

The Influence of Chelating Agents on the Prooxidative Effect of a Hydrogen Peroxide Producing Methylhydrazine Compound

It is known that hydrogen peroxide and hydrogen peroxide-producing compounds can cause an oxidative degradation of sodium deoxyribonucleinate (DNA)¹. This effect is ascribed to the formation of OH radicals from hydrogen peroxide. The latter reaction is catalyzed by iron¹. In the experiments here described substantial differences are demonstrated between hydrogen peroxide and a hydrogen peroxide-producing compound with respect to DNA degradation in the presence of metal chelating agents. The degradation of the DNA was followed by means of viscosity measurements².

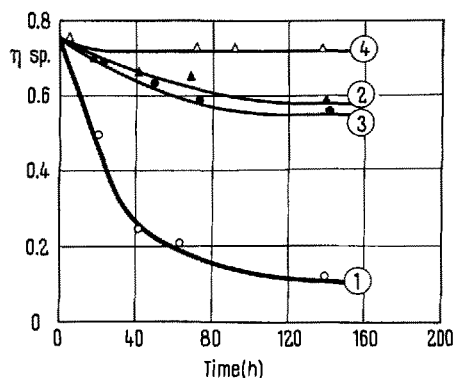


Fig. 1. Effect of metal chelating agents on the DNA degradation by hydrogen peroxide. (1) 0.0005 mole/l hydrogen peroxide only. (2) 0.0005 mole/l hydrogen peroxide and 0.01% desferrioxamine B. (3) 0.0005 mole/l hydrogen peroxide and 0.01% EDTA. (4) Control: DNA solution without hydrogen peroxide.

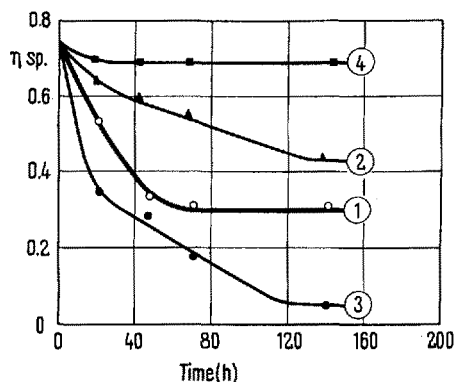


Fig. 2. Effect of metal chelating agents on the DNA degradation by 1-methyl-2-p-(isopropylcarbamoyl)-benzyl-hydrazine hydrochloride. (1) 0.0005 mole/l 1-methyl-2-p-(isopropylcarbamoyl)-benzyl-hydrazine hydrochloride. (2) 0.0005 mole/l 1-methyl-2-p-(isopropylcarbamoyl)-benzyl-hydrazine hydrochloride and 0.01% desferrioxamine B. (3) 0.0005 mole/l 1-methyl-2-p-(isopropylcarbamoyl)-benzyl-hydrazine hydrochloride and 0.01% EDTA. (4) 0.0005 mole/l 1-methyl-2-p-(isopropylcarbamoyl)-benzyl-hydrazine hydrochloride, 0.01% EDTA and 0.001% catalase.

The DNA preparation used in our experiments contained about 0.01% iron and it is therefore readily degraded by hydrogen peroxide. The degradation can be almost completely suppressed by the addition of a suitable chelating agent for iron. This becomes evident from the experimental results presented in Figure 1. Curve 1 shows the decrease of the specific viscosity of a 0.07% w/v aqueous solution of DNA, caused by the presence of 0.0005 moles/liter hydrogen peroxide, and the curves 2 and 3 demonstrate the inhibition of the viscosity decrease by 0.01% desferrioxamine B³ and 0.01% ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA)⁴ respectively. Curve 4 shows that the viscosity of the solution remains almost constant when no hydrogen peroxide is added.

Surprisingly, the effect of the above-mentioned chelating agents on the DNA degradation is quite different when the hydrogen peroxide is replaced by a compound which is known to yield hydrogen peroxide in aqueous solution as a result of its autoxidation, namely 1-methyl-2-p-(isopropylcarbamoyl)-benzylhydrazine hydrochloride. In Figure 2, the results are presented of experiments which were carried out with 0.0005 moles/liter of the hydrazine compound instead of hydrogen peroxide but under otherwise identical conditions as in the experiments of Figure 1. According to these results, desferrioxamine B inhibits the degradation of DNA by the methylhydrazine compound to a much lesser extent than the degradation by added hydrogen peroxide (curve 2), whereas EDTA even has a pronounced promoting effect on the DNA degradation (curve 3).

The viscosity decrease of the DNA solution containing the methylhydrazine compound and EDTA can be completely suppressed by the addition of 0.001% catalase⁵ (curve 4). It is therefore concluded that the hydrogen peroxide formed from the hydrazine compound is the intermediate responsible for the DNA degradation, also when EDTA is present in the solution.

The difference in the action of chelating agents on the DNA degradation by added hydrogen peroxide and by a hydrogen peroxide-producing hydrazine derivative may be explained by the reducing power of the latter compound or of the products formed during their autoxidation⁶. As is known, strong reducing agents can cause the formation of OH radicals from hydrogen peroxide and thereby promote the degradation of DNA⁷. The methylhydrazine compound used in our experiments would thus act both as producer and as activator of hydrogen peroxide. Ap-

¹ J. A. V. BUTLER and B. E. CONWAY, *J. chem. Soc.* 1950, 3418. - J. A. V. BUTLER and K. A. SMITH, *Nature* 165, 847 (1950).

² A more detailed description of the experimental conditions is given in K. BERNEIS, *Helv. chim. Acta* 46, 57 (1963). - See also K. BERNEIS, M. KOFLER, W. BOLLAG, and A. LANGEMANN, *Exper.* 19, 132 (1963). All experiments and the viscosity measurements were carried out at 37°C. As to the cytotoxic activity of the compound mentioned, see P. ZELLER, H. GUTMANN, B. HEGEDÜS, A. KAISER, A. LANGEMANN, and M. MÜLLER, *Exper.* 19, 129 (1963). - W. BOLLAG and E. GRUNBERG, *Exper.* 19, 130 (1963). - A. RUTISHAUSER and W. BOLLAG, *Exper.* 19, 131 (1963).

³ Desferal® Ciba, Basel, Switzerland.

⁴ Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (= Komplexon III), supplied by Siegfried, Zofingen (Switzerland).

⁵ Supplied by Boehringer, Mannheim (Germany).

⁶ K. BERNEIS, M. KOFLER, W. BOLLAG, P. ZELLER, A. KAISER, and A. LANGEMANN, *Helv. chim. Acta* 46, 2157 (1963).

⁷ B. E. CONWAY and J. A. V. BUTLER, *J. chem. Soc.* 1952, 834. - J. A. V. BUTLER, *Organic Peroxides in Radiobiology* (Pergamon Press, London 1958), p. 36.

parently the activation of the hydrogen peroxide by the hydrazine compound is promoted by the EDTA iron complex. This observation seems of interest in connection with the well-known catalytic activity of complexes between EDTA and iron^{8,9}.

Zusammenfassung. Es wird gezeigt, dass die Chelatbildner für Eisen, Desferrioxamin B und Äthylendiamintetraacetat (EDTA), den Abbau von Desoxyribonucleinsäure (DNS) durch Wasserstoffperoxid stark hemmen. Dagegen wird der durch eine Wasserstoffperoxid liefernde Methylhydrazinverbindung bewirkte DNS-Abbau vom ersteren Chelatbildner viel weniger gehemmt und vom letzteren sogar verstärkt. Diese Unterschiede zwischen dem Effekt des Wasserstoffperoxids und dem des Wasserstoffperoxid-Bildners können auf das Reduktionsver-

mögen der Wasserstoffperoxid liefernden Verbindung zurückgeführt werden.

K. BERNEIS, M. KOFLER, and W. BOLLAG

Forschungsabteilung, F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel (Switzerland), October 17, 1963.

⁸ E. TANNER, W. SCHULER, and R. MEIER, *Helv. chim. Acta* **42**, 445 (1959). – S. FALLAB, *Chimia* **16**, 189 (1962). – J. H. GREEN, B. J. RALPH, and P. J. SCHOFIELD, *Nature* **198**, 754 (1963).

⁹ TANNER et al.⁸ have found a catalytic activity of a phenanthroline-iron complex in certain systems. In our experiments it was noted that 0.01% of phenanthroline has a promoting effect on the DNA degradation, both by the methylhydrazine compound as well as by added hydrogen peroxide.

Über die Beziehungen zwischen Albumin- γ -Globulin-Quotienten und der immunologischen Reaktionsfähigkeit

Die immunologische Reaktionsfähigkeit eines Organismus ist durch quantitative Bestimmung der Serumantikörper nach Antigenapplikation messbar. Eine Aussage über die Quantität der Fähigkeit zur Antikörperbildung eines Organismus schon vor der Antigenverabfolgung treffen zu können, wäre von grosser Bedeutung für die Auswahl von Tieren, die der Immunschutzproduktion dienen sollen. Die von STÖCKL¹ an Pferden durchgeführten Rotlaufimmunisierungen führten zu dem Ergebnis, dass Tiere, die vor der Immunisierung einen hohen Albumin- γ -Globulin-Quotienten aufwiesen, trotz geringer applizierter Kulturmengen einen hohen spezifischen Schutzwert des Serums erkennen liessen. Zu ähnlichen Ergebnissen führte die Immunisierung von Kaninchen mit Hammelerythrocyten².

Da wir³ eine grössere Anzahl von Katzen im Rahmen einer anderen Fragestellung immunisiert haben, möchten wir zu der Frage Stellung nehmen, ob der Erkenntnis von STÖCKL ein allgemeinbiologisches Prinzip zugrunde liegt. Wir immunisierten Katzen am 1., 5. und 9. Versuchstag mit einer hitzeabgetöteten Vakzine von *Bruc. abortus* und ermittelten den Immunisierungseffekt durch Bestimmung der agglutinierenden Antikörper. Die Seren wurden ausserdem papierelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Elutionsmethode ausgewertet.

Die Errechnung des Quotienten an 169 Seren führte zu einem Mittelwert von 3,9. Der von uns aus den STÖCKL'schen Zahlenangaben aus 32 Einzelwerten errechnete Quotientenmittelwert beträgt 1,4.

Um zu der aufgeworfenen Frage Stellung nehmen zu können, korrelierten wir den Wert des Quotienten jeweils mit dem während der 26tägigen Versuchsperiode erreichten höchsten Titerwert der Agglutinine. Wir bezogen somit das titerserologische Ergebnis unabhängig vom Entnahmetag in die Rechnung ein, um eventuell auftretende Unterschiede in der Geschwindigkeit der AK-Bildung ausschalten zu können. Wir bestimmten den Korrelationskoeffizienten (r), die zugehörige Grösse z ⁴ und errechneten den mittleren Fehler zu z , m_z .

Eine Bestätigung der These, dass ein grosser Albumin- γ -Globulin-Quotient Voraussetzung für hohe Titerwerte ist, erfolgt, wenn z grösser ist als $3 m_z$. Diese Forderung wird in unserem Beispiel nicht erfüllt ($z = 0,133$;

$3 m_z = 0,2328$), so dass keine signifikante positive Korrelation zwischen dem Quotienten und dem Antikörperbildungsvermögen besteht.

Da die von uns vorgenommene Immunisierung unter der Einwirkung verschiedener Pharmaka erfolgte, erhebt sich die Frage, ob die Betrachtung der einzelnen Gruppen zu einer anderen Aussage führen könnte. Neben einer Kontrollgruppe immunisierten wir Tiere unter Megaphen-, Chloralhydrat-, Pervitin- und Adrenalineinwirkung.

Die Korrelationskoeffizienten der einzelnen Kollektive

	Anzahl	r	z	m_z	$3 m_z$
Kontrollkollektiv	28	0,28	0,29	0,2	0,6
Pervitinkollektiv	52	0,02	0,02	0,14	0,42
Adrenalinkollektiv	38	-0,09	-0,09	0,17	0,51
Chloralhydratkollektiv	23	-0,15	-0,15	0,22	0,66
Megaphenkollektiv	28	0,03	0,03	0,2	0,6

Den Korrelationskoeffizienten errechneten wir mit folgender Formel:

$$r = \frac{\sum x y - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right) \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right)}}$$

Dabei bedeuten: x : Albumin- γ -Globulin-Quotient. y : Logarithmus des reziproken Titerwertes. n : Anzahl der verglichenen Wertepaare.

Wie die tabellarische Zusammenstellung zu erkennen gibt, zeigen das Adrenalin- und das Chloralhydratkollektiv einen negativ von Null verschiedenen Korrelationskoeffizienten. Diese statistisch nicht signifikanten Einzelergeb-

¹ W. STÖCKL, *Zbl. Vet. Med.* **1**, 330 (1954).

² H. PETER, A. HANSER und D. AMELUNG, *Z. Immun. Forsch.* **109**, 383 (1951/52).

³ G. NAUMANN und J. WILDE, *Z. Immun. Forsch.* **115**, 16 (1958). – J. WILDE und G. NAUMANN, *Z. Hyg.* **145**, 143 (1958); *Z. inn. Med.* **1958**, 180.

⁴ E. WEBER, *Grundriss der biologischen Statistik*, 2. Aufl. (VEB Gustav Fischer, Jena 1956).