

DETOXIFIKÁLT ENDOTOXINOK KÉMIAI ÉS BIOLÓGIAI  
TULAJDONSÁGAINAK VIZSGÁLATA

Doktori értekezés

Írta:

Takáts István  
egyetemi tanársegéd

Készült:

A Szegedi Orvostudományi Egyetem  
Gyógyszertani Intézetében

Igazgató: Dr. Jancsó Miklós egyetemi tanár



S z e g e d  
1965.





E 1.125





## T A R T A L O M :

|                                                     |         |
|-----------------------------------------------------|---------|
| Bevezetés . . . . .                                 | 1 oldal |
| Az endotoxinok kémiája . . . . .                    | 2 "     |
| Az endotoxinok biológiai hatásai . . . . .          | 7 "     |
| Endotoxinok detoxifikálása . . . . .                | 11 "    |
| Kísérleti anyagok és módszerek . . . . .            | 17 "    |
| Állatok . . . . .                                   | 17 "    |
| Endotoxinok . . . . .                               | 18 "    |
| Detoxifikálás . . . . .                             | 19 "    |
| Kémiai vizsgálatok . . . . .                        | 20 "    |
| Biológiai és immunológiai módszerek . . . . .       | 22 "    |
| Kísérleti eredmények . . . . .                      | 23 "    |
| A foszfor tartalom változása . . . . .              | 24 "    |
| A szén-sav tartalom változása . . . . .             | 25 "    |
| Egér toxicitás vizsgálatok . . . . .                | 26 "    |
| Shwartzman aktivitás változása . . . . .            | 27 "    |
| Precipitációs titer változások . . . . .            | 27 "    |
| Passzív hemagglutinációs titer változások . . . . . | 28 "    |
| Agar-gél precipitációs eredmények . . . . .         | 29 "    |
| Kísérleti eredmények összefoglalása . . . . .       | 31 "    |
| Megbeszélés . . . . .                               | 32 "    |
| Összefoglalás . . . . .                             | 39 "    |
| Irodalom . . . . .                                  | 41 "    |



## B e v e z e t ő s .

A bakteriális endotoxinok kémiai, farmakológiai, kórélettani és immunológiai tulajdonságainak vizsgálata napjainkban mindinkább a kutatók érdeklődési körébe kerül.

A kiterjedt vizsgálatokat az indokolja, hogy egyrészt az emberi szervezet egész élete során symbiosisban él endotoxin termelő mikroorganizmusokkal, másrészt egyes bakteriális fertőző betegségeknél endotoxin szívódhat fel, mely a szervezet szöveteinek károsodását okozhatja.

A Gram negatív és egyes Gram pozitív baktériumok sejtfala tartalmazza az endotoxint, melyet első ízben Boivin és munkatársai /2/ izoláltak.

A megfelelő O-antigénnel megegyező specificitású anyagot több névvel illették: bakteriális pyrogen, lipopolysaccharida, Schwartzman aktiv toxin, tumor nekrotizáló toxin, endotoxin. Ezen elnevezések közül leginkább ez utóbbi ment át a köztudatba annak ellenére, hogy nem a leghelyesebb kifejezés, ugyanis az endotoxin a baktérium sejtfalából folyékony táptalajban már 24 órán belül kiválasztódni képes.



## AZ ENDOTOXINOK KÉMIAJA.

Az endotoxinnal kapcsolatos első megfigyeléseket Boivin és Mesrobeanu 1933-ban közölték /2/. Megállapították, hogy a Gram negatív és egyes Gram pozitív baktériumokból előállítható endotoxin kémiailag lipopolysaccharida-fehérje komplex. Izolálása főleg a sejtfalból történik és specificitása a megfelelő O-antigénnel megegyező. A komplex endotoxin aktivitása a fehérje rész nélkül is megmarad, amint ezt a későbbi kutatások bebizonyították.

Boivin és munkatársai /4/ megállapították, hogy enyhe ecetsavas hidrolízis után az endotoxin két részre bomlik szét:

1./ A lipíd jellegű " A frakció " nem rendelkezik antigen tulajdonsággal, a megfelelő antitesteket nem precipitálja, de bizonyos mértékben toxikus.

2./ A " B frakció ", amely a víztiszta supernatanst alkotja, reagál a csoport-specifikus antiszérummal, antitest képződést nem indukál és nem toxikus.

A későbbiekben igen sok szerző foglalkozott az endotoxin komplex kémiai úton történő elhasításával és a szerkezet felderítésével. Miles és Pirie /29/ 0,1 n sósavval, Morgan és Partridge /32/, valamint Freeman /40/ 0,1 n ecetsavval, Goebel /44/ telített picrinsavval, Bendich és Chargaff /1/ jégecettel, Westphal és Lüderitz /57/ 1 n sósavval végzett kísérletei azt bizonyították, hogy az endotoxin komplex



a különböző kezelések közös eredményeként egy haptén tulajdonságú polysaccharidára és egy nitrogén tartalmú phospholipidre bomlik el.

Westphal, Lüderitz és Kauffmann /<sup>19,20,26,56,58,59/</sup> fényt derítettek az endotoxikus O-antigének biológiai aktivitása és kémiai szerkezete közti egyes összefüggésekre. Megállapították, hogy a szerológiai csoport-specifikus rész a 3,6-dideoxy-hexose. A baktériumtörzstől, az izolálás és a hidrolízis módjától függően különböző cukrok eltérő koncentrációban találhatók az egyes endotoxinokban. Leggyakrabban hexosok, hexoseaminok, pentosok, 6-deoxypentosok és 3,6-dideoxy-pentosok szerepelnek.

Sósavas hidrolízis után az endotoxin egy polysaccharida részre és egy Westphal által "Lipid A"-nak nevezett részre bomlik, amely nitrogén tartalmú phosphatida /<sup>57/</sup>.

Arról, hogy az endotoxin melyik része felelős a biológiai hatásokért, a szerzők véleménye megoszlik. Miles és Pirie /<sup>30/</sup>, Westphal /<sup>55/</sup>, Neter /<sup>33/</sup> és Mihich /<sup>28/</sup> véleménye szerint a lipid rész a felelős az endotoxin biológiai hatásosságáért és a biológiailag aktív tényezők ebben a frakcióban keresendők. Ribí /<sup>46/</sup> és Haskins /<sup>16/</sup> kutatásai azt bizonyították, hogy a Salmonella enteritidis endotoxinból izolált "Lipid A" rész toxicitása az eredeti endotoxin toxicitásának csak egy százaléka, vagy még ennél is kevesebb volt.

Nowotny és munkatársai /<sup>36,41/</sup> az Escherichia coli 08 "Lipid A" frakcióját vizsgálva azt a megállapítást tették,



hogy a hidrolizátum 40%-a nyolc különböző szabad zsírsavat tartalmaz, a fennmaradó 60% pedig 6 különböző részre frakcionálható. Ezek közül a legnagyobb mennyiségben egy peptid tartalmu foszfor-mucolipid található. Ebben az új lipidben Nowotny /38/ további vizsgálatai szerint poly-D-glucoseamin-foszfát lánchoz észter kötéssel kapcsolódnak a hosszú láncú zsírsav molekulák.

Az endotoxinoknak a sejtfalból történő extrakciójára számos módszer ismeretes. Boivin és Mesrobian /3/ triklórecetsavval, Raistrick és Topley /45/ tripszines emésztéssel, Morgan /31/ diaethylenglycollal, Fuller /12/ formamiddal, Walker /54/ karbamiddal, Palmer és Gerlough /44/, Westphal és Lüderitz /57/, valamint Goebel és Barry /13/ fenol és víz különböző aránya elegyével, Goebel, Binkley és Perlman /14/ piridin és víz elegyével, Roberts /48/ 80°C-os vízzel, Ribí és munkatársai /47/ vizes éterrel, Scott /49/ Kay és munkatársai /21/, valamint Cohn és Butler /6/ felület-aktiv detergenssek segítségével végezték el az endotoxin izolálását.

A különböző kivonásokkal elért eredmények azt bizonyították, hogy míg az egyes módszerek alkalmasak voltak biológiailag hatásos endotoxin előállítására bizonyos Gram negatív törzseknél, addig ugyanezek az eljárások más csoportoknál alkalmazva hatástalannak bizonyultak.

Nowotny és munkatársai /42/ három különböző baktérium törzs mindegyikénél hat különböző kivonási eljárást alkalmaztak. Arra a megállapításra jutottak, hogy általános



örvényű, hatásos kivonási eljárást nem lehet meghatározni. Minden baktérium törzs más kivonási eljárást kíván. Megállapították, hogy az endotoxinok antigen tulajdonsága és toxicitásuk nem mutat párhuzamot. Az endotoxinok aminosav, zsírsav, nukleinsav és szénhidrát tartalma széles határok között változik a különböző extrakciós eljárásoktól és baktérium törzsektől függően. Ez részben azt bizonyítja, hogy a különböző endotoxinok kémiai szerkezete között nagy különbségek vannak, másrészt arra ad felvilágosítást, hogy a sejtfalban működő kohéziós erők az egyes törzseknél különböznek. Nem sikerült eddig még semmilyen párhuzamot felfedezni az endotoxinok biológiai tulajdonságai, valamint az egyes kémiai komponensek koncentrációja között.

Az endotoxin kémiai szerkezetének felderítésére irányuló kutatások mai állása szerint az a felfogás, hogy a biológiai aktivitás a molekula-komplex egy kisebb részével illetve a komplex egy igen specifikus térbeli elrendeződésével kapcsolatos.

Kasai és Yamano /18/ számos Gram negatív bélbaktériumból izolált endotoxin "Lipid A" frakcióját vizsgálták vékonyréteg kromatográfiás módszerrel és megállapították, hogy a lipidek nagyrészt azonosak voltak, továbbá, hogy minden "Lipid A" frakció legalább 8 lipid komponenst tartalmaz, melyek az izolálástól és a hidrolizistól függően különböznek egymástól.

Nowotny /38/ vizsgálatai szerint sósavas hidrolízis után az endotoxin éter-oldékony részének 85%-a szabad zsír-



sav volt. A papirkromatográfiás analízis a zsírsavak és a lipopolysaccharida zsírsav részének azonosságát igazolta. A vizoldékony rész nagyfeszültségű papirelektroforetikus vizsgálata azt mutatta, hogy nagy mennyiségű glucoseamin tartalmaz, kis mennyiségű asparaginsav, arginin, glutaminsav, alanin, serin, valin és lizin mellett. Három ismeretlen, pozitív polyol-specifikus reakciót és pozitív foszforészter reakciót mutató vegyületet is sikerült izolálni. A további vizsgálatok igazolták a vegyületek 4-phospho-D-glucoseamin, 6-phospho-D-glucoseamin és 1-peptido-4-phospho-D-glucoseamin szerkezetét /5,37/. Az alkálikus és savas foszfatáz szabad foszforsavat nem tudott a lipidből lehasítani, ami azt bizonyította, hogy a D-glucoseamin-phosphat egységek foszfordiészter-híd kötással kapcsolódnak egymáshoz.

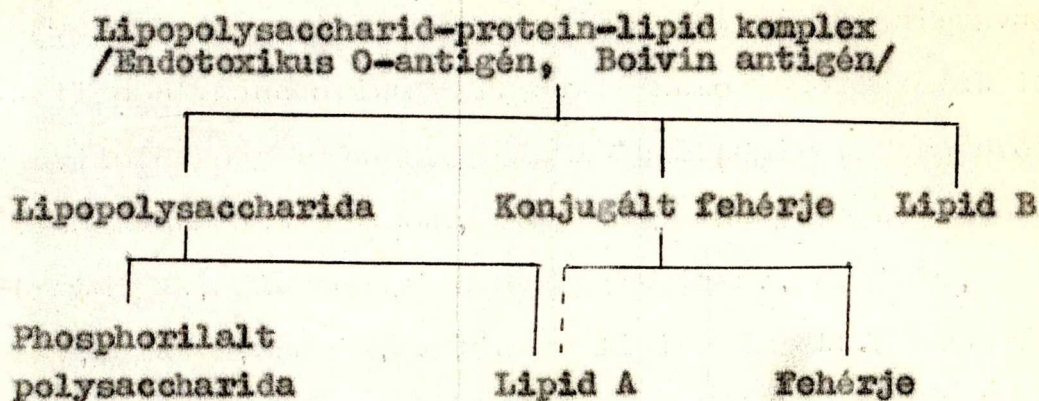
A zsírsavak egy része a glucoseamin amino csoportjához kapcsolódik és sav-amid kötést létesít. Más részük valószínűleg a háromas szénatom hydroxyl csoportjával létesít labilis, könnyen hasítható észter kötést. Ugyancsak zsírsavak kapcsolódnak viszonylag stabilabb kötést alkotva a hatos szénatom hydroxyl csoportjához is.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az endotoxin kémiailag igen bonyolult komplex molekula, melynek molekulahelye  $10^6$  nagyságrendű. Különböző kémiai ágensekkel történő hidrolizissal protein, lipid és polysaccharida részre bontható.

Westphal és Lüderitz /57/ szerint az endotoxin bomlása az alábbi séma szerint írható fel:







### AZ ENDOTOXINOK BIOLÓGIAI HATÁSAI.

A bakteriális endotoxinoknak az élő szervezetre kifejtett hatásával, a hatás mechanizmusával és következményeivel számos kutató foglalkozik.

Az endotoxinnak a szervezetre gyakorolt hatásaira vonatkozó kutatási eredmények igen szerteágazóak. Egységes és rövid összefoglalásuk Kováts és munkatársai /23,24,25,53/ munkáinak felhasználásával történt, az említett szerzők csoportosításának és definícióinak figyelembevételével.

Eszerint az endotoxinoknak a makroorganizmusokra kifejtett hatásait két részre oszthatjuk:

I. Az első csoportba tartoznak azok a többségükben nem fajlagos hatások, amelyeket primer toxicitásnak, vagy endotoxin fogékonyságnak neveznek. A primer toxikus hatások a szervezet endotoxin fogékonyságának vetületei, szorosan összefüggő fogalmak.

Primer toxicitáson az endotoxinnak a vegetatív idegrendszerre kifejtett - a vasomotor hatás kivételével - nem



fajlagos, károsító hatásait értjük. A különböző eredetű endotoxinok toxicitása és a szervezet fogékonysága ezekkel szemben megközelítőleg azonos. Az endotoxin kis adagjainak ismételt oltása révén rezisztencia fejlődik ki, amely nem fajlagos és átmeneti jellegűnek tekinthető. Előidézése a nem fajlagos védelmi berendezések pl. RES stimulálásán és immunológiai mechanizmuson alapszik.

Az endotoxin primer toxikus hatása a vegetatív idegrendszeren keresztül jön létre.

Az alább felsorolandó toxikus hatások nagyrészt együtt szerepelnek. Egyes hatások megjelenése az endotoxin dózisának függvénye. Ezenkívül megállapítást nyert az is, hogy bármely primer toxikus hatás a többit befolyásolni képes.

A primer toxikus hatások alatt a vegetatív idegrendszerre gyakorolt hatást értjük, melyet a sympathicus hatás túlsúlya miatt adrenerg hatásnak jelölnek. A hatás következményei:

a./ vasomotor zavarok. Az endotoxin oltás után 5-15 perc múlva az arteriolák váltakozó kontrakciója és dilatációja következik be egészen a halálig.

b./ haemorrhagiás és szövetnekrotikus hatás. Az endotoxin mucosus illetve submucosus haemorrhagiát okoz a gyomor- és béltraktusban, a mellékvesében, a hasi nyirokcsomóban és a thymusban. Az endotoxin által okozott haemorrhagiás készség az erekre gyakorolt direkt toxikus hatásával van kapcsolatban.



Az endotoxin által okozott haemorrhagiás, nekrotikus laesio legszembetűnőbb megjelenési formája a Shwartzman jelenség. Az endotoxin tumoros állatok tumor-szövetében vérzéses nekrozist tud előidézni.

c./ hyperglycaemiás hatás. Endotoxin adás után a vércukor szint 1-2 óra múlva emelkedik, mely állapot néhány órán át tart. Valószínű, hogy a hyperglycaemia vegetatív idegrendszeri mechanizmusokon keresztül érvényesül és fokozott adrenalin kidobással hozható összefüggésbe.

d./ láskeltő hatás. Endotoxin oltás után 15-30 perc múlva jellegzetes két fázisu láz következik be. A láz az endotoxinnak a központi idegrendszer thermoregulációs területeire kifejtett direkt hatásán alapul és vegetatív idegrendszeri mechanizmusokon át jön létre.

e./ Egyes kísérleti adatokból direkt és indirekt módon következtetni lehet az endotoxinnak az agyi endokrin központra /hypophysisre/ kifejtett hatására. Ennek következménye különböző haematologiai változások /leucopenia, thrombocytopenia/ kialakulása. Az endokrin rendszernek az endotoxin hatására létrejövő fokozódó működése valószínűleg kapcsolatban van az endotoxin ellenes védelem kialakulásával, így e hatásokat nem lehet toxikus hatásnak nevezni.

f./ Nagyobb endotoxin adagok az eddig leirt összes toxikus tünetek együttes megjelenését, az endotoxin-shockot okozzák. Ezt a jellegzetes tünetesortot csak endotoxin képes produkálni és 24 órán belül halálhoz vezet, /lethalis hatás/.



II. Az endotoxinok makroorganizmusokra kifejtett hatásainak második csoportját azok a hatások alkotják, melyek a különböző eredetű endotoxinok fajlagos túlérzékenyítő képességével, azaz allergén tulajdonságaival kapcsolatosak.

Endotoxin túlérzékenységen a szervezetnek az endotoxinnal szemben kifejlődő késői és korai típusú túlérzékenységet értjük. Ez eltér az egyéb antigének, vagy allergének által okozott túlérzékenység tüneteitől, ugyanis a primer toxikus tünetek, valamint az endotoxin túlérzékenység tünetei rendszerint együttesen jelennek meg. Az endotoxin túlérzékenység természetes túlérzékenység. Kisebb-nagyobb mértékben minden állatnál megfigyelhető, és az endotoxin-termelő mikroorganizmusokkal való symbiosis és az élet folyamán előforduló fertőzések következménye. Az endotoxin túlérzékenység minden endotoxinnal szemben kialakulhat, azonban egyes endotoxinok között valószínűleg érvényesül a faj-specifitás.

Annak ellenére, hogy egyes szerzők felvetik az endotoxin túlérzékenység lehetőségét, e feltevéseket megfelelő kísérletekkel döntő módon alátámasztani eddig még nem sikerült.

Kováts és munkatársai /24,25,53/ kísérleteikben megállapították, hogy a Shwartzman reakció pathomechanizmusában az endotoxin túlérzékenységnak szerepe van. Megállapították, hogy a primer toxicitás elválasztható az endotoxin túlérzékenységtől, hiszen az előbbit átmenetileg meg tudták



szüntetni, míg az utóbbit nem. Az endotoxin fogékonyság csökkenése, azaz a rezisztencia kifejlődése csak átmeneti és nem fajlagos jelenség. A rezisztencia emelkedése nem befolyásolja az állandó jellegű endotoxin túlérzékenységet.

Egyes szerzők megfigyelései szerint bizonyos betegségekben az endotoxin rezisztencia előidézése kedvező hatású. Tekintettel azonban az előbb említett megállapításra /a rezisztencia fokozódásával a túlérzékenység megmarad/, az endotoxint csak igen kis mennyiségben, fokozatosan lehet terápiásan alkalmazni.

A másik lehetőség az endotoxinok detoxifikálása. Erre vonatkozólag eddig is több kísérleti eredmény ismeretes. Ezeknek részletesebb ismertetésére az alábbiakban térek ki.

#### ENDOTOXINOK DETOXIFIKÁLÁSA.

Minthogy az egyes endotoxinok oltása fertőzések ellen fajlagos és nem fajlagos antibakteriális immunitást biztosít, egyes szerzők olyan endotoxin készítmények előállítását tűzték ki célul, melyeknek toxicitása és pyrogenitása csökkent, viszont az eredeti antigén tulajdonságukat és serológiai specificitásukat megtartják.

Ezek a kísérletek, melyek nagyrészt az endotoxin biológiailag aktív részének és szerkezetének felderítésére irányuló kísérletekkel párhuzamosan folytak, eddig még nem vezettek teljesen egyértelmű megállapításokra.



Hidrolitikus bontás alkalmazása során az endotoxin antigén tulajdonságai hamarabb tűntek el, mint a toxicitás, illetve a toxicitás csökkenésével együtt az antigenitás is csökkent vagy megszűnt.

A további kutatások arra irányultak, hogy olyan speciális kémiai módszert dolgozzanak ki az endotoxinok detoxifikálására, melynek során a reagens az endotoxin antigén tulajdonságaiért felelős molekula rész érintetlenül hagyása mellett a molekulának a toxicitásért felelős csoportjával, az u.n. toxofor csoporttal lép reakcióba és az endotoxin toxicitását csökkenti.

Nowotny /38/ korábbi vizsgálatai alapján ismeretes, hogy a zsírsavak sav-amid illetve észter kötésekkel kapcsolódnak az endotoxin molekula polysaccharid részéhez. Az is ismeretes, hogy az észter kötések  $\text{LiAlH}_4$  segítségével selektíve hasítható. Így Noll és Braude /35/ az *Escherichia coli*-ból triklórecetsavas módszerrel kivont endotoxint lithium-aluminium-hydriddel kezelték. A kezelést követő infravörös spektrum felvételek azt bizonyították, hogy míg a peptid kötések nagy része érintetlen maradt és a szénhidrátok acetal és glycosid kötése is ellenálltak a redukáló szernek, addig az észter kötésre jellemző abszorpciós maximum eltűnt. Tehát az endotoxin-komplex zsírsav észter kötése a  $\text{LiAlH}_4$ -del történt redukció során elhasadt. Ugyanakkor a molekula toxicitása és pyrogenitása csaknem teljesen eltűnt, viszont antigén tulajdonságai az eredeti endotoxinéval megegyeztek és alkalmazása védelmet biztosított a homolog



*Escherichia coli* fertőzésekkel szemben. A szerzők véleménye szerint a toxicitás csökkenése a molekuláris konfiguráció megváltozásának következménye, ugyanakkor a struktúra épsége nem elengedhetetlen feltétele az immunogenitásnak.

Haskins és munkatársai /17/ a *Salmonella enteritidis*-ből triklórecetsavval kivont endotoxint kezelték  $\text{LiAlH}_4$ -del. Azt tapasztalták, hogy a hatásos endotoxin mennyiségének kb. 50%-a a reakció megbontásakor keletkező  $\text{Al/OH/}_3$ -dal együtt kicsapódik, és éppúgy mint supernatansban lévő 2% zsírsav tartalmu anyag, megtartotta pyrogenitását, toxicitását és nem-specifikus rezisztencia fokozó képességét. A redukált termék infravörös spektruma ugyanazokat a változásokat mutatta jelen esetben is, amelyeket Noll és Braude megfigyelt. A zsírsav-észterek mennyiségében viszont igen csekély változás volt megfigyelhető. Fenti szerzők ebből azt a következtetést vonták le, hogy a zsírsav-észter tartalom és a toxicitás-csökkenés között nincs összefüggés. Elképzelhető, hogy az *Escherichia coli* endotoxin mellett egy nem toxikus, protektív anyag is található, mely a  $\text{LiAlH}_4$ -del történő reakció során az endotoxintól izolálható.

A  $\text{LiAlH}_4$ -es redukció szelektív voltának igazolására Fukushima és munkatársai /11/ további kísérleteket végeztek, melyeknek eredményeként megállapították, hogy az *E. coli* endotoxint  $\text{LiAlH}_4$ -del kezelve kis mennyiségű foszformentes polysaccharidát nyertek, mely pyrogen és toxikus tulajdonsággal nem rendelkezett. Ellentétben Noll és Braude



eredményeivel a reakció-termék nyulakban nem fokozta az ellenanyag képződést és tolerancia kialakulást nem okozott. Megállapították, hogy az endotoxin nagy része biológiailag nem változott meg a  $\text{LiAlH}_4$ -del történt kezelés hatására és nem találtak összefüggést a zsírsav-észter tartalom, valamint a toxikus és pyrogen tulajdonságok között sem.

Freedman és Sultzter /8/ a detoxifikált endotoxinok előállítására irányuló további kísérletek során acetylalt endotoxint állítottak elő ecetsav-anhydriddel vizmentes natriumacetat jelenlétében. Az acetylezett frakció pyrogenitása és toxicitása csökkent, de endotoxin toleranciát nem volt képes előidézni. A derivatum megőrizte fagocitozist stimuláló képességét, a nem-specifikus rezisztenciát növelte a fertőzésekkel szemben. A detoxifikálás megfordítható, enyhe elszappanosítással az eredeti toxicitás és pyrogenitás visszaállítható.

Kim és Watson /22/ szellemes kísérleteikben redukált kristályos papainnal reagáltatták az endotoxint. A kísérlet eredményeként csökkent az endotoxin pyrogen és toxikus aktivitása. Minthogy az endotoxin makromolekulában észter-, peptid- és amid- kötések egyaránt előfordulnak és a fenti enzim mindhárom kötéstípust képes elhasítani, ezen kísérletekből nem tudták megállapítani, hogy melyik kötésfajta vagy vegyületcsoport felelős az endotoxin aktivitásért.

A Gram negatív bakteriális O-antigének kémiai szerkezete és biológiai tulajdonságai közti kapcsolatot vizsgálatakor felmerült annak a lehetősége, hogy különböző szelektív





kémiai eljárásokkal az endotoxinok egyes biológiai tulajdonságai befolyásolhatók.

Ismeretes az a tény, hogy a  $\text{BF}_3$ -nak igen nagy az affinitása a carbonyl-csoportokhoz, valamint, hogy a kalium-methylat katalitikus koncentrációban bontja a szervesetlen savak észter kötéseit. Minthogy éppen Nowotny korábbi kutatásai bizonyították, hogy az endotoxin molekulában a polysaccharidák között foszfor-diészter kötések is találhatóak, továbbá feltételezték a szénhidrátok hydroxyl-csoportja és a karboxylsavak közti észter-kötések, valamint a hexoseaminok és a hosszuláncu zsírsavak közti sav-amid típusú kötések létezését is, Nowotny /39,40/ három, általa speciálisan hatásosnak vélt módszert alkalmazott az endotoxinok detoxifikálására:

1./ Kezelés methanolos bórtrifluoriddal csaknem tökéletesen vizoldékony anyagot, elnevezése szerint "endotoxoidot" eredményez, melynek toxicitása a kiinduló endotoxin toxicitásának tized része. A reakció során átészterezés játszódik le a  $\text{BF}_3$  hatására. Az oldékonyság növekedése a polysaccharida rész részleges roncsolódásával magyarázható.

2./ Kalium-methylatos kezelés hatására az endotoxin dezacylálódik. Az így nyert "endotoxoid" a kezelés után visszamaradó, methanolban oldhatatlan maradék, mely gyakorlatilag nem toxikus.

3./ Pyridin-hangyasav 2 : 1 arányu elegye forró vízfürdő hőmérsékletén feloldja az endotoxint, majd ugyan-



ennek a reagensnek 10%-os vizes oldata igen jól detoxifikál.

A vizsgálatok azt mutatták, hogy mindhárom módszer csökkenti az endotoxin toxicitását, legnagyobb mértékű ez a csökkenés a kalium-methylatos módszernél. A csökkent toxicitás, valamint a Shwartzman reaktivitás, antigenitás, pyrogenitás és vérnyomáscsökkentő hatás között szoros korreláció van. Ugyanakkor nem fedezhető fel párhuzam a serológiai reaktivitás, az adjuválo hatás, a nem-specifikus rezisztencia fokozó hatás, valamint az előbb említett biológiai tulajdonságok között.

A Nowotny által végrehajtott detoxifikálások a következő kémiai változásokat okozták a molekula szerkezetében:

a./ A szénhidrát tartalom csak a  $\text{BF}_3$ -os kezelés után csökkent, a többi esetben nagyrészt változatlan maradt.

b./ A kezelések nem okoztak számottevő változást az aminosav tartalomban.

c./ A hosszú-szénláncú karboxyl-csoport tartalom erősen csökkent a  $\text{BF}_3$ -os és kalium-methylatos kezelés után.

Nowotny ezen kísérletei arra a kérdésre, hogy a detoxifikálás során az endotoxin molekulán belül milyen kötéstípusok hasadtak el, nem adtak világos választ.

Ezért Nowotny és munkatársai /36/ különböző modellvegyületeken tanulmányozták a fent leírt detoxifikáló eljárások hatását a foszfor-monoészter, foszfor-diészter, O-acyl, O-acetyl, N-acetyl és glycosid kötésekre.

Ezen újabb kísérleti eredmények azt mutatták, hogy



csak az észter kötések szakadtak el mindhárom detoxifikálási módszernél. Így lehetségesnek tartják, hogy néhány észter kötés hasítása a toxicitás és más biológiai tulajdonságok csökkenéséhez vezet. Ezt támasztja alá az a tény, hogy a detoxifikálás után az észter kötések száma jelentősen csökkent.

Az ismertetett irodalmi adatokból látható, hogy a kutatók eddigi kísérleteik során egymásnak sokszor ellentmondó eredményeket kaptak. Az is nyilvánvaló, hogy a különböző detoxifikáló eljárások során a kísérleti körülmények is eltérőek voltak és így összehasonlításra csak igen korlátozott mértékben van mód.

Ezért szükségesnek látszott egységes paraméterek mellett a kísérletek megismétlése, a kapott eredmények összevetése az eddigiekkel és egységes vélemény kialakítása.

Munkánk elvégzésében nem egy előre meghatározott hipotézist akartunk kísérleti eredményekkel alátámasztani, hanem kísérleti eredményeink alapján próbáltunk következtéseket levonni az egyes kémiai komponensek és a biológiai tulajdonságok kapcsolatáról.

#### KISÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.

Állatok: Kísérleteinkben 1,80-2,40 kg súlyú vegyes nemű beltenyészetű szürke csincsilla nyulakat, valamint 20-25 g súlyú vegyes nemű beltenyészetű albinó egereket használtunk.



Endotoxinok: Kísérleteinkben két különböző baktérium törzsből előállított endotoxint használtunk.

Tenyésztés: *Escherichia coli* 055 és *Serratia marcescens* baktériumokat tenyésztettünk 1%-os kazein hidrolizátumot / Lactacid, Human/, 0,1% glucoset és 10% élesztő dializátumot tartalmazó 7,2 pH-ju folyékony táptalajon. A tenyésztést 10 literes fermentor edényekben végeztük 24 órán keresztül az *E. coli* 055 esetében 37°C-on, a *S. marcescens* esetében pedig 32°C-on.

Endotoxin izolálás: Az endotoxinok kivonását Boivin és Mesrobeanu /4/ triklórecetsavas módszerével végeztük, a centrifugálással nyert nedves baktérium suspensióból. A triklórecetsavas kivonatot a továbbiakban alkoholos kicsapással tisztítottuk.

Endotoxin ellenes hyperimmun nyulsavó előállítása: A nyulak emelkedő dózisokban 100-1000  $\mu\text{g Al(OH)}_3$ -hoz adszorbeált *E. coli* illetve *S. marcescens* endotoxint kaptak subcutan 5 naponként hat alkalommal. Az utolsó oltás után 10 nappal az állatokat elvéreztettük. A hyperimmun savókat felhasználásig - 20°C-on tároltuk.

Az endotoxin toxicitás-egység megállapítást részben a Shwartzman reaktiv-egység, másrészt pedig az egér lethalitási-egység megállapítása alapján végeztük /lásd később/.



### Detoxifikálás.

Az *E. coli* és a *S. marcescens* endotoxinokat négyféle eljárásnak vetettük alá Noll és Braude /35/, valamint Nowotny /39/ módszerei szerint.

1./ Kezelés bórtrifluoriddal: 100 mg endotoxint 15 ml abszolút metanolban oldottunk, majd a részleges oldódás után hozzáadtunk 0,5 g = 0,35 ml 40%  $\text{BF}_3$  tartalmú bórtrifluorid-ecetsav komplexet. Vízfürdőn melegítettük 1 órára át, miközben a metanol elpárolgásának megakadályozására visszafolyós hűtőt alkalmaztunk. A reakció lezajlása után 60 ml pyrogen mentes bidesztillált vízzel hígítottuk az elegyet, majd 6 napon át bidesztillált vízzel szemben dializáltuk. A dializálás után a detoxifikált endotoxint tartalmazó folyadékot 1 mg/ml koncentrációra állítottuk be vakuum-száritószekrényben történő óvatos bepárlással.

2./ Kezelés natrium-methylattal: 150 mg endotoxint 120 percen át forró vízfürdő hőmérsékletén 40 ml 0,02 mólus natrium-methylattal kevertük. A metanol elpárolgását visszafolyós hűtő alkalmazásával gátoltuk meg. Az oldhatatlan maradékot centrifugálással elválasztottuk a redukálószer-től, kétszer mostuk abszolút metanollal, majd vakuum-száritószekrényben szárítottuk egy éjszakán keresztül.

3./ Kezelés pyridin-hangyasav eleggyel: 100 mg endotoxint 10 ml 2 : 1 arányú koncentrált pyridin-hangyasav eleggyel 15 percen át kevertük forró vízfürdő hőmérsékletén. 90 ml bidesztillált víz hozzáadása után az előbbi eljárást



azonos hőmérsékleten tovább folytattuk még 60 percen át. Ezután a reakcióelegyből négyszeres mennyiségű metanol hozzáadásával kicsaptuk a detoxifikálódott endotoxint. Egy éjtszakán át jégszekrényben tartottuk, hogy a csapadék kiválása tökéletesen végbemenjen, majd centrifugáltuk. A felül-uszó leöntése után a csapadékot metanollal kétszer mostuk, majd vákuum-száritószekrényben szárítottuk.

4./ Kezelés lithium-aluminium-hydriddel: 150 mg endotoxint 30 ml abszolút éterben szuszpendáltunk. Kis részletekben, kb. 15-20 perc alatt hozzáadtunk 75 mg, abszolút éterben szuszpendált lithium-aluminium-hydridet. Öt órán át állandó keverés közben infralámpával melegítettük. Az éter elpárolgását visszafolyós hűtő alkalmazásával csökkentettük. A lithium-aluminium-hydridet nedve éter, majd pyrogen mentes bidesztillált víz óvatos hozzáadásával bontottuk el a reakció lejátszódása után. A két fázis elválasztása után az éteres részt kétszer mostuk bidesztillált vízzel. A vizes fázisokat egyesítve centrifugáltuk. A leülepedett  $Al(OH)_3$  csapadéktól elkülönített vizes oldatot 4 napon keresztül bidesztillált vízzel szemben dializáltuk, majd 1 mg/ml detoxifikált endotoxin koncentrációra állítottuk be vákuum-száritószekrényben történt bepárlással.

#### Kémiai vizsgálatok.

1./ Foszfor meghatározás: A meghatározást Dryer, Tammes és Routh /7/ általunk módosított eljárásával végeztük el.



A meghatározás elve: a foszfor tartalmu endotoxint kénsavval és hidrogénperoxiddal elroncsoljuk, majd a viztisza, szervetlen foszfort tartalmazó oldathoz ammonium-molibdát kénsavas oldatát adjuk, melynek hatására foszformolibdénsav keletkezik. Amidol /2,4-diamino-fenol/ hozzáadására molibdénkék oldat keletkezik, melynek színintenzitása a foszfor tartalommal arányos.

Eljárás: 2 mg endotoxint tartalmazó 2 ml oldatot Kjeldahl lombikba viszünk, 2 ml 2%-os kénsavat adunk hozzá, majd óvatosan melegíteni kezdjük, az anyag elszenesedése után a lombikot kihűlni hagyjuk. Kb. 10 csepp 30%-os hidrogénperoxidot csepegtetünk ozután a lombikba, majd ismét nyílt lángon melegítjük. A roncsolást 2 órán át folytatjuk. Kihűlés után a maradékot desztillált vízzel beosztott kémcsőbe öblítjük át, 6 ml-re kiegészítjük, 2 ml 2,5%-os ammoniummolibdát oldatot, majd 2 ml 0,5%-os amidol oldatot adunk hozzá. A megjelenő kék szín intenzitását vakkal szemben Optica Milano spektrofotométeren 1 cm-es küvettában 610 mμ hullámhosszon olvassuk le. Ismert foszformennyiséget tartalmazó oldat segítségével kalibrációs görbét veszünk fel, melynek segítségével a meghatározandó anyag foszformennyisége megállapítható. A foszformennyiséget az endotoxin szárazanyag tartalmára vonatkoztatott százalékban adjuk meg.

2./ Zsirsav meghatározás: A meghatározást Snyder és Stephens /50/ módszerének Tauber /52/, valamint Haskins /15/ által módosított változata szerint végeztük.



A meghatározás elve: Az észter és amid kötésben lévő hosszú szénláncu karbonsavak lugos hydroxylaminnal végzett kezelés hatására hydroxamsavvá  $/R-CO-NH-OH/$  alakulnak, amely ferri ionokkal vörös színű belső komplex söt képez. Ennek színintenzitása az észter- és amid- kötésben lévő zsírsavak koncentrációjával arányos.

Eljárás: Száritószekrényben beszáritott 5-10 mg endotoxinhoz lefedhető kémcsőben hozzáadunk 2 ml frissen készült alkális hydroxylamin reagenst. Öt órán át  $67^{\circ}C$ -os vízfürdön tartjuk. Szobahőmérsékletre való lehűtés után 5 ml ferri-perklorátot adunk hozzá, majd a megjelenő piros színt 30 perc múlva 520 nm hullámhosszon leolvassuk Optica Milano spektrofotométeren 1 cm-es küvettában vakkal szemben. A kalibrációs görbét tristearin standarddal vesszük fel 1-5  $\mu$ egu. értékek között és erről a görbéről olvassuk le a vizsgált anyag extinkciójának ismeretében a zsírsav tartalmat, melyet  $\mu$ egu./mg-ban adunk meg.

#### Biológiai és immunológiai módszerek.

1./ Toxicitás: Az eredeti és a detoxifikált endotoxinok 5  $\mu$ g/g mennyiségét intraperitoniális injekció formájában adtuk be az egereknek. Az endotoxinok toxicitását a 72 óra alatt okozott lethális százalékaiban fejeztük ki.

2./ Shwartzman reaktivitás: Nyulak szőrtelenített oldal bőrébe intracután preparáló oltásként a detoxifikált endotoxinok 40  $\mu$ g-nyi mennyiségét, valamint az eredeti endotoxin 2,5-5-10-20  $\mu$ g-nyi mennyiségét injiciáltuk. Kiváltó



oltás gyanánt 10 µg/kg eredeti endotoxint adtunk intravénásan a preparáló oltás után 24 órával.

3./ Precipitációs módszerek: a./ Gyűrűs csőprecipitációt végeztünk 0,1 ml hyperimmun nyulsvér és 0,1 ml kettes léptékű endotoxin antigén hígítás alkalmazásával. b./ Két dimenziós agar-gél diffúziós precipitációs technikát alkalmaztunk Ouchterlony /43/ módszere szerint.

4./ Hemagglutinációs titer meghatározása Neter és munkatársai /34/ módszerével történt. NaOH-dal kezelt eredeti és detoxifikált endotoxinokat adszorbeáltunk mosott nyul vörösvértestekhez. Az endotoxin ellenes nyulsvérkből fizioiogiás konyhasó oldattal kettes léptékű hígítási sort készítettünk és szoba hőmérsékleten történt állás után leolvastuk az eredeti és detoxifikált endotoxinokkal jelölt vörösvértestekkel kapott hemagglutinációs titert.

#### KISÉRLETI EREDMÉNYEK.

A különböző detoxifikálási eljárásokkal nyert endotoxinok mennyisége széles határok között mozog, amint ez az alábbi táblázatból látható:

| A detoxifikálás módja | kitermelés %-ban |               |
|-----------------------|------------------|---------------|
|                       | E. coli          | S. marcescens |
| $LiAlH_4$             | 40               | 29            |
| $BF_3$                | 6                | 30            |
| Natrium-methylat      | 66               | 47            |
| Pyridin-hangyasav     | 24               | 67            |



A reakciótermék mennyiségét a kiindulási anyagmennyiséghez viszonyított százalékban adtuk meg.

A  $\text{LiAlH}_4$ -dal végzett redukció során valószínűleg a detoxifikált endotoxin egy része a reakcióelegy megbontásakor keletkezett kolloidális  $\text{Al}(\text{OH})_3$ -ra adszorbeálódott. Ez indokolja a visszanyert endotoxin viszonylag alacsony mennyiségét. Az *E. coli* és a *S. marcescens* kitermelési százaléka közel azonos.

A  $\text{BF}_3$ -dal végzett kezelés során feltűnően kis mennyiségű redukált coli endotoxint sikerült visszanyerni, csupán az eredeti mennyiség 6%-át. Ezt az eredményt a megismételt kísérletek során sem tudtuk túlszárnyalni.

A natrium-methylattal és pyridin-hangyasav eleggyel végzett kezelés után a visszanyert anyagmennyiség az irodalmi értékekkel közel megegyezett, bár a két endotoxin mennyisége között lényeges eltérést tapasztaltunk.

A redukált endotoxinok oldékonysága igen kis mértékű volt. Bár korábbi tapasztalataink azt mutatták, hogy az eredeti endotoxin oldékonysága is jelentős mértékben csökken még vákuumban történt kimerletes beszáritás után is. Különösen alacsony volt a pyridin-hangyasav eleggyel kezelt endotoxin oldékonysága.

A foszfor tartalom változása.

| A detoxifikálás módja | Foszfor tartalom %-ban |                      |
|-----------------------|------------------------|----------------------|
|                       | <i>E. coli</i>         | <i>S. marcescens</i> |
| Nem detoxifikált      | 0,83                   | 0,40                 |
| $\text{LiAlH}_4$      | 0,07                   | 0,10                 |
| $\text{BF}_3$         | 0,18                   | 0                    |
| Natrium-methylat      | 1,00                   | 0,52                 |
| Pyridin-hangyasav     | 0,47                   | 0,01                 |



A foszfor tartalmat az endotoxin szárazanyagra vonatkoztatott százalékban adjuk meg.

A foszfor tartalom változását vizsgálva megállapíthatjuk, hogy az eredeti endotoxinhoz viszonyítva a natrium-methylatos kezelés során számottevő változás nem történt.

Szembevetendő volt a foszfortartalom csökkenése  $\text{BF}_3$ -dal kezelt endotoxinok esetén. A *S. marcescens* endotoxinban  $\text{BF}_3$ -os kezelés után még foszfor nyomok sem voltak kimutathatók.

Ugyancsak megmérték a foszfor tartalom csökkenése  $\text{LiAlH}_4$ -del történt kezelés után.

A foszfor tartalom változása párhuzamos lefutást mutat mindkét endotoxinnál. Kivételt képez a pyridin-hangyasavas kezelés, midőn a *S. marcescens* endotoxin foszfor tartalma fokozott mértékben csökkent.

#### A zsírsav tartalom változása.

| A detoxifikálás módja | Zsírsav tartalom $\mu\text{equ.}/\text{mg}$ |                      |
|-----------------------|---------------------------------------------|----------------------|
|                       | <i>E. coli</i>                              | <i>S. marcescens</i> |
| Nem detoxifikált      | 0,17                                        | 0,40                 |
| $\text{LiAlH}_4$      | 0,10                                        | 0,29                 |
| $\text{BF}_3$         | 0,32                                        | 0,65                 |
| Natrium-methylat      | 0,12                                        | 0,18                 |
| Pyridin-hangyasav     | -                                           | 0,22                 |

Az észter és amid kötésű zsírsav tartalmat tristearin  $\mu\text{equ.}/\text{mg}$  szárazanyag koncentrációban fejeztük ki.

Az észter és amid kötésben lévő zsírsav tartalom



változásának vizsgálatakor megállapíthatjuk, hogy az eredeti értékhez képest lényeges csökkenés nem tapasztalható.

Szembevetendő, hogy Nowotny /39/ megállapításaival ellentétben mind az *E. coli*, mind a *S. marcescens* endotoxin zsírsavtartalma a kiindulási érték fölé emelkedik  $\text{BF}_3$ -os kezelés után. Ennek a jelenségnek a magyarázatára a megbeszélésben próbálunk választ adni.

Egér toxicitás vizsgálatok.

| A detoxifikálás módja | elhullások száma |                      |
|-----------------------|------------------|----------------------|
|                       | <i>E. coli</i>   | <i>S. marcescens</i> |
| Nem detoxifikált      | 11               | 11                   |
| $\text{LiAlH}_4$      | 9                | 8                    |
| $\text{BF}_3$         | 11               | 14                   |
| Natrium-methylat      | 7                | 4                    |
| Pyridin-hangyasav     | 9                | 10                   |

A vizsgálatokat anyagonként 34 egéren végeztük el. Valamennyi anyagot 5  $\mu\text{g/g}$  mennyiségben injiciáltuk intraperitoniálisan.

A 72 órás elhullások azt mutatták, hogy a legkevesebb elhullás a natrium-methylattal redukált endotoxinnal kezelt csoportban történt. A többi csoportban közel azonos volt az elhullás. Tehát az endotoxin toxicitás lényegesen nem változott a többi detoxifikálási eljárás során.



Shwartzman aktivitás változása.

| A detoxifikálás módja | Shwartzman aktivitás |               |
|-----------------------|----------------------|---------------|
|                       | E. coli              | S. marcescens |
| Nem detoxifikált      | +++                  | +++           |
| $\text{LiAlH}_4$      | ++                   | ++            |
| $\text{BF}_3$         | Ø                    | Ø             |
| Natrium-methylat      | ++                   | ++            |
| Pyridin-hangyasav     | +                    | +             |

A kereszt jelzések a Shwartzman reakció intenzitási fokát jelölik:

+++ = 10 mm Ø /átmérőjű/,

++ = 3-10 mm közötti átmérőjű,

+ = 3 mm alatti átmérőjű, szemmel még jól látható vérzéses reakció.

Az eredeti Shwartzman aktivitás értéke mindkét vizsgált endotoxinnál kis mértékben csökken  $\text{LiAlH}_4$ -es és natrium-methylatos kezelés után. Jelentős mértékben csökkent a Shwartzman aktivitás a pyridin-hangyasavas és teljesen megszűnt a  $\text{BF}_3$ -os kezelés után.

Precipitációs titer változások.

| A detoxifikálás módja | precipitációs titer |               |
|-----------------------|---------------------|---------------|
|                       | E. coli             | S. marcescens |
| Nem detoxifikált      | 1 : 100             | 1 : 100       |
| $\text{LiAlH}_4$      | 1 : 200             | 1 : 100       |
| $\text{BF}_3$         | 1 : 20              | 1 : 10        |
| Natrium-methylat      | 1 : 100             | 1 : 40        |
| Pyridin-hangyasav     | 1 : 40              | 1 : 10        |





A gyűrűs csőprecipitációs titer értékek változásának vizsgálata azt mutatja, hogy a precipitációs titer a  $\text{BF}_3$  és a pyridin-hangyasav eleggyel történt kezelés után csökkent. Ugyanakkor a  $\text{LiAlH}_4$ -es redukció során a precipitációs titer nem változik meg, sőt az *E. coli* endotoxinnál még emelkedik is. Natrium-methylattal történt kezelés után csak a *S. marcescens* endotoxinnál tapasztalható a titer csökkenése.

Passzív hemagglutinációs titer változások.

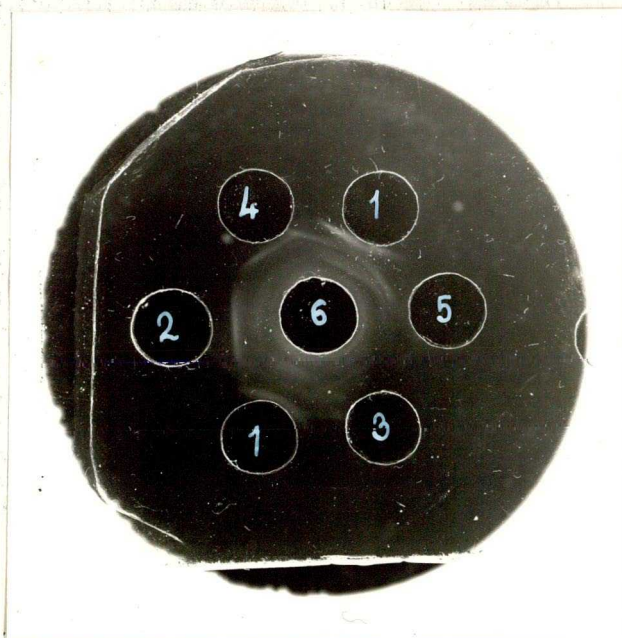
| A detoxifikálás módja | hemagglutinációs titer |                      |
|-----------------------|------------------------|----------------------|
|                       | <i>E. coli</i>         | <i>S. marcescens</i> |
| Nem detoxifikált      | 1 : 640                | 1 : 320              |
| $\text{LiAlH}_4$      | 1 : 320                | 1 : 320              |
| $\text{BF}_3$         | 1 : 80                 | 1 : 160              |
| Natrium-methylat      | 1 : 640                | 1 : 320              |
| Pyridin-hangyasav     | 1 : 40                 | 1 : 160              |

Megállapíthatjuk, hogy a kémiai kezelések a *S. marcescens* endotoxin hemagglutinációs titerében lényeges változást nem okoztak. Kis fokú csökkenés tapasztalható  $\text{BF}_3$ -os és pyridin-hangyasavas kezelés után.

Az *E. coli* endotoxin hemagglutinációs titerében sincs különbség az eredeti és a natrium-methylattal kezelt endotoxin titere között. Viszonylag kis fokú a titer-csökkenés a  $\text{LiAlH}_4$ -del történt kezelés után. A hemagglutinációs titer nagymértékű csökkenését figyeltük meg a  $\text{BF}_3$ -dal és különösen a pyridin-hangyasavval történt kezelés után.



Agar-gél precipitációs eredmények.



1. ábra.

- |                                                          |   |   |   |   |
|----------------------------------------------------------|---|---|---|---|
| 1. Nem detoxifikált endotoxint tartalmazó antigéntartály |   |   |   |   |
| 2. $\text{LiAlH}_4$ -del detoxifikált e.-t               | " | " | " | " |
| 3. $\text{BF}_3$ -dal                                    | " | " | " | " |
| 4. Natrium-methylattal                                   | " | " | " | " |
| 5. Pyridin-hangyasavval                                  | " | " | " | " |
| 6. Ellenanyag-tartály.                                   |   |   |   |   |

Két dimenziós agar-gél diffúziós rendszerben

Ouchterlony szerint /43/ végzett vizsgálataink azt mutatják, hogy a megfelelő immunsavóval szemben futtatott nem detoxifikált E. coli endotoxin három precipitációs ívet képez. /1. ábra/

A legintenzívebb az antigén-tartályhoz legközelebb eső, "külső" precipitációs ív. A "középső" ív a leghalványabb.



Az ellenanyag tartályhoz legközelebb eső "belső" iv intenzitása az előbbi kettő között van.

Valamennyi detoxifikált endotoxin precipitációs iverben változás volt megfigyelhető a nem detoxifikált endotoxin precipitációs iverihez viszonyítva.

A  $\text{LiAlH}_4$ -del detoxifikált endotoxin esetében a "külső" precipitációs iv intenzitása nem csökkent, sőt esetenként kissé emelkedett, azonban kis mértékben a középpont felé tolódott el. A két "belső" precipitációs iv intenzitása kissé csökkent. Esetenként a középső iv nem is látható. A  $\text{BF}_3$ -del detoxifikált endotoxin esetében valamennyi precipitációs iv intenzitása csökkent, esetenként egy-egy iv el is tűnik.

Natrium-methylatos kezelés után a "külső" precipitációs iv intenzitása változatlan, a két "belső" iv intenzitása lényegesen csökken, esetenként el is tűnnek.

Pyridin-hangyasavas kezelés után a "külső" precipitációs iv eltűnik, míg a "belső" iver helyzeté és intenzitása nem változik.

*Serratia marcescens* endotoxinokkal agar-gél diffúziós vizsgálatokat nem végeztünk.



KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.

Serratia marcescens endotoxin.

| Detoxifikálás<br>módja | kitem.<br>% | foszfor<br>% | ssir-<br>sav<br><u>megu.</u><br>mg | Shwartz.<br>aktiv. | egér<br>tox.<br>/elh.<br>sz./ | prec.<br>titer | hemaggl.<br>titer |
|------------------------|-------------|--------------|------------------------------------|--------------------|-------------------------------|----------------|-------------------|
| Nem detoxi-<br>fikált  | -           | 0,4          | 0,40                               | +++                | 11                            | 1:100          | 1:320             |
| LiAlH <sub>4</sub>     | 29          | 0,04         | 0,29                               | ++                 | 8                             | 1:100          | 1:320             |
| BF <sub>3</sub>        | 30          | ø            | 0,65                               | ø                  | 11                            | 1: 10          | 1:160             |
| Natrium-<br>methylat   | 47          | 0,52         | 0,18                               | ++                 | 4                             | 1: 40          | 1:320             |
| Pyridin-<br>hangyasav  | 67          | 0,01         | 0,22                               | +                  | 10                            | 1: 10          | 1:160             |

Escherichia coli endotoxin.

| Detoxifikálás<br>módja | kitem.<br>% | foszfor<br>% | ssir-<br>sav<br><u>megu.</u><br>mg | Shwartz.<br>aktiv. | egér<br>tox.<br>/elh.<br>sz./ | prec.<br>titer | hemaggl.<br>titer |
|------------------------|-------------|--------------|------------------------------------|--------------------|-------------------------------|----------------|-------------------|
| Nem detoxi-<br>fikált  | -           | 0,83         | 0,17                               | +++                | 11                            | 1:100          | 1:640             |
| LiAlH <sub>4</sub>     | 40          | 0,07         | 0,10                               | ++                 | 9                             | 1:200          | 1:320             |
| BF <sub>3</sub>        | 6           | 0,18         | 0,32                               | ø                  | 14                            | 1: 20          | 1: 80             |
| Natrium-<br>methylat   | 66          | 1,0          | 0,12                               | ++                 | 7                             | 1:100          | 1:640             |
| Pyridin-<br>hangyasav  | 24          | 0,47         | -                                  | +                  | 9                             | 1: 40          | 1: 40             |



### MEGBESZÉLÉS.

Elvégzett kísérleteinkben az az elsődleges cél vezetett bennünket, hogy az irodalomban leírt számos, kémiai úton végzett detoxifikálási eljárást, melyek igen eltérő kísérleti körülmények között készültek és eredményeikben is jelentősen különböztek egymástól, azonos kísérleti körülmények között megismételjük és eredményeinket összehasonlítva az eddig ismert adatokkal következtetéseket vonjunk le az egyes módszerek hatásosságára vonatkozóan.

A detoxifikált endotoxinok biológiai hatásainak vizsgálata közben néhány érdekes megfigyelést tettünk a kémiai és antigén szerkezet, valamint a biológiai hatás közötti összefüggésekre vonatkozóan.

Kísérleteinkben elsődleges követelmény volt az azonos paraméterek betartása. Ezt igen fontosnak tartottuk és ezért a különböző endotoxinok előállítása, detoxifikálása, az egyes kémiai meghatározások immunológiai, szerológiai és biológiai vizsgálatok elvégzése teljesen azonos körülmények között és egy időben történt.

A detoxifikálásokat az irodalomban közölt eljárásokkal elvileg teljesen azonos módon végeztük. Kisebb változtatásokat ugyan az irodalomban leírt eljárásokhoz képest eszközöltünk /kalium-methylat helyett natrium-methylatot, metanolos  $\text{BF}_3$  helyett  $\text{BF}_3$ -ecetsav komplexet használtunk/. Ezek azonban az eredményeket nem befolyásolhatták.

A kísérletekben használt állattörzsek ugyan nem



mindig egyeztek meg az irodalomban közöltekkel, de mindig egységes állattörzsekkel dolgoztunk. A különböző módokon detoxifikált endotoxinokkal folytatott állatkísérleteinket azonos időpontban végeztük. Így a hatásokban kifejezésre jutó esetleges szezonális változások nem érvényesülhettek.

A szezonális változások hatását különböző időpontokban /tavasszal és ősszel/ megismételt kísérleteinkben mi is észleltük. Azonban ezek csak az abszolút értékekben okoztak változást, a különböző kísérletekben az arány állandó maradt.

A különböző detoxifikálási eljárásokkal nyert anyagok toxicitását vizsgálva megállapíthatjuk, hogy detoxifikálásuk mértéke csak igen limitált volt. Egyedül a natrium-methylattal kezelt endotoxin toxicitása mutatott csökkenést az eredeti endotoxin toxicitási értékéhez viszonyítva. A többi kémiai kezelés után nyert u.n. "detoxifikált" endotoxin megtartotta eredeti toxicitásának jelentős részét.

Kísérleteinkkel nem tudtuk igazolni az irodalomban közölt, hatásosnak ítélt detoxifikálási eljárások eredményeit.

Azokban a kísérletekben, melyekben az endotoxin toxicitását  $\text{LiAlH}_4$ -del próbáltuk redukálni, a kezelt endotoxin toxicitása csak jelentéktelen mértékben csökkent. Ugyanezen kísérletekben a zsírsav tartalom is csak jelentéktelen mértékű csökkenést mutatott. Nem tudjuk alátámasztani Noll és Braude /35/ azon megállapításait, hogy a  $\text{LiAlH}_4$ -des kezelés után nem toxikus, antigén tulajdonságú endotoxint nyertek. Fukushi és munkatársai /11/ azon megállapításait,



hogy az E. coli endotoxin  $\text{LiAlH}_4$ -del kezelve foszformentes, pyrogen és toxikus tulajdonsággal nem rendelkező polysaccharidát nyertek, kísérleteinkkel nem tudjuk igazolni.

Kísérleti eredményeinkből valószínűnek látszik, hogy a  $\text{LiAlH}_4$ -del végzett kezelés a molekula szerkezetére hatást nem gyakorol és az eredeti endotoxint nyertük vissza a detoxifikálási eljárás után. Ezt bizonyítja, hogy a precipitációs és a passzív hemagglutinációs titer nem változik, a Schwartzman aktivitás csak kis mértékben csökken. Az agar-gél diffúziós rendszerben kapott precipitációs ívek elrendeződéséből arra következtetünk, hogy az antigén szerkezetben lényeges változás nem történt. Az endotoxin molekula szerkezetére a legkifejezettebb hatást a  $\text{BF}_3$ -os kezelés fejtí ki. A precipitációs titer és a passzív hemagglutinációs titer nagyfokú csökkenése, a Schwartzman aktivitás teljes hiánya azt bizonyítja, hogy a molekula antigén szerkezetében lényeges változás történt. Az agar-gél diffúziós módszerrel kapott precipitációs ívek elrendeződésének megváltozása illetve eltűnése szintén arra utal, hogy az endotoxin molekulában alapvető szerkezeti változások történtek. Kémiaileg a foszfor érték jelentős csökkenése illetve teljes hiánya az eredeti endotoxinban lévő foszfor-észter kötések elszakadására és megszűnésére enged következtetni. Ha ehhez hozzávesszük azt a tényt, hogy az eredeti és a  $\text{BF}_3$ -dal kezelt endotoxin egér toxicitása nem változott, valószínűnek látszik, hogy a kezelés során a molekulát olyan erőteljes be-





hatások érték, melyek az antigén tulajdonságokat szinte teljesen megszüntették és a molekulát feltehetően kisebb egységekre bontották le, amelyek azonban toxikus tulajdonságúak.

Másik feltevésünk a fenti esetben az, hogy az endotoxin molekula lebontásakor csak az antigén tulajdonságokért felelős szerkezeti részek szenvedtek változást, míg a toxikus tulajdonság hordozói, az u.n. toxofor csoportok változatlanok maradtak, sőt hatásuk egyes esetekben még kifejezettebb lett. Ez a nagy toxicitású anyag a dializálás során a dializáló hárttyában visszamarad. Ebből a molekula töredék viszonylag magas molekulasúlyára következtetünk.

A toxikus tulajdonságok csökkenése legkifejezettebb a natrium-methylatos kezelés után. Ugyanekkor csak kis mértékben csökkent a precipitációs titer és a Shwartzman aktivitás, míg a passzív hemagglutinációs titer csökkenését nem tapasztaltuk. Mindez azt látszik bizonyítani, hogy a natrium-methylatos kezelés a molekula antigén tulajdonságaiért felelős részét befolyásolta legkevésbé, viszont a toxofor csoportokra kifejezett hatással volt. Kémiaailag a molekula foszfor tartalma nem változott lényegesen, a zsírsav tartalom kis mértékben csökkent.

A  $\text{BF}_3$ -os és natrium-methylatos kezelés eredményeinek felületesebb vizsgálataiból azt a következtetést vonhatnánk le, hogy párhuzam állítható fel a foszfor tartalom, valamint az antigén karakter és a toxicitás között, hiszen a  $\text{BF}_3$ -os kezelés során az antigenitás csökkenésével együtt jár a fosz-



for tartalom csökkenése illetve hiánya és ugyanakkor a molekula toxicitása nem változott.

A natrium-methylatos kezelés után viszont a foszfor tartalom és az antigén tulajdonságok maradtak változatlanul, míg a toxicitás jelentősen csökkent. Ezen feltevést viszont nem támasztja alá a  $\text{LiAlH}_4$ -del és a pyridin-hangyasav eleggyel végzett kísérlet, ahol a párhuzam a toxicitás és a foszfor tartalom között nem áll fenn.

Az észter és amid kötésben lévő zsírsav tartalom és a toxicitás között párhuzam nem vonható. A natrium-methylatos kezelés után a toxicitás csökkenésével a zsírsav tartalom is csökken, ez azonban csak igen kis mértékű.

Szembevetendő a zsírsav tartalom emelkedése  $\text{BF}_3$ -os kezelés után. Ezt a jelenséget azzal tudjuk magyarázni, hogy a kezelés során a molekula annyira dekomponálódott, hogy talán már nem is tekinthető endotoxinnak, amit az antigén tulajdonságok nagyfokú csökkenése is alátámaszt. Ugyanakkor a visszamaradt toxikus rész az egyéb komponensektől mintegy "megtisztulva", koncentrálnálódott és így magasabb zsírsav tartalommal rendelkezik.

Munkánk megkezdésekor néhány kémiai detoxifikálási eljárás összehasonlító vizsgálatát kívántuk elvégezni. Kísérleti munkánk során azonban érdekes megfigyeléseket tettünk a kémiai szerkezet, az antigén tulajdonságok, valamint a biológiai hatások kapcsolata között. Ezeket az összefüggéseket az alábbiakban ismertetjük:

A legszembetűnőbb kapcsolat a Shwartzman aktivitás



és az agar-gél diffúziós eljárás precipitációs íveinek elrendeződése között mutatkozik. Az 1. ábrán jól látható, hogy az eredeti *E. coli* endotoxin a megfelelő immunsavóval szembe futtatva három jól definiálható precipitációs ívet ad. A precipitációs ívek ezen elrendeződése egyik detoxifikált endotoxinnál sem figyelhető meg, tehát valószínűleg a detoxifikálási eljárások során a molekula szerkezet bizonyos módosulást szenvedett.

A legnagyobb eltérés a  $\text{BF}_3$ -os detoxifikálás után tapasztalható. Szinte teljesen megváltozik a precipitációs ívek eredeti helyzete és intenzitásuk nagymértékben csökkent, illetve el is tűnt. Ugyanakkor a Schwartzman jelenség  $\text{BF}_3$ -os kezelés után nem volt kiváltható. A precipitációs és a passzív hemagglutinációs titer jelentős mértékben csökkent az eredeti toxicitás megtartása mellett. Mindez azt, a fentiekben is említett következtetést erősíti meg, hogy a molekula egy része a kezelés során annyira dekomponálódott, hogy már nem tekinthető endotoxinnak.

A Schwartzman aktivitás kifejezett csökkenését tapasztaltuk a piridin-hangyasavval végzett kezelés után is. Ezzel együtt az endotoxin antigén tulajdonságaira jellemző precipitációs és passzív hemagglutinációs titer csökkenését is megfigyelhettük. A piridin-hangyasavval kezelt endotoxin agar-gél diffúziós precipitációs képe azt mutatja, hogy míg a "belső" és "középső" precipitációs ívek helyzete és intenzitása nem változik, addig a "külső" precipitációs ív eltűnt.



Az eredeti endotoxin toxicitása legnagyobb mértékben a natrium-methylatos kezelés után csökkent. Ugyanekkor a precipitációs titer, a passzív hemagglutinációs titer, valamint a Shwartzman aktivitás csak kismértékben változott. Ha szemügyre vesszük az Ouchterlony technikával készített precipitációs ívek elhelyezkedését az agar-gél lemezen, láthatjuk, hogy míg a "külső" ív intenzitása változatlan, addig a két "belső" ív erőssége lényegesen csökken, sőt esetenként el is tűnik.

Ezekből az összehasonlító vizsgálatokból azt a következtetést vontuk le, hogy a "külső" precipitációs ív, valamint a Shwartzman aktivitás és az endotoxin antigén tulajdonsága között kapcsolat van.

Az eredeti endotoxinnál és azoknál a detoxifikált endotoxinoknál  $\text{LiAlH}_4$ -del és natrium-methylattal kezelt/, melyek jelentős Shwartzman aktivitással rendelkeznek, valamint precipitációs és passzív hemagglutinációs titerük is magas, az agar-gél lemezen erős "külső" precipitációs ív található. Ahol viszont ez a "külső" ív hiányzik, vagy csökkent intenzitása  $\text{BF}_3$ -dal és pyridin-hangyasavval kezelt endotoxinok/ a Shwartzman aktivitás, valamint az antigén tulajdonságok is csökkennek, vagy teljesen hiányoznak.

A "belső" precipitációs ívek eltűnése illetve intenzitásuk csökkenése a toxicitás csökkenésével állítható párhuzamba.

Ezen kísérleti eredmények alapos vizsgálata után talán nem tűnik merésznek az az állításunk, hogy az endo-



toxin egér lethalitást okozó tulajdonságaiért a molekula azon részei tehetők felelőssé, melyek az agar-gél diffúziós vizsgálatok során az antigén-tartálytól távolabbi, "középső" és "belső" precipitációs ív kialakításában is szerepet játszanak, míg az endotoxin antigén tulajdonságáért és Shwartzman aktivitásáért a molekula azon részei felelősek, melyek a "külső" precipitációs ív kialakulásában játszanak szerepet.

### ÖSSZEFOGLALÁS.

Kísérleteink megkezdésekor azt a célt tűztük magunk elé, hogy a kémiai detoxifikálásokkal foglalkozó különböző eljárásokat egységes körülmények alkalmazásával megismételve eredményeinket az irodalomban leírtakkal összehasonlítsuk és egységes véleményt alakítsunk ki az eddig alkalmazott detoxifikálási eljárások hatásosságát illetően.

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy az irodalomból ismert négy detoxifikálási eljárás eredményét csak kis részben tudjuk alátámasztani.

Megállapítottuk, hogy a  $\text{LiAlH}_4$ -del végzett kezelés az endotoxin biológiai hatásait, antigén tulajdonságait és a vizsgált kémiai komponensek arányát számottevően nem változtatta meg. A detoxifikálás után feltehetően az eredeti endotoxint nyertük vissza.

A  $\text{BF}_3$ -os detoxifikálás során az antigén tulajdonságok és a Shwartzman aktivitás szinte teljesen megszűntek.



A kezelés során a molekula valószínűleg kisebb egységekre hasadt, melyek azonban erősen toxikus tulajdonságúak.

A pyridin-hangyasav eleggyel végzett kezelés csaknem hasonló eredménnyel járt.

Az endotoxin egér toxicitása legnagyobb mértékben a natrium-methylatos kezelés után csökkent, ugyanakkor a Shwartzman aktivitás és az antigén tulajdonságok alig változtak.

A kapott eredmények ismeretében néhány megfigyelést tettünk az endotoxinok kémiai szerkezete, antigén tulajdonsága és a biológiai hatás összefüggésére vonatkozóan.

Megállapítottuk, hogy a foszfor és zsírsav tartalom, valamint az antigén tulajdonságok és biológiai hatások között az elvégzett kísérletek alapján párhuzam nem vonható. Ugyanekkor elvégzett kísérleteinkből azt a következtetést vontuk le, hogy összefüggés állapítható meg az endotoxin antigén tulajdonságai, valamint biológiai hatásai között. Erre az agar-gél diffúziós eljárással vizsgált precipitációs ívek elhelyezkedésének és intenzitásának változásai, valamint a passzív hemagglutinációs és precipitációs titerek illetőleg a Shwartzman aktivitás változásának alapján következtettünk.



IRODALOM.

1. BENDICH, A., and E. CHARGAFF: The isolation and characterization of two antigenic fractions of *Proteus* OX-19. *J. Biol. Chem.* 166: 283-312. /1933/
2. BOIVIN, A., I. MESROBEANU and L. MESROBEANU: Extraction d'un complexe toxique et antigénique a partir du Bacille d'Aertrycke. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 114: 307-310. /1933./
3. BOIVIN, A., J. MESROBEANU, and L. MESROBEANU: Technique pour la préparation des polysaccharides microbiens spécifiques. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 113: 490-492. /1933/
4. BOIVIN, A. and L. MESROBEANU: Recherches sur les antigenes somatiques du bacille typhique. Sur la nature chimique des antigenes "O" et "Vi", *Compt. rend. Soc. Biol.* 128: 5-8. /1938./
5. CLOSSE, A., Doctoral thesis. Univ. of Freiburg. Germany. /1960./
6. COHN, P. and J.A.V. BUTLER: Fractionation of proteins of the microsomes of rat liver by means of a non-ionic detergent. *Biochem. J.* 70: 254-260. /1958/
7. DRYER, R.L., A.R. TAMMAES and J.I. ROUTH: Phosphor determination with N-phenyl-p-phenylenediamin. *J. of Biol. Chem.* 225: 177. /1957/.
8. FREEDMAN, H.H. and B.M. SULTZER: Dissociation of the biological properties of bacterial endotoxin by chemical modification of the molecule. *J. of Exp. Med.* 116: 929-942. /1962/.
9. FREEDMAN, H.H., B.M. SULTZER and W. KLEINBERG: Detoxification of bacterial endotoxin with retention of ability to stimulate non-specific resistance to infection. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 107: 819. /1961/.
10. FREEMAN, G.G.: The components of the antigenic complex of *Salmonella typhimurium*. *Biochem. J.* 37: 601-612. /1943/.
11. FUKUSHI, K., R.L. ANKER, W.T. HASKINS, M. LANDY, K.C. MILNER, and E. RIBI: Reaction of *Escherichia coli* Endotoxin with Lithium aluminium hydride: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 115: 133-139 /1964/.
12. FULLER, A. T.: The formamide method for the extraction of polysaccharides from haemolytic *Streptococi*. *Brit. J. Exptl. Pathol.* 19: 130-139. /1938/.



13. GOEBEL, W. F., and G.T. BARRY: Colicine K. II. The preparing antigenic substances from the typhoid bacillus. *Science* 92: 155-156. /1940/.
14. GOEBEL, W. F., F. BINKLEY and E. PERLMAN: Studies on the Flexner group of dysentery bacilli. I. The specific antigens of *Shigella paradysenteriae*. *J. Exptl. Med.* 81: 315-330. /1945/.
15. HASKINS, W. T.: Spectrophotometrical determination of fatty-acid amids in lipids. *Anal. Chem.* 33: 1445. /1961/.
16. HASKINS, W.T., M. LANDY, K.C. MILNER, and E. RIBI: Biological properties of parent endotoxins and lipid fractions, with a kinetic study of acid-hydrolyzed endotoxin. *J.Exptl. Med.* 114: 665-684. /1961/.
17. HASKINS, W.T., E. RIBI, M. LANDY, R. L. ANACKER and K.C. MILNER: Preparation and properties of an aluminium citrate-endotoxin complex from *Salmonella enteritidis*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*: 112: 113-119. /1963/.
18. KASAI, N., and A. YAMANO: Studies on the lipids of endotoxins. Thin layer chromatography of lipid fractions. *Jap. J. of Exp. Med.* 34: 329-344. /1964/.
19. KAUFFMANN, F.O.H. BRAUN, O. LÜDERITZ, H. STIERLIN and O. WESTPHAL: Zur Immunchemie der O-Antigene von *Enterobacteriaceae*. IV. Analyse der Zuckerbausteine von *Escherichia*-O-Antigenen. *Zentr. Bakteriол. Parasitenk. Abt. I. Orig.* 180: 180. /1960/a/.
20. KAUFFMANN, F., O. LÜDERITZ, H. STIERLIN and O. WESTPHAL: Zur Immunchemie der O-Antigene von *Enterobacteriaceae*. I. Analyse der Zuckerbausteine von *Salmonella*-O-Antigenen. *Zentr. Bakteriол. Parasitenk. Abt. I. Orig.* 178: 442-458. /1960/b./
21. KAY, E.R.M.N.S. SIMMONS, and A. L. DOUNCE: An improved preparation of Na desoxy-ribonucleate. *J. Am. Chem. Soc.* 74: 1724-1726. /1952/.
22. KIM, Y. B. and D. W. WATSON: Inactivation of Gram-negative bacterial endotoxins by papain. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115: 140-142. /1964/.
23. KOVÁTS T. Gy.: A bakteriális endotoxinok farmakológiai, kóreléttani és allergológiai vonatkozásaival kapcsolatos vizsgálatok. Kandidátusi disszertáció. Szeged, /1963/.



24. KOVÁTS, T. G.: Local endotoxin hypersensitivity and its relation to the Schwartzman phenomenon. *Nature* 190: 177-178. /1961/.
25. KOVÁTS, T.G., LAZÁR, G. and VEGH, P.: The phenomenon of endotoxin hypersensitivity and its relation to the Schwartzman phenomenon *Acta Phys. Hung.* 23: 169-187 1962/.
26. LÜDERITZ, O., F. KAUFFMANN, H. STERLIN and O. WESTPHAL: Zur Immunchemie der O-Antigene von Enterobacteriaceae. II. Vergleich der Zuckerbausteine von Salmonella S-, R- und T- Formen. *Zentr.Bacteriol. Parasitenk. Abt. I. Orig.* 179: 180-186. /1960/a/.
27. MERIER, A., A. PERHAULT, R. TRAPANI, J. M. LANDY, and M.J. SHEAR: Absence of endotoxic activity derived without bacterial contamination from mammalian tissue. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. /New York/* 105: 443-445. /1960/.
28. MIHICH, E. O. WESTPHAL, O. LÜDERITZ, and E. NETER: The tumor necrotizing effect of lipoid A component of Escherichia coli endotoxin. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 107: 816-819. /1961/.
29. MILES, A.A., and N.W. PIRIE: The properties of antigenic preparations from Brucella melitensis. I. Chemical and physical properties of bacterial fractions. *Brit. J. Exptl. Pathol.* 20: 83-98. /1939/.
30. MILES, A.A., and N.W. PIRIE. The properties of antigenic preparations from Brucella melitensis. III. The Biological properties of the antigen and the products of gentle hydrolysis. *Brit. J. Exptl. Pathol.* 20: 278-296. /1939/.
31. MORGAN, W.T.J. Studies in immunochemistry, II. The isolation and properties of a specific antigenic substance from B.dysenteriae. *Biochem. J.* 31: 2003-2021. /1937/.
32. MORGAN, W. T. J. and S. M. PARRIDGE: Studies in immunochemistry. 4. The fractionation and nature of antigenic material isolated from Bact. dysenteriae /Shiga/. *Biochem. J.* 34: 169-191 /1940/.
33. NETER, E. H. ANZAI, E.A. GORZYNSKI, A. NOWOTNY, and O. WESTPHAL: Effects of lipoid A component of Escherichia coli endotoxin on dermal reactivity of rabbits to epinephrine. *Proc. Soc. Exptl. Biol.Med.* 103: 783-786. /1960/.



34. NETER, E., L.F. BERTRAM, D.A. ZAK, M.R. MURDOCK and C.E. ARBESMAN:.....  
J.Exp. Med. 96:1. / 1952 /.
35. NOLL, H., and A.I. BRAUDE: Preparation and biological properties of a chemically modified Escherichia coli endotoxin of high immunogenic potency and low toxicity. J.Clin. Inv. 40:1935. / 1961 /.
36. NOWOTNY, A. On the chemistry of the lipid components /Lipid/ of endotoxins. Lecture, Conference on biological Effects of Endotoxins in Relation to Immunity, Freiburg, Germany / 1959 /.
37. NOWOTNY, A., Conference on biological effects of endotoxin in relation of immunity. Freiburg, Germany. / 1959 /.
38. NOWOTNY, A. Chemical structure of a phosphomucolipid and its occurrence in some strains of Salmonella. J.Am.Chem.Soc. 83:501-503. / 1961 /.
39. NOWOTNY, A.: Endotoxoid preparations. Nature 197:721-722. / 1963 /.
40. NOWOTNY, A., Chemical detoxification of bacterial endotoxins Bacterial endotoxin Symposium Rutgers Univ. Press. 29-33. / 1964 /. New Brunswick.
41. NOWOTNY, A., E. EICHENBERGER, H. HURNI, O. LÜDERITZ, and O. WESTPHAL. New results in the chemistry and biology of the lipid component in bacterial endotoxins. Proc. Intern. Congr. Biochem., 4 th, Vienna. / 1958 /.
42. NOWOTNY, A.M., S. THOMAS, O., S. DURON, and A., NOWOTNY, Relation of structure to function in Bacterial O Antigen. J. of Bact. 85:418-426. / 1963 /.
43. OUCHTERLONY, Ö.: Antigen - antibody reactions in gels. Acta Path. Microbiol. Scand. 26:507. / 1949 /.
44. PALMER, J.W., and T.D. GERLOUGH. A simple method for preparing antigenic substances from the typhoid bacillus. Science 92:155-156. / 1940 /.



45. RAISTRICK, H., and W.W.C. TOPLEY. Immunizing fractions isolated from *Bact. aertrycke*. Brit. J. Exptl. Pathol. 15:113-130. / 1934 /.
46. RIBI, E., W.T. HASKINS, M. LANDY, and K.C. MILNER. Preparation and host-reactive properties of endotoxin with low content of nitrogen and lipid. J. Exptl. Med. 114:647-663. / 1961 /.
47. RIBI, E., K.C. MILNER, and T.D. FERRINE. Endotoxic and antigenic fractions from the cell wall of *Salmonella enteritidis*. J. Immunol. 82:75-84. / 1959 /.
48. ROBERTS, R.S. The endotoxin of *Bact. coli*. J. Comp. Pathol. Therap. 59:284-304. / 1949 /.
49. SCOTT, J.E. Aliphatic ammonium salts in the assay of acidic polysaccharides from tissue. Methods Biochem. Anal. 6:145-197. / 1959 /.
50. SNYDER, F. and N. STEPHENS: A simplified spectrophotometric determination of ester groups in lipids. Biochem. Biophys. Acta 34:244-245. / 1959 /.
51. SULTZER, B.M.W., and H.H. FREEDMAN: The stimulation of non-specific host resistance to infection by chemically modified endotoxin. J. Exp. Med. 116:943-956. / 1962 /.
52. TAUBER, H.: Fatty-acid ester groups in lipopolysaccharide-endotoxins. Federation Proc. 19:245. / 1960 /.
53. VÉGH, P. and KOVÁTS, T.G.: Az endotoxin tulérvékenység és az endotoxinnal szembeni fogékonyság viszonya. Az immunológiai sectio előadás sorozata. Szombathely. 1963.
54. WALKER, J. A method for the isolation of toxic and immunizing fractions from bacteria of the *Salmonella* group. Biochem. J. 34:325-329. / 1940 /.
55. WESTPHAL, O. Étude immunochimique sur les *Salmonella*. V. Rôle de quelques sucres, et en particulier des 3-6 di-désoxyhexoses dans la spécificité des antigènes O du tableau de Kaufmann-White. Ann. Inst. Pasteur 96:303. / 1960 /.



56. WESTPHAL, O., F. KAUFFMANN, O. LÜDERITZ, and H. STIERLIN. Zur Immunchemie der O-Antigene von Enterobacteriaceae. III. Analyse der Zuckerbausteine kreuzreagierender Salmonella-, Arizona- und Escherichia-O-Antigene. Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. I. Orig. 179:336-342. / 1960 /.
57. WESTPHAL, O., and O. LÜDERITZ. Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gram-negativer Bakterien. Angew. Chem. 66:407-417. / 1954 /.
58. WESTPHAL, O., and O. LÜDERITZ. 3,6-Didesoxy-hexosen Chemie und Biologie. Angew. Chem. 72:881-891. / 1960 /.
59. WESTPHAL, O., and O. LÜDERITZ: Chemie Bakterieller O-Antigene. Path. Microbiol. 24:870-889. / 1961 /.

