

folic acid cleaved far exceeded the concentration of added  $H_2O_2$  on molar basis. Under anaerobic conditions, the folic acid degraded was related to the amount of  $H_2O_2$  added in the ratio of 1 : 1 within the range of 1 to 5  $\mu g$  of  $H_2O_2$  (Fig. 1). These observations suggest that, in absence of air, the cleavage of folic acid is purely due to the activity of the peroxidase. Addition of small quantities of catalase completely inhibited the system, indicating that  $H_2O_2$  *per se* is essential for the enzyme system degrading folic acid.

A study of the products of reaction formed from folic acid by the peroxidase from *C. arietinum* showed that liberation of the aromatic amine was accompanied by a simultaneous increase in the carbonyl derivative. This was extracted by methods described previously<sup>4</sup> and identified as 2-amino-4-hydroxy-6-formyl-pteridine by the characteristic absorption spectrum (Fig. 2). The aromatic amine was identified as *p*-aminobenzoylglutamic acid by the ether extraction procedure described by STOKSTAD *et al.*<sup>5</sup>. It is thus clear that the peroxidase of *C. arietinum* brings about a cleavage of folic acid at  $C_9-N_{10}$  linkage.

**Discussion.** It is well known that peroxidases can function also as oxidases<sup>7,8</sup> and in many instances the requirements for trace amounts of  $H_2O_2$  in the oxidase reaction have been clearly demonstrated. The results described here strongly suggest that folic acid is oxidised under aerobic conditions in presence of small quantities of  $H_2O_2$  in a manner so as to generate more  $H_2O_2$ . Such a mechanism could account for the greater degradation of folic acid observed under aerobic conditions than expected on stoichiometric basis from the quantity of  $H_2O_2$  added. Since the oxidase reaction cannot operate in absence of air, the breakdown of folic acid is then dependent on added  $H_2O_2$ . As only the peroxidase is effective under anaerobiosis, the ratio of folic acid degraded to  $H_2O_2$  added is 1, as experimentally found. A possible reason for the lack of activity under anaerobic conditions when heated extracts were employed, could be that small quantities of added  $H_2O_2$  were removed from the field of action by other peroxidase substrates present in the heated extract. Such an interference would be absent in the system containing only dialysed enzyme but no heated extract. Although the dialysed enzyme extracts are impure in so far as they contain adhering cofactors, it is clear from the results of the anaerobic experiments that they do not contain competing substrates for the peroxidase. Thus even 1  $\mu g$  of  $H_2O_2$  could degrade an equivalent quantity of folic acid.

The results reported are of interest in relation to the decrease in total folic acid content found to occur during the growth of seedlings of *C. arietinum*<sup>9</sup>.

Since these seeds contain low catalase activity, it is conceivable that the peroxidatic breakdown operates *in vivo* and may play a role in the destruction of total folic acid observed during the germination of these and many other seeds.

D. S. GHANEKAR and B. M. BRAGANCA

Enzyme Chemistry Department, Indian Cancer Research Centre, Bombay (India), June 17, 1960.

### Résumé

La peroxidase des plantules de *Cicer arietinum* catalyse la transformation de l'acide folique dans 2-amino-4-hydroxy-6-formyl-pteridine et l'acide *p*-amino-benzoylglutamique. C'est peut-être le mécanisme responsable de la diminution de l'acide folique observée pendant la germination.

## Wirkung von $\Delta^4$ -Cholesten-3,6-dion auf die Auslösung und Entwicklung von Tumoren

Aus zahlreichen tierexperimentellen Untersuchungen ist die Bedeutung von Steroidhormonen für die Auslösung und Förderung des Tumorwachstums unter bestimmten Bedingungen erwiesen<sup>1</sup>. Die Angaben über die Wirkung des Cholesterins und einiger Derivate sind nach bisherigen Versuchsergebnissen nicht übereinstimmend<sup>2-6</sup>. Besonderes Interesse hat das Auftreten ungesättigter Steroide mit UV-Absorption im Stoffwechsel Krebskranker erregt<sup>7</sup>. Bei dem von FIESER für Cancerogenese-Versuche synthetisierten, aber in seiner Wirkung umstrittenen  $\Delta^4$ -Cholesten-3,6-dion (Cholesten-dion) handelt es sich um ein stark elektronenaktives ungesättigtes Sterin mit ausgeprägter UV-Absorption. Die zusätzliche Sauerstoff-Funktion in 6-Stellung ist zudem in bemerkenswerter Parallele bei speziellen Stoffwechsel-Reaktionen von Steroidhormonen zu finden.

Bei experimentellen, über viele Jahre an einer grossen Zahl von Mäusen durchgeführten Untersuchungen von HIEGER<sup>8,9</sup> sind nach subkutaner Injektion von Cholesterin lokal sarkomatöse Geschwülste aufgetreten, deren Frequenz bei verschiedenen Versuchen bemerkenswerte Schwankungen zwischen 0 und 14% aufweist. HIEGER nimmt an, dass diese unterschiedlichen Ergebnisse von individuellen Besonderheiten der Reaktionsfähigkeit der Tiere abhängig sind. Er vertritt jedoch die Meinung, dass dem Cholesterin eine schwache cancerogene Wirkung zukommt, wenngleich bisher nicht endgültig geklärt ist, ob das Cholesterin selbst oder endogen entstehende Oxydationsprodukte wirksam sind. BISCHOFF<sup>5,6</sup> hat nach subkutaner Verabreichung verschiedener von FIESER *et al.*<sup>4</sup> synthetisierter Oxydationsprodukte des Cholesterins bei einem bestimmten Mäusestamm (Marsh-Buffalo) in einem hohen Prozentsatz die Entwicklung lokaler sarkomatöser Geschwülste beobachtet, zum Beispiel nach Applikation von Cholesten-dion bei 33 Marsh-Buffalo-Mäusen in 34% Fibrosarkome. Diese Ergebnisse sind von HIEGER bei der Überprüfung an einem anderen Mäusestamm nicht bestätigt worden<sup>3</sup>.

In eigenen Versuchen mit Cholesten-dion bei weissen Mäusen des Inzuchtstammes «Riems», einem Unterstamm des «Agnes-Bluhm»-Stammes, sowie bei schwarzen Mäusen des C57-black-Stammes ist nicht allein die lokale Wirkung nach subkutaner Injektion der Substanz in Sesamöl, sondern die allgemeine Reaktion der Versuchstiere durch die histologische Untersuchung vieler Organe geprüft worden. Da auf Grund der Erfahrungen von HIEGER nur mit einer schwachen cancerogenen Wirkung zu rechnen war, ist 2 Gruppen von Mäusen zusätzlich Cortisonazetat in Anlehnung an Versuche von SCHNITZER<sup>9</sup> verabreicht worden. Pro Versuchsgruppe sind 30 Mäuse verwendet worden,

<sup>1</sup> K. SCHUBERT, Arch. Geschwulstforsch. 15, 142 (1959).

<sup>2</sup> J. HIEGER, Acta Un. internat. Cancr. 15, 603 (1959).

<sup>3</sup> J. HIEGER, Brit. Emp. Cancer Campaign 37th Ann. Report, Part II, p. 90 (1959).

<sup>4</sup> L. F. FIESER, TH. W. GREEN, F. BISCHOFF, G. LOPEZ und J. J. RUPP, J. Amer. chem. Soc. 77, 3928 (1955).

<sup>5</sup> F. BISCHOFF, J. LOPEZ und J. J. RUPP, Abstr. Amer. chem. Soc., March 3-C (1954).

<sup>6</sup> F. BISCHOFF, J. LOPEZ, J. J. RUPP und C. L. GRAY, Fed. Proc. 14, 183 (1955).

<sup>7</sup> K. SCHUBERT und G. BACIGALUPO, Arch. Geschwulstforsch. 16, 237 (1960).

<sup>8</sup> J. HIEGER, Brit. med. Bull. 14, 159 (1958).

<sup>9</sup> A. SCHNITZER, Oncologia 10, 130 (1957).

ausserdem sind Kontrollversuche mit Sesamöl, dem Lösungsmittel des Cholesten-dions durchgeführt worden. Bei den Kontrolltieren sind keine Tumoren aufgetreten. Sowohl in der Versuchsreihe mit weissen als auch mit schwarzen Mäusen sind Geschwülste entstanden, die hinsichtlich ihrer histologischen Beschaffenheit, ihres Malignitätsgrades und in der Neigung zur Metastasierung ein ungewöhnliches Verhalten gezeigt haben<sup>10</sup>. Die beobachteten Geschwülste weisen abweichend von sogenannten Spontantumoren der verwendeten Mäusestämme Besonderheiten auf. Am Injektionsort selbst hat sich nur bei einer Maus des Stammes C57-black ein polymorphzelliges Sarkom entwickelt. Die Ergebnisse von FIESER, BISCHOFF *et al.* sind bei den in eigenen Versuchen verwendeten Mäusestämmen also nicht bestätigt worden. Bei 60 weissen Mäusen sind in etwa 18% metastasierende Brustdrüsenkrebs entstanden. Die Frequenz ist im Vergleich mit Brustdrüsenkarzinomen, die spontan bei Weibchen dieses Stammes in der gleichen Altersgruppe in etwa 2% und im Vergleich mit Brustdrüsenadenomen, die in etwa 10% auftreten, wesentlich erhöht. Als ungewöhnliche, bisher bei Mäusen dieses Inzuchtstammes niemals beobachtete Tumoren sind folgende aufgetreten: 1 metastasierendes Milzsarkom, 1 metastasierendes Melanosarkom und 1 metastasierender, undifferenzierter, vorwiegend in der Bauchhöhle ausgebreiteter Tumor, dessen Ausgangsort nicht mit Sicherheit festgestellt werden konnte. Es handelt sich wahrscheinlich um ein hypernephroides Carcinom. Bei insgesamt 60 schwarzen Mäusen, bei denen bisher in unserer Zucht weder Magen- noch Lungencarcinome beobachtet worden sind, haben sich folgende Tumoren entwickelt: 1 metastasierendes Magencarcinom, 2 metastasierende Lungencarcinome allein nach Verabreichung von Cholesten-dion, 10 weitere Lungencarcinome nach kombinierter Verabreichung von Cholesten-dion und Cortisonazetat, 3 metastasierende Retikulosarkome, 2 Leukämien und 1 Osteoidsarkom. Die Lungencarcinome weichen in ihrer histologischen Beschaffenheit vom Typ der Adenocarcinome der Lunge ab, wie sie bei Mäusen gelegentlich vorkommen. Einzelne Geschwülste sind frühestens nach 10 Monaten, die Mehrzahl im Durchschnitt nach 20 Monaten diagnostiziert worden.

Diese Beobachtungen führen zur Forderung, in Zukunft bei der Prüfung suspekter schwacher Cancerogene bei den Versuchstieren nicht allein die lokale Reaktion zu untersuchen, sondern eine allgemeine pathologisch-anatomische und histologische Untersuchung hinsichtlich tumoröser Veränderungen verschiedener Organe durchzuführen. Bei der Untersuchung schwacher Cancerogene wird es nur mit grossem Aufwand an Versuchstieren möglich sein, statistisch gesicherte Ergebnisse zu erlangen, da offenbar, wie auch HIEGER vermutet hat, individuelle Besonderheiten der Versuchstiere eine Rolle spielen. Der Grad der Cancerogenität einer schwachen cancerogenen Verbindung kann nicht allein nach der Häufigkeit am Injektionsort entstehender Geschwülste beurteilt werden. Es erscheint vielmehr wesentlich, die Qualität der Tumoren zu beachten und die Eigenart dieser Tumoren bezüglich der feingeweblichen Beschaffenheit, des Malignitätsgrades und der Neigung zur Metastasierung mit Befunden bei Kontrolltieren und mit sogenannten Spontantumoren bei unbehandelten, unter den gleichen äusseren Bedingungen lebenden Tieren derselben Stämme zu vergleichen.

Für die Zukunft dürfte gerade die Untersuchung jener schwach cancerogener Faktoren an Bedeutung gewinnen, die mit Produkten des oxydativen Stoffwechsels der Steroide in Beziehung stehen und beim Menschen für die Auslösung von Tumoren mit langer Latenzzeit und geringer Frequenz in Betracht zu ziehen sind.

ILSE KÜHL und K. SCHUBERT

*Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie  
Jena, Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin,  
17. August 1960.*

### Résumé

Au cours d'expériences faites avec des substances dérivées du cholestérol, les auteurs ont étudié l'effet du  $\Delta^4$ -cholestène-3,6-dione sur des souris blanches et noires. Dans divers organes, des tumeurs apparurent qui ne se montrèrent pas chez les animaux de contrôle. Au point de vue de leur structure histologique, de leur degré de malignité et de leur tendance métastatique, les tumeurs observées étaient extraordinaires.

<sup>10</sup> I. KÜHL, Verh. dtsch. Ges. Path. 1960, im Druck.

### Presynaptic Effect of D-Tubocurarine

In addition to the well-known postsynaptic effect of D-tubocurarine on the receptor substance, a presynaptic one is supposed to be demonstrated by comparison of end-plate potentials (e. p. p.) produced by single stimulation and tetanic stimulation at different stages of curarization. Rat phrenic nerve-diaphragm preparations were used, and the potentials were recorded by two extracellular electrodes, one in the central part of the end-plate zone and the other a few mm away on the same fibres. The results are presented in two Figures.

Figure 1 demonstrates that the e. p. p. is maintained on an approximately steady level even during long tetanic stimulation at an early stage of curarization. With a higher concentration, or after a longer period of action of tubocurarine, the potentials under tetanic stimulation are reduced more or less during the tetanic stimulation and represent transitory stages to the other typical effect illustrated in Figure 2.

The effect demonstrated in this Figure is the strong Wedensky inhibition. This inhibition is developed to its strongest extent during the recovery after a protracted curarization. The Figure demonstrates the very rapid decline of a rather big e. p. p. to about zero in less than 1/3 sec.

The two Figures demonstrate together the marked change of effect which takes place during the development of curarization.

The Wedensky inhibition of tetanic contractions, which reduces the usual approximately rectangular tetanic contraction to twitch-contractions of very short duration, has always been considered a typical effect of tubocurarine and similar substances.

Some years ago HUTTER<sup>1</sup> very clearly demonstrated that the process behind the Wedensky inhibition was of presynaptic origin. His work demonstrated beyond doubt that the acetylcholine sensitivity examined during complete inhibition of transmission of tetanic impulses (during a Wedensky inhibition) was exactly the same as the sensitivity before the start of tetanization.

One of us (N.) has previously demonstrated that Wedensky inhibition is not an essential feature of the tubocurarine effect<sup>2,3</sup>. The first tetanic contractions (in

<sup>1</sup> O. F. HUTTER, J. Physiol. 118, 216 (1952).

<sup>2</sup> NAESS, Acta pharmacol. toxicol. 8, 400 (1952).

<sup>3</sup> K. NAESS, Acta pharmacol. toxicol. 9, 196 (1953).