

Ber. nat.-med. Ver. Innsbruck	Band 57 Festschr. Scheminzky	S. 147 -- 152	Innsbruck, Dez. 1969
-------------------------------	---------------------------------	---------------	----------------------

## Dreißig Jahre Colchicinforschung

von

Walter FLEISCHMANN

und

Susanne Kann FLEISCHMANN

### Thirty Years of Research on Colchicine

**Synopsis:** The investigations of the alkaloid colchicine by the authors and their associates are reviewed. The following hormone induced growth phenomena were studied with the help of colchicine because this drug arrests mitosis in methaphase: effect of thyrotropic hormone on thyroids of guinea pigs, of androgens on seminal vesicles of rodents and of corticoids on ovi-positors of bitterlings (*Rhodeus amarus*). It was further demonstrated that X-irradiation of seminal vesicles in castrated male rats and subsequent treatment with androgens delays onset of mitosis. This effect is reversible. Furthermore flat preparations of corneas of rodents treated with colchicine enabled the investigators to estimate the duration of the mitotic cycle at about one hour. Finally the pathways of excretion of colchicine were studied in the Golden Hamster (*Cricetus aureus*). Intraperitoneally administered colchicine is mainly excreted by urine and bile.

### I. Wirkung des Colchicins auf hormonal bedingte Wachstumsvorgänge

Der belgische Pathologe DUSTIN hat im Jahre 1934 beobachtet, daß das Alkaloid der Herbstzeitlose, *Colchicum autumnale* (Colchicin), eine charakteristische Wirkung auf Zellteilungen ausübt. Nach Einspritzung von Colchicin findet man in allen wachsenden Geweben abnormale Zellteilungen. Colchicin verursacht in diesen Geweben Anhäufung von Zellen im Stadium der Metaphase. Versuche an Gewebekulturen (LUDFORD 1936, BÜCHER 1939) zeigen, daß der Mechanismus dieser Wirkung in einer Hemmung der Spindelbildung besteht. Die Blockierung der Kernteilungen findet in einem frühen Stadium der Metaphase statt. Die Zellen, deren Teilung in Metaphase gehemmt wird, zeigen das charakteristische Bild der C-Mitrose (LEVAN 1938); das Chromatin bildet einen dichten unregelmäßigen Klumpen, der von einem Hof von klarem Protoplasma umgeben ist. Bei großen Colchicindosen

und langdauernder Einwirkung kommt es zu einer Zersplitterung dieses Klumpens. Dieses Phänomen wurde zum Studium des Wachstums von Tumoren (DUSTIN 1934) und der Regeneration von Lebergewebe (BRUES 1936) herangezogen. Bald wurde diese Methode auf das Studium folgender hormonal bedingter Wachstumsvorgänge angewendet: Wirkung östrogenen Hormone auf das Vaginalepithel der kastrierten Maus (ALLEN u. M. 1936), Wirkung des mammastimulierenden Hormons auf die Kropfdrüse der Taube (LEBLOND u. M. 1937), Wirkung des Testosterons auf die Samenblase kastrierter Mäuse (FLEISCHMANN u. M. 1937p., 1938a), Wirkung von Nebennierenrindenhormonen auf das Wachstum der Legeröhre des Bitterlings (*Rhodeus amarus*) und Wirkung des thyreotropen Hormons auf die Schilddrüse des infantilen Meerschweinchens (FLEISCHMANN u. M. 1937 b, 1938 b). Von den Ergebnissen dieser Untersuchungen seien die folgenden hervorgehoben: in allen untersuchten Fällen konnte die Wachstumswirkung der verschiedenen Hormone durch Blockierung der Mitosen in der Metaphase verdeutlicht werden. Die Wirkung des Testosterons auf die Samenblase kastrierter Mäuse ist besonders deutlich wenn man den Tieren 39 Stunden nach der Hormoninjektion 1 mg per kg Colchicin injiziert und sie nach weiteren 9 Stunden tötet. Mittels dieser Methode sind 0,05 mg Testosteronpropionat (TP) gut nachweisbar. Das Epithel der Prostata ist gegen TP noch empfindlicher als das Epithel der Samenblase. Die Wirkung von Nebennierenrindenextrakten und des aus der Nebennierenrinde isolierten Hormons Corticosteron wurde ebenfalls mit der Colchicinmethode untersucht. Das Vorhandensein von Wachstumszonen im distalen Teil der Legeröhre des Bitterlings wurde vor allem in der Epidermis festgestellt. Schließlich konnte mittels der Colchicinmethode gezeigt werden, daß bereits in den ersten 10 Stunden nach Injektion von thyreotropem Hormon in infantile Meerschweinchen Mitosen in der Schilddrüse zu finden sind.

Die Wirkung des Testosterons auf die Samenblase wurde zu einem klinisch verwendbaren Test zur Bestimmung von androgenen Stoffen in Geweben und im Harn ausgearbeitet (FLEISCHMANN 1939). Extrakte von Geweben oder von hydrolysiertem Harn wurden in Olivenöl aufgenommen und kastrierten Rattenmännchen intramuskular injiziert. Eine zweite Injektion wurde 18 Stunden nach der ersten vorgenommen; 24 Stunden nach der zweiten Injektion des öligen Extraktes wurde Colchicin (1 mg per kg) in wässriger Lösung subkutan injiziert. Die Ratten wurden 8 Stunden nach der Colchicininjektion getötet, die Samenblasen sofort entnommen und in Bouin'scher Flüssigkeit fixiert. Das Auftreten von C-Mitosen im Epithel der Samenblase wurde als positiver Test gewertet. 0,05 mg TP oder 0,5 mg Androsteron gaben ein positives Resultat; kleinere Dosen bei beiden Hormone riefen keine C-Mitosen hervor. Da dieser Endpunkt scharf war, war diese Methode für das klinische Laboratorium brauchbar. Die chemischen Methoden zur Bestimmung der androgenen Wirkstoffe waren ja 1939 noch nicht allgemein verbreitet. Mit der Colchicinmethode wurden von uns in einem Falle vorzeitiger Entwicklung der Geschlechtsorgane mit begleitender Nebenniereninsuffizienz bei einem vierjährigen Knaben androgene Wirkstoffé in den Hoden nachgewiesen. Histologisch zeigte die Nebenniere dieses

Patienten ausschließlich Zellen der androgenen Zone, welche anscheinend andere Zellen der Nebennierenrinde verdrängt hatten. Die Hoden waren groß und bestanden aus ähnlichen Zellen; Spermatogonien wurden nicht gefunden. Der Test an Extrakten aus den Hoden eines normalen 38 Jahre alten Mannes war negativ (WILKINS u. M. (1940).

## II. Studien über Strahlenwirkung

Störung der Mitose durch Röntgenstrahlen ist an einer Reihe niederer Tierformen untersucht worden. Unbefruchtete Eier von *Arbacia punctulata* wurden bestrahlt und unmittelbar nach der Bestrahlung befruchtet. Die erste Teilung der bestrahlten Eier war im Vergleich mit unbestrahlten Eiern verzögert; wurde aber erst einige Zeit nach der Bestrahlung befruchtet, so blieb dieser Effekt aus (HENSHAW 1940).

Es erschien von Interesse, diesen Effekt an Säugetierzellen zu untersuchen; Samenblasen kastrierter Ratten erwiesen sich als ein geeignetes Versuchsobjekt. Röntgenbestrahlung der Beckengegend und unmittelbar darauffolgende Behandlung mit TP bewirkte, wie mittels der Colchicinmethode gezeigt werden konnte, Ausbleiben der Mitosen. Wenn TP 5 Tage nach der Bestrahlung injiziert wurde, war kein Effekt der Bestrahlung mehr nachzuweisen. Mit anderen Worten, es wurde ungefähr dieselbe Anzahl von C-Mitosen wie in unbestrahlten Samenblasen gefunden (FLEISCHMANN u. M. 1954). Diese Beobachtung beweist, daß Erholung von der Strahlenwirkung auf die Mitose im ruhenden Gewebe stattfinden kann. Röntgenbestrahlung hat eine spezifische Wirkung auf die Chromosomen, aber nicht auf die durch TP bewirkte Veränderung vom ruhenden kubischen in sezernierendes Zylinderepithel. Histochemische Studien lassen vermuten, daß die Röntgenstrahlen nur auf die Bildung von DNA, aber nicht auf die von RNA wirken (FLEISCHMANN 1958). Diese Beobachtung der Erholung von der Strahlenwirkung auf die Samenblase der Ratte ist ganz analog den oben erwähnten Befunden am Seeigelei.

## III. Colchicinstudien an der Cornea

Die folgenden Untersuchungen bilden einen Teil einer größeren Studie der Mitosen und Heilungsvorgänge des Hornhautepithels die an der Augenklinik der Johns Hopkins Universität in Baltimore vorgenommen wurde (BUSCHKE u. M 1943). Es wurden sowohl Flachpräparate als Schnitte der Hornhaut von Ratten untersucht, die eine fast quantitative Auszählung der Mitosen ermöglichten. In einer Reihe von Versuchen wurden die Augen 8 bis 10<sup>1</sup> Stunden nach intramuskulärer Einspritzung von Colchicin (2 mg per kg) entfernt und die Zahl der Mitosen an Flychpräparaten und Schnitten der Hornhaut gezählt. Die Zahl der Mitosen war bei den mit Colchicin behandelten Tieren nach 8 Stunden achtmal so groß wie bei unbehandelten Ratten. Das läßt auf eine Dauer des Mitosenzyklus von etwa einer Stunde schließen. Differentialzählungen der einzelnen Mitosenstadien bei den behandelten Tieren läßt erkennen, daß der Eintritt und die ersten Stadien der Mitose (Prophase) vom Col-

chicin nicht beeinflusst werden, daß aber nach 45 Minuten alle auf die Metaphase folgenden Stadien (Anaphase, Telophase und Rekonstruktionsphase) fehlen. Dies läßt ebenfalls auf eine Mitosendauer von etwa einer Stunde schließen.

Die semiquantitative Methode des Studiums der Mitosen an Flachpräparaten der Cornea wurde auch zur Prüfung der Blockierung der Mitosen durch einige Colchicinderivate verwendet (FLEISCHMANN u. M 1950). Im allgemeinen ging die antimitotische Wirkung der Toxizität parallel. Im Folgenden wird als kleinste wirksame antimitotische Dosis (KWAD) diejenige Menge bezeichnet, die einen signifikanten Zuwachs in der Zahl der Mitosen hervorruft. Z. B. zeigt die für die Maus giftigste Verbindung Colchicin (LD/50 3,5 mg per kg) eine KWAD von 0,35 mg per kg, das weit weniger giftige Colchicein (LD/50 84 mg per kg) eine KWAD von 28 mg per kg.

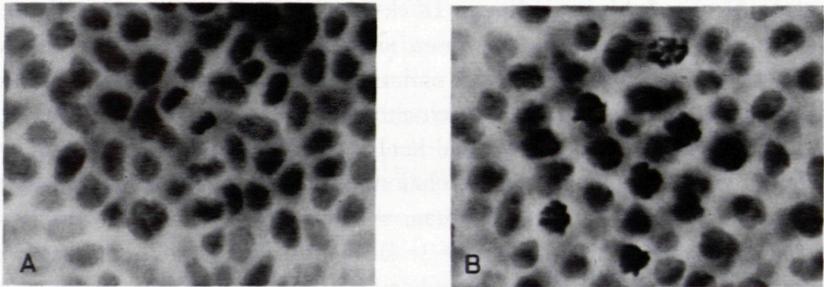


Abb. 1: Hornhaut der Maus.

A: Kontrolle; 6 Stunden nach Injektion physiol. NaCl-Lösung.

B: Behandelt; 6 Stunden nach Injektion von Colchicin (3 mg per kg).  
(Flachpräparat. Hamatoxylin. Abbildungsmaßstab 1350:1).

#### IV. Studien zur Toxikologie des Colchicins

Die Unterschiede in der Empfindlichkeit gegen Colchicin bei verschiedenen Nagetieren sind bedeutend. Zum Beispiel ist der Goldhamster gegen Colchicin besonders unempfindlich (ORSINI u. M 1952). Es erschien daher von Interesse die Toxizität und die KWAD bei einer Reihe von Laboratoriumstieren zu untersuchen (FLEISCHMANN u. M 1962). Die Toxizität wurde mittels der Methode von Prigge und Schafer (PRIGGE u. M 1939) bestimmt. Tabelle I zeigt die Ergebnisse dieser Versuche. LD/50 und KWAD gehen im großen und ganzen in derselben Richtung.

Tabelle I

Species	LD/50 mg/kg	KWAD Epidermis	(mg/kg) Darmepithel
Goldhamster ( <i>Cricetus auratus</i> )	470,0	10,0	10,0
Mongolischer Gerbil ( <i>Meriones unguiculatus</i> )	90,0	6,0	6,0
Chinesischer Hamster ( <i>Cricetus griseus</i> )	7,3	2,5	0,8
Hausmaus ( <i>Mus musculus</i> )	3,5	1,0	1,0
Meerschweinchen ( <i>Cavia cobaya</i> )	0,5	0,5	0,2

Die relativ geringe Empfindlichkeit des Goldhamsters und des mongolischen Gerbils ermöglichte Studien über die Ausscheidung intraperitoneal injizierten Colchicins (FLEISCHMANN u. M 1965, 1967). Als Bestimmungsmethode des Colchicins im Harn und in Geweben verwendeten wir eine Modifikation der von BRUES (1951) angegebenen Methode. Colchicin wird durch Säurehydrolyse in Colchicein und Methylalkohol gespalten; das Colchicein wird dann durch seine grüne Farb-reaktion mit dreiwertigem Eisen spektrophotometrisch bestimmt. Diese Farb-reaktion ist vor 80 Jahren von ZEISEL (1888) in Wien entdeckt worden. Die nach zwei Stunden im Harn und im Magen-Darmtrakt von Goldhamstern vorhandene Menge wurde quantitativ gemessen. Die Ausscheidung durch den Harn in Perzenten der injizierten Menge zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, die 100, 200 oder 400 mg per kg Colchicin erhalten hatten. Tiere der Gruppen die 490 oder 800 mg per kg erhalten hatten, zeigten Verminderung der Ausscheidung durch den Harn. Diese verminderte Ausscheidung ist vermutlich auf eine toxische Wirkung des Colchicins auf die Niere zurückzuführen. Ganz ähnlich verhielt sich die Ausscheidung durch den Harn beim Gerbil. Keine signifikanten Unterschiede in der Ausscheidung wurden zwischen den Gruppen, die 90, 150 oder 270 mg per kg erhalten hatten, gefunden. Die Gruppen jedoch die 400 oder 500 mg per kg erhalten hatten, zeigten eine herabgesetzte Ausscheidung von Colchicin durch den Harn. Bei beiden Arten (Goldhamster und Gerbil) war der Colchicingehalt des Magen-Darmtraktes samt Inhalt in allen Gruppen (in Perzenten der injizierten Menge) ungefähr gleich. Um weiteren Aufschluß über das Schicksal intraperitoneal injizierten Colchicins zu erhalten wurden je zehn Goldhamster mit 400 mg per kg injiziert und nach 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten getötet (FLEISCHMANN u. M 1968). Das Colchicin wurde im Harn, in der Leber samt Gallenblase und im Magen-Darmtrakt samt Inhalt bestimmt. In der Leber wurden 15 Minuten nach der Injektion  $4,73 \pm 1,41\%$  der injizierten Colchicindosis gefunden. Dieser Prozentsatz verminderte sich nach 120 Minuten auf  $1,07 \pm 0,40\%$ . Hingegen stieg der Colchicingehalt des Harnes von  $4,38 \pm 1,25\%$  nach 15 Minuten auf  $34,00 \pm 4,12\%$  nach 120 Minuten an. Sowohl die Differenzen im Colchicingehalt der Leber wie des Harnes in Perzenten der zugeführten Dosis waren statistisch signifikant. Im Magen-Darmtrakt war ein Ansteigen des Colchicingehaltes in Perzenten der zugeführten Dosis von  $14,83 \pm 3,74\%$  nach 15 Minuten zu einem Gehalt von  $22,16 \pm 10,95\%$  nach 120 Minuten zu beobachten. Dieser Unterschied ist nicht signifikant. Diese Resultate zeigen, daß das Colchicin sowohl durch den Harn als durch die Galle ausgeschieden wird. Diese Befunde am Goldhamster stimmen mit den Beobachtungen von BRUES (1951) an der Ratte gut überein.

Wir haben unsere experimentellen Studien über das Colchicin abgeschlossen und beschränken uns jetzt darauf, in unserem Garten verschiedene Colchicinspender zu ziehen.

## Literatur

- ALLEN, E., M. SMITH, and W. U. GARDNER (1936): Accentuation of the growth effect of theelin on genital tissues by arrest of mitosis with colchicine. *Anat. Record* **67**: Suppl. 1, 49.
- BRUES, A. M. (1936): The effect of colchicine on regenerating liver. *Journ. Physiol.* **86**: 63.
- BRUES, A. M. (1951): Discussion of a paper by M. Levine on „The action of colchicine on cell division“. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**: 1406—1408.
- BUCHER, O. (1939): Zur Kenntnis der Mitose VI. Der Einfluß von Colchicin und Trypolfavin auf den Wachstumsrhyth. u. auf die Zellteilung in Fibrocytenkulturen. *Z. Zellforsch.* **29**: 283.
- BUSCHKE, W., J. S. FRIEDENWALD, and W. FLEISCHMANN (1943): Studies on the mitotic activity of the corneal epithelium, Methods: The effect of colchicine, ether, cocaine and ephedrine. *Bull. Johns Hopkins Hospital* **53**: 143.
- DUSTIN, A. B. (1934): Action de la colchicine sur le sarcome greffé, type Crocker de la souris. *Bull. Acad. Roy. Méd. Belg.* **14**: 487.
- FLEISCHMANN, W. (1939): The use of colchicine in the assay of androgens. *Endocrinology* **25**: 798.
- FLEISCHMANN, W. (1958): Effects of androgens on the cytology of x-irradiated seminal vesicles. *Exp. Cell Research* **13**: 604.
- FLEISCHMANN, W. u. S. KANN (1937): Schnellmethode zum Nachweis von Sexualhormonen. *Akad. Anzeiger Akad. d. Wissenschaften, Wien, Nr. 21.* (Vorgelegt vom wirkl. Mitgl. A. Durig).
- FLEISCHMANN, W. und S. KANN (1937b): Zur Methodik des Nachweises von thyreotropem Hormon. *Akad. Anzeiger Akad. d. Wissenschaften, Wien, Nr. 24.* (Vorgelegt vom wirkl. Mitgl. A. Durig).
- FLEISCHMANN, W. und S. KANN (1938a): Über das Colchicin als Hilfsmittel beim Studium hormonal bedingter Wachstumsvorgänge. *Biochem. Zeitschr.* **296**: 373.
- FLEISCHMANN, W. and S. KANN (1938b): The bitterling ovipositor reaction to corticosterone. *Science* **87**: 305.
- FLEISCHMANN, W. and M. NIMAROFF (1954): Combined effects of x-irradiation and testosterone propionate on accessory sex organs. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.* **85**: 195, 655.
- FLEISCHMANN, W., H. G. PRICE, and S. K. FLEISCHMANN. (1965): Fate of intraperitoneally administered colchicine in the Golden Hamster. *Med. Pharmacol. exp.* **12**: 172.
- FLEISCHMANN, W., H. G. PRICE, and S. K. FLEISCHMANN (1967): Fate of intraperitoneally administered colchicine in the Mongolian Gerbil. *Med. Pharmacol. exp.* **17**: 323.
- FLEISCHMANN, W., H. G. PRICE, and S. K. FLEISCHMANN (1968): Pathways of excretion of colchicine in the Golden Hamster. *Pharmacology* **1**: 48.
- FLEISCHMANN, W., G. A. RUSSEL, and S. K. FLEISCHMANN (1962): LD/50 and minimal effective antimitotic dose of colchicine in various rodents. *Med. Exp.* **6**: 101.
- FLEISCHMANN, W. and G. E. ULLYOT (1950): Studies on colchicine derivatives. I. Effect on mitotic activity of the corneal epithelium. *Cancer* **3**: 130.
- HENSHAW, P. S. (1940): Action of x-rays on the gametes of *Arbacia punctulata*. *Am. J. Roentgen.* **43**: 899.
- LEBLOND, C. (1937): Action de la proclation sur le jabot du pigeon mise en évidence par l'arrêt des mitoses a l'aide de la colchicine. *C. r. Assoc. des Anat.* **32**: 241.
- LEVAN, A. (1938): The Effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. *Hereditas* **24**: 471.
- LUDFORD, R. J. (1936): The action of toxic substances upon the division of normal and malignant cells in vivo and in vitro. *Arch. exp. Zellforsch. und mikr. Anat.* **18**: 411.
- ORSINI, M. W. and B. Pansky (1952): The natural resistance of the golden hamster to colchicine. *Science* **115**: 88.
- PRIGGE, R. and W. Schafer (1939): Methoden der Wertbestimmung biologisch wirksamer Substanzen. *Arch. exp. Path. u. Pharmakol.* **191**: 281.
- WILKINS, L., W. FLEISCHMANN and J. E. HOWARD (1940): Macrogenitosomia precoc associated with hyperplasia of the androgenic tissue of the adrenal and death from corticoadrenal insufficiency. *Endocrinology* **26**: 385.
- ZEISEL, S. (1888): Über Colchicin. *Monatsh. Chem.* **9**: 1.

Anschrift der Verfasser: DDr. Walter u. Dr. Susanne Kann FLEISCHMANN, 1406 Lynnwood Drive, Johnson City, Tenn., USA., 37601.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Berichte des naturwissenschaftlichen-medizinischen Verein Innsbruck](#)

Jahr/Year: 1969

Band/Volume: [57](#)

Autor(en)/Author(s): Fleischmann Walter, Fleischmann Susanne

Artikel/Article: [DreiBig Jahre Colchicinforschung. 147-152](#)