

Die am Kern nicht weiter substituierten Pyridin-4-carbonsäure-Ester haben sich als völlig unwirksam erwiesen. Sie zeigen in dieser Hinsicht ein gleiches Verhalten wie die Pyridin-3-carbonsäure- und Chinolin-4-carbonsäure-Ester. Bei den entsprechenden Pyridin-4-carbonsäure-Amiden dagegen beginnt sich eine — wenn auch sehr schwache — Oberflächenwirkung abzuzeichnen. Sie erreicht aber diejenige des Cocains bei weitem noch nicht.

Dagegen führt die Einführung einer Alkoxy-Gruppe an den Pyridinring, sowohl bei den Estern als auch den Amiden der 2-Monoalkoxy-pyridin-4-carbonsäure, zu einer beträchtlichen Wirkungssteigerung. Die Amide erwiesen sich auch in dieser Reihe deutlich wirksamer als die entsprechenden Ester.

Die 2,6-Dialkoxy-Derivate sind allgemein nochmals wirksamer als die Monoalkoxy-Verbindungen. Erneut wirken die Amide erheblich stärker lokalanästhetisch als die entsprechenden Ester. In den Substanzen Nr. 736 und Nr. 721 fanden wir lokalanästhesierende Stoffe, welche $4\frac{1}{2}$ bzw. 6mal stärker wirken als Cocain bzw. Novocain. Interessant ist, darauf hinzuweisen, dass die Verlängerung des Alkoxy-Restes in 2- und 2,6-Stellung zu einer wesentlichen Wirkungssteigerung bis zum Butoxy-Rest führt, worauf die Amyloxy-Derivate wieder durchwegs weniger wirksam sind. Diese Beziehungen sind auch von *Miescher*¹⁾ bei den 2-Alkoxy-chinolin-4-carbonsäure-Derivaten angetroffen worden. Beim 2-Butoxy-chinolin-4-carbonsäure-diäthyläthylendiamid (Percain) ist ebenfalls das Wirkungsoptimum erreicht.

Da die als gut lokalanästhetisch wirksam erkannten Verbindungen durchwegs Gewebsreizungen verursachen, musste auf ihre klinische Auswertung verzichtet werden.

Pharmazeutisches Institut der
Eidg. Techn. Hochschule, Zürich.
Wissenschaftliche Forschungsabteilung
der *Dr. A. Wander AG.*, Bern.

63. Der neuro-regenerative Wuchsstoff „NR“.

3. Mitteilung^{2) 3)}

von **B. Koechlin** und **A. von Muralt**.

(22. I. 47.)

Wird ein Nerv durchtrennt, so verfallen die von ihren Zellen abgeschnittenen peripheren Stücke der Degeneration unter Verlust ihrer normalen Funktionen und unter charakteristischen Veränderungen des histologischen und chemischen Aufbaues, vgl.⁴⁾ Vom zentralen Stück aus setzt nach einiger Zeit die langsame Regeneration ein, durch Aussprossen neuer Fasern, die in die alten Nervenbahnen einwachsen und diesen folgend bis zur Peripherie vordringen.

Wie wir schon in unseren früheren Arbeiten²⁾³⁾ mitgeteilt haben, gelang, es aus nervösem Material Extrakte herzustellen, die bei intra-

¹⁾ *Miescher*, Helv. 15, 172 (1932).

²⁾ 1. Mitt. *M. Jent*, *B. Koechlin*, *A. v. Muralt* und *Th. Wagner-Jauregg*, Schweiz. med. Wschr. 75, 317 (1945).

³⁾ 2. Mitt. *B. Koechlin* und *A. v. Muralt*, Helv. physiol. acta 3, C. 38 (1945).

⁴⁾ *A. v. Muralt*, Die Signalübermittlung im Nerven, Verlag *Birkhäuser*, Basel, 1946.

peritonealer Applikation am Kaninchen in sehr kleinen Mengen die Regeneration der sensiblen Nerven in der Kaninchen-Hornhaut (Cornea) beschleunigen. Wir haben den für diese Wirkung verantwortlichen Stoff vorläufig als den neuro-regenerativen Wuchsstoff „NR“ bezeichnet. Der besondere Test, um die Wirksamkeit zu prüfen (Cornea-Test) ist durch *Jent*¹⁾ am Hallerianum ausgearbeitet worden und hat es ermöglicht, nach dem Wuchsstoff zu suchen. In der vorliegenden Arbeit sollen die bisherigen Resultate der chemischen Bearbeitung des Wuchsstoffes „NR“ mitgeteilt und diskutiert werden. Es scheint aber angezeigt, auch an dieser Stelle etwas über den Test auf den sich die Arbeiten stützen, seine Leistungsfähigkeit und seine Grenzen zu sagen.

Der Cornea-Test.

Ausführung: Die radiär einstrahlenden sensiblen Nerven der Kaninchen-Cornea werden durch einen circulären, bis zur *Descemet*'schen Membran geführten Schnitt durchtrennt. Die innerhalb des Narbenringes liegenden Fasern degenerieren in 3—5 Tagen. Die Sensibilität der Cornea geht gleichzeitig verloren. Der Verlust wird am Aussetzen des Lidschlagreflexes beim Bestreichen der Hornhaut mit einem Tasthaar geprüft. Das Einsprossen neuer Fasern erfolgt nach 13—30 Tagen am innern Narbenrand und ihr Fortschreiten kann mit Hilfe des Tasthaares zeitlich verfolgt werden. Als Testwert gilt der Mittelwert in Tagen, von der Durchschneidung an bis zum Auftreten der ersten deutlichen Sensibilität innerhalb des Narbenrandes gerechnet, an einer Gruppe von 5 Tieren gemessen.

Der Corneatest wird den folgenden, an einen brauchbaren Nervenregenerationstest zu stellenden Anforderungen gerecht: 1. Er ermöglicht ein direktes Beobachten der Regenerationsvorgänge in vivo durch das natürliche Fenster, die Cornea.

2. Er erfordert zur Nervendurchtrennung einen unter Lokalanästhesie durchführbaren operativen Eingriff, der die gegenseitige Lage der durchtrennten Nerven sehr wenig verändert.

3. Die wiedereinsetzende Regeneration lässt sich an Hand der Sensibilität eindeutig und reproduzierbar feststellen. Fragliche Testresultate sind durch vitale Anfärbung mit Methylenblau mit Hilfe des Spaltlampenmikroskopes nachprüfbar.

Er hat aber folgende Nachteile:

1. Das Kaninchen ist ein labiles Versuchstier. Die Aufrechterhaltung des einwandfreien Gesundheitszustandes erfordert sorgfältige Ernährung und Pflege. Die Anzahl der gleichzeitig im Versuch stehenden Tiere ist beschränkt, d. h. es können nur relativ wenig chemische Fraktionen gleichzeitig geprüft werden und man ist gezwungen, mit kleinen Versuchsgruppen, meistens nur Gruppen von 5 Tieren, für jeden Ansatz auszukommen.

2. Die relativ lange Dauer bis zur Feststellung des Ergebnisses hemmt die Arbeit des Chemikers. Je nachdem verstreichen 8—20 Tage bis das Resultat vorliegt.

¹⁾ *M. Jent*, *Helv. physiol. acta* **3**, 65 (1945).

Prüfung und Bewertung der Extrakte.

Ausführung der Prüfung: Die Extrakte werden an Versuchsgruppen von 5, in wichtigen Fällen von 10 Kaninchen geprüft. Jedem Tier vom ungefähren Gewicht von 1500 g wird täglich vom Tag der Operation an 1 cm³ einer mit Kochsalz isotonisch gemachten wässrigen Lösung des zu prüfenden Extraktes intraperitoneal injiziert. Als Testwert gilt der Durchschnittswert der bei den 5 Versuchstieren gefundenen Regenerationszeiten. Die Einzelwerte werden ebenfalls angegeben, da die Grösse ihrer Streuung einen weiteren wichtigen Anhaltspunkt für die Bewertung eines Extraktes bietet. Kontrollwerte: In regelmässigen Zeitabständen werden Kontrollgruppen angesetzt, bei denen täglich 1 cm³ einer isotonischen Kochsalzlösung injiziert wird. Auffallend ist bei den Kontrollgruppen die grosse Streuung der Einzelwerte. Bis jetzt sind 800 Operationen mit gutem Erfolg für den Corneatest ausgeführt worden.

„NR“-Wirkung: Die wirksamen Extrakte verkürzen die Regenerationszeit auf 6–11 Tage. Dies bedeutet gegenüber den Kontrollwerten eine Verkürzung um das 1,5–5fache. Geringe Streuung der Einzelwerte sind für wirksame Extrakte charakteristisch, ferner ein besonders eindeutiges Einsetzen der Sensibilität innerhalb des Narbenrandes und ein rasches Fortschreiten der Regeneration unter Bildung eines dichten Fasernetzes.

Geringe Wirksamkeit der Extrakte äussert sich in einer Zunahme der Durchschnittswerte unter gleichzeitiger charakteristischer Zunahme der Streuung der Einzelwerte. Neben guten Werten werden bei solchen Extrakten einzelne, aus der Reihe springende relativ hohe Werte angetroffen. Allgemein bedeuten Testwerte von 6–11 Tagen sichere, mehr oder weniger ausgeprägte Wirksamkeit, Werte von 13–16 Tagen fragliche und höhere Werte keine Wirksamkeit.

Vorkommen des „NR“-Stoffes.

Wirksame Extrakte lassen sich aus peripheren Nerven, Rückenmark und Gehirn bereiten. Der Stoff wird vorwiegend in der weissen Substanz des Gehirns angetroffen. Analog hergestellte Extrakte aus der zellreichen grauen Substanz sind nur wenig wirksam.

Tabelle.

Substanz	Durchschnitt	Einzelwerte in Tagen
Kaninchengehirn, Brei	7,4	(7, 7, 7, 8, 8)
Kalbsgehirn, Dialysat	6,2	(6, 6, 6, 6, 7)
Kalbsgehirn, weisse Subst.	6,2	(6, 6, 6, 6, 7)
Kalbsgehirn, graue Subst.	12	(6, 6, 14, 14, 20)
Ischiadicus, Brei	10,9	(7, 8, 8, 8, 9, 11, 12, 15, 15, 16)
Kalbsthymus, Brei	10,8	(7, 10, 11, 13, 13)
Kalbsthymus, Dialysat	11,2	(6, 6, 9, 17, 18)
Kalbs-Milz, Dialysat	17,2	(12, 16, 19, 22)
Kalbs-Leber, Dialysat	16,6	(13, 16, 17, 17, 20)
Die Extrakte aus Milz und Leber werden als unwirksam zum Vergleich angeführt.		

Aufarbeitung und Bereitung der Extrakte.

Die Gehirne werden möglichst frisch nach der Schlachtung mit Kleinhirn und Medulla entnommen und anschliessend im Kühlraum bei 4° verarbeitet. Nach Entfernung der Pia Mater und der grössten Blutgefässe lässt sich das zerleinerte Gehirn im Mörser zerreiben und mit Wasser oder isotonischer Kochsalzlösung zu einem leicht injizierbaren Brei anteigen. Gründliche Zerkleinerung und guter Aufschluss der Zellen sind von grossem Einfluss auf die Wirksamkeit der Extrakte. Dies lässt sich schon durch kräftiges, anhaltendes Verreiben, vor allem aber durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen des Materials erreichen.

Die Dialyse: Die Dialyse hat sich zur Gewinnung wirksamster Extrakte bisher als die beste und zweckmässigste Methode erwiesen. Sie ermöglicht eine schonende, vollständige Abtrennung des „NR“-Stoffes von den Lipoiden und Proteinen. Die Dialysate sind wasserklare, in konzentrierter Form leicht gelbstichige Lösungen. Wird der Gehirnbrei längere Zeit dialysiert, so geht die Aktivität fast vollständig ins Dialysat über.

Rückstand 17,8 (8,9,22,24,26)

Dialysat. 9,4 (8,7,9,9,14)

Es handelt sich folglich beim aktiven Stoff „NR“ um eine wasserlösliche, niedermolekulare, nicht eiweissartige Substanz, die im Gehirn vorkommt. Es ist möglich, dass der „NR“-Stoff im Verlauf der Dialyse auf fermentativem Wege freigesetzt wird.

Wird der Gehirnbrei bei 35° unter aseptischen Bedingungen einer energischen Autolyse unterworfen, so büsst er seine Wirksamkeit vollständig ein. Der Wuchsstoff wird unter diesen Bedingungen zerstört: Er unterscheidet sich somit deutlich von den von *Henschen*¹⁾ beschriebenen regenerationsfördernden Wuchsstoffen, die aus Geweben verschiedener Art durch Autolyse gewonnen werden können.

Hirn-Autolysat 18,6 (13, 15, 18, 19, 28).

Verdünnungskurve.

Die Wirksamkeit der Dialysate ist von ihrer Verdünnung in charakteristischer Weise abhängig. In Fig. 1 ist eine solche Verdünnungskurve wiedergegeben. Bei relativ hohen Konzentrationen kommt die Wirksamkeit des Dialysates noch nicht vollständig zur Auswirkung, sondern erreicht erst nach einer gewissen Verdünnung ihren maximalen Wert. Wird das Dialysat über diese optimale Konzentration hinaus weiter verdünnt, so klingt die Wirksamkeit allmählich ab, ist aber auch noch in sehr grossen Verdünnungen erkennbar.

Die Tatsache, dass die Wirksamkeit bei Verdünnung steigt, steht wohl kaum mit einer Überdosierung in Zusammenhang. Sie muss eher mit der Annahme erklärt werden, dass im Extrakt Hemmstoffe vorkommen, deren Wirkung bei Verdünnung rascher abklingt, als die des „NR“-Stoffes.

Anti-NR-Stoffe: Es zeigte sich im Verlauf unserer Arbeit, dass gründlicher Aufschluss des Ausgangsmaterials und erschöpfende Dialyse allein gute Wirksamkeit eines Dialysates nicht gewährleisten. Es fiel uns auf, dass die wirksamsten Dialysate gerade diejenigen waren, die beim Einengen Temperaturen von über 35° ausgesetzt waren, während die sorgfältig bei weniger als 35° eingeeengten Dialysate meist wenig oder überhaupt nicht aktiv waren. Wenig aktive, bei tiefer Temperatur eingeeengte Dialysate konnten durch nachträgliches Erhitzen in aktivere übergeführt werden. Wir haben

¹⁾ *C. Henschen*, Schweiz. med. Wschr. **59**, 1239 (1929).

in unserer ersten Mitteilung gezeigt, dass es Stoffe gibt, die die Nervenregeneration sogar hemmen können. Solche Hemmstoffe können auch in Organextrakten neben den regenerationsstimulierenden Stoffen in wirksamen Mengen vorkommen. Es ist denkbar, dass der Anti-NR-Stoff bei Verdünnung stärker inaktiviert wird als der NR-Stoff, und dass sich aus diesem Grund das Gleichgewicht zu Gunsten des NR-Stoffes verschiebt.

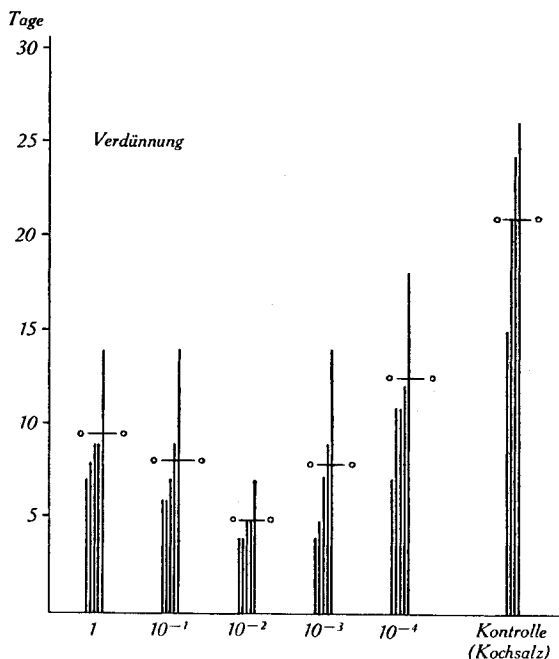


Fig. 1.

Ergebnis des Corneatestes mit 5 verschiedenen Verdünnungen des gleichen Gehirndialysates. Als Kontrolle sind die Ergebnisse einer mit Kochsalzlösung injizierten Versuchsgruppe aufgezeichnet. Ordinate: Anzahl der Tage bis zum Einsetzen der Regeneration. Abszisse: Verdünnung.

Eigenschaften des Stoffes „NR“.

Beständigkeit: Der Stoff „NR“ ist nicht absolut thermostabil. Er wird bei 1stündigem Kochen in neutraler wässriger Lösung zerstört, hingegen verträgt er mehrstündiges Erhitzen auf 50° ohne wesentlich an Wirksamkeit einzubüßen.

Die Haltbarkeit der Lösungen beim Stehen ist stark vom p_H abhängig. Bei einem p_H von 7,2 war die Wirksamkeit bereits nach zwei Monaten verschwunden, während sich eine andere Lösung von einem p_H von 6—6,5 über drei Monate hielt. Es gelingt, durch Eindampfen einer bei 20° sorgfältig voreingeengten Lösung im gefrorenen Zustand im Hochvakuum ein aktives, pulveriges Trockenpräparat herzustellen.

Gegen Säure ist „NR“ in der Kälte beständig. Es wird durch 20stündiges Stehen mit 0,1-n. HCl nicht zerstört.

Gegen Alkali ist „NR“ nur beschränkt beständig. 20-stündiges Stehen in 0,1-n. NaOH hat einen gewissen Aktivitätsverlust zur Folge. Aktivitätsverlust beim Durchleiten von Sauerstoff durch die wässrige Lösung liess sich nicht feststellen. Trotzdem werden die Dialysate stets unter Kohlendioxyd eingeengt und unter reinem Stickstoff,

in Ampullen eingeschmolzen, aufbewahrt. Auch die Berührung mit Schwermetall wird während der ganzen Aufarbeitung vermieden.

Löslichkeit: Der Stoff „NR“ ist in 90-proz. Alkohol vollständig löslich. Er lässt sich auf Grund dieser Eigenschaft von Salzen, Phosphaten und andern alkoholl unlöslichen Stoffen trennen und so aus den Dialysaten anreichern. Der Stoff verliert bei längerem Stehen in alkoholischer Lösung seine Wirksamkeit.

In 90-proz. Aceton ist der Stoff „NR“ nur wenig löslich. Nach mehrfachem Ausfällen aus wässriger Lösung mit der 9-fachen Menge Aceton scheint die Wirksamkeit auf die acetonal unlösliche und die lösliche Fraktion verteilt zu sein. In Estern, Äther, Benzol und Petroläther ist der „NR“-Stoff unlöslich. Der „NR“-Stoff wird bei p_H 2 an Frankonit adsorbiert.

Durch Bleiacetat wird „NR“ in alkalischer Lösung zum Teil ausgefällt. Ausfällen der Silbersalze mit Silbernitrat bei p_H 8 hat ein Verschwinden der Wirksamkeit zur Folge. Weder das Filtrat, noch das Ausgefällte sind wirksam. Es ist noch nicht möglich, zu entscheiden, ob „NR“ ein einziger Stoff ist oder eine Gruppe von Stoffen darstellt.

Wirksamkeit des Stoffes „NR“.

Das Dialysat zeigt eine Wirksamkeit, die auf die Gehirnefeuchtsubstanz zurückgerechnet einer Ausgangsmenge von 1 mg pro Injektion von 1 cm³ am Versuchstier entspricht. Dies bedeutet, dass der NR-Stoff in ausserordentlich kleinen Mengen vorkommt und wirksam ist. Seine regenerative Wirkung entfaltet er unabhängig vom Ort der Injektion. Intraperitoneale oder subcutane Injektion bringt den Wirkstoff, vermutlich auf dem Blutwege, in das Operationsgebiet und führt dort zu einer wesentlichen Beschleunigung der Regeneration.

Hallerianum, Bern.

64. Krystallisiertes, synthetisches Pyridoxal-acetal-phosphat als Coferment von *l*-Aminosäuren-decarboxylasen

von P. Karrer und M. Viscontini.

(29. I. 47.)

Pyridoxal-phosphat ist in letzter Zeit als Coferment zahlreicher Enzyme angesprochen worden. Man hält es für das Coferment der *l*-Tyrosin-decarboxylase¹⁾, der *l*-Lysin-decarboxylase²⁾, der *l*-Arginin-decarboxylase³⁾, der *l*-Glutaminsäure-decarboxylase³⁾, der *l*-Ornithin-decarboxylase⁴⁾, der *l*-Dioxyphenylalanin-decarboxylase⁴⁾, der Trans-

¹⁾ Gunsalus, Bellamy, Umbreit, J. Biol. Chem. **155**, 685 (1944). — Bellamy, Umbreit, Gunsalus, J. Biol. Chem. **160**, 461 (1945).

²⁾ Baddiley, Gale, Nature **155**, 727 (1945).

³⁾ Umbreit, Gunsalus, J. Biol. Chem. **159**, 333 (1945).

⁴⁾ Lichstein, Gunsalus, Umbreit, J. Biol. Chem. **161**, 311 (1945).