

Über die Reaktion von $\Delta^{9,12}$ -Linolsäuremethylester in Wasser, 9. Mitt.:

Hydroperoxycaprylsäure-methylester und Hydroperoxy-nonenal, zwei neue Lipidhydroperoxide aus Präparat *LHPO* mit tumorhemmender Wirkung

Von

E. Schauenstein, H. G. Klöpffer-Jaag und M. Taufer

Aus der Lehrkanzel für Biochemie der Universität Graz

Mit 5 Abbildungen

(Eingegangen am 30. Juni 1965)

Aus dem Mischpräparat *LHPO* wurden zwei neue Lipidhydroperoxide, Substanz 64 und 65, isoliert und als Hydroperoxycaprylsäuremethylester und Hydroperoxy-*trans*-nonen-(2,3)-al-(1) identifiziert. Beide Substanzen zeigen deutliche Hemmwirkungen auf Gärung und Atmung von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen in vitro, insbesondere Subst. 65, offenbar infolge der im selben Molekül gleichzeitig anwesenden Hydroperoxy- und α,β -Enalgruppe. Der Reaktionsmechanismus von Substanz 64 in bezug auf die Gärungshemmung besteht im wesentlichen in einer Selektiv-Hemmung von *GAPDH* und *LDH*, während das *NAD*-System nicht essentiell betroffen wird.

In bezug auf die Hemmwirkungen des Mischpräparates *LHPO* ergibt sich, daß dessen gärungshemmende Wirkung im wesentlichen der Subst. 64 zugeschrieben werden kann, während die Atmungshemmung nicht als reiner Persauerstoffeffekt zu erklären ist. Hier wird vielmehr eine synergistische Wirkung gewisser im Präparat *LHPO* anwesender Carbonylverbindungen anzunehmen sein.

Two more lipid hydroperoxides, the substances 64 and 65, were isolated from the crude preparation *LHPO* and were identified as methyl hydroperoxycaprylate and hydroperoxy-*trans*-nonen(2,3)-al-(1). Either compound is markedly active in Vitro in inhibiting both fermentation and respiration of Ehrlich ascites tumour cells, particularly substance 65 which is characterized by the simultaneous presence within the same molecule of an hydroperoxy and an α,β -enal group. The interference of

substance 64 with fermentation is due essentially to a selective inhibition of glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and lactic dehydrogenase, whereas the NAD system does not appear to be fundamentally involved.

The inhibition of fermentation by the crude preparation *LHPO* may be largely ascribed to substance 64, whereas the respiratory inhibition can not be accounted for by peroxy compounds exclusively, but rather by a synergistic action of several carbonyl compounds present in *LHPO*.

In der 6. und 7. Mitt.^{1, 2} dieser Reihe wurde über die chromatographische Auftrennung des Mischpräparates *LHPO* ausführlich berichtet.

Im Anschluß daran konnten die ersten isolierten Reinsubstanzen beschrieben werden. Es waren dies Substanz 1 (*trans*-Octenal), Subst. 23 (n-Amylhydroperoxid)³ aus Hauptfraktion A, sowie Subst. 81 (4-Hydroxyoctenal)⁴ aus Hauptfraktion C.

Über die tumorhemmenden Wirkungen der Substanzen 23⁵ und 81⁴ wurde gleichfalls bereits publiziert.

Im Zuge der weiteren Auftrennung des Mischpräparates wurden aus Hauptfraktion B zwei neue Hydroperoxide isoliert, und zwar aus Komponente 6 die Substanzen 64 und 65⁶.

Subst. 64 konnte als Hydroperoxycaprylsäure-methylester identifiziert werden⁷. Hierzu wurde an der nativen Substanz der aktive Sauerstoff, das Absorptionsspektrum im nahen und mittleren UR, sowie das Polarogramm ermittelt. Die analytischen Daten wurden am 4,4'-Nitrozobenzolcarbonsäure-ester der durch Reduktion mit SnCl₂ aus dem Hydroperoxid gewonnenen Hydroxyverbindung erhoben. Über die Stellung der Hydroperoxidgruppe sind keine gesicherten Aussagen möglich, doch ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß sie endständig, d. h. am C-8, steht.

Subst. 65 erwies sich als Hydroperoxy-*trans*-nonen-(2,3)-al-(1)⁷. Abgesehen davon, daß Subst. 65 — ebenso wie Subst. 64 — als Autoxydationsprodukt des Linolsäureesters bisher unbekannt war, erscheint Subst. 65 durch die gleichzeitige Anwesenheit von Persauerstoff und Aldehydgruppe als eine auch in chemischer Hinsicht bemerkenswerte neue Verbindung.

¹ E. Schauenstein und H. Esterbauer, Mh. Chem. **94**, 164 (1962).

² H. Esterbauer und E. Schauenstein, Mh. Chem. **94**, 998 (1963).

³ W. Klöpffer, H. Esterbauer und E. Schauenstein, Fette, Seifen, Anstrichm. **67**, 198 (1965).

⁴ E. Schauenstein, H. Esterbauer, G. Jaag und M. Taufer, Mh. Chem. **95**, 180 (1964).

⁵ H. G. Jaag, M. Taufer und E. Schauenstein, Mh. Chem. **95**, 1671 (1964).

⁶ H. Esterbauer, Dissertat. Univ. Graz 1963.

⁷ H. Esterbauer und E. Schauenstein, Fette, Seifen, Anstrichm., im Druck.

Besonderes Gewicht bei der Identifizierung der Substanz mußte auf den Nachweis der beiden genannten Gruppen im Molekül der nativen Substanz gelegt werden. Zum Nachweis der Hydroperoxygruppe wurde zunächst der aktive Sauerstoff jodometrisch nach *Sully* und mit FeSO_4 und Dichlorphenol-indophenol nach *Hartman* ermittelt, wobei sich Werte von 81 γ aktivem Sauerstoff pro mg (Mittel aus 3 Bestimmungen) ergaben. Das Polarogramm — aufgenommen in Benzol—Methanol (1:1) mit 0,3*m*-LiCl als Leitelektrolyt — ergab die typische Hydroperoxystufe bei — 1,1 V. Außerdem enthält das Polarogramm eine zweite Reduktionsstufe bei — 1,6 V, die für α,β -ungesättigte Aldehyde kennzeichnend ist. Schließlich zeigt das Absorptionsspektrum im mittleren UR das für Aldehyde charakteristische Maximum bei 3,67 μ (C—H-Valenzschwingung der Aldehydgruppe) sowie bei 5,90 μ (C=O-Valenzschwingung einer mit einer Äthylengruppe konjugierten Carbonylgruppe), wobei die *trans*-CH=CH bei 6,12 und vor allem bei 10,30 μ nachweisbar ist. Außerdem führt die Konjugation von Aldehyd- und CH=CH-Gruppe zu einem ebenfalls charakteristischen Absorptionsmaximum im mittleren UV mit einem spez. dekadischen Extinktionskoeffizienten ϵ' von 70 bei 46 000 cm^{-1} .

Die elementaranalytischen Daten wurden am 2,4-Dinitrophenylhydrazon der durch Reduktion mit SnCl_2 aus dem nativen Hydroperoxyaldehyd gewonnenen Hydroxyverbindung ermittelt. Die Hydroperoxygruppe steht aller Wahrscheinlichkeit nach am C-4-Atom.

Stoffwechselfmessungen mit Substanz 64 und 65 an Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellsuspensionen

Auf Grund der bereits mitgeteilten Hemmwirkungen des Mischpräparates *LHPO* gegenüber Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (*EATZ*), die den darin enthaltenen Persauerstoff-Verbindungen zugeordnet worden waren, erschien es von Interesse, die beiden nunmehr isolierten neuen Hydroperoxide — ebenso wie seinerzeit das *n*-Amylhydroperoxid — auf ihre Hemmwirkungen zu untersuchen.

Über die Präparation der *EATZ* und über die Ansätze für die Stoffwechselfmessungen darf auf frühere, ausführliche Beschreibungen verwiesen werden⁸. In allen Stoffwechselfversuchen wurde die Hemmstofflösung stets 30 Min. bei 37° C auf die Zellen einwirken gelassen, ehe mit der eigentlichen Messung begonnen wurde („Vorinkubation“). Dabei wurde die Zellsuspension mit dem Hemmstoff im Hauptraum vorinkubiert und die Glucose erst bei Meßbeginn zugekippt (Vermeidung des „Glucose-Schutzeffektes“).

Substanz 64

Abb. 1 gibt die Dosis—Effektkurven für die Hemmung der anaeroben und aeroben Glykolyse, der Atmung und die Inaktivierung von *GAPDH*

⁸ E. Schauenstein, G. Schatz und M. Taufer, Z. Krebsforsch. 64, 465 (1962).

und *LDH* wieder. Bei einer Endkonzentration* von $3,15 \times 10^{-4}$ m/l wird die anaerobe Gärung der Zellen nach aerober Vorinkubation praktisch vollständig gehemmt. Bei anaerober Vorinkubation wird bei Vorinkubation von Zellen + Hemmstoff ohne Glucose die gleiche Dosis—Wirkungskurve (Abb. 1, Kurve 1) erhalten. Daraus ergibt sich, daß — bei Vermeidung des Glucose-Schutzes — die Anwesenheit von Sauerstoff auf die Gärungshemmung ohne Einfluß ist.

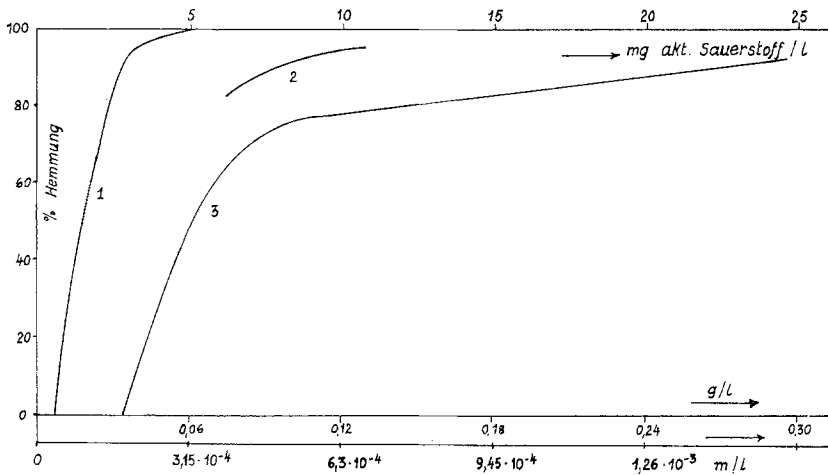


Abb. 1. Stoffwechselhemmung durch Subst. 64 bei Ehrlich-Ascites-Tumorzellen
 Kurve 1: Anaerobe Gärung nach aerober und anaerober Vorinkubation (ohne „Glucoseschutz“)
 Kurve 2: Aerobe Gärung nach aerober Vorinkubation
 Kurve 3: Atmung

Die aerobe Glykolyse wird bei einer Endkonzentration von $6,3 \times 10^{-4}$ m/l maximal, das ist bis zu 95%, gehemmt. In Anbetracht der nur geringen zur Verfügung stehenden Mengen von Subst. 64 mußte auf die Aufnahme einer vollständigen Dosis—Effektkurve verzichtet werden.

Zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus der Gärungshemmung wurden folgende Untersuchungen angestellt:

a) *SH-Glykolyse-Enzyme*

15 Mio. *EATZ* wurden in 2,5 ml Bicarbonat-Puffer mit steigenden Konzentrationen an Subst. 64 bei 37° C 30 Min. aerob oder anaerob inkubiert. Die Kontrollen wurden unter Zusatz entsprechender Mengen physiologischer Kochsalzlösung angesetzt. Anschließend wurde aus den Zellen der Enzymextrakt⁹ gewonnen und auf Aktivität der *GAPDH*

* Konzentration des Hemmstoffes im kompletten Stoffwechselansatz (2,5 ml Gesamtvolumen pro Warburg-Reaktionsgefäß).

⁹ E. Schauenstein, M. Taufer und G. Schatz, Mh. Chem. **93**, 543 (1962).

und *LDH* getestet. Es ergab sich, daß ab einer Endkonzentration an Hemmstoff von 3×10^{-4} m/l die *GAPDH* zu 91%, die *LDH* zu 100% inaktiviert wird. Zusatz von Cystein vermag die Hemmung nicht wieder aufzuheben. Die Ergebnisse zeigen, daß die Blockierung der anaeroben Glykolyse und die maximale Inaktivierung der getesteten *SH*-Enzyme der Gärung bei praktisch gleicher Endkonzentration an Hemmstoff eintreten.

b) *Beeinflussung des DPN-Niveaus*

Wie die folgende Tab. 1 ergibt, senkt Hydroperoxid 64 den intrazellulären *DPN*-Spiegel mit zunehmender Glykolysehemmung:

Tabelle 1

Glykolysehemmung	<i>DPN</i> -Abfall
57%	55%
92%	80%

Der bei 92% Glykolysehemmung noch verbleibende Restgehalt an *DPN* von rund 20% dürfte wohl dem intramitochondrialen *DPN*-Anteil entsprechen.

c) *Einfluß von Nicotinamid*

Tabelle 2

	Subst. 64	Subst. 64 +	Nicotinamid
% Gärungshemmung	0,03 g/l 91	0,03 g/l	2×10^{-2} m/l 93
% Gärungshemmung	0,045 g/l 98	0,045 g/l	2×10^{-2} m/l 96

Sämtliche Befunde sprechen dafür, daß Hydroperoxid 64 die anaerobe Gärung der Tumorzellen — in Analogie zu n-Amylhydroperoxid und dem Mischpräparat *LHPO* — in erster Linie über eine irreversible und oxydative Inaktivierung der *SH*-Enzyme *GAPDH* und *LDH* hemmt. Der intrazelluläre *DPN*-Spiegel sinkt zwar ebenso stark ab wie bei Einwirkung von essentiell über das *DPN*-System hemmwirksamen Substanzen, doch kann die Gärungshemmung durch Subst. 64 durch Zusatz von Nicotinamid *nicht* aufgehoben werden. Dies zeigt an, daß das *DPN*-System nicht essentiell mitbetroffen wird.

Die Hemmung der Sauerstoffaufnahme der Tumorzellen durch Subst. 64 wird durch Kurve 3 der Abb. 1 graphisch wiedergegeben. Ab Endkonzentrationen von ca. 8×10^{-4} m/l verläuft die Dosis—Effektkurve asymptotisch und beginnt sich dem Grenzwert einer 90 bis 95proz.

Atmungsblockade zu nähern. Der Mechanismus der Atmungshemmung ist noch ungeklärt. Mutmaßliche Angriffspunkte dürften im Cytochromsystem und Coenzym A zu suchen sein.

Substanz 65

Die Dosis—Wirkungskurven für die Stoffwechselhemmungen an *EATZ* sind in Abb. 2 wiedergegeben.

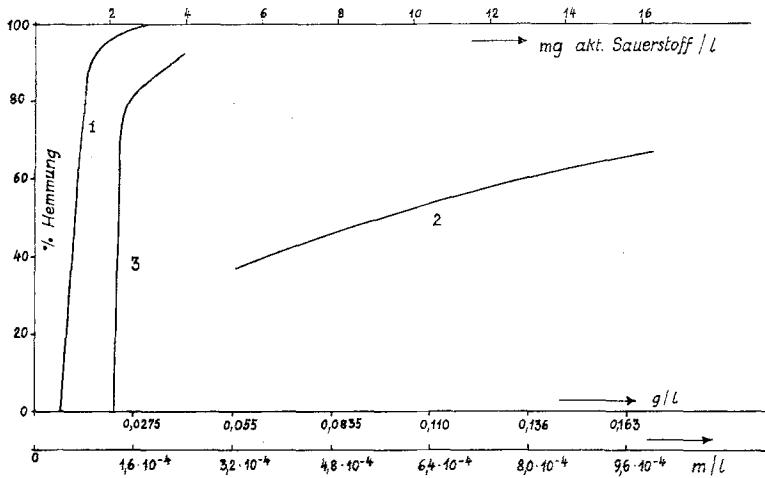


Abb. 2. Stoffwechselhemmung durch Subst. 65 bei Ehrlich-Ascites-Tumorzellen
 Kurve 1: Anaerobe Gärung nach anaerober Vorinkubation (ohne „Glucoseschutz“)
 Kurve 2: Anaerobe Gärung nach anaerober Vorinkubation (unter „Glucoseschutz“)
 Kurve 3: Atmung

Daß Persauerstoffverbindungen gewisse, von Substanz zu Substanz stark unterschiedliche Hemmwirkungen besitzen, ist bereits bekannt^{10, 11}. Andererseits weisen auch α, β -ungesättigte Aldehyde, insbesondere das erstmals von uns isolierte Hydroxyoctenal, Hemmeffekte auf⁴. Somit erscheint ein Vergleich der Hemmeffekte von Subst. 65 mit denen von Persauerstoffverbindungen und α, β -ungesättigten Aldehyden von besonderem Interesse. Die folgende Zusammenstellung ergibt, daß die Anwesenheit von Hydroperoxy- und α, β -ungesättigter Aldehydgruppe in ein und demselben Molekül eine beträchtliche Steigerung der Hemmaktivität bewirkt: Subst. 65 ist rund doppelt so wirksam wie Subst. 64, und Subst. 23 3- bis 6mal so wirksam wie verschiedene andere Persauerstoffverbindungen und etwa 20mal wirksamer als α, β -ungesättigte

¹⁰ G. Weitzel, E. Buddecke und F. Schneider, Z. physiol. Chem. **323**, 211 (1961).

¹¹ G. Weitzel, E. Buddecke, F. Schneider und H. Pfeil, Z. physiol. Chem. **323**, 65 (1961).

Aldehyde. Auch der bisher wirksamste Aldehyd, das Hydroxyoctenal, ist nur etwa halb so wirksam.

Tabelle 3

	Endkonzentration für 100% Gärungshemmung in <i>m/l</i>
Subst. 65: Hydroperoxy-nonenal	$1,6 \cdot 10^{-4}$
Subst. 64: Hydroperoxycaprylsäuremethylester	$3,15 \cdot 10^{-4}$
Subst. 23: n-Amylhydroperoxid	$3,0 \cdot 10^{-4}$
Anderer Persauerstoffverbindungen	$5 \cdot 10^{-4}$ bis $1 \cdot 10^{-3}$
2,3-Heptenal, 2,3-Octenal	$3 \cdot 10^{-3}$
Subst. 81: Hydroxyoctenal	$3 \cdot 10^{-4}$

Ähnlich verhält sich die Hemmaktivität von Subst. 65 gegenüber der Atmung der Tumorzellen. Die folgende Tab. 4 ergibt, daß Subst. 65 5- bis 7mal wirksamer ist als die Lipidhydroperoxide 64 und 23. Ein Vergleich mit den Persauerstoffverbindungen, die *Weitzel* und *Ma*¹⁰ untersucht haben, ermöglicht keine exakteren Verhältniszahlen. Von den genannten Verbindungen hemmt die wirksamste, nämlich Bis-hydroxymethylhydroperoxid, die Atmung bei 10^{-3} *m/l* Endkonzentration zu 90 % und ist demnach rund 4mal schwächer wirksam. Die anderen Verbindungen sind weitaus schwächer wirksam.

Der Unterschied zwischen Hemmaktivität von Subst. 65 und α, β -ungesättigten Aldehyden ist in bezug auf die Atmung erheblich größer als bei der Gärung: wie Tab. 4 zeigt, erreichen diese Verbindungen bei 15mal höherer Endkonzentration bereits ihr maximale Wirkung von 40% Atmungshemmung. Lediglich der wirksamste der α, β -ungesättigten Aldehyde, das vorhin bereits genannte Hydroxyoctenal, kommt Subst. 65 in seiner Hemmwirkung nahe, bleibt aber immer noch etwa 1,5mal schwächer wirksam.

Tabelle 4

	Endkonzentration für 100% Atmungshemmung in <i>m/l</i>
Subst. 65: Hydroperoxy-nonenal	$2,7 \cdot 10^{-4}$
Subst. 64: Hydroperoxycaprylsäuremethylester	$2,0 \cdot 10^{-3}$
Subst. 23: n-Amylhydroperoxid	$1,5 \cdot 10^{-3}$
2,3-Heptenal, 2,3-Octenal	ca. $4,0 \cdot 10^{-3}$
	max.: 40% Hemmung!
Subst. 81: Hydroxyoctenal	ca. $4,0 \cdot 10^{-4}$

Zusammenfassend ergibt sich somit, daß die Kombination von Hydroperoxy- und α, β -ungesättigter Aldehydgruppe die Hemmwirkung einer Substanz auf den Stoffwechsel von Tumorzellen — verglichen mit

einfachen Persauerstoffverbindungen einerseits und α,β -ungesättigten Aldehyden andererseits — beträchtlich verstärkt. Besonders erwähnt sei noch, daß auch die Einführung einer Hydroxylgruppe am C-8 eines α,β -ungesättigten Aldehyds dessen Hemmaktivität erheblich vergrößert.

Hydroperoxy-nonenal ist im Mischpräparat *LHPO* zu rund 2 Gew. % enthalten und in Anbetracht der außerordentlichen Empfindlichkeit der Substanz nur unter großen Schwierigkeiten zu isolieren. Aus diesem Grunde mußte auf weitere Versuche über den Wirkungsmechanismus und sonstige biochemische Eigenschaften dieser überaus interessanten Substanz verzichtet werden.

Versuch einer Zuordnung und quantitativen Diskussion der Hemmeffekte des Mischpräparates *LHPO*

Die Hemmaktivität des Mischpräparates *LHPO* wurde bisher vermutungsweise auf die darin enthaltenen Lipidhydroperoxide zurückgeführt. Nachdem nunmehr drei dieser Persauerstoffverbindungen in Substanz isoliert und ihre Einzelhemmwirkungen ermittelt werden konnten, erscheint der Versuch naheliegend, die Hemmwirkung des Mischpräparates quantitativ zu diskutieren.

Hiezu wurde zunächst die Hemmwirkung der vier Hauptfraktionen A, B, C und D gemessen (vgl. Abb. 3, 4 und 5). In bezug auf die Gärungshemmung ergibt sich daraus, daß Hauptfraktion B die wirksamste ist, gefolgt von A und C und in weitem Abstand von D. Die folgende Tab. 5 bringt in der ersten Spalte die Endkonzentrationen der isolierten Hauptfraktionen und des Mischpräparates für 100% Gärungshemmung. In der 2. Spalte sind die in 0,25 g Mischpräparat enthaltenen Gramm A, B, C und D angeführt und in der 3. Spalte die diesen Konzentrationen entsprechenden, an den isolierten Fraktionen gemessenen Hemmwerte. Die Zusammenstellung zeigt, daß für die Gärungshemmung des Mischpräparates nur die Hauptfraktionen A und B in Betracht zu ziehen sind, wobei Frakt. B zweifellos den Hauptanteil übernimmt.

Fraktion C, die den hochwirksamen Aldehyd 81 enthält und daher ebenfalls hohe spezifische Wirkung zeigt, kommt nicht zur Wirkung, da sie in zu geringem Anteil enthalten ist.

Andererseits vermag auch der hohe Prozentgehalt des Mischpräparates an Frakt. D die geringe spezif. Wirksamkeit der Frakt. D nicht aufzuwiegen, so daß auch diese Fraktion im Mischpräparat praktisch unwirksam bleibt.

In der hauptsächlich wirksamen Frakt. B sind nun, wie in dieser Arbeit näher ausgeführt, die hemmwirksamen Hydroperoxide 64 und 65 anwesend. Auf Grund der quantitativen Untersuchungen von *Esterbauer*

läßt sich angeben, daß 0,25 g Mischpräparat rund 0,005 g Substanz 65 und 0,023 g Substanz 64 enthalten.

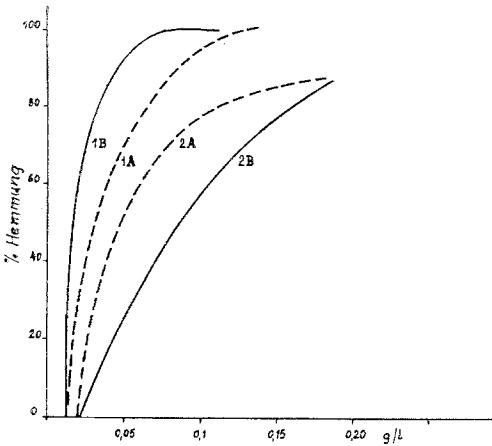


Abb. 3

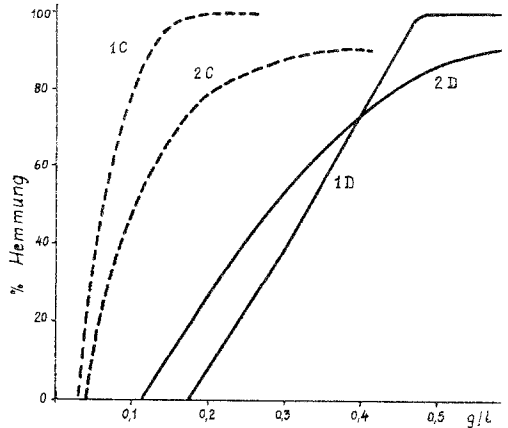


Abb. 4

Abb. 3. Stoffwechselhemmung durch Hauptfraktion A und B bei Ehrlich-Ascites-Tumorzellen
 Kurve 1 A: Anaerobe Gärung nach aerober Vorinkubation mit Hauptfraktion A
 Kurve 2 A: Atmung mit Hauptfraktion A
 Kurve 1 B: Anaerobe Gärung nach aerober Vorinkubation mit Hauptfraktion B
 Kurve 2 B: Atmung mit Hauptfraktion B

Abb. 4. Stoffwechselhemmung durch Hauptfraktion C und D bei Ehrlich-Ascites-Tumorzellen
 Kurve 1 C: Anaerobe Gärung nach aerober Vorinkubation mit Hauptfraktion C
 Kurve 2 C: Atmung mit Hauptfraktion C
 Kurve 1 D: Anaerobe Gärung nach aerober Vorinkubation mit Hauptfraktion D
 Kurve 2 D: Atmung mit Hauptfraktion D

Kurve 1 der Abb. 2 zeigt, daß Subst. 65 in einer Endkonzentration von 0,005 g/l noch kaum hemmwirksam sein dürfte, Subst. 64 hingegen bei 0,023 g/l die Gärung zu ca. 70% hemmt (Abb. 1). Daraus ergibt sich, daß die Gärungshemmung durch Mischpräparat LHPO in erster Linie durch das in Frakt. B enthaltene Hydroperoxid 64 zustande kommt, vielleicht unter Mitbeteiligung von Subst. 65.

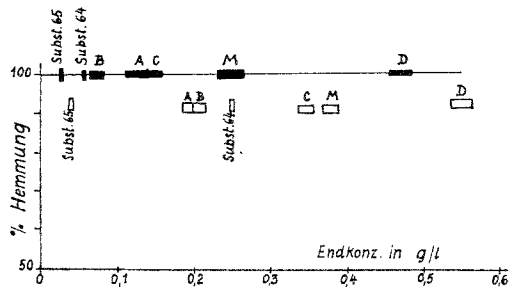


Abb. 5. Zur Erreichung der maximalen Hemmwirkungen mindestens erforderliche Endkonzentrationen von Mischpräparat LHPO, Hauptfraktionen A, B, C, D und Substanzen 64 u. 65

■ : Gärungshemmung
 □ : Atmungshemmung

In Hauptfraktion A, die auf Grund der an der Einzelfraktion ermittelten Hemmwirkung rund 10% der Hemmwirkung des Mischpräparates

übernehmen könnte, ist das Hydroperoxid 23 enthalten. Die Dosis—Effektkurve von Subst. 23 für die Gärungshemmung ergibt, daß diese Substanz bei 0,005 g/l Endkonzentration kaum eine nennenswerte, über 10% hinausgehende Hemmwirkung entfaltet.

Tabelle 5

	Endkonzentration für 100% Hemmung	in 0,25 g <i>LHPO</i>	
Frakt. B	ca. 0,075 g/l	ca. 0,038 g, entsprechen	90% Hemmung
Frakt. A	ca. 0,12 g/l	ca. 0,017 g, entsprechen	10% Hemmung
Frakt. C	ca. 0,135 g/l	ca. 0,027 g, entsprechen	0% Hemmung
Frakt. D	ca. 0,475 g/l	ca. 0,16 g, entsprechen	0% Hemmung
Mischpräp. <i>M</i>	0,25 g/l		100% Hemmung

Auch hinsichtlich der Hemmwirkung auf den Sauerstoffverbrauch der Zellen ergibt sich eine ganz ähnliche Reihung der Hauptfraktionen, wie Abb. 5 veranschaulicht (vgl. auch die folgende Tab. 6). Man erkennt, daß Frakt. D, obwohl an sich am schwächsten wirksam, infolge ihres überwiegenden Anteils für die Atmungshemmung zum größten Teil verantwortlich ist, während die den stark wirksamen Aldehyd 81 enthaltende Frakt. C — wie bei der Gärungshemmung — wegen des zu geringen Anteils im Mischpräparat praktisch wirkungslos ist.

Tabelle 6

	Endkonzentration für 90—95% Hemmung	in 0,38 g <i>LHPO</i>	
Frakt. A	0,20 g/l	0,027 g, entsprechend	18% Hemmung
Frakt. B	0,23 g/l	0,057 g, entsprechend	34% Hemmung
Frakt. C	0,30 g/l	0,042 g, entsprechend	0% Hemmung
Frakt. D	0,50 bis 0,55 g/l	0,250 g, entsprechend	45% Hemmung
Mischpräp. <i>M</i>	0,38 g/l		97% Hemmung

Frakt. B kommt ebenfalls, wenn auch zu einem geringeren Anteil als Wirkungsträger im Mischpräparat für die Atmungshemmung in Betracht und schließlich, zum geringsten Anteil, Hauptfrakt. A.

Es ergibt sich nun die Frage, ob die in Frakt. A und B anwesenden Hydroperoxide 23, 64 und 65 für eine Wirkung im Mischpräparat verantwortlich sein könnten.

In 0,38 g des Mischpräparates sind auf Grund der analytischen Untersuchungen *Esterbauers*⁷ vorhanden:

Subst. 23: 0,008 g

Subst. 64: 0,034 g

Subst. 65: 0,008 g

Die Dosis—Wirkungskurven der drei genannten Hydroperoxide (für Subst. 64 und 65 vgl. Abb. 1 und 2) ergeben, daß keine der genannten Substanzen allein für eine Wirkung in Frage kommt. Zu einer Erklärung der Teilwirkung der diese Substanzen enthaltenen Frakt. A und B könnte angenommen werden, daß die in den genannten Fraktionen außerdem enthaltenen Carbonylverbindungen mit den Peroxiden synergistisch wirken. Zur Prüfung dieser Annahme wurden Modellversuche mit H_2O_2 , 2,3-Octenal und einer Mischung beider Substanzen angesetzt.

Die folgende Tab. 7 gibt die Ergebnisse dieser Messungen wieder.

Tabelle 7

Endkonzentration an H_2O_2	Endkonzentration an Octenal	% Atmungs-Hemmung
$6 \cdot 10^{-5} m/l$	—	52,2
—	$1,4 \cdot 10^{-3} m/l$	46,5
$6 \cdot 10^{-5} m/l$	$1,4 \cdot 10^{-3} m/l$	84,5

(Mittelwerte aus 3 verschiedenen Ansätzen; Vorinkubation aerob 30 Min. bei $37^\circ C$).

Tab. 7 zeigt eindeutig, daß bei Kombination beider Hemmstoffe eine erhebliche Vergrößerung des Hemmeffektes eintritt. Wenn auch von einer Additivität der Einzelwirkungen im strengen Sinn nicht gesprochen werden kann, so deuten die Ergebnisse doch durchaus auf eine synergistische Wirkung von Peroxid und Octenal hin.

Unsere Untersuchungen wurden teilweise von einer Forschungsbeihilfe CA 06617-02 PC des Public Health Service, National Cancer Institute, unterstützt.