

Collagen in Experimental Lathyrism¹

Since lathyrism has been known mainly from the morphological aspect, we wish to report here the effect of sweet pea diet on the synthesis of collagen in growing rats. MIELKE, LALICH, and ANGEVINE² found recently, that the administration of the toxic agent (β -amino-propionitrile) decreased the synthesis of hydroxyproline in croton oil pouches. The findings reported below agree well with their results.

The experimental diet³ contained 56% sweet peas and the control diet ordinary peas respectively. The rats (Wistar stock, both males and females) were fed with diet *ad libitum* in individual cages. The weanling animals weighed in the beginning 40 g (mean) and after 2 months in the control group 135 g (mean) and in the lathyrus group 100 g (mean).

Wounds of about 1 cm length were cut (in local anaesthesia) in the backs of the animals and closed with continuous silk suture. No infections occurred. After five days the animals were killed. Strips (1 cm broad), containing the scar transversely in the middle, were cut from the skins and the tensile strength up to the rupture was measured with a simple system of hanging weights. In the control group (5 rats), the tensile strength of the scars was on the average 140 g (range 106–181 g) and in lathyrus-group (4 rats) 57 g (33–87 g). The thickness of the corium was 0.25 mm (mean) in the control group and in the lathyrus group 0.15 mm (mean).

To check the stability of the collagen, the thermal shrinking point was determined from 4 samples of tail tendon in each group. It was identical and normal in both groups (61°–62°C).

The skin samples were cleaned mechanically from hair and fat, ground and finally extracted with ether and acetone. The amount of hydroxyproline was estimated (after conversion of the collagen to gelatine) according to NEUMANN and LOGAN⁴ and tyrosine according to

HEIDELBERGER and MACPHERSON⁵. The respective bone samples were similarly obtained from the thigh-bones. Bone salts were not removed.

The 'tyrosine'-content differed in bone gelatine between the lathyrus and control groups (means 0.28% and 0.17%, $P < 0.01$). This was not found in skin samples.

The non-collagenous residues contained very little hydroxyproline. There was no differences in the amount of 'tyrosine' in the skin samples, but again in the bone it was higher in the lathyrus than in the control group (means 0.35% and 0.25% respectively, $P < 0.10$). Against this background the decrease in the hydroxyproline in the bones is still more significant.

L. KALLIOMÄKI, MAIJA YLI-POHJA,
and E. KULONEN

Department of Medical Chemistry, University of Turku (Finland), August 5, 1957.

Zusammenfassung

Mit Wickendiät synthetisieren wachsende Ratten weniger Hydroxyprolin als Kontrollen, und die Zugfestigkeit des Narbengewebes ist vermindert. Der Wärmeschrumpfungspunkt des Collagens ist unverändert. In der Haut bleibt die Menge des Gelatin«tyrosins» gleich, während sie im Knochen anscheinend vermehrt ist.

⁵ M. HEIDELBERGER and C. F. M. MACPHERSON, Science 97, 405 (1943).

Ein neuer vorteilhafter Substitutionstypus
der Lokalanästhetika

Auf Grund von Erwägungen über die Bedeutung physikalisch-chemischer Eigenschaften für den Wirkungsmechanismus von Arzneimitteln wird bei der rationalen Synthese von Lokalanästhetika oft die Alkoxy-Substitution angewandt. Es soll durch Vergrößerung der Lipoidlöslichkeit die Wirksamkeit erhöht werden. Die geeignetste Länge der Alkoxykette liegt gewöhnlich bei C₂ bis C₄, höhere Derivate sind meist zu stark hydrophob (geringe Wasserlöslichkeit, Hydrolyse der Salze in Wasserlösung).

In Fortsetzung unserer Studien über lokalanästhetisch wirksame basische Ester der alkoxysubstituierten Arylcarbaminsäuren¹ haben wir im Bestreben, lipophile Derivate herzustellen, ohne ihre unvorteilhaften Eigenschaften, eine Reihe von Diäthylaminoäthylestern isomerer Phenoxy-, Benzyloxy- und Phenyläthoxycarb-

¹ This work forms a part of a program which has been aided by Reumaliitto (Society for Campaign against Rheumatic Diseases in Finland) and, technically, by the pharmaceutical manufacturers, Lääke Oy. Their help is gratefully acknowledged.

² J. E. MIELKE, J. J. LALICH, and D. M. ANGEVINE, Proc. Soc. exp. Biol. Med. N. Y. 94, 673 (1957).

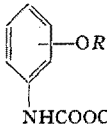
³ Sweet pea meal (*Lathyrus odoratus* Spencer) 56.0%
Casein 5.8%
Wet yeast (containing 27% dry matter) 5.8%
Sodium chloride 2.3%
Calcium carbonate 2.3%
Sucrose 27.7%
Each rat received daily 1 ml of following solution: 100 ml of olive oil, 1000 I.U. vitamin A, 30 I.A. vitamin D, 50 mg tocopherol and 6 mg vitamin K.

⁴ R. E. NEUMANN and M. A. LOGAN, J. biol. Chem. 186, 549 (1950); 184, 299 (1950).

¹ A. SEKERA, A. BOROVSÁKÝ, I. JAKUBEC, K. PALÁT und Č. VRBA, Českoslov. farm. 5, 388 (1956). – K. PALÁT, A. SEKERA und Č. VRBA, Chem. listy 51, 563 (1957); Exper. 12, 273 (1956).

	Hydroxyproline in % of defatted tissue	
	Skin	Bone
	Mean (range)	Mean (range)
Lathyrus group (5 rats)	7.80 (7.35–8.55)	1.84 (1.50–2.40)
Control group (4 rats)	8.51 (8.05–9.05)	2.31 (1.89–2.43)
P of change occurrence of the difference	< 0.10	< 0.05

Struktur und pharmakologische Wirkung der hergestellten Verbindungen

Präparat Nr.	 $\text{NHCOOCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{HCl}$	Schmelzpunkt °C	Berechnet Gefunden		Relative Wirksamkeit bei		LD 50 mg/kg
			% N	% Cl	Ober- flächen- anästhesie	Infiltra- tions- anästhesie	
	$R =$						
S 50	2-C ₆ H ₅	174,5	7,68 7,84	9,72 9,87	4,5	9,3	270
S 51	3-C ₆ H ₅	132	7,68 7,49	9,72 9,76	7,8	19,6	500
S 52	4-C ₆ H ₅	136-137	7,68 7,60	9,72 9,77	11,5	24	660
S 53	2-C ₆ H ₅ CH ₂	104-105	7,39 7,47	9,36 9,34	14,3	33	235
S 54	3-C ₆ H ₅ CH ₂	127-128	7,39 7,36	9,36 9,27	9,2	14,7	600
S 55	4-C ₆ H ₅ CH ₂	130-131	7,39 7,36	9,36 9,63	3,2	3,7	500
S 56 *	2-C ₆ H ₅ CH ₂ CH ₂	—	—	—	16,7	24	170
S 57	3-C ₆ H ₅ CH ₂ CH ₂	119	7,13 7,31	9,02 8,95	37	38,5	210
S 58	4-C ₆ H ₅ CH ₂ CH ₂	152	7,13 7,02	9,02 9,04	7,1	7,4	770
Cocain					1	3,6	125
Procain					0,15	1	630

* Die Substanz wurde nur in Form der flüssigen Base hergestellt und gereinigt (n_D^{25} : 1,5446).

Für C₂₁H₂₈O₃N₂ (356,5) berechnet: 70,76% C, 7,92% H, 7,86% N,
gefunden: 70,94% C, 7,85% H, 7,94% N.

anilsäuren synthetisiert. Die Strukturen der Substanzen sind aus der Tabelle ersichtlich.

Die Verbindungen wurden auf die übliche Weise² durch Reaktion entsprechender aromatischer Amine mit Phosgen und darauffolgende Überführung der entstandenen aromatischen Isocyanate mit Diäthylaminoäthanol in die betreffenden basischen Ester hergestellt. Die hierzu benötigten aromatischen Amine wurden durch katalytische Reduktion der entsprechenden Nitroderivate gewonnen, teils durch Reaktion der Phenolate mit Nitrophenylhalogeniden, teils durch Reaktion von Nitrophenolaten mit Aralkylhalogeniden. Die Endprodukte wurden in Form von Hydrochloriden dargestellt, mit Ausnahme des S 56, dessen Salz nicht in kristalliner Form erhalten werden konnte und darum als Base isoliert und gereinigt wurde. Die Hydrochloridlösung erhielten wir in diesem Fall durch Auflösen der Base in äquivalenter Menge verdünnter HCl.

Von allen basischen Estern prüften wir die Wirksamkeit bei Oberflächen- und Infiltrationsanästhesie und die Toxizität. Die Wirksamkeit bei Oberflächenanästhesie (Kaninchenhornhaut, Standard Cocain M/100) und Infiltrationsanästhesie (Meerschweinchen, intradermal, Standard Procain M/50) konnte durch Ermitteln und Vergleichen gleichwirksamer molarer Konzentrationen der getesteten Substanzen mit konstanten Konzentrationen der Standarde festgestellt werden³. Die Toxizität wurde nach KÄRBER⁴ durch Bestimmung der LD 50 an weissen Mäusen des H-Stammes nach subkutaner Verabreichung ermittelt.

Aus den Ergebnissen der pharmakologischen Prüfungen (Tabelle) ist ersichtlich, dass die hergestellten Substanzen bei relativ geringer Toxizität sowohl bei Oberflächen- als auch bei Infiltrationsanästhesie allgemein sehr wirksam sind. Als bestes Präparat erwies sich der *m*-Phenyläthoxycarbanilsäure-diäthylaminoäthylester (S 57), welcher nahezu 40mal wirksamer als Kokain bei Oberflächenanästhesie wie auch als Procain bei Infiltrationsanästhesie ist. Betrachtet man neben der Wirksamkeit auch die Toxizität der untersuchten Präparate, so zeigt den vorteilhaftesten therapeutischen Index der *p*-Phenoxycarbanilsäure-diäthylaminoäthylester (S 52), welcher bei Oberflächenanästhesie 11mal wirksamer als Kokain und bei Infiltrationsanästhesie 24mal wirksamer als Procain ist. Seine Toxizität ist dabei wie diejenige von Procain und etwas weniger als ein Fünftel der Toxizität des Kokains. Auf Grund von Versuchsergebnissen über die örtliche Verträglichkeit können einige Präparate zur klinischen Prüfung besonders für Oberflächenanästhesie empfohlen werden. Ausführliche experimentelle Ergebnisse des chemischen und pharmakologischen Teiles werden an anderer Stelle veröffentlicht.

J. SOVA, A. SEKERA und Č. VRBA

Institut für pharmazeutische Chemie der Masaryk-Universität und Pharmakologisches Institut der Fakultät für Veterinärmedizin, Brno (Tschechoslowakei), 25. Juni 1957.

Summary

Highly active and relatively little toxic local anaesthetics from the group of aroxy- and aralkoxycarbanilic acids were developed. The substances were tested for local anaesthetic activity in surface and infiltration anaesthesia.

² A. SEKERA, A. BOROVANSKÝ, I. JAKUBEC, K. PALÁT und Č. VRBA, Českoslov. farm. 5, 388 (1956). - A. SEKERA, I. JAKUBEC, J. KRÁL und Č. VRBA, Chem. listy 46, 762 (1952).

³ Č. VRBA und A. SEKERA, Arch. intern. Pharmacod. (im Druck).

⁴ G. KÄRBER in J. H. BURN, *Biologische Auswertungsmethoden* (Berlin 1937), S. 29.