

Wirksamkeit einiger neuer Lokalanästhetika mit β -Halogen- oder β -Hydroxyäthylgruppen

Christoph Schmid und Peter G. Waser, Universität Zürich

Einige neue β -Halogen- bzw. β -Hydroxyäthyl-Analoga bekannter Lokalanästhetika wurden in bezug auf Intensität und Dauer ihrer leitungsanästhetischen Wirksamkeit am isolierten Frosch-Ischiadicus geprüft. Durch die Halogensubstitution konnte zwar zum Teil eine Verstärkung der Wirksamkeit erzielt werden; eine Verlängerung der Wirkungsdauer (durch postulierte Alkyl-Bindung an Rezeptoren) wurde jedoch in der vorliegenden Versuchsreihe nicht gefunden.

Activity of some new Local Anesthetics with β -Halogen- or β -Hydroxy-side Chains

Some new β -halogen- or β -hydroxy-aethyl derivatives of known local anesthetics were tested for their activity and duration of action on isolated frog sciatic nerves. Substitution with halogens increased the activity (nerve block), but the time of action was not increased by alkyl-binding to the receptors in the axonal membrane as postulated.

1 Einleitung

β -Chloräthylamine sind vor allem als Zytostatika (z.B. Cyclophosphamid) in die Therapie eingeführt und bekannt geworden. Nach ihrem Wirkungsmechanismus eingeordnet, gehören sie zur Gruppe der alkylierenden Verbindungen. Ebenfalls eingehend sind sie untersucht worden auf ihre Wirkung an cholinergen und adrenergen Rezeptoren (z.B. Phenoxybenzamin als α -Blocker). Schliesslich haben Ehrenpreis und Mitarbeiter (S. Ehrenpreis et al., 1968; J.F. Stubbins et al., 1970; G.M. Rosen et al., 1971) das Alkylierungsprinzip auf Lokalanästhetika übertragen und berichten über eine langdauernde lokal-anästhetische Wirkung an verschiedenen Präparaten.

Um diese auch im Hinblick auf eine mögliche Auffindung von Rezeptoren interessante Alkylierungs-Hypothese weiter prüfen zu können, wurden an der ETH Zürich verschiedene β -Halogen- und entsprechende (nicht alkylierende) β -Hydroxyäthyl-Funktionen enthaltende Moleküle synthetisiert (W. Tirto, 1976). Als Modellsubstanzen dienten Paräthoxycain, Procain, Oxybuprocain und Cinchocain, da die physikalisch-chemischen Eigenschaften und die Struktur-Wirkungs-Beziehungen dieser Verbindungen und zahlreicher ihrer Derivate ausführlich untersucht und beschrieben worden sind (J. Büchi und X. Perlia, 1962, 1971, 1973, 1976).

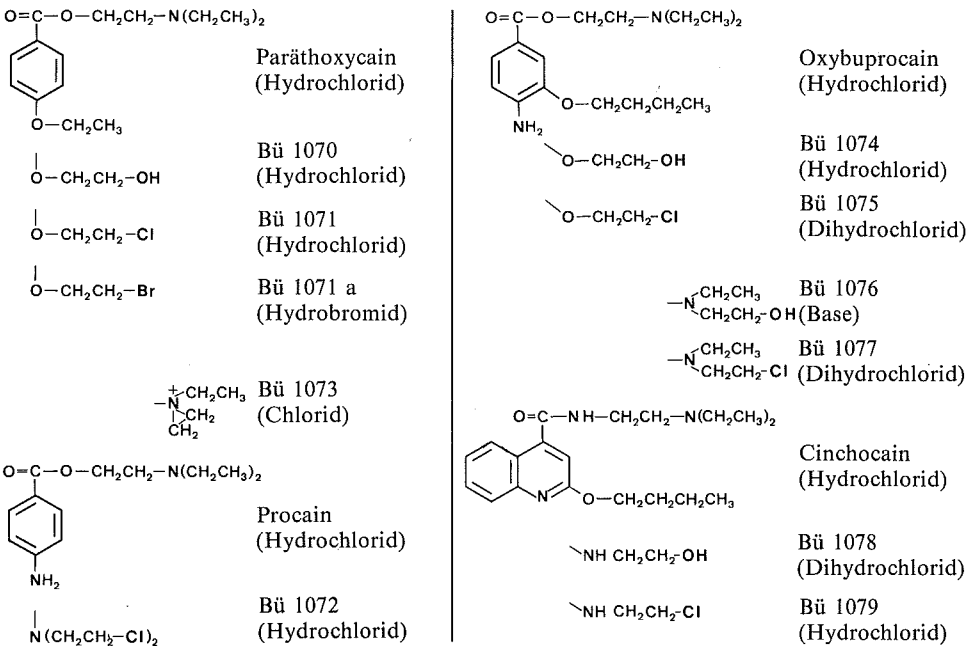
In der vorliegenden Arbeit ging es darum, diese neuen Substanzen mit einer direkten, objektiven Methode (A.L. Bennett et al., 1942) auf ihre leitungsanästhetische Wirksamkeit zu testen. Die allgemeine Toxizität (Dosis letalis) und die Gewebeerträglichkeit (mögliche lokale Reizwirkung) waren nicht Gegenstand dieser Untersuchung. Schon 1969 fand F.P. Luduena, die lang-

dauernde lokalanästhetische Wirkung der β -Chloräthylverbindungen von Ehrenpreis sei zweifelhaft, falls sie nicht auch mit nicht-irritierenden Konzentrationen erzielt werden könne.

2 Material und Methodik

2.1 Liste der geprüften Substanzen

Angegeben sind die Strukturformeln, die Bezeichnungen (Referenzsubstanzen mit DCI-Namen, neue Verbindungen mit Bü-Nummern) sowie die Form, in der die Kristalle vorlagen.



2.2 Tiere, Nerven

Bei den Fröschen handelte es sich um *Rana esculenta*. Die Versuchstiere stellten eine bezüglich Geschlecht, Grösse (Gewichte im Bereich von 50 bis 100 g) und Saison recht heterogene Population dar.

Die Nervi ischiadici wurden jeweils beidseits mit tibialen und fibularen Ästen frei präpariert und herausgenommen.

2.3 Frosch-Ringer-Lösung

Die Lösung, in welche die Nerven vor und zwischen den Versuchen gebracht und in der auch die zu testenden Substanzen appliziert wurden, weist folgende Zusammensetzung auf:

(in 10^{-3} Mol/Liter)

Na ⁺	116,5	Cl ⁻	117,2
K ⁺	2,5	H ₂ PO ₄ ⁻	0,4
Ca ⁺⁺	1,8	HPO ₄ ⁻⁻	2,5

pH $7,25 \pm 0,1$, Lösung im Gleichgewicht mit Luft. Wenn das pH dieser Pufferlösung durch eine zu prüfende Substanz zu sehr gesenkt wurde, so erfolgte eine Einstellung auf den gewünschten Wert mit Natriumhydroxid, versuchsweise auch mit Natriumcarbonat (möglicherweise instabile Ester). Versuche bei Zimmertemperatur (20 Grad Celsius).

2.4 Versuchsanordnung und -apparatur

Prinzipiell geht es darum, die Fortleitung eines elektrisch induzierten Summenaktionspotentials eines Nervs nach der Stelle der Pharmakonwirkung zu registrieren.

Als Reizgerät diente ein Stimulator (Grass S4K) mit einer Isolations-Einheit (Grass SIU478A), die Registrierung erfolgte mit einem Kathodenstrahloszilloskop (anfänglich ein Zweistrahloszilloskop, Tektronix 502, später ein Einstrahlloszilloskop, Tektronix 5103N, mit zwei Differentialverstärkern).

Der Nerv liegt auf sechs Elektroden in einer Kammer (Bild 1). Er wird am ersten Elektrodenpaar mit Rechteckspannungstößen einer Frequenz von 0,5 pro Sekunde supramaximal gereizt. Dazu genügte im allgemeinen bei einer Spannung von einem Volt zehn Mikrosekunden als Reizdauer. Am zweiten und dritten Elektrodenpaar erfolgen bipolare Ableitungen. Zwischen diesen beiden taucht der Nerv, an der tiefsten Stelle durch ein Glashäklein gehalten, mit einer Länge von 12 mm in die Lösung. Die Amplituden der Summenaktionspotentiale betragen jeweils bei der proximalen Ableitung 15 bis 30, bei der distalen Ableitung 3 bis 9 Millivolt. Die Form dieser zweiten bipolaren Ableitung erscheint relativ breit, eine Aufteilung in mehrere Wellen, den verschiedenen Fasergruppen entsprechend, ist nicht zu erkennen. Das Bad, welches die zu prüfende Lösung enthält, hat einen Zulauf, der durch einen Tropfenzähler reguliert werden kann. Ein Ablauf und ein Überlauf (beide an einer Wasserstrahlsogpumpe) ermöglichen Leeren und Spülen des Bads. Die ganze Versuchskammer ist mit einer dünnen Goldschicht versehen und geerdet. Am Boden liegt ein mit Frosch-Ringer-Lösung befeuchteter Fliesspapierstreifen, als Deckel dient ein (ebenfalls mit Gold bedampftes) Glas.

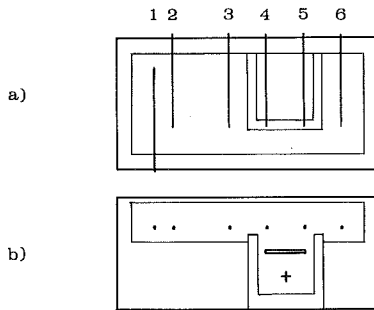


Bild 1 Skizze der Versuchskammer

a) Die Ansicht von oben zeigt die Anordnung der Elektroden. 1 (Anode) und 2 (Kathode) sind die stimulierenden Elektroden, bei 3 und 4 sowie 5 und 6 erfolgen bipolare Ableitungen.

Der Nerv wird so in die Kammer gebracht, dass die Radices auf dem ersten, die tibialen und fibularen Äste auf dem letzten Elektrodenpaar liegen. Die erste Ableitung (3 und 4) dient lediglich der Kontrolle (die dort registrierte Amplitude bleibt während der Versuche konstant), während an der zweiten Ableitung (5 und 6) je nach auf den Nerv einwirkender Lösung Veränderungen festgestellt werden.

b) In der Ansicht von der Seite erscheinen die Elektroden, auf die der Nerv zu liegen kommt, punktförmig. Der eingezeichnete Schlitz (Überlauf) markiert das Niveau der Flüssigkeit im Bad, das das Kreuz die Stelle, an welcher der Nerv durch ein Glashäklein in der Lösung gehalten wird.

Fig. 1 Nerve chamber.

a) Top view with electrodes: 1 anode, 2 cathode for stimulation; 3 and 4 as 5 and 6 for bipolar registration.

The nerve was placed with its proximal end on 1, its distal endings on 6. The first lead (3, 4) is used as a control of stimulation and is not influenced by the local anesthetic, whereas the second lead (5, 6) is changed by it.

b) Side view with electrodes (points) on which the nerve is placed. A slit for overflow of bath fluid keeps a constant level; the cross below marks the hook where a loop of the nerve is embedded into the bath fluid.

Mit dieser feuchten Kammer werden folgende Ziele erreicht (J. Bures et al., 1967):

1. Der Nerv ist durch die Elektroden fixiert. Reize können appliziert und Aktionspotentiale können registriert werden. Die Kammer schirmt gegen äussere Einflüsse ab (Faraday-Käfig-Effekt), was störungsfreie Ableitungen ermöglicht.
2. Im feuchten Milieu wird der Nerv unter relativ günstigen Bedingungen gehalten. (Bei der extrazellulären Ableitung sollten die Elektroden nicht in Lösung tauchen.) Der Inhalt des Bads kann ohne Öffnen der Kammer gewechselt werden.

2.5 Versuchsablauf

Versuche beginnen erst zwei Stunden nach der Nervenpräparation. Tropfen werden abgestreift, bevor der Nerv über die Elektroden und unter das Glas-

häkchen ins Bad gelegt wird. Zu Beginn wird die normale Nervenleitung kontrolliert (konstante Stimulation alle zwei Sekunden während der ganzen Versuchsdauer). Das Bad ist mit Frosch-Ringer-Lösung gefüllt. Nach 20 bis 30 Minuten wird die Lösung abgelassen und durch die zu prüfende Lokalanästhetikum-Lösung ersetzt. Dieser Moment wird als Zeitpunkt Null definiert. Messungen der Amplituden erfolgen alle fünf Minuten, bis zur Minute dreissig. Danach ist entweder der Versuch beendet (d.h. der Nerv wird zur Erholung wieder in ein Becherglas mit Frosch-Ringer-Lösung gebracht), oder es setzt eine kontinuierliche Spülung mit Frosch-Ringer-Lösung ein. Dadurch wird die Lokalanästhetikum-Lösung im Bad rasch verdünnt, ohne dass sich das Flüssigkeitsniveau ändert. Die Amplituden der Aktionspotentiale werden weiterhin in definierten Zeitintervallen abgelesen und notiert. Als Beispiel ist in Bild 2 ein Versuch mit Procain dargestellt, natürlich nur die Messwerte der Ableitung distal der Lösung.

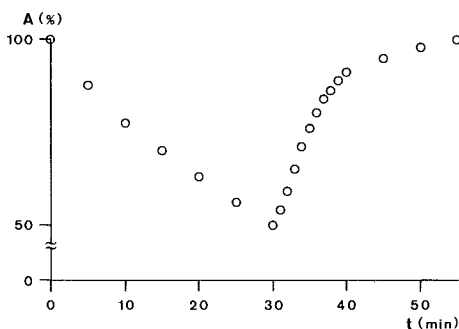


Bild 2 Messungen während eines Versuches (Beispiel).

Die Kurvenpunkte stellen die Amplitude der zweiten Ableitung als Funktion der Zeit dar. In diesem Versuch war zum Zeitpunkt 0 (Procainzugabe) auf dem Bildschirm des Kathodenstrahloszilloskops eine Amplitude von 6,4 Millivolt abzulesen, zum Zeitpunkt 30 (Beginn der Spülung mit Frosch-Ringer-Lösung) eine Amplitude von 3,2 Millivolt.

Am Schluss des Versuches beträgt die Amplitude wieder gleich viel wie am Anfang, der Nerv hat sich «erholt».

Fig. 2 Action potential of nerve (second derivation) as function of time. At time 0 addition of procaine ($A = 6.4$ mV), at time 30 min ($A = 3.2$ mV) start of rinsing with frog-Ringer and afterwards recovery.

Üblicherweise wurden die Nerven für mehrere Versuche verwendet und alternierend (linker und rechter Nerv) in aufsteigenden Konzentrationen geprüft. Mit Ausnahme der in Abschnitt 3.2 erwähnten Versuche gelangen in dieser Arbeit nur Ergebnisse von Experimenten mit Nerven am Tag der Präparation zur Darstellung. Für Substanzen mit langer Wirkungsdauer (z.B. Cinchocain) wurden Nerven nur für ein bis drei Versuche verwendet (je nach Konzentration). Bei solchen Verbindungen kommt auch das Problem der zeitlichen Limitierung am klarsten zum Ausdruck: Nach dreissigminütiger Ein-

wirkung war einerseits die maximale Wirkung der geprüften Konzentration noch lange nicht eingetreten, und andererseits wäre es schwierig gewesen, für die Statistik genügend Nerven zu finden, die sich in der Versuchskammer völlig erholt hätten (vereinzelte solche Versuche mit Cinchocain dauerten drei bis vier Stunden). Aus praktischen Gründen wurde daher die Einwirkungs-dauer generell auf 30 Minuten und die maximale Versuchsdauer auf zwei Stunden festgesetzt.

2.6 Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung erfolgte am Rechenzentrum der Universität Zürich, mit den BMDP-Programmen 3D und 9D (W.J. Dixon und M.B. Brown, 1977). Sämtliche Resultate beziehen sich auf die im Abschnitt 2.5 beschriebenen zeitlichen Bedingungen, d.h. in den Dosis-Wirkungs-Kurven ist immer die Wirkung einer bestimmten Konzentration nach einer halben Stunde angegeben. In diesen Kurven ist als Ordinate die prozentuale Restamplitude (Ausgangswert zum Zeitpunkt Null = 100 %) eingetragen: Mittelwerte, Anzahl Versuche, Standardabweichungen.

Um die lokalanästhetische Wirksamkeit einer Verbindung zahlenmässig ausdrücken zu können, wurde die ED_{50} bestimmt, d.h. die Dosis, die nach dreissig Minuten die Nervenleitung zur Hälfte blockiert (oder anders formuliert: Dosis, die im Mittel das Summenaktionspotential des Frosch-Ischiadicus im Verlauf einer halben Stunde auf die Hälfte reduziert). Auf eine Regressionsanalyse wurde verzichtet, und die grafische Bestimmung mit Wahrscheinlichkeitspapier ergibt keine präziseren Werte als das direkte Ablesen aus der Dosis-Wirkungs-Kurve. Im Bereich mittlerer Konzentrationen weichen die Kurven in der semilogarithmischen Darstellung kaum von einer Geraden ab.

Zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufes (vor allem der Wirkungs-dauer) wurden Versuche verwendet, in denen die Nervenleitung zu einem bis zu drei Vierteln blockiert worden war (also Experimente mit Konzentrationen nahe der ED_{50}). In diesem Bereich fand sich keine bestimmte Korrelation zwischen erfolgter Blockade und dem zeitlichen Verlauf der Erholung. So schien u.a. die Halbwertszeit der Erholung nicht abhängig zu sein von der in 30 Minuten erfolgten Blockade. Für die grafische Darstellung wurde der Effekt nach 30 Minuten als 100% gesetzt, danach die Mittelwerte errechnet. Die Auswertung erfolgte auch mit einer statistisch wohl korrekteren Winkeltransformation (L. Sachs, 1974). In Anbetracht der geringfügigen Abweichungen wurde aber schliesslich die doch etwas anschaulichere Auswertung zur Darstellung gebracht. Die angegebenen Irrtumswahrscheinlichkeiten beziehen sich immer auf den separaten t-Test (Annahme verschiedener Varianzen der zu vergleichenden Gruppen), obschon die Streuung häufig die gleiche war. Aus Übersichtsgründen sind die (sich stark überlappenden) Standardabweichungen nicht eingezeichnet.

3 Resultate

3.1 Dosis-Wirkungs-Kurven und Kurven des zeitlichen Verlaufs, nach Substanzgruppen geordnet, mit kurzen Kommentaren

3.1.1 Paräthoxycain-Gruppe

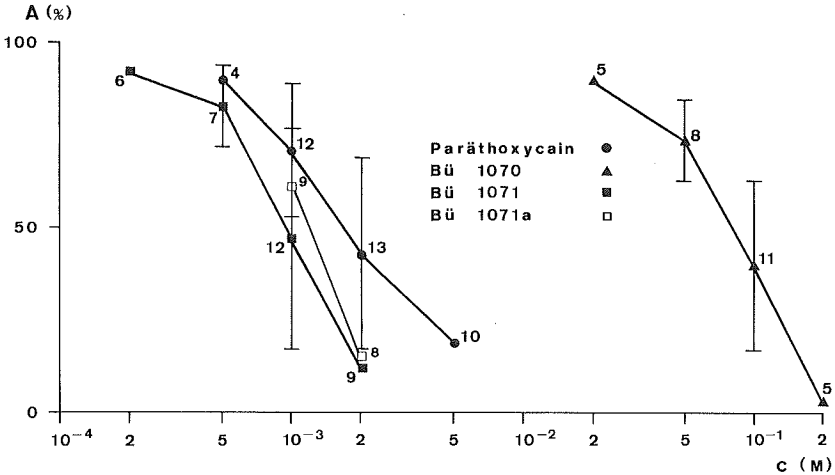


Bild 3 Dosis-Wirkungs-Kurven von Paräthoxycain und Analogen.

Abszisse: Konzentration in Mol/Liter, Ordinate: Amplitude in % (Erklärungen im Abschnitt 2.6).

Fig. 3 Dose-effect curves of parethoxycaine and analogues. Ordinate: amplitude (%) of action potential, abscissa: concentration (mol/lit.) (explanation see text).

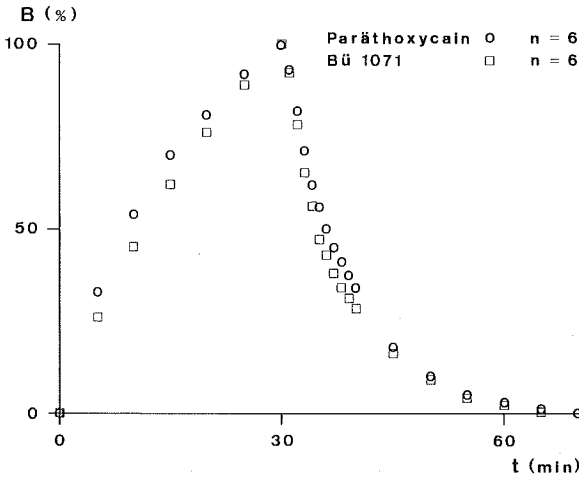


Bild 4 Zeitlicher Verlauf von Paräthoxycain und Bü 1071. Abszisse: Zeit in Minuten, Ordinate: Blockade in % (Erklärungen im Abschnitt 2.6).

Fig. 4 Blockade of nerve by parethoxycaine and Bü 1071 (explanation see text).

Paräthoxycain $ED_{50} 1,7 \times 10^{-3} \text{ M}$

Bü 1070 $ED_{50} 8 \times 10^{-2} \text{ M}$

Die im Vergleich zu Paräthoxycain fast fünfzigmal schwächere Wirksamkeit kann damit begründet werden, dass die Substanz deutlich hydrophiler ist.

Bü 1071 $ED_{50} 9,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ Bü 1071a $ED_{50} 1,2 \times 10^{-3} \text{ M}$

Die leichte Erhöhung der Wirksamkeit gegenüber Paräthoxycain durch die Halogensubstitution könnte durch die erhöhte Lipophilie erklärt werden.

Die beiden Substanzen zeigen in bezug auf den zeitlichen Verlauf ihrer Wirkung keinen Unterschied, d.h. Bü 1071 ist nicht länger wirksam als die Referenzsubstanz Paräthoxycain. Bü 1071 a verhält sich ebenso ($n=4$).

3.12 Procain-Gruppe

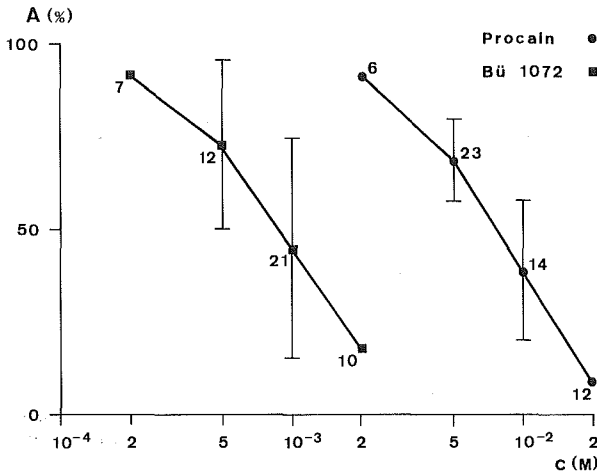


Bild 5 Dosis-Wirkungs-Kurven von Procain und Bü 1072 (wie Bild 3).
Fig. 5 Dose-effect curves of procaine and Bü 1072.

Procain $ED_{50} 7,7 \times 10^{-3} \text{ M}$

Bü 1072 $ED_{50} 8,7 \times 10^{-4} \text{ M}$

Annähernd neunmal wirksamer als Procain, was allerdings bei der Einführung der beiden neuen Ketten wenig erstaunlich ist.

Bü 1073 ED_{50} grösser als 10^{-1} M

Die einzige untersuchte Substanz, bei der überhaupt kein sicherer Effekt nachgewiesen werden konnte. Als plausible Erklärung mag dienen, dass das positiv geladene Molekül wohl kaum in der Lage ist, seinen Wirkungsort zu erreichen.

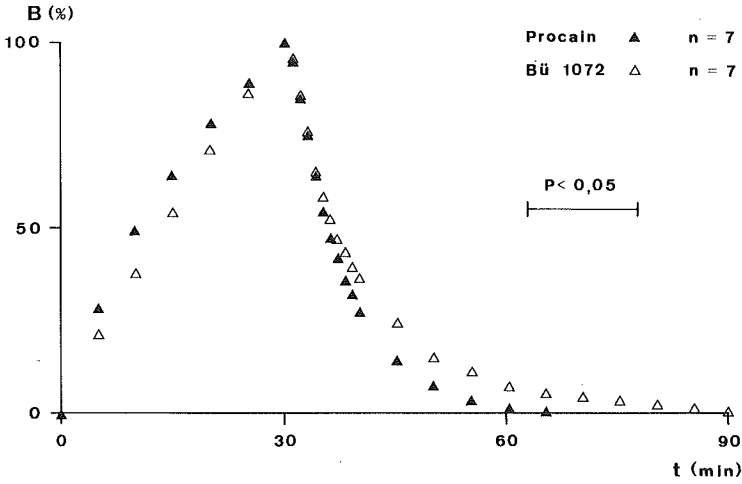


Bild 6 Zeitlicher Verlauf von Procain und Bü 1072 (wie Bild 4).
Fig. 6 Blockade of nerve by procaine and Bü 1072.

Die Wirkung von Bü 1072 dauert etwas länger an als jene von Procain. Diese Verlängerung scheint aber nicht derart spezifisch zu sein, dass man sie auf eine Alkylierung von Rezeptoren zurückführen könnte. Befinden sich die β -Chloräthylgruppen am «falschen» Stickstoff?

3.13 Oxybuprocain-Gruppe

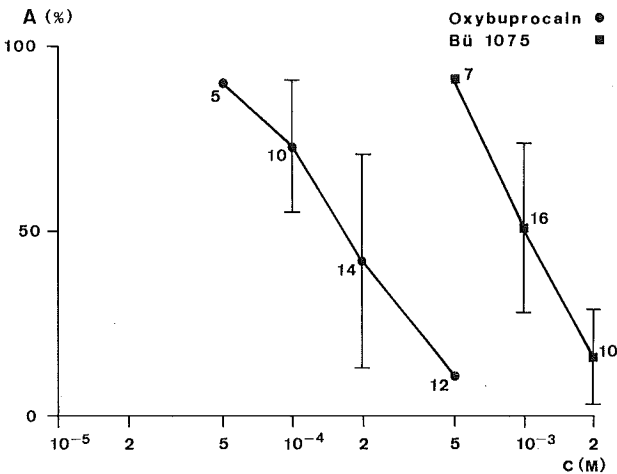


Bild 7 Dosis-Wirkungs-Kurven von Oxybuprocain und Bü 1075 (wie Bild 3).
Fig. 7 Dose-effect curves of oxybuprocaine and Bü 1075.

Oxybuprocain $ED_{50} 1,7 \times 10^{-4} M$

Bü 1074 ED_{50} grösser als $5 \times 10^{-2} M$

Vermutlich ist die Verbindung wie Bü 1070 zu stark hydrophil.

Bü 1075 $ED_{50} 10^{-3} M$

Die Substanz dürfte in bezug auf Lipophilie dem Oxybuprocain etwa vergleichbar sein und ist etwa sechsmal schwächer wirksam als dieses. Es ist bekannt, dass das Aethoxy-Derivat des Procain der entsprechenden Butoxyverbindung unterlegen ist (J. Büchi et al., 1951, 1952). Abgesehen von dieser Verkürzung der Seitenkette wäre es auch denkbar, dass die Halogensubstitution hier die Wirksamkeit gar nicht erhöht, denn im Gegensatz zur Paräthoxycain-Gruppe könnte bei Bü 1075 eine Halogenhydrolyse mit Übergang in eine schwächer wirksame Verbindung (Bü 1074) leichter erfolgen (infolge möglicher Resonanzstabilisierung des Zwischenproduktes).

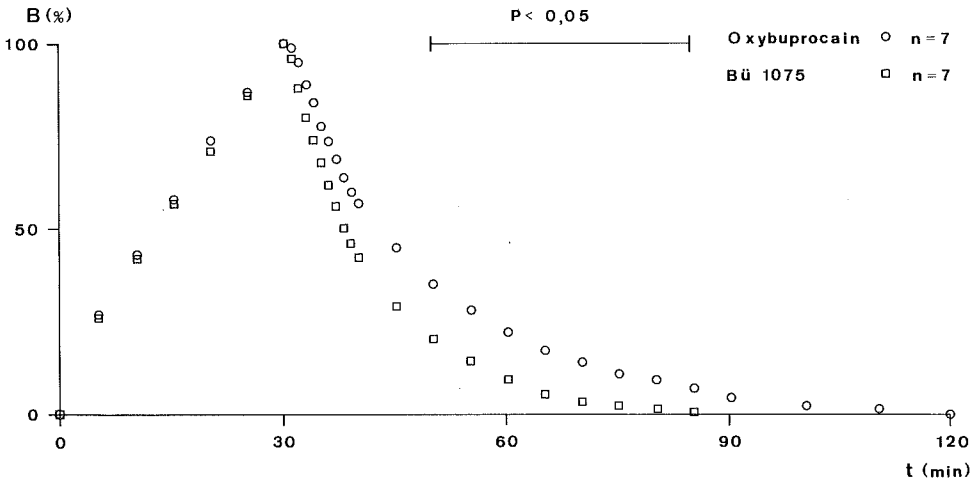


Bild 8 Zeitlicher Verlauf von Oxybuprocain und Bü 1075 (wie Bild 4).

Fig. 8 Blockade of nerve by oxybuprocaine and Bü 1075.

Bü 1075 wirkt etwas weniger lang als Oxybuprocain, d.h. die Dauer verhält sich gleichsinnig wie die Intensität der lokalanästhetischen Wirkung.

3.14 Cinchocain-Gruppe

Cinchocain $ED_{50} 6,6 \times 10^{-5} M$

Erwies sich als die am stärksten wirksame Substanz der ganzen Versuchsreihe.

Bü 1076 $ED_{50} 2,1 \times 10^{-4} M$

Der Alkohol wurde zuerst stöchiometrisch in HCl, dann in Frosch-Ringer-Lösung gelöst. Die besonders fettlösliche Ausgangssubstanz (Cinchocain) tole-

riert offenbar eher die Einführung einer Hydroxylgruppe, so dass Bü 1076 «nur» rund dreimal schwächer wirksam ist.

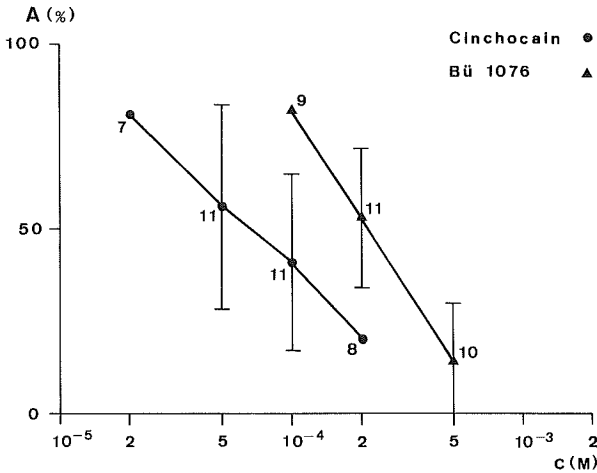


Bild 9 Dosis-Wirkungs-Kurven von Cinchocain und Bü 1076 (wie Bild 3).

Fig. 9 Dose-effect curves of cinchocaine and Bü 1076.

Bü 1077

Für diese Substanz wurde keine Dosis-Wirkungs-Kurve gezeichnet und auch keine ED_{50} angegeben, da sie sich in der verwendeten Ringerlösung bei physiologischem pH als schlecht löslich erwies. Gerade in jenem Konzentrationsbereich, wo die Dosis-Wirkungs-Kurve zu liegen kommen dürfte (10^{-4} bis 10^{-3} M), geht Bü 1077 nicht mehr in Lösung.

Es wäre nicht richtig gewesen, trübe Suspensionen oder stark saure Lösungen zu applizieren, da ein isolierter Nerv im Gegensatz zu einem ganzen Organismus nur eine sehr begrenzte Pufferkapazität aufweist (J. M. Ritchie, 1975). Eine Differenzierung zwischen einer irreversiblen spezifischen Blockade durch das Lokalanästhetikum und einer unspezifischen Schädigung des Nervs (durch Basenausfällung im Gewebe oder durch zu tiefes pH) wäre ohnehin kaum möglich gewesen.

Bü 1078, Bü 1079 ED_{50} grösser als 5×10^{-2} M

Beide Verbindungen erwiesen sich erst in hohen Konzentrationen als wirksam. Der Vergleich mit Cinchocain ist nicht einfach, aber wahrscheinlich kann der Wirkungsverlust bereits durch den Austausch der Äther- gegen eine Aminfunktion sowie die Verkürzung der Seitenkette hinreichend erklärt werden. So war eine Verbindung mit einer um zwei Kohlenstoffatome längeren Seitenkette als Bü 1079 (d. h. mit einer Delta-Chlorbutyl-Kette) «nur» noch etwa hundertmal schwächer wirksam als Cinchocain. Diese stark hygroskopische Substanz wurde allerdings nur kurz getestet ($n = 5$).

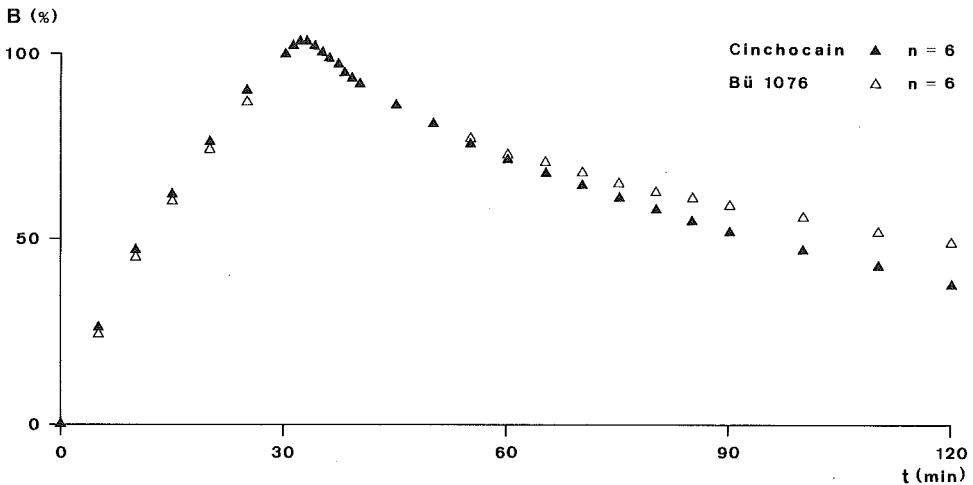


Bild 10 Zeitlicher Verlauf von Cinchocain und Bü 1076 (wie Bild 4).

Fig. 10 Blockade of nerve by cinchocaine and Bü 1076.

Zu Beginn der Erholung decken sich die Kurvenpunkte von beiden Substanzen, und der spätere «Unterschied» vermag nicht einmal eine 10%-Signifikanzschwelle zu unterschreiten.

Die verspätete «Umkehr», d. h. dass die Blockade trotz Einsetzen der Spülung noch stärker wird, war typisch für die Substanzen dieser Gruppe. Das Phänomen ist vermutlich auf die langsame Penetranz dieser Lokalanästhetika (T. G. Brown und F. P. Luduena, 1953) zurückzuführen und zeigt, dass es Zeit braucht, bis sich der Konzentrationsgradient innerhalb der Nervenhülle umkehrt.

In vier Versuchen, in denen klare Lösungen von Bü 1077 nach einer halben Stunde einen genügend starken Effekt hatten (um einen fairen Vergleich zu ermöglichen), zeigte sich, dass die Erholung ebenso schnell eintrat wie nach Cinchocain.

3.2 Empfindlichkeit der Nerven auf Lokalanästhetika im Verlauf der Zeit seit der Isolation

Die in Frosch-Ringer-Lösung (während der Nacht im Kühlschrank bei vier Grad Celsius) aufbewahrten Nerven behalten tagelang die Fähigkeit, Impulse zu leiten. Daher wurden auch am Tag nach der Präparation (am zweiten Tag) Versuche durchgeführt. Der Unterschied zwischen Experimenten am ersten und am zweiten Tag ist in Bild 11 (auf der folgenden Seite) am Beispiel von Procain gezeigt. Bei ebenso grossen Ausgangsamplituden und gleicher Erholung von der Blockade sprechen die Nerven empfindlicher auf Procain an, wenn eine längere Zeit seit ihrer Isolation verstrichen ist. Dieser Unterschied

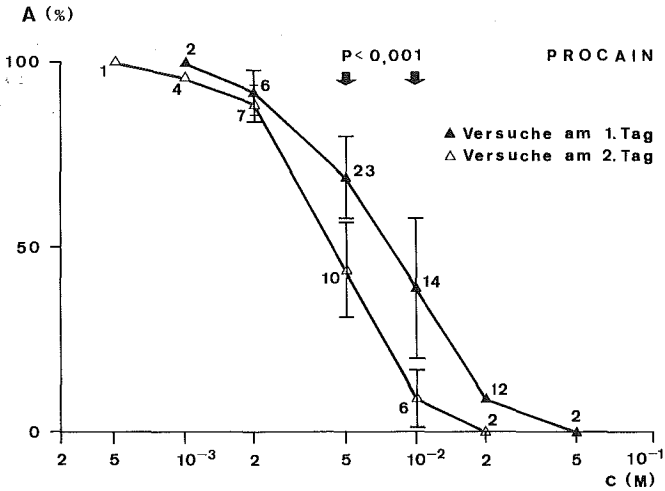


Bild 11 Dosis-Wirkungs-Kurven von Procain.

Abszisse: Konzentration in Mol/Liter (logarithmisch), Ordinate: Amplitude der Aktionspotentiale nach 30 Minuten Procaineinwirkung (in % der Ausgangsamplitude).

Fig. 11 Dose-effect curves of procaine applied on fresh or one day old nerve preparation.

wurde auch bei den anderen geprüften Substanzen gefunden, d. h. die Dosis-Wirkungs-Kurven vom zweiten Tag erscheinen gegenüber jenen vom ersten Tag nach links verschoben, und zwar alle in ähnlichem Ausmass. Natürlich ändert sich die Empfindlichkeit der Nerven auch innerhalb des ersten Tages (unmittelbar nach der Präparation sind sie recht unempfindlich). Ebenso ist erfahrungsgemäss der Effekt bei wiederholten Versuchen das zweite Mal stärker, auch wenn die Blockade beim ersten Mal völlig reversibel war (T. G. Brown und F. P. Luduena, 1953). Daher berücksichtigt Bild 11 ausschliesslich Versuche mit Nerven, die am Vortag nicht für Lokalanästhetikum-Teste verwendet wurden. Es wird darin gezeigt, dass die Nerven am Tag nach der Präparation empfindlicher gegenüber Procain reagieren, verglichen mit Nerven am Tag der Präparation. Im mittleren Dosisbereich ist der Unterschied im t-Test hochsignifikant.

4 Diskussion

Der im letzten Abschnitt beschriebene Unterschied zwischen Nerven verschiedenen «Alters» ist wohl einer der wichtigsten Gründe für die doch eher grosse Streuung der Resultate. Es gilt übrigens zu berücksichtigen, dass die Nerven ohne spezielle Begasung mit Sauerstoff und Kohlendioxid (R. L. de No, 1947) gehalten wurden. Eine beträchtliche biologische Streuung war ebenfalls zu erwarten. Bereits 1922 wies K. Fromherz auf eine unterschiedli-

che Empfindlichkeit von Fröschen auf Lokalanästhetika im Verlauf der Jahreszeiten hin, und A. L. Bennett et al. haben 1942 die Abhängigkeit der lokal-anästhetischen Wirkung vom Durchmesser der Frosch-Ischiadici gezeigt.

Im Vergleich zum Zustand des biologischen Objektes dürften minime Schwankungen der Versuchsbedingungen und die Messgenauigkeit wenig ins Gewicht fallen, so z. B. die der Lösung exponierte Nervenlänge oder das pH. Man muss sich übrigens vorstellen, dass bei diesen Versuchen an Nerven mit intaktem Perineurium das Penetrationsvermögen eine sehr grosse Rolle spielt (als Voraussetzung für die Wirksamkeit der Substanzen überhaupt). W. Wilbrandt und J. L. de la Cuadra (1947) haben am Nerv-Muskel-Präparat des Frosches demonstriert, dass die Diffusionszeiten durch Auffaserung der Nerven an der Einwirkungsstelle des Lokalanästhetikums stark verkürzt werden (d. h. Induktionszeit und Wirkungsdauer werden durch das Verfahren stark herabgesetzt). Ebenso wäre anzunehmen, dass die geprüften Substanzen am isolierten Nervenstamm bei hohem pH stärker wirksam wären als bei tiefem pH.

Die Methode, Lokalanästhetika an isolierten Froschnerven zu testen, ist heutzutage wenig üblich. Es gibt eine grosse Zahl verschiedener Prüfungsverfahren, und mit Ausnahme der Oberflächenanästhesie an der Kaninchen-Cornea kann keines davon als Standardmethode bezeichnet werden. Verständlicherweise arbeitet man mit einzelnen Nervenfasern, um dem Wirkungsmechanismus der Lokalanästhetika näher auf die Spur zu kommen (J. M. Ritchie, 1971, 1975; B. Hille, 1977; K. R. Courtney et al., 1978). Auf der anderen Seite sollen Versuchsergebnisse, die an Ganztieren (insbesondere Säugern) gewonnen wurden, direkter auf die Klinik zu übertragen sein (F. Herr, 1958). Dabei wird in der Regel geprüft, wie häufig eine bestimmte Konzentration in einer bestimmten Zeit die Reaktion auf einen Reiz (durch Säure, Hitze oder mechanischer Art) aufhebt. Relativ gebräuchlich ist das Verfahren der Infiltrationsanästhesie an Meerschweinchen (E. Buelbring und I. Wajda, 1945).

Die Bestimmung der lokal-anästhetischen Wirksamkeit an isolierten Nervenstämmen könnte man als klassisch bezeichnen. Es handelt sich dabei um eine direkte und objektive Methode. Nach Applikation einer wirksamen Lokalanästhetikum-Lösung wird die Anzahl der impulsleitenden Nervenfasern kleiner, damit auch die Amplitude des Summenaktionspotentials. Die nun schon seit fünfzig Jahren bekannte unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Fasertypen auf Lokalanästhetika wirkt sich beim mindestens 1 cm langen tauchenden Nervenabschnitt wohl wenig aus (D. N. Franz und R. S. Pery, 1974). Die Messungen sind recht präzise und ermöglichen das Aufstellen von Dosis-Wirkungs-Kurven anhand der Stärke des Effektes, nicht nur nach der Häufigkeit seines Auftretens. Das Versuchsmodell stellt, wie bereits erwähnt, hohe Anforderungen an die Penetrationsfähigkeit eines Lokalanästhetikums, ohne den bisweilen stark variablen Faktor der Blutzirkulation zu beinhalten.

Natürlich sind die Resultate verschiedener Prüfungsverfahren nicht mitein-

ander vergleichbar (K. Fromherz, 1922; J. Büchi, 1952), und es erstaunt nicht, dass die Ergebnisse am isolierten Frosch-Ischiadicus (Verhältnis der Wirksamkeit von Procain : Oxybuprocain : Paräthoxycain : Cinchocain = 1:45:4,5:117) deutlich von den Ergebnissen an Ganztierversuchen mit Meer-schweinchen (1:10:14:15) (J. Büchi et al., 1951) abweichen. Allerdings können auch Versuche am gleichen biologischen Präparat (z. B. isolierter Nervus ischiadicus von *Rana pipiens*) und mit derselben Registriertechnik (Aktionspotentiale) zu sehr unterschiedlichen Resultaten führen: A. L. Bennett et al. (1942) fanden nach Cinchocainblockade überhaupt keine Erholung, während A. P. Truant (1952) als Erholungszeit für Cinchocain hundert Minuten angibt. Derartige Beispiele liessen sich vermehren, und das angeführte soll nicht etwa gegen die verwendete Methode sprechen. Die Erklärung für solche Differenzen liegt natürlich in unterschiedlichen Versuchsbedingungen. Das Beispiel zeigt, dass insbesondere in Testmodellen, wo ein Gleichgewichtszustand der Konzentrationen nicht erreicht wird, die kinetischen Verhältnisse bei der Interpretation nicht ausser acht gelassen werden dürfen. Die durchaus logisch anmutende Forderung, zur Bestimmung der Wirkungsdauer äquieffektive Konzentrationen zu verwenden (F. P. Luduena, 1969), ist in Wirklichkeit gar nicht so einfach zu erfüllen.

Abschliessend noch zwei Bemerkungen betreffend die neuen Substanzen und deren pharmakologische Wirkung: Bei den β -Halogenäthoxy-Verbindungen war von vornherein eine langdauernde Wirkung eher nicht zu erwarten, da sie (Bü 1071 und Bü 1075) nicht dasselbe Reaktionsvermögen besitzen wie die β -Halogenäthylamine. Es ist daher schade, dass die speziell interessierenden Derivate des Cinchocains und des Procains Probleme stellten; die eine Substanz (Bü 1077), weil sie sich in der verwendeten Lösung als schlecht löslich erwies, die andere dagegen, weil die am biologischen Objekt erwünschte Zyklisierung zum Aziridiniumion unangenehmerweise bereits bei der Synthese erfolgte (Bü 1073). Zum andern ist festzustellen, dass die pharmakologisch-experimentelle Methodik bei S. Ehrenpreis (1968, 1970, 1971) eher spärlich beschrieben ist; selbst beim Eintritt einer irreversiblen Wirkung bleibt deren Spezifität vorerst fraglich.

5 Literatur

- Bennett, A. L., Wagner, J. C., McIntyre, A. R. (1942), The determination of local anesthetic-potency by observation of nerve action-potentials. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 75: 125–136.
- Brown, T. G., Luduena, F. P. (1953), Penetrance of local anesthetics. *J. Anesthesiology* 14 (6): 555–566.
- Büchi, J., (1952), Die Entwicklung der Arzneimittelforschung auf dem Gebiet der Lokalanästhetika. *Arzneim.-Forsch.* 2: 1–6, 65–72, 114–120.
- Büchi, J., Perlia, X. (1962), Beziehungen zwischen den physikalisch-chemischen Eigenschaften und der Wirkung von Lokalanästhetika. 1. Teil (1962) und 2. Teil (1976). Cantor Aulendorf i. Württ.

- Büchi, J., Perlia, X. (1971), Structure-activity relations and physico-chemical properties of local anesthetics. *International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics, Local Anesthetics*, ed. Lechat, P., Pergamon Press, Oxford, p. 39–130.
- Büchi, J., Perlia, X. (1973), Entwicklung und Chemie der Lokalanästhetika. *Lokalanästhesie und Lokalanästhetika*, Hg. Killian, H., Thieme Stuttgart, S. 19–75.
- Büchi, J., Stünzi, E., Flury, M., Hirt, R., Labhart, P., Ragaz, L. (1951), Über lokalanästhetisch wirksame basische Ester und Amide verschiedener Alkoxy-aminobenzoesäuren. *Helv. Chim. Acta* 34: 1002–1013.
- Buelbring, E., Wajda, I. (1945), Biological comparison of local anesthetics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 85: 78–84.
- Bures, J., Petran, M., Zachar, J. (1967), *Electrophysiological Methods in Biological Research*. Academic Press, New York.
- Courtney, K. R., Kendig, J. J., Cohen, E. N. (1978), The rates of interaction of local anesthetics with sodium channels in nerve. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 207 (2): 594–604.
- Dixon, W. J., Brown, M. B. (1977), BMDP-77, Biomedical Computer Programs P-Series. University of California Press, Berkeley.
- Ehrenpreis, S., Lynes, T. H., Stubbins, J. F., Manning, M. D., Edwards, S. (1968), Synthesis and pharmacological properties of an irreversible local anesthetic. *Federation Proc.* 27: 407.
- Franz, D. N., Perry, R. S. (1974), Mechanisms for differential block among single myelinated and non-myelinated axons by procaine. *J. Physiol.* 236: 193–210.
- Fromherz, K. (1922), Über die Wirkung verschiedener Gruppen von Lokalanästhetika im Lichte verschiedener Untersuchungsmethoden. *Arch. f. Exp. Path. u. Pharm.* 93: 34–91.
- Herr, F. (1958), Zur Frage der Standardisierung der Prüfung von Lokalanästhetika. *Arzneim.-Forsch.* 8: 137–141.
- Hille, B. (1977), The pH-dependent rate of action of local anesthetics on the node of Ranvier, Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *J. Gen. Physiol.* 69: 475–496, 497–515.
- Ludueno, F. P. (1969), Duration of local anesthesia. *Ann. Rev. Pharmacol.* 9: 503–520.
- No, R. L. de (1947), *A Study of Nerve Physiology*. The Rockefeller Institute for Medical Research, New York, Vol. 131/132.
- Ritchie, J. M. (1971), The mechanism of action of local anesthetic agents. *International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics, Local Anesthetics*, ed. Lechat, P., Pergamon Press, Oxford, p. 131–166.
- Ritchie, J. M., Cohen, P. J. (1975), Local anesthetics. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, ed. Goodman, L. S., Gilman, A., Macmillan New York, p. 379–403.
- Rosen, G. M., Ehrenpreis, S., Mittag, T. W., Stubbins, J. F. (1971), Physical and pharmacological properties of an irreversible local anesthetic. *J. Med. Chem.* 14 (6): 514–516.
- Sachs, L. (1974), *Angewandte Statistik*. Springer Wiesbaden.
- Stubbins, J. F., Ehrenpreis, S., Lynes, T. H., Bigo-Gullino, M. (1970), A new class of ultralong-acting local anesthetics. *J. Med. Chem.* 13 (3): 558–559.
- Tirto, W. (1976), Synthese einiger neuer Beta-Halogen- bzw. Beta-Hydroxyäthyl-Analogue des Procains, Paräthoxycains, Oxybuprocains und Cinchocains mit möglicher langdauernder lokalanästhetischer Aktivität. *Diss. ETH Nr. 5665*, Zürich.
- Truant, A. P. (1952), Local anesthetic studies on isolated frog sciatic nerves. *Federation Proc.* 16: 341.
- Wilbrandt, W., Cuadra, J. L. de la (1947), Die Prüfung der Lokalanästhetika am peripheren Nervenstamm und der Mechanismus der Wirkungsverstärkung durch Coffein. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta* 5: 265–271.

Dr. med. Christoph Schmid, Hofstrasse 81, 8044 Zürich

Prof. Dr. Peter G. Waser, Pharmakologisches Institut der Universität Zürich, Gloriastrasse 32, 8006 Zürich