

243. Der pro-oxydative Effekt tumorhemmender Methylhydrazin-Verbindungen¹⁾

von K. Berneis, M. Kofler, W. Bollag, P. Zeller, A. Kaiser und A. Langemann

(16. VIII. 63)

In einer kürzlich erschienenen Mitteilung²⁾ wurde dargelegt, dass tumorhemmende Methylhydrazin-Verbindungen Desoxyribonucleinsäure in wässriger Lösung bei Gegenwart von Luftsauerstoff abbauen, und dass diese Wirkung auf die Bildung von Wasserstoffperoxid bei der Autoxydation der Hydrazin-Derivate zurückzuführen ist. Die im folgenden wiedergegebenen Versuchsergebnisse zeigen, dass diese Verbindungen durch die Lieferung freier Radikale einen starken pro-oxydativen Effekt ausüben. Die Wirkung im *in-vitro*-System lässt ausgeprägte Analogien zum indirekten Effekt von Röntgenstrahlen erkennen.

I. Der Abbau von Desoxyribonucleinsäure durch Methylhydrazin-Verbindungen

1. *Vergleich der Wirkung äquimolarer Mengen einer tumorhemmenden Methylhydrazin-Verbindung und von Wasserstoffperoxid auf die Viskosität einer Desoxyribonucleinsäure-Lösung. Aufhalten des Viskositätsabfalles durch Katalase.* In der Figur 1 ist die zeitliche Veränderung der spezifischen Viskosität einer 0,07-proz. wässrigen Lösung³⁾ von Natrium-desoxyribonucleinat nach Zusatz von 0,0005 Mol/l 1-Methyl-2-(*p*-isopropyl-carbamoyl-benzyl)-hydrazin-hydrochlorid und in Figur 2 deren Verhalten nach Zusatz von 0,0005 Mol/l Wasserstoffperoxid wiedergegeben. Im Falle der Methylhydrazin-Verbindung ist während 160 Stunden ein ständiger Viskositätsabfall festzustellen. Dieser Abfall ist die Folge eines Abbaues der Desoxyribonucleinsäure. Durch Bestimmung der Sedimentationskonstanten kann die Abnahme des mittleren Molekulargewichtes nachgewiesen werden. Ein etwas rascherer Viskositätsabfall ist mit der äquimolaren Menge Wasserstoffperoxid festzustellen. Dieser Unterschied in der Abbaugeschwindigkeit ist wohl darauf zurückzuführen, dass im Falle der Methylhydrazin-Verbindung das Wasserstoffperoxid erst durch Autoxydation gebildet werden muss.

Beiden Lösungen wurden nach 20 Stunden Proben entnommen und diese mit 0,001% Katalase⁴⁾ versetzt. Der Figur ist zu entnehmen, dass sowohl im Falle des Hydrazinderivates als auch des Wasserstoffperoxids durch den Katalase-Zusatz ein sofortiges Aufhören des Viskositätsabfalles erreicht wird. Diese Versuche zeigen, dass die Viskosität der Lösung nur solange abnimmt, als Wasserstoffperoxid vorhanden

1) Auszugsweise vorgetragen an der Frühjahrstagung der Schweiz. Gesellschaft für Biochemie in Basel am 4. Mai 1963.

2) K. BERNEIS, M. KOFLER, W. BOLLAG, A. KAISER & A. LANGEMANN, *Experientia* 19, 132 (1963).

3) Zur Stabilisierung gegen Denaturierung enthielt die Natrium-desoxyribonucleinat-Lösung 10% Kochsalz. Vgl. R. SIGNER & H. SCHWANDER, *Helv.* 32, 853 (1948).

4) Geliefert von BOEHRINGER, Mannheim.

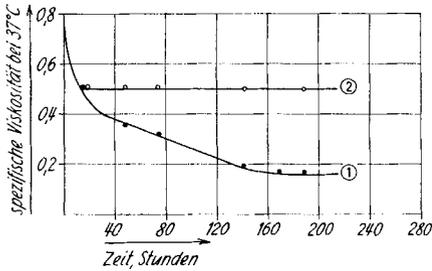


Fig. 1. Wirkung von 0,0005 Mol/l 1-Methyl-2-(p-isopropylcarbamoyl-benzyl)-hydrazin-hydrochlorid auf die spezifische Viskosität einer Desoxyribonucleinsäure-Lösung, und das Aufhalten des Viskositätsabfalles durch Katalase.

- (1) ohne Katalase-Zusatz
(2) nach 20 Std. Zusatz von Katalase.

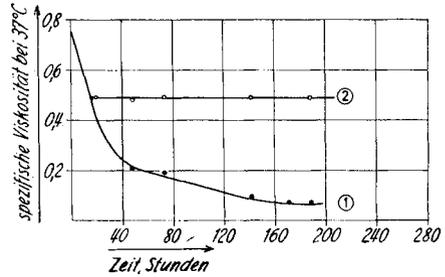


Fig. 2. Wirkung von 0,0005 Mol/l Wasserstoffperoxid auf die spezifische Viskosität einer Desoxyribonucleinsäure-Lösung, und das Aufhalten des Viskositätsabfalles durch Katalase.

- (1) ohne Katalase-Zusatz
(2) nach 20 Std. Zusatz von Katalase.

ist. Das Abfallen der Viskosität kann somit direkt als ein Indikator für das Vorhandensein von Wasserstoffperoxid im System angesehen werden.

2. Der Einfluss von Peroxidase auf den Abbau von Desoxyribonucleinsäure durch Methylhydrazin-Verbindungen und durch Wasserstoffperoxid. In unserer früheren Notiz²⁾ wurde erwähnt, dass eine Hemmung des Nucleinsäureabbaues ausser durch Katalase auch durch Peroxidase-Zusatz⁴⁾ erzielt werden kann. In den Figuren 3 und 4 sind die Ergebnisse von Versuchen wiedergegeben, welche den Einfluss der Peroxidase-Dosis auf das Ausmass der Hemmung zeigen. Die in Figur 3 aufgeführten Versuchsergebnisse wurden unter Verwendung von 0,0005 Mol/l 1-Methyl-2-(p-isopropylcarbamoyl-benzyl)-hydrazin-hydrochlorid erhalten, während in Figur 4 die entsprechenden Ergebnisse mit 0,0005 Mol/l Wasserstoffperoxid wiedergegeben sind.

In beiden Figuren gibt die Kurve 1 die spezifische Viskosität der Lösung beim Kontrollversuch ohne Peroxidase-Zusatz wieder, während die Kurven 2 und 3 die

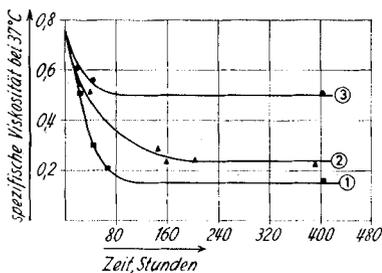


Fig. 3. Einfluss von Peroxidase auf den Abbau von Desoxyribonucleinsäure durch 0,0005 Mol/l 1-Methyl-2-(p-isopropylcarbamoyl-benzyl)-hydrazin-hydrochlorid.

- (1) ohne Peroxidase-Zusatz
(2) Zusatz von 0,0002% Peroxidase
(3) Zusatz von 0,0010% Peroxidase

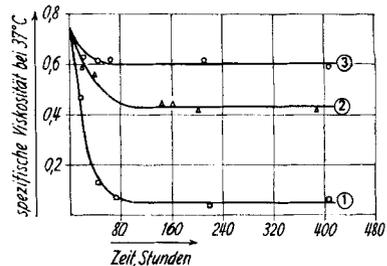


Fig. 4. Einfluss von Peroxidase auf den Abbau von Desoxyribonucleinsäure durch 0,0005 Mol/l Wasserstoffperoxid.

- (1) ohne Peroxidase-Zusatz
(2) Zusatz von 0,0002% Peroxidase
(3) Zusatz von 0,0010% Peroxidase

Hemmung des Viskositätsabfalles durch 0,0002% bzw. 0,0010% Peroxidase zeigen. Sowohl bei der Methylhydrazin-Verbindung als auch beim Wasserstoffperoxid ist vermehrte Hemmung mit zunehmender Peroxidase-Konzentration festzustellen. Der Effekt von Wasserstoffperoxid wird aber offensichtlich stärker gehemmt als derjenige der Methylhydrazin-Verbindung.

3. *Der Einfluss von Cystein und Cysteamin auf den Abbau von Desoxyribonucleinsäure durch Methylhydrazin-Verbindungen und durch Wasserstoffperoxid.* Den Figuren 5 und 6 ist zu entnehmen, welchen Einfluss Cystein und Cysteamin auf den Abbau von Desoxyribonucleinsäure durch die Methylhydrazin-Verbindung und durch Wasserstoffperoxid ausüben. Die Messpunkte der Kurven 1 von Figur 5 und 6 wurden bei den Kontrollversuchen ohne Zusatz von Cystein oder Cysteamin erhalten und die Kurven 2 und 3 bei den Ansätzen mit Zusatz von je 0,1% Cystein bzw. Cysteamin.

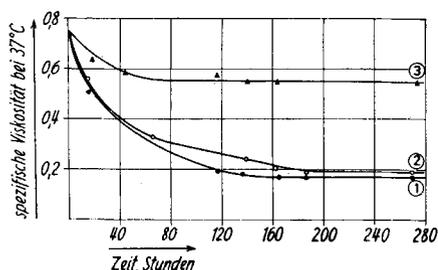


Fig. 5. Einfluss von Cystein und Cysteamin auf den Abbau von Desoxyribonucleinsäure durch 0,0005 Mol/l 1-Methyl-2-(p-isopropylcarbamoyl-benzyl)-hydrazin-hydrochlorid.

- (1) ohne Zusatz
- (2) Zusatz von 0,1% L-Cystein-hydrochlorid
- (3) Zusatz von 0,1% Cysteamin-hydrochlorid

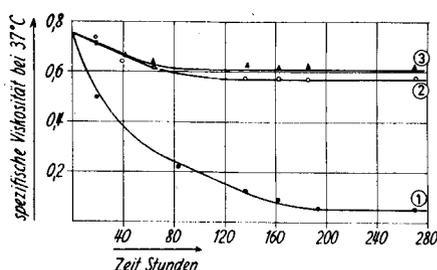


Fig. 6. Einfluss von Cystein und Cysteamin auf den Abbau von Desoxyribonucleinsäure durch 0,0005 Mol/l Wasserstoffperoxid.

- (1) ohne Zusatz
- (2) Zusatz von 0,1% L-Cystein-hydrochlorid
- (3) Zusatz von 0,1% Cysteamin-hydrochlorid

Die Kurven 3 der beiden Figuren zeigen, dass Cysteamin den Abbau bei beiden Versuchen stark hemmt, wobei aber beim Versuch mit Wasserstoffperoxid der Hemmeffekt wiederum etwas grösser ist als bei Verwendung der Methylhydrazin-Verbindung. Ein sehr ausgeprägter Unterschied im Viskositätsverlauf der beiden Lösungen ist hingegen bei Zusatz von Cystein festzustellen. Dies zeigen die durch die Kurven 2 wiedergegebenen Versuchsergebnisse. Der Versuch mit der Methylhydrazin-Verbindung wird durch Cystein nur sehr wenig beeinflusst, während die Wirkung von Wasserstoffperoxid durch dieselbe Menge Cystein zum grössten Teil aufgehoben wird.

Die Unterschiede in der Beeinflussbarkeit des Nucleinsäureabbaues durch Wasserstoffperoxid einerseits und durch Methylhydrazin-Verbindungen andererseits sind wahrscheinlich auf den Radikal-Mechanismus der Autoxydation dieser Verbindungen zurückzuführen (vgl. Abschnitt II, 3).

4. *Die Stabilität der Doppelhelixstruktur von Desoxyribonucleinsäure beim Abbau durch Methylhydrazin-Verbindungen.* Beim Abbau der Desoxyribonucleinsäure durch Methylhydrazin-Verbindungen ändert sich das Absorptionsspektrum der Desoxyribonucleinsäure im ultravioletten Gebiet nur geringfügig (s. Fig. 7).

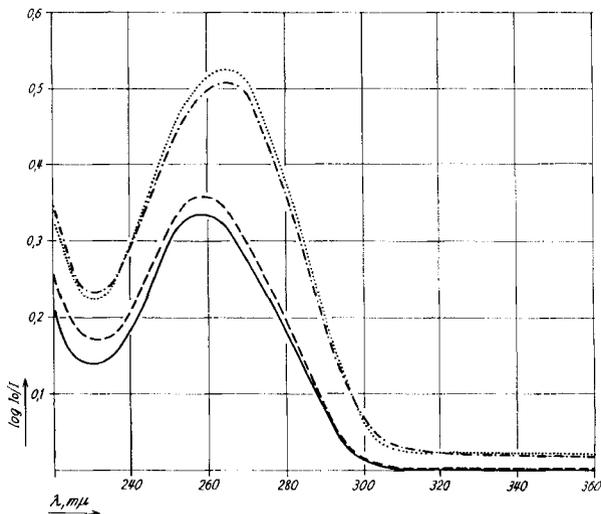


Fig. 7. Absorptionsspektren im ultravioletten Gebiet von Desoxyribonucleinsäure vor und nach dem Abbau durch 0,0005 Mol/l 1-Methyl-2-(*p*-isopropylcarbamoyl-benzyl)-hydrazin-hydrochlorid.

Ausgezogene Kurve:	vor dem Abbau
gestrichelte Kurve:	nach dem Abbau
punktierte Kurve:	nicht-abgebaute DNS mit Säurezusatz
punktiert/gestrichelte Kurve:	abgebaute DNS mit Säurezusatz

Als Vergleichslösung diente die Wirkstofflösung ohne Desoxyribonucleinsäure. Für diese Versuche wurde wiederum die 0,07-proz. wässrige Lösung von Natrium-desoxyribonucleinat verwendet. Der Abbau der Desoxyribonucleinsäure erfolgte durch Zusatz von 0,0005 Mol/l 1-Methyl-2-(*p*-isopropylcarbamoyl-benzyl)-hydrazin-hydrochlorid. Die ausgezogene Kurve zeigt das Absorptionsspektrum der Desoxyribonucleinsäure vor und die gestrichelte Kurve nach dem Abbau durch die Methylhydrazin-Verbindung. Die grosse Ähnlichkeit der Absorptionsspektren vor und nach dem Abbau weist darauf hin, dass die Doppelhelixstruktur der Desoxyribonucleinsäure bei der Einwirkung der Methylhydrazin-Verbindung trotz Spaltung der Molekel in kleinere Bruchstücke im wesentlichen erhalten bleibt.

Erst wenn die Desoxyribonucleinsäure-Lösung auf einen pH-Wert von ungefähr 2 angesäuert und erwärmt wird, findet ein Anstieg der optischen Dichte im Extinktionsmaximum um rund 50% statt, wobei sich gleichzeitig das Extinktionsmaximum um 7 $m\mu$ zum sichtbaren Bereich hin verschiebt. Diese Veränderungen im Absorptionsspektrum beim Ansäuern werden sowohl mit der unbehandelten als auch mit der durch die Methylhydrazin-Verbindung abgebauten Desoxyribonucleinsäure-Lösung erhalten. In Figur 7 ist das entsprechende Absorptionsspektrum für die unbehandelte Desoxyribonucleinsäure durch die punktierte Kurve und für die abgebaute Desoxyribonucleinsäure durch die punktiert-gestrichelte Kurve wiedergegeben. Diese Veränderungen im Absorptionsspektrum sind bekanntlich eine Folge der Lösung von Wasserstoffbrücken zwischen gegenüberliegenden Purin- und Pyrimidin-Basen, wobei die Doppelhelixstruktur der Desoxyribonucleinsäure zerstört wird. In der Tabelle

sind die Viskositätswerte und die optischen Daten dieser Lösungen zusammengestellt. Ausserdem sind die entsprechenden Messwerte aufgeführt, welche beim Abbau der Desoxyribonucleinsäure durch Wasserstoffperoxid anstelle von 1-Methyl-2-(*p*-isopropylcarbamoyl-benzyl)-hydrazin-hydrochlorid erhalten wurden. Der Tabelle ist zu entnehmen, dass Wasserstoffperoxid denselben Einfluss auf das Absorptionsspektrum der Desoxyribonucleinsäure hat wie die äquimolare Menge der Methylhydrazin-Verbindung.

Lösung ⁵⁾	η spez.	λ_{max} (m μ)	$\log (I_0/I)_{max}$	Anstieg $\log (I_0/I)_{max}$ in %
Desoxyribonucleinsäure, unbehandelt	0,63	258	0,340	–
Desoxyribonucleinsäure + 1-Methyl-2-(<i>p</i> -isopropylcarbamoyl-benzyl)-hydrazin-hydrochlorid	0,08	258	0,360	6
Desoxyribonucleinsäure + Wasserstoffperoxid	0,08	258	0,360	6
Desoxyribonucleinsäure unbehandelt, nach Denaturierung mit HCl	–	265	0,525	54
Desoxyribonucleinsäure + 1-Methyl-2-(<i>p</i> -isopropylcarbamoyl-benzyl)-hydrazin-hydrochlorid, nach Denaturierung mit HCl	–	265	0,510	50
Desoxyribonucleinsäure + Wasserstoffperoxid, nach Denaturierung mit HCl	–	265	0,510	50

II. Die Wasserstoffperoxid-Bildung durch Methylhydrazin-Verbindungen in Gegenwart von molekularem Sauerstoff

Die im folgenden wiedergegebenen Versuchsergebnisse zeigen den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Bildungsgeschwindigkeit und die Ausbeute an Wasserstoffperoxid aus den tumorhemmenden Hydrazinderivaten. Diese Versuche wurden bei Abwesenheit von Desoxyribonucleinsäure durchgeführt, die Wasserstoffperoxid-Bestimmung erfolgte nach der Titansulfat-Methode⁶⁾.

1. *Die Abhängigkeit der Wasserstoffperoxid-Ausbeute bei der Autoxydation der Methylhydrazin-Verbindungen von der Phosphat-Ionen-Konzentration.* Der zeitliche Verlauf der Wasserstoffperoxid-Bildung in 0,01M wässrigen Lösungen von 1-Methyl-2-(*p*-isopropylcarbamoyl-benzyl)-hydrazin-hydrochlorid bei Gegenwart von molekularem Sauerstoff ist der Figur 8 zu entnehmen. Die wiedergegebenen Versuchsergebnisse wurden mit drei Lösungen von wechselndem Gehalt an Phosphat-Ionen erhalten.

Bei Verwendung von 1/15M Phosphatpuffer⁷⁾ mit dem pH-Wert 7 wurde eine wesentlich höhere Wasserstoffperoxid-Ausbeute erhalten als in einer Lösung mit viermal geringerem Gehalt an Phosphatpuffer, und bei völliger Abwesenheit von Phos-

⁵⁾ Für die Absorptionmessungen wurden die Lösungen 1:25 mit Wasser verdünnt.

⁶⁾ A. C. EGERTON, A. J. EVERETT, G. J. MINKOFF, S. RUDRAKANCHANA & K. C. SALVOJA, *Analyt. chim. Acta* 10, 422 (1954).

⁷⁾ System Na₂HPO₄-KH₂PO₄.

phat-Ionen konnte nach 140 Stunden nur ein geringer Bruchteil des in 1/15 M Phosphatpuffer gebildeten H_2O_2 nachgewiesen werden. Diese Resultate sind wohl dadurch zu erklären, dass das Wasserstoffperoxid bei Abwesenheit von Phosphatpuffer durch die in der Lösung anwesenden Hydrazinderivate zersetzt wird. Andererseits ist bekannt, dass Phosphat-Ionen Wasserstoffperoxid in wässriger Lösung stabilisieren^{8) 9)}.

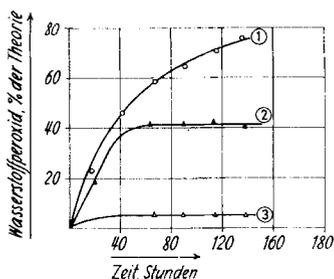


Fig. 8. Wasserstoffperoxid-Bildung durch 1-Methyl-2-(p-isopropylcarbonyl-benzyl)-hydrazin-hydrochlorid bei Gegenwart von molekularem Sauerstoff.

- (1) in 1/15 M Phosphatpuffer mit pH 7
 (2) in 1/60 M Phosphatpuffer mit pH 7
 (3) in Wasser ohne Zusatz.

2. Die pH-Abhängigkeit der Autoxydationsgeschwindigkeit. Die in der Figur 9 wiedergegebenen Versuchsergebnisse wurden unter Verwendung 0,01M Lösungen von 1-Methyl-2-benzyl-hydrazin-phosphat in 0,1M Phosphatpuffer¹⁰⁾ bei drei pH-Werten der Lösung erhalten.

Die Geschwindigkeit der Autoxydation der erwähnten Methylhydrazin-Verbindung hängt vom pH-Wert der Lösung ab. Am raschesten verläuft die Wasserstoffperoxid-Bildung in neutralem oder in schwach alkalischem Milieu, während in saurer Lösung eine Induktionsperiode festzustellen ist, deren Länge mit steigender Acidität der Lösung zunimmt. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die freie Hydrazin-Verbindung sich leichter als ihr Salz autoxydiert.

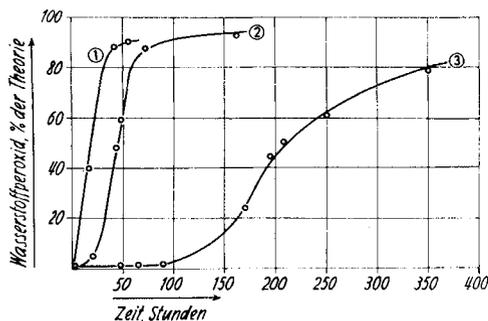


Fig. 9. Wasserstoffperoxid-Bildung durch 1-Methyl-2-benzyl-hydrazin-phosphat bei Gegenwart von molekularem Sauerstoff.

- (1) pH-Wert der Lösung = 7,0
 (2) pH-Wert der Lösung = 6,5
 (3) pH-Wert der Lösung = 4,5

3. Der Einfluss eines Radikal-Akzeptors auf den Ablauf der Autoxydation. Figur 10 zeigt die verzögernde Wirkung von 0,05% Propylgallat auf die Wasserstoffperoxid-Bildung in einer 0,01M wässrigen Lösung¹¹⁾ von 1-Methyl-2-benzyl-hydrazin-

⁸⁾ W. C. SCHUMB, C. N. SATTERFIELD & R. L. WENTWORTH, Hydrogen Peroxide, Reinhold Publishing Corp., New York 1954, S. 540; siehe dort weitere Literaturangaben.

⁹⁾ S. HUSAIN & R. J. PARTINGTON, Trans. Faraday Soc. 83, 235 (1928). Zitiert in W. MACHU, Das Wasserstoffperoxid und die Perverbindungen, Springer-Verlag, Wien 1951, S. 330.

¹⁰⁾ System $Na_2HPO_4-NaH_2PO_4$.

¹¹⁾ Zur Stabilisierung des bei der Autoxydation gebildeten Wasserstoffperoxids waren alle Lösungen 1/15M hinsichtlich Phosphatpuffer mit pH 7.

phosphat (Kurve 3). Dieser Effekt scheint überraschend, weil Propylgallat allein in wässriger Lösung durch Autoxydation ebenfalls Wasserstoffperoxid liefert (Kurve 2)¹²⁾.

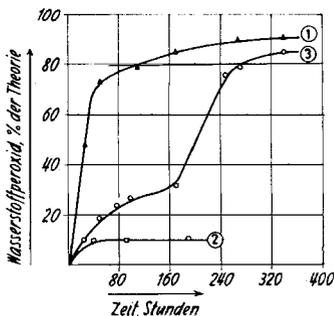


Fig. 10. Einfluss von Propylgallat auf die Wasserstoffperoxid-Bildung durch 1-Methyl-2-benzyl-hydrazin-phosphat.

- (1) 0,01 Mol/l 1-Methyl-2-benzyl-hydrazin-phosphat allein
- (2) 0,05% Propylgallat allein
- (3) 0,01 Mol/l 1-Methyl-2-benzyl-hydrazin-phosphat und 0,05% Propylgallat zusammen.

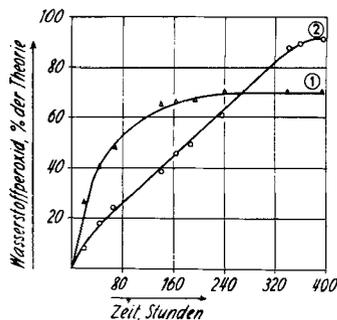


Fig. 11. Einfluss von Propylgallat auf die Wasserstoffperoxid-Bildung durch 1-Methyl-2-(p-isopropylcarbamoyl-benzyl)-hydrazin-hydrochlorid.

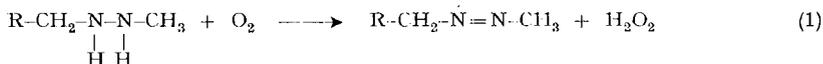
- (1) 0,01 Mol/l 1-Methyl-2-(p-isopropylcarbamoyl-benzyl)-hydrazin-hydrochlorid allein
- (2) 0,01 Mol/l 1-Methyl-2-(p-isopropylcarbamoyl-benzyl)-hydrazin-hydrochlorid und 0,05% Propylgallat.

Den in der Figur 11 dargestellten Versuchsergebnissen ist zu entnehmen, dass auch die Autoxydation von 0,01 Mol/l 1-Methyl-2-(p-isopropylcarbamoyl-benzyl)-hydrazin-hydrochlorid durch 0,05% Propylgallat verlangsamt wird. Die Wasserstoffperoxid-Bildung beim Versuch ohne Propylgallat-Zusatz ist nach 240 Stunden beendet; bei Gegenwart von Propylgallat hingegen kann eine Zunahme des Wasserstoffperoxid-Gehaltes der Lösung während 400 Stunden beobachtet werden. Ausserdem zeigt die Figur 11, dass die Lösung mit Propylgallat nach 400 Stunden ungefähr 20% mehr Wasserstoffperoxid enthält als diejenige ohne diesen Zusatz. Propylgallat-Zusatz hat somit in diesem System ausser der Verzögerung der Autoxydation noch eine Steigerung der Wasserstoffperoxid-Ausbeute zur Folge.

Die Beeinflussbarkeit des Reaktionsablaufes durch Zusatz eines Radikal-Acceptors weist darauf hin, dass die Autoxydation der erwähnten Methylhydrazin-Verbindungen über die intermediäre Bildung freier Radikale erfolgt.

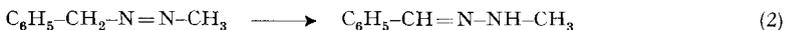
III. Methylhydrazin als weiteres Reaktionsprodukt der Autoxydation von Methylhydrazin-Verbindungen

Bei der Autoxydation der Methylhydrazin-Verbindungen entsteht neben Wasserstoffperoxid die entsprechende Azo-Verbindung:

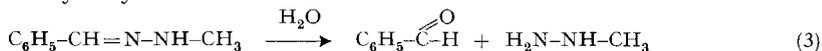


¹²⁾ Bezogen auf die theoretische Wasserstoffperoxid-Ausbeute aus 0,01 Mol/l der Methylhydrazin-Verbindung.

Diese Azo-Verbindungen lagern sich in neutraler Lösung relativ rasch zum entsprechenden Hydrazon um. Bei der Autoxydation von 1-Methyl-2-benzyl-hydrazin-phosphat entsteht somit zunächst Benzylazomethan, welches sich dann zu 1-Benzyliden-2-methyl-hydrazin umlagert:



1-Benzyliden-2-methyl-hydrazin wird in wässriger Lösung zu Benzaldehyd und Methylhydrazin hydrolysiert:



Der Figur 12 ist zu entnehmen, dass bei der Autoxydation von 1-Methyl-2-benzyl-hydrazin-phosphat die Bildung von Wasserstoffperoxid und von Benzaldehyd¹³) parallel geht. Als Mass für die Wasserstoffperoxid-Bildung diente der durch den Abbau der Desoxyribonucleinsäure hervorgerufene Viskositätsabfall der Lösung. Wie die Figur 12 zeigt, konnten nach 250 Stunden ungefähr 85% der theoretischen Menge Benzaldehyd nachgewiesen werden. Der Benzaldehyd kann als ein Indikator für die Bildung von Methylhydrazin angesehen werden.

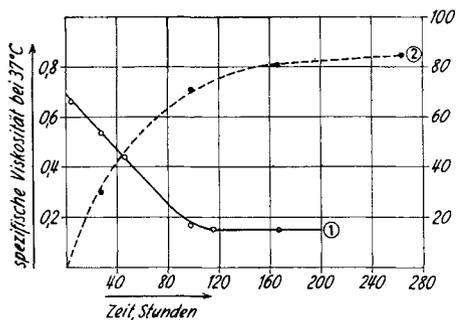


Fig. 12. Viskositätsabfall und Benzaldehyd-Bildung in einer Nucleinsäure-Lösung mit Zusatz von 0,0005 Mol/l 1-Methyl-2-benzylhydrazin-phosphat.

- (1) spezifische Viskosität
(2) Benzaldehyd-Gehalt.

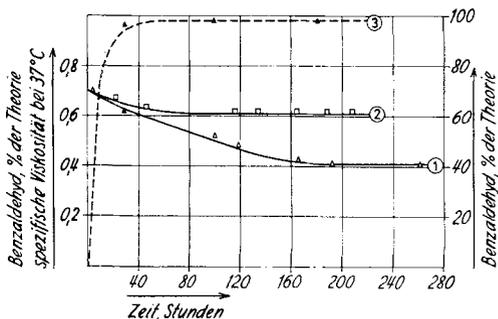


Fig. 13. Viskositätsabfall und Benzaldehyd-Bildung in einer Nucleinsäure-Lösung mit Zusatz von 0,0005 Mol/l 1-Benzyliden-2-methylhydrazin, und Einfluss von Katalase auf den Viskositätsabfall.

- (1) spezifische Viskosität
(2) spezifische Viskosität bei Gegenwart von 0,001% Katalase
(3) Benzaldehyd-Gehalt.

Gemäss Gleichung (2) entsteht aus 1-Methyl-2-benzyl-hydrazin nach der Autoxydation zur Azo-Verbindung durch Umlagerung 1-Benzyliden-2-methyl-hydrazin. Dieses Hydrazon wird dann zu Benzaldehyd und Methylhydrazin hydrolysiert. Daher sollte auch bei Zusatz des Hydrazons zur Natrium-desoxyribonucleinat-Lösung die Bildung von Benzaldehyd nachgewiesen werden können. Der Figur 13 ist zu entnehmen, dass schon nach 40 Stunden 97% der theoretischen Menge an Benzaldehyd entstanden ist (Kurve 3).

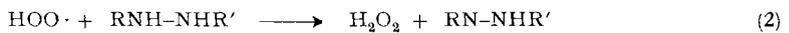
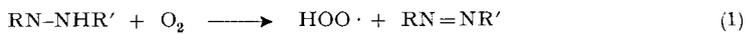
¹³⁾ Der Benzaldehyd-Gehalt wurde durch Messung der optischen Dichte bei 248 m μ der 1:10 verdünnten Lösung bestimmt. Dabei wurde Natrium-desoxyribonucleinat-Lösung ohne Zusatz des Hydrazin-Derivates als Vergleichslösung verwendet.

Ausserdem entsteht bei der Hydrolyse des Hydrazons Methylhydrazin. Auf die Bildung von Methylhydrazin ist der durch Kurve 1 wiedergegebene Viskositätsabfall der Desoxyribonucleinsäure-Lösung zurückzuführen. Bei der Autoxydation von Methylhydrazin entsteht nämlich ebenfalls Wasserstoffperoxid, welches dann den Abbau der Desoxyribonucleinsäure bewirkt. Durch Zusatz von 0,001% Katalase kann daher auch hier der Viskositätsabfall nahezu vollständig unterdrückt werden (Kurve 2).

IV. Methylhydrazin als Aktivator von Wasserstoffperoxid

Methylhydrazin reduziert in neutraler oder schwach saurer Lösung Eisen(III)- zu Eisen(II)-Ionen. Andererseits ist bekannt, dass sich Wasserstoffperoxid mit Eisen(II)-Ionen unter Bildung von HO·-Radikalen umsetzt¹⁴⁾. Daher ist anzunehmen, dass Methylhydrazin bei Anwesenheit von Eisen¹⁵⁾ Wasserstoffperoxid aktivieren kann. Es ist bekannt, dass der Abbau von Desoxyribonucleinsäure in Lösung nicht durch Wasserstoffperoxid, sondern erst durch die aus diesem durch Reduktion gebildeten OH·-Radikale erfolgt¹⁶⁾.

Diskussion. - In unserer früheren Mitteilung²⁾ wurde auf die Analogie zwischen dem Effekt der Methylhydrazin-Verbindungen bei Gegenwart von Luftsauerstoff und dem indirekten Effekt von Röntgenstrahlen hingewiesen. In beiden Fällen sind HO·-Radikale für die Wirkung verantwortlich. Die hier mitgeteilte Feststellung, dass der Abbau von Desoxyribonucleinsäure durch Methylhydrazin-Verbindungen ohne wesentliche Zerstörung der Doppelhelices erfolgt, entspricht den Beobachtungen von MOROSON & ALEXANDER¹⁷⁾ über die Wirkung von HO·-Radikalen auf Desoxyribonucleinsäure *in vitro*. Eine weitere Analogie in diesem Sinne stellt die Hemmung des Effekts der Methylhydrazin-Verbindungen auf Desoxyribonucleinsäure durch Cysteamin dar. Auch gegenüber dem indirekten Effekt von Röntgenstrahlen ist Cysteamin bedeutend wirksamer als Cystein¹⁸⁾.



Die experimentellen Befunde legen den Schluss nahe, dass es sich bei der Autoxydation der Methylhydrazin-Verbindungen um eine Kettenreaktion handelt, bei welcher freie Radikale als Zwischenprodukte auftreten. Die Reduktion des molekularen Sauerstoffs zu Wasserstoffperoxid erfolgt in zwei Stufen, wobei HOO·-Radikale

¹⁴⁾ F. HABER & J. WEISS, Proc. Roy. Soc. A 147, 332 (1934); siehe auch H. J. KAUFFMANN, J. Amer. chem. Soc. 73, 4311 (1951).

¹⁵⁾ Das bei den hier beschriebenen Versuchen verwendete Na-desoxyribonucleinat ist eisenhaltig; siehe exper. Teil.

¹⁶⁾ J. A. V. BUTLER & B. E. CONWAY, J. chem. Soc. 1950, 3418; J. A. V. BUTLER & K. A. SMITH, Nature 165, 847 (1950).

¹⁷⁾ H. MOROSON & P. ALEXANDER, Radiation Res. 14, 29 (1961); vgl. auch F. WEGMÜLLER, Dissertation, Bern 1942, S. 33 und 74.

¹⁸⁾ Vgl. Z. M. BACQ & P. ALEXANDER, Fundamentals of Radiobiology, Pergamon Press, London 1961, S. 460.

als Zwischenprodukte gebildet werden. Der Reaktionsablauf kann schematisch durch das im folgenden wiedergegebene Gleichungssystem beschrieben werden. Dabei wird die Anwesenheit der «Startradikale» $RN-NHR'$ vorausgesetzt.

In der ersten Stufe (1) erfolgt die Bildung eines $HOO\cdot$ -Radikals durch Reaktion von molekularem Sauerstoff mit einem *Radikal* des Hydrazinderivates. In der Stufe (2) reagiert das $HOO\cdot$ -Radikal mit einer *Molekel* des Hydrazinderivates unter Bildung von Wasserstoffperoxid. Dabei entsteht wieder ein für den Ablauf der ersten Stufe erforderliches Radikal des Hydrazinderivates. Die Erhöhung der Wasserstoffperoxid-Ausbeute bei Zusatz von Propylgallat ist wohl dadurch zu erklären, dass dieses als Wasserstoffdonator fungieren kann, indem es $HOO\cdot$ -Radikale zu Wasserstoffperoxid reduziert oder an das Radikal der Methylhydrazin-Verbindung ein Wasserstoffatom abgibt. Ganz analog können auch andere Wasserstoffdonatoren die Bildung von Wasserstoffperoxid fördern und auf diese Weise den pro-oxydativen Effekt verstärken. Auf diese Reaktionsmöglichkeiten der bei der Autoxydation der Methylhydrazin-Verbindungen gebildeten radikalischen Zwischenprodukte sind wahrscheinlich die weiter vorn gezeigten Unterschiede zwischen den Methylhydrazin-Verbindungen und Wasserstoffperoxid hinsichtlich der Beeinflussbarkeit ihrer Wirkung auf Desoxyribonucleinsäure zurückzuführen.

Die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass es sich bei den erwähnten Methylhydrazin-Verbindungen um typische «Pro-Oxydantien»¹⁹⁾ handelt. Die Desoxyribonucleinsäure war in unserem System in erster Linie ein Indikator für $HO\cdot$ -Radikale. Hingegen können die Versuche keinen Aufschluss darüber geben, ob der cytostatische Effekt auf eine Schädigung der Desoxyribonucleinsäure oder auf andere Reaktionen der $HO\cdot$ -Radikale oder des Wasserstoffperoxids in der Zelle zurückzuführen ist.

Experimentelles. - Die Versuche zur Bestimmung des Einflusses der Methylhydrazin-Verbindungen und von Wasserstoffperoxid auf die Viskosität einer Lösung von Natrium-desoxyribonucleinat erfolgten unter den bereits früher mitgeteilten Bedingungen²⁰⁾. Bei allen Versuchen wurden 0,07-proz. Lösungen des Nucleinsäurepräparates verwendet. Sämtliche Versuche wurden bei 37°C ausgeführt. Die gefundenen Viskositäten wurden gemäss STAUDINGER & HEUER²¹⁾ in «Spezifische Viskositäten» umgerechnet. Die den Abbau auslösenden Substanzen - 1-Methyl-2-(*p*-isopropylcarbamoyl-benzyl)-hydrazin-hydrochlorid, 1-Methyl-2-benzyl-hydrazin-phosphat sowie 30-proz. Wasserstoffperoxid - wurden wiederum zu 0,001M in 1/15M Phosphatpuffer MERCK vom pH 7 mit Zusatz von 10% Kochsalz gelöst. Die im Text erwähnten Zusätze²²⁾ - Peroxidase, Cystein und Cysteamin - wurden zusammen mit den oben erwähnten Verbindungen ebenfalls im Phosphatpuffer gelöst. Unmittelbar nachher erfolgte die Zugabe der Desoxyribonucleinsäure-Lösung. Um die Wasserstoffperoxid-Bildung aus den Methylhydrazin-Verbindungen zu verfolgen, wurden diese zu 0,01M in den im Text erwähnten Phosphatpuffern gelöst, deren Bereitung unter Verwendung von aus Quarzapparaturen bidestilliertem Wasser erfolgte. Spektralanalytisch konnten in diesem Wasser keine Schwermetalle nachgewiesen werden. Der Zusatz²²⁾ des im Text erwähnten Antioxydans Propylgallat wurde bei den entsprechenden Versuchen gleichzeitig mit der Zugabe der Hydrazinderivate zum Phosphatpuffer vorgenommen. Von den Lösungen wurden je 20 ml in Messkolben mit einem Totalvolumen von ungefähr 55 ml gefüllt, mit Sauerstoff überschichtet und bei 37° verschlossen gelagert. In bestimmten Zeitintervallen, welche den in den Figuren wiedergegebenen Messpunkten entsprechen, wurden 1 bis 2 ml der Lösung entnommen,

¹⁹⁾ Vgl. D. L. GILBERT sowie F. BERNHEIM in «Radiation Research», Supplement 3, 1963, S. 44 und S. 17 (Academic Press, New York 1963).

²⁰⁾ K. BERNEIS, *Helv.* 46, 59 (1963).

²¹⁾ H. STAUDINGER & W. HEUER, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 63, 222 (1930).

²²⁾ Bei den Prozentangaben handelt es sich um Gewichts-Prozente, bezogen auf das Gewicht der Lösung.

