 1.

⁷ J. R. HOBBS and J. A. DAVIS, *Lancet* 1, 757 (1967).

⁸ T. BERG, *Acta paediat. scand.* 57, 369 (1968).

⁹ D. S. ROWE, P. A. CRABBE and M. W. TURNER, *Clin. exp. Immunol.* 3, 477 (1968).

¹⁰ J. L. FAHEY and E. M. MCKELVEY, *J. Immunol.* 94, 84 (1965).

¹¹ P. TOIVANEN and T. HIRVONEN, *Scand. J. Haemat.* 6 (1969), in press.

¹² H. AXELSSON, B. G. JOHANSSON and L. RYMO, *Acta chem. scand.* 20, 2339 (1966).

¹³ J. P. VAERMAN and J. F. HEREMANS, in *Protides of the Biological Fluids*, Proceedings of the 15th Colloquium, Bruges, 1967 (Ed. H. PEETERS; Elsevier, Amsterdam 1968), p. 615.

¹⁴ J. L. FAHEY and E. W. TERRY, in *Handbook of Experimental Immunochimistry* (Ed. D. M. WEIR; Blackwell, Oxford 1967), p. 19.

¹⁵ S. G. O. JOHANSSON and T. BERG, *Acta paediat. scand.* 56, 572 (1967).

¹⁶ P. F. KOHLER and R. S. FARR, *Nature* 210, 1070 (1966).

¹⁷ J. L. MICHAUX, J. F. HEREMANS and W. H. HITZIG, *Trop. geogr. Med.* 18, 10 (1966).

¹⁸ P. TOIVANEN, R. MÄNTYJÄRVI and T. HIRVONEN, *Immunology* 15, 395 (1968).