

Cytostatische Effekte organischer Persauerstoff- Verbindungen gegenüber Ascites-Krebszellen*

Von

Günther Weitzel, Eckhart Buddecke und Friedhelm Schneider

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen

(Der Schriftleitung zugegangen am 24. Dezember 1960)

Durch Vergleich der Inhibitorwirkungen von Zink, Persauerstoff und Alkylierungsmitteln konnten wir an einzelnen Fermenten^{1, 2} und an Hefezellen³ zeigen, daß die Hemmeffekte von Zinkverbindungen denen der beiden anderen Inhibitorgruppen gleichkommen. Dagegen fanden wir⁴ in Versuchen an Asciteszellen des Ehrlich'schen Mäusecarcinoms, daß Zinkverbindungen die Atmung und Glykolyse dieser Zellen nicht in so hohem Maße hemmen, wie z. B. einige der zum Vergleich geprüften organischen Persauerstoffverbindungen. Bei dieser Inhibitorgruppe sind die möglichen Strukturvariationen so zahlreich, daß alle gewünschten Wirkungsabstufungen zu erzielen sind. Inzwischen teilten wir^{5, 6} mit, daß bestimmte organische Peroxyde das Wachstum des Mäuse-Ascites-Carcinoms auch im Tierexperiment vollständig unterdrücken. (Ausführliche Beschreibung: siehe die folgende Arbeit in dieser Z.)

Wir berichten nachstehend über die Hemmeffekte, die wir mit Peroxyhydraten und mit organischen Peroxyden an Asciteszellen beobachteten, und über die dabei feststellbaren Schädigungen in der Glykolysekette. Wie in der vorangehenden Arbeit (Zink-Hemmungen an Asciteszellen⁴) handelt es sich um manometrische Versuche mit der Warburg-Technik an intakten Asciteszellen sowie um Bestimmungen von Fermentaktivitäten, DPN[®] und Substrat-

* Es werden folgende Abkürzungen benutzt: EDTA = Äthylendiamintetraacetat; Aldolase = Fructose-diphosphataldolase; DPN[®] = Diphosphopyridinnucleotid; FDP = Fructose-1.6-diphosphat; GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Triosephosphat-Dehydrogenase); MDH = Milchsäure-Dehydrogenase.

¹ G. Weitzel u. W. Schaeg, diese Z. **316**, 250 [1959].

² G. Weitzel, H. König, G. Benwitz u. P. Wahl, diese Z. **316**, 267 [1959].

³ G. Weitzel u. E. Buddecke, diese Z. **317**, 150 [1959].

⁴ G. Weitzel u. E. Buddecke, diese Z. **323**, 14 [1961].

⁵ G. Weitzel, E. Buddecke u. F. Schneider, vorgetragen (G. W.) am 10. Okt. 1960 auf der Tagung für Physiologische Chemie in Zürich.

⁶ G. Weitzel, E. Buddecke u. F. Schneider, Angew. Chem. **72**, 920 [1960].

konzentrationen. Soweit die von uns geprüften Persauerstoff-Verbindungen bisher nicht bekannt waren, beschreiben wir in der vorliegenden Arbeit ihre Darstellung; zugleich geben wir für einige bekannte Substanzen verbesserte Synthesevorschriften. Daneben prüften wir die eingesetzten Persauerstoff-Verbindungen *in vitro* auf ihre enzymatische Angreifbarkeit durch Katalase.

Methodik

a) Ascitezellen und Manometrie

Die Gewinnung der Mäuse-Ascitezellen des Ehrlich-Ascites-Carcinoms erfolgte, wie l. c.⁴ beschrieben. Für die manometrischen Ansätze wurden zwei verschiedene Inkubationsmedien benutzt: 1. Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung für Atmungsmessung, Krebs-Ringer-Hydrogencarbonat-Lösung für anaerobe Glykolyse, und 2. die gleichen Pufferlösungen mit Zusatz von 50% Humanserum. (Serumkonserve, Behring-Werke, Marburg). Einzelheiten zur Manometrie s. l. c.⁴. Zahl der Ascitezellen im Ansatz: $3-3,5 \cdot 10^7$ Zellen in $2,1 \text{ cm}^3$ (Manometrie) bzw. $2,0 \text{ cm}^3$ (Ferment- und Substratbestimmungen).

Mittelwert, Streuung und Signifikanz der angegebenen Hemmwerte für Atmung und anaerobe Glykolyse ergeben sich aus der Standardabweichung (s), die aus Doppelbestimmungen von 100 Kontrollansätzen ermittelt wurde.

Bezogen auf je $1 \cdot 10^6$ Zellen waren Q_{O_2} 1,88 ($s = \pm 0,134$) und $Q_M^{N_2}$ 13,45 ($s = \pm 0,633$). Unter Zugrundelegung einer Sicherheitsgrenze von $3s$ sind demnach Abweichungen vom Kontrollwert um mehr als 21,3% für die Atmung und mehr als 14,1% für die anaerobe Glykolyse statistisch gesichert.

b) Fermentmessungen und Substratbestimmungen

Fermentaktivitäten: Herstellung eines Aceton-Trockenpulvers aus der Ascites-Zellsuspension wie beschrieben⁴. Die angegebenen Aktivitätseinheiten beziehen sich auf 1 mg Aceton-Trockenpulver.

DPN[®]- und Substratbestimmungen: Aufschluß der Zellsuspension mit 10proz. Perchlorsäure, jedoch ohne Zusatz von festem EDTA vor Neutralisation mit KOH, im übrigen wie beschrieben^{3, 4}.

c) Peroxohydrate und Peroxyde im Katalasetest

Katalasestammlösung: 0,025 ml Katalase-Kristallsuspension (Boehringer) mit $m/45$ Phosphatpuffer (pH 7,6) auf 100 ml auffüllen.

Substrate: $1,25-2,5 \cdot 10^{-4}$ Mol in 20 bzw. 25 ml Phosphatpuffer lösen (pH 7,0).

Fermentansatz: Die in 20 bzw. 25 ml Phosphatpuffer gelösten Substrate wurden mit 0,05 (0,1) ml Katalasestammlösung bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach 10, 30 und 60 Min. wurden je 2,0 ml des Ansatzes entnommen und der Gehalt an aktivem Sauerstoff wurde durch jodometrische Titration ermittelt:

a) Perhydrate:

2,0 ml Fermentansatz
15,0 ml 0,2n KJ-Lösung
15,0 ml 2n H₂SO₄
3-4 Tropfen 1n (NH₄)₂MoO₄
1,0 ml Stärkelösung (0,5%)

b) Peroxyde:

2,0 ml Fermentansatz
5,0 ml Eisessig
1,0 ml gesätt. KJ-Lösung
5 Min. erwärmen
1 ml Stärkelösung (0,5%)

a) und b): Titration mit 0,02n Na₂S₂O₃-Lösung.

Substanzen

Persauerstoff-Analysen: Jodometrische Titration, wie vorstehend beschrieben, in Eisessig oder $2n$ H_2SO_4 (Anstelle des Fermentansatzes tritt die eingewogene Persauerstoff-Verbindung).

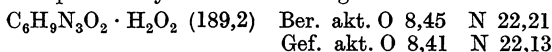
Stickstoff-Analysen nach Dumas.

Molekulargewichtsbestimmungen nach der osmotischen Methode (isotherme Destillation) von G. Barger⁷ gegen Azobenzol. Lösungsmittel: Äthanol.

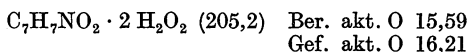
Die nachstehend beschriebenen Persauerstoff-Verbindungen sind bei Aufbewahrung im Kühlschrank bei 0° mehrere Wochen stabil (Ausnahme s. u. 5 I a), wovon wir uns durch laufende Persauerstoff-Analysen überzeugen.

Organische Peroxohydrate

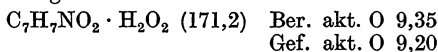
L-Histidin-peroxohydrat: Darstellung nach l. c.⁸



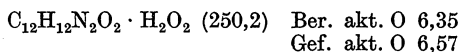
Trigonellin-peroxohydrat (1:2): Man löst 1 g Trigonellin in 5 cm³ 30proz. H_2O_2 , läßt über Nacht bei -10° stehen und engt im Exsikkator bei Zimmertemperatur ein, bis sich Kristalle abscheiden. Diese werden abgesaugt und mit wenig Aceton gewaschen.



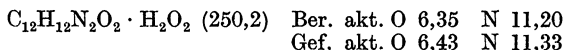
Trigonellin-peroxohydrat (1:1): Man löst 1 g Trigonellin in 1 cm³ 30proz. H_2O_2 . Darstellung wie vorstehend.



1.2-Bis-[pyridyl-(4)]-glykol-peroxohydrat (DL-Form): 0,5 g Substanz (Raschig, Ludwigshafen) löst man in etwa 10 cm³ 30proz. H_2O_2 unter vorsichtigem Erwärmen. Die klare Lösung bewahrt man 1 bis 2 Tage bei -10° auf, bis ein kristalliner Niederschlag entstanden ist. Absaugen, Waschen der Kristalle mit Aceton.



1.2-Bis-[pyridyl-(4)]-glykol-peroxohydrat (meso-Form): 0,5 g Substanz (Raschig, Ludwigshafen) werden in 20 bis 25 cm³ 30proz. H_2O_2 unter Erwärmen bis auf 80 bis 90° gelöst. Man filtriert heiß und läßt über Nacht bei -10° stehen. Die entstandenen Kristalle werden abgesaugt und mit wenig Aceton gewaschen.



Organische Peroxyde

1. Peroxo-carbonsäuren

Als Beispiel der von uns nach l. c.⁹ dargestellten Peroxocarbonsäuren von C_3 bis C_{16} geben wir die Vorschrift für Capronpersäure: 23,2 g (0,02 Mol) n-Capronpersäure löst man in 46,4 g konz. Schwefelsäure und läßt 40 cm³ 30proz. H_2O_2

⁷ Siehe Pregl-Roth, Quantitative organ. Mikroanalyse, S. 336, Springer-Verlag, Wien 1958.

⁸ W. Dirscherl u. K. Mosebach, Naturwissenschaften 41, 552 [1954].

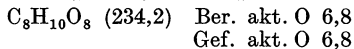
⁹ W. E. Parker, C. Ricciuti, C. L. Ogg u. D. Swern, J. Amer. chem. Soc. 77, 4037 [1955].

innerhalb 20 Min. zutropfen. Dabei wird die Temperatur der Mischung stets bei -10° gehalten. Die gebildete Capronpersäure wird in Petroläther aufgenommen und daraus durch Ausfrieren bei -30° gewonnen. Die Präparate besitzen einen Per-sauerstoffgehalt von 93 bis 98% d. Th.

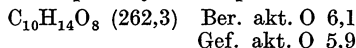
2. Diacyl-peroxyde

Dibenzoyl-peroxyd: Präparat von Riedel-deHaen. Das angefeuchtete Pulver besaß nach Trocknen den Schmp. $104-105^{\circ}$ und wurde in dieser Form verwendet.

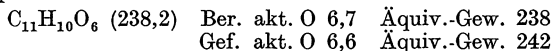
Saures Disuccinperoxyd: Darstellung nach l. c.¹⁰ aus Bernsteinsäure-anhydrid und Wasserstoffperoxyd. Schmp. $115-120^{\circ}$.



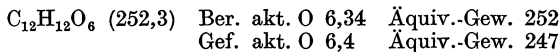
Saures Diglutarperoxyd: Darstellung nach l. c.¹⁰ aus Glutarsäure-anhydrid und Wasserstoffperoxyd. Schmp. $105-108^{\circ}$.



Saures Succin-benzoyl-peroxyd: 150 cm^3 Chloroform, die etwa 7 g Benzopersäure enthalten, werden bei Zimmertemperatur mit 5,5 g Bernsteinsäure-anhydrid versetzt und geschüttelt, bis sich alles gelöst hat. Nach 12stdg. Aufbewahrung bei Zimmertemperatur wird das Chloroform im Vak. bis zur beginnenden Kristallisation verdampft. Nach Stehenlassen im Tiefkühlschrank saugt man die Kristalle ab, löst in Äther und läßt durch Zugabe von Petroläther kristallisieren. Schmp. $101-104^{\circ}$.



Saures Glutar-benzoyl-peroxyd: Diese Verbindung wurde auf demselben Wege erhalten wie die Succinyl-Verbindung. Wegen der größeren Löslichkeit des Glutarsäure-anhydrids benötigte man nur 50 ml Chloroform. Dadurch kam es schon bei Zimmertemperatur zur Ausscheidung des kristallinen Peroxyds. Schmp. $67-68^{\circ}$.



3. tert.-Butyl-persäureester

Saures tert.-Butyl-succin-peroxyd (s. hierzu l. c.¹¹): Eine Mischung von 3 g tert.-Butyl-hydroperoxyd (s. 4a), 3,3 g Bernsteinsäure-anhydrid und 4 g Pyridin wird über Nacht bei Zimmertemperatur belassen, wobei alles in Lösung geht. Dann erwärmt man 10 Min. auf $65-68^{\circ}$, kühlt ab, setzt 4 cm^3 Aceton zu, verdünnt mit Wasser und macht mit 6n HCl kongosauer. Das ausfallende Öl wird in Äther gelöst, der Äther über Na_2SO_4 getrocknet und bis zur beginnenden Trübung mit Petroläther versetzt. Bei -20° im Kühlschrank erfolgt Kristallisation. Umkristallisation aus Äther-Petroläther. Schmp. $57-59^{\circ}$.

Saures tert.-Butyl-glutar-peroxyd: 3 g tert.-Butyl-hydroperoxyd (s. 4a), 3,6 g Glutarsäure-anhydrid und 4 g Pyridin werden, wie vorstehend beschrieben, umgesetzt und aufgearbeitet. Die äther. Lösung des Peresters wird mit gesätt. Hydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt, der Äther verworfen, die wäßrige Phase angesäuert und das ausgefallene Öl in Äther gelöst. Den über Na_2SO_4 getrockneten Äther versetzt man mit Petroläther. Im Tiefkühlschrank kristallisiert das abgeschiedene Öl langsam aus. Falls keine Kristallisation erfolgt, muß man das

¹⁰ F. Stearns & Co, Dtsch. Reichs-Pat. Nr. 170727; Chem. Zbl. 1906 II, 79.

¹¹ A. G. Davies, R. V. Foster u. A. M. White, J. chem. Soc. [London] 1953, 1541.

Ausschütteln mit Hydrogencarbonatlösung und die Fällung mit Säure wiederholen. Schmp. 35—36°.

$C_9H_{16}O_5$ (204,2) Ber. akt. O 7,8 Äquiv.-Gew. 204
Gef. akt. O 7,8 Äquiv.-Gew. 207

Saures tert.-Butyl-malein-peroxyd: Ein mit Weichmacher vermisches, käufliches Präparat (Elektrochem. Werke, München) wurde vom Weichmacher in folgender Weise befreit: Absaugen der öligen Phase auf einem Büchner-Trichter und mehrfaches sorgfältiges Nachwaschen des Kristallbreies mit gekühltem Petroläther, Trocknen des kristallinen Produktes im Vak. und Aufbewahren bei 0° unter Ausschluß von Feuchtigkeit. Schmp. 131—132°.

4. Alkylhydroperoxyde

a) tert.-Butyl-hydroperoxyd: Ein Mischpräparat aus Mono- und Di-tert.-butyl-peroxyd (Trigonox A 75 der Fa. Oxydo, Emmerich/Rh.) wird in der doppelten Menge Wasser suspendiert und im Eis-Kochsalz-Bad Natronlauge in berechneter Menge zugesetzt. Das Hydroperoxyd geht in Lösung, das Di-tert.-butyl-peroxyd scheidet sich ab. Man läßt über Nacht stehen, trennt die untere Phase ab und säuert unter Eiskühlung an; das tert.-Butyl-hydroperoxyd scheidet sich in reiner Form ab. Ausbeute: 60—70%. Man trocknet über $MgSO_4$.

b) n-Butyl-hydroperoxyd: Aus 22,9 g Methansulfonylchlorid und 14,8 g n-Butanol erhielt man durch Zutropfen von 31,6 g trockenem Pyridin bei 0—5° Methansulfonyloxybutan. Sdp.₁₂ 109°. 6,1 g dieses Produktes und 20 g Perhydrol wurden nach l. c.¹² umgesetzt und aufgearbeitet. Dabei erhielt man im Durchschnitt pro Ansatz etwa 1 g n-Butyl-hydroperoxyd. Für die meisten Zwecke wurde das Rohprodukt eingesetzt, dessen Reinheit wir durch Persauerstoffbestimmungen kontrollierten. Sdp.₁₂ ~ 50°.

$C_4H_{10}O_2$ (90,1) Ber. akt. O 17,75
Gef. akt. O 17,21

c) Cumyl-hydroperoxyd: Es wurde ein käufliches Präparat der Firma Oxydo, Emmerich/Rh., benutzt.

d) 1-Hydroxy-äthyl-hydroperoxyd: Darstellung aus äquimolaren Mengen Acetaldehyd und Wasserstoffperoxyd in äther. Lösung, l. c.¹³.

5. Bis-hydroxymethyl-peroxyd und Derivate

(Die eingeklammerten röm. Ziffern beziehen sich auf die Formeln in Tab. 3, S. 223.)

I. Stickstofffreie Verbindungen

a) Bis-hydroxymethyl-peroxyd (I): In Anlehnung an die Vorschrift von Wieland¹⁴ erhielten wir die Verbindung auf folgendem Wege: 34 cm³ 10proz. Wasserstoffperoxyd und 60 cm³ 10proz. Formaldehyd werden vermischt und 2 Stdn. bei Zimmertemperatur belassen. Man teilt die erhaltene Lösung in zwei Teile und führt eine Gefriertrocknung durch. Als Rückstand erhält man weiße Kristalle, die man mit wenig Äther vom Kolben ablöst und nach Abgießen des Äthers im Vak. trocknet. Unter Vermeidung von Reiben und Stoßen mit dem Spatel füllt man in kleine Portionen ab und bewahrt im Kühlschrank auf. Wenn die Substanz sich zu zersetzen beginnt, wird sie ölig-viscos und riecht stehend nach Ameisensäure, in die sie sich schließlich verwandelt. Das völlig trockene, kristalline Produkt ist im Kühlschrank aber sehr gut haltbar. Schmp. 62—64°. Die Substanz verpufft in der Flamme und ist gegen Stoß und Schlag empfindlich.

b) Hydroxymethyl-tert.-butyl-peroxyd¹⁵ (III): Man läßt 10 g tert.-Butyl-hydroperoxyd bei Zimmertemperatur in 7,5 cm³ 40proz. Formalin

¹² H. R. Williams u. H. S. Mosher, J. Amer. chem. Soc. 76, 2984 [1954].

¹³ A. Rieche, Ber. dtsh. chem. Ges. 64, 2328 [1931].

¹⁴ H. Wieland u. A. Wingler, Liebigs Ann. Chem. 431, 301 [1923]; A. Rieche u. R. Meister, Ber. dtsh. chem. Ges. 66, 718 [1933].

¹⁵ F. M. Dickey, F. F. Rust u. W. E. Vaughan, J. Amer. chem. Soc. 71, 1432 [1949].

unter Rühren eintropfen. Das Reaktionsprodukt löst man in Äther, trocknet mit Na_2SO_4 und destilliert. Sdp.₁₂: 59—60°. Ausbeute: 5 g.

c) Hydroxymethyl-*n*-butyl-peroxyd (II): 2 g *n*-Butyl-hydroperoxyd werden, wie vorstehend bei der tert.-Butyl-Verbindung beschrieben, mit 1,5 g 40proz. Formalin zur Reaktion gebracht und ebenso aufgearbeitet. Sdp.₁₂: 77—78°.

$\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_3$ (120,1) Ber. akt.-O 13,30.
Gef. akt.-O 12,50.

II. Stickstoffhaltige Verbindungen

a) *N*-tert.-Butylperoxymethyl-piperidin (IV): Die Verbindung wurde nach Rieche u. Mitarbeitern¹⁶ aus Piperidin, Formaldehyd und tert.-Butyl-hydroperoxyd dargestellt. Sdp.₃: 50—53°.

b) *N*-*n*-Butylperoxymethyl-piperidin (V): 2 g Piperidin, 1,8 cm³ 40proz. Formalin und 2,1 g *n*-Butyl-hydroperoxyd werden im Eisbad intensiv vermischt und 24 Stdn. in der Kälte belassen, wobei gelegentlich umgeschüttelt wird. Man löst in Äther, trocknet über Natriumsulfat und destilliert. Sdp.₁: 85°.

$\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{NO}_2$ (187,3) Ber. akt. O 8,5 N 7,5
Gef. akt. O 9,0 N 6,8

c) *N*-tert.-Butylperoxymethyl-benzamid (VII): Aus *N*-Methylol-benzamid und tert.-Butyl-hydroperoxyd erhält man in saurer Lösung nach l. c.¹⁶ ein Produkt vom Schmp. 105—110°.

d) Bis-[benzaminomethyl]-peroxyd (IX): Darstellung nach l. c.¹⁶, Schmp. 150—154°.

e) *N,N*-Bis-[tert.-butylperoxymethyl]-glycin-äthylester (X): 3,3 g Glycin-äthylester-hydrochlorid werden in 7,5 cm³ 40proz. Formaldehyd gelöst und unter Eiskühlung auf p_{H} 6,5 eingestellt. Dann gibt man 2 cm³ tert.-Butyl-hydroperoxyd unter Umschütteln hinzu, wobei es sofort zur Trübung und Abscheidung eines Öles kommt. Nach 1/2 Stde. im Eisbad wird das Öl mit Hilfe von Äther abgetrennt und die Ätherphase noch 3mal mit Wasser ausgeschüttelt. Man trocknet den Äther über Na_2SO_4 und dampft ihn im Vak. ab. Zurück bleibt ein Öl, das im Kühlschrank aufbewahrt wird.

$\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{NO}_6$ (307,3) Ber. akt. O 10,40 N 4,56
Gef. akt. O 10,5 N 4,80 Mol.-Gew. 301

f) Kondensationsprodukt aus Glycin-äthylester, Formaldehyd und Hydroperoxyd: 3,3 g Glycinäthylester-hydrochlorid werden in 7,5 cm³ 40proz. Formaldehyd gelöst und der p_{H} -Wert der Lösung auf 6,5 bis 7 gebracht. (Es soll keine Trübung durch evtl. ausgeschiedenen Ester stattfinden.) In die klare Lösung gibt man 3,5 cm³ kaltes Perhydrol. Innerhalb weniger Sekunden trübt sich die Reaktionsmischung unter Abscheidung eines Öls. Man läßt unter gelegentlichem Umschütteln noch 1/2 Stde. im Eisbad und zentrifugiert das Öl ab, sammelt aus dem Reaktionsgefäß und Zentrifugenglas das Produkt durch Lösen in wenig Äthanol (3 bis 5 cm³) und fällt durch Zugabe von Wasser. Man zentrifugiert ab und trocknet. Das Umfällen aus Äthanol/Wasser kann man, falls nötig, wiederholen. Wir schreiben der Substanz die Formel XII (s. Tab. 3) zu. Das erhöhte Molgewicht spricht für Beimischung linearer Oligomere¹⁷.

$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_4$ (161,2) Ber. akt. O 9,95 N 8,70
Gef. akt. O 9,90 N 9,0 Mol.-Gew. 230

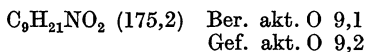
Entsprechende Kondensationen führten wir auch mit anderen Aminosäureestern, z. B. Alanin, Leucin, Valin, Asparaginsäure, Glutaminsäure durch.

g) *N*-tert.-Butylperoxymethyl-diäthylamin (XIV): 1,8 g Diäthylamin werden in 3,7 g 40proz. Formaldehyd gelöst und nach Kühlen im Eisbad

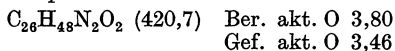
¹⁶ A. Rieche, E. Schmitz u. E. Beyer, Chem. Ber. **92**, 1206 [1959].

¹⁷ E. Schmitz, Liebigs Ann. Chem. **635**, 73 [1960].

2,25 g tert.-Butylhydroperoxyd zugesetzt. Kurz nach dessen Zugabe scheidet sich ein Öl ab, das man nach 2 Stdn. abtrennt und in Äther löst. Die äther. Lösung wird 3mal mit wenig Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und der Äther im Vak. verdampft. Das zurückbleibende Öl wurde im Vak. destilliert. Sdp.₁: 40°.



h) Bis-[dicyclohexylamino-methyl]-peroxyd (XV): Die Darstellung erfolgte nach l. c.¹⁶. Schmp. 80—82°.



i) *N,N'*-Bis-[tert.-butylperoxymethyl]-harnstoff: Darstellung nach l. c.¹⁶. Schmp. 148—149°.

Ergebnisse

1. Gärungs- und Atmungshemmung von Asciteszellen durch Persauerstoffverbindungen

Die von uns geprüften Persauerstoffverbindungen gliedern sich in zwei Gruppen: die Peroxohydrate, welche als H_2O_2 -Koordinationsverbindungen aufzufassen sind, und die organischen Peroxyde.

Serumhaltiges Inkubationsmedium

In Tab. 1 sind für einige Peroxohydrate und Peroxyde die in Gegenwart von 50% Serum gemessenen Hemmungen der Atmung und anaeroben Glykolyse von Asciteszellen zusammengestellt. Ebenso wie Schwermetalle und Alkylierungsmittel werden auch die meisten Persauerstoffverbindungen durch Serumproteine mehr oder weniger inaktiviert, so daß die Hemmeffekte in serumfreien Pufferlösungen fast stets höheres Ausmaß erreichen (s. u. Tab. 2).

Aus Tab. 1 geht hervor, daß die Wirkung der Peroxohydrate sich auf Atmung und Glykolyse erstreckt, wobei in allen Konzentrationen die Glykolysehemmung stärker ausgeprägt ist. Die Wirkungsunterschiede zwischen den einzelnen Peroxohydraten werden am deutlichsten bei einem Vergleich der Glykolysehemmungen für die Konzentration $5 \cdot 10^{-4}m$. Während die stark wirksamen Peroxohydrate (von Trigonellin und 1.2-Bis-[pyridyl-(4)]-glykol) die Glykolyse fast völlig unterdrücken, sind andere Peroxohydrate bereits wirkungslos. Das Hydroperoxyd selbst gehört zu den nur schwach wirksamen Perverbindungen; es würde in Tab. 1 etwa dem Carbamid-peroxohydrat gleichkommen.

Unerwartet und überraschend ist die Abhängigkeit der Hemmeffekte von der Struktur der organischen Peroxohydrate, welche als H_2O_2 -Koordinationsverbindungen in wäßriger Lösung dissoziieren. Zur Deutung der Wirkungsunterschiede und der gegenüber einfachem Hydroperoxyd z. T. erheblich stärkeren Hemmeffekte nehmen wir an, daß die koordinative H_2O_2 -Bindung durch geeignete organische Liganden so stabilisiert wird, daß der Angriff auf die Asciteszelle rascher

Tab. 1. Hemmung der Gärung und Atmung von Asciteszellen durch Persauerstoffverbindungen.
 Inkubationsmedium: Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer für Glykolyse bzw. Krebs-Ringer-Phosphatpuffer für Atmung
 mit Zusatz von je 50% Humanserum.

Volle Aktivität = Kontrolle = 100, Totale Hemmung = 0, Hemmeffekte auf Fünferwerte abgerundet.

Molare Inhibitor-Endkonzentration:	Anaerobe Glykolyse %				Atmung %			
	10 ⁻³	5 · 10 ⁻⁴	2 · 10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻³	5 · 10 ⁻⁴	2 · 10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
Carbamid-peroxohydrat	10	100	—	—	60	100	—	—
Histidin-peroxohydrat	10	60	100	—	90	100	—	—
1.2-Bis-[pyridyl-(4)]-glykol-peroxohydrat (<i>meso</i> *)	0	30	70	100	70	90	100	100
Trigonellin-peroxohydrat (1:1)	0	10	60	90	90	100	100	—
Trigonellin-peroxohydrat (1:2)	0	10	60	80	70	80	90	100
1-Hydroxy-äthyl-hydroperoxyd	40	70	100	—	60	80	100	—
Bis-hydroxymethyl-peroxyd	0	15	100	—	10	70	100	—
saures tert.-Butyl-malein-peroxyd	10	45	70	90	30	20	40	70
N-tert.-Butylperoxymethyl-piperidin	0	50	90	100	70	80	90	100
N.N-Bis-[tert.-butylperoxymethyl]-glycin-äthylester	10	40	100	100	40	80	90	100
N-Äthyl-maleinimid	0	5	90	100	0	0	85	90
Methyl-bis-[-β-chlor-äthyl]-amin-hydrochlorid	5	10	40	70	80	90	100	—

* Die entsprechende DL-Verbindung zeigt praktisch gleiche Hemmwerte.

abläuft als die Dissoziation des Peroxohydrates im wäßrigen Inkubationsmedium. Die benutzten organischen Liganden allein sind in vergleichbarer Konzentration gegenüber Asciteszellen wirkungslos (Kontrollversuche).

Die in Tab. 1 enthaltenen organischen Peroxyde hemmen Gärung und Atmung in etwa gleichem Maße wie die Peroxohydrate (s. o.). Freie Persäuren fehlen in der Tabelle, da sie wegen des Serumzusatzes in dieser Versuchsanordnung wirkungslos sind. 1-Hydroxy-äthyl-hydroperoxyd und Bis-hydroxymethyl-peroxyd sind dagegen stark wirksam. Auch das saure tert.-Butyl-malein-peroxyd zeigt sehr ausgeprägte, konstante Hemmeffekte und weicht damit von dem Verhalten ähnlicher Dicarbonsäure-tert.-butyl-perester in auffallender Weise ab (s. u.). Eine weitere Besonderheit dieser Verbindung besteht darin, daß sie im Gegensatz zu den meisten anderen organischen Peroxyden die Atmung stärker als die Glykolyse hemmt (s. hierzu auch Abb. 1). Als gut maskierte stickstoffhaltige organische Peroxyde finden sich in Tab. 1 zwei Derivate des tert.-Butyl-peroxymethans: die 1960 von Rieche und Mitarbeitern¹⁶ beschriebene *N*-Piperidyl-Verbindung und die erstmals von uns dargestellte *N*-Glycinester-Verbindung. Beide Peroxyde führen im Vergleich zum tert.-Butyl-malein-peroxyd zu einer etwa ebenso hohen Glykolyse-Hemmung, jedoch zu einer deutlich schwächeren Atmungshemmung.

Vergleicht man die Hemmeffekte der in Tab. 1 zusammengestellten Persauerstoffverbindungen mit denjenigen von Alkylierungsmitteln wie z. B. *N*-Äthyl-maleinimid oder Stickstofflost (Tab. 1), so ergibt sich, daß im manometrischen Warburg-Test die Inhibitoreffekte geeigneter Persauerstoffverbindungen denen der Alkylierungsmittel nicht unterlegen sind.

Vergleich: serumfreies und serumhaltiges Medium

Verwendet man — wie oben in Tab. 1 — Inkubationsmedien mit 50% Serumgehalt, so ist mit stark verminderten Hemmeffekten bei solchen Persauerstoffverbindungen zu rechnen, welche rasch mit den Serumproteinen reagieren. Zur Prüfung des Serumeinflusses auf die Hemmeffekte sind daher Parallelversuche mit serumfreiem und serumhaltigem Inkubationsmedium erforderlich, wie sie in Tab. 2 zusammengestellt sind:

Histidin-peroxohydrat zeigt nur geringe Abschwächung der Hemmeffekte gegenüber Glykolyse und Atmung durch den Serumzusatz, ein Befund, der für alle Peroxohydrate gilt. Besonders kraß ist dagegen der Einfluß der Serumproteine auf die Percarbonsäuren: Am Beispiel der hier gewählten Capronpersäure erkennt man, daß im serumfreien Medium die Konzentration $10^{-3}m$ zu fast vollständiger Auslöschung von Glykolyse und Atmung führt, während in Anwesenheit von Serum die Asciteszellen praktisch nicht beeinflußt werden. Das Bis-hydroxymethyl-peroxyd rangiert in Tab. 2 als Beispiel einer gegen-

über den Serumproteinen relativ stabilen Verbindung, die Hemmeffekte werden nur in geringem Maße abgeschwächt. Das saure tert.-Butylmalein-peroxyd stellt den Typ eines sehr stabilen Peroxydes dar; in Anwesenheit von 50% Serum zeigt es praktisch die gleichen Hemmeffekte wie ohne Serum.

Tab. 2. Vergleich der Inhibitoreffekte im serumfreien und serumhaltigen Medium (Asciteszellen wie in Tab. 1). Kontrolle = volle Aktivität = 100%, totale Hemmung = 0%.

Inhibitor (molare Endkonzentration im Ansatz)	ohne Serum		mit 50% Serum	
	Glykolyse	Atmung	Glykolyse	Atmung
Histidin-peroxohydrat ($10^{-3}m$) . . .	5	55	15	100
Capronpersäure ($10^{-3}m$)	0	10	90	100
Bis-hydroxymethyl-peroxyd ($5 \cdot 10^{-4}m$)	5	55	20	75
saures tert.-Butylmalein-peroxyd ($5 \cdot 10^{-4}m$)	60	25	55	25
<i>N,N</i> -Bis-[tert.-butylperoxymethyl]- glycin* ($5 \cdot 10^{-4}m$)	25	80	40	90
Bis-diäthylaminomethyl-peroxyd* ($5 \cdot 10^{-4}m$)	5	80	90	90
<i>N,N'</i> -Bis-[tert.-butylperoxymethyl]- harnstoff ($5 \cdot 10^{-4}m$)	95	85	95	100

* Die Synthese dieser Verbindungen beschreiben wir in der folgenden Arbeit.

Die drei stickstoffhaltigen Peroxyde der Tab. 2 sind als weitere Beispiele für die verschiedenartigen Inhibitor Typen unter den organischen Peroxyden ausgewählt: Das *N,N*-Bis-[tert.-butylperoxymethyl]-glycin wird in seiner glykolyse- und atmungshemmenden Wirkung durch Serum nur wenig beeinträchtigt, während im Gegensatz dazu das Bis-diäthylaminomethyl-peroxyd seine an sich hohe Hemmwirkung auf die Glykolyse durch Serum fast völlig verliert. Der *N,N'*-Bis-[tert.-butylperoxymethyl]-harnstoff jedoch zeigt in derselben Konzentration ($5 \cdot 10^{-4}m$) keine nennenswerten Hemmeffekte, sei es mit oder ohne Anwesenheit von Serum. Es handelt sich hier um ein Beispiel für diejenigen Peroxyde, deren cytostatische Effekte vermutlich infolge hoher Stabilität der organischen Persauerstoffbindung während des manometrischen Versuchs nicht zur Auswirkung kommen.

Tab. 2 führt somit zu dem Ergebnis, daß je nach der Struktur des organischen Restes das Verhalten der Persauerstoffverbindungen gegenüber Serumproteinen stark wechselt. Die in Tab. 2 gegebenen Beispiele, die sich beliebig vermehren lassen (s. u.), zeigen, daß alle Übergänge existieren zwischen solchen organischen Persauerstoffverbindungen, die

mit den Serumproteinen nicht reagieren und zugleich hohe cytostatische Effekte besitzen, und solchen, die ihre an sich vorhandenen cytostatischen Wirkungen in Gegenwart von Serum völlig verlieren.

2. Struktur und cytostatische Wirkung organischer Peroxyde

Die relativ große Zahl der von uns synthetisierten und biologisch geprüften Peroxyde berechtigt zu der Frage, inwieweit Zusammenhänge zwischen chemischer Konstitution und cytostatischer Wirkung an Ascites-Krebszellen erkennbar sind. Die Aufgliederung nach den einzelnen Peroxydklassen ergibt folgendes Bild:

Percarbonsäuren

Die in wäßriger Lösung meist instabilen Percarbonsäuren sind dadurch charakterisiert, daß sie in Pufferlösungen ohne Serumgehalt stark cytostatisch wirken, in Gegenwart von Serum diese Effekte aber völlig einbüßen. Hierzu gehören außer der bereits erwähnten Capronpersäure (Tab. 2) die folgenden von uns geprüften Verbindungen: Peressigsäure, Caprylpersäure, Caprinpersäure, Laurinpersäure, Myristinpersäure und Palmitinpersäure. Sie sind wegen der Labilität der Percarboxylgruppe, z. T. auch wegen ihrer Schwerlöslichkeit, für biologische Versuche wenig geeignet.

Diacyl-peroxyde

Unter den Diacyl-peroxyden aliphatischer Monocarbonsäuren, wie z. B. Dicaproyl-, Dicaprylyl, Dilauroyl-peroxyd u. dgl., konnten wir cytostatisch wirksame Verbindungen (Konzentration im serumhaltigen Ansatz: $10^{-3}m$) nicht finden. Von den sauren Diacyl-peroxyden der Dicarbonsäuren erwies sich das recht stabile Diphthal-peroxyd ebenfalls im manometrischen Test als unwirksam; dagegen zeigten das viel weniger stabile saure Disuccin-peroxyd und das homologe Diglutar-peroxyd in der Konzentration $10^{-3}m$ im serumfreien Ansatz mäßige Glykolysehemmungen (Aktivitätsminderung auf 60 bzw. 75%), die jedoch in der Konzentration $5 \cdot 10^{-4}m$ nicht mehr vorhanden waren. Die Atmung wurde nicht gehemmt.

Eine Sonderstellung unter den Diacyl-peroxyden nehmen diejenigen der Benzopersäure ein: Dibenzoyl-peroxyd (Konzentration $10^{-3}m$ und darunter) hemmt die Glykolyse der Asciteszellen nicht, dagegen die Atmung in hohem Maße. Sowohl im serumfreien wie im serumhaltigen Medium wird die Atmung durch Dibenzoyl-peroxyd in der Konzentration $10^{-3}m$ und $5 \cdot 10^{-4}m$ völlig unterdrückt, durch $10^{-4}m$ noch auf 25% vermindert. Diesen elektiven Hemmeffekt auf die Atmung besitzen auch die gemischten Benzoyl-acyl-peroxyde. Um zugleich die Wasserlöslichkeit zu verbessern, synthetisierten wir Benzoyl-succin-,

Benzoyl-glutar-, Benzoyl-nicotinyl*- und Benzoyl-isonicotinyl*-peroxyd. Die atemungshemmende Wirkung dieser 4 Verbindungen ist derjenigen des Dibenzoyl-peroxyds vergleichbar. Die drei erstgenannten z. B. führen in der Konzentration $5 \cdot 10^{-4}m$ eine fast vollständige Atemungshemmung (Senkung auf 10—15%) herbei, ohne dabei die Glykolyse zu beeinträchtigen. Für diesen spezifischen Effekt des Benzoylperoxyd-Restes auf die Atmung der Asciteszellen besitzen wir bisher keine Erklärung.

tert.-Butyl-persäureester

Ohne sichere cytostatische Wirkung waren die tert.-Butyl-perester von Monocarbonsäuren, z. B. tert.-Butyl-acetyl-peroxyd, tert.-Butyl-butyryl-peroxyd, tert.-Butyl-nicotinyl-peroxyd. Auch das Di-tert.-butyl-succin-diperoxyd erwies sich als wirkungslos. Erschwerend kommt bei diesen Estern hinzu, daß sie im wäßrigen Inkubationsmedium fast unlöslich sind. Experimentell leichter zu handhaben sind die ausreichend wasserlöslichen Halbestoffe von Dicarbonsäuren mit tert.-Butyl-peroxyd. Dabei fanden wir eine bemerkenswerte Sonderstellung des sauren tert.-Butyl-malein-peroxyds, welches starke cytostatische Effekte besitzt (Hemmwerte s. Tab. 1 und 2). Die zum Vergleich von uns dargestellten und geprüften Verbindungen, wie z. B. das saure tert.-Butyl-succin-peroxyd und das saure tert.-Butyl-glutar-peroxyd erwiesen sich ebenso wie das saure tert.-Butyl-phthal-peroxyd als völlig wirkungslos, sowohl im serumfreien wie im serumhaltigen Inkubationsmedium. Ebenso wirkungslos in allen Versuchsanordnungen war der in gleichen Konzentrationen geprüfte saure Maleinsäure-n-butyl-ester sowie die Maleinsäure. Daraus folgt, daß die hohen Hemmeffekte von Maleinperester primär dem Persauerstoff und nicht der Maleinsäurekomponente zuzuschreiben sind. Wir nehmen daher an, daß die Maleinsäure hier eine Art „Adjuvans-Wirkung“ auf den Persauerstoff-Effekt ausübt. Dabei muß der entscheidende Einfluß von der Doppelbindung der Maleinsäure ausgehen, da hierin der einzige Unterschied zum wirkungslosen sauren tert.-Butyl-succin-peroxyd liegt. Auf Grund zusätzlicher experimenteller Untersuchungen nehmen wir zum Maleinsäureproblem in Kürze gesondert Stellung.

Alkyhydroperoxyde

Das in Tab. 1 und 2 angeführte 1-Hydroxy-äthyl-hydroperoxyd ist mit seiner starken cytostatischen Wirkung nicht für diese Verbindungsklasse charakteristisch. tert.-Butyl- und n-Butyl-hydroperoxyd sind viel weniger wirksam; beide Verbindungen zeigen im serumfreien Medium in der Konzentration $10^{-3}m$ eine schwache, in der Konzentration $5 \cdot 10^{-4}m$ kaum noch erkennbare Wirkung. Dagegen wird durch 1-Hydroxy-äthyl-hydroperoxyd unter gleichen Bedingungen in der Konzentration $5 \cdot 10^{-4}m$ die Glykolyse noch fastvollständig unterdrückt. Das Cumyl-hydroperoxyd schließt sich dem Verhalten des tert.- und n-Butyl-hydroperoxyds an.






* Beschreibung der Synthesen von Benzoyl-nicotinyl- und Benzoyl-isonicotinyl-peroxyd in der folgenden Arbeit.

Bis-hydroxymethyl-peroxyd und Derivate

Das Bis-hydroxymethyl-peroxyd ist, wie aus Tab. 1 und 2 hervorgeht, cytostatisch stark wirksam und gegenüber den Serumproteinen relativ stabil. Es handelt sich hier um diejenige Verbindung, welche das Wachstum des Mäuse-Ascitescarcinoms im Tierversuch völlig verhindert (siehe l. c.^{5, 6}). Die hohe cytostatische Wirkung dieses Peroxyds findet sich auch in seinen Substitutionsprodukten, jedoch besteht ausgeprägte Strukturabhängigkeit. Tab. 3 gibt an Hand der Glykolysehemmung bei stets gleicher Endkonzentration des Inhibitors ($5 \cdot 10^{-4}m$) im serumfreien Ansatz Aufschluß über die Zusammenhänge zwischen Konstitution und cytostatischer Wirkung bei Derivaten des Bis-hydroxymethyl-peroxyds.

Als Beispiele einseitiger Substitution synthetisierten und prüften wir das Hydroxymethyl-n-butyl- und -tert.-butyl-peroxyd (II u. III in Tab. 3). Beide Verbindungen erwiesen sich gegenüber Asciteszellen in

Tab. 3. Bis-hydroxymethyl-peroxyd: Einfluß der Substitution auf die Glykolysehemmung von Asciteszellen. Inkubationsmedium: serumfreie Pufferlösung. Anaerobe Glykolyse, volle Aktivität = Kontrolle = 100, totale Hemmung = 0.

Peroxyd (stets $5 \cdot 10^{-4}m$)		Anaerobe Glykolyse
Nr. im Text	Struktur	
I	$HO \cdot CH_2 \cdot OO \cdot CH_2 \cdot OH$	5
II	$CH_3 \cdot [CH_2]_3 \cdot OO \cdot CH_2 \cdot OH$	15
III	$(CH_3)_3C \cdot OO \cdot CH_2 \cdot OH$	20
IV	$(CH_3)_3C \cdot OO \cdot CH_2 \cdot N$ 	10
V	$CH_3 \cdot [CH_2]_3 \cdot OO \cdot CH_2 \cdot N$ 	90
VI*	 $N \cdot CH_2 \cdot OO \cdot CH_2 \cdot N$ 	5
VII	$(CH_3)_3C \cdot OO \cdot CH_2 \cdot NH \cdot CO \cdot C_6H_5$	100
VIII*	$CH_3 \cdot [CH_2]_3 \cdot OO \cdot CH_2 \cdot NH \cdot CO \cdot C_6H_5$	95
IX	$C_6H_5 \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot OO \cdot CH_2 \cdot NH \cdot CO \cdot C_6H_5$	60
X	$((CH_3)_3C \cdot OO \cdot CH_2)_2N \cdot CH_2 \cdot CO_2C_2H_5$	10
XI*	$(CH_3 \cdot [CH_2]_3 \cdot OO \cdot CH_2)_2N \cdot CH_2 \cdot CO_2H$	70
XII	 $N \cdot CH_2 \cdot CO_2C_2H_5$	5
XIII*	$(C_2H_5)_2N \cdot CH_2 \cdot OO \cdot CH_2 \cdot N(C_2H_5)_2$	5
XIV	$(CH_3)_3C \cdot OO \cdot CH_2 \cdot N(C_2H_5)_2$	80
XV	$(C_6H_{11})_2N \cdot CH_2 \cdot OO \cdot CH_2 \cdot N(C_6H_{11})_2$	0

* Die Synthesen von VI, VIII, XI und XIII werden in der folgenden Arbeit beschrieben.

serumfreier Pufferlösung als fast ebenso stark glykolysehemmend wie I; durch Serum wird die Wirkung dagegen erheblich stärker abgeschwächt, als es bei I der Fall ist.

Ersetzt man im Bis-hydroxymethyl-peroxyd beide Hydroxylgruppen durch organische Reste, so ergeben sich vielfältige Möglichkeiten, die je nach Art der Substitution die cytostatischen Effekte verändern.

Die Verbindungen IV, V und VI (Tab. 3) geben Aufschluß über die Änderungen des cytostatischen Wirkungsgrades bei Einführung von Piperidylresten in das Bis-hydroxymethyl-peroxyd. Dabei zeigt sich, daß die symmetrische Substitution mit zwei Piperidylresten VI ebenso wie die einseitige Piperidylsubstitution des tert.-Butyl-Derivates (IV) nicht zu einer Abschwächung der Gärungshemmung führt. Setzt man dagegen das n-Butyl-Derivat der Monopiperidylverbindung V ein; so verschwindet die Glykolysehemmung fast vollständig.

Vergleicht man die Hemmeffekte der Piperidylverbindungen (IV, V, VI) mit den analogen Benzaminverbindungen (VII, VIII, K), so fällt auf, daß die Benzaminoderivate schwächere Glykolysehemmungen hervorrufen als die Piperidylverbindungen. An den beiden tert.-Butyl-Derivaten IV und VII wird die Überlegenheit der Piperidylverbindung besonders deutlich, aber auch die symmetrische Benzaminverbindung IX erreicht bei weitem nicht die Hemmeffekte der analogen Piperidylverbindung VI. Weshalb tert.- und n-Butyl-Derivat in einem Falle (IV, V) stark unterschiedliche, im anderen Falle (VII, VIII) gleiche Hemmeffekte auslösen, ist noch ungeklärt.

Unter den Stickstoffderivaten des Bis-hydroxymethyl-peroxyds prüften wir u. a. eingehend die Aminosäurederivate, von denen in Tab. 3 die Glycin-Verbindungen X, XI und XII angeführt sind. Von ihnen ist der *N,N*-Bis-[tert.-butylperoxymethyl]-glycinester (X) wirksamer als das *N,N*-Bis-[n-butylperoxymethyl]-glycin (XI). Besonders interessant erscheint die Verbindung XII, die wir als monomeres cyclisches Peroxyd des *N,N*-Dimethyl-glycinesters ansehen. Sie besitzt eine ebenso starke glykolysehemmende Wirkung wie Verbindung I.

Die Verbindungen XIII, XIV und XV sind als Diäthylamino- bzw. Dicyclohexylamino-Verbindungen miteinander vergleichbar. Von ihnen bringen die beiden symmetrisch substituierten Derivate XII und XV die anaerobe Glykolyse praktisch vollständig zum Erliegen. Ersetzt man jedoch eine der beiden substituierten Aminomethyl-Gruppen durch den tert.-Butylrest (XIV), so wird die glykolysehemmende Wirkung stark abgeschwächt.

3. Fermentaktivitäten in Asciteszellen nach Persauerstoffhemmung

Versuche an isolierten Fermenten^{1, 2} hatten ergeben, daß Aldolase und GAPDH (aus Muskel) hochempfindlich gegen Persauerstoffverbindungen sind. Es war daher anzunehmen, daß die vorstehend beschrie-

benen Glykolysehemmungen von Asciteszellen zumindest teilweise durch Schädigung SH-abhängiger Fermentsysteme der Glykolysekette, besonders von Aldolase und GAPDH, zustandekommen. Tab. 4 gibt einen Überblick über die Aktivitäten der Fermente Aldolase, GAPDH und MDH, welche aus Asciteszellen nach $1\frac{1}{2}$ stdg. Einwirkung des betreffenden Inhibitors im Warburg-Versuch erhalten wurden. Die eingesetzten Persauerstoffverbindungen sind — wie Tab. 4 zeigt — sämtlich dadurch gekennzeichnet, daß sie am stärksten die GAPDH schädigen. Dabei bestehen jedoch Wirkungsunterschiede: Das saure tert.-Butyl-malein-peroxyd und Bis-hydroxymethyl-peroxyd vernichteten die GAPDH-Aktivität fast vollständig, während die beiden Peroxohydrate, das 1-Hydroxy-äthyl-hydroperoxyd und Verbindung XII in der angewandten Konzentration eine etwa 50proz. Aktivitätsminderung herbeiführen. Bei der Beurteilung dieses Ergebnisses ist zu beachten, daß nach unseren Erfahrungen bei starker Glykolysehemmung auch dann eine Aktivitätsminderung der GAPDH beobachtet wird, wenn der Hauptangriffspunkt des Inhibitors nicht an der GAPDH, sondern an anderer Stelle, z. B. in der DPN^o-Synthese, liegt.

Tab. 4. Fermentaktivitäten von Aldolase, GAPDH und MDH in Asciteszellen nach Einwirkung von Persauerstoffverbindungen. Mittelwerte aus je 5 Ansätzen. 100% = Kontrolle. 0% = völliger Aktivitätsverlust. (Methodik s. l. c.⁴.)

Inhibitor (stets $10^{-3}m$ im Ansatz)	% anaerobe Gärung	% Aktivität		
		Aldolase	GAPDH	MDH
Histidin-peroxohydrat	50	60	50	90
Carbamid-peroxohydrat	55	70	50	80
Saures tert.-Butyl-malein-peroxyd . .	35	80	0	90
Verbindung XII (s. Tab. 3)	30	60	60	70
Bis-hydroxymethyl-peroxyd	0	70	5	30
1-Hydroxy-äthyl-hydroperoxyd	70	80	45	85
Jodessigsäure	0	85	0	60
N-Äthyl-maleinimid	5	25	0	5

Gegenüber der Aldolase sind die Hemmeffekte bei allen Verbindungen wesentlich schwächer; im allgemeinen sinkt die Fermentaktivität auf rund 70—80% der Kontrollansätze. Dieser Befund entspricht dem Verhalten der reinen Fermente: Gegenüber Persauerstoff ist GAPDH etwa zehnfach empfindlicher als Aldolase¹. Bei der MDH sind die Inhibitoreffekte aller Persauerstoffverbindungen der Tab. 4 unbedeutend mit Ausnahme des Bis-hydroxymethyl-peroxyds, welches die MDH stärker hemmt als die Aldolase. Diesen auffallenden Befund konnten wir mehrfach sichern.

Vergleicht man die gemessenen Fermentaktivitäten nach Einwirkung von Persauerstoffverbindungen mit den Effekten der beiden zum Vergleich angeführten Alkylierungsmittel Jodessigsäure und N-Äthylmaleinimid, so ergibt sich, daß die Wirkung der Persauerstoffverbin-

dungen selektiver auf die GAPDH gerichtet ist. *N*-Äthyl-maleinimid führt zu schweren Schädigungen aller drei untersuchten Fermente, während Jodessigsäure eine auffallende Ähnlichkeit mit dem Verhalten des Bis-hydroxymethyl-peroxyds zeigt: Sehr starke Schädigung der GAPDH, mittelschwere Schädigung der MDH, nur schwache Schädigung der Aldolase.

Die Absolutaktivitäten der Fermente normaler Asciteszellansätze (Kontrollwerte) sowie deren biologische Schwankungsbreite gehen aus Tab. 5 hervor.

Tab. 5. Fermentaktivitäten normaler Asciteszellen nach 1½stdg. anaerobem Glucoseumsatz. Angaben in Aktivitäts-Einheiten/mg; Acetontrockenpulver, Mittelwerte aus 16 Ansätzen.

Ferment	GAPDH	Aldolase	MDH
Aktivator	Cystein	Cystein	ohne
Aktivitäts-Einh. ($M \pm s$)	12,6 ± 1,8	0,91 ± 0,29	22,8 ± 4,6

4. Substrat- und DPN[®]-Konzentrationen in Asciteszellen nach Persauerstoffeinwirkung

In Tab. 6 sind die Ergebnisse der Substrat- und DPN[®]-Bestimmungen sowie die jeweils durch die Persauerstoff-Verbindung erzielte Glykolysehemmung angegeben. Die Wirkung der beiden Peroxohydrate zeigt sich deutlich in der Abnahme des DPN[®] und der Zunahme des FDP, aber nicht sicher im Anstau des Triosephosphats. 1-Hydroxy-äthyl-hydroperoxyd schließt sich etwa dem Verhalten der Peroxohydrate an.

Sehr bemerkenswert ist das Verhalten des sauren tert.-Butyl-malein-peroxyds: Es führt zu sehr starker Anreicherung von FDP und Triosephosphat, beeinflusst jedoch die DPN[®]-Konzentration praktisch nicht. Gegensinnig verhält sich Bis-hydroxymethyl-peroxyd: Die Erhöhungen von FDP und Triosephosphat liegen hier in der Größenordnung der Effekte der Peroxohydrate, DPN[®] jedoch wird auf Null gesenkt. Den letztgenannten Effekt zeigt auch Verbindung XII. Bei den in Tab. 6 aufgeführten drei Peroxyden, deren Konzentration im Ansatz geringer war ($5 \cdot 10^{-4}m$), zeigen die Meßergebnisse eine klare Beziehung zwischen Ausmaß der Glykolysehemmung und Veränderung der FDP-, Triosephosphat- und DPN[®]-Konzentrationen: Die beiden piperidyl- bzw. cyclohexyl-substituierten Peroxyde hemmen die Glykolyse fast völlig und führen sowohl Substratanstau wie starke DPN[®]-Senkung herbei. Dagegen beeinträchtigt das letztgenannte Peroxyd in Tab. 6 die Glykolyse nur wenig; die Werte für FDP, Triosephosphat und DPN[®] weichen dementsprechend nicht signifikant von der Kontrolle ab.

Die durch saures tert.-Butyl-malein-peroxyd hervorgerufene Glykolysehemmung weicht insofern von der Wirkungsart anderer Persauer-

Tab. 6. Substrat- und DPN[®]-Konzentrationen nach Einwirkung von Persauerstoff-Verbindungen.

Persauerstoffverbindung	Glykolyse-Aktivität	FDP	Triosephosphat	DPN [®]
	(Kontrolle = 100)	% der Kontrolle	% der Kontrolle	% der Kontrolle
stets 10 ⁻³ m im Ansatz				
Histidin-peroxohydrat	5	660	145	11
Carbamid-peroxohydrat	10	330	130	51
1-Hydroxy-äthyl-hydroperoxyd . . .	35	445	80	16
saures tert.-Butyl-malein-peroxyd . .	10	4800	1420	103
Bis-hydroxymethyl-peroxyd	5	230	300	0
Verbindung XII (vgl. Tab. 3).	5	—	150	0
stets 5 · 10 ⁻⁴ m im Ansatz				
Bis-piperidinomethyl-peroxyd	10	1758	300	28
Bis-[dicyclohexylamino-methyl]-peroxyd	5	601	588	7
N-tert.-Butylperoxymethyl-diäthylamin	85	71	128	103
Absolutwerte der Kontrolle (γ/g Asciteszellen [Trockengew.]), Mittel aus 7 Kontrollansätzen		1262	227	593

stoffverbindungen ab, als es mit höherer Spezifität die Fermente der Glykolysekette angreift. Diese Wirkungsdifferenzen zeigt besonders deutlich ein Vergleich der DPN[®]-, FDP- und Triosephosphat-Werte bei Grenzkonzentrationen, die noch zu geringfügigen Glykolysehemmungen (~80%) führen. Dabei sind z. B. unter der Wirkung von Bis-hydroxymethyl-peroxyd (10⁻⁴m) oder Bis-piperidinomethyl-peroxyd (2 · 10⁻⁴m) trotz Fehlens stärkerer Glykolysehemmungen schon meßbare DPN[®]-Senkungen (63 bzw. 70%), jedoch keine oder nur angedeutete Veränderungen der Substratkonzentration vorhanden. Dagegen sind nach Einwirkung des Maleinperesters (2 · 10⁻⁴m) bei voll erhaltener DPN[®]-Konzentration FDP und Triosephosphat bereits stark angestaut (1070 bzw. 350%).

Vergleicht man die FDP- und Triosephosphat-Konzentrationen in Tab. 6, so fällt auf, daß die meisten der dort genannten Verbindungen einen sehr viel stärkeren prozentualen Anstau des FDP als des Triosephosphats bewirken. Dieser Befund läßt verschiedene Deutungsmöglichkeiten zu, berechtigt jedoch nicht zu dem Schluß, daß die Aldolase hier das am stärksten gehemmte Ferment sei.

5. Vorinkubation mit Anti-Inhibitoren

Das Ausbleiben einer Glykolyse- oder Atmungshemmung in Anwesenheit geeigneter „Schutzstoffe“ ist aus Untersuchungen an Hefe- und Asciteszellen bekannt und nach den Ergebnissen unserer Versuche

an solchen Fermenten zu erwarten. Zudem können chemische Struktur, Reaktionsfähigkeit und biologisches Verhalten wirksamer Schutzstoffe Hinweise auf den mutmaßlichen Wirkungsmechanismus des Inhibitors geben. Wir prüften daher die Hemmeffekte verschiedener Persauerstoffverbindungen nach vorheriger Zugabe von Anti-Inhibitoren. Diese wurden dem Ansatz (Inkubationsmedium + Asciteszellen) 15 Min. vor dem Einbringen der Persauerstoffverbindung zugegeben.

Leicht oxydable Schwefelverbindungen

Während Chelatbildner wie EDTA oder Histidyl-histidin erwartungsgemäß keine Schutzwirkung besitzen, sind leicht oxydable Schwefelverbindungen wie Thiazolidin-carbonsäure-(4), Cystein und Cystein-glucose hochwirksam. Die letztgenannte Verbindung gehört zur Gruppe der Cystein-Zucker-Kondensate, die ebenfalls Thiazolidinstruktur besitzen und über deren Bildungstendenz und Metallaffinität wir vor kurzem berichteten¹⁸. Cystein z. B. verhindert in 10fachem molaren Überschuß die Hemmeffekte des Histidin-peroxohydrates praktisch vollständig, die des sauren tert.-Butyl-malein-peroxyds zu etwa 50%. Es ist jedoch zu vermuten, daß sich die Schutzeffekte dieser leicht oxydablen Schwefelverbindungen überwiegend extrazellulär abspielen, da die 15 Min. nach dem Schutzstoff zugegebene Persauerstoffverbindung diesen zum größten Teil noch im Inkubationsmedium erreicht. In diesem Zusammenhang kann man auch bei serumhaltigem Inkubationsmedium die labilen Thiolgruppen der Serumproteine als Anti-Inhibitoren gegen Persauerstoffverbindungen ansehen, soweit diese — wie z. B. die Peroxocarbonsäuren (Tab. 2) — nach Einbringen in das Medium genügend rasch mit dem Serum reagieren.

Nicotinsäureamid

Anders liegen die Verhältnisse, wenn man Nicotinsäureamid als Anti-Inhibitor einsetzt. In diesem Falle handelt es sich mit Sicherheit um einen intrazellulären Schutzmechanismus, der wahrscheinlich die DPN^o-Synthese betrifft, wie aus den Erfahrungen mit alkylierenden Reagenzien hervorgeht (s. Diskussion). Da die Persauerstoffverbindungen in wechselndem Ausmaße (s. Tab. 6) die DPN^o-Konzentration in den Asciteszellen beeinflussen, prüften wir an verschiedenen Verbindungstypen den Einfluß von vorinkubiertem Nicotinsäureamid auf die Gärungs- und Atmungshemmung von Asciteszellen. Dabei ergab sich, daß Nicotinsäureamid nur dann als Anti-Inhibitor wirkt, wenn die betreffende Persauerstoffverbindung — allein gegeben — die DPN^o-Konzentration vermindert. Dagegen werden Hemmeffekte von Persauerstoffverbindungen, die keinen Einfluß auf die DPN^o-Konzentration haben, durch Nicotinsäureamid nicht abgeschwächt.

¹⁸ G. Weitzel, J. Engelmann u. A.-M. Fretzdorff, diese Z. 315, 236 [1959].

Da die Peroxohydrate durchweg die DPN^o-Konzentration in den Asciteszellen herabsetzen (Beispiele s. Tab. 6), führt die Vorinkubation mit Nicotinsäureamid zur Abschwächung bzw. Aufhebung der Hemmeffekte von Peroxohydraten, wie wir dies für Histidin-peroxohydrat bereits mitteilten⁶. Die organischen Peroxyde dagegen verhalten sich unterschiedlich. Als charakteristische Beispiele bringen wir in Abb. 1 die Konzentrationswirkungskurven des sauren tert.-Butyl-malein-peroxyds, in Abb. 2 die des Bis-hydroxymethyl-peroxyds, jeweils mit und ohne Vorinkubation von Nicotinsäureamid.

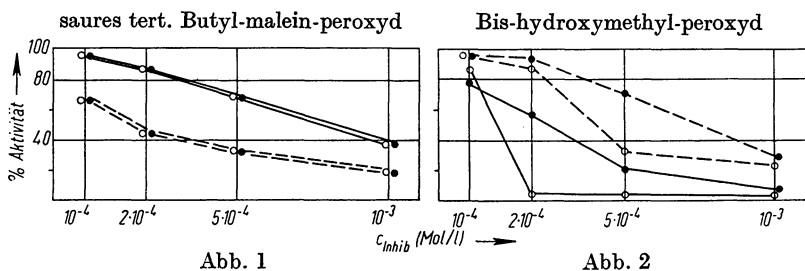


Abb. 1 und 2. Einfluß von vorinkubiertem Nicotinsäureamid auf die Peroxydhemmung von Asciteszellen.

Anaerobe Glykolyse: —; Atmung: - - - -; \circ = Peroxyd allein; \bullet = Peroxyd nach Vorinkubation mit je 10fachem Überschuß an Nicotinsäureamid.

Aus Abb.1 geht hervor, daß bei Maleinperester in allen untersuchten Inhibitorkonzentrationen die Vorinkubation mit 10fachem Überschuß an Nicotinsäureamid nichts an dem Ausmaß der Hemmeffekte ändert. Für die Atmung und die anaerobe Glykolyse sind die Hemmkurven mit und ohne Nicotinsäureamid identisch. Zugleich zeigt Abb. 1 sehr deutlich, daß dieser Inhibitor die Atmung stets stärker hemmt als die Glykolyse. Aus Abb. 2 ergibt sich dagegen, daß bei einer Konzentration des Bis-hydroxymethyl-peroxyds von $10^{-3}m$ eine Abschwächung des Hemmeffektes durch Nicotinsäureamid zwar noch nicht erkennbar ist, daß aber die Konzentrationen 2 und $5 \cdot 10^{-4}$ nach Vorinkubation mit Nicotinsäureamid eine deutliche Abschwächung der Gärungshemmung, die Konzentration $5 \cdot 10^{-4}m$ der Atmungshemmung zeigen. Beziehungen zwischen Hemm- und Schutzwirkung sind bei einer Konzentration von $10^{-4}m$ nicht mehr zu sichern, da die Hemmeffekte dann zu gering sind. Aus Versuchen mit abgestuften Nicotinsäureamid-Konzentrationen (1- bis 100facher Überschuß) geht jedoch hervor, daß die Schutzeffekte des Nicotinsäureamids auch dann verschwinden, wenn — unabhängig von der Bis-hydroxymethyl-peroxyd-Konzentration — die Nicotinsäureamid-Konzentration auf Absolutwerte von $10^{-3}m$ oder weniger gesenkt wird. Offenbar reicht in diesem Falle die Nicotinsäureamid-Konzentration als solche nicht mehr aus, um die fermentative

DPN[®]-Synthese merklich zu beschleunigen. Abb. 2 zeigt außerdem, daß Bis-hydroxymethyl-peroxyd — umgekehrt wie der Maleinperester — die Glykolyse stets stärker hemmt als die Atmung.

Vergleicht man damit die in Tab. 6 mitgeteilten Meßergebnisse, wonach der Maleinperester die DPN[®]-Konzentration nicht herabsetzt, während Bis-hydroxymethyl-peroxyd sie meist unter die Erfassungsgrenze senkt, so bestätigen Abb. 1 und 2 das oben aufgestellte Allgemeinprinzip: Danach kann Nicotinsäureamid nur dann Anti-Inhibitor-Effekte zeigen, wenn der Inhibitor die DPN[®]-Konzentration herabsetzt. Das Beispiel des sehr starken Inhibitors Bis-hydroxymethyl-peroxyd zeigt darüber hinaus (s. Abb. 2), daß hier die Schutzeffekte des vorinkubierten Nicotinsäureamids nur bei bestimmten „mittleren“ Inhibitorkonzentrationen bemerkbar sind.

6. Persauerstoffverbindungen im Katalasetest

Bei den vorstehend beschriebenen Inhibitorversuchen ergaben sich keine sicheren Anhaltspunkte für eine Beeinträchtigung der Effekte der Persauerstoffverbindungen durch eine etwaige Katalaseaktivität der Asciteszellen. Trotzdem war es im Hinblick auf Versuche am Ganztier erwünscht, das Verhalten der geprüften Persauerstoffverbindungen gegen Katalase kennenzulernen (Versuchsordnung s. Methodik). Es zeigte sich, wie aus Tab. 7 hervorgeht, daß die Peroxohydrate sämtlich katalaseempfindlich sind; unter den gewählten Versuchsbedingungen wurden innerhalb einer Stunde 50 bis 80% des Persauerstoffs enzymatisch freigesetzt. In seltenen Fällen war die Geschwindigkeit der Sauerstoffabgabe herabgesetzt, z. B. bei dem Trigonellin-peroxohydrat (1 : 2). Die besonders starke glykolysehemmende Wirkung (Tab. 1) dieses Peroxohydrates hängt möglicherweise mit seiner geringeren Katalaseempfindlichkeit zusammen. Die organischen Peroxyde dagegen verhalten sich im Katalasetest umgekehrt wie die Peroxohydrate. Sie zeigen bei einstündigem Kontakt mit Katalase keinerlei Sauerstoff-Freisetzung. Eine Ausnahme bildet das 1-Hydroxy-äthyl-hydroperoxyd, welches von Katalase angegriffen wird.

Die katalaseresistenten Peroxyde sind zum Teil sehr energisch und rasch reagierende Oxydationsmittel. Deshalb war zu befürchten, daß sie im Katalasetest das Ferment bis zur Vernichtung seiner Aktivität schädigen könnten. Eine derartige, nur vorgetäuschte Katalaseresistenz schlossen wir dadurch aus, daß wir zur Kontrolle gleichzeitig oder nach Beendigung des einstündigen Testes dem fermentativen Ansatz Histidin- oder Carbamid-peroxohydrat zugaben. Die prompt einsetzende und typisch ablaufende Sauerstoff-Freisetzung zeigte, daß das Peroxyd die Katalase nicht inaktiviert hatte. Lediglich die Capronpersäure führte zu einer Aktivitätsminderung, jedoch nicht zum völligen Aktivitätsverlust der Katalase; denn die nachträgliche Kontrolle des Ansatzes mit einem Peroxohydrat lieferte höhere Anteile an freigesetztem Sauerstoff, wenn die Katalasemenge erhöht wurde.

Tab. 7. Verhalten von Persauerstoff-Verbindungen gegenüber Katalase.
100% = völlige Freisetzung des ber. Per-O-Gehaltes.

Persauerstoff-Verbindung	Freigesetztes akt. O in % nach:		
	10 Min.	30 Min.	60 Min.
H ₂ O ₂	23	40	63
Carbamid-peroxohydrat	45	69	87
Histidin-peroxohydrat	33	57	73
Picolinsäure-peroxohydrat	33	59	73
DL-1.2-Bis-[pyridyl(4)]-glykol-peroxo- hydrat.	34	59	74
Trigonellin-peroxohydrat (1:2) . . .	9	13	21
	12	19	22
Caprylpersäure	0	0	0
saures Digtutar-peroxyd	0	0	0
saures tert.-Butyl-malein-peroxyd. .	0	0	0
1-Hydroxy-äthyl-hydroperoxyd . . .	25	47	53
	21	37	62
tert.-Butyl-hydroperoxyd	0	0	0
Bis-hydroxymethyl-peroxyd	0	0	0

Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit setzen wir unsere vorangehenden Untersuchungen¹⁻⁴ über die Inhibitoreffekte von Zinkverbindungen, Alkylierungsmitteln und Persauerstoffverbindungen fort. Im Schrifttum konnten wir keine Anhaltspunkte dafür finden, daß organische Persauerstoffverbindungen bereits an Asciteszellen geprüft wurden. Lediglich die Hemmeffekte des gewöhnlichen H₂O₂ wurden im Zusammenhang mit der Deutung cytostatischer Strahlenwirkungen an Asciteszellen studiert:

Warburg¹⁹ vertritt die Ansicht, daß „die selektive Schädigung von Krebszellen durch Röntgenstrahlen eine Schädigung durch H₂O₂ ist“. Er konnte zeigen, daß die Effekte einer Röntgenbestrahlung von Krebszellen in gleicher Weise auch durch H₂O₂ hervorgerufen werden. Dabei ist die gegenüber Normalzellen höhere Strahlenempfindlichkeit von Krebszellen zwanglos dadurch erklärbar, daß die letzteren weniger Katalase enthalten. Holzer und Frank²⁰ kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, daß H₂O₂ in Konzentrationen, wie sie auch bei der Röntgenbestrahlung entstehen können, die Lebenstätigkeit von Krebszellen hemmt. Holzer und Mitarbeiter²¹ konnten entsprechende Hemmeffekte auch dann erzielen, wenn H₂O₂ erst im Versuchsansatz durch die Reaktion von Methylenblau mit Sauerstoff entstand. Für die Röntgenbestrahlung als

¹⁹ O. Warburg, W. Schröder, H. Gewitz u. W. Völker, Naturwissenschaften **45**, 192 [1958].

²⁰ H. Holzer u. S. Frank, Angew. Chem. **70**, 570 [1958].

²¹ P. Glogner, H. Wolf u. H. Holzer, Biochem. Z. **332**, 407 [1960].

solche²² wie für die Hemmversuche mit H_2O_2 ¹⁹⁻²¹ ist dabei hergestellt, daß die auftretende Glykolysehemmung sowohl zum Absinken der DPN^o-Konzentration als auch der GAPDH-Aktivität führt. Durch Vorinkubation mit Nicotinsäureamid läßt sich in jedem Falle diese Glykolysehemmung aufheben^{20, 22, 23}.

Wie die vorliegenden Befunde ergeben, können die Hemmwirkungen organischer Peroxyhydrate von denen des H_2O_2 stark abweichen; so zeigen einige der von uns neu dargestellten Peroxyhydrate gegenüber Asciteszellen Hemmeffekte, die weit über diejenigen des einfachen H_2O_2 hinausgehen. Warburg¹⁹ hat gezeigt, daß die cytostatischen Effekte von Röntgenstrahlen an Asciteszellen durch vorherigen Zusatz von Katalase verhindert werden. Nach unseren obigen Befunden besteht jedoch auch die Möglichkeit, daß die Röntgenbestrahlung nicht nur zur Entstehung von einfachem H_2O_2 , sondern zugleich auch zur Bildung erheblich stärker wirksamer organischer Peroxyhydrate führt. Denn auch diese werden durch Katalase zersetzt (s. Abschnitt 6). Dagegen schließen die Versuche von Warburg die Möglichkeit aus, daß die Röntgenbestrahlung von Asciteszellen zur Bildung cytotatisch wirksamer organischer Peroxyde führt, denn diese sind fast durchweg katalaseresistent (s. Abschnitt 6).

In noch höherem Maße als bei den Peroxyhydraten wird bei den organischen Peroxyden die cytostatische Wirkung von der chemischen Struktur des organischen Restes bestimmt. Es entspricht den Erwartungen, daß rasch zerfallende Peroxyde — wie z. B. die Peracbonsäuren und gewisse Diacylperoxyde — im serumfreien Medium die Asciteszellen stark, im serumhaltigen dagegen nicht schädigen. Nur Peroxyde mit gut maskiertem Persauerstoff können in Serumpräsenz cytostatische Effekte entfalten; jedoch sind — wie unsere Ergebnisse zeigen — von diesen ausreichend stabilen Peroxyden die meisten gegenüber Asciteszellen unwirksam, obwohl sie von Katalase nicht angegriffen werden. Unsere vorliegenden Befunde (s. z. B. Tab. 3) lassen erkennen, welchen Schwierigkeiten der Versuch einer Klärung der Zusammenhänge zwischen Struktur und Wirkung hier begegnet.

Das Verhalten des Bis-hydroxymethyl-peroxyds einerseits, des sauren tert.-Butyl-malein-peroxyds andererseits verdient besondere Beachtung, weil dieses Substanzpaar die naheliegende Vermutung widerlegt, daß grundsätzlich die cytostatischen Peroxydeffekte stets in die gleiche Richtung gehen. Die aufschlußreiche Gegenüberstellung der Substrat- und DPN^o-Konzentrationen nach Einwirkung dieser beiden Inhibitoren (Tab. 6), das unterschiedliche Verhalten bei Vorinkubation mit Nicotinsäureamid (Abb. 1 u. 2), die gegensätzliche

²² H. Maas, G. Rathgen, H. Künkel u. G. Schubert, Z. Naturforsch. **13b**, 735 [1958].

²³ M. Panlitschko u. F. Seelich, Biochem. Z. **333**, 78 [1960].

Bevorzugung von Atmungs- bzw. Glykolysehemmung (Tab. 1, Abb. 1 und 2) zeigen, daß die intrazellulären Effekte organischer Peroxyde sehr differenziert sind. Nimmt man das Dibenzoyl-peroxyd und die Benzoyl-acyl-peroxyde hinzu, so hat man einen dritten Peroxydtyp mit gänzlich anderer Wirkungsrichtung. Denn während die erstgenannten beiden Inhibitoren starke Hemmwirkungen in der Glykolysekette entfalten, inhibieren die Benzoylperoxyde selektiv die Atmung und beeinträchtigen weder die Glykolysefermente noch die DPN[®]-Synthese bei Peroxyd-Konzentrationen, welche die Atmung praktisch völlig zum Erliegen bringen.

Die intrazellulären Angriffspunkte der organischen Persauerstoffverbindungen sind noch nicht genügend bekannt. Man wird jedoch in erster Linie die Oxydation labiler Enzym-Thiolgruppen anzunehmen haben. Fast alle der von uns beobachteten Hemmeffekte sind wenigstens z. T. durch die Schädigung von SH-Fermenten erklärbar, wie es z. B. für Fermente der Glykolysekette sichergestellt ist¹. Auch die Verminderung der DPN[®]-Konzentration — soweit vorhanden — läßt sich hypothetisch auf eine oxydative Inaktivierung von solchen SH-Fermenten zurückführen, die etwa an der DPN[®]-Synthese beteiligt sind. Der Angriffspunkt des selektiv die Atmung hemmenden Benzopersäurerestes dagegen entzieht sich bisher allen Deutungsversuchen. Es besteht die Möglichkeit, daß neben den labilen Thiolgruppen noch weitere Gruppierungen mit Persauerstoffverbindungen reagieren, jedoch liegen dafür keine sicheren Anhaltspunkte vor. Die Oxydation des Ringstickstoffs in Pyridinderivaten erscheint uns unwahrscheinlich, die Oxydation von Imidazolderivaten dagegen möglich.

Die Annahme, daß die organischen Persauerstoffverbindungen in erster Linie reaktionsfähige Thiolgruppen angreifen, erlaubt eine zwanglose Erklärung der parallelen Effekte SH-alkylierender Reagenzien. Jodessigsäure und *N*-Äthyl-maleinimid, Lost- und Äthylenimin-Derivate führen an Asciteszellen zu Glykolysehemmungen mit Senkungen der DPN[®]-Konzentration und Schädigungen der Glykolysefermente, wie man sie in ähnlicher Weise auch mit einigen organischen Peroxyden (s. o.) erzielen kann. Da diejenigen Persauerstoffverbindungen, die die DPN[®]-Konzentration senken, durch Nicotinsäureamid ebenso wie die SH-Alkylierungsmittel ihre Wirkung verlieren, liegt die Annahme nahe, daß hier die Angriffspunkte die gleichen sind. Darüber hinaus finden wir jedoch bei organischen Peroxyden Hemmwirkungen, die den Alkylierungsmitteln fehlen.

Die organischen Persauerstoffverbindungen bilden für stoffwechselchemische Untersuchungen an lebenden Zellen eine Verbindungsklasse, die sich nicht nur durch zahlreiche chemische Variationsmöglichkeiten auszeichnet, sondern die auch — wie die vorgelegten Ergebnisse zeigen — sehr verschiedenartige und spezifische Wirkungen auf den Zellstoffwechsel ausüben kann.

Zusammenfassung

Die Einwirkung organischer Peroxohydrate und Peroxyde auf Ascites-Krebszellen erstreckt sich — je nach der Struktur des organischen Restes — von fehlender bis zu totaler Hemmung auf Atmung und anaerobe Glykolyse.

Organische Peroxohydrate, wie z. B. die bisher nicht bekannten des Trigonellins oder 1.2-Bis-[pyridyl-(4)]-glykols, entfalten z. T. erheblich höhere Hemmeffekte als H_2O_2 .

Unter den organischen Peroxyden besitzen diejenigen mit labiler Struktur, z. B. Mono-percarbonsäuren und einige Diacylperoxyde, hohe Hemmeffekte, die jedoch im serumhaltigen Inkubationsmedium völlig verschwinden. Das Dibenzoyl-peroxyd sowie die Benzoyl-acyl-peroxyde, deren Synthesen beschrieben werden, zeigen bei fast fehlender Glykolysehemmung starke Atmungshemmung.

Die tert.-Butyl-persäureester von Mono- und Dicarbonsäuren zeigen praktisch keine Inhibitoreffekte mit Ausnahme des sauren tert.-Butyl-malein-peroxyds, welches hohe, durch Serumanwesenheit nicht beeinträchtigte Hemmeffekte gegenüber Atmung und Glykolyse besitzt.

Von den Hydroxyalkyl-peroxyden sind wirksam das 1-Hydroxy-äthyl-hydroperoxyd sowie vor allem das Bis-hydroxymethyl-peroxyd und einige seiner Derivate. Synthetisiert und geprüft wurden die einseitig und beiderseitig substituierten n- und tert.-Butyl-, Piperidyl-, Benzamino-, Diäthylamino-, Dicyclohexylamino-, Glycin- und Harnstoffderivate.

Die Aktivitäten der Glykolysefermente in Ascitezellen sind nach Einwirkung organischer Persauerstoffverbindungen vor allem bei Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, weniger bei Aldolase und Milchsäure-Dehydrogenase herabgesetzt. Zugleich findet man Anstau von Fructose-1.6-diphosphat und Triosephosphat sowie meist eine Herabsetzung der DPN^o-Konzentration. Diese Effekte wechseln je nach der Struktur des eingesetzten Peroxyds.

Vorinkubation der Ascitezellen mit labilen Schwefelverbindungen führt zu Schutzeffekten. Vorinkubation mit Nicotinsäureamid führt nur dann zur Minderung der Hemmeffekte, wenn die betreffende Persauerstoffverbindung — allein gegeben — die DPN^o-Konzentration senkt.

Die meisten organischen Peroxohydrate werden durch Katalase zerlegt, fast alle der geprüften organischen Peroxyde sind gegen Katalase resistent.

Summary

The action of peroxohydrates and peroxides on respiration and glycolysis in ascites tumour cells varies from total inhibition to no action, depending on the structure of their organic residues.

Organic peroxohydrates, e. g. the hitherto unknown peroxohydrates of trigonelline or 1,2-bis-(4-pyridyl)-glycol, have a greater inhibitory effect than just H_2O_2 .

The more labile organic peroxides, e. g. monopercarboxylic acids and some diacyl peroxides, exhibit a strong inhibition, which is completely abolished in serum-containing incubation media. Dibenzoyl peroxide and benzoyl acyl peroxides (syntheses are described), have almost no effect on glycolysis, but strongly inhibit respiration.

Mono- and dicarboxylic acid esters of *tert.*-butyl peracids exert practically no inhibition, with the exception of *tert.*-butyl maleyl peroxide, which strongly inhibits respiration and glycolysis, and whose action is not affected by serum.

Amongst the hydroxyalkyl peroxides, 1-hydroxyethyl hydroperoxide and especially bis-(hydroxymethyl)-peroxide and some of its derivatives, are active inhibitors. The *n.*- and *tert.*-butyl, piperidyl, benzamino, diethylamino, dicyclohexylamino, glycine and urea derivatives have been prepared as mono and bis compounds, and tested.

Organic peroxides inhibit particularly glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and to a lesser extent aldolase and lactic dehydrogenase in glycolysis in ascites cells. There is a concomitant accumulation of fructose-1,6-diphosphate and triose phosphate and usually a decrease in the concentration of DPN[®]. These effects vary according to the structure of the peroxide.

Ascites cells are protected from peroxide inhibition by prior incubation with labile sulphur compounds. Prior incubation with nicotinamide decreases the inhibition only in those cases where the peroxide on its own decreases the DPN[®] concentration.

Most organic peroxohydrates are decomposed by catalase. Almost all the tested organic peroxides are not attacked by catalase.

Prof. Dr. Dr. Günther Weitzel, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Tübingen, Gmelinstr. 8.