

Struktur und Wirkung des Muscarins, des Muscarons und ihrer Stereoisomeren

Die Konstitution und Konfiguration des Muscarins wurden erst kürzlich endgültig abgeklärt¹ und durch eine stereospezifische Synthese bewiesen². Gleichzeitig gelang es, auf einem andern Weg neben dem natürlichen Muscarin sämtliche Stereoisomerenpaare des Muscarins darzustellen³. Wir stellten für reines L-(+)-Muscarinchlorid eine etwas stärkere, im übrigen aber eine dem Acetylcholin sehr ähnliche Wirkung für die gleichen peripheren cholinergischen Rezeptoren fest⁴. An den ganglionären Synapsen ist die Wirkung des Muscarins viel schwächer und fehlt beinahe vollständig für die Endplatte⁵. Die Atomkette des Acetylcholins im Muscarinmolekül erklärt die ähnliche Wirksamkeit, und man kann die Besonderheiten der Muscarinwirkung zum Teil auf den voluminösen Tetrahydrofuranring beziehen⁶. Am starren Ringgerüst sind verschiedene Stellungen der Substituenten möglich, bei denen die Gruppen (Hydroxyl, Methyl, Methyltrimethylammonium), die wir für die pharmakologische Wirkung, das heisst die Bindung mit den Pharmorezeptoren⁷ der Zelle verantwortlich machen, in eine fest definierte Lage zueinander kommen. Es ist daher von besonderem Interesse, die Wirksamkeit der Stereoisomeren mit dem natürlich vorkommenden Muscarin und dessen synthetischem Razemat zu vergleichen.

An mit Dial-Nembutal i. p. narkotisierten Katzen wurden Blutdruck, Atmung, Muskelzuckungen nach Reizung des motorischen Nerven und Nickhautkontraktionen durch präganglionäre Sympathikusreizung registriert. Damit konnte die intravenöse Wirksamkeit der leicht wasserlöslichen Muscarinisomeren gleichzeitig auf verschiedene Synapsen (peripher parasymphatisch, ganglionär sympathisch, Muskelendplatten und Chemorezeptoren des Glomus caroticum) untersucht werden.

Das Ergebnis (Tabelle II) zeigt die ausserordentlich selektive Wirkung des natürlichen Muscarins und seines Razemats. Die Reihenfolge der Aktivitäten der verschiedenen Isomeren (Muscarin, Epiallo-Muscarin, Allo-Muscarin, Epi-Muscarin) ist für verschiedene Effekte, wie Blutdrucksenkung, spontane Nickhautkontraktion und Atmungsanregung gleich. Ganglienblockade und curareartige Lähmung der Skelettmuskulatur fehlen bei Dosen von 1–10 mg/kg Körpergewicht. Die peripher cholinergischen Synapsen sind bei allen Isomeren wie beim Muscarin gegenüber den ganglionären und besonders den Endplatten bevorzugt.

Muscaron und 4,5-Dehydromuscaron sind in dieser Hinsicht von Muscarin ganz verschieden. Sie wirken deutlich stärker cholinergisch als Muscarin oder Acetylcholin. Schon

mit relativ kleinen Dosen (20 µg/kg) wird bei atropinisierten Tieren das sympathische Ganglion cervicale superius teilweise blockiert, und mit wenig grösseren Mengen (30–50 µg/kg) folgt nach starken fasciculären Zuckungen eine depolarisierende Lähmung der Endplatten, welche durch Prostigmin verstärkt wird. Die Muscarone gleichen daher nicht nur in ihrer Konstitution, sondern auch in ihrer Wirkung viel mehr dem Acetylcholin als das Muscarin. Da es sich aber nicht um Ester handelt, die durch Cholinesterase leicht gespalten werden, ist der Effekt bei intravenöser Injektion stärker als mit Acetylcholin.

Die Prüfung der Muscarin-Verbindungen erfolgte auch mit isolierten Froschorganen, bei denen die minimale Dosis zur Verminderung der Herzamplitude um 1/4 mit Herzschlagverlangsamung und zur submaximalen Kontraktion des Musculus rectus abdominis, verglichen mit Acetylcholin und Muscarin, festgestellt wurde.

Das Ergebnis dieser Versuche (Tabelle I) bestätigt die bei Katzen gewonnenen Resultate. Die Muscarinisomeren sind viel weniger cholinergisch wirksam als natürliches Muscarin und ohne Wirkung auf die quergestreifte Muskulatur. Dagegen sind die Muscarone stark cholinergisch und auch nikotinisch wirksam und übertreffen beim Skelettmuskel das Acetylcholin.

Tabelle I
Wirksamkeit bei isolierten Froschorganen
(µg/ml Perfusions- oder Badflüssigkeit)

| | Herz, 1/4 Lähmung (muscarinisch) | Musc. rectus, submax. Kontraktion (nikotinisch) | Quotient nikotinisch/muscarinisch |
|----------------------------------|--|--|--------------------------------------|
| (+)-Muscarin-J | 0,018 | > 500 | > 30000 |
| d,l-Muscarin-J | 0,032 | > 500 | > 20000 |
| (+)-Nor-Muscarin-HCl | 5,0 | — | — |
| d,l-Epi-Muscarin-J | 214 | > 1000 | > 5 |
| d,l-Allo-Muscarin-J | 15 | > 1000 | > 65 |
| d,l-Epiallo-Muscarin-J | 12 | > 500 | > 40 |
| Acetylcholin-Cl | 0,002 | 5,0 | 2500 |
| (-)-Muscaron-J | 0,0075 | 2,5 | 330 |
| d,l-Muscaron-J | 0,01 | 2,5 | 250 |
| d,l-Allo-Muscaron-J | 0,02 | 1,5 | 75 |
| d,l-Dehydro-Muscaron-J | 0,01 | 0,9 | 90 |

Man kann durch Vergleichen der Wirkungsstärken die günstigste Stellung und gegenseitige Beziehung der pharmophoren Gruppen und damit die Molekülform angeben, die am cholinergischen Rezeptor vorliegt und am besten auf diesen passt (Abb.). Für Acetylcholin selbst ist dies nicht möglich, da das Molekül infolge freier Dreharbeit aller Kettenbindungen unendlich viele Formen annehmen kann.

Nach der Wirksamkeitstabelle ist jede cis-Stellung zwischen Hydroxyl- und Methyl- oder Methyltrimethylammongruppe mit einem mindestens 100fachen Aktivitätsverlust (Blutdrucksenkung) verbunden. Die Abnahme ist beim Epi-Muscarin, bei dem alle 3 Substituenten auf der gleichen Seite der Ringebene stehen, am stärksten, beim Allo-Muscarin mit cis-Stellung des grossen kationischen Kopfes mit der Oxygruppe etwas kleiner und beim Epiallo-Muscarin mit cis-Stellung der kleineren Methylgruppe am geringsten. Dies deutet auf eine sterische Behinderung der pharmophoren Funktion der Oxygruppe hin. Die Behinde-

¹ C. H. EUGSTER und P. G. WASER, Exper. 10, 298 (1954); Helv. chim. Acta 40, 888 (1957). — C. H. EUGSTER, Helv. chim. Acta 39, 1002, 1023 (1956). — F. KÖGL, C. A. SALEMINK, H. SCHOUTEN und F. JELLINEK, Rec. Trav. chim. 76, 109 (1957).
² E. HARDEGGER und F. LOHSE, Helv. chim. Acta 40, 2383 (1957). — H. C. COX, E. HARDEGGER, F. KÖGL, P. LIECHTI, F. LOHSE und C. A. SALEMINK, Helv. chim. Acta 41, 229 (1958).
³ C. H. EUGSTER, Helv. chim. Acta 40, 2462 (1957). — C. H. EUGSTER, F. HÄFLIGER, R. DENSS und E. GIROD, Helv. chim. Acta 41, 205, 583, 705, 886 (1958).
⁴ C. C. KUENZLE und P. G. WASER, Helv. physiol. Acta 16, 44 (1958).
⁵ P. G. WASER, Exper. 11, 462 (1955). — H. KONZETT und P. G. WASER, Helv. physiol. Acta 14, 202 (1956).
⁶ P. G. WASER, Schweiz. med. Wschr. 87, 577 (1957).
⁷ Zur Unterscheidung von anderen Rezeptoren (Chemorezeptor, Barorezeptor, usw.) soll der Begriff des Pharmorezeptors eingeführt werden.

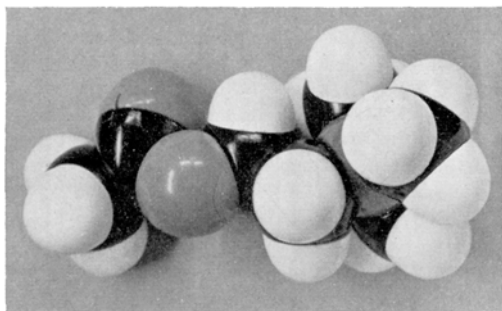
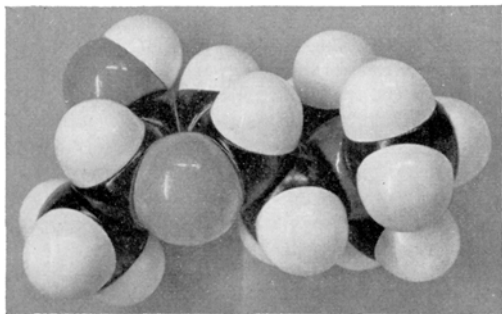
Tabelle II
Wirksamkeit bei Katzen intravenös (Minimaldosen µg/kg)

| | | Nicht atropinisiert: | | | | Atropinisiert: | | Wirkungs- index bezogen auf Blutdruck |
|-------------------------------------|--|----------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------|--------------------|--------------------|---|
| | | Blut- druck- senkung | At- mungs- ver- stärkung | Nick- haut- kontrak- tion | Saliv- ation | Ganglion- block | Muskel- lähmung | |
| (+)-Muscarin-J (natürliche Form) | | 0,004 | 0,02 | 1,0 | 1,0 | > 1000 | > 1000 | 1 |
| d,l-Muscarin-J (synthetisch) | | 0,01 | 0,05 | 1,2 | 2,0 | | | 2,5 |
| (+)-Nor-Muscarin-HCl | | 5,0 | 100 | 1000 | | > 10000 | > 10000 | 1250 |
| d,l-Epi-Muscarin-J | | 3,0 | 20 | 250 | 200 | 8000 | > 10000 | 750 |
| d,l-Allo-Muscarin-J | | 1,7 | 20 | 125 | 250 | > 10000 | > 10000 | 420 |
| d,l-Epiallo-Muscarin-J | | 1,0 | 10 | 50 | | > 500 | > 500 | 250 |
| Acetylcholin-Cl | | 0,01 | 1 | | | | | 2,5 |
| (-)-Muscaron-J | | 0,001 | 0,02 | 0,2 | 0,5 | 10 | 30 | 0,25 |
| d,l-Muscaron-J | | 0,0015 | 0,03 | 0,2 | | 20 | 40 | 0,3 |
| d,l-Allo-Muscaron-J | | 0,003 | 0,03 | 0,4 | 0,8 | 30 | 70 | 0,75 |
| d,l-Dehydro-Muscaron-J | | 0,0015 | 0,03 | 0,5 | 0,5 | 20 | 30 | 0,35 |

rung wird besonders deutlich, wenn man auch dem Äthersauerstoff eine pharmophore Funktion zuschreibt, indem dann Äther-O und Oxygruppe gleichzeitig möglichst nahe in Kontakt mit dem Rezeptor treten müssen. Jeder Substituent in *cis* zur Oxygruppe wird eine gleichzeitige Bindung der beiden pharmophoren Gruppen, abhängig von seiner Grösse, behindern.

Unsere Versuche zeigen daher, dass für die Muscarinwirkung Oxygruppe und Äthersauerstoff wesentlich sind. Ähnlich werden beim Muscaron und Acetylcholin die Carbonylgruppe (an Stelle der Oxygruppe) und der Äthersauerstoff an den Rezeptor gebunden, wodurch anscheinend die Selektivität bedeutend vermindert wird, indem zusätzlich ganglionäre und neuromuskuläre Syn-

apsen erregt und später blockiert werden. Für die Wirkung ist weiterhin die quartäre Trimethylammoniumgruppe, deren wirkungsverstärkender Einfluss beim tertiären Normuscarin fehlt (Tabelle II), absolut notwendig.



Stuartmodelle des natürlichen (+)-Muscarins (oben) und des Acetylcholins (unten).

Der kationische Stickstoff kann weder beim Acetylcholin noch beim Muscarin mit den beiden ersten pharmophoren Gruppen in eine gemeinsame Kontaktebene gebracht werden, da hier die N-Methylgruppen sterisch hindern. Dass mindestens 3 am Rezeptor haftende Gruppen notwendig sind, beweist auch die eindeutige Wirkungsspezifität der Antipoden, von denen nur eine der beiden Formen gleichzeitig mit 3 entsprechenden Rezeptorpunkten in Verbindung treten kann. Bei dem bis dahin untersuchten Muscarin ist die natürliche Form doppelt so wirksam wie das Racemat (*d,l*-Muscarin). (–)-Muscarin hat dementsprechend höchstens einige Prozent der Wirksamkeit des (+)-Muscarins³. Es ist anzunehmen, dass für die Antipoden der übrigen Stereoisomeren ähnliche Unterschiede existieren. Nur die untersuchten Muscarone scheinen in ihrer Wirkung wenig stereospezifisch zu sein.

Auch die Molekülgrösse spielt für die Wirkung eine bedeutende Rolle. Eine Vergrösserung des Ringes oder eine Verlängerung der «Acetylcholkette»⁸ vermindert die Aktivität bedeutend. Vielleicht ist auch die viel weniger selektive Wirkung des Muscarons Folge der etwas kleineren Molekülgrösse. Aus diesen Gründen muss man erneut schliessen, dass die Rezeptorgegend räumliche Form hat und nicht einfach planar gebaut ist⁶.

Muscarin besitzt damit 3 nachgewiesene pharmophore Gruppen, deren Stellung im Molekül wenigstens für 2 definiert ist. Das gleiche gilt auch für Acetylcholin, und alle Vorschläge für den Bau des cholinergischen Rezeptors werden darauf Rücksicht nehmen müssen.

⁸ P. G. WASER und C. H. EUGSTER, in Vorbereitung.

Für die Unterstützung dieser Arbeit danken wir der Fritz-Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz, sowie Herrn PD. Dr. C. H. EUGSTER, Universität Zürich, und Herrn Dr. F. HÄFLIGER der J. R. Geigy AG., Basel für die Überlassung der Muscarinverbindungen.

P. G. WASER

*Pharmakologisches Institut der Universität Zürich,
25. Juni 1958.*

Summary

All synthetic isomers of (+)-muscarine, the racemic forms of epi-muscarine, allo-muscarine, and epiallo-muscarine are at least 100 times less potent on blood pressure of cats and isolated frog hearts than the natural alkaloid. Only muscarones are more potent and exhibit strong nicotinic action on the frog rectus and in blocking ganglionic and neuro-muscular transmission in the cat. They closely resemble acetylcholine in their structure and action.

The activity of the isomers depends on the position of the constituents on the tetrahydrofurane ring. Steric hindrance of the hydroxy or carbonyl group and of ether-oxygen plays an important part in the contact with the cholinergic receptor. As nor-muscarine without the quarternary nitrogen is inactive, at least 3 different points of contact have to be considered. This is stressed by the fact that muscarine is highly stereospecific in its action, whereas muscarone is not.

Sul meccanismo della eptoformazione non ossidativa nel muscolo scheletrico

In una precedente nota¹ abbiamo riferito sulla eptoformazione non ossidativa a partire da glucoso-6-fosfato (G-6-P) e da fruttosio-6-fosfato (F-6-P), in estratti di muscolo scheletrico di ratto (trattati con carbone per eliminare i nucleotidi, presenti in forte concentrazione, e tra questi l'ATP, il TPN e il DPN).

Circa il meccanismo di tale eptoformazione, si poteva ammettere – come suggerito da BONSIGNORE² – che essa fosse dovuta a reazioni transaldolasiche e transchetolasiche, tra il substrato aggiunto (G-6-P o F-6-P), e un metabolita (per esempio trioso-fosfato), presente già in tracce nell'estratto, e rigenerantesi nel corso delle reazioni stesse di interconversione glicidica. La concentrazione di questo metabolita (trioso-fosfato), nell'estratto, sarebbe stato quindi fattore limitante della modica eptoformazione verificatasi.

Per suffragare questa ipotesi, abbiamo pensato di vedere se si aveva un aumento della eptoformazione aumentando la concentrazione del trioso-fosfato. A tale scopo, abbiamo aggiunto alle nostre prove enzimatiche il fruttosio-1,6-difosfato (F-1,6-P)³, il quale, per azione aldolasica, si sarebbe scisso in trioso-fosfati. Questi, d'altra parte, nelle nostre condizioni, non potevano essere sottratti alla eptoformazione dalla via glicolitica, perchè impediti dalla mancanza di DPN (adsorbito dal carbone) e dalla presenza di acido monoiodoacetico, inibitore della trioso-fosfato-deidrase.

¹ V. MORET e S. SPERTI, *Exper.* 14, 309 (1958).

² A. BONSIGNORE, S. PONTREMOLI, G. FORNAINI e E. GRAZI, *G. Biochimica* 6, 241 (1957).

³ Nelle nostre prove, il F-1, 6-P non poteva formarsi per azione fosfochinasi a partire da F-6-P (o G-6-P), a causa della mancanza di ATP nel mezzo.