
**Zur Existenz des sogenannten „Vierten Stoffes“,
der blutdrucksenkenden Substanz von Lange und Felix**

Von

Heinrich Hellmann und Peter Witt

Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Biochemie und dem Pharmakologischen Institut
der Universität Tübingen

(Der Schriftleitung zugegangen am 3. Juli 1948)

Auf Grund seiner Studien über die Regulation des peripheren Kreislaufs schloß F. Lange¹ 1932 auf das Vorhandensein einer blutdrucksenkenden Substanz, die nach ihrem pharmakologischen Verhalten mit keinem der bis dahin bekannten hypotensiven Stoffe — Histamin, Acetylcholin, Adenylsäure — identisch sein sollte. K. Felix und A. v. Putzer-Reybegg² hatten die Isolierung und Konstitutionsermittlung dieses sog. „vierten Stoffes“ in Angriff genommen. Als Ausgangsmaterial dienten ihnen hauptsächlich wässrige, von Eiweiß und Lipiden befreite Extrakte aus Gekröse. Aus den alkohollöslichen Anteilen dieser Mesenterialextrakte gewannen sie durch Anwendung der Methode zur Basentrennung von Kossel und Kutscher eine wirksame Fraktion, aus der sich ein Guanidinkörper in Form verschiedener Salze kristallisieren ließ. Aus den Analysen dieser Salze errechneten sie für den Stoff die Summenformel $C_4H_{12}N_6$. Da er eine positive Sakagouchi-Reaktion lieferte und bei Behandlung mit Jodwasserstoff eine an Stickstoff gebundene Methylgruppe abspaltete, vermuteten sie in dem wirksamen Stoff ein monomethyliertes Methylene-diguanidin. Bemerkenswert war die Säurestabilität; selbst 18-stdg. Kochen mit 30-proz.

¹ F. Lange, Münchener med. Wschr. **77**, 2095 [1930]; Verh. dtsh. Ges. inn. Med. **44**, 106 [1932]; Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **164**, 417 [1932]; Klin. Wschr. **12**, 173 [1933]; —, W. Ehrlich u. A. E. Cohn. J. exp. Med. **52**, 65 [1930].

² K. Felix, Klin. Wschr. **12**, 176 [1933]; — u. A. v. Putzer-Reybegg, Klin. Wschr. **11**, 1838 [1932]; Münchener med. Wschr. **77**, 2097 [1930]; Verh. dtsh. Ges. inn. Med. **44**, 109 [1932]; Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **164**, 402 [1932].

Schwefelsäure führte zu keinem Wirksamkeitsverlust. Nach vorheriger Desaminierung wurde mit 2,5 bis 7 γ des Kristallisates an der atropinisierten Katze noch eine deutliche Senkung des Blutdruckes erzielt.

Über die endgültige Konstitutionsermittlung des fraglichen Stoffes finden sich im Schrifttum keine weiteren Angaben. Von anderer Seite wurden in der Zwischenzeit neue blutdrucksenkende Stoffe entdeckt, das Kallikrein und die „Substanz P“³. Man kennt bis heute von beiden nicht die Zusammensetzung; da die erste aber weder kochbeständig noch alkohollöslich und die zweite nicht säurestabil ist, können sie mit dem sog. „vierten Stoff“ von Lange und Felix nicht identisch sein. Andererseits sind die Arbeiten von Lange und Felix nicht unwidersprochen geblieben. Gaddum und Schild⁴ konnten in Darmextrakten außer Histamin keinen anderen säurestabilen, an der atropinisierten Katze blutdrucksenkend wirkenden Stoff auffinden. Gaddum⁵ sprach sich dafür aus, daß Felix und v. Putzer-Reybegg Methylguanidinsalze kristallisiert hätten, denen eine kleine Menge Histamin beigemischt war. Histamin soll sich möglicherweise beim Kochen mit starker Säure aus Histidin gebildet haben.

Auf Vorschlag von Hrn. Prof. F. Lange und im Einvernehmen mit Hrn. Prof. Felix haben wir uns seit einiger Zeit mit diesem Problem beschäftigt; wir teilen im folgenden die Ergebnisse unserer Experimente mit.

Zur Natur des von Felix und Putzer-Reybegg dargestellten Kristallisates

Felix und v. Putzer-Reybegg haben selbst darauf hingewiesen, daß die Analysenzahlen ihres Kristallisates auf Methylguanidin stimmen; sie verwarfen jedoch die Möglichkeit einer Identität des Methylguanidin mit ihrem Stoff, da „dessen Pikrat und Goldsalz ganz andere Eigenschaften besitzen, ganz abgesehen davon, daß Methylguanidin den Blutdruck nicht senkt, sondern steigert“⁶. Die Schmelzpunkte der von ihnen kristallisierten Salze sind folgende:

Flavianat 231⁰, Chloraurat 204⁰, Pikrat 197⁰.

Wir haben die entsprechenden Salze des Methylguanidins hergestellt und für sie folgende Schmelzpunkte gefunden:

Methylguanidin-Flavianat 230,5⁰, -Chloraurat 204⁰, -Pikrat 197,5⁰.

³ Vgl. Gaddum u. Dale, Gefäßerweiternde Stoffe der Gewebe, Leipzig 1936, S. 97 u. 102.

⁴ Gaddum u. Schild, J. Physiology **83**, 1 [1934].

⁵ Gaddum u. Dale, Gefäßerweiternde Stoffe der Gewebe, Leipzig 1936, S. 98; vgl. auch Guggenheim, Biogene Amine, Basel 1940, S. 548.

⁶ K. Felix, Klin. Wschr. **12**, 177 [1933].

Die Kristallformen der von uns hergestellten Salze gleichen den von Felix und v. Putzer-Reybegg veröffentlichten Kristallbildern⁷ auffallend. Es liegt daher in der Tat der von Gaddum gezogene Schluß sehr nahe, daß diese Autoren in ihren Kristallisaten nur Salze des Methylguanidins in Händen hatten. Die beschriebene Wirkung muß dann auf Verunreinigung zurückgehen; wir prüften selbst nochmals die Blutdruckwirkung des Methylguanidins an der Katze und können bestätigen, daß der reine Stoff keinerlei senkenden Einfluß hat⁸.

Untersuchung der blutdrucksenkenden Wirkung von Mesenterialextrakt

Es verblieb somit die Aufgabe, erneut nach der Ursache der senkenden Wirkung der Mesenterialextrakte zu forschen. Diese Aufgabe stellte sich praktisch so dar, daß ein alkohollöslicher säurestabiler Stoff gesucht werden mußte, der nach Desaminierung noch eine Wirksamkeit an der atropinisierten Katze besitzt; denn Kallikrein scheidet durch seine Unlöslichkeit in Alkohol aus, Adenylsäure, Adenosin und Substanz *P* durch Verlust ihrer Wirksamkeit beim Kochen mit Säure, Histamin durch Desaminierung, Acetylcholin bzw. Cholin durch Verwendung der atropinisierten Katze als Testtier. Unser Aufarbeitungsgang, der die genannten Tatsachen berücksichtigt, war der folgende:

Von Fett und Fremdgewebe mechanisch befreites Schweinemesenterium wurde im Fleischwolf zerkleinert und mit essigsauerm Wasser vom p_{H} 4,0 20 Min. ausgekocht. Die heiße Brühe wurde filtriert und mit dem Filtrat eine Trichloressigsäurefällung zur Entfernung der Eiweißstoffe durchgeführt. Überschüssige Trichloressigsäure sowie Lipide wurden durch Ätherextraktion beseitigt. Der Rückstand des nunmehr lipid- und eiweißfreien wässrigen Mesenterialextraktes wurde zweimal mit Alkohol ausgezogen. Der Trockenrückstand des alkoholischen Extraktes wurde in Wasser aufgenommen und mit Natriumnitrit und Essigsäure desaminiert. Zur Entfernung überschüssiger salpetriger Säure und zur Zerstörung ev. noch vorhandener Adenylsäure und Adenosin wurde 1 Stde. in 5-proz. schwefelsaurer Lösung auf dem Wasserbad unter vermindertem Druck erhitzt. Nach Neutralisation mit Soda erfolgte Verdampfen des Wassers und Durchführen des Rückstandes mit Alkohol, wobei anorganische Salze ungelöst blieben. Der Trockenrückstand dieser letzten Alkoholextraktion wurde in physiolog. Kochsalzlösung aufgenommen und an der atropinisierten Katze getestet. Zur

⁷ K. Felix u. A. v. Putzer-Reybegg, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. u. Pharmakol. **169**, 214 [1933.]

⁸ Hr. Prof. Felix teilte uns freundlicherweise mit, daß er selbst schon früher zur gleichen Auffassung gelangt sei und darüber 1934 auf der Physiologentagung in Göttingen und 1936 auf einer Tagung in Oeynhausen vorgetragen habe. Leider sind diese Befunde nicht ins Schrifttum übergegangen.

Sicherung wurden weitere Teste am isolierten Froschherzen und am isolierten Meerschweinchendarm durchgeführt. Die Resultate der pharmakologischen Prüfungen, die im Versuchsteil näher beschrieben sind, zeigen, daß in unserem Versuch im Schweine-Mesenterium und -Darm außer Histamin und Cholin kein anderer säurestabiler alkohollöslicher depressorischer Stoff gefunden worden ist.

F. Lange beschrieb als Charakteristikum des „vierten Stoffes“ eine bei der Blutdrucksenkung gleichzeitig auftretende Amplitudenvergrößerung und die Eigenschaft, daß durch größte Dosen bei Senkung des Blutdruckes auf tiefste Grade niemals eine tödliche Wirkung eintrat; durch Atropin wurde die Wirkung seiner gereinigten Präparate nicht beeinflusst⁹. Wir haben bei unseren Aufarbeitungen niemals eine solche Amplitudenvergrößerung beobachtet. Diese Diskrepanz bedarf einer Klärung, um so mehr als R. Christie¹⁰ aus einem Tumor des Glomus caroticum eines Menschen und aus den Glomera von Haifischen und Rochen eine blutdrucksenkende Substanz anreicherte, die sich von Acetylcholin, Histamin, Adenylsäure und Kallikrein unterschied. Die Befunde in bezug auf den Tumor des menschlichen Glomus caroticum wurden kürzlich bestätigt¹¹.

Den HHrn. Prof. A. Butenandt, Prof. F. Haffner und Prof. F. Lange danken wir für ihr förderndes Interesse an der vorliegenden Arbeit.

Beschreibung der Versuche

Der im folgenden gegebene Bericht stellt eine Zusammenfassung aus den Protokollen von insgesamt 27 Aufarbeitungen dar, die wir im Laufe eines Jahres durchführten.

Herstellung der Mesenterialextrakte. 1450 g schlachtfrischen Schweinemesenteriums wurden von Fett und anhaftendem Fremdgewebe befreit und durch einen Fleischwolf getrieben. Das zerkleinerte Gewebe (720 g) wurde nach Verrühren mit 1,5 l Essigwasser vom τ_{II} 4,0 20 Min. gekocht. Der wässrige essigsaurer Extrakt ließ sich in heißem Zustand schnell filtrieren. Sobald er auf 60° C abgekühlt war, wurde die Lösung 10-proz. trichloressigsaurer gemacht zwecks Ausfällung der gelösten Eiweißstoffe. Nach Abfiltrieren der entstandenen Fällung und Eindampfen des Filtrates konnte der verbliebene Rückstand durch dreimalige Extraktion mit Äther von überschüssiger Trichloressigsäure und von Lipiden befreit werden. Der im Rückstand aufgesaugte Äther wurde abgedampft, der lipid- und eiweißfreie Trockenrückstand des wässrigen Mesenterialextraktes zweimal mit Alkohol ausgezogen, der Alkohol verdampft, der Rückstand der alkoholischen Lösung mit Wasser verrührt und die sich bildende Lösung klar filtriert. Äthanol-Wasser-lösliche Fraktion. Sie enthielt in 30 ccm Lösung 1,8 g orangefarbener Trockensubstanz.

Desaminierung und Säurebehandlung. 25 ccm der Alkohol-Wasser-löslichen Fraktion wurden mit 1 g Natriumnitrit und 3 ccm Eisessig versetzt und unter mehrfachem Schütteln 5 Stdn. stehen gelassen. Dann wurde die Lösung

⁹ F. Lange, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **164**, 421 [1932].

¹⁰ R. Christie, Endocrinology 1933, S. 421, 433.

¹¹ L. Leger, J. L. Parrot u. P. Gley, Presse méd. **1947**, 542.

5-proz. schwefelsauer gemacht und unter mehrfacher Zugabe von Wasser 1 Stde. auf dem Wasserbad am Wasserstrahlpumpenvakuum erhitzt. Nach dieser Behandlung war Histamin durch Desaminierung zerstört, Adenylsäure und Adenosin waren gespalten. Histamin wird unter diesen Bedingungen nicht aus Histidin gebildet (Gaddum befürchtete eine solche Histaminbildung bei Felix, der eine Probe seines Extraktes allerdings 18 Stdn. in 30-proz. Schwefelsäure ohne Wirksamkeitsverlust kochte), nitrose Gase sind vertrieben. Wir haben uns von den aufgezählten Tatsachen dadurch überzeugt, daß wir jeweils Proben von Histamin, Adenylsäure, Adenosin und Histidin derselben Behandlung unterzogen. Nach Neutralisation mit Soda verdampften wir die Lösung zur Trockne und nahmen in Alkohol auf, wobei die anorganischen Salze ungelöst blieben (etwas Natriumacetat ging in Lösung; es verursacht jedoch nach unserer Kontrolle an Katze keine Blutdrucksenkung). Nach Vertreiben des Alkohols wurde der Rückstand in physiol. Kochsalz-Lösung aufgenommen: Desaminierte Äthanol-Wasser-lösliche Fraktion. Sie enthielt in 25 cem Lösung 1,6 g gelblicher Trockensubstanz.

Außer Äthanolextraktionen haben wir auch solche mit Butanol an Waschwässern von Rinderdärmen des hiesigen Schlachthofes durchgeführt.

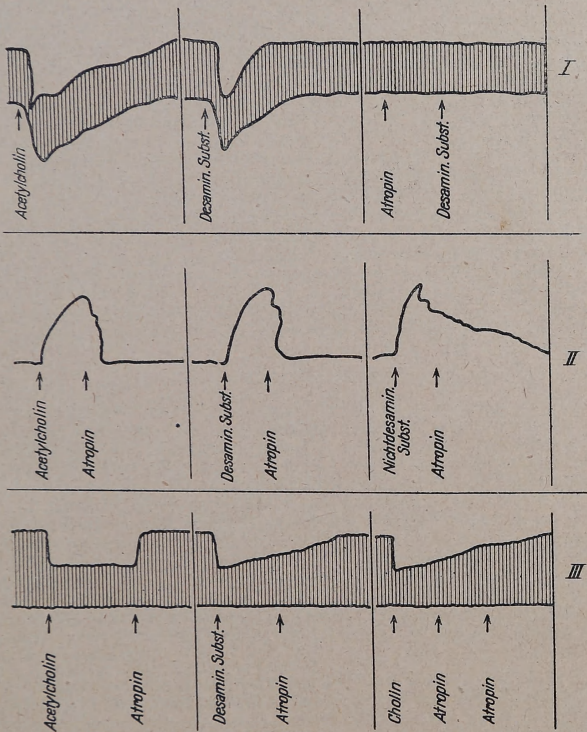
Pharmakologische Tests:

1. Blutige Messung des Blutdruckes an der narkotisierten Katze nach Frank-Petter: Der mit Eunarcon ad us. vet. betäubten Katze wurde eine Kanüle in die Arteria Carotis eingebunden und der Blutdruck durch ein starres Röhrensystem, gefüllt mit physiologischer Kochsalzlösung + Heparin, auf einen Zeiger übertragen. Zur Verhinderung der Blutgerinnung wurden der Katze bei Beginn des Versuches mehrere cem Heparin-NaCl-Lösung i. v. injiziert. Durch eine in die Vena jugularis eingebundene Kanüle wurden die Test-Substanzen i. v. injiziert, und jeweils 1 cem Kochsalz-Lösung zur Reinigung nachgespritzt. Die blutdrucksenkende Wirkung, die die desaminierte Substanz in Konzentrationen von 1:10 mit 0,5 bzw. 1,0 cem deutlich entfaltete, verschwand nach Gabe von 3 mg Atropin; was der Wirkung von Acetylcholin bzw. Cholin entspricht. 10 γ Acetylcholin bzw. 5 mg Cholin zeigten den gleichen Effekt. 10 mg Methylguanidin zeigten eine geringe blutdrucksteigernde Wirkung (Kurve I, s. Seite 206).

2. Untersuchung an der Motorik eines ausgeschnittenen Darmstückes: Ein 3 cm langes Darmstück eines Meerschweinchens wird in körperwarmer Tyrode-Lösung an einer Seite befestigt, an der anderen mit einem Zeiger verbunden. Auch hier zeigte die desaminierte Fraktion einen durch Atropin aufhebaren Effekt. Die Wirkung der nichtdesaminierten Fraktion ließ sich durch Atropin nicht vollständig aufheben und glich der Wirkung von Histamin 1:10 000 000. Methylguanidin zeigte 1:3000 einen geringen tonisierenden Effekt (Kurve II).

3. Prüfung an isolierten Froschherzen nach Straub: Am isolierten mit Ringerlösung gefüllten Froschherzen an der Straubschen Kanüle bewirkte die nichtdesaminierte Fraktion eine Senkung der Hubhöhe, die sich durch Atropin aufheben ließ, was der Acetylcholinwirkung entspricht. Die an den vorgenannten Präparaten außerdem gefundene Histaminwirkung der nicht desaminierten Fraktionen läßt sich am Froschherzen nicht zeigen. Die Wirkung der desaminierten Fraktion 1:30 wurde durch Atropin verzögert rückgängig gemacht, was an unseren Präparaten der Wirkung einer Cholinlösung 1:100 entspricht. Die geringe Wirkung einer Methylguanidinlösung 1:1000 wurde durch Atropin nicht beeinflußt (Kurve III).

Nach diesen Versuchen ist die blutdrucksenkende Wirkung der geprüften Extrakte nicht von den bekannten Wirkungen von Histamin und Acetylcholin unterschieden bzw. ist die abgeschwächte Wirkung nach Desaminierung auf Cholin zurückzuführen.



Ausgewählte Beispiele der Wirkung der desaminierten Substanz im Vergleich mit Acetylcholin, Cholin und nichtdesaminierter Substanz.

I: Blutdruck (Katze), II: Darm (Meerschweinchen), III: Herz (Frosch).