

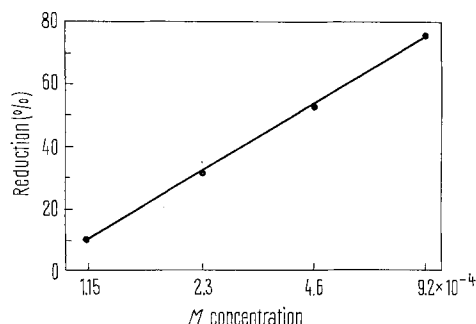
Action of Hydroxychloroquine on the Skeletal Muscle in vitro

GREWAL and SHARMA¹ showed that chloroquine, mepacrine, quinine and quinidine caused the depression of the contracture of the rectus abdominis produced by acetylcholine as well as the depression of the twitch tension and tetanus in the gastrocnemius sciatic preparations. We have studied the action of 4-aminoquinoline anti-malarial hydroxychloroquine (HCQ) on the isolated frog rectus abdominis stimulated by acetylcholine.

The frog rectus abdominis was suspended in a 10 ml bath containing frog Ringer solution. The effect of acetylcholine was observed by exposing the muscle to $5.5 \times 10^{-6} M$ acetylcholine in Ringer solution for 1.5 min. The acetylcholine solution was then replaced by Ringer solution and after 5 min the same procedure was repeated till 3 consecutive acetylcholine responses were equal. Then the bath was filled with the appropriate concentra-

tions of the drug in Ringer solution and left in contact with the muscle for 1 min. After this the acetylcholine was added and the effect was observed for 1.5 min. The addition of the fresh Ringer solution with acetylcholine was repeated every 5 min until the contraction returned to their original height. 5 experiments were made using 4 different molar concentrations of HCQ: 1.15×10^{-4} ; 2.3×10^{-4} ; 4.6×10^{-4} and 9.2×10^{-4} .

The effect of HCQ on the contracture produced by the frog rectus abdominis in response to acetylcholine administration is shown in the Figure. According to our results HCQ proved to have a dose-related inhibitory effect on the contraction of the frog rectus abdominis caused by acetylcholine. This effect is in agreement with the previously described influence of chloroquine¹ but differs from the influence of the further 4-aminoquinoline anti-malarial-amodiaquine which increases the tonus of isolated m. rectus abdominis of the frog and potentiates the effect of the later added acetylcholine².



The dose response curve of the average results of hydroxychloroquine on the frog rectus abdominis.

Zusammenfassung. Hydroxychloroquine vermindert die Acetylcholinwirkung am M. rectus abdominis des Frosches.

M. GRUNDMANN and MARTA HERBEROVÁ

Department of Pharmacology,
Palacký University, Olomouc (Czechoslovakia),
27 April 1970.

¹ R. S. GREWAL and M. L. SHARMA, Ind. J. med. Res. 48, 169 (1960).

² M. N. JINDAL and V. R. DESHPANDE, Arch. int. Pharmacodyn. 125, 448 (1960).

Das L-Isomere als teratogenes Prinzip der N-Phthalyl-DL-glutaminsäure

In unserer vorigen Mitteilung wurde gezeigt, dass N-Phthalyl-DL-glutaminsäure eine starke embryotoxische Wirkung bei der Maus (SWS) aufweist¹. Durch die vorliegende Untersuchung soll geklärt werden, ob die bei der racemischen N-Phthalyl-glutaminsäure festgestellte biologische Aktivität nur einem der optischen Isomere zukommt oder ob beide optisch aktiven Formen embryotoxisch sind. Die teratologische Prüfung erfolgt wieder an der SWS-Maus nach i.p. Injektion in Kombination mit Tween 20.

Zur Herstellung der optisch aktiven N-Phthalyl-glutaminsäuren bewährte sich die Phthalylierung mit N-Äthoxycarbonyl-phthalimid nach NEFKENS^{2,3}. Dieses einfache Verfahren ist den älteren Darstellungsmethoden⁴⁻⁷ vorzuziehen, da seine schonenden Bedingungen die Gefahr einer Racemisierung ausschliessen. Die spezifische Drehung der N-Phthalyl-glutaminsäuren sollte in Zukunft einheitlich in Dioxan bestimmt werden; wegen der Alkaliempfindlichkeit dieser Substanzen raten auch wir dringend davon ab, die polarimetrische Messung in wässriger Sodalösung vorzunehmen^{8,9}.

N-Phthalyl-L-glutaminsäure: Aus L-Glutaminsäure und N-Äthoxycarbonyl-phthalimid erhielt man in 64%iger Ausbeute ein Rohprodukt vom Smp. 154–156°, das noch zweimal aus Wasser umkristallisiert wurde: Smp. 160–161°; $[\alpha]_D^{25} = -48.3^\circ$ (c = 3.04; Dioxan).

N-Phthalyl-D-glutaminsäure: D-Glutaminsäure wurde unter den gleichen Bedingungen wie ihr L-Isomeres

phthalyliert (Smp. 155–156°; 65% d.Th.). Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Wasser waren die physikalischen Daten konstant. Die über P₂O₅ getrockneten farblosen Kristalle (taflig, mit quadratischem bis rechteckigem Umriss) schmolzen bei 160–161°. $[\alpha]_D^{25} = +48.1^\circ$ (c = 2.97; Dioxan). – Beide Isomere stimmten im chromatographischen Verhalten sowie im NMR- und UV-Spektrum mit authentischer N-Phthalyl-DL-glutaminsäure überein.

Einzelheiten über Tierhaltung, künstliche Besamung sowie die Methode der Schnittentbindung und Untersuchung auf embryotoxische Wirkung finden sich unter l.c.¹. Alle Verabreichungen erfolgten zwischen dem 7. bis

¹ F. KÖHLER und H. OCKENFELS, Experientia, im Druck (1970).

² G. H. L. NEFKENS, Nature 185, 309 (1960).

³ G. H. L. NEFKENS, G. I. TESSER und R. J. F. NIVARD, Recl Trav. chim. Pays-Bas Belg. 79, 688 (1960).

⁴ F. E. KING und D. A. A. KIDD, J. chem. Soc. 1949, 3315.

⁵ J. W. CLARK-LEWIS und J. S. FRUTON, J. biol. Chem. 207, 477 (1954).

⁶ H. HANSON und R. ILLHARDT, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 298, 210 (1954).

⁷ E. D. SCHILLING und F. M. STRONG, J. Am. chem. Soc. 77, 2843 (1955).

⁸ R. ST. TIPSON, J. org. Chemistry 21, 1353 (1956).

⁹ F. E. KING, J. W. CLARK-LEWIS und R. WADE, J. chem. Soc. 1957, 886.

Optische Isomere der N-Phthalyl-L-glutaminsäure: Prüfung ihrer embryotoxischen Wirkung in Kombination mit Tween 20

Gruppe Nr.	Verabreichte Substanz	Applikation am Tag p.c.	Dosis ^c	Muttertiere	Implantationen	Resorptionen		Feten Gesamt	Missgebildet M	M/F [%]
						I	R R/I [%]			
I	N-Phthalyl-L-glutaminsäure ^a	7	200 mg/kg	1	19	5	26,3	14	0	0
		7	400 mg/kg	2	28	14	50,0	14	1	7,1
		8	200 mg/kg	5	66	44	66,7	22	10	45,5
		9	100 mg/kg	4	56	9	16,1	47	3	6,4
		9	200 mg/kg	6	88	18	20,5	70	24	34,3
		9	400 mg/kg	9	121	65	53,7	56	50	89,3
		10	400 mg/kg	3	41	5	12,2	36	2	5,6
II	N-Phthalyl-D-glutaminsäure ^b	7	1600 mg/kg	5	75	5	6,7	70	0	0
		8	1600 mg/kg	5	64	3	4,7	61	0	0
		9	320 mg/kg	2	31	1	3,2	30	0	0
		9	640 mg/kg	4	53	1	1,9	52	0	0
		9	1280 mg/kg	5	67	3	4,5	64	0	0
		10	1280 mg/kg	3	38	1	2,6	37	0	0
III	Physiol. NaCl-Lösung	7, 8, 9 oder 10	40 ml/kg	25	341	9	2,6	332	0	0
IV	Physiol. NaCl-Lösung + Tween 20 (3:1)	7, 8, 9 oder 10	40 ml/kg	29	377	19	5,0	358	0	0
V	Normaltiere	—	—	20	256	9	3,5	247	0	0

^a Verabreicht als 2%ige Lösung in einer Mischung aus physiologischer Kochsalzlösung und Tween 20 im Verhältnis 3:1. ^b Konzentration der injizierten Lösungen: 2% am Tag 7 und 8, dagegen 3,2% am Tag 9 und 10 p.c.; Lösungsmittel: Mischung aus physiologischer Kochsalzlösung/Tween 20 = 3:1. ^c Die Verabreichung erfolgte als einmalige i.p. Injektion.

10. Tag p.c. durch intraperitoneale Injektion als einmalige Dosis.

Den Mäusen (SWS) in Gruppe I applizierten wir je 100, 200 bzw. 400 mg/kg N-Phthalyl-L-glutaminsäure als 2%ige Lösung in einer Mischung aus physiologischer Kochsalzlösung und Tween 20 im Verhältnis 3:1 (Tabelle).

Die Tiere der Gruppe II erhielten am 7. bzw. 8. Tag p.c. je 1600 mg/kg N-Phthalyl-D-glutaminsäure in Form einer 2%igen Lösung; an den Tagen 9 und 10 p.c. wurde eine 3,2%ige Lösung des D-Isomeren verabreicht, und zwar 320, 640 bzw. 1280 mg/kg am Tag 9 und 1280 mg/kg am Tag 10. Das Lösungsmittel war in beiden Fällen wieder physiologische Kochsalzlösung/Tween 20 = 3:1.

Zur Kontrolle des Lösungsmiteleinflusses injizierten wir den Mäusen in Gruppe III je 40 ml/kg physiologischer Kochsalzlösung und in Gruppe IV je 40 ml/kg der Mischung physiologische Kochsalzlösung/Tween 20 = 3:1. Die Normaltiere (Gruppe V) wurden wie die Versuchstiere gehalten und ebenfalls am Tag 18½ p.c. schnittentbunden.

Die Auswertung der Würfe ergab folgenden Befund: Die L-Form der N-Phthalyl-glutaminsäure (Gruppe I) zeigt an den Tagen 7 und 10 p.c. bei einer einmaligen Dosis von 400 mg/kg einen schwachen teratogenen Effekt; am 8. und 9. Tag treten schon mit 200 mg/kg bei mehr als 30% der Feten Missbildungen auf. Die Resorptionsraten aller Mäuse in Gruppe I sind gegenüber den entsprechenden Werten der Kontrolltiere (Gruppe IV) bei einseitiger Interpretation der Testgröße und Zugrundelegung der 5%-Sicherheitsgrenze statistisch signifikant erhöht¹⁰. Am Tag 10 p.c. hat die Injektion gleicher Substanzmengen einen wesentlich geringeren embryotoxischen Effekt als am Tag 9. Das D-Isomere der N-Phthalyl-glutaminsäure (Gruppe II) dagegen führt weder zu Missbildungen noch zu einer Steigerung der Resorptionen. Das negative Resultat für das D-Enantiomere bleibt selbst bei der Dosierung von 1600 mg/kg bestehen.

Als Missbildungsformen treten ausschliesslich Exencephalien auf, wenn die Applikation an den Tagen 7 oder 8 p.c. erfolgt. Bei den Feten, die den Applikationstagen

9 und 10 entstammen, finden sich Anomalien im Bereich der Wirbelsäule, der Rippen und der Extremitäten (überwiegend proximale Hemimelie, vereinzelt Phocomelie und Amelie¹¹); die Kopfregion ist hier unverändert. Die Missbildungen nach Verabreichung des L-Isomeren entsprechen auch sonst den nach racemischer N-Phthalyl-glutaminsäure¹ oder nach Thalidomid bei der SWS-Maus beobachteten Formen, deren detaillierte Beschreibung Gegenstand einer vergleichend anatomischen Untersuchung sein wird.

Wie die Versuchsergebnisse zeigen, besitzt ausschliesslich die L-Form der N-Phthalyl-glutaminsäure embryotoxische Aktivität, während das D-Isomere unter gleichen experimentellen Bedingungen keinen Einfluss auf die Frucht ausübt. Der embryotoxische Effekt der racemischen N-Phthalyl-glutaminsäure kann somit nicht auf die im D-Isomeren enthaltene körperfremde D-Glutaminsäure zurückgehen. Aufgrund der stereospezifischen Wirkung muss andererseits für N-Phthalyl-L-glutaminsäure ein enzymatischer Teilschritt in der zur Embryopathie führenden Reaktionskette angenommen werden.

Summary. The teratogenicity of optical antipodes of phthaloyl-glutamic acid, a metabolite of thalidomide, was determined by administering i.p. to pregnant mice. The injected solution contained Tween 20 as solubilizer. Under the conditions of experiment the L-isomer was found to be embryotoxic; whereas the D-form was devoid of any embryopathic properties.

H. OCKENFELS und F. KÖHLER

Institut für Humangenetik der Universität Bonn, Wilhelmsplatz 7, D-53 Bonn (Deutschland), 15. Juni 1970.

¹⁰ L. SACHS, *Statistische Auswertungsmethoden* (Springer, Berlin – Heidelberg – New York 1968).

¹¹ CH. A. SWINYARD, *Limb Development and Deformity: Problems of Evaluation and Rehabilitation* (Ch. C. Thomas, Springfield Ill. 1969), p. 525.