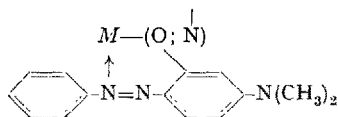


Table II

Substance injected in arachis oil	Rat No.	Serum Copper Level ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	
		24 h before injection	72 h after injection
3'-MeDMAAB	1	224	57
	2	281	30
Nil	3	174	191
	4	144	178
4'-MeDMAAB	5	154	241
	6	157	198

MeDMAAB becomes attached to proteins by linkage through its 2-position with a protein amino group. Since azoxy compounds are known to be transformed readily *in vitro* into *o*-hydroxyazo derivatives¹⁰, it was thought that similar reactions might occur *in vivo* leading to 2-hydroxy- and even 2-imino products of the metabolizing azo dyes. Molecules of this kind could then chelate with metals¹¹ (M):



a reaction which might be responsible for PPD oxidase inhibition.

As yet, no clear evidence has been obtained that such a mechanism is involved. Thus, 1-phenylazo-2-naphthol, a compound which could chelate with copper in the manner depicted, failed to inhibit rat serum PPD oxidase *in vivo*, and its solution in normal rat serum *in vitro* did not influence the oxidase activity of this serum. Crude metabolites of 3'-MeDMAAB from rat urine failed to inhibit rat serum PPD oxidase *in vitro* as did the parent azo dye, but in one experiment with 4'-EtDMAAB metabolites some inhibition was observed.

Injection of 8-hydroxyquinoline into rats stimulated strongly serum PPD oxidase activity. This compound like some *o*-aminophenolic substances, acts as a local carcinogen for the bladders of mice, and BOYLAND and WATSON¹² have suggested that a chelation mechanism may well be involved in this process. We have found that the hepatocarcinogen, 2-aminofluorene caused a feeble temporary decline in rat serum PPD oxidase activity, while its non-carcinogenic isomer, 4-aminofluorene was completely inactive. The potent liver carcinogen, 4-dimethylaminostilbene, proved to be as powerful an inhibitor of PPD oxidase *in vivo* as the azo carcinogen, 3'-MeDMAAB. Perhaps in the case of these amino carcinogens *o*-aminophenolic derivatives capable of chelation are produced in the liver.

Our results will be reported in detail elsewhere together with an account of the effects of azo carcinogens etc. on rat serum xanthine oxidase, an enzyme which requires molybdenum for its activity and which is known to be susceptible to inhibition by copper ions¹³.

¹⁰ G. M. BADGER and R. G. BUTTERY, J. chem. Soc. 1954, 2243.

¹¹ H. D. K. DREW and J. K. LANDQUIST, J. chem. Soc. 1938, 292. – M. L. ERNSBERGER and W. R. BRODE, J. org. Chem. 6, 331 (1941). – V. I. MUR, J. gen. Chem., Moscow (Consultants Bureau Translation) 26, 405 (1956).

¹² E. BOYLAND and G. WATSON, Nature 177, 837 (1956).

¹³ F. PASQUIER and J. POLONOVSKI, Bull. Soc. Chim. biol. 39, 1465 (1957).

The writer is indebted to the University of Sheffield for the James Morrison Fellowship in cancer research.

W. J. P. NEISH

Cancer Research Unit, The University, Sheffield, April 28, 1958.

Résumé

On a trouvé que les azoïques 3'-méthyl- et 4'-éthyl-4-diméthylaminoazobenzène, substances cancérigènes puissantes pour le foie du rat, empêchent fortement l'activité de la *p*-phénylènediamine oxydase du sérum sanguin. Au contraire, 4'-méthyl-4-diméthylaminoazobenzène avec pouvoir cancérigène très faible n'a aucune activité. L'azoïque 3'-méthyl-4-diméthylaminoazobenzène, mais pas son isomère 4'-méthyl, diminue fortement le cuivre sérique.

Über einen Cortison-äquivalenten Katalysator der Autoxydation der Linolsäure *in vitro*

Die nichtenzymatische Oxydationskatalyse der Linolsäure mit Cortison und anderen Corticosteroiden, als körpereigene Hormone, ist von praktischem und theoretischem Interesse¹. Das bei der Cortisonkatalyse der Linolsäure entstehende und mit der TBA-Reaktion proportional dem Sauerstoffverbrauch nachweisbare² Reaktionsprodukt ist, ebenso wie nach UV.-Bestrahlung dieser Fettsäure, ein Hydroperoxyd, dem biologische Bedeutung zukommt: Es ist bekannt, dass Linolsäurehydroperoxyd bestimmte Fermente, wie Succinoxidase, Cytochromoxydase und Cholinoydase zu hemmen vermag³, dass es die Atmung und Glykolyse von Ehrlichs Ascitestumorzellen hemmt⁴, dass es die Fähigkeit besitzt, Desoxyribonukleinsäure zu depolarisieren⁵, und dass es bestimmte Zellteilungen blockiert⁶. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass die Oxydationskatalyse der Linolsäure mit Cortison, unter Bildung von Linolsäurehydroperoxyd, durch andere Steroide, solche mit Follikelhormonwirkung, gehemmt wird⁷.

Die Linolsäureoxydationskatalyse durch bestimmte Corticosteroide ist eine für deren Hormoncharakter ungewöhnliche Wirkung, deren Bedeutung für die Hormoneffekte unklar bleibt. Sie steht in Zusammenhang mit Metall-katalytischen Phänomenen, denn für ihr Zustandekommen sind Metallionen, besonders Cu^{2+} , nötig, so dass ein Cortison-Cu-Komplex als massgeblich angenommen werden muss¹. Die Veresterung der Seitenkette der Corticosteroide hebt deren katalytische Wirkung auf. Diese ist somit für die Katalyse massgebend. Ein Beweis hierfür sind auch unsere Befunde, dass niedermolekulare, aliphatische, konstitutionell der Corticosteroidseitenkette ähnliche Verbindungen, wie Dioxyceton usw., die Linolsäureoxydation katalysieren können⁸. Allerdings besteht zwischen diesen und den Corticosteroiden ein grundsätzlicher Unterschied. Die niedermolekularen, bisher ge-

¹ W. SCHULER und R. MEIER, Hoppe-Seylers Z. 302, 236 (1955).

² W. SCHULER, unveröffentlichte Befunde.

³ F. BERNHEIM, M. K. WILBUR und C. B. KENASTON, Arch. Biochem. Biophys. 38, 177 (1952). – A. OTTOLENGHI, F. BERNHEIM und K. M. WILBUR, Arch. Biochem. Biophys. 56, 157 (1955).

⁴ C. W. SHUSTER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. N.Y. 90, 423 (1955).

⁵ W. D. FISHER and K. M. WILBUR, J. Elisha Mitchell Soc. 70, 124 (1954).

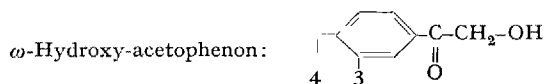
⁶ K. M. WILBUR, G. B. KENASTON, N. WOLFSON, A. OTTOLENGHI und M. E. GAULDEN, Anat. Rec. 120, 708 (1954).

⁷ W. SCHULER und R. MEIER, Arch. exp. Path. Pharmacol. 228, 474 (1956).

⁸ W. SCHULER und R. MEIER, Helv. physiol. Acta 15, 279 (1957).

prüften Substanzen sind autoxydabel, und der Verlauf ihrer Wirkung entspricht nicht völlig dem der Cortisonkatalyse.

Es schien uns von erheblichem Interesse zu versuchen, einfachste Strukturmodelle aufzufinden, welche die charakteristische katalytische Eigenschaft von Cortison aufweisen, ohne selbst autoxydabel zu sein. In dieser Absicht haben wir unter anderen verschiedene ω -Hydroxy-acetophenonderivate, welche uns von Herrn Prof. REICHSTEIN⁹ zur Verfügung gestellt worden sind, hinsichtlich ihrer katalytischen Wirkung auf die Linolsäureoxydation geprüft, und zwar:



	Substituent:	4	3	Präp. Nr.
ω ,3,4-Trihydroxy-	acetophenon-OH	-OH	-OH	18813/E
ω ,3-Dihydroxy-4-methoxy-	acetophenon-OCH ₃	-OH	-OH	17977/E
ω ,4-Dihydroxy-3-methoxy-	acetophenon-OH	-OCH ₃	-OCH ₃	14601/E
ω -Hydroxy-3,4-dimethoxy-	acetophenon-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	18815/E
ω ,4-Dihydroxy-	acetophenon-OH	-H	-H	18647/E
ω -Hydroxy-3-methoxy-4-acetoxy-	acetophenon	-OCOCH ₃	-OCH ₃	18646/E

Methode. Die Linolsäureoxydation wurde, wie beschrieben¹, an Hand der Sauerstoffaufnahme nach WARBURG bestimmt. Ges. Flk. Vol. 2 ml, O₂ als Gas, 37°C, 20 min Temperatúrausgleich, stündliche Ablesung, Versuchsdauer 4 h, Substrat 5 mg/ml Linolsäure (Hoffmann-La Roche, Basel). Katalysator: *m*/720 (analog Cortison). Puffer: 0,5 *m*. Phosphat pH 7,0 mit 1% Tween. Leerversuche: Linolsäure allein, Cortison allein, Katalysator allein und Temperaturkontrolle.

Ergebnisse. Die katalytische Wirkung der verschiedenen Acetophenonderivate auf den 4-h-Sauerstoffverbrauch der Linolsäure unter den genannten Bedingungen ist in folgender Tabelle in Prozenten des gleichzeitig bestimmten Sauerstoffverbrauchs der Linolsäure mit äquivalenter Menge Cortison in der Reihenfolge der katalytischen Wirksamkeit angegeben:

Katalytische Wirkung
verschiedener ω -Hydroxy-acetophenonderivate

Katalysator <i>m</i> /720	Substituenten		Prozentualer O ₂ -Verbrauch in 4 h (Cortison = 100%)
	in 4	in 3	
18813/E	-OH	-OH	0
14601/E	-OH	-OCH ₃	etwa 10
17977/E	-OCH ₃	-OH	etwa 20
18647/E	-OH	-H	etwa 30
18646/E	-OCOCH ₃	-OCH ₃	etwa 30
18815/E	-OCH ₃	-OCH ₃	100
—	ω -Hydroxy-acetophenon		140

Während somit die meisten der geprüften Acetophenonderivate nur sehr geringe katalytische Wirkung auf die Linolsäureautoxydation zeigen, katalysiert ω -Hydroxy-acetophenon Linolsäure stärker als Cortison und entspricht das ω -Hydroxy-3,4-dimethoxy-acetophenon in äquimolarer Konzentration quantitativ dem Cortison. Auch der zeitliche Verlauf der Katalyse mit diesem Derivat entspricht völlig dem mit Cortison. Komplexon III hemmt unter unseren Versuchsbedingungen die Oxydationskatalyse mit diesem Derivate zu 50% bei der

gleichen E. K. ($1,6 \times 10^{-7}$) wie die mit Cortison ($2,5 \times 10^{-7}$).

Diskussion. Das ω -Hydroxy-acetophenon katalysiert die Linolsäureautoxydation stärker als Cortison, während ω -Hydroxy-3,4-dimethoxy-acetophenon quantitativ und qualitativ gleich wie Cortison katalysiert. Das im Ring substituierte Derivat unterscheidet sich von den übrigen nicht oder kaum katalytisch wirksamen Acetophenonderivaten hinsichtlich Ringsubstituenten dadurch, dass es in 3,4-Stellung zwei Methoxygruppen und weder eine freie noch eine acetylveresterte Hydroxygruppe trägt. Offensichtlich vermag bereits ein derartiger Ringsubstituent die katalytische Wirkung völlig oder nahezu völlig aufzuheben, trotzdem die eigentliche katalytische Wirkgruppe, die Seitenkette, unverändert ist. Der Befund, dass komplexbildungsfähige Substituenten im Ring die katalytische Aktivität der intakten, eigentlichen Wirkgruppe derart stark zu beeinflussen vermögen, erscheint uns wichtig, denn dies könnte eine Erklärung sein, warum dem Cortison verwandte Corticosteroide, trotz gleicher Seitenkette, katalytisch verschiedenen wirksam sind⁷.

W. SCHULER und R. MEIER

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft,
Basel, Pharmazeutische Abteilung, 16. Mai 1958.

Summary

Acetophenone derivatives with a cortisone-like side chain have been investigated for their catalytic effect on the autoxydation of linolenic acid. ω -Hydroxy-acetophenone and the substituted ω -hydroxy-3,4-dimethoxy-acetophenone are the substances with the simplest structure having a catalytic effect quantitatively and qualitatively similar to that of cortisone.

The significance of substituents in the ring for the catalytic activity of the side chain is discussed.

Die Wirkung der Lipoid- und Polysaccharid-Komponente endotoxischer Lipopolysaccharide gram-negativer Bakterien auf die Leukozytenkultur

Extrakte aus gramnegativen Bakterien vornehmlich polysaccharidischer Natur wirken auf die feste Leukozytenkultur bis zu hohen Verdünnungen emigrationsfördernd¹. In vielen verschiedenen Testen an höheren Tieren und klinisch am Menschen konnte gezeigt werden, dass die im Leukozyten-Emigrationstest wirksamen Bakterienstoffe die bekannten typischen endotoxischen Manifestationen auslösen. Sie sind unter anderem die wirksamsten bislang bekannten Pyrogene². WESTPHAL *et al.* haben 1952 nachgewiesen, dass es sich dabei nicht um reine Polysaccharide, sondern um Lipopolysaccharide handelt³ und dass die Lipoid-Komponente (Lipoid A⁴) für die Pyro-

¹ R. MEIER und B. SCHÄR, Hoppe-Seyl. Z. 307, 103 (1957).

² E. EICHENBERGER, M. SCHMIDHAUSER-KOPP, H. HURNI, M. FRICISAY und O. WESTPHAL, Schweiz. med. Wschr. 85, 1190, 1213 (1955).

³ O. WESTPHAL, O. LÜDERITZ, E. EICHENBERGER und W. KEDERLING, Z. Naturf. 7 B, 536 (1952).

⁴ O. WESTPHAL und O. LÜDERITZ, Angew. Chemie 66, 407 (1954).

⁹ Herrn Professor Dr. T. REICHSTEIN danken wir auch an dieser Stelle bestens.