

ÜBER DIE ISOLIERUNG EINES IN DEN  
WEISSEN BLUTKÖRPERCHEN (EOSINOPHILEN LEUKOZYTEN)  
NACHGEWIESENEN "NATÜRLICHEN ANTIHISTAMINS"

von

A. KOVÁCS UND É. KOVÁCS-JUHÁSZ

(Techn. Assistent: J. ERDÉSZ)

*Pharmakologisches Institut der Universität Szeged (Ungarn)*

In früheren Versuchen<sup>1, 2, 3, 4</sup> hatten wir bereits in mehreren Testen nachgewiesen, dass die weissen Blutkörperchen, und zwar wahrscheinlich vor allem die eosinophilen Leukozyten, eine stark antihistaminwirksame Substanz enthalten.

Die Ergebnisse dieser Versuche hat VERCAUTEREN<sup>5, 6</sup> durch Ausarbeitung einer geistreichen Methode vollkommen bestätigen können.

Das Ziel unserer weiteren Untersuchungen war die Isolierung des Wirkstoffes. Binnen zweieinhalb Jahren ist es gelungen, durch Aufarbeiten von insgesamt 6000 Liter Rinderblut — in je 50–100 Liter-Portionen — den Wirkstoff in praktisch reinem Zu-stande darzustellen und seine näheren Eigenschaften kennen zu lernen.

*Methode zur Prüfung der Wirksamkeit und Isolierung*

Die Bestimmung der Antihistaminwirkung geschah an Meerschweinchen mit dem schon anderweitig eingehend beschriebenen 0.4%igen Histaminaerosol-Test<sup>3, 7</sup>. Sämtliche Tiere wurden vor Versuchsbeginn titriert und nur diejenigen verwendet, die binnen 30–90 Sekunden einen subletalen Bronchuskrampf bekamen. Als wirksam wurde die Substanz betrachtet, die bewirkte, dass die Tiere 10 Minuten — ohne einen Anfall zu bekommen — das 0.4%ige Histaminaerosol vertrugen. Die Verabreichung des Stoffes geschah immer auf die gleiche Weise. Ein gewisser Teil des ätherischen Extraktes bzw. der chromatographierten Fraktion wurde in Äther gelöst, dem Äther 3–3.5 ml dest. Wasser und 1–2 Tropfen *N*/HCl beigegeben. Nach der Entfernung des Äthers im Vakuum bei 30–35° C wurde der wässrige Rückstand neutralisiert und den Meerschweinchen intraperitoneal injiziert. Der Antihistamineffekt ist etwa 5–8 Stunden lang gut nachweisbar.

Die weissen Blutkörperchen wurden mit der Methode von SZILÁRD<sup>8</sup> aus Rinderblut isoliert bei —15° C Tiefkühlung zertrümmert und in saurem Milieu (pH 5.0–5.5) mit Quarzsand homogenisiert. Dieses Material wurde neutralisiert (pH 6.9–7.0), nach 5–10 Minuten langem Stehen zentrifugiert und der Niederschlag nach Abgießen der überstehenden Flüssigkeit mit 0.04 *N*/HCl homogenisiert und mit 0.04 *N* HCl versetzt, bis pH 2–2.1 erreicht war. (In diesem Zustande ist der Wirkstoff, mit wenig Äthyläther überschichtet, bei —15° C lange Zeit ohne Zersetzung haltbar.) Nach 4–6-stündigem Stehen bei 0° C und Neutralisieren mit *N*/KOH (pH 6.9–7.1) wurde das Material mit dem 3–5-fachen Volumen Äther ausgeschüttelt.

Nun wird der den Wirkstoff enthaltende ätherische Extrakt auf 5–7 ml eingeengt. Wir chromatographieren danach auf einer Säule in Äthyläther suspendierten (12 : 2.5

cm)  $\text{Al}_2\text{O}_3$ 's (nach BROCKMANN). Insgesamt wurden 10-12 Fraktionen von je 30-40 ml aufgefangen.

*Eluierung 1:* 100 ml Petroläther ( $40-55^\circ\text{C}$  70 ml —  $60-80^\circ\text{C}$  30 ml)

*Eluierung 2:* 100 ml Petroläther ( $40-55^\circ\text{C}$  60 ml —  $60-80^\circ\text{C}$  40 ml)

*Eluierung 3:* 100 ml Petroläther ( $40-55^\circ\text{C}$  40 ml —  $60-80^\circ\text{C}$  60 ml)

*Eluierung 4:* 100 ml Petroläther ( $40-55^\circ\text{C}$  50 ml —  $60-80^\circ\text{C}$  50 ml)

In den Fraktionen 4-8 ist der Wirkstoff regelmässig anzutreffen, während die unwirksame, ziemlich grosse Fettmenge sich in der 2. Fraktion befindet und die ebenfalls sehr beträchtliche Cholesterinmenge in der Säule bleibt.

Der chromatographierte Wirkstoff enthält nurmehr minimale Verunreinigungen und 0.1-0.3 mg/kg entfalten einen sicheren Antihistamineffekt.

Er ist gut löslich in absolut. Äthanol, Äther, Chloroform, Petroläther, Tetrachlor-kohlenstoff usw., aber sehr leicht zersetzblich. In Lösungsmitteln, bzw. zur Trockene verdampft, wird er — auch bei  $-15^\circ\text{C}$  aufbewahrt — binnen 24 Stunden unwirksam im Vakuum, mit  $\text{CO}_2$  überschichtet, kann er aber im Tiefkühlschrank ( $-15^\circ\text{C}$ ) wochenlang ohne Zersetzung gelagert werden.

#### *Untersuchungen über die ketosteroide Natur des Stoffes*

Die einmal chromatographierten, wirksamen Fraktionen wurden in 3-5 ml Äthyläther aufgenommen und an einer  $8 \times 1$  cm hohen  $\text{Al}_2\text{O}_3$  Säule noch einmal chromatographiert.

*Eluierung 1:* 40 ml Petroläther ( $31\text{ ml }40-55^\circ\text{C}$  — 9 ml  $60-80^\circ\text{C}$ )

*Eluierung 2:* 25 ml Petroläther ( $10\text{ ml }40-60^\circ\text{C}$  — 15 ml  $60-80^\circ\text{C}$ )

*Eluierung 3:* 40 ml Aethyläther

Insgesamt wurden 8-9 Fraktionen von durchschnittlich je 10-15 ml aufgefangen; der Wirkstoff war in der 2.-5. Fraktion enthalten.

Das so gewonnene reine Material erscheint schon vollkommen farblos und einheitlich, 300  $\gamma$  enthalten nach den papierchromatographischen Untersuchungen weder Aminosäuren, noch Polipeptide in nachweisbarer Menge (5  $\gamma$ ).

Seine Löslichkeit aber, sowie seine Eluierung aus  $\text{Al}_2\text{O}_3$  lassen eine Steroid-Natur vermuten.

#### *Papierchromatographische Untersuchung auf Steroide*

Wegen der Zersetzblichkeit des Stoffes konnte die weit verbreitete Zaffaroni'sche Methode nicht Verwendung finden; am besten geeignet erschien uns das von PECHET<sup>9</sup> beschriebene papierchromatische Verfahren.

0.5-2.0 mg Wirkstoff — in 0.2 ml absolut. Aethanol + 0.2 ml Äther gelöst — wurde auf einen Filterpapierstreifen — Whatman Nr. 1 — von 4 cm Breite aufgetragen. Als Kontrolle liefen kristallines Pregnandion-3,20 und Cortisonacetat auf je 2 cm breiten Filterpapierstreifen. Laufzeit  $2\frac{3}{4}$  Stunden bei  $25-26^\circ\text{C}$  im Dunkeln. Während dieser Zeit war das Lösungsmittel 25-26 cm gewandert, während der Leukozytenwirkstoff mit der Zimmermannschen Reaktion<sup>10</sup> bei 20-24 cm, das Cortison bei 18-21 cm und Pregnandion-3,20 bei 19-23 cm nachweisbar war.

Ausser diesem Wirkstoff enthielt das Papier keine weiteren in Reaktion tretenden Substanzen, was dafür spricht, dass bei diesem Reinheitsgrade nurmehr dieses eine Steroid anwesend ist.

Dass wirklich die mit dem Entwickler nachgewiesene Substanz für die Wirkung

verantwortlich ist, bewiesen wir, indem von dem 4 cm breiten Filtrerpapier einen 1 cm breiten Streifen ausschnitten und entwickelten und aus dem übriggebliebenen 3 cm breiten Gebiet die Substanz mit einem Gemisch aus 20 ml Chloroform + 20 ml Äthyläther eluierten. Die Antihistaminwirksamkeit des Stoffes war mit Sicherheit nachweisbar.

*Untersuchungen zum Beweise dessen, dass der Wirkstoff ein Ketosteroid ist*

1. *U.V.-Absorption*: positiv.

2. *Modifizierte Zimmermann-Reaktion* auf Whatman Filtrerpapier Nr. 1(10): bräunlich purpurne Farbe, die für die 20-Ketosteroide charakteristisch ist (SAVARD). Ziemlich schwach, erst 40-100 g sichern gute Sichtbarkeit.

3. *2-4-Dinitrophenylhydrazin-Reaktion*<sup>11</sup>: gelbe Farbe, die sofort in Erscheinung tritt. Benötigt werden ebenfalls 40-100 g.

*Weitere Versuche zur näheren Erkennung des Wirkstoffes*

1. *Absorptionsspektrum*: — bestimmt im Beckmann-Spektrophotometer — zwischen 210 und 500 m $\mu$ .

(a) in absolut. Äthanol. Konzentration: 5 mg (10 ml). Maximum bei 255 und 335 m $\mu$ .

(b) in konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub><sup>12</sup>. Konz.: 5 mg (10 ml) nach 2-stündigem stehen. Maximum bei 230, 315 und 410 m $\mu$ . Verglichen mit den für die schon bekannten Steroide von R. I. DORFMAN<sup>13</sup> und BERNSTEIN<sup>12</sup> zusammengefassten Angaben stimmten die erhaltenen Maxima mit keinem einzigen der Steroid Absorptionsmaxima überein. Dies schliesst aber die Möglichkeit nicht aus, dass es sich bei dem unsererseits isolierten Material um schon bekanntes Steroid handelt, da es wahrscheinlich noch minimale Verunreinigungen enthält, die seinen tatsächlichen Wert verändern können.

2. Am Papierchromatogramm ist die Reaktion mit basischem AgNO<sub>3</sub> sehr schwach: mit 100-150 g Wirkstoff werden eher graue als dunkelbraune Tupfen erhalten.

3. *Phosphorsäure-Reaktion*<sup>14</sup>: negativ.

4. *Gelbe Fluoreszenz*<sup>15</sup> nach Erhitzen: schwach positiv.

Die angeführten Versuche erscheinen von zwei Gesichtspunkten aus wichtig:

1. Sie beweisen, dass die weissen Blutkörperchen, und zwar wohl vorwiegend die eosinophilen Leukozyten, wahrscheinlich aber auch andere Organe, ein sehr wirksames, natürliches Antihistaminpräparat enthalten. Diese Erkenntnis wird wahrscheinlich eine Modifizierung unserer bisherigen Auffassungen und Kenntnisse über die Rolle der weissen Blutkörperchen (eosinophilen Leukozyten) im Organismus nötig machen.

2. Sollte der unzweifelbare Nachweis gelingen, dass die von uns isolierte Substanz tatsächlich ein Ketosteroid darstellt, so bedeutet dies, dass eine Gruppe der Steroide über eine bisher unbekannte, neue wichtige biologische Wirksamkeit verfügt.

Weitere Untersuchungen zur Aufdeckung der chemischen Eigenschaften unserer Substanz, zum Nachweise etwaiger anderer biologischer Wirkungen, zur Klärung der Rolle der Nebenniere und des Entstehungsmechanismus des Stoffes sind im Gange.

Den Forschungsinstitut der Arzneimittelindustrie (Budapest) sei für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit, Herrn Dr. B. TANOS für seine Hilfe und Ratschläge bei der Chromatographie, sowie Herrn Doz. Dr. J. HÍRES für die Durchführung der spektrophotometrischen Untersuchungen sei auch an dieser Stelle herzlichst gedankt.

## ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde nachgewiesen, dass es sich bei dem in den eosinophylen Leukozyten befindlichen Antihistaminstoff aller Wahrscheinlichkeit nach um ein Ketosteroid handelt.

## SUMMARY

It has been demonstrated that the antihistamine material found in the eosinophytic leucocytes is in all probability a steroid.

## RÉSUMÉ

Les auteurs ont démontré que la substance antihistaminique qui se trouve dans les leucocytes éosinophyles est, selon toute vraisemblance, un cétostéroïde.

## LITERATUR

- <sup>1</sup> A. KOVÁCS, *Experientia*, 6 (1950) 349.
- <sup>2</sup> A. KOVÁCS UND É. JUHÁSZ, *Experientia*, 7 (1951) 273.
- <sup>3</sup> A. KOVÁCS UND É. JUHÁSZ, *Arch. intern. pharmacodynamie*, 88 (1952) 383.
- <sup>4</sup> G. PETRI, J. CZIPOTT, A. KOVÁCS UND M. BENTZIK, *Arch. Intern. Pharmacodynamie*, 91 (1952) 177.
- <sup>5</sup> E. VÉRCAUTEREN UND G. PETERS, *Arch. Intern. Pharmacodynamie*, 89 (1952) 10.
- <sup>6</sup> E. VÉRCAUTEREN, *Enzymologia*, 16 (1953) 1.
- <sup>7</sup> D. GYÜRE UND A. KOVÁCS, *Schweiz. med. Wochschr.*, 79 (1949) 624.
- <sup>8</sup> P. SZILLÁRD, *Pflügers Arch.*, 211 (1926) 597.
- <sup>9</sup> M. M. PECHET, *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 13 (1953) 1542.
- <sup>10</sup> K. SAVARD, *J. Biol. Chem.*, 202 (1953) 457.
- <sup>11</sup> L. R. AXELROD, *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 173.
- <sup>12</sup> S. BERNSTEIN, *J. Org. Chem.*, 18 (1953) 1146.
- <sup>13</sup> R. I. DORFMAN, *Chemical Reviews*, 53 (1953) 47.
- <sup>14</sup> B. NEBER UND A. WETTSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 2278.
- <sup>15</sup> J. E. BUSH, *Biochem. J.*, 50 (1952) 370.

Eingegangen am 18. Januar 1955