

**175. Anaphylaxieähnliche Reaktionen durch 2'-Oxy-8'-acylamino-naphthalin-1'-azobenzol-2,5-disulfosaures Natrium
(„Tachyphylaxie?“)**

von H. E. Fierz-David, W. Jadassohn und E. Pfanner.

(21. X. 39.)

Damit die Kontraktion eines glatten Muskels *in vitro* als anaphylaktisch angesehen werden darf, müssen in der Regel zwei Bedingungen erfüllt sein:

Als erste Bedingung muss das sog. Neutralisationsphänomen feststellbar sein, d. h. nach wiederholter Gabe der Substanz, die die Kontraktion bewirkt, darf eine Reaktion nicht mehr eintreten, trotzdem, was durch die Gabe einer andern Substanz (z. B. Pituglandol) bewiesen wird, der Muskel an sich noch kontraktionsfähig ist. Die anaphylaktische Kontraktion beruht auf Antikörpern. Das Neutralisationsphänomen beruht darauf, dass durch die vorausgegangenen Anaphylaktogengaben die Antikörper irgendwie verbraucht wurden.

Die Antikörper sind für gewöhnlich bei unvorbehandelten Tieren nicht vorhanden, und sie bilden sich erst durch eine geeignete Vorbehandlung. Daraus ergibt sich die zweite Bedingung, die dazu berechtigt, eine Kontraktion auf eine bestimmte Substanz als anaphylaktisch zu bezeichnen: Die Reaktion darf bei unvorbehandelten Tieren nicht auslösbar sein.

Wir haben kürzlich mit *Kleemann*¹⁾ mitgeteilt, dass es nicht selten gelingt, den Uterus unvorbehandelter Tiere mit Oleyl-N-methyl-aurin zur Kontraktion zu bringen. Es handelt sich hierbei nicht um Kontraktionen, die der Pituglandol- oder Histaminkontraktion ohne weiteres an die Seite gestellt werden dürfen; denn die Oleyl-N-methyl-aurin-Kontraktionen erfüllen die eine der erwähnten Anaphylaxiebedingungen: Sie geben meist in einwandfreier Weise das Neutralisationsphänomen. Auf theoretische Auseinandersetzungen haben wir uns damals nicht eingelassen, sondern nur die Tatsache registriert, dass sich mit Oleyl-N-methyl-aurin am Uterus Kontraktionen auslösen lassen, die die Reaktionsfähigkeit des Uterus auf Oleyl-N-methyl-aurin aufheben, trotzdem nachher mit Pituglandol ebenso intensive Kontraktionen ausgelöst werden können, wie zu Beginn des Versuches.

¹⁾ H. E. Fierz, W. Jadassohn und A. Kleemann, *Helv.* **22**, 3 (1939).

Wir sind heute in der Lage, weiteres Versuchsmaterial über solche anaphylaxieähnliche Kontraktionen beizubringen; trotzdem glauben wir, das sei hier schon vorweggenommen, dass wir noch nicht berechtigt sind, theoretische Schlussfolgerungen aus unseren Beobachtungen zu ziehen.

Wir hatten s. Z. das Oleyl-N-methyl-aurin auf Grund von theoretischen Überlegungen für Anaphylaxieversuche gewählt, und zwar bezogen sich diese, wie wir schon damals betonten, gewagten, theoretischen Überlegungen auf die Molekellänge, die beim Oleyl-N-methyl-aurin etwa der Länge einer Periode in der Eiweissmolekel entspricht.

Fierz und Kuster¹⁾ haben nun eine Serie von Substanzen hergestellt, von denen die Vertreter mit den grössten Molekeln ungefähr dem Oleyl-N-methyl-aurin entsprechen. Es sind dies Farbstoffe vom Typ: 2'-Oxy-8'-acylaminonaphthalin-1'-azobenzol-2,5-disulfosaures Natrium. Ausser diesen Verbindungen aus Fettsäuren mit 19 und 18 C-Atomen haben sie noch alle entsprechenden Verbindungen mit den Fettsäuren mit weniger C-Atomen hergestellt. Wir haben alle, mit Fettsäuren von 19—8 C-Atomen, auf ihre Wirkung auf die glatte Muskulatur (*Schultz-Dale'scher Versuch*) untersucht.

Gibt man im *Schultz-Dale'schen*²⁾ Versuch zu 50 cm³ Bade-
flüssigkeit 3—5 mg der zu untersuchenden Substanz, so ergibt sich bei der Verwendung der Uteri unvorbehandelter Tiere das im folgenden tabellarisch zusammengestellte Resultat. In der Tabelle bedeutet: + eine Kontraktion, die durch eine nachfolgende Gabe der gleichen Substanz nicht wieder ausgelöst werden konnte (d. h. Kontraktionen mit einwandfreiem Neutralisationsphänomen); ± ganz schwache, neutralisierbare Kontraktion; — keine Kontraktion; ⊕ Kontraktion, bei der ein einwandfreies Neutralisationsphänomen nicht nachgewiesen werden konnte. Letzteres konnte entweder deswegen nicht erfolgen, weil jede neue Gabe wieder zu einer Kontraktion führte oder deswegen nicht, weil nach einer Substanzzugabe der Uterus sich nicht mehr entspannte. Da die verschiedenen verwendeten Substanzen sich nur in der Anzahl der C-Atome ihrer Fettsäure unterscheiden, geben wir in der Tabelle nur die Zahl C-Atome der letzteren an, um die verwendete Substanz zu bezeichnen.

In der Tabelle sind nur die Resultate angeführt, in denen das betreffende Uterushorn noch nicht mit einer andern Substanz untersucht war, abgesehen von der Pituglandolgabe, mit der jeder Versuch eingeleitet wird, um zu beweisen, dass das Muskelstück überhaupt reaktionsfähig ist.

¹⁾ H. E. Fierz und W. Kuster, *Helv.* **22**, 82 (1939).

²⁾ Siehe Technik des *Schultz-Dale'schen Versuches*, H. E. Fierz, W. Jadassohn und Zürcher, *Helv.* **20**, 18 (1937).

Tabelle I.

C ₈	— — — —
C ₉	— — — — —
C ₁₀	≡ ≡ — — — —
C ₁₁	— — — — — ≡
C ₁₂	— — — ≡ — —
C ₁₃	+ + + + ≡ + + + + ≡
C ₁₄	+ + + + + + + + + +
C ₁₅	+ + + + + ⊕ + + ⊕
C ₁₆	+ + + + + + + ≡ + + + + + ⊕ + ⊕ ⊕ + + +
C ₁₇	+ + + + + + + + +
C ₁₈	+ + + + + + + + + +
C ₁₈ [⊖]	+ + ⊕ + + ⊕ + ⊕ + + + + + + + +
C ₁₉	+ ⊕ + ⊕

Aus der Tabelle ergibt sich die Tatsache, dass die Verbindungen mit 12 und weniger C-Atomen enthaltenden Fettsäuren nie deutliche Reaktionen hervorrufen, während die Verbindungen der Fettsäuren mit mehr als 12 C-Atomen fast immer starke und meist neutralisierbare, also anaphylaxieähnliche Kontraktionen auslösen. Fig. 1 zeigt eine solche Reaktion.

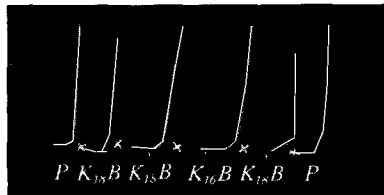


Fig. 1.

Als Bädelflüssigkeit wurde in allen Fällen Tyrodelösung verwendet.

Normaltier:

P = Pituglandol

x = Spülen.

K_{18B} = 5 mg 2'-Oxy-8'-stearylaminonaphthalin-1'-azobenzol-2,5-disulfosaures Natrium.

Wie schon erwähnt, wollen wir uns auf theoretische Überlegungen nicht einlassen. Wir wollen vor allem die Frage offen lassen, ob es sich hier doch um anaphylaktische Reaktionen handelt, dann müsste man die Annahme von „Normalantikörpern“ machen, oder ob die Reaktionen mit Anaphylaxie nichts zu tun haben.

Es hat uns nun interessiert, festzustellen, wie sich der mit der einen Substanz aus unserer Serie behandelte Uterus gegenüber einer

andern Substanz aus der gleichen Serie verhält. Wir geben das Resultat wiederum in Form einer Tabelle.

Tabelle II.

	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	18 ^F	19
8	///					⊗⊗	○	○					
9		///				⊗⊗⊗	○	○					
10			///			●○	○					●⊗⊗	
11				///		●●	○○		○				
12					///	○●	○○					○○	
13					///	⊗	⊗	●	⊗⊗	●	⊗	●●●	○
14						●	///	●	●●	●	⊗	○○	
15						●	●	///	●	●	●		○○
16						●●	○○	●	///	●●	●	○	
17						●	○	⊗	●●	///	●	○	●
18						●	⊗	●	●	●	///	⊗	⊗
18 ^F						●●●	●					///	
19								●		●			///

- Neutralisation: Substanz 2 ergibt keine Reaktion, nachdem Substanz 1 bis zur Neutralisation gegeben wurde.
- Keine Neutralisation: Substanz 2 ergibt Reaktion, nachdem Substanz 1 bis zur Neutralisation gegeben wurde.
- ⊗ Fragliche Neutralisation.

Senkrecht: zuerst } applizierte Substanz.
 Waagrecht: nachher }

Es wurden zuerst die in der Tabelle in der senkrechten Kolonne durch die C-Zahl (s. S. 1457) angegebenen Substanzen appliziert bis zur vollkommenen Neutralisation. Dann wurde die in der horizontalen Kolonne aufgeführte Substanz gegeben. Die durch die Gabe der zweiten Substanz ausgelöste Kontraktion konnte öfters nicht mehr neutralisiert werden, weil der Uterus sich nicht mehr entspannte oder zu unruhig wurde. Das wurde bei der Bewertung des Resultates in der Tabelle nicht berücksichtigt, sondern nur, ob nach vollständiger Neutralisation mit der zuerst gegebenen Substanz, mit der zweiten Substanz noch eine Kontraktion erzielt werden konnte oder nicht.

Aus der Tabelle ergibt sich, dass sehr häufig, aber nicht immer, durch die Vorausgabe einer Substanz aus der im Titel genannten Farbstoffreihe volle Reaktionsunfähigkeit des Uterus auf die nachfolgende Gabe einer andern Substanz aus der gleichen Reihe erzielt wurde.

Gelegentlich, aber nicht häufig, haben auch Substanzen (C_{8-12}) neutralisiert, die selber Reaktionen nicht auslösen. Diese Reaktionen werden durch die folgenden Figuren 2, 3, 4, 5 belegt.

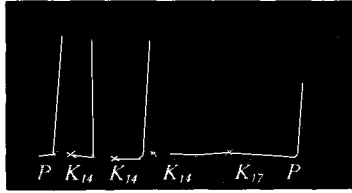


Fig. 2.

C_{14} neutralisiert C_{17} .

Normaltier:

P = Pituglandol.

x = Spülen.

K_{14} = 5 mg 2'-Oxy-8'-myristylaminonaphthalin-1'-azobenzol-2,5-disulfosaures Natrium.

K_{17} = 5 mg 2'-Oxy-8'-heptadecanoylaminonaphthalin-1'-azobenzol-2,5-disulfosaures Natrium.

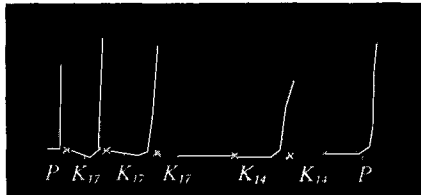


Fig. 3.

C_{17} neutralisiert C_{14} nicht.

Normaltier:

P , x , K_{14} und K_{17} gleiche Bedeutung wie bei Fig. 2.

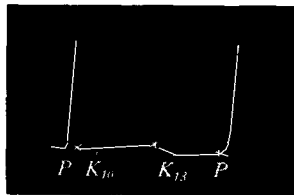


Fig. 4.

C_{10} neutralisiert C_{13} .

Normaltier:

P = Pituglandol.

x = Spülen.

K_{10} = 5 mg 2'-Oxy-8'-decanoylaminonaphthalin-1'-azobenzol-2,5-disulfosaures Natrium.

K_{13} = 5 mg 2'-Oxy-8'-tridecanoylaminonaphthalin-1'-azobenzol-2,5-disulfosaures Natrium.

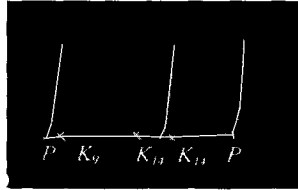


Fig. 5.

C_9 neutralisiert C_{14} nicht.

Normaltier:

P = Pituglandol.

x = Spülen.

K_9 = 5 mg 2'-Oxy-8'-pelargonylaminonaphthalin-1'-azobenzol-2,5-disulfosaures Natrium.

K_{14} = 5 mg 2'-Oxy-8'-myristylaminonaphthalin-1'-azobenzol-2,5-disulfosaures Natrium.

Bei der Suche nach analogen anaphylaxie-ähnlichen Reaktionen, wie sie hier beschrieben wurden, half uns eine persönliche Mitteilung von *Kallos*, der uns auf eine Arbeit von *Kellaway* über Schlangengift hinwies.

Kellaway schreibt¹⁾:

“The Liberation of Histamin by Snake Venoms.

Our main interest in the analysis of the fall of blood pressure due to the intravenous injection of copperhead venom was that this venom causes a fall of blood pressure from which the animal recovers and is desensitised to later injections of venom. We were struck by the similarity which this phenomenon presents to desensitisation in anaphylaxis, a similarity which is even more striking if other effects of this venom are taken into account.

Some years earlier (1929) I had studied the action of Australian venoms upon the isolated uterus of the virgin guineapig and had drawn attention to the resemblance of the contraction so obtained to that of sensitive plain muscle to its anaphylactic antigen. The latent interval observed following the addition of venom to the bath was of the same order as that in the anaphylactic response; a second dose was without effect and by the use of a number of small doses of venom it was possible to desensitise the plain muscle without reaction. I suggested that the action of snake venom on the cells might not be direct but indirect by the liberation of a stimulant substance like histamine.”

Kellaway weist dann darauf hin, dass bewiesen sei, dass auch im anaphylaktischen Schock Histamin freigemacht werde.

Wir wollen hier auf die theoretischen Fragen nicht weiter eingehen, doch haben uns die Untersuchungen *Kellaway's* veranlasst, noch folgende zwei Fragen zu beantworten. 1. Ergibt ein mit unseren Substanzen *in vitro* behandelter und neutralisierter Uterus noch eine anaphylaktische Reaktion? 2. Lässt sich mit unseren Substanzen auch an einem Uterus, bei dem eine anaphylaktische Reaktion ausgelöst und neutralisiert wurde, noch eine Reaktion auslösen?

¹⁾ *Charles H. Kellaway*, Bull. Johns Hopkins Hosp. **40**, Nr. 1.

Die Untersuchungen wurden an mit Eiklar anaphylaktisierten Tieren durchgeführt und haben zu einer eindeutigen (durch Figuren 6 und 7 belegten) Beantwortung beider Fragen geführt.

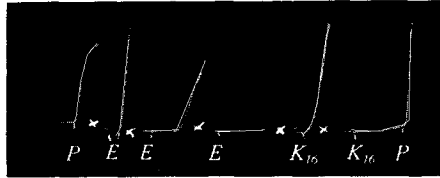


Fig. 6.

Meerschweinchen vorbehandelt mit Eiklarlösung 1:6.

P = Pituglandol.

x = Spülen.

E = 1 cm³ Eiklarlösung 1:10.

K₁₆ = 5 mg 2'-Oxy-8'-palmitylaminonaphthalin-1'-azobenzol-2,5-disulfosaures Natrium.

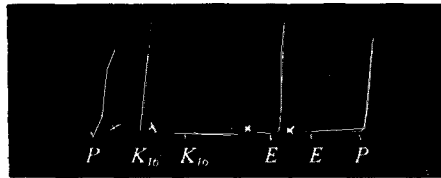


Fig. 7.

P, x, E, K₁₆ gleiche Bedeutung wie bei Fig. 6.

Nach „Auslösung“ und „Neutralisation“ mit C₁₆ (wir haben diese Versuche nur mit diesem Vertreter aus unserer Serie durchgeführt) lässt sich mit Eiklar die anaphylaktische Reaktion regelmässig und einwandfrei auslösen, und nach „Auslösung“ und „Neutralisierung“ mit Eiklar erfolgt wie am unvorbehandelten Uterushorn die anaphylaxieähnliche Kontraktion auf C₁₆.

Diese Feststellung lässt die *Kellaway'sche* Hypothese der Histaminmobilisierung wenigstens für unsere Substanzen wenig wahrscheinlich erscheinen.

Bei der Suche nach weiteren Analogien zu unseren Reaktionen sind wir auf die Untersuchungen von *Champy* und *Gley*¹⁾ gestossen. Diese Autoren haben 1911 festgestellt, dass Corpus luteum-Extrakte schwere Schockerscheinungen hervorrufen: wird der Schock überstanden, so reagiert das Tier schon 15 Minuten später auf die gleiche oder eine grössere Dosis nicht mehr. Die Analogie mit unsern in vitro Versuchen ist in die Augen springend. *Champy* und *Gley* bezeichnen dieses Phänomen als Tachyphylaxie. *Gley* und *Lebas*²⁾ haben übrigens schon 1897 festgestellt:

¹⁾ *Chr. Champy* und *E. Gley*, C. r. Soc. Biol. (Paris) **71**, 159 (1911).

²⁾ Cit. nach ¹⁾.

„qu'une première injection d'albumoses, même à faible dose, immunise contre les principaux effets d'une nouvelle injection, 30 minutes à 2 heures après la première; dans quelques expériences, l'immunité a même pu être constatée 15 minutes après la première injection. Mais cette immunité est en général moins complète que celle que déterminent les extraits de corp jaune.“

Rietschel schreibt 1938¹⁾:

„Unter Tachyphylaxie versteht der Pharmakologe und Physiologe die Abschwächung, Aufhebung oder Umkehr gewisser biologischer Reaktionen bei mehrmaliger Verabfolgung eines bestimmten Mittels in gleicher oder veränderter Menge auf eine erste Dosis hin. Tachyphylaxie tritt nur dann auf, wenn die eingegebene Substanz noch nicht zerstört oder ausgeschieden — der Nachweis von noch im Körper vorhandener Substanz geschieht chemisch —, die biologische Reaktion aber bereits beendet ist.“

Als „Grundversuch“ führt er folgendes Experiment an¹⁾:

„Injiziert man einem Versuchstier (Katze, Hund usw.) in bestimmter Narkose eine gewisse Menge Ephedrin, so kommt es zu einer deutlichen Drucksteigerung. Nach einiger Zeit (etwa 30 Minuten) ist die pressorische Wirkung wieder voll ausgeglichen, eine zweite gleiche Dosis Ephedrin führt zu einer gegenüber der ersten verminderten Blutdrucksteigerung. Wartet man wieder bis zum Druckausgleich und appliziert die Substanz ein drittes Mal, so kommt es zu einer Drucksenkung. Weitere Injektionen innerhalb einer bestimmten Zeitspanne führen dann immer wieder zur Drucksenkung.“

Über die oben erwähnte Tachyphylaxie von *Champy* und *Gley* schreibt *Rietschel*¹⁾:

„*Champy's* und *Gley's* Versuch ist ein Beispiel von Unempfindlichwerden des Organismus, eine Art Immunität und hat nichts mit dem Begriff der Tachyphylaxie zu tun, wie er oben definiert wurde. Bei der Tachyphylaxie im heute gebräuchlichen Sinne kommt es nicht zu einer Unter- oder Unempfindlichkeit, sondern zu einer Andersempfindlichkeit des Organismus (Abschwächung, Aufhebung oder Umkehr gewisser biologischer Reaktionen).“

Wir möchten die Berechtigung dieser Aussagen nicht diskutieren, sondern nur feststellen:

Die Tachyphylaxie mit Corpus luteum-Extrakt, die Tachyphylaxie mit Ephedrin u. a., die Schlangengiftreaktionen, wie sie *Kellaway* beschreibt und die Reaktionen, die wir in dieser Arbeit beschrieben haben, sind in einem wesentlichen Punkt analog: Die durch eine erste Substanzapplikation ausgelöste Reaktion kann durch eine folgende Applikation nicht wieder in gleicher Weise erzielt werden. Der Mechanismus ist in allen Fällen noch nicht, oder zum mindesten nicht einwandfrei geklärt. Die Phänomene sind allgemein biologisch vielleicht auch für die Veränderung der Hautreaktivität bei wiederholten Hautreizungen (vgl. *Török*²⁾) von Interesse.

Zusammenfassung:

Es werden anaphylaxieähnliche, da neutralisierbare Kontraktionen des Meerschweinchenuterus *in vitro* beschrieben. Es handelt sich um Reaktionen des Uterus un vorherbehandelter Tiere. Während

¹⁾ *Hans-Georg Rietschel*, *Klin. Woch.schr.* **17**, Nr. 19, 671—73 (1938).

²⁾ *Török*, *Ann. Dermat.* 1938.

es mit Oleyl-N-methyl-aurin, wie wir früher mitteilten, nicht selten gelingt, solche Reaktionen auszulösen, gelingt es mit 2'-Oxy-8'-acylaminonaphthalin-1'-azobenzol-2,5-disulfosaurem Natrium fast ausnahmslos, doch nur mit denjenigen Verbindungen, bei denen der Fettsäurerest mehr als 12 C-Atome enthält. Sehr häufig, aber nicht immer, wird durch die Voraugabe eines Vertreters aus dieser Substanzserie volle Reaktionsunfähigkeit des Uterus auf die nachfolgende Gabe einer andern Substanz aus der gleichen Serie erzielt. Gelegentlich, aber nicht häufig, haben auch Substanzen mit kürzerer Fettsäure, die selber keine Reaktion auslösen, neutralisiert. Die Auslösung einer Reaktion mit den von uns verwendeten Substanzen bewirkt keine Aufhebung anaphylaktischer Überempfindlichkeit, und umgekehrt können mit unseren Substanzen Reaktionen ausgelöst werden, nachdem vorher anaphylaktische Kontraktionen des Muskels ausgelöst worden sind. Anaphylaxieähnliche Reaktionen, wie sie hier mit chemisch bekannten Substanzen ausgelöst wurden, sind von *Kellaway* für Schlangengifte beschrieben. Auf die Analogie der hier beschriebenen Reaktionen mit der sog. Tachyphylaxie haben wir hingewiesen. Es handelt sich hier um ein noch ungeklärtes Phänomen, dem unserer Ansicht nach allgemeines Interesse zukommt.

Aus dem biochemischen Laboratorium des chem.-techn.
Institutes der Eidgen. Techn. Hochschule Zürich.

176. Über die Isolierung des α -Phyllochinons (Vitamin K aus Alfalfa) sowie über dessen Entdeckungsgeschichte

von P. Karrer, A. Geiger, R. Legler, A. Rügger und H. Salomon.

(23. X. 39.)

In zwei früheren Mitteilungen¹⁾ haben wir über die Isolierung und das physikalische und chemische Verhalten des Vitamins K aus Alfalfa, das Phyllochinon, kurz berichtet. Die vorliegende Abhandlung enthält die genaue Beschreibung der Methode, die zuerst zur Isolierung dieses Vitamins geführt hat. Sie beruht auf einer Kombination von Adsorptionsverfahren und einer Molekulardestillation; als Kriterium der fortschreitenden Reinigung der Präparate diente ihre spektrographische Untersuchung bzw. die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten für die Wellenlänge 248 $m\mu$. Der früheren Beschreibung des α -Phyllochinons haben wir nichts hin-

¹⁾ H. Dam, A. Geiger, J. Glavind, P. Karrer, W. Karrer, E. Rothschild, H. Salomon, *Helv.* **22**, 310 (1939). — P. Karrer, A. Geiger, *Helv.* **22**, 945 (1939).