

Cytostatische Effekte stickstoffhaltiger organischer Peroxyde*

Von

Günther Weitzel, Friedhelm Schneider, Heinz Pfeil und Karl Seynsche

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen

(Der Schriftleitung zugegangen am 22. Oktober 1962)

Adolf Butenandt zum 60. Geburtstag

Unter den cytostatisch wirksamen organischen Peroxyden, über die wir in den vorangehenden Arbeiten¹⁻⁴ berichteten, nimmt das Bis-hydroxymethyl-peroxyd eine Sonderstellung ein. Diese Verbindung ist nicht nur in vitro gegenüber Ascites-Krebszellen, sondern auch in vivo am Ascitescarcinom der Maus hoch wirksam. Durch Injektion von Bis-hydroxymethyl-peroxyd (1 mg pro Tag u. Maus i. p.) gelingt es, das Wachstum des Ascitescarcinoms völlig zu unterbinden, sowie ein seit mehreren Tagen im Wachstum befindliches Ascitescarcinom wieder zur Rückbildung zu bringen. Im letzteren Falle sinken die Zahl der Krebszellen und die NAD-Konzentration im Ascites rasch ab, der Ascites wird resorbiert⁴. Unter den von uns^{3, 4} synthetisierten und geprüften N-freien und N-haltigen Derivaten des Bis-hydroxymethyl-peroxyds und anderen Peroxyden fand sich jedoch zunächst keines, welches in vivo den Effekten des Bis-hydroxymethyl-peroxyds auch nur annähernd gleich kam. Wir⁴ diskutierten daher die Möglichkeit, daß die in-vivo-Wirkung des Bis-hydroxymethyl-peroxyds durch Kombination der oxydierenden und alkylierenden Eigenschaften dieser Substanz zustande kommt, während bei ein- und beidseitiger Substitution oder in anderen Peroxyden die Alkylierungsfähigkeit fehlt oder zumindest stark erschwert ist.

In der vorliegenden Arbeit prüften wir an zwölf nach strukturchemischen Überlegungen ausgewählten, stickstoffhaltigen Peroxyden, ob die cytostatische in-vivo-Wirkung des Bis-hydroxymethyl-peroxyds

* Es werden folgende Abkürzungen benutzt: ATP = Adenosin-triphosphat; NAD^o = Nicotinamid-adenin-dinucleotid, bisher bekannt als DPN^o, vgl. Report of the Commission on Enzymes of the Internat. Union of Biochem., I. Ü. B. Sympos. Series, Bd. 20, S. 16 ff, Pergamon Press, Oxford 1961.

¹ G. Weitzel u. E. Buddecke, diese Z. **317**, 150 [1959] und **323**, 14 [1961]; G. Weitzel, E. Buddecke u. F. Schneider, vorgetragen (G. W.) am 10. Okt. 1960 auf der Tagung für Physiologische Chemie in Zürich.

² G. Weitzel, E. Buddecke u. F. Schneider, Angew. Chem. **72**, 920 [1960].

³ G. Weitzel, E. Buddecke u. F. Schneider, diese Z. **323**, 211 [1961].

⁴ G. Weitzel, E. Buddecke, F. Schneider u. H. Pfeil, diese Z. **325**, 65 [1961].

nicht doch auch in weiteren Peroxyden wiederkehrt. Es handelt sich um 10 mit Heterocyclen und um 2 mit Harnstoff substituierte Peroxyde, welche mit einer Ausnahme in der Literatur noch nicht beschrieben sind.

Zur Beurteilung der Peroxydeffekte ziehen wir die folgenden Kriterien heran:

1. Reaktionsfähigkeit des Peroxyds *in vitro* gegenüber Thiazolidin-carbonsäure-(4) und Methionin.
2. Inhibitorwirkungen an Asciteszellen *in vitro*.
3. Gewichtskurven, Ascitesmenge und Lebensdauer von Ascitesmäusen unter Peroxydgaben.
4. Konzentrationen von NAD, Nicotinamid, Nicotinsäure, ATP, Fructose-1.6-diphosphat, Triosephosphat und der Gesamt-Pyridinnucleotide im Ascites vor und nach Peroxyd-Behandlung.

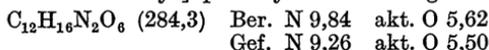
Beschreibung der Versuche

Substanzen

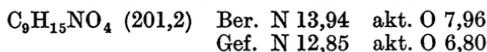
Bis-[succinimido-methyl]-peroxyd: Man erhält die Verbindung in nicht ganz reiner Form, in Analogie zum Bis-[benzamido-methyl]-peroxyd nach Rieche und Mitarbeitern⁵.



Bis-[glutarimido-methyl]-peroxyd: Darstellung wie oben nach l. c.⁵.



N-[tert.-Butylperoxymethyl]-succinimid: Durch Kondensation von Hydroxymethyl-succinimid und tert.-Butylhydroperoxyd in 2*n* H₂SO₄ und Entfernen der Schwefelsäure mit Bariumhydroxyd erhielt man ein Öl, das in Äther gelöst, mit Natronlauge und Wasser gewaschen, und nach Trocknen und Verdampfen des Äthers für die Versuche verwendet wurde.



Bis-[morpholino-methyl]-peroxyd: 1,74 g Morpholin werden bei -20° mit 940 mg Bis-hydroxymethyl-peroxyd intensiv gemischt, so daß man eine homogene Masse erhält. Nach etwa 1 Stde. im Eisbad ist alles zu einem festen Produkt erstarrt. Man löst in Äther, trocknet mit Natriumsulfat und fällt mit Petroläther aus oder verdampft im Vak.; Krist. farbloses Pulver vom Schmp. 64—66°. Ausb. 2,0 g (90% d. Th.).



N-[tert.-Butylperoxymethyl]-morpholin: 1,8 g Morpholin und 1,5 g 40proz. Formaldehyd werden unter Kühlung gemischt und im Eisbad mit 1,8 g tert.-Butylhydroperoxyd versetzt. Man erhält eine klare Lösung, die sich bald unter Abscheidung eines Öls trübt. Man rührt die Mischung noch 1 Stde. bei Zimmertemperatur, nimmt in Äther auf und trennt die wäbr. Phase ab. Man schüttelt mit Natronlauge und Wasser aus, trocknet über Natriumsulfat und ver-

⁵ A. Rieche, E. Schmitz u. E. Beyer, Chem. Ber. **92**, 1206 [1959].

dampft den Äther im Vak. Es bleibt ein Öl, das man in dieser Form verwenden kann. Ausb. 3,0 g (80% d. Th.).

$C_9H_{19}NO_3$ (189,2) Ber. N 7,4 akt. O 8,46
Gef. N 7,3 akt. O 8,41

N-[*n*-Butylperoxymethyl]-morpholin: Die Darstellung erfolgt wie oben bei der tert.-Butyl-Verbindung. Man erhält ein farbloses Öl in 70proz. Ausbeute.

$C_9H_{19}NO_3$ (189,2) Ber. N 7,4 akt. O 8,46
Gef. N 7,3 akt. O 8,20

N-[Cumylperoxymethyl]-morpholin: Aus 1,8 g Morpholin, 1,4 ml 40proz. Formaldehyd und 3,1 g Cumol-hydroperoxyd wurde, wie oben beschrieben, ein Öl erhalten.

$C_{14}H_{21}NO_3$ (251,3) Ber. N 5,57 akt. O 6,4
Gef. N 5,2 akt. O 6,0

N,N'-Bis-[tert.-butylperoxymethyl]-piperazin: 5,4 g tert.-Butylhydroperoxyd und 9 g 40proz. Formaldehyd werden unter Kühlung gemischt und in der Kälte mit 6 g Piperazinhydrat versetzt. Die Mischung wird mehrere Stdn. geschüttelt, das angefallene Produkt durch Lösen in Äther abgetrennt, der Äther mit Wasser, 30proz. Natronlauge, Wasser ausgeschüttelt und über Natriumsulfat getrocknet. Man gewinnt die Substanz entweder durch Fällen mit Petroläther, wobei sie auskristallisiert, oder durch Verdampfen des Äthers im Vak. Schmp. 49—51°. Ausb. 5,6 g (64% d. Th.).

$C_{14}H_{30}N_2O_4$ (290,3) Ber. N 9,7 akt. O 11,0
Gef. N 9,9 akt. O 10,5

N,N'-Bis-[cumylperoxymethyl]-piperazin: Die Darstellung erfolgte nach l. c.⁵. Schmp.: 90—92°.

$C_{24}H_{34}N_2O_4$ (414,5)

N-[tert.-Butylperoxymethyl]-pyrrolidin: 3,55 g Pyrrolidin werden in 5 ml Wasser gelöst und 6 g Hydroxymethyl-tert.-butyl-peroxyd in der Kälte unter starkem Rühren zugesetzt. Nach kurzer Zeit scheidet sich das Reaktionsprodukt als Öl ab, das abgetrennt, in Äther gelöst und mit Wasser, 30proz. Natronlauge und Wasser ausgeschüttelt wird. Man trocknet den Äther über Natriumsulfat, verdampft im Vak. und erhält ein farbloses Öl.

$C_9H_{19}NO_2$ (163,1) Ber. N 8,6 akt. O 9,80
Gef. N 8,7 akt. O 9,75

N-Methyl-*N'*-[tert.-butylperoxymethyl]-harnstoff: 3,7 g Methylharnstoff, 10 ml 40proz. Formaldehyd und 4,5 g tert.-Butylhydroperoxyd werden in 40 ml 2*n* H_2SO_4 3 Stdn. gerührt, wobei man nach kurzer Zeit eine ölige Abscheidung erhält. Nach 2 Stdn. Rühren wurde 2 Stdn. im Kühlschrank belassen und das gebildete Öl abgetrennt, in Äther gelöst und mit 30proz. Natronlauge und Wasser ausgeschüttelt, über Na_2SO_4 getrocknet und der Äther im Vak. verdampft. Der ölige Rückstand wurde als solcher verwendet.

$C_7H_{16}N_2O_3$ (176,2) Ber. N 15,90 akt. O 9,1
Gef. N 15,35 akt. O 9,3

N-Dimethyl-*N'*-[tert.-butylperoxymethyl]-harnstoff: 4,4 g *N,N*-Dimethylharnstoff, 10 ml 40proz. Formalin und 4,5 g tert.-Butylhydroperoxyd werden in 40 ml 2*n* H_2SO_4 3 Stdn. gerührt. Danach neutralisiert man mit Natriumcarbonat und läßt im Kühlschrank stehen. Das auskristallisierte Natriumsulfat wird abgetrennt, der Überstand im Vak. eingedampft und der Rückstand in Äther gelöst. Man schüttelt mit wenig Wasser und 30proz. Natronlauge aus,

trocknet mit Natriumsulfat und verdampft den Äther im Vak. Der ölige Rückstand erstarrt langsam bei -10° . Ausb. 3,5 g (43% d. Th.).



Methoden

a) Thiazolidin-Test: wie früher beschrieben⁴. Setzt man an Stelle von Thiazolidin-carbonsäure-(4) Methionin ein (s. u. „Ergebnisse I“), so bleiben alle Pufferlösungen und Konzentrationen unverändert.

b) Asciteszellen und Manometrie: wie l. c.³ beschrieben.

c) Bestimmung des Ascites-Wachstums in der Maus wie l. c.⁴

d) Die enzymatisch-optische Bestimmung von NAD^o erfolgte wie früher beschrieben⁶. Da wir unsere Untersuchungen sehr kurzfristig nach Peroxydgabe durchführten, könnte hier der Einwand gemacht werden, daß sich im Ascites-extrakt noch aktiver Sauerstoff befand. Dieser Sauerstoff hätte im enzymatischen Test die Alkoholdehydrogenase als SH-Ferment schädigen können, wodurch ein geringerer NAD^o-Gehalt vorgetäuscht worden wäre. Jedoch auch nach den kürzesten Abnahmezeiten konnten wir im Ascitesextrakt aktiven Sauerstoff nicht nachweisen.

e) Die quantitative kolorimetrische Bestimmung der Gesamt-Pyridin-nucleotide erfolgte nach l. c.⁷ (Küvetteninsatz: 0,5 ml Ascitesextrakt + 2,5 ml 1m KCN). Für die Berechnung auf μg benutzten wir den Extinktionskoeffizienten von NAD^o, gewonnen durch KCN-Behandlung von NAD^o.

f) Nicotinsäure und ihr Amid bestimmten wir mit der Bromcyan-Methode nach l. c.⁸, in den Einzelheiten folgten wir l. c.⁹. Bei der Berechnung wurde der Nicotinsäureamid-Wert vom NAD^o-Anteil, der Nicotinsäure-Wert vom Nicotinsäureamid-Anteil befreit.

g) Zur Bestimmung von ATP benutzten wir den Test (Kennwort TC-J) der Firma C. F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim.

h) Die enzymatische Bestimmung von Fructosediphosphat und Triosephosphat erfolgte wie l. c.⁶ beschrieben.

Gewinnung und Aufarbeitung des Ascites für die Methoden d—h: Mäuse mit „10 Tage altem“ Ascites wurden in Gruppen zu je 4 Stück eingeteilt. Jeder Maus entnahm man direkt vor der Peroxydapplikation 1,5 ml Ascites und mischte die 4 Proben jeder Gruppe in einem Erlenmeyerkolben bei -2° . Von diesem Mischascites (je 6 ml) wurden 5 ml zur Extraktherstellung und 0,1 ml zur Zellvolumenbestimmung entnommen. Die an diesem Mischascites ausgeführten Bestimmungen lieferten jeweils die Kontrollwerte. Nach der Entnahme des Kontrollascites (s. o.) injizierte man jeder Maus i. p. das betreffende stickstoffhaltige Peroxyd, in 0,2 ml Ringerlösung frisch gelöst. Die einzelnen Gruppen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (30 Min.—6 Stdn.) nach der Peroxydgabe getötet. Von jeder Maus wurden dann rasch 2 ml Ascites aus der uneröffneten Peritonealhöhle entnommen und gruppenweise bei -2° zusammengemischt. Von dem Mischascites der einzelnen Gruppen entnahm man wie beim Kontrollwert für die Zellvolumenbestimmung bzw. Extraktherstellung entsprechende Mengen. Vor der ersten Ascitesentnahme und nach vollständigem Austupfen des Restascites wurden die Mäuse zwecks Bestimmung der Ascitesmenge gewogen. Wie die Differenzwägungen ergaben, schwankten die Ascitesmengen der einzelnen Versuchsgruppen nur in ge-

⁶ G. Weitzel u. E. Buddecke, diese Z. **323**, 14 [1961].

⁷ M. M. Ciotti u. N. O. Kaplan, Methods in Enzymol. **3**, 890 [1957].

⁸ B. P. Lisboa, Naturwissenschaften **44**, 617 [1957].

⁹ H. Kröger, H. W. Rotthauwe, B. Ulrich u. H. Holzer, Biochem. Z. **333**, 155 [1960].

ringen Grenzen, wodurch eine einheitliche Dosierung des Peroxyds pro ml Ascites gewährleistet war.

Zur Aufarbeitung wurde der Nativascites mit eiskalter Perchlorsäure-Lösung gemischt (Endkonzentration der Perchlorsäure: 3,3%). Man ließ die Perchlorsäure unter Rühren 20 Min. bei 0° auf den Ascites einwirken, bevor das gefällte Eiweiß und der Zelldetritus 20 Min. bei 0° und 15000 × g abzentrifugiert wurden. Das Vol. des Überstandes wurde bestimmt und der Überstand selbst auf den pH-Wert von 6,5 eingestellt. Der dabei ausfallende Niederschlag von Kaliumperchlorat wurde abzentrifugiert.

Ein wesentlicher Vorteil der beschriebenen Methode liegt darin, daß die Werte vor und nach der Peroxydgabe von denselben Mäusen stammen. Besonders für die quantitativen kolorimetrischen Meßmethoden ist dies wichtig; denn Ascites-extrakte verschiedener Mäuse können sehr unterschiedliche Lichtabsorption aufweisen.

Zellvolumenbestimmung: Von jedem Mischascites ermittelte man das Zellvolumen in 0,1 ml Nativascites mit Kafka-Röhrchen.

Ergebnisse

I. Reaktionsfähigkeit der N-haltigen Peroxyde in vitro

(Experimentelle Bearbeitung Dr. Anna-Maria Fretzdorff)

Zur Bestimmung der Reaktionsfähigkeit von Peroxyden in vitro messen wir den zeitlichen Verlauf der Umsetzung mit Thiazolidincarbonsäure-(4)⁴. Diese Verbindung hat sich im in-vitro-Test bewährt, weil hier der Schwefel in der -C-S-C-Gruppierung nur zögernd mit Peroxyden reagiert, so daß der Reaktionsverlauf bequem gemessen werden kann. Zum Vergleich prüften wir analog dem Thiazolidintest die Reaktion einiger zellvertrauter Thioäther-Verbindungen mit organischen Peroxyden. Dabei zeigten die Vitamine Thiamin und Biotin eine, wenn auch geringe, Angreifbarkeit durch Peroxyd. Nach Istdg. Einwirkung von Bis-hydroxymethyl-peroxyd war der Persauerstoffgehalt in Gegenwart von Thiamin auf 84,7, in Gegenwart von Biotin auf 76,0% gesunken. Wie in der Thiazolidincarbonsäure dürfte hier die Oxydation am Schwefel der Thioäther-Bindung angreifen. Dies geht auch daraus hervor, daß im Parallelversuch mit Desthiobiotin eine Abnahme des aktiven Sauerstoffs nicht nachzuweisen war.

Die einzige von uns bisher aufgefundene Thioäther-Verbindung, welche etwa ebenso gut wie Thiazolidincarbonsäure mit Peroxyden reagiert, ist das Methionin. Die Einwirkung von 10 stickstoffhaltigen Peroxyden auf Thiazolidincarbonsäure und auf Methionin ist aus Tab. 1 ersichtlich. Einige dieser Peroxyde zeigen im Thiazolidintest eine bemerkenswerte Oxydationsgeschwindigkeit. So sinkt der Persauerstoffgehalt innerhalb einer Stunde bei der Bis-[morpholino-methyl]-Verbindung auf 49,6%, bei der Bis-[succinimido-methyl]-Verbindung auf 57,0% und bei der Bis-[glutarimido-methyl]-Verbindung auf 66,2%. In Tab. 1 fällt auf, daß die symmetrisch mit zwei Heterocyclen substituierten Peroxyde ihren aktiven Sauerstoff erheblich rascher abgeben als die anderen, mit tert.-Butyl- oder Cumyl- substituierten Peroxyde. Diese reagieren sämtlich nur träge im Thiazolidintest; nach Istdg. Reaktionszeit sind noch 84—98% des Persauerstoffs vorhanden.

Tab. 1. Reaktionsvermögen N-haltiger organischer Peroxyde gegenüber Thiazolidin-carbonsäure-(4) (Th.) und Methionin (M.).

Peroxyd	Substrat	noch vorhandener akt. O in % nach		
		5 Min.	30 Min.	60 Min.
Bis-[succinimido-methyl]-peroxyd	Th.	70,4	59,7	57,0
Bis-[glutarimido-methyl]-peroxyd	Th.	82,0	70,6	66,2
	M.	82,5	57,5	47,8
<i>N</i> -[tert.-Butylperoxymethyl]-succinimid	Th.	90,6	90,9	88,0
Bis-[morpholino-methyl]-peroxyd	Th.	69,3	52,9	49,6
	M.	84,4	40,6	23,4
<i>N</i> -[tert.-Butylperoxymethyl]-morpholin	Th.	92,5	88,4	83,7
	M.	99,0	99,0	98,2
<i>N</i> -[Cumylperoxymethyl]-morpholin	Th.	92,5	89,6	87,6
	M.	98,7	96,1	94,3
<i>N.N'</i> -Bis-[tert.-butylperoxymethyl]-piperazin	Th.	99,9	100,3	97,6
	M.	100,6	100,3	98,6
<i>N.N'</i> -Bis-[cumylperoxymethyl]-piperazin	Th.	95,0	92,4	88,9
	M.	100,3	99,6	97,2
<i>N</i> -[tert.-Butylperoxymethyl]-pyrrolidin	Th.	99,0	96,2	91,6
	M.	100,0	100,0	100,0
<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -[tert.-butylperoxymethyl]-harnstoff	Th.	96,0	96,7	96,8
	M.	101,0	100,0	99,1

Vergleicht man damit die analog erhaltenen Werte des Methionintestes (Tab. 1), so ergibt sich weitgehende Parallelität. Mit den im Thiazolidintest stark wirksamen Peroxyden verläuft die Oxydation des Methionins zumeist noch etwas rascher als diejenige des Thiazolidinringes, s. z. B. Bis-[glutarimido-methyl]- und Bis-[morpholino-methyl]-peroxyd. Diejenigen Peroxyde in Tab. 1, die im Thiazolidintest nur langsam reagieren, sind jedoch gegenüber Methionin meist noch reaktionsträger.

Es versteht sich von selbst, daß Thiazolidin- und Methionintest nur über die Reaktionsfähigkeit eines Peroxyds, nicht aber über dessen intrazelluläre Angriffspunkte Aufschluß geben können. Nach unseren bisherigen Erfahrungen erlaubt jedoch der Thiazolidintest Voraussagen über die zu erwartende Peroxydwirkung am Mäuse-Ascitescarcinom *in vivo*: nur solche Peroxyde, die im Thiazolidintest in 60 Min. einen Persauerstoff-Verlust von 30—40% (oder mehr) erleiden, sind an der Maus wirksam (s. l. c.⁴). Dies trifft in der Tat, wie unten gezeigt wird, für die Bis-[succinimido-methyl]- und die Bis-[glutarimido-methyl]-Verbindung zu, jedoch nicht für die zu toxische Bis-[morpholino-methyl]-Verbindung.

Unter dem Gesichtspunkt der intrazellulären Peroxydwirkung erhebt sich die Frage, welche Substanzgruppen überhaupt im lebenden Gewebe für eine Reaktion mit Peroxyden in Frage kommen. Von den labilen Schwefelverbindungen sind zweifellos diejenigen am leichtesten oxydabel, welche freie, nicht besonders maskierte Thiol-Gruppen besitzen. Hierzu gehören die meisten SH-Fermente, deren Empfindlichkeit gegenüber Peroxyden wir am Beispiel von Aldolase¹⁰, Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase¹⁰, Hexokinase¹¹, Glycerin-1-phosphat-dehydrogenase¹² und am transacetylierenden System¹³ untersuchten. Niedermolekulare SH-Verbindungen wie Cystein, Glutathion, Thioglykolsäure u. dgl. reagieren mit den cytostatisch wirksamen Peroxyden der vorliegenden und vorangehenden⁴ Arbeit *in vitro* so rasch und vollständig, wie wir es bei Thioäthern nie beobachten konnten. Die Oxydation der SS-Bindung erfolgt dagegen langsamer als die der Thiolgruppe. Nach unseren bisherigen (unveröffentlichten) Befunden nimmt die Disulfidbindung hier eine Mittelstellung zwischen SH-Gruppe und Thioäther ein.

Unklar ist bisher, welche zellvertrauten Gruppierungen außer den labilen Schwefel-Verbindungen von Peroxyden leicht angegriffen werden. Wir prüften daher die Oxydation weiterer zellvertrauter Substanzen durch das in der Ascites-Maus stark wirksame Bis-hydroxymethylperoxyd. Im Phosphatpuffer bei pH 7,1 wurde das zu prüfende Substrat (0,05*m*) mit Bis-hydroxymethylperoxyd (0,025*m*) 1—2 Stdn. stehen gelassen; in verschiedenen Zeitabständen entnahm man Proben des Ansatzes und bestimmte jodometrisch den noch vorhandenen Persauerstoffgehalt. Im Vergleich zu den Thiol- und Thioäther-Verbindungen zeigten fast alle geprüften Substrate eine auffallend hohe Stabilität, d. h. nach 60 Min. waren noch 95—100% des eingesetzten Bis-hydroxymethylperoxyds unverändert vorhanden! Derartige mit Peroxyd praktisch nicht reagierende Verbindungen sind z. B. die folgenden:

Uracil	Adenosin-3'-phosphorsäure	Pyridoxin
Thymin	Adenosin-5'-phosphorsäure	Nicotinsäure
Adenosin	DL-Histidin	Nicotinsäureamid
Cytidin	Histamindiphosphat	NAD [®]
Uridin		Trigonellin
		Glucose

Daraus folgt, daß wir noch keine schwefelfreie zellvertraute Verbindung kennen, welche bei neutralem pH mit organischen Peroxyden ebenso rasch reagiert wie die Thiol- oder wenigstens wie die Thioäther-Verbindungen.

¹⁰ G. Weitzel u. W. Schaeg, diese Z. **316**, 250 [1959].

¹¹ A. Fischer, Dissertat. Univ. Tübingen 1961.

¹² H. Nagler, Dissertat. Univ. Tübingen 1963.

¹³ G. Weitzel, H. König, G. Benwitz u. P. Wahl, diese Z. **316**, 267 [1959].

Tab. 2. Hemmung der anaeroben Glykolyse und der Atmung
 Inkubationsmedium: Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer für Glykolyse. Krebs-
 Volle Aktivität = Kontrolle = 100, totale Hemmung = 0.

Peroxyd molare Inhibitor-Endkonz.:	anaerobe Glykolyse ohne Serum	
	5×10^{-4}	10^{-4}
Bis-hydroxymethyl-peroxyd	5	75
Bis-[succinimido-methyl]-peroxyd	0—5	80—95
Bis-[glutarimido-methyl]-peroxyd	0—5	60—80
<i>N</i> -[tert.-Butylperoxymethyl]-succinimid	20	90
Bis-[morpholino-methyl]-peroxyd	5	60
<i>N</i> -[tert.-Butylperoxymethyl]-morpholin	10	90
<i>N</i> -[n-Butylperoxymethyl]-morpholin	10	90
<i>N</i> -[Cumylperoxymethyl]-morpholin	10	90
<i>N,N'</i> -Bis-[tert.-butylperoxymethyl]-piperazin	0	70

II. Einwirkung auf Ascites-Krebszellen in vitro

Die Hemmeffekte der heterocyclisch substituierten Peroxyde an Ascites-Krebszellen im Warburg-Versuch sind in Tab. 2 zusammengestellt. Zum Vergleich sind die Werte des Bis-hydroxymethyl-peroxyds zu Beginn der Tabelle angeführt. Man erkennt, daß sämtliche Peroxyde der Tab. 2 starke Inhibitoreffekte besitzen, die z. T. diejenigen des Bis-hydroxymethyl-peroxyds erreichen. Bis-[succinimido-methyl]- und Bis-[glutarimido-methyl]-peroxyd hemmen die anaerobe Glykolyse in der Konzentration $5 \times 10^{-4}m$ praktisch total und in $1 \times 10^{-4}m$ noch deutlich. *N*-[tert.-Butylperoxymethyl]-succinimid hemmt nicht ganz so stark; das Gleiche gilt für sämtliche Morpholino-Verbindungen. Bei diesen ist wie bei den Succinimidperoxyden die symmetrisch substituierte Bis-Verbindung stärker wirksam als die unsymmetrisch substituierten tert.-Butyl-peroxyde. Die hochwirksame Piperazino-Verbindung am Ende von Tab. 2 nimmt eine Sonderstellung ein, da hier zwei Peroxygruppen im Molekül enthalten sind. Für alle Peroxyde der Tab. 2 gilt, daß die anaerobe Glykolyse stärker als die Atmung gehemmt wird. In Abwesenheit von 50% Serum in Inkubationsmedium sind die Hemmeffekte durchweg geringer, trotzdem aber in der Inhibitor-Konzentration $5 \times 10^{-4}m$ noch stark ausgeprägt.

Vergleicht man die in Tab. 2 zusammengestellten Ergebnisse mit den entsprechenden Werten des Thiazolidin- und Methionintestes (Tab. 1), so zeigt sich eine bemerkenswerte Übereinstimmung. Hier wie dort sind die drei symmetrisch substituierten Peroxyde (Bis-[succinimido-methyl]-, Bis-[glutarimido-methyl]-, Bis-[morpholino-methyl]-peroxyd) am stärksten wirksam. Eine Ausnahme macht die Piperazino-Verbindung, welche gegenüber Asciteszellen (Tab. 2) hochwirksam, gegenüber Thiazolidin-carbonsäure-(4) (Tab. 1) unwirksam ist.

von Asciteszellen durch heterocyclisch substituierte Peroxyde.

Ringer-Phosphatpuffer für Atmung, ohne und mit Zusatz von je 50% Humanserum. Hemmeffekte auf Fünferwerte abgerundet.

anaerobe Glykolyse mit 50% Serum		Atmung			
		ohne Serum		mit 50% Serum	
5×10^{-4}	10^{-4}	5×10^{-4}	10^{-4}	5×10^{-4}	10^{-4}
15	100	55	95	70	100
0—5	90	80	100	80	100
20	95	35	100	—	—
70	100	80	100	75	90
40	95	35	100	—	—
50	100	60	95	95	100
70	100	45	100	—	—
50	100	20	100	—	—
15	80	15	100	90	100

III. Einwirkung auf das Mäuse-Ascitescarcinom in vivo

Die in Tab. 3 zusammengestellten Versuchsergebnisse zeigen, daß neben dem früher von uns¹⁻⁴ aufgefundenen Bis-hydroxymethyl-peroxyd weitere organische Peroxyde existieren, welche das Wachstum des Ascitescarcinoms in der Maus völlig unterbinden können. Hierzu gehören die beiden zu Beginn von Tab. 3 angeführten Substanzen, das Bis-[succinimido-methyl]- und das Bis-[glutarimido-methyl]-peroxyd. Die Abstufung der Dosen von 4—8 bzw. von 1—7 mg gibt ein deutliches Bild der Dosisabhängigkeit des Effektes. Bei beiden Verbindungen reichen schon etwa 4 mg pro Maus und Tag zur Verhinderung des Asciteswachstums aus. Die jeweilige DL_{50} (12 bzw. 8 mg) ist relativ weit von der therapeutischen Dosis entfernt. Dabei ist die Glutarimido-Verbindung etwas toxischer als die Succinimido-Verbindung, was sich auch in der Zahl der pro Versuchsgruppe überlebenden Tiere ausprägt. Vergleicht man damit die cytostatische Wirkung des folgenden, einseitig mit Succinimid substituierten Peroxyds, so ist dessen Wirkung schwächer als diejenige der beiden Bis-Verbindungen. Man erreicht zwar noch eine deutliche Verminderung, aber keine vollständige Aufhebung des Asciteswachstums.

Die in Tab. 3 folgenden vier Morpholino-Verbindungen sind sämtlich erheblich toxischer als die vorangehenden Dicarbonsäurederivate. Auch beim Einsatz subtoxischer Dosen gelingt es nicht, das Asciteswachstum zu verhindern. Aber auch hier ist wiederum die Bis-morpholino-Verbindung die wirksamste; sie vermindert die Ascitesbildung auf annähernd die Hälfte des Kontrollwertes. Die beiden Piperazino-Verbindungen zeigen, wenn überhaupt, nur schwache Effekte; das *N*-[tert.-Butylperoxymethyl]-pyrrolidin ist völlig wirkungslos. Die am Ende von Tab. 3 aufgeführten zwei Harnstoffverbindungen sind ebenfalls ohne Effekt.

Tab. 3. Prüfung N-haltiger organischer Peroxyde an der Ascitesmaus.

Peroxyd	Dosis mg/Maus u. Tag i. p.		Kontrollgruppe = 100% Werte in % der Kontrolle am 11. Versuchstage		Zahl der über- leb. Tiere von je 11
	DL ₅₀	im Versuch	Gew.- zunahme	Ascites- menge	
Bis-[succinimido-methyl]-peroxyd	12	4	9	0	11
		5	—29	0	11
		6	—26	13	11
		7	—14	0	11
		8	—14	0	10
Bis-[glutarimido-methyl]-peroxyd	8	1	70	21	9
		2	13	20	10
		3	—7	7	11
		4	—35	0	8
		7	—33	0	8
N-[tert.-Butylperoxymethyl]- succinimid	> 12	8	22	22	11
		9	28	34	11
Bis-[morpholinomethyl]-peroxyd	3	0,7	65	76	10
		1	87	54	2
N-[tert.-Butylperoxymethyl]- morpholin	4,5	2	103	90	11
		2,5	100	102	11
N-[n-Butylperoxymethyl]-morpholin	3,5	1,5	90	95	11
N-[Cumylperoxymethyl]-morpholin	5	2	77	77	10
		2,5	48	64	8
N.N'-Bis-[tert.-butylperoxymethyl]- piperazin	5	2,5	102	97	11
		2,5	102	97	11
N.N'-Bis-[cumylperoxymethyl]- piperazin	12	6	91	96	9
N-[tert.-Butylperoxymethyl]- pyrrolidin	6	2,5	100	105	11
N-Methyl-N'-[tert.-butylperoxy- methyl]-harnstoff	9	8	116	105	8
N-Dimethyl-N'-[tert.-butylperoxy- methyl]-harnstoff	> 12	7	127	140	10
		8	97	94	11

Vergleicht man die in Tab. 3 zusammengefaßten Effekte an der Ascitesmaus mit den Wirkungen der gleichen Peroxyde im Thiazolidin-Test (Tab. 1) sowie im Warburg-Versuch (Tab. 2), so zeigen in allen drei Versuchsanordnungen die Bis-[succinimido-methyl]- und die Bis-[glutarimido-methyl]-Verbindung besonders hohe Wirksamkeit. Weitere Verbindungen, die im Thiazolidintest und/oder im Warburg-Versuch starke Effekte zeigen, versagen in der Ascitesmaus. Hierzu gehören z. B. das im Thiazolidintest rasch reagierende Bis-[morpholino-methyl]-

peroxyd und das im Warburg-Versuch stark wirksame *N,N'*-Bis-[tert.-butylperoxymethyl]-piperazin.

Weitere Versuche mit den Dicarbonsäure-imido-peroxyden an Ascites-Mäusen

Zur Bestimmung der Überlebenszeit wurden Gruppen zu je 22 Mäusen vom 3.—10. Versuchstag mit Bis-[succinimido-methyl]-peroxyd (7 mg pro Tag und Maus) bzw. Bis-[glutarimido-methyl]-peroxyd (3 mg) behandelt. Das Ergebnis ist aus Tab. 4 ersichtlich. Nach 3 Wochen z. B. war die Hälfte der Kontrolltiere verstorben, während in den beiden Peroxyd-Gruppen noch je 20 Tiere lebten und keine Ascitesbildung erkennen ließen. Vergleicht man die Zeitpunkte, an denen jeweils noch 50% der Tiere/pro Gruppe am Leben waren, so verhalten sich die Überlebenszeiten von Kontroll-, Bis-[succinimido-methyl]- und Bis-[glutarimido-methyl]-peroxyd-Gruppe wie 1:2:4. In einem anderen Versuche erzielten wir mit Bis-[succinimido-methyl]-peroxyd (11 Tiere; 9 Tage je 7 mg/Maus) ein besseres Ergebnis: Am 51. Tage waren von der Kontrollgruppe alle Tiere verstorben, während von der Peroxydgruppe 9 von 11 Tieren noch am Leben waren und keine Ascitesbildung aufwiesen, wie die Autopsie ergab.

Tab. 4. Überlebenszeit von Ascitesmäusen nach Peroxyd-Behandlung.

Tage nach Versuchsbeginn	Kontrollgruppe Ringerlösung		Bis-[succinimido- methyl]-peroxyd		Bis-[glutarimido- methyl]-peroxyd	
	Tier- zahl	mittl. Tiergewicht	Tier- zahl	mittl. Tiergewicht	Tier- zahl	mittl. Tiergewicht
3	22	25 g	22	25 g	22	25 g
10	21	32 g	22	22 g	22	23 g
21	11	42 g	20	25 g	20	26 g
42	1	45 g	12	27 g	19	28 g
63	—	—	7	29 g	14	29 g
84	—	—	4	28 g	11	30 g

Die Dosisabstufung des Bis-[succinimido-methyl]-peroxyds geht aus dem parallelen Gruppenversuch der Abb. 1 hervor. Die mit 4 mg pro Tag und Maus behandelte Gruppe nahm während der Versuchsdauer geringfügig an Gewicht zu. Bei der Tötung am 11. Versuchstage waren alle 11 Tiere dieser Gruppe frei von Ascites. Auch bei den mit 5 bzw. 7 mg behandelten Gruppen waren sämtliche Tiere zu Versuchsende ohne Ascites, Tierverluste traten nicht ein. Aus Abb. 1 erkennt man, daß die 5- und die 7-mg-Dosis im Gegensatz zur 4-mg-Dosis zur Abnahme des Körpergewichtes führen. Will man mit N-Lostverbindungen an Ascitesmäusen die gleichen Effekte erreichen, so gelingt dies praktisch

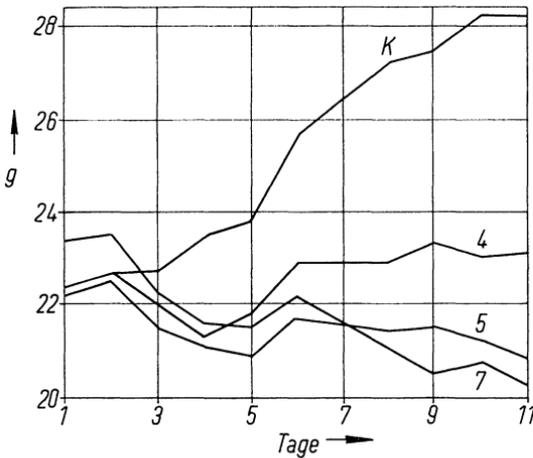


Abb. 1. Einfluß von Bis-[succinimido-methyl]-peroxyd auf das Mäuse-Ascites-carcinom. 4 Gruppen zu je 11 Tieren. Inokulation am 1. Versuchstage, vom 2. bis 10. Tage je 0,5 cm³ i. p.; K = Kontrollgruppe; die Peroxyddosis in mg/Maus und Tag befindet sich an den Kurven. Ordinate: Körpergewicht in g.

nicht. Nur wenn man subtoxische Dosen einsetzt, läßt sich die Ascitesbildung hintanhaltend. Dabei kommt es jedoch regelmäßig zu hohen Tierverslusten und zu extremer Gewichtsabnahme während der Versuchsdauer.

In einem sogen. „Therapie-Versuch“ mit Bis-[succinimido-methyl]-peroxyd begann man mit der Behandlung bei drei verschiedenen Mäusegruppen erst am 3. bzw. 4., bzw. 5. Tage nach der Inokulation der Krebszellen (Dosis 7 mg pro Tag und Maus). Die beiden Gruppen, welche am 3. bzw. am 4. Tage nach der Inokulation das Peroxyd erhielten, waren bei der Tötung am 11. Versuchstage frei von Ascites, wobei jeweils alle 11 Tiere überlebt hatten. Diejenige Gruppe, bei welcher erst am 5. Tage mit der Behandlung begonnen wurde, zeigte am 11. Versuchstage eine Gewichtszunahme von 23% und eine Ascitesmenge von 25% der Kontrollgruppe (diese = 100%). Von den 11 Tieren dieser Gruppe waren bis zum 11. Tage 5 verstorben.

Als Beispiel für die Wirkung des Bis-[glutarimido-methyl]-peroxyds ist in Abb. 2 ein weiterer „Therapie-Versuch“ dargestellt. Die über den Kurven befindlichen Pfeile geben den Zeitpunkt des Beginns der Behandlung an. Die Kontrollgruppe (K) wurde vom 2. Tage an mit Ringer-Lösung behandelt, während die Versuchsgruppe I vom 2. Tage an 3 mg Bis-[glutarimido-methyl]-peroxyd pro Maus und Tag i. p. erhielt. Der Kurvenverlauf I zeigt, daß diese Dosis eine Gewichtszunahme der Mäuse verhindert. Am 11. Versuchstage waren von den 11 Tieren dieser Gruppe noch 10 am Leben; nur ein Tier davon zeigte eine geringfügige Ascitesbildung. Die Kurve II entspricht der Versuchs-

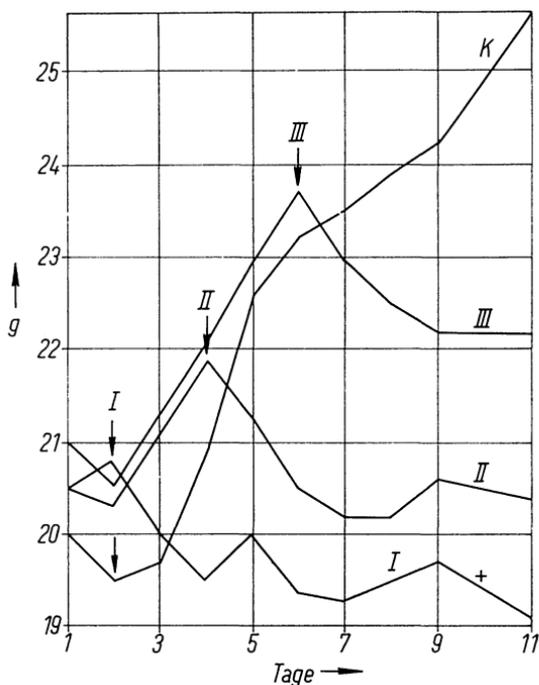


Abb. 2. Therapie-Versuch mit Bis-[glutarimido-methyl]-peroxyd. K = Kontrollgruppe (0,5 cm³ Ringer-Lösung pro Maus u. Tag i. p.). I, II, III = Tiergruppen, die je 3 mg des Peroxyds pro Tag und Tier i. p. erhielten. Die Pfeile geben den Beginn der Injektionen an, letzte Injektion stets am 10. Tage.

gruppe, welche erst am 4. Tage nach der Inokulation das Peroxyd erhielt. Man erkennt an der rasch einsetzenden, drastischen Senkung des Körpergewichtes den therapeutischen Effekt: Die Gruppe hat am 6. und 7. Tage ihr Ausgangsgewicht wieder erreicht. Zu Versuchsende am 11. Tage waren alle Tiere der Gruppe am Leben, 4 von ihnen zeigten eine (allerdings sehr geringe) Ascitesbildung. Die Verlaufsform der Kurve III entspricht derjenigen Gruppe, bei der man erst am 6. Tage mit der Peroxydzufuhr begann. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die Tiere schon eine sehr beträchtliche Zunahme des Körpergewichtes auf, jedoch erkennt man auch hier die sofort einsetzende Gewichtssenkung. Zu Versuchsende waren alle 11 Tiere der Gruppe III am Leben, die Wägung der Ascitesmenge ergab 63% der Kontrollgruppe (= 100%). Da aus Vergleichsgründen diese Gruppe ebenfalls am 11. Versuchstage, d. h. nach nur fünfmaliger Injektion getötet werden mußte, läßt sich nicht sagen, ob eine Weiterführung der Behandlung den Ascites gänzlich zum Verschwinden gebracht hätte.

Tab. 5. Metabolit-Konzentrationen im Mäuse-Ascites nach einmaliger
(Alle Werte in γ/cm^3 Nativascites. K = gemessener Wert vor,

Zeitpunkt nach Peroxyd- Injektion (= Abstand K bis P)	NAD ^o		Gesamt-Pyridin- nucleotide		Nicotinsäureamid	
	K	P	K	P	K	P
30 Min.	69,0	28,8	134,2	81,7	3,19	5,59
1 Stde.	64,6	13,4	133,2	53,2	2,94	3,87
2 Stdn.	72,4	25,9	137,0	64,3	2,79	2,76
4 Stdn.	57,9	25,7	113,4	61,2	2,71	2,17
6 Stdn.	61,7	32,3	106,5	67,4	2,22	2,11

IV. Einfluß der Peroxyde auf Metabolit-Konzentrationen im Ascites

In früheren Arbeiten wiesen wir²⁻⁴ nach, daß die Wirkung des Bis-hydroxymethyl-peroxyds auf Ascites-Krebszellen *in vitro* und *in vivo* mit einer starken Abnahme der NAD-Konzentration und mit einem Anstau von Fructosediphosphat und Triosephosphat einhergeht. Diese Effekte fehlten bei cytostatisch unwirksamen Peroxyden. Um weiteren Einblick in den intrazellulären Wirkungsmechanismus der organischen Peroxyde zu erhalten, bestimmten wir in der vorliegenden Arbeit Metabolit-Konzentrationen im voll entwickelten Ascites vor und nach einer einmaligen Peroxydinjektion. Dabei verglichen wir stickstoffhaltige Peroxyde, die sich an der Ascitesmaus als wirksam erwiesen hatten, mit solchen, die *in vivo* ohne Wirkung waren (s. o. Tab. 3). In Tab. 5 sind die vor und nach Injektion von Bis-[succinimido-methyl]-peroxyd im Ascites gemessenen Werte für NAD^o, Gesamt-Pyridinnucleotide, Nicotinsäure und ihr Amid, ATP, Fructosediphosphat und Triosephosphat zusammengestellt.

Aus Tab. 5 geht hervor, daß die vor den Peroxydinjektionen ermittelten Kontrollwerte mit wenigen Ausnahmen ein relativ gleichmäßiges Niveau zeigen. Nach den Peroxydinjektionen kommt es dagegen zu teilweise beträchtlichen Konzentrationsänderungen. So ist z. B. NAD^o nach 30 Min. auf etwa die Hälfte, nach 1 Stde. auf etwa $\frac{1}{5}$ des Kontrollwertes abgesunken; 6 Stdn. nach der Peroxydinjektion wird erst die Hälfte des Kontrollwertes wieder erreicht. Die Gruppe der Gesamt-Pyridinnucleotide zeigt gleichsinniges Verhalten wie NAD^o, jedoch in abgeschwächtem Maße. Hier werden offenbar neben NAD^o auch Pyridinnucleotide erfaßt, welche an den Schwankungen der NAD^o-Konzentration nicht teilnehmen. Nicotinsäureamid verhält sich umgekehrt wie NAD^o: 30 Min. nach der Injektion zeigt es einen sehr

Injektion von Bis-[succinimido-methyl]-peroxyd (5 mg/Maus i. p.).

P nach Peroxyd-Zufuhr- näheres s. o. unter „Methodik“.

Nicotinsäure		ATP		Fructose-diphosphat		Triosephosphat	
K	P	K	P	K	P	K	P
26,5	21,0	605	154	0,44	108,6	0,87	81,20
23,7	16,4	355	170	0,43	99,9	0,40	52,25
24,4	16,4	446	265	0,54	39,6	0,98	16,51
21,7	15,9	429	380	0,45	11,4	1,22	19,86
20,2	15,2	360	407	0,44	37,1	2,25	12,39

starken Anstieg; erst nach etwa 2 Stdn. wird das Niveau des Kontrollwertes wieder erreicht. Nicotinsäure dagegen nimmt an den Ausschlägen der NAD⁺- und Nicotinsäureamid-Konzentrationen nicht teil. ATP verhält sich ähnlich wie NAD⁺: Man findet eine starke Verminderung der ATP-Konzentration während der ersten Stunde nach Peroxydinjektion. Jedoch ist im Vergleich zu NAD⁺ die Senkung der ATP-Konzentration etwas weniger stark ausgeprägt und bereits nach 4 Stdn. wieder ausgeglichen.

Die Konzentrationen an Fructosediphosphat und Triosephosphat zeigen bereits 30 Min. nach Peroxydinjektion Zunahmen auf etwa das 200- bzw. 100fache der Kontrollwerte! Diese Steigerungen normalisieren sich während der ganzen Versuchszeit nicht; auch nach 6 Stdn. betragen die Konzentrationen beider Metaboliten noch ein Vielfaches der Kontrollwerte. Hier besteht somit ein bemerkenswerter Unterschied zum Verhalten von ATP und Nicotinsäureamid, deren Konzentrationsänderungen noch innerhalb der Versuchsdauer wieder ausgeglichen werden.

Eine in gleicher Weise durchgeführte Analyse des Ascites nach Injektion von Bis-[glutarimido-methyl]-peroxyd ergab dasselbe Bild, wie es Tab. 5 für die Succinimido-Verbindung zeigt. Dagegen beobachtet man nach Injektion stickstoffhaltiger Peroxyde, die an der Ascitesmaus unwirksam sind, keine deutlichen Veränderungen der Metabolit-Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollwerten. Als Beispiel ist in Abb. 3 das an der Ascitesmaus unwirksame Bis-[tert.-butylperoxymethyl]-piperazin dem Bis-[succinimido-methyl]-peroxyd gegenüber gestellt.

Die in Abb. 3 eingetragenen Werte beziehen sich hier nicht wie in Tab. 5 auf cm³ Nativascites, sondern auf cm³ Zellvolumen (in Abb. 3 umgerechnet auf % der Kontrollwerte). Die Bezugnahme auf das Zellvolumen kommt den wahren Verhältnissen näher, da für die Stoffwechsellätigkeit des Ascites die Zahl der Asciteszellen (nicht das Ascites-

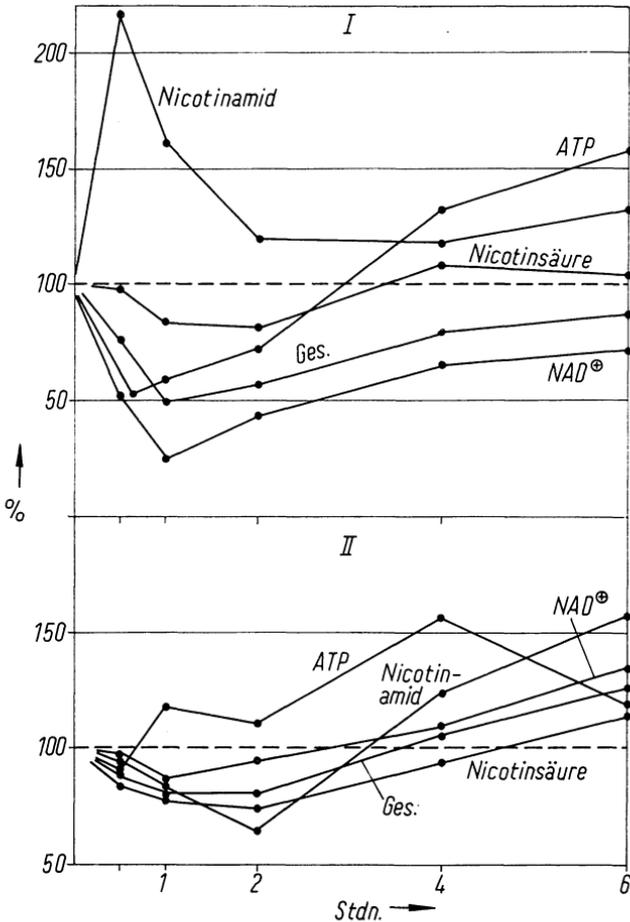


Abb. 3. Metabolit-Konzentrationen im Nativascites nach Injektion von Bis-[succinimido-methyl]-peroxyd (5 mg/Maus i. p.) = I und Bis-[tert.-butylperoxy-methyl]-piperazin (3 mg/Maus i. p.) = II. Abszisse: Zeit nach Peroxydinjektion. Ordinate: Prozentuale Abweichungen vom Kontrollwert, dieser = 100%. Ges. = Gesamt-Pyridinnucleotide.

volumen) entscheidend ist. Abb. 3 zeigt jedoch am Beispiel des Bis-[succinimido-methyl]-peroxyds, daß es für das Gesamtergebnis gleichgültig ist, ob die gemessenen Werte auf cm^3 Ascites oder auf cm^3 Zellvolumen bezogen werden. Denn wie in Tab. 5 ist auch in Abb. 3 die Peroxydwirkung charakterisiert durch das starke, rasch einsetzende Absinken von NAD^{\oplus} und ATP sowie durch einen, dem NAD^{\oplus} -Sturz etwa komplementären Nicotinsäureamid-Anstieg. Die Kurven für NAD^{\oplus} und Gesamt-Pyridinnucleotide laufen fast parallel, doch sind die Senkungen

der letzteren jeweils geringer. Nur Nicotinsäure nimmt an den Konzentrationsänderungen nicht teil. Bei der unwirksamen Piperazino-Verbindung (Abb. 3) fehlen alle diese Kriterien der Peroxyd-Wirkung; die Konzentrationen von NAD^{\ominus} , ATP, Nicotinsäureamid wie auch von Nicotinsäure und Gesamt-Pyridinnucleotiden bewegen sich während der ganzen Versuchsdauer in Bereichen, die denen der Kontrollwerte entsprechen. Auch die in Abb. 3 nicht eingezeichneten Zeit-Konzentrationskurven für Fructosediphosphat und Triosephosphat zeigen keine Abweichungen vom Kontrollbereich.

Diskussion

Die eingangs gestellte Frage, ob neben dem früher von uns¹⁻⁴ aufgefundenen Bis-hydroxymethyl-peroxyd weitere organische Peroxyde existieren, welche ebenfalls das Wachstum des Mäuse-Ascitescarcinoms *in vivo* verhindern können, ist auf Grund der vorstehend mitgeteilten Ergebnisse zu bejahen. Bis-[succinimido-methyl]- und Bis-[glutarimido-methyl]-peroxyd erreichen an Asciteszellen *in vitro* und an der Ascitesmaus den Wirkungsgrad des Bis-hydroxymethyl-peroxyds. Auf Grund unserer bisherigen Erfahrungen⁴ sind an der Ascitesmaus nur diejenigen Peroxyde wirksam, die im Thiazolidintest innerhalb 60 Min. zur Abnahme des Persauerstoffs auf weniger als 60% führen. In der Tat heben sich im Thiazolidintest (Tab. 1) die beiden wirksamen N-haltigen Peroxyde durch rasches Reaktionsvermögen deutlich von den unwirksamen Peroxyden ab. Die gleiche Differenzierung tritt zutage, wenn Methionin als Substrat dient (Tab. 1).

Hinweise auf die intrazellulären Angriffspunkte der rasch reagierenden organischen Peroxyde geben die *in vitro* durchgeführten Messungen der zeitlichen Abnahme des aktiven Sauerstoffs in Anwesenheit verschiedener Substrate. Übereinstimmend zeigt sich, daß labile Schwefelverbindungen mit SH-, SS- oder CSC-Gruppen leicht angegriffen werden, während dies für stickstoffhaltige Substrate nicht zutrifft. Unter den niedermolekularen Pyridin-, Pyrimidin-, Purin- und Imidazol-Verbindungen sowie unter Mono- und Dinucleotiden konnten wir bisher keine Substanz finden, welche in ihrer Angreifbarkeit durch organische Peroxyde bei neutralem pH mit der Empfindlichkeit der genannten Schwefelverbindungen auch nur annähernd vergleichbar wäre. Sofern sich dieses Bild nicht noch ändert, bleibt es wahrscheinlich, daß auch in der Zelle die labilen Schwefelverbindungen, vor allem Thiolgruppen von Enzymen, Angriffspunkte der organischen Peroxyde sind.

Die vorstehend beschriebenen Metabolit-Veränderungen im Ascites nach Injektion cytostatisch wirksamer N-haltiger Peroxyde geben den zeitlichen Verlauf der Konzentrationsänderungen 30 Min. bis 6 Stdn. nach der Peroxydinjektion wieder. Man beobachtet NAD^{\ominus} - und ATP-Senkungen, Nicotinsäureamid-Anstieg und Anstau von Fruc-

tosediphosphat und Triosephosphat. Es fällt auf, daß die gleichen Effekte auch nach Anwendung von N-Lost- und Äthylenimin-Verbindungen, d. h. von alkylierenden Substanzen, auftreten^{14, 15}. Dies spricht für gemeinsame Angriffspunkte in der Zelle, wofür wiederum reaktionsfähige Thiolgruppen in Frage kommen, die sowohl der Oxydation wie auch der Alkylierung zugänglich sind.

Die Arbeiten über den cytostatischen Wirkungsmechanismus von N-Lost- und Äthylenimin-Verbindungen haben zu der Annahme geführt^{15, 16}, daß hier die NAD⁺-Senkung durch eine Hemmung der NAD⁺-Synthese in der Krebszelle zustandekommt. Auch für das rasche Absinken der NAD⁺-Konzentration nach Peroxydeinwirkung erscheint diese Deutung geeignet, zumal dadurch zugleich der komplementäre Anstieg des Nicotinamids (s. Tab. 5 und Abb. 3) zwanglos als Anstau von Nicotinamid infolge gehemmter NAD⁺-Synthese erklärbar ist. Daß die NAD⁺-Senkung nach Peroxydgaben (ebenso wie nach Gabe von N-Lost- und Äthylenimin-Verbindungen) nicht eintritt, wenn mit Nicotinsäureamid vorinkubiert wird, hatten wir schon früher³ gefunden.

Der lang anhaltende, 6 Stdn. nach Peroxydinjektion noch nicht behobene Anstau von Fructosediphosphat und Triosephosphat (Tab. 5) verdient besondere Aufmerksamkeit. Würde dieser Anstau, wie man es z. B. für Äthylenimine annimmt, nur eine Folge des NAD⁺-Mangels sein, so müßte er mit der Normalisierung des NAD⁺-Gehaltes rasch verschwinden. Auf Grund unserer früheren Inhibitor-Versuche mit organischen Peroxyden an Fermenten¹⁰⁻¹³ nehmen wir an, daß die Thiolgruppen von Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase und Aldolase direkt geschädigt werden. Denn auch nach Einwirkung von Bis-[hydroxymethyl]-peroxyd auf Asciteszellen konnten wir die praktisch völlige Vernichtung der Aktivität dieses Enzyms nachweisen³.

Wenn die organischen Peroxyde in der Zelle bevorzugt reaktionsfähige Thiolgruppen angreifen, so ist mit zahlreichen verschiedenen Angriffspunkten zu rechnen. Neben der Hemmung des NAD⁺-aufbauenden Systems und der direkten Schädigung von Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase und Aldolase sollten daher weitere Inhibitor-effekte im Zellstoffwechsel nachweisbar sein. Noch ungeklärte Eingriffe in den Nucleotid-Stoffwechsel lassen sich z. B. aus der starken ATP-Verminderung nach Peroxyd-Injektion (s. o.) ableiten. Das Gleiche gilt für die nach Einwirkung von Röntgen-Strahlen beobachtete parallele Beziehung zwischen NAD⁺-Senkung und Verminderung des Thymidin-

¹⁴ J. M. Roitt, *Biochem. J.* **63**, 300 [1956].

¹⁵ H. Holzer, G. Sedlmayr u. A. Kemnitz, *Biochem. Z.* **328**, 163 [1956]; H. Holzer, P. Glogner u. G. Sedlmayr, ebenda **330**, 59 [1958]; H. Holzer u. H. Kröger, ebenda **330**, 579 [1958].

¹⁶ H. Kröger, H. Rotthauwe, B. Ulrich u. H. Holzer, *Biochem. Z.* **333**, 148, 155 [1960]; H. Holzer, G. Friedrich u. H. Griesebach, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **51**, 600 [1961].

Einbaus in Desoxyribonucleinsäure von Asciteszellen¹⁷; ein Effekt, der vermutlich durch Persauerstoff-Verbindungen ausgelöst wird, welche als Folge dieser Bestrahlung gebildet werden.

Für wertvolle Anregungen und Diskussionen danken wir Herrn wiss. Rat. Dozent Dr. E. Buddecke, für unermüdliche Mitarbeit Herrn cand. med. U. Klominsky.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine Sachbeihilfe.

Zusammenfassung

Die Darstellung von 10 mit Heterocyclen und 2 mit Harnstoff substituierten Peroxyden wird beschrieben.

Die Reaktionsfähigkeit dieser Peroxyde wird *in vitro* an der zeitlichen Abnahme des aktiven Sauerstoffs in Anwesenheit von Thiazolidin-carbonsäure-(4) oder Methionin gemessen. An weiteren Substanzen wird gezeigt, daß *in vitro* labile Schwefelverbindungen durch reaktionsfähige Peroxyde rasch angegriffen werden, während schwefelfreie zellvertraute Verbindungen gleicher Angreifbarkeit bisher nicht bekannt sind.

Symmetrisch substituierte Peroxyde wie Bis-[succinimido-methyl]-, Bis-[glutarimido-methyl]- und Bis-[morpholino-methyl]-peroxyd sind *in vitro* starke Inhibitoren der anaeroben Glykolyse und der Atmung von Ascites-Krebszellen.

Das Wachstum des Mäuse-Ascitescarcinoms *in vivo* wird durch Bis-[succinimido-methyl]- und Bis-[glutarimido-methyl]-peroxyd völlig gehemmt, die Überlebenszeit der Tiere wird beträchtlich verlängert; ein seit mehreren Tagen wachsendes Ascitescarcinom kann zurückgebildet werden.

Die Metabolit-Analyse des Nativascites vor und nach Peroxyd-injektion zeigt, daß die *in vivo* wirksamen stickstoffhaltigen Peroxyde die NAD^o- und ATP-Konzentration stark und rasch vermindern, während zugleich Nicotinamid ansteigt. Die Gesamt-Pyridinnucleotide folgen dem Verhalten des NAD^o, Nicotinsäure bleibt unbeeinflusst. Fructosediphosphat und Triosephosphat steigen bis auf das 200fache der Kontrollwerte an und zeigen noch 6 Stdn. nach Peroxydinjektion keine Normalisierung.

Summary

The preparation of 10 heterocyclic-substituted peroxides and 2 urea-substituted peroxides is described.

The reactivity of these peroxides was measured *in vitro* by the rate of disappearance of active oxygen in the presence of thiazolidine-carboxylic acid-(4) or methionine. Labile sulphur compounds are attacked

¹⁷ H. Hilz, M. v. Gossler, M. Oldekop u. M. Scholz, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **6**, 379 [1962]; H. Hilz, P. Hlavica u. R. Hubmann, *Österr. Chemiker-Ztg.* **63**, 287 [1962]. Vortrag H. Hilz, Wien 27. 9. 1962.

rapidly in vitro by reactive peroxides, but comparable lability is shown by no known sulphur-free cell compound.

Symmetrically substituted peroxides, like bis-[succinimido-methyl]-, bis-[glutarimido-methyl]-, and bis-[morpholino-methyl]-peroxide, are strong in vitro inhibitors of anaerobic glycolysis and the respiration of Ascites tumour cells.

The growth of mouse-Ascites carcinoma is completely inhibited in vivo by bis-[succinimido-methyl]- and bis-[glutarimido-methyl]-peroxide; the survival time of the animals is considerably increased; and several days growth of Ascites carcinoma will degenerate.

Metabolite levels of native Ascites were compared before and after peroxide injection. The in vivo-active, nitrogen-containing peroxides cause a rapid and large decrease in the concentration of NAD⁺ and ATP, with a simultaneous increase in nicotinamide. The level of total pyridin nucleotides follows that of NAD⁺; but nicotinic acid is unchanged. Fructose diphosphate and triose phosphate show a 200-fold increase over the control values, and, unlike the other metabolites, are still not normalised 6 hours after peroxide injection.

Prof. Dr. Dr. Günther Weitzel, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, 74 Tübingen, Gmelinstraße 8.
