

Potentiation of the Cancerostatic Effect of 6-Azauridine and 6-Azacytidine with 5-Bis-(2-chloroethyl)aminomethyluracil

Recent clinical tests with 6-azauridine, carried out in this country, indicate that this drug may in some cases bring about remission of leukaemia as well as some degree of regression of certain solid tumours. The dose required to achieve these effects is, however, rather large (100 to 300 mg/kg weight). For this reason we have attempted to potentiate the effect of 6-azauridine by cancerostatics of other types. We have now found that the effect of 6-azauridine, as well as of 6-azacytidine¹, is markedly potentiated by 5-bis-(2-chloroethyl)aminomethyluracil (bis-chloroethylaminothymine, BCEAT), a cytostatic agent recently synthesised in these Laboratories².

Results of our experiments on Ehrlich ascitic tumours are summarised in the Tables I and II. The tumours employed are practically insensitive to 6-azauridine. However, when applied in combination with BCEAT the survival time of the experimental animals is increased to as much as twice that of the untreated controls. The superior properties of BCEAT as compared with the widely employed trichloroethylamine hydrochloride (TS-160 Spofa) are clearly evident from Table II. In the case of solid Ehrlich tumours (Table III) potentiation by means of BCEAT appears to be statistically significant in the case of 6-azacytidine but not in the case of 6-azauridine.

Zusammenfassung. Es wird gezeigt, dass die cancerostatische Wirkung von 6-Azauracil und 6-Azacytidin bei Mäusen durch 5-Bis-(2-chloroethyl)aminomethyluracil signifikant potenziert wird.

Tab. I. Ehrlich tumour (ascitic form). 20×10^6 cells were given i.p., therapy initiated on the day following inoculation, the drugs administered daily i.p. in physiological solution.

	Daily dose mg/kg	Total number of doses	Average survival time	Number of mice
Controls	—	—	12.5	12
Azauridine	250	8	13.3	12
BCEAT ^a	0.25	13	18.3	12
BCEAT and ^a	0.25	14	26.0	11
Azauridine	250	14		

^a $P < 0.001$

Tab. II. Ehrlich tumour (ascitic form). 15×10^6 cells i.p., therapy initiated on the day following inoculation, the drugs given daily i.p. in physiological solution.

	Daily dose mg/kg	Total number of doses	Average survival time	Number of mice
Controls	—	—	12.9	13
BCEAT ^a	0.25	14	17.8	10
Trichloroethylamine hydrochloride	0.20 ^c	11 ^d	13.6	10
Trichloroethylamine ^b hydrochloride and azauridine	0.20 500	11 ^d	16.8	10
BCEAT and ^a azauridine	0.25 500	14	23.2	9

^a $P < 0.001$. ^b $P < 0.02$. ^c Equimolar with BCEAT. ^d The number of doses could not be increased; the animals began to die on the 11th day.

Tab. III. Ehrlich tumour (solid form). 20×10^6 cells were transplanted s.c., therapy initiated on the fourth day following inoculation, the drugs administered daily i.p. in physiological solution. The mice were killed on the 15th day following transplantation, weighed and the average weight of the tumours for each group determined.

	Daily dose mg/kg	Total number of doses	Average weight of tumour	Average weight of mice on the 15th day after trans- plantation	Number of mice
Controls	—	—	379	29.4	11
Azacytidine	250	9	345	27.1	10
Azacytidine ^a	250	9	261	24.4	10
and BCEAT	0.25	9			

^a $P < 0.05$

F. ŠORM and J. VESELY

Czechoslovak Academy of Science, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Prague (Czechoslovakia), February 23, 1961.

¹ F. ŠORM, J. SMRT, and V. ČERNECKIJ, Exper. 17, 64 (1961).

² J. FARKAŠ and F. ŠORM, Coll. Czech. Chem. Commun. 26, 893 (1961).

Gonadotrope Wirkung von Spermaextrakten

NUKARYIA¹ zeigte, dass durch Spermainjektionen Kastrationsfolgen bei ♂ Ratten teilweise aufgehoben werden können. FULCONIS und CHIAPPONI² sowie VARGAS³ zeigten, dass Spermainjektionen die Reifung der Follikel herbeiführen und dass die Veränderungen am Ovar jenen nach Gonadotropinverabreichung gleichen. In einer früheren Arbeit (CHURÝ⁴) konnten wir die oben erwähnten Befunde bestätigen und ferner zeigen, dass auch resorbierter Sperma ähnlich wirkt. Alle diese Befunde führten uns zur Annahme, dass bestimmte Sperma-Stoffe für die erwähnten Veränderungen verantwortlich sind. Die folgenden Versuche dienten deren Ermittlung.

Als Versuchsmaterial benutzten wir infantile Ratten und Mäuseweibchen, die in 9 Gruppen geteilt wurden (siehe Tabelle).

Gruppe	Zahl der Tiere	Versuchsdaten und Bemerkungen
I	11	Ratten, Spermaextrakt, ges. Menge 2,4 ml
II	8	Ratten, Spermaextrakt, ges. Menge 3,6 ml
III	7	Ratten, Spermaextrakt, inaktiviert, 2,4 ml
IV	15	Ratten, Azetonpräzipitatlösung 2,0 ml
V	17	Mäuse, Spermaextrakt, ges. Menge 1,2 ml
VI	13	Mäuse, Azetonpräzipitatlösung 0,8 ml
VII	9	Ratten, Kontrolltiere, Physiol. Lösung
VIII	10	Mäuse, Kontrolltiere, Physiol. Lösung
IX	10	Ratten, FSH, Kontrolltiere, ges. Menge 0,5–1,0 R.E.

¹ S. NUKARYIA, Arch. ges. Physiol. 214, 697 (1926).

² H. FULCONIS und L. CHIAPPONI, Rév. franc. gynécol. 25, 441 (1934).

³ L. VARGAS, Ann. Inst. Biol. 5, 83 (1934).

⁴ J. CHURÝ, Sborník VSZ, B 7, 131 (1959); im Druck (1960).

Die Spermaextrakte wurden aus dem Azeton-Sperma-niederschlag durch 24 h dauernde Extraktion mit physiologischer Lösung hergestellt. Die Extraktion wurde im Eisschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Das Azetonpräzipitat des Spermaextraktes wurde durch Zugabe des 2,5fachen Volumens Azeton zum Spermaextrakt gewonnen. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert und nach Auflösen in physiologischer Lösung benutzt. Die Spermaextrakte sowie die Lösung des Azeton-Präzipitats wurden den Ratten 2-3mal täglich während drei Tagen verabreicht. Am 4. Tag wurden die Tiere getötet. Bei Mäuseversuchen wurden die Injektionen nur während zwei Tagen verabreicht; am dritten Tage wurden die Mäuse getötet. Die biologische Wirkung der Spermaextrakte und des Azetonpräzipitats wurde an Ovarien und Mäuseuteri bestimmt. Das Uterusgewicht wurde mit der Torsionswaage gemessen, die Veränderungen an Ovarien histologisch bestimmt. Um den Stoff, welcher im Sperma biologisch wirksam ist, näher zu bestimmen, wurden Papierelektrophorese, Papier-

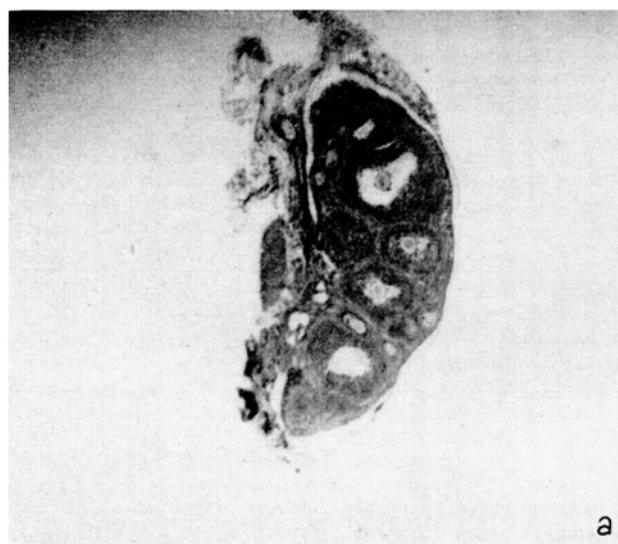
chromatographie sowie die Biuret- und Molisch-Reaktion benutzt.

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass bei Mäusen die Applikation von Spermaextrakten und Azetonpräzipitat-lösung starke Uterusgrößenveränderungen hervorruft. Bei den Kontrollmäusen betrug das durchschnittliche Uterusgewicht $3,8 \pm 0,7$ mg; nach Spermaextraktinjektionen stieg es auf $7,2 \pm 0,9$ mg und nach Azetonpräzipitat-lösung auf $12,3 \pm 1,2$ mg. Diese Uterusgrößenveränderungen können durch die früheren Befunde und Angaben DELFS⁵, FEVOLD⁶, sowie CLARINGBOLD und LAMOND⁷ erklärt werden. Beiden Ratten rufen die Spermaextraktinjektionen sowie die Applikation von Azetonpräzipitat-Lösung das Wachstum des Ovars hervor. Die Ovarienvergrößerung war nach den Injektionen von

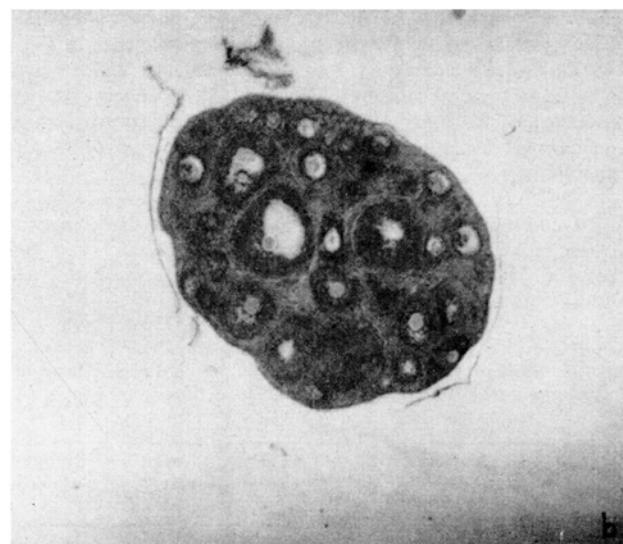
⁵ E. DELFS, Endocrinology 28, 196 (1941).

⁶ H. L. FEVOLD, Endocrinology 28, 33 (1941).

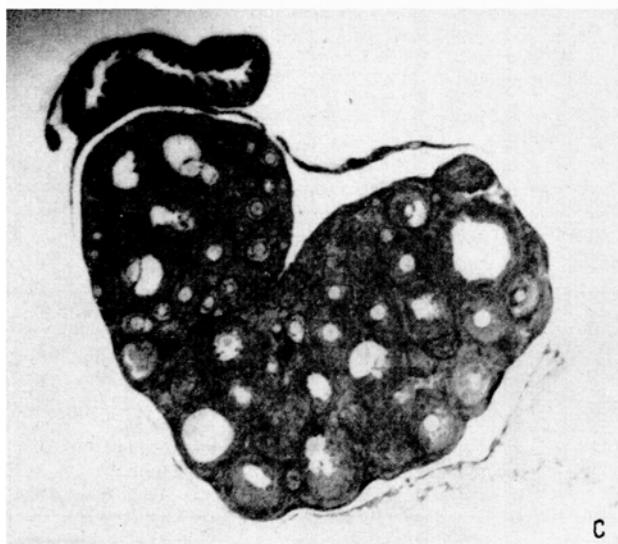
⁷ P. J. CLARINGBOLD und D. R. LAMOND, J. Endocrin. 16, 86 (1957).



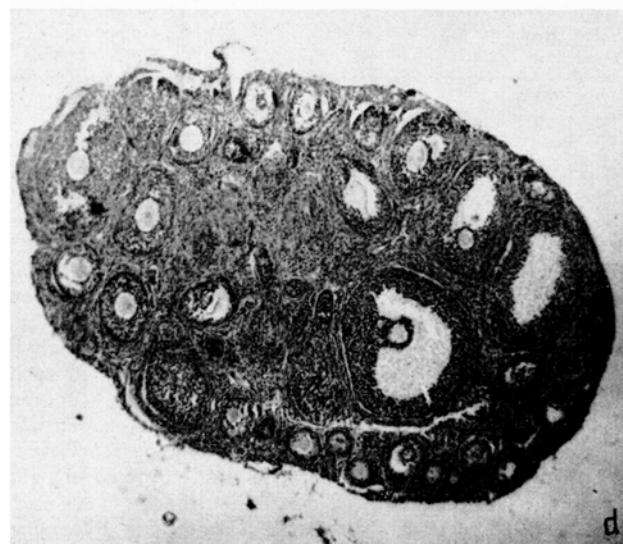
a



b



c



d

Fig. 1. (a) Ovarium von infantilen Ratten; (b) Ovarium von infantilen Ratten nach Injektionen von inaktiviertem Spermaextrakt; (c) Ovarium nach Injektion von 2,4 ml aktiven Spermaextraktes; (d) Ovarium nach Injektion von 3,6 ml Spermaextrakt. Die mikroskopischen Aufnahmen sind alle 120fach vergrößert. Färbung Hämatoxylin-Eosin.

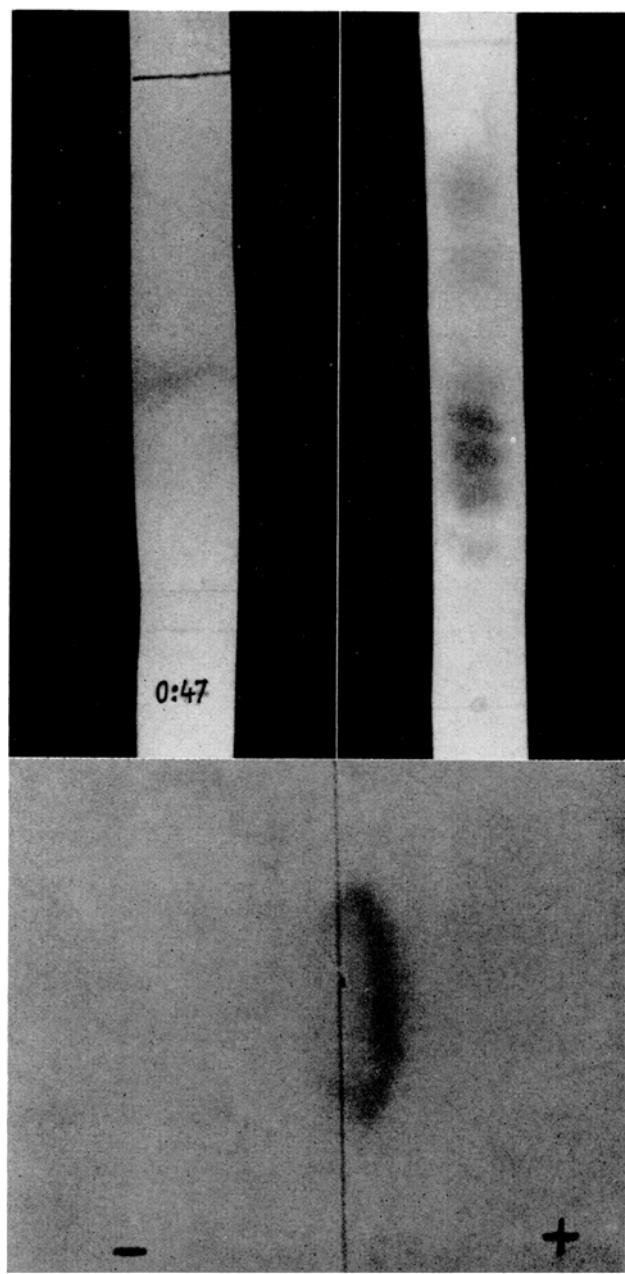


Fig. 2. Links oben: Papierchromatogramm von 0,01 ml Peptid-Lösung. Entwicklungssystem: Butanol-Essigsäure-Wasser. Rechts oben: Papierchromatogramm des partiellen Hydrolysats des Peptids; Entwicklungssystem dasselbe. Unten: Elektropherogramm der Peptid-Lösung; 0,02 ml, 300 V, Essigsäurepuffer von pH 1,7.

Bemerkung: Alle Photos prom. Biologe Crha.

Nitrosamines and Other Carcinogens as Agents of Protein Denaturation^{1,2}

The hypothesis that a relationship exists between carcinogenesis and protein denaturation was set forth as early as 1938 by RONDINI (reviewed in ³). During denaturation a protein molecule passes from a specific configuration to a less orderly structure, while similarly in carcinogenesis there is an increasing anaplasia in the tissue. AMBROSE⁴ has pointed out a more direct connection between dedifferentiation of tissue morphology at the

Azetonpräzipitatlösung ausgeprägter als nach der Verabreichung von Spermaextraktinjektionen. Übersichtlich sind die makroskopischen und mikroskopischen Veränderungen der Ovarien in der Figur 1 dargestellt. Inaktivierung des Spermaextraktes während 1 h durch 90–95°C beeinflusst die biologische Wirksamkeit nur geringfügig.

Obwohl zwischen der Gruppe, die mit FSH behandelt wurde, und der Gruppe, welche mit Spermaextrakt oder Azetonpräzipitatlösung behandelt wurde, histologisch einige Differenzen bemerkbar sind, finden wir in beiden Reihen Stimulation des Follikelwachstums, Beschleunigung des Ovarienwachstums und der Vermehrung der Granulosazellen, also jene Erscheinungen, die für die Wirkung von FSH typisch sind. Ausser diesen biologischen Wirkungen konnten wir auch eine ziemlich starke Nebennierenhypertrophie beobachten und in einigen Fällen eine Verkleinerung der Hypophyse. Ob diese Veränderungen spezifisch sind, müssen jetzt weitere Versuche abklären.

Obwohl der in Spermaextrakten anwesende Stoff biologisch dem FSH nahe steht, ist er mit diesem Hormon nicht identisch. Die papierelektrophoretischen und papierchromatographischen Studien zeigten, dass es sich um ein Peptid handelt. Das Peptid hat ungefähr 13 Aminosäurereste, enthält einen Zucker (positive Molisch-Reaktion); seine biologische Aktivität beträgt ungefähr 35 Einheiten/g. Chromatographisch und elektrophoretisch verhält sich der Stoff einheitlich (Figur 2). Unseren Schätzungen nach enthalten 100 ml Ebersperma ungefähr 0,04–0,05% dieses Stoffes.

In den Vordergrund treten nun einige Fragen: (1) ob die beschriebene Wirkung direkt oder indirekt ist, (2) welchen Ursprungs dieser Stoff im Sperma ist. Eine Beantwortung dieser Fragen können nur weitere Versuche ergeben. Wir hoffen aber, dass der Befund eines biologisch wirksamen Peptids im Sperma einige Befunde anderer Forscher näher klären kann; in erster Linie die Angaben von STRATMAN und SELF⁸, DOKUNIN⁹ und PITKJANEN¹⁰, sowie auch die Angaben von LAMOND und CLARINGBOLD¹¹.

Summary. The action of sperm extracts and acetone precipitate of these extracts upon the growth of ovary and uterus was investigated on infantile mice and rats. It was found that injections of the above-mentioned agents increased the uterine and ovarian weights and caused microscopic changes similar to those caused by FSH. The active principle present in the sperm must be a peptid.

J. CHURÝ

Biologisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät Brno (ČSSR), 23. Februar 1961.

¹ F. W. STRATMAN und H. L. SELF, J. Animal Sci. 19, 1081 (1960).

² A. V. DOKUNIN, Bjull. exp. Med. Biol. 8, 106 (1957).

³ I. G. PITKJANEN, Zurnal obšč. biol. 21, 28 (1960).

⁴ D. R. LAMOND und P. J. CLARINGBOLD, J. Endocrin. 16, 298 (1958).

microscopic level and submicroscopic alterations at the macromolecular level. Similar concepts have been reached

¹ This work was supported by USPHS Grant CY-4939 at the University of Florida, and by USPHS Grant C-5431 and a Grant-in-aid from the Greater New Orleans Cancer Association and the Cancer Society of Greater Baton Rouge, at Tulane University.

² Presented at the Fifty-second Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Atlantic City, N. J., April, 1961 (Abstr., Proc. Amer. Assoc. Cancer Research 3, 206 (1961)).

³ P. RONDINI, Adv. Cancer Res. 3, 171 (1955).

⁴ E. J. AMBROSE, Brit. J. Cancer 8, 259 (1954).