

7. B. L. VALLEE and F. L. HOCH, *Proc. natn. Acad. Sci., U.S.A.* **41**, 327 (1955).
8. E. JACOBSEN, *Pharmac. Rev.* **4**, 107 (1952).
9. W. W. WESTERFELD, *Tex. Rep. Biol. Med.* **13**, 559 (1955).
10. J. D. TAYLOR, H. E. PAUL and M. F. PAUL, *J. biol. Chem.* **191**, 223 (1951).

Biochemical Pharmacology, 1966, Vol. 15, pp. 1894-1896. Pergamon Press Ltd., Printed in Great Britain.

Inhibitory effect of barbiturate on brain and serum xanthine oxidase

(Received 10 May 1966; accepted 14 June 1966)

BARBITURATES have been shown to inhibit the respiration of brain *in vitro*.¹ Cytochrome *c* reductase was claimed to be the sensitive site of the inhibition by barbiturates in the oxidative system of the cell.² Aldridge³ suggested that the inhibition must occur in the site of the energy transport chain

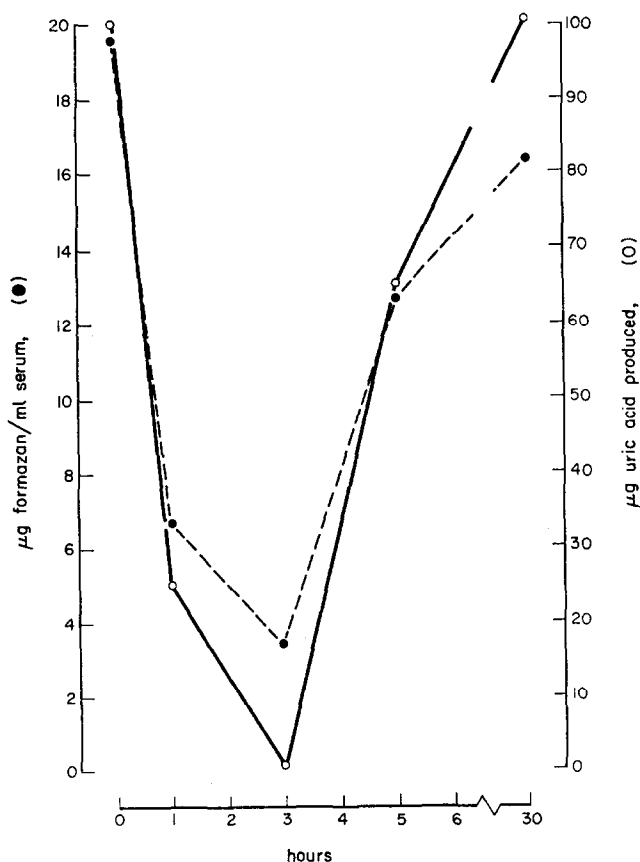


FIG. 1. Effect of the barbiturate on brain and blood xanthine oxidase activity. Time in abscissa is expressed in hours from the beginning of the narcosis. Each point represent average values for three determinations.

associated with the oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH₂) by flavo-proteins. Other aspects of the effect of barbiturates were studied in respect to oxidative phosphorylation.^{2, 4}

As far as we know, the inhibitory effect of barbiturates has not yet been reported in relation to the metabolism of purines. It seemed, therefore, of interest to report some of our results dealing with the inhibition *in vivo* by sodium diethylbarbiturate (Medinal) on brain and blood serum xanthine oxidase.

Wistar white rats, weighing 100–160 g were used throughout this study. Medinal was injected subcutaneously (30 mg/100 g body wt.) in intervals of 24 hr. The animals were killed by decapitation after 1, 3, 5 and 30 hr from the beginning of the narcosis. Each dose of Medinal maintained the animals asleep for 5½–6 hr and the narcosis began 20–30 min after the administration of the drug. Blood was withdrawn simultaneously. The brains were isolated, weighed quickly and homogenized in the cold with 3 ml of phosphate buffer pH 7.4 for each g of tissue. The homogenates were centrifuged at 3000 rev/min for 10 min and 0.5 ml of the clear supernatant was incubated for 2 hr at 37° with 0.5 ml of a 0.05 M hypoxanthine solution and 1.0 ml of phosphate buffer. The mixture was precipitated with 4 ml of a 12% perchloric acid solution and centrifuged. Uric acid formed was determined in a quartz Zeiss PMQII spectrophotometer at 291 mμ according to the method of Kalckar.⁵ A blank containing the same solution and precipitated at once with the perchloric acid solution was run simultaneously. The results were expressed as units of xanthine oxidase, one unit being equivalent to 1 μg uric acid formed in 2 hr.

The xanthine dehydrogenase activity was measured in 1 ml of clear blood serum incubated with 0.1 ml of a 0.05 M hypoxanthine solution as substrate and 0.3 ml of a 0.1% triphenyltetrazolium chloride solution as hydrogen acceptor in a evacuated Thunberg tube. The enzymatic activity was expressed as μg formazan produced and measured colorimetrically at 480 mμ.^{6, 7}

Figure 1 shows that xanthine oxidase decreases sharply in brain tissue as well as in blood serum. The maximal inhibitions were obtained 3 hr from the beginning of the narcosis. Brain xanthine oxidase (XO) was determined in rats injected with two doses of 30 mg/100 g body wt of Medinal and serum xanthine dehydrogenase (XD) was measured in rats administered with 3 doses of the barbiturate solution. Increasing inhibition has been shown when the doses administered were repeated (Table 1). It is possible that the binding of barbiturate occurs in the flavin prosthetic group

TABLE 1. INHIBITION BY MEDINAL OF BRAIN AND BLOOD SERUM XO ACTIVITY

Doses	Barbiturate (30 g/100 g body wt)				% Inhibition		
	None	1	2	3	1	2	3
Serum	19.56 (7)	13.36 (5)	9.50 (3)	3.36 (3)	33.16	52.41	83.16
Brain	100 (3)	74 (3)	0.9 (3)	—	26.00	99.10	—

Serum XD—μg formazan/ml serum/30 min at 37°.

Brain XO—μg uric acid/total brain in 2 hr at 37°.

The enzyme activity was determined after 3 hr from the beginning of the narcosis.

Plain numbers are average values and figures in parenthesis number of animal for each dose.

of the XO molecule. Nevertheless, it could occur in another active site since it has been shown that several nonflavoenzymes are also inhibited by phenobarbiturates.⁸ Preliminary experiments in course also showed that Medinal inhibits XO *in vitro* if incubated with serum or brain homogenates prior to the addition of the substrate.

Biochemical Laboratory,
Instituto Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro, Brazil

GILBERTO G. VILLELA
OTTILIA R. AFFONSO
EMILIO MITTIERI

* This investigation was supported by grants of Conselho Nacional de Pesquisas (Brazilian National Research Council).

REFERENCES

1. J. H. QUASTEL, *Physiol. Rev.* **19**, 135 (1939).
2. M. E. GREIG, *J. Pharmac. exp. Ther.* **91**, 317 (1947).
3. W. N. ALDRIDGE, *Ciba Foundation Symposium on Enzyme and Drug Action*, p. 155. Churchill, London (1962).
4. T. M. BRODY and J. A. BAIN, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **77**, 50 (1951).
5. H. M. KALCKAR, *J. biol. Chem.* **167**, 461 (1947).
6. G. G. VILLELA, *Rev. Brasil. Biol.* **14**, 455 (1954).
7. O. R. AFFONSO, E. MITIDIERI, L. P. RIBEIRO and G. G. VILLELA, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **90**, 527 (1955).
8. A. GIUDITTA and L. CASOLA, *Biochim. biophys. Acta*, **110**, 17 (1965).

Biochemical Pharmacology, 1966, Vol. 15, pp. 1896-1898. Pergamon Press Ltd., Printed in Great Britain.

Effet de l'éthanol sur la sécrétion acide de l'estomac *in vitro* chez le rat

(Received 3 May 1966; accepted 17 May 1966)

L'EFFET de l'éthanol sur la sécrétion gastrique est discuté; d'après Chittenden *et al.*,¹ l'éthanol chez le chien diminue le flux de la sécrétion gastrique et la production d'acide chlorhydrique; mais chez le cobaye, d'après Dragstedt *et al.*,² l'éthanol stimulerait la sécrétion acide par formation d'histamine. Cette hypothèse a été reprise par Irvine *et al.*,³ pour expliquer le mécanisme par lequel l'alcool stimulerait la sécrétion acide chez l'homme. Woodward *et al.*⁴ ont montré chez le chien que des solutions d'alcool dilué ne stimulaient pas par contact direct avec la muqueuse, la sécrétion acide, mais l'injection intraveineuse d'éthanol provoque une stimulation de la sécrétion chlorhydrique de l'estomac, même en absence des mécanismes nerveux. Chez l'homme également, d'après Hirschowitz *et al.*,⁵ l'injection intraveineuse d'éthanol augmente la sécrétion acide de l'estomac. A la suite de ces résultats, nous avons pensé qu'il serait intéressant d'étudier la sécrétion acide de l'estomac retourné de rats selon la technique décrite récemment par Dikstein et Sulman,⁶ en présence d'alcool éthylique.

METHODES

Estomac in vitro

Des rats Wistar mâles, adultes, d'un poids moyen de 280-300 g, au jeûne depuis la veille, sont décapités puis l'estomac est rapidement prélevé; ensuite, selon la technique de Dikstein et Sulman, le cardia et le pyllore sont liés, le fundus est ouvert et l'estomac est retourné à l'aide d'un agitateur à bout rodé. L'estomac, lavé avec une solution de NaCl à 0,9 % glacé, est ligaturé au niveau du fundus et 3 ml de Ringer sont injectés dans la poche stomacale *invertie*. Cette préparation est alors maintenue à 37° pendant 2 h dans 10 ml de milieu d'incubation oxygéné. Le pH est mesuré avec l'électrode d'un pHmètre; le milieu d'incubation utilisé, permettant d'obtenir une sécrétion chlorhydrique maximum, a la composition suivante: NaCl 100 mM; glucose 80 mM; Na₂HPO₄ 2 mM; KCl 6 mM; MgCl₂ 2 mM.

Traitement alcoolique

Nous avons étudié l'évolution du pH du milieu d'incubation au cours du temps, suivant deux modalités:

Dans une première expérience l'éthanol a été administré à raison de 2 g par kg de poids, en solution à 20 %, par voie oesophagienne, à des rats au jeûne depuis la veille; nous avons prélevé l'estomac 15 sec, 15 min, 1 h, 2 h et 8 h après ce traitement, de façon à déterminer si l'éthanol aurait *in situ* une action directe sur la cellule gastrique responsable de la sécrétion chlorhydrique. Cette dose d'alcool correspond environ à 1,3 M d'éthanol par rat. Dans les mêmes conditions, les rats du lot témoin ont reçu une solution isocalorique de glucose.

Dans une deuxième expérience, l'animal étant à jeun depuis la veille, nous avons prélevé l'estomac et nous l'avons placé dans un milieu d'incubation alcoolique, c'est-à-dire que la muqueuse gastrique