

Ein Beitrag zur Kenntnis von Lanatosid D

Im Rahmen von Untersuchungen über Nebenglykoside, die im natürlichen Lanatosid-Komplex spurenweise vorhanden sind, haben wir im vorigen Jahr eine einheitliche Fraktion gewonnen, die nach der Kristallisation aus wässrigem Methanol eine Substanz vom Smp. 246,2–248,0°C korr. (Zers.) ergab, deren Zusammensetzung mit der Formel $C_{49}H_{76}O_{31}$ übereinstimmte. Diese Werte und das papierchromatographische Verhalten des Präparates sowie der spätere unmittelbare Vergleich haben gezeigt, dass der in unseren Versuchen isolierte Stoff mit dem von ANGLIKER *et al.*¹ kürzlich beschriebenen Lanatosid D identisch ist².

Nun wurde eine präparative Methode ausgearbeitet, die uns ermöglichte, eine grössere Menge von Lanatosid D (1,04 g) in reinster Form zu gewinnen. Aus dem rohen Lanatosid-C-Präparat wurde durch Gegenstromverteilung im System Chloroform-Dichlorethan-Methanol-Wasser (4:1:3:2) eine an stärker polaren Kardenoliden relativ reiche Fraktion abgetrennt. Aus diesem Gemisch wurde dann durch Verteilungschromatographie an einer Kieselgursäule (Wasser als stationäre, wassergesättigtes Chloroform mit 4–6% Butanol als mobile Phase) Lanatosid D in einheitlicher Form isoliert.

Im Zusammenhang mit diesen Versuchen wurde auch durch milde Verseifung der Acetylgruppe mittels $KHCO_3$ ³ kristallinisches Desacetyl lanatosid D vom Smp. 249,7 bis 253,4°C korr. (Zers.) dargestellt.

Zur besseren Beurteilung der ständigen Lanatosid-C-Begleitsubstanz wurden eingehende pharmakologische Untersuchungen von Lanatosid D herangezogen, denn unseres Wissens wurde bisher nur seine Toxizität an der Katze nach der modifizierten Hatterschen Methode bestimmt¹. Aus der Reihe von Versuchen, die wir mit unserem Lanatosid D vorgenommen haben, können hier kurz einige Resultate referiert werden.

Am isolierten, mit elektrischem Strom gereizten Katzenpapillarmuskel nach CATTELL und GOLD⁴ wirkt Lanatosid D in einer Konzentration von 10^{-7} . Im Vergleich mit Lanatosid C beträgt dessen Wirksamkeit 85%, mit Verlässlichkeitsgrenzen 65–105%. Die an Meerschweinchen bestimmte, mittlere letale Dosis bei der Infusionsgeschwindigkeit 0,01 mg/min war $1,976 \pm 0,04$ mg/kg, die letale Dosis von Lanatosid C war $0,757 \pm 0,02$ mg/kg. Subkutan verursacht Lanatosid D in der Dosis von 2,4 mg/kg eine 100%ige Mortalität innerhalb von 60 bis 70 min.

In einem weiteren Versuch wurde Lanatosid D Meerschweinchen subkutan in einer Menge, die 15% der intravenösen, das heisst 12,5% der sicher letalen subkutanen Dosis entspricht, während 5 Tagen injiziert. Am 6. Tage wurde die mittlere letale Dosis bestimmt; es konnte keine statistisch auswertbare Kumulation nachgewiesen werden wie bei Lanatosid C. Die enterale Resorption war unzuverlässig, da 4 h nach intraduodenaler Verabreichung der intravenösen letalen Dosis nur 10% resorbiert wurden.

Der chronische Versuch wurde in drei Gruppen mit je 5 Tieren eingeteilt. Die Meerschweinchen erhielten 23

Tage lang dreimal wöchentlich subkutan 36, bzw. 18 oder 9% der intravenösen letalen Dosis, was 30, bzw. 15 und 7,5% der sicher letalen subkutanen Dosis entspricht. Nach den höchsten Dosen wurde 1 h nach der Injektion Muskelschwäche und Zittern beobachtet, das bis 4 h lang andauerte. Nur in dieser Gruppe starb nach der 10. Injektion ein Tier. Der Gewichtsanstieg war in allen Gruppen etwas geringer als bei den Kontrolltieren. Auf Grund des Vergleichs mit den Resultaten von SUTTER⁵ und ROTHLIN⁶, bei welchen die Katzen durchschnittlich 4,7 Injektionen der 36%igen Hatcher-Dosis und 4,7 Injektionen der 28,6%igen letalen Dosis von Lanatosid C überlebten, scheint es uns, dass im chronischen Versuch Lanatosid D weniger toxisch wirkt.

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass die Eigenschaften von Lanatosid D im Tierversuch erfolgversprechend sind.

ALENA KOVAŘIKOVÁ, J. PITRA und Z. ČEKAN

Forschungsinstitut für Heilpflanzen in Prag (Tschechoslowakei), 13. Oktober 1958.

Summary

A preparative method for the isolation of lanatoside D has been developed, and fundamental pharmacological characteristics of the pure compound have been established.

The genuine glycoside has been converted to desacetyl lanatoside D.

⁵ E. SUTER, E. ROTHLIN und E. BIRCHER, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* 7, 1 (1949).

⁶ E. ROTHLIN und E. BISCHER, *Ergebn. inn. Med.* 5, 457 (1954).

Production of Spinal Curvatures in Rats by Chemically Dissimilar Substances¹

Severe kyphoscoliosis is a prominent feature of osteolathyrism² produced in weanling rats by feeding diets containing sweet peas (*Lathyrus odoratus*), β -aminopropionitrile (BAPN), or aminoacetone nitrile. Pertinent references are given in recent reviews^{3–4}. Recently it has been demonstrated that β -mercaptoethylamine^{5–7}, cystamine⁶, semicarbazide^{8,9}, and acetone semicarbazone⁹, when fed to weanling rats, produce skeletal and aortic lesions resembling those of osteolathyrism. All these substances

¹ This investigation was supported in part by Research Grant A-1427 from the National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, National Institutes of Health, U. S. Public Health Service. The authors also gratefully acknowledge generous gifts of BAPN acid fumarate by Dr. D. V. FROST of Abbott Laboratories, North Chicago, Ill. – These results were presented in part at the annual meeting of the American Institute of Nutrition, April 1958: W. DASLER and R. V. MILLISER, *Fed. Proc.* 17, 474 (1958).

² H. SELVE, *Rev. canad. Biol.* 16, 1 (1957).

³ W. DASLER, *Chicago Med. School Quart.* 18, 1 (1957).

⁴ F. M. STRONG, *Nutrition Rev.* 14, 65 (1956).

⁵ W. DASLER, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, N. Y. 88, 196 (1955).

⁶ W. DASLER and R. V. MILLISER, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, N. Y. 98, 759 (1958).

⁷ P. RAMAMURTI and H. E. TAYLOR, *Amer. Med. Assoc. Arch. Path.* 66, 270 (1958).

⁸ W. DASLER, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 97, 112 (1958).

⁹ R. V. MILLISER and W. DASLER, *Amer. Med. Assoc. Arch. Path.*, In press.

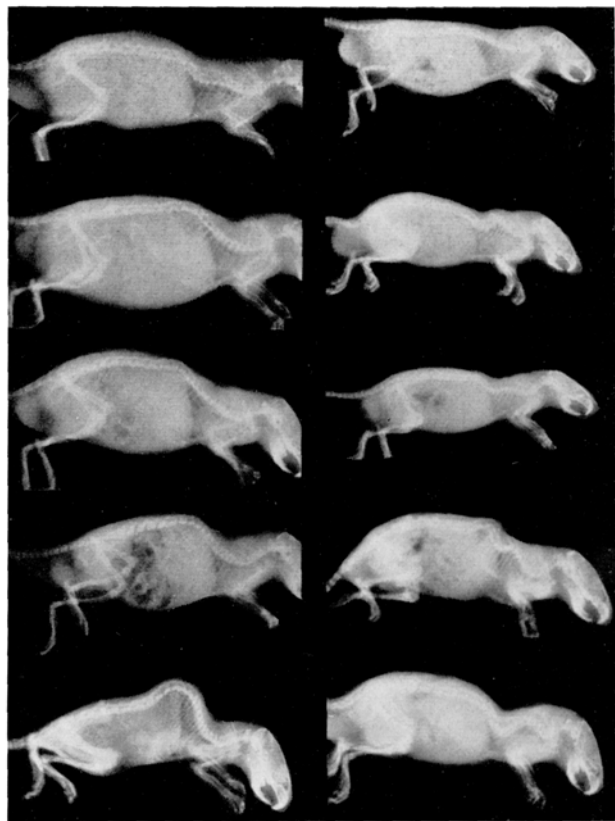
¹ E. ANGLIKER, F. BARFUSS, W. KUSSMAUL und J. RENZ, *Liebigs Ann.* 607, 131 (1957).

² Wir danken noch an dieser Stelle Herrn Dr. ANGLIKER für den liebenswürdigst ausgeführten Beweis durch Vergleich beider Präparate.

³ T. REICHSTEIN und J. VON EUW, *Helv. chim. Acta* 21, 1181 (1938).

⁴ MCK. CATTELL und H. GOLD, *J. Pharmacol. exper. Therap.* 71, 14 (1941).

give rise to spinal curvatures similar to those produced by BAPN (Figure).



X-ray photographs of rat spines. Right-hand column, top to bottom: normal; 0.175% BAPN·H·Fumarate for 37 days; 0.3% cystamine·2HCl for 37 days; 0.2% semicarbazide·HCl for 41 days; 0.1% acetone semicarbazone for 31 days. Left-hand column, top to bottom: 0.1% *p*-hydrazinobenzoic acid for 31 days; 1.0% 4,4-diphenylsemicarbazide for 44 days; 0.2% 1,5-diphenyl carbazine for 49 days; 0.1% 1,3-diethyl-2-thiourea for 49 days; 0.1% thiosemicarbazide for 31 days.

We have also produced kyphosis by feeding the following dietary levels of various chemicals to rats weighing 50–60 g (Figure): 0.1% *p*-hydrazinobenzoic acid, 1.0% 4,4-diphenylsemicarbazide, 0.2% 1,5-diphenylcarbazine, 0.1% 1,3-diethyl-2-thiourea, and 0.1% thiosemicarbazide. Of these substances, *p*-hydrazinobenzoic acid caused spinal curvatures most similar to those produced by BAPN. Thoracic cage deformities were also present, but exostosis formation on mandibles and femurs was slight.

The spinal curvatures caused by 4,4-diphenylsemicarbazide, 1,5-diphenylcarbazine, and 1,3-diethyl-2-thiourea were less severe, but definitely palpable after 3–5 weeks of feeding. No gross evidence of exostosis formation was seen in these animals. The diphenylcarbazine, however, gave rise to marked *splenomegaly* and *anemia*.

The spinal curvature produced by thiosemicarbazide was different in character from that of osteolathyrism (Figure). This was probably due to the occurrence in these animals of a very severe atrophy of the muscles and a shortening of the tissue elements surrounding the spine. That thiosemicarbazide toxicity is probably related to BAPN toxicity is evidenced by the fact that damage to the aortic media occurred in these animals (MILLISER and

DASLER: unpublished). Some exostosis formation on the medial aspects of the femurs was also evident grossly.

We have endeavoured to find a common denominator for the similar effects on skeleton and aorta of such dissimilar chemicals as BAPN, mercaptoethylamine, and semicarbazide. Much of the senior author's earlier work on protective agents against sweet pea and BAPN toxicity^{10,3} was based on the premise that BAPN acted as a competitive antimetabolite. This possibility now appears remote. We now feel that coordination complex- or chelate-formation may be the common mechanism by means of which these substances induce similar toxic effects. All of these substances do form chelates. Thus far, however, we have been unable either to prove or to disprove this hypothesis. The feeding of disodium (ethylene-dinitrilo) tetraacetate (EDTA) at levels of 0.5% of the diet neither accelerated nor delayed the progress of the disease in BAPN-fed rats.

W. DASLER and R. E. STONER

Department of Biochemistry, Chicago Medical School, Chicago (Illinois), October 20, 1958.

Zusammenfassung

Starke Kyphoskoliosen werden in Ratten durch Fütterung von osteolathrogenischen Substanzen wie 2-Aminopropionitril, Aminoacetonitril, 2-Mercaptoethylamin, Cystamin, Semicarbazid und Acetonsemicarbazid induziert. Kyphosen können auch durch *p*-Hydrazinbenzoesäure, 4,4-Diphenylsemicarbazid, 1,5-Diphenylcarbazon, 1,3-Diäthyl-2-thioharnstoff und Thiosemicarbazid hervorgerufen werden. Es wird vermutet, dass derselbe toxische Mechanismus dieser chemisch ungleichen Substanzen durch Bildung von Koordinationsverbindungen oder Chelaten bedingt ist.

¹⁰ W. DASLER, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. 91, 554 (1956).

The Effect of Lipid Emulsions on the Blood Lipoproteins of Atheromatous Rabbits

In the study of the effect of glucocorticoids on experimental rabbit atheromatosis, it was found a retrogression of aortic atheromatosis in rabbits receiving a phospholipid emulsion, whereas upon neutral fat infusions no such changes in atheromatosis could be observed¹.

In the present work it was intended to ascertain (1) whether atheromatous rabbits, after infusions of lipid emulsions, show changes in blood lipoproteins as well as changes in blood lipids, (2) in what respect would changes in the blood lipoprotein spectrum affect the properties of cholesterol of the lipoproteins, (3) relationship of such changes to the retrogression of the atheromatous process. Atheromatous rabbits were given infusions of emulsified neutral fat containing olive oil (7%), Tween 80 (0.6%), and monoglyceride K (1%). The phospholipid emulsion contained crude soya lecithin (4%). Control rabbits received stabilisers in 5% glucose or glucose alone. The duration of the individual infusions was 9–10 h. Lipoprotein changes were studied by paper electrophoresis. The individual fractions were analysed for cholesterol

¹ V. FELT, D. REICHL, S. ROEHLING, and S. VOHNOUT, Gerontologia, in press.