

Die lokale Leukozytenreaktion bei der intraperitonealen Infektion der Maus mit *E. coli*

Die Erhöhung der Resistenz gegen Infektion mit Mikroorganismen durch Behandlung mit bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) besonders bei prophylaktischer Gabe kann nach Untersuchungen verschiedener Autoren und eigenen Befunden als eine gesicherte Tatsache angesehen werden¹⁻⁶. Der Mechanismus dieser Wirkung ist vorläufig nicht geklärt und wird mit verschiedenen Abwehrphänomenen in Zusammenhang gebracht, so zum Beispiel der Erhöhung der Leukozytenphagozytose⁷, der Bildung von bakteriziden Serumkomponenten wie Propperdin^{8,9}, der Aktivierung des Reticuloendothels^{8,9}, der Erhöhung der Opsonine¹⁰ usw. Weiterhin wird beschrieben, dass bei Immunisierungsvorgängen die Antikörperbildung durch gleichzeitige Gaben von LPS verstärkt werden kann¹¹. Alle diese Befunde scheinen nicht auszureichen, den Mechanismus völlig zu charakterisieren. Ein wichtiger Faktor, die lokale Leukozytenreaktion, wurde zwar berücksichtigt, aber in ihrem quantitativen Zusammenhang mit der Infektionsresistenz nicht genügend gesichert¹². Eine Beurteilung kann nur auf einer quantitativen Auswertung der Leukozytenansammlung in Beziehung zum Infektionsverlauf erfolgen.

Für eine solche ist eine geeignete Methode Voraussetzung. Diese wurde für die intraperitoneale Infektion der Maus ausgearbeitet; sie wird andernorts ausführlich beschrieben¹³.

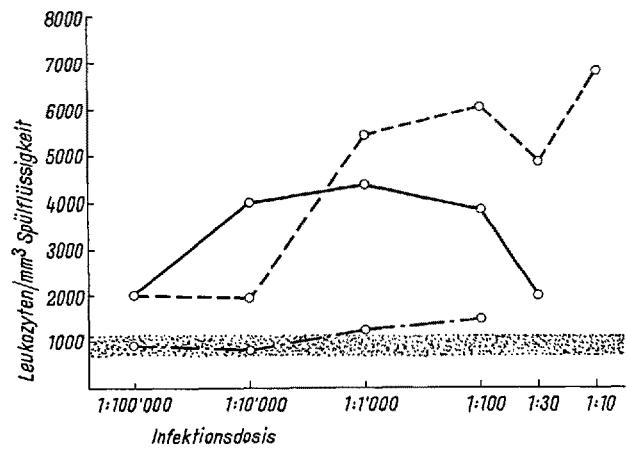
Das Prinzip der Methode ist folgendes: lebende oder abgetötete Bakterien werden in abgestuften Mengen in die Bauchhöhle der Maus eingeführt. Nach bestimmtem Intervall wird der Bauchinhalt ausgespült und die Leukozytenzahl quantitativ ermittelt. Das Maximum der leukozytären Reaktion wird nach einer Einwirkungsduer von ca. 16–20 h erreicht.

Bei Injektion steigender Mengen von lebenden Bakterien (*E. coli* CN 348) ergibt sich: Die Leukozytenzahlen nehmen zunächst zu bis zu einem Maximum und sinken bei höheren Dosen von Bakterien wieder auf Kontrollwerte und darunter ab. Die Mortalität steigt dabei parallel zur Infektionsdosis ständig an. Dass diese Reaktion im wesentlichen von den auf die Leukozytenmigration wirksamen Produkten der Bakterien abhängig ist, wird dadurch bewiesen, dass abgetötete Bakterien sowie eine LPS enthaltende Fraktion aus Bakterien, in gleicher Weise appliziert, eine analoge Dosis/Wirkungskurve der Leukozytenansammlung ergeben.

Bei systemischer Vorbehandlung der Tiere mit geeigneten Dosen eines gereinigten LPS, von dem bereits aus den Untersuchungen von NEIPP, KUNZ und MEIER² bekannt war, dass es eine ausgeprochene Erhöhung der Resistenz bewirkt, verändert sich die lokale Leukozytenreaktion in charakteristischer Weise. Werden lebende Bakterien in gleicher Weise wie oben intraperitoneal gegeben, so tritt im Bereich geringerer Bakteriendosen eine etwas geringere Leukozytenreaktion ein, die Menge der Leukozyten steigt aber bis zu den höchsten Bakteriendosen kontinuierlich an und zeigt nicht mehr den ohne LPS-Vorbehandlung eintretenden Abfall. Die Mortalität der Tiere hat sich dabei so verändert, dass jetzt auch bei der höchsten Infektionsdosis 100% derselben überleben.

Wird das LPS nicht wie in diesem Falle prophylaktisch (das heisst 48 h vor der Infektion), sondern simultan (gleichzeitig mit der Infektion) gegeben, so wird die Leukozytenreaktion praktisch vollständig unterdrückt, und die Tiere sind gegenüber der Infektion empfindlicher geworden.

Die Resultate dieser Versuche sind in der beigefügten Abbildung zusammengefasst. Dass auch in diesen Fällen im wesentlichen die Beeinflussung der Wirkung auf die Leukozyten die Ursache des Phänomens ist, wird dadurch gezeigt, dass eine völlig analoge Veränderung der Leukozytenansammlung in der Peritonealhöhle durch systemische Behandlung mit LPS erzielt werden kann, wenn statt der lebenden Bakterien tote Bakterien oder eine LPS-haltige Bakterienfraktion zur Auslösung der Leukozytenreaktion intraperitoneal gegeben werden.



Überlebende Tiere:

1. <i>E. coli</i> allein (—) nach						
16 h	100%	100%	100%	91%	58%	12%
10 Tage	80%	100%	60%	60%	29%	0%
2. LPS (simultan) + <i>E. coli</i> (---) nach						
16 h	100%	92%	83%	71%	28%	6%
10 Tage	100%	83%	57%	30%	8%	6%
3. LPS (prophylakt.) + <i>E. coli</i> (---) nach						
16 h				100%	100%	100%
10 Tage				100%	80%	100%

Leukozytenansammlung nach intraperitonealer Injektion von lebenden Colibakterien, ohne zusätzliche Behandlung (—), bei gleichzeitiger Gabe einer einheitlichen intravenösen Dosis (1 mg/kg) einer Lipopolysaccharidfraktion aus *Proteus vulgaris* (---) und nach prophylaktischer Gabe einer einheitlichen intravenösen Dosis (1 mg/kg) dieser gleichen LPS-Fraktion (---). Ordinate: Anzahl Leukozyten pro mm^3 aufgefangener Spülflüssigkeit. Abszisse: Verdünnungsgrad einer 24-h-Kultur von *E. coli* (Injektionsvolumen einheitlich 0,2 ml). Grau hervorgehoben die Zone der Normalwerte (freie Zellen der Bauchhöhle beim unbehandelten Tier). Am Fuß der Abbildung ist der Prozentsatz der nach 16 h bzw. 10 Tagen noch überlebenden Tiere für jede Infektionsdosis angegeben.

¹ D. ROWLEY, Lancet 286, 232 (1955).

² L. NEIPP, W. KUNZ und R. MEIER, Schweiz. med. Wschr. 89, 532 (1959).

³ M. LANDY, Fed. Proc. 15, 598 (1956).

⁴ L. PILLEMER, Ann. N. Y. Acad. Sci. 66, 233 (1956).

⁵ J. S. KISER, H. LINHD und G. C. DE MELLO, Ann. N. Y. Acad. Sci. 66, 312 (1956).

⁶ R. J. DUBOS und R. W. SCHAEDLER, J. exp. Med. 104, 53 (1956).

⁷ E. FRITZE und F. WENDT, Klin. Wschr. 33, 575 (1955).

⁸ D. BOEHME und R. J. DUBOS, J. exp. Med. 107, 523 (1958).

⁹ G. BIOZZI, B. BENACERAFF und B. N. HALPERN, Brit. J. exp. Pathol. 36, 226 (1955).

¹⁰ C. R. JENKIN und D. ROWLEY, Nature 184, 474 (1959).

¹¹ A. G. JOHNSON, S. GAINES und M. LANDY, Fed. Proc. 13, 499 (1954).

¹² H. J. ROBINSON, and A. L. SMITH: Ann. N. Y. Acad. Sci. 56, 757-764 (1953). J. D. ROMANI: C. r. Soc. Biol., Paris 146, 993-997 (1952). M. B. LURIE, P. ZAPASODI, A. M. DANNEBERG und E. CARDONA-LYNCH: Ann. N.Y. Acad. Sci. 56, 779-792 (1953). L. THOMAS, Ann. N.Y. Acad. Sci. 56, 799-814 (1953).

¹³ B. ECKLIN, Arch. int. Pharmacodyn. (im Druck).

Bei intraperitoneal infizierten Mäusen wird somit durch die LPS-Vorbehandlung ein völlig geänderter Verlauf der lokalen Leukozytenreaktion auf die Infektion hervorgerufen. Während bei nicht vorbehandelten Tieren im Bereich der hohen Bakteriendosen eine Aufhebung der Leukozytenreaktion erfolgt, ist nach LPS-Vorbehandlung auch bei den höchsten Infektionsdosen eine starke intraperitoneale Leukozytenansammlung vorhanden. Da die Leukozytenreaktion in quantitativer Relation zur Schutzwirkung der LPS-Vorbehandlung steht, stellt sie offenbar einen besonders wesentlichen Faktor für die Erhöhung der Resistenz durch LPS dar.

B. ECKLIN und R. MEIER

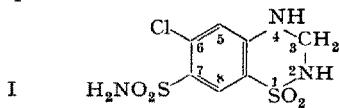
Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung, Basel, 4. Januar 1960.

Summary

Intraperitoneal aggregation of leucocytes is produced in an identical manner by intraperitoneal application of different amounts of living and dead bacteria and bacterial products. The maximum accumulation occurs with medium dosages of bacteria or their products, with high dosages no leucocytic accumulation is produced. Pretreatment with selected LPS of bacteria enhances the intraperitoneal accumulation of leucocytes also with the high amounts of bacteria, whereas the reaction in not pretreated with LPS is suppressed. Parallel to the increase of the intraperitoneal leucocytic accumulation the animals are protected against the infection with high amounts of bacteria, to which they succumb if not pretreated with LPS.

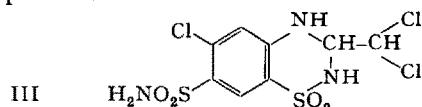
The Chemistry and Pharmacology of Hydrotrichlorothiazide

Since the discovery of the potent orally effective non-mercurial diuretic drug, 6-chloro-7-sulfamyl-3,4-dihydro-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (I), (hydrochlorothiazide) in our Laboratories¹, the ground work was laid for preparation of a considerable number of analogs of this heterocyclic system. As described in our first communication, compounds of this type are readily prepared by condensing an aldehyde or acetal with 4-amino-6-chloro-m-benzenedisulfonamide (II). In this way a large variety of 3-substituted derivatives of I have been synthesized. One of the several hundred compounds² we have prepared in this series is the subject of this report.



The condensation of the disulfonamide II with dichloroacetaldehyde or diethyldichloroacetal was carried out in anhydrous diethyleneglycol dimethyl ether containing a catalytic amount of hydrogen chloride. The condensation could also be run in 15% hydrochloric acid solution. The

resulting substance, 6-chloro-3-dichloromethyl-7-sulfamyl-3,4-dihydro-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (III)³ was recrystallized from methanol:acetone:water (1:1:1) to yield a white crystalline powder, m. p., 248–250°C with decomposition.



Anal. Calculated for $C_8H_8Cl_3N_3O_4S_2$; C, 25.25; H, 2.08; N, 11.05. Found: C, 25.40; H, 2.33; N, 11.01.

Pharmacology

General Pharmacological Properties. Hydrotrichlorothiazide (III) has shown marked diuretic activity in the unanesthetized dog after oral administration. The diuretic, saluretic, kaluretic, and chloruretic activities of this compound were compared to those of hydrochlorothiazide (I). Both drugs were tested in the unanesthetized dog after the oral administration of the drugs. The exact method of the assay employed has been previously described by BARRETT *et al.*⁴. The relative potency of III compared to that of hydrochlorothiazide was computed by using a 2×2 factorial assay. The results obtained for each of the four parameters measured are summarized in the following Table along with the 95% confidence limits. Hydrotrichlorothiazide at doses of 1.25 and 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ was compared with hydrochlorothiazide at doses of 20 and 310 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Thus, in terms of water excretion, this substance is 22 times more potent than I and in terms of sodium excretion 20 times more potent than I. Since it was not possible to obtain a dose response curve for urinary potassium excretion after the administration of hydrotrichlorothiazide, one could not calculate a relative potency value for this parameter.

Parameter	Relative Potency (Hydrochlorothiazide = 1)	95% Confidence Limits
Water	22	9.0-51
Sodium	20	9.0-46
Chloride	11	7.0-18.0

The relative diuretic potency of hydrotrichlorothiazide and hydrochlorothiazide was determined for the rat utilizing four separate assays. The method of assay was similar to that previously reported⁵. Compound III was tested at doses of 0.08 and 0.02 mg/kg and hydrochlorothiazide at 0.32 and 0.08 mg/kg for each assay. The calculation of relative potencies of the two compounds showed that hydrotrichlorothiazide was 6.3 times as potent in its effect on water excretion, 3.8 times as potent in terms of sodium excretion, 4.6 times in terms of potassium excretion, and 4.9 times as potent with respect to chloride excretion. This difference in potency is less for the rat than for the dog.

Hydrotrichlorothiazide produced no effect on the blood pressure of the anesthetized dog at doses up to 9.0 mg/kg (i. v.). In the anesthetized dog it did not exhibit any anticholinergic activity nor adrenolytic activity. It had no effect on the behaviour of the unanesthetized dog in the doses employed in the diuretic studies, neither did it have

¹ G. DE STEVENS, L. H. WERNER, A. HALAMANDARIS, and S. RICCA, JR., *Exper.* 15, 463 (1958).

² In a recent paper we have described in detail the preparation of compounds substituted at the 2, 4, 5, 6, and 7 positions. See L. H. WERNER, A. HALAMANDARIS, S. RICCA, JR., L. DORFMAN, and G. DE STEVENS, *J. Amer. Chem. Soc.* 82, in press (1960).

³ Generic name: Hydrotrichlorothiazide.

⁴ W. BARRETT *et al.* *Toxicol. appl. Pharmacol.* 1, 333 (1959).

⁵ A. H. RENZI, J. CHART, and R. GAUNT, *Toxicol. appl. Pharmacol.* 1, 406 (1959).