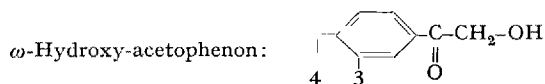


prüften Substanzen sind autoxydabel, und der Verlauf ihrer Wirkung entspricht nicht völlig dem der Cortisonkatalyse.

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 Corticosteroiden, 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-

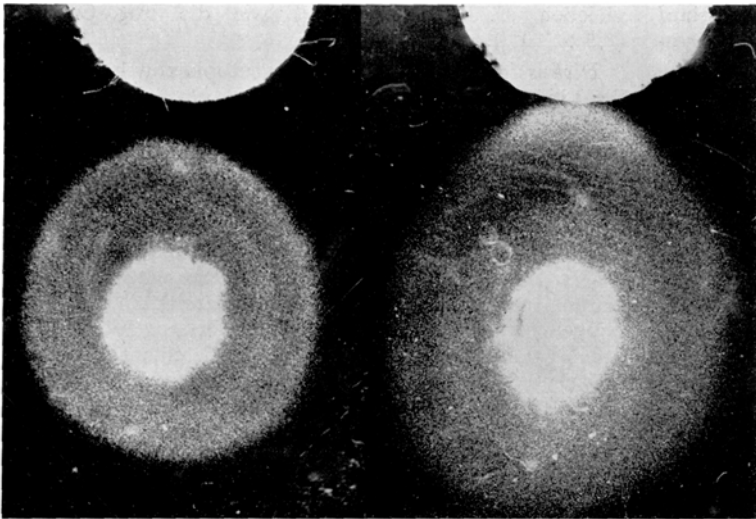
¹ R. MEIER und B. SCHÄR, Hoppe-Seyl. Z. 307, 103 (1957).

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.



Leukotaktische Wirkung von Lipoid A aus *E. coli*.
Oben rechts Filterpapier mit aufgetrocknetem Lipoid A (Lösung 10⁻⁴ in Chloroform),
links Kontrolle (Chloroform).

Nach diesen Prinzipien wurden aus *Salmonella abortus equi* und *E. coli* (Stamm Kröger, Serogruppe 08) die folgenden Substanzen in hochgereinigter Form dargestellt:

- a) Lipopolysaccharid;
- b) Bakt. Lipoprotein;
- c) Lipokasein;
- d) Lipoidfreies Polysaccharid;
- e) Lipoid A.

genität⁴ und viele weitere endotoxischen Wirkungen verantwortlich ist (siehe zum Beispiel auch ⁵). Auf Grund der nachstehend beschriebenen Versuche ergibt sich, dass die Lipoidkomponente der bakteriellen Lipopolysaccharide auch für die leukozytenemigrationsfördernde Wirkung entscheidend ist.

Material und Methodik. Die biologische Untersuchung des isolierten Lipoids A bietet insofern Schwierigkeiten, als das hochgereinigte Material in Wasser nahezu unlöslich ist. Wir haben daher die schon früher benutzte Technik⁴ (vgl. ⁶) der Umkupplung angewandt: das *Lipopolysaccharid* wurde an ein inertes Protein – im vorliegenden Fall reines, pyrogenfreies Kasein-Hammarsten – gekuppelt (vgl. ⁷) und der künstliche Komplex mit verdünnter Säure behandelt, derart, dass das Polysaccharid quantitativ abgespalten wurde, während Lipoid A am Protein gebunden blieb⁸. In dem so gewonnenen wasserlöslichen, künstlichen *Lipokasein* ist nurmehr Lipoid A bakteriellen Ursprungs; Kasein fungiert als lyophiler Träger. Mit Hilfe des Phenol/Wasser-Verfahrens⁹ können Bakterien so aufgearbeitet werden, dass die endotoxisch wirksame Lipoidkomponente am Bakterienprotein gebunden bleibt¹⁰, wobei stark pyrogene bakterielle *Lipoproteine* (conjugated protein) erhalten werden, die kein Polysaccharid enthalten. Reine *Polysaccharide* aus den Endotoxinen gramnegativer Bakterien sind nur als sogenannte «degraded polysaccharides» im Sinne von MORGAN¹¹ mit Molekulargewichten in der Größenordnung von 20000 bis 30000 darstellbar, weil bei der hydrolytischen Abspaltung des Lipoids A die hochmolekularen Lipopolysaccharide in kleinere Untereinheiten zerfallen, die im genuine Material durch lipoidale Gruppen zusammengehalten werden.

Bei der Prüfung der *Emigrationsförderung an der Hühnerleukozytenkultur* hielten wir uns an die Angaben von MEIER, DESAULLES und SCHÄR¹². Die Mutterstücke der Kultur wurden vor der Bebrütung während 30 min in mindestens 3 Standard-Verdünnungen der wasserlöslichen Präparate *a* bis *d* gebadet. Die Kulturen wurden nach 12stündiger Inkubation bei 37°C photographiert und die Wachstumszonen planimetriert. Für jeden Wert wurden 10–20 Kulturen ausgemessen.

Zur Prüfung der leukotaktischen Wirkung von Lipoid A wurden kreisrunde Filterpapierstückchen von 5 mm Durchmesser in eine Lösung von Lipoid A in reinem Chloroform eingelegt und nach sorgfältigem Trocknen in einer Entfernung von etwa 3 mm vom Mutterstück auf den Nährboden gebracht.

Emigrationswirkung verschiedener Komponenten bakterieller Endotoxine

	<i>S. abortus equi</i>			<i>E. coli</i> 08		
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁹	10 ⁻¹²	10 ⁻⁶	10 ⁻⁹	10 ⁻¹²
Lipopolysaccharid	+	+	(+)	+	+	+
Bakt. Lipoprotein	+	θ	θ	+	(+)	θ
Lipokasein	+	θ	θ	+	+	θ
Lipoidfreies Polysaccharid .	θ	θ	θ	θ	θ	θ
Lipoid A	leukotaktisch			leukotaktisch		
Kasein	θ	θ	θ			

+ = signifikant vergrößerter Auswanderungshof;
(+) = nicht signifikant vergrößerter Auswanderungshof;
θ = ohne Wirkung.

Ergebnisse und Diskussion. Die in der Tabelle zusammengestellten Resultate zeigen erhebliche quantitative Unterschiede zwischen den einzelnen Präparaten. Alle diejenigen, welche Lipoid A enthalten, wirken mehr oder weniger stark emigrationsfördernd, während das lipoidfreie Polysaccharid beider Keime ohne Einfluss auf die Leukozytenkultur ist. Reines Lipoid A wirkt deutlich leukotaktisch (siehe Abbildung). Diese Wirkung ist mit Sicherheit nicht auf etwa vorhandene Spuren begleitenden Lipopolysaccharids zurückzuführen, was durch die Art

⁵ J. G. HOWARD, D. ROWLEY und A. C. WARDLAW, *Nature* 179, 314 (1957).
⁶ Y. TAKEDA, N. KASAI, M. ARAKI und O. T. ODAKA, *Hoppe-Seyl. Z.* 307, 49 (1957).
⁷ O. LÜDERITZ, O. WESTPHAL, E. EICHENBERGER und E. NETER, *Biochem. Z.* 330, 21 (1958).
⁸ F. BINKLEY, W. F. GOEBEL und E. PERLMAN, *J. exp. Med.* 81, 331 (1945).
⁹ O. WESTPHAL, O. LÜDERITZ und F. BISTER, *Z. Naturf.* 7B, 148 (1952).
¹⁰ O. WESTPHAL, O. LÜDERITZ und W. KEIDERLING, *Zbl. Bakt. I. Orig.* 158, 152 (1952).
¹¹ W. T. J. MORGAN und S. M. PARTRIDGE, *Biochem. J.* 34, 169 (1940); 35, 1140 (1941); *Brit. J. exp. Path.* 23, 151 (1942).

¹² R. MEIER, P. A. DESAULLES und B. SCHÄR, *Arch. exp. Path. Pharmac.* 224, 104 (1955).

der Reinigung von Lipoid A ausgeschlossen ist. Die quantitativen Unterschiede können nicht auf einen wechselnden Lipoidgehalt der einzelnen Präparate zurückgeführt werden, sondern sind offenbar durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Trägersubstanzen mitbedingt. Polysaccharide als lyophile Träger scheinen in dieser Beziehung besonders günstig, wie wir auch am Beispiel anderer biologischer Wirkungen (Pyrogenität u.a.) zeigen konnten.

Die durchweg etwas geringere Wirksamkeit der Präparate aus *S. abortus equi* gegenüber denjenigen aus *E. coli* 08 stimmt mit unserer Erfahrung überein, wonach das Lipoid A aus *S. abortus equi* gegen Hydrolyse und andere chemische Einflüsse weniger stabil ist als dasjenige aus *E. coli*.

Der Polysaccharidanteil in den bakteriellen Lipopolysacchariden vermittelt die Wasserlöslichkeit der Präparate und damit den hohen Dispersionszustand des Lipoids A in Lösung; das Polysaccharid ist überdies Träger der immunspezifischen Eigenschaften (O-Antigen) der betreffenden Bakterienart¹³. Demgegenüber enthält der Lipoid-Anteil (Lipoid A) die für die endotoxischen Wirkungen wesentlichen Wirkgruppen¹⁴. Auf Grund der vorliegenden Versuche über die leukotaktische Wirkung der bakteriellen Lipopolysaccharide kann geschlossen werden, dass hierfür ebenfalls Wirkgruppen im jeweiligen Lipoid-A-Anteil wesentlich sind.

GISELA SCHMIDT, E. EICHENBERGER
und O. WESTPHAL

Dr.-A.-Wander-Forschungsinstitute, Bern und Freiburg-Zähringen, den 8. April 1958.

Summary

Highly purified lipopolysaccharides derived from gram-negative bacteria (endotoxins) stimulate the migration of leucocytes from cultures of chick leucocytes. This effect, as well as many endotoxic manifestations of the preparations *in vivo* (pyrogenicity, toxicity, etc.), is induced by their lipid fraction (lipid A), while the respective species-specific polysaccharide functions as lyophilizing carrier which, fundamentally, can be substituted by other inert carriers (e.g. protein).

¹³ O. WESTPHAL und O. LÜDERITZ, *Angew. Chemie* 66, 407 (1954). – Siehe zum Beispiel A. M. STAUB und R. TINELLI, *Bull. Soc. Chim. biol., Paris* 39, Suppl. I, 65 (1957).

¹⁴ E. NETER, O. WESTPHAL, O. LÜDERITZ, E. A. GORZYNSKI und E. EICHENBERGER, *J. Immunol.* 76, 377 (1956). – O. WESTPHAL, O. LÜDERITZ, E. EICHENBERGER und E. NETER in *Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides*, Ciba Found. Symp. (J. & A. Churchill Ltd., London 1958), p. 187.

Exudative Diathesis Produced by Vitamin E-Deficient Diets Without Polyenoic Fatty Acids

In earlier studies (DAM, KOFOED NIELSEN, PRANGE, and SØNDERGAARD¹) we have examined the content of polyenoic fatty acids in two kinds of yeast, viz. Torula 3N and Fleischmann 50B, used as the source of protein in vitamin E-deficient diets for chicks. Torula 3N, which gave rise to exudates, contained 5.3% total fatty acids

with 44.7% dienoic and 2.6% trienoic, whereas Fleischmann 50B, which did not produce exudates, contained almost no polyenoic fatty acids. Torula yeast extracted with alcohol still contained 2.7% total fatty acids with 45.3% dienoic and 3.6% trienoic¹, and gave rise to exudates (BIERI, POLLARD, and BRIGGS²).

Therefore, in analogy with previous experiences with casein-cod liver oil diets, it seems reasonable to assume that, also in the experiments with Torula yeast, the polyenoic fatty acids are an important factor in the development of exudative diathesis.

In a search for possible additional factors, we have examined a series of different yeasts with respect to their fat content and ability to produce exudative diathesis in chicks. Among these yeasts we have found one which is of particular interest, because, as in Fleischmann yeast 50B, the content of polyenoic fatty acids is practically nil, and nevertheless it produces exudates in chicks when fed without vitamin E. This yeast is a dried *Saccharomyces cerevisiae* obtained from The Distillers Company Ltd., London under the designation 'Flake Yeast'. It contained 4.4% total fatty acids and 2.0% unsaponifiable matter. The content of dienoic fatty acids in the total fatty acids was 0.6%. The amounts of trienoic, tetraenoic, pentaenoic, and hexaenoic acids were nil. No significant amount of trans fatty acids could be detected by means of infrared spectrophotometry.

Composition of basal diets, g per 100 g

Flake yeast	40.00	60.00
Gelatine	3.00	3.00
Salt mixture ³	5.17	5.17
Vitamin mixture ³	0.10	0.10
Choline chloride	0.20	0.20
Sucrose	51.53	31.53

Plus 0.001 g dicalcium salt of 2-methyl-1,4-naphthohydroquinone diphosphoric acid ester (Synkavit 'Roche') per 100 g diet.

Vitamins A and D₃ were given in aqueous solution⁴, 0.1 ml twice a week.

When fed at a 40%, resp. 60% level in a diet of the composition indicated in the Table, 'Flake yeast' caused exudates in 9, resp. 5 out of 10 chicks within 29 days. In a repetition of the experiment, 8, resp. 6 out of 10 chicks showed exudates within 33 days. These results suggest that 'Flake yeast' contains an insufficient amount of a protective factor. The exudates were less severe than those produced by corresponding Torula yeast diets.

One more peculiarity was noted in the feeding experiments with 'Flake yeast'. Fat tissue in which exudate had occurred contained, in 19 out of 23 cases, no peroxide detectable by the method of KING, ROSCHEN, and IRWIN⁵, modified by DAM and GRANADOS⁶.

This might indicate that the *in vivo* peroxidation of body fat usually observed in connection with exudative diathesis produced by casein-cod liver oil diets and (to a

² J. G. BIERI, C. J. POLLARD, and G. M. BRIGGS, *Fed. Proc.* 16, 381 (1957).

³ H. DAM and E. SØNDERGAARD, *Acta pharm. tox., Kbh.* 9, 131 (1953).

⁴ H. DAM, S. HARTMANN, J. E. JACOBSEN, and E. SØNDERGAARD, *Acta physiol. scand.* 41, 149 (1957), Table 2.

⁵ A. E. KING, H. L. ROSCHEN, and W. H. IRWIN, *Oil & Soap* 10, 105 (1933).

⁶ H. DAM and H. GRANADOS, *Acta physiol. scand.* 10, 162 (1945).

¹ H. DAM, G. KOFOED NIELSEN, I. PRANGE, and E. SØNDERGAARD, *Exper.* 13, 493 (1957).