

Aus dem Pharmakologischen Laboratorium der Sandoz AG., Basel

Über die Wirkungsdauer einiger Serotoninantagonisten

Von B. Berde, W. Doepfner und A. Cerletti

Eingegangen am 22. Juni 1960

(2 Abbildungen)

Das vor allem durch seine psychotrop-halluzinogene Wirkung charakterisierte D-Lysergsäure-diäthylamid [13, 15] – bezeichnet auch als LSD 25 oder Delysid – zeigt auch im Tierexperiment zentralnervöse Effekte [1, 2, 8, 10–11, 16, 17, 18], welche bis zu einem gewissen Grade mit den beim Menschen beobachteten Symptomen in Beziehung gesetzt werden können. Daneben weist jedoch diese Substanz als prägnante periphere Eigenschaft einen spezifischen Antagonismus gegenüber dem körpereigenen Wirkstoff Serotonin (5-Hydroxytryptamin) auf [5], dessen eventuelle Beziehungen zum psychotomimetischen LSD-Syndrom allerdings noch unklar sind. Bei der systematischen Untersuchung einer größeren Reihe von mit LSD verwandten Lysergsäurederivaten zeigte es sich, daß eine Anzahl dieser Verbindungen am isolierten Rattenuterus ebenfalls eine beträchtliche serotoninhemmende Aktivität aufweist [3]. Eine eingehendere Analyse ergab – wie schon bei der Prüfung anderer Serotoninantagonisten [6] – außer den quantitativen Differenzen auch Unterschiede im Wirkungstypus, welche vor allem den zeitlichen Verlauf dieses in vitro-Effektes betrafen [3].

b Aus diesem Grunde wurde die Wirkungsdauer bzw. der Charakter des zeitlichen Verlaufes des serotoninhemmenden Effektes von D-Lysergsäurediäthylamid-Tartrat (LSD 25), 1-Acetyl-D-Lysergsäure-diäthylamid-Bitartrat (ALD 52), 2-Brom-D-Lysergsäure-diäthylamid-Bitartrat (BOL 148) und N-Methyl-D-Lysergsäure-butanolamid-Tartrat (UML 491) auch nach in vivo-Verabreichung untersucht. Als Tests dienten die Serotoninempfindlichkeit des Rattenuterus sowie das durch Serotonin hervorgerufene Ödem der Rattenpfote.

Methodik

A. *Serotoninempfindlichkeit des Rattenuterus.* In dieser Versuchsanordnung wurden LSD und UML geprüft. Rattenweibchen von 180–200 g Gewicht, welche 24 h vorher mit 200 µg/Tier Stilboestrol i.m. vorbehandelt wurden, erhielten 200 µg/kg¹ LSD

¹ Alle Dosisangaben beziehen sich auf die oben angegebenen Salze der Wirkstoffe.

s.c. bzw. 80 $\mu\text{g/kg}$ UML s.c. Nach verschiedenen Zeitabständen (56 sec², 1 min 52 sec, 3 min 45 sec, 7 min 30 sec, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h³, 32 h³, 64 h³) wurden die Tiere getötet und die Uteri in vitro unter den üblichen Versuchsbedingungen [7] untersucht. Die Serotoninempfindlichkeit wurde wie folgt geprüft: 15 min nach Einhängen der Uteri in das Organbad wurde eine einzige Dosis von Serotoninkreatininsulfat verabreicht und festgestellt, ob das Organ mit einer Kontraktion reagiert oder nicht. Die Testdosen von Serotonin waren 1,25³; 2,5; 5; 10 und 20 $\mu\text{g/l}$.

Die Wirkung von LSD und UML wurde in zwei Versuchsserien in gleicher Weise geprüft: Jede der oben erwähnten Serotindosen wurde je 10 Uteri von 5 vorbehandelten Tieren und 10 Uteri von 5 nicht vorbehandelten Kontrolltieren verabreicht. Die Bewertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der χ^2 -Methode, wobei die Häufigkeit der positiven Reaktionen (serotoninbedingte Kontraktion) in der vorbehandelten Gruppe derjenigen in der Kontrollgruppe gegenübergestellt wurde.

B. Serotoninödem der Rattenpfote. In dieser Versuchsanordnung wurden alle vier eingangs erwähnten Lysergsäurederivate (LSD, ALD, BOL und UML) untersucht. Es ist bekannt [12], daß die Injektion kleiner Serotoninmengen in die Rattenpfote zur Entwicklung eines intensiven, lokalen Ödems führt. Dieses Phänomen ist für die quantitative Erfassung von serotoninhemmenden Effekten in vivo geeignet. Das in unserem Laboratorium übliche Verfahren, welches auch in diesen Untersuchungen angewendet wurde, ist an anderer Stelle [4] ausführlich beschrieben. Die zu prüfenden Serotoninantagonisten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h⁴) vor der Auslösung des Ödems i.v. verabreicht. Mit LSD wurden zudem Versuche durchgeführt, in welchen dieser Stoff lokal in die Pfote (Injektionsvolumen 0,1 ml) verabfolgt wurde. Die Wirkung der Substanzen wurde durch die ED₅₀ charakterisiert, d. h. durch die Dosis, welche erforderlich ist, um die Pfotenschwellung um 50% zu hemmen. Zu diesem Zweck wurde für die oben angegebenen Zeitpunkte mit 3 verschiedenen Dosen des betreffenden Wirkstoffes, welche an je mindestens 12 Tieren geprüft wurden, eine Dosis-Wirkungskurve erstellt, aus welcher die ED₅₀ graphisch ermittelt wurde.

Resultate

A. Serotoninempfindlichkeit des Rattenuterus. 5 $\mu\text{g/l}$ und 10 $\mu\text{g/l}$ Serotonin erwiesen sich als besonders geeignete Testdosen, da sie bei den Kontrolltieren in nahezu allen Fällen zu einer Kontraktion führten. 1,25 $\mu\text{g/l}$ und 2,5 $\mu\text{g/l}$ haben auch in der Kontrollgruppe nur bei relativ wenig Uteri eine Kontraktion hervorgerufen, stellten somit einen zu schwachen Reiz dar. 20 $\mu\text{g/l}$ andererseits bewirkten sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei der vorbehandelten Ratten fast immer eine Uteruskontraktion, d. h. erwiesen sich für diese Untersuchungen als ein zu starker Reiz.

Im mittleren Dosisbereich (5 $\mu\text{g/l}$ und 10 $\mu\text{g/l}$) reagierten die Uteri der mit LSD oder UML vorbehandelten Tiere während einer gewissen Periode nach Verabreichung dieser Wirkstoffe seltener auf Serotonin als diejenigen der Kontrolltiere. Dies wird als Manifestation eines serotoninantagonistischen Effektes gewertet. Die zahlenmäßigen Angaben sind aus Abb. 1 ersichtlich,

² Nur in den Versuchen mit UML;

³ Nur in den Versuchen mit LSD;

⁴ Nur in den Versuchen mit LSD und UML.

welche die relative Häufigkeit der positiven Reaktionen (Uteruskontraktion) in Abhängigkeit von der Vorbehandlungszeit zeigt.

Das obere Kurvenpaar in dieser Abbildung bezieht sich auf Versuche mit LSD. Es ist ersichtlich, daß die Uteri der vorbehandelten Tiere während der Zeitspanne von 7 min 30 sec bis 8 h nach in vivo-Verabreichung des Wirkstoffes seltener auf Serotonin angesprochen haben als die der Kontrolltiere. Mit Ausnahme des 15 min-Wertes sind alle Unterschiede in der erwähnten

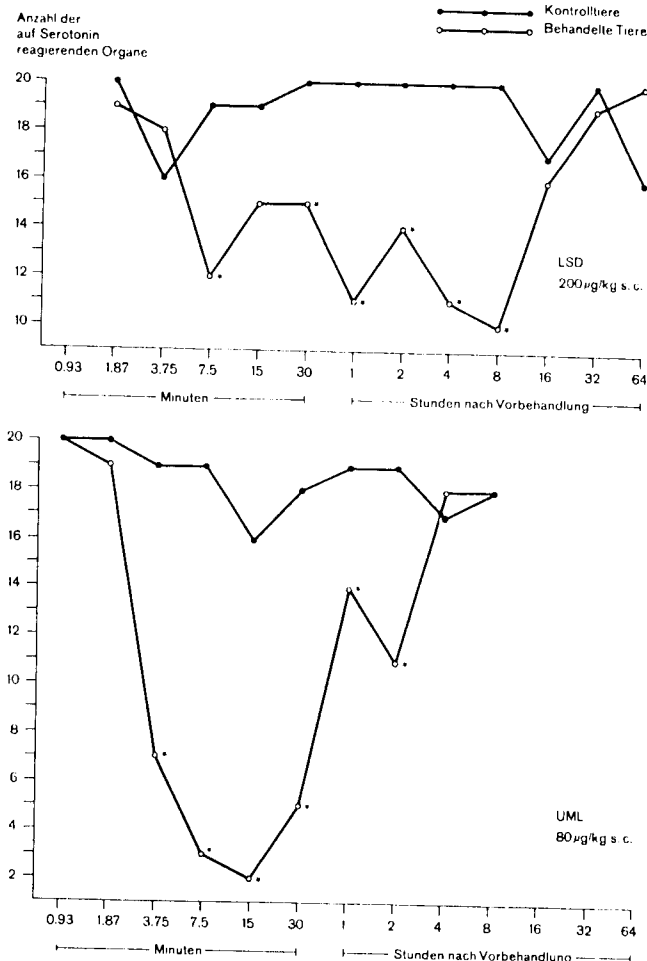


Abb. 1. Einfluß von in vivo verabreichtem LSD und UML auf die in vitro-Serotoninempfindlichkeit von Rattenuteri. Nach den angegebenen Vorbehandlungszeiten wurden je 10 Uteri mit 5 µg/l bzw. mit 10 µg/l Serotonin getestet (insgesamt 20). Ihre Empfindlichkeit wurde derjenigen von 20 Uteri unbehandelter Kontrolltiere gegenübergestellt. Jeder Punkt repräsentiert die relative Häufigkeit der positiven Reaktionen (Kontraktion). Die signifikant (χ^2 -Test, 95% Wahrscheinlichkeit) verschiedenen Werte sind mit einem * markiert.

Zeitspanne bei 95% Wahrscheinlichkeit signifikant, während die Unterschiede vor und nach dieser Periode zufällig (nicht signifikant) sind.

Das untere Kurvenpaar in Abb. 1 zeigt die Ergebnisse mit UML. Die Häufigkeit der positiven Reaktionen (Uteruskontraktion) in der behandelten Gruppe ist zwischen 3 min 45 sec und 2 h nach in vivo-Verabreichung von UML signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe.

B. Serotoninödem der Rattenpfote. Alle vier getesteten Substanzen haben bei i. v. Verabreichung eine eindeutige serotoninhemmende Wirkung gezeigt. Wie aus Abb. 2 (links) ersichtlich, waren die zur Erzielung des gleichen

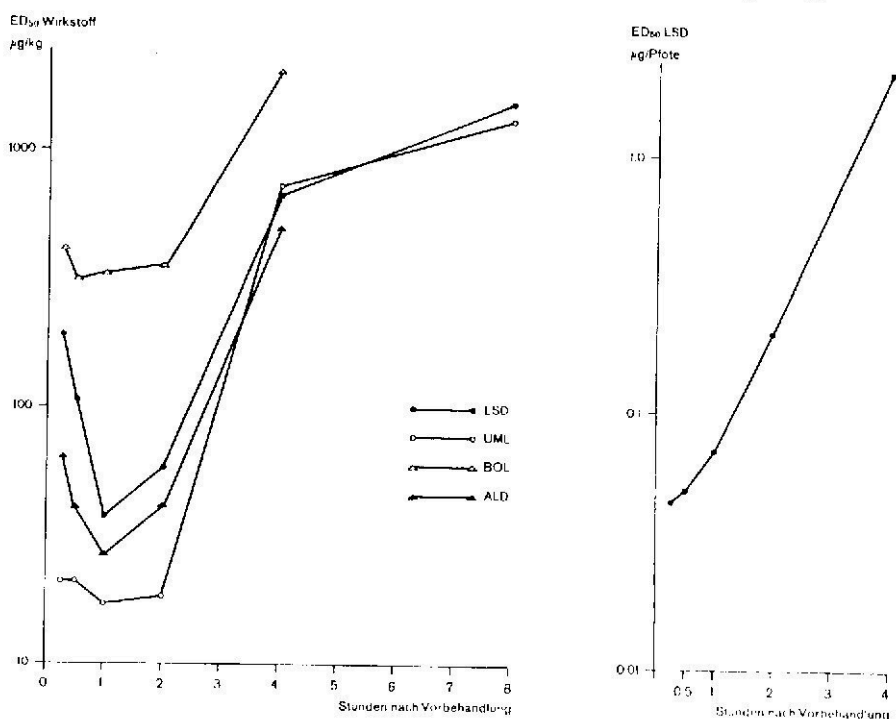


Abb. 2. Links: Die bei intravenöser Verabreichung zur Hemmung des Serotoninödems benötigten Wirkstoffmengen (ED_{50}) in Abhängigkeit von ihrer Einwirkungszeit. – Rechts: Die bei lokaler (in die Pfote) Verabreichung zur Hemmung des Serotoninödems benötigten LSD-Mengen (ED_{50}) in Abhängigkeit von ihrer Einwirkungszeit.

Effektes (50% Hemmung des Ödems) benötigten Wirkstoffmengen von ihrer Einwirkungsdauer vor Auslösung des Ödems abhängig. Hinsichtlich Wirkungseintritt lassen sich zwei Typen unterscheiden: LSD und ALD erreichen das Wirkungsmaximum relativ langsam, während im Falle von UML und BOL bereits 15 min nach Verabreichung ein nahezu maximaler Effekt vorhanden ist. Bei allen Substanzen setzt ca. 2 Stunden nach ihrer Verabreichung ein relativ rasches Abklingen der Wirkung ein.

Im Gegensatz zu obigem Befund mit i. v. Verabreichung fand sich bei lokaler Applikation von LSD in die Pfote bereits nach 15 min der stärkste serotoninhemmende Effekt, welcher im Laufe der folgenden Stunden nahezu linear abgenommen hat (Abb. 2, rechts).

Diskussion

Die Verteilung von parenteral verabreichtem LSD sowie dessen Schicksal im Organismus wurde in unseren Laboratorien mit Hilfe verschiedener Methoden bereits früher untersucht [9, 14]. Mittels biologischer Bestimmung (serotoninantagonistischer Effekt am isolierten Rattenuterus) ergab sich für LSD nach i. v. Injektion von 35 mg/kg bei der Maus eine Halbwertszeit von 37 min im Blut. In der Leber und im Gehirn wurden die höchsten Werte 10 min nach Verabreichung gefunden. Versuche mit ^{14}C -markiertem LSD [14] ebenfalls an der Maus zeigten, daß nach i. v. Injektion der wesentlich kleineren Dosis von 50 $\mu\text{g}/\text{Tier}$ (= ca. 2,5 mg/kg) LSD die Radioaktivität innerhalb einiger Minuten aus dem Blut verschwindet. In den meisten Organen war das Maximum nach 10 bis 15 Minuten erreicht; anschließend nahm die Radioaktivität im Laufe der folgenden Stunden langsam ab. Die Ausscheidung erfolgte vornehmlich durch die Galle. Dies geht auch aus Versuchen an Ratten mit Gallenfistel hervor, wobei innerhalb von 6 Stunden nach i. v. Verabreichung 70% der Radioaktivität auf diesem Wege ausgeschieden wurde, vorwiegend in Form von Metaboliten.

Unsere Versuche zeigen, daß es möglich ist, den serotoninhemmenden Effekt von in vivo s.c. verabreichtem LSD und UML am nach verschiedenen Zeitabschnitten dem Körper entnommenen Uterus in vitro nachzuweisen. Der rasche Wirkungseintritt von LSD – 7 min 30 sec – läßt sich mit den oben erwähnten Befunden betreffend der Verteilung von radioaktivem LSD im Organismus in Einklang bringen. Auch die Wirkung von UML ist früh nachweisbar. Die beiden Substanzen unterschieden sich jedoch in dieser Versuchsanordnung hinsichtlich ihrer Wirkungsdauer. Der Effekt von LSD hielt länger als 8 Stunden an, während der von UML zwischen 2 und 4 Stunden abklang. Die weiteren Unterschiede zwischen diesen beiden Stoffen, wie sie aus Abb. 1 entnommen werden können, d. h. etwas schnellerer Wirkungseintritt und größere Wirkungsintensität von UML, dürften lediglich durch die angewandten Dosen bedingt sein. Als Serotoninantagonist (bestimmt am isolierten Rattenuterus) ist nämlich UML ca. 4mal stärker als LSD, d. h. die beiden Stoffe wurden in unseren Versuchen nicht in streng äquipotenten Mengen verwendet.

Aus den Versuchen am Serotoninödem der Rattenpfote geht hervor, daß auch nach i. v. Verabreichung von LSD, ALD, BOL und UML ihre serotoninantagonistische Wirksamkeit während einiger Stunden nachweisbar ist. Es ist allerdings bemerkenswert, daß im Gegensatz zu BOL und UML,

welche ihre volle Wirkung relativ schnell erreichen, LSD und ALD zur Entfaltung ihres maximalen Effektes ca. 1 Stunde benötigen. Der Charakter des zeitlichen Verlaufes des serotoninantagonistischen Effektes von LSD am Pfotenödem läßt sich daher mit unseren Befunden am Rattenuterus nicht ohne weiteres in Einklang bringen. Während am Uterus der Hemmeffekt von LSD nach 7 min 30 sec gut entwickelt ist, beträgt die Latenzzeit der vollen Wirkungsentfaltung an der Pfote ca. 1 Stunde. Ein verzögerter Antransport des Wirkstoffes ist nicht anzunehmen, da in den Uterusversuchen LSD s.c., in den Ödemversuchen jedoch i.v. verabfolgt wurde, was eher eine raschere Verteilung erwarten lassen würde. Eine andere Möglichkeit wäre die Annahme, daß am Wirkungsort des LSD in der Pfote eine Kette von Reaktionen ablaufen müßte bevor ein effektiver Schutz gegen Serotonin entsteht. Eine solche Hypothese wird durch die Versuche, in welchen LSD direkt in die Pfote injiziert wurde (Abb. 2, rechts), entkräftet, da die volle Wirkung bereits 15 min nach Verabreichung nachweisbar war. Man muß deshalb annehmen, daß die verzögerte Wirkungsentfaltung nach i.v. Verabreichung durch einen besonders langsamen Übertritt von LSD aus der Blutbahn in das Bindegewebe der Rattenpfote bedingt ist.

Aus den Ergebnissen der beiden Versuchsreihen läßt sich zusammenfassend die Folgerung ziehen, daß auch die in vivo-Analyse der Wirkungsdauer serotoninantagonistischer Effekte von LSD keine Kriterien ergibt, welche eine qualitative Differenzierung dieses psychoaktiven Serotoninantagonisten gegenüber psychoinaktiven Lysergsäurederivaten zuließe.

Zusammenfassung

Die Wirkungsdauer bzw. der Charakter des zeitlichen Verlaufes des serotoninhemmenden Effektes von D-Lysergsäure-diäthylamid (LSD), 1-Acetyl-D-Lysergsäure-diäthylamid (ALD), 2-Brom-D-Lysergsäure-diäthylamid (BOL) und 1-Methyl-D-Lysergsäure-butanolamid (UML) wurde an Ratten untersucht.

Nach in vivo (s.c.) Verabreichung von LSD bzw. UML konnte ihre serotoninhemmende Aktivität an zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Uteri in vitro nachgewiesen werden. Der Effekt von LSD hielt über 8 Stunden an, derjenige von UML war kürzer.

Am Serotoninödem der Rattenpfote ließ sich die serotoninhemmende Aktivität von LSD, ALD, BOL und UML während mehrerer Stunden nach i.v. Verabreichung nachweisen. Im Gegensatz zu BOL und UML, welche ihre volle Wirkung schnell erreichten, benötigten LSD und ALD zur Entfaltung ihres maximalen Effektes ca. 1 Stunde.

Diese Befunde werden im Hinblick auf Angaben über die Verteilung von LSD im Organismus und seine Ausscheidung diskutiert.

Summary

A study was made in rats to determine the duration of the antagonism to serotonin (5-hydroxytryptamine) exhibited by d-lysergic acid diethylamide (LSD), 1-acetyl-d-lysergic acid diethylamide (ALD), 2-brom-d-lysergic acid diethylamide (BOL) and 1-methyl-d-lysergic acid butanolamide (UML).

LSD or UML was administered subcutaneously in vivo. The serotonin-antagonising activity was determined in vitro on the uterus removed at various times after the injection. The effect of LSD lasted more than eight hours, that of UML was of shorter duration.

LSD, ALD, BOL and UML were administered i.v. in rats. The serotonin-antagonising activity was demonstrated for several hours by the effect on serotonin-induced edema of the paw. Whereas the effects of BOL and UML rapidly reached a peak, at least one hour was required for the effects of LSD and ALD to reach a maximum.

The findings are discussed with reference to the available data on the distribution of LSD in the organism and its excretion.

1. *Cerletti A.*: Lysergic acid diethylamide (LSD) and related compounds. Transactions of the Second Conference on Neuropharmacology, Princeton, May 1955. Josiah Macy Jr. Foundation, New York 1956.
2. *Cerletti A.*: Comparison of abnormal behavioral states induced by psychotropic drugs in animals and man. In Proceedings of the 1st International Congress of Neuro-Psychopharmacology, Rome, September 1958. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Princeton 1959, p. 117-123.
3. *Cerletti A. and Doepfner W.*: Comparative study on the serotonin antagonism of amide derivatives of lysergic acid and of ergot alkaloids. J. Pharmacol. exp. Ther. **122**, 124-136 (1958).
4. *Doepfner W. and Cerletti A.*: Comparison of lysergic acid derivatives and antihistamines as inhibitors of the edema provoked in the rat's paw by serotonin. Int. Arch. Allergy **12**, 89-97 (1958).
5. *Gaddum J. H.*: Antagonism between lysergic acid diethylamide and 5-hydroxytryptamine. J. Physiol. (Lond.) **121**, 15 P (1953).
6. *Gaddum J. H., Hameed K. A., Hathway D. E. and Stephens F. F.*: Quantitative studies of antagonists for 5-hydroxytryptamine. Quart. J. exp. Physiol. **40**, 49-74 (1955).
7. *Gaddum J. H., Peart W. S. and Vogt M.*: The estimation of adrenaline and allied substances in blood. J. Physiol. (Lond.) **108**, 467-481 (1949).
8. *Konzett H.*: Zur Wirkung von LSD (und LSD-Derivaten) auf den Blutzucker. XXe Congr. Internat. de Physiologie, Bruxelles, 30. Juli bis 4. August 1956.
9. *Lanz U., Cerletti A. und Rothlin E.*: Über die Verteilung des Lysergsäurediäthylamids im Organismus. Helv. Physiol. Acta **13**, 207-216 (1955).
10. *Neuhold K., Taeschler M. und Cerletti A.*: Beitrag zur zentralen Wirkung von LSD: Versuche über die Lokalisation von LSD-Effekten. Helv. Physiol. Acta **15**, 1-7 (1957).
11. *Rothlin E., Cerletti A., Konzett H., Schalch W. R. und Taeschler M.*: Zentrale vegetative LSD-Effekte. Experientia (Basel) **12**, 154-157 (1956).

12. *Rowley D. A. and Benditt E. P.*: 5-Hydroxytryptamine and histamine as mediators of the vascular injury produced by agents which damage mast cells in rats. *J. exp. Med.* **103**, 399-412 (1956).
13. *Stoll A. und Hofmann A.*: Partialsynthese von Alkaloiden vom Typus des *sergei* basins. *Helv. chim. Acta* **26**, 944-965 (1943).
14. *Stoll A., Rothlin E., Rutschmann J. and Schulch W. R.*: Distribution and *metabolism* of ¹⁴C-labeled lysergic acid diethylamide (LSD 25) in the animal body. *Experientia* (Basel) **11**, 396-399 (1955).
15. *Stoll W. A.*: Lysergsäure-diäthylamid, ein Phantastikum aus der Mutterkorngruppe. *Schweiz. Arch. Neurol. Psychiat.* **60**, 279-323 (1947).
16. *Taeschler M. and Cerletti A.*: Some observations on the interaction of reserpine and LSD. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **120**, 179-183 (1957).
17. *Weidmann H. und Cerletti A.*: Die Wirkung von D-Lysergsäurediäthylamid und 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) auf spinale Reflexe der Katze. *Helv. Physiol. Acta* **15**, 376-383 (1957).
18. *Weidmann H. und Cerletti A.*: Weiterer Beitrag zur Pharmakologie von D-Lysergsäure-diäthylamid: Die Wirkung von LSD auf Kreislaufreflexe. *Helv. Physiol. Acta* **16**, C 38-C 40 (1958).