

Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus von Procarbazin (Natulan®).

In früheren Versuchen konnte ein mitosehemmender Effekt von Methylbenzylhydrazin (MBH) gezeigt werden (RUTISHAUSER und BOLLAG¹). Die von dieser Substanz abgeleitete Verbindung 1-Methyl-2-*p*-(isopropyl-carbamoyl)-benzylhydrazin-hydrochlorid, Ibenzmethylin oder Natulan®, weist im Tierexperiment (BOLLAG²) wie in der Klinik eine starke cytostatische Wirksamkeit auf. Die nachfolgenden Versuche wurden durchgeführt, um über den Wirkungsmechanismus von Natulan mehr Aufschluss zu erhalten. Als cytologische Methoden dienten uns die Bestimmung des Mitoseindexes sowie der autoradiographische Nachweis des Einbaus von Tritium-markiertem Thymidin in die Desoxyribonukleinsäure des Kerns. Wir arbeiten wie in früheren Versuchen mit dem Ehrlich-Ascites-Carcinom (EAC), Stamm B (RUTISHAUSER³).

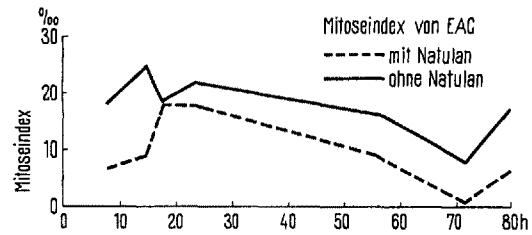
Albino-Mäuse aus einer randomisierten geschlossenen Eigenzucht von 20–25 g Gewicht wurden mit 0,2 ml frischem Ascites, 10–15 Mill. Zellen enthaltend, i.p. inoculiert. 4 Tage nach der Implantation wurde eine einzelne Injektion von 200 mg Natulan/kg Körpergewicht in wässriger Lösung i.p. injiziert. Nach verschiedenen Zeitabständen wurde der Mitoseindex jeweils an 4–7 Versuchstieren bestimmt. Feulgen-Technik und Orcein-Färbung sowie die Charakteristika des Ascitestumors sind anderswo beschrieben (RUTISHAUSER³). Pro Versuchstier und Tumor wurden in 5 Trockenpräparaten je 5000 Zellen ausgezählt. Wie aus der Figur hervorgeht, sinkt der Mitoseindex bei Gaben von 200 mg Natulan/kg Körpergewicht nach 8 h stark ab: von 18,2% auf 6,9%, also um 62,1%. Er bleibt auf diesem niedrigen Niveau bis 15 h nach der Behandlung: ein Mitoseindex von 9,1% beim Natulanversuch ergibt in diesem Zeitpunkt gegenüber der Kontrolle von 24,8% einen Abfall von 63,3%. Der Mitoseindex steigt dann wieder an und erreicht 18 h nach Behandlung fast den Wert der Kontrolle (18,2% gegenüber 18,7% bei der Kontrolle). Später sinkt der Mitoseindex, gemessen an der Kontrolle, wieder stetig ab – wobei allerdings zu bemerken ist, dass er nur in relativ langen Zeitintervallen gemessen worden ist – und erreicht nach 80 h den Wert von 6,4%, das heisst er ist um 63,4% kleiner als der Mitoseindex der Kontrolle (17,5%). Aus diesen Versuchen geht hervor, dass sich der cytostatische Einfluss des Natulans über eine sehr lange Zeit erstreckt. Da nach unseren autoradiographischen Untersuchungen der Mitosezyklus der Zellen des Stammes B ca. 16–18 h dauert, werden vermutlich durch eine einzige Natulangabe mehrere Mitosezyklen cytostatisch beeinflusst. Die Ursachen für den Anstieg des Mitoseindex zwischen 15 h und 18 h lassen sich vorläufig noch nicht mit Sicherheit angeben. Sie könnten darin liegen, dass 15–18 h nach Beginn der Natulanbehandlung die Synthese, die vermutlich gegenüber der Kontrolle stark verlängert wird, beendet ist, worauf eine grosse Zahl von Asciteszellen in die Mitose eintreten (die G₂-Phase ist nach unseren autoradiographischen Untersuchungen kurz). Über dieses Problem werden wir in einer späteren Arbeit eingehend berichten.

Die früheren Mitoseindexresultate für MBH¹ (1963) sind mit den jetzigen für Natulan quantitativ nicht vergleichbar, da in der vorliegenden Arbeit (1965/66) allgemein niedrigere Mitoseindices erhalten wurden. Der bei unseren Experimenten verwendete EAC Stamm B, weist jetzt (1965/66) eine gegenüber früher (1963) verminderte Proliferationsrate auf.

Um den Wirkungsmechanismus des Natulans besser kennen zu lernen, war es notwendig, den Ursachen des starken mitosehemmenden Effektes dieser Verbindung

nachzugehen, insbesondere auch deshalb, weil die chromosomenbrechende Wirkung des Natulans nach unseren Beobachtungen – die Brüche entstehen auf chromatidaler Basis – vermutlich ebenfalls auf die Interphase beschränkt ist. Zu diesem Zwecke wurden am Ehrlich-Ascitescarcinom des von uns cytologisch analysierten B-Stammes (RUTISHAUSER³) kombinierte Versuche mit Natulan (200 mg/kg) und Tritium-markiertem Thymidin, 10 µc H³-Thymidin (methyl-T), durchgeführt. Als Kontrolle wurden EAC-Mäuse der gleichen Altersstufe mit 10 µc H³-Thymidin i.p. allein behandelt. Natulan wurde in einem Versuch 8 h vor H³-Thymidin im andern Versuch 72 h vor H³-Thymidin in einer einmaligen Dosis von 200 mg/kg i.p. injiziert. In beiden Versuchsserien betrug die Behandlungsdauer mit H³-Thymidin 10 h, worauf die Ascitestumoren nach den üblichen Methoden zu cytologischen Präparaten verarbeitet und nach dem «stripping film»-Verfahren autoradiographiert wurden. Die Expositionszeit betrug in allen Versuchen 25 Tage bei einer Temperatur von 4°C. Für jede Versuchsserie, mit Ausnahme des 72 h-Versuches, wurden 3–4 Tiere verwendet und von jedem Tumor mehrere Präparate analysiert. Der Hintergrund zeigte in allen Versuchen zwischen 2 und 3 Silberkörner (Punkte) pro Kernareal. Als aktiv – in bezug auf DNS-Synthese – wurden Zellkerne bezeichnet, über denen 4 und mehr Punkte festgestellt werden konnten. Die Wahl der relativ niedrigen Aktivität von 4 Punkten als untere Grenze hat den Nachteil, dass eventuell einzelne Kerne als aktiv taxiert werden, die im Streubereich des Hintergrundes liegen. Da aber der Hintergrund aller analysierten Präparate gleich gross und die Gesamtzahl der Punkte über den Zellkernen mit geringer Aktivität kleiner als 1% war, fällt der Fehler nicht ins Gewicht. Bestimmt wurden auf diese Weise: (1) die relative Zahl der aktiven Zellkerne (Tabelle I), und (2) die Zahl der Silberkörner über allen untersuchten und allen aktiven Zellkernen (Tabelle II).

Wie aus Tabelle I ersichtlich ist, sind die Frequenzen der aktiven Zellkerne ohne und mit Natulanbehandlung nicht wesentlich verschieden, mit Ausnahme allerdings des 72 h mit Natulan behandelten Tumors, wo nur 46,5% aktive Zellen gezählt wurden. Das Natulan verhindert also den Einbau von Thymidin nicht völlig oder dann nur bei einer sehr kleinen Anzahl von Zellkernen und bei längerer Behandlungsdauer. Deutlich und signifikant ist dagegen der Unterschied hinsichtlich der mittleren Frequenz der Silberkörner bezogen auf die totale Zellzahl und die aktiven Zellkerne (Tabelle II). Dieses Resultat bedeutet, dass der Einbau von Thymidin und damit die DNS-Synthese durch eine Natulangabe von 200 mg/kg



Mitoseindices von EAC in vivo mit und ohne Natulanbehandlung.

¹ A. RUTISHAUSER und W. BOLLAG, Experientia 19, 131 (1963).

² W. BOLLAG, Cancer Chemother. Rep. 33, 1 (1963).

³ A. RUTISHAUSER, Neuj Bl. naturf. Ges. Zürich 1 (1963).

Tabelle I. Frequenz der aktiven Zellkerne eines EAC in vivo ohne und mit Natulanbehandlung, 10 h nach Injektion von $10 \mu\text{c}$ H^3 -Thymidin i.p.

Natulan	Dosis mg/kg	h vor H^3 -Thymidin Injektion	H^3 -Thymidin	Dauer h	Anzahl Versuchs- tiere	Anzahl aller		Aktive Zellen %
			Dosis μc			analysierten Zellen	aktiven Zellen	
0	0	0	10	10	4	1500	989	65,9
200	8	8	10	10	3	3000	1841	61,4
200	72	72	10	10	1	1000	465	46,5

Tabelle II. Frequenz der Silberkörner bezogen auf alle und auf die aktiven Zellkerne eines EAC ohne und mit Natulanbehandlung, 10 h nach Injektion von $10 \mu\text{c}$ H^3 -Thymidin i.p. (vgl. auch Tabelle I)

Natulan	Dosis mg/kg	H^3 -Thymidin			Summe aller aktiven Zellkerne	Silber- körner total	Mittlere Frequenz der Silberkörner		
		h vor H^3 -Thymidin Injektion	Dosis μc	Dauer h			Variations- breite bei aktiven Kernen	pro Zellkern	pro aktivem Zellkern
0	0	0	10	10	989	16960	4-92	11,3	17,2
200	8	8	10	10	1841	14480	4-45	4,8	7,9
200	72	72	10	10	465	3103	4-41	3,1	6,7

Körpergewicht wesentlich herabgesetzt oder mindestens verzögert wird. Der Thymidineinbau scheint dabei um so mehr behindert zu sein, je länger die Natulanbehandlung dauert. Sowohl die Maximalzahl wie auch die mittlere Anzahl Silberkörner pro Zellkern nimmt mit zunehmender Dauer der Natulanbehandlung innerhalb der gemessenen Behandlungsdauer ab.

Die in Tabelle II zusammengestellten Resultate über die Aktivität der Zellkerne stimmen gut mit den Werten überein, die bei der Bestimmung des Mitoseindex erhalten worden waren, und erhärten von neuem die Hypothese, wonach Natulan in der Interphase, und zwar in der S- oder G₂-Phase, wirksam ist. Diese Auffassung wird nun durch zwei unabhängig voneinander festgestellte Befunde gestützt: (1) Die Chromosomenaberrationen erfolgen stets auf chromatidaler Basis, was auf ihre Induktion in der S-Phase, eventuell auch in der G₂-Phase des Mitosezyklus hinweist (RUTISHAUSER und BOLLAG¹). Wegen der relativ kurzen Dauer der G₂-Phase ist aber die S-Phase als Zeitpunkt für das Bruchgeschehen wahrscheinlicher. (2) Die DNS-Synthese, gemessen am Ausmass des Thymidineinbaus, wird durch Natulan gehemmt.

Gute Übereinstimmung zwischen Autoradiographieuntersuchungen und den Resultaten der MI-Bestimmungen ergibt sich vor allem aus einer Gegenüberstellung der MI-Werte und der Frequenz der Silberkörner über den aktiven Zellkernen: Dem Abstieg des MI-Wertes 8 h nach Natulanbehandlung um 62,1% entspricht eine Frequenz von durchschnittlich 7,9 Silberkörnern pro Zellkern (gegenüber 17,2 Körnern der Kontrolle, was einem Minderwert von 54,1% entspricht). Dem Abfall des MI-Wertes um 63,4% bei 72 h entspricht ein Minderwert von 61,0% Silberkörnern.

Diese Befunde legen den Gedanken nahe, dass die beiden Vorgänge eng miteinander verknüpft sein könnten. Sie könnten zum Beispiel bedeuten, dass der Mitoseindex nach Natulanbehandlung beshalb so stark absinkt, weil die Vorbereitungen für die Durchführung der Mitosen

(Bereitstellung der notwendigen Verbindungen, besonders DNS) verlangsamt bzw. verzögert sind. Tatsächlich beträgt die Maximalzahl von Punkten über den aktiven Zellkernen 8 h nach Beginn der Natulanbehandlung nur 45 gegenüber 92 beim Kontrollversuch.

Unsere Befunde, die auf eine Hemmung der DNS-Synthese hinweisen, stimmen gut mit den Ergebnissen anderer Autoren überein, die mit anderen Methoden bzw. an anderen Objekten ebenfalls eine Beeinträchtigung der DNS-Synthese durch Natulan beobachten konnten (FOELSCH et al.⁴, KREIS⁵, TREPEL et al.⁶, WEITZEL⁷)⁸.

Summary. The cytotoxic methylhydrazine derivative procarbazine or Natulan® has a marked influence on the synthesis of deoxyribonucleic acid in Ehrlich ascites carcinoma cells. The incorporation of ^3H -thymidine into DNA – measured by autoradiographic methods – is inhibited.

A. RUTISHAUSER und W. BOLLAG

Cytologisches Laboratorium des Instituts für allgemeine Botanik, Universität Zürich und Medizinische Forschungsabteilung, F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel (Schweiz), 28. September 1966.

⁴ E. FOELSCH, J. DREWS und H. GRUNZE, Verh. dt. Ges. inn. Med., 70, 995 (1964).

⁵ W. KREIS, Proc. Am. Ass. Cancer Res. 13, 39 (1966).

⁶ F. TREPEL, J. RASTETTER, H. THEML und G. STOCKHUSEN, Medsche Klin. 61, 618 (1966).

⁷ G. WEITZEL, persönliche Mitteilung.

⁸ Diese Arbeit wurde mit finanzieller Unterstützung durch die Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel, und den Schweiz. Nationalfonds ausgeführt.