

threshold of convulsions.^{8,9} It is also equally true that many substances are powerful anticonvulsants without having any appreciable effect upon brain GABA levels.¹⁰

On the basis of the above evidence, it may be assumed that the anticonvulsant action of anabolic steroids is probably due to other mechanisms controlling brain excitability, possibly involving electrolyte distribution.

*C.S.I.R. Pharmacology Research Unit,
Department of Pharmacology,
Seth G.S. Medical College,
Parel, Bombay-12, India*

S. G. KALYANPUR
S. R. NAIK
SAVITRI PAHUJANI
U. K. SHETH*

REFERENCES

1. H. SELYE, *J. Lab. clin. Med.* **27**, 1951 (1942).
2. E. SPIEGEL, *Fedn. Proc.* **2**, 47 (1943).
3. E. SPIEGEL and H. WYCIS, *J. Lab. clin. Med.* **30**, 947 (1945).
4. D. M. WOODBURY, *J. Pharmac. exp. Ther.* **105**, 27 (1952).
5. C. R. CRAIG, *J. Pharmac. exp. Ther.* **153**, 337 (1966).
6. D. M. WOODBURY and A. VERNADAKIS, *Fedn. Proc.* **17**, (1958).
7. E. ROBERTS and S. FRANKEL, *J. biol. Chem.* **187**, 55 (1950).
8. C. F. BAXTER and E. ROBERTS, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **104**, 426 (1960).
9. E. W. MAYNERT and H. K. KAJI, *J. Pharmac. exp. Ther.* **137**, 114 (1962).
10. G. CARVAJAL, M. RUSSEK, R. TAPIA and G. MASSIEU, *Biochem. Pharmac.* **13**, 1059 (1964).

* Reprint requests to Prof. U. K. Sheth.

Biochemical Pharmacology, Vol. 18, pp. 959-962. Pergamon Press. 1969. Printed in Great Britain

Etudes sur l'action biologique du benzo(a)pyrène — II Effet de l'irradiation gamma sur l'induction d'hydroxylases microsomiales hépatiques par le benzo(a)pyrène

(Received 15 October 1968; accepted 15 November 1968)

L'ADMINISTRATION de benzo(a)pyrène (BaP) à des rats en croissance détermine, endéans 24 hr, un accroissement important des enzymes microsomiaux hépatiques qui hydroxylent cet hydrocarbure^{1,2}. On a montré par des moyens divers et convergents la réalité d'une synthèse accrue de protéines dans le déroulement de ce phénomène, ainsi d'ailleurs que des modifications morphologiques du reticulum endoplasmique. Un certain nombre d'autres processus métaboliques doivent entrer en jeu pour expliquer l'ampleur des transformations biochimiques constatées ainsi que l'absence de spécificité des systèmes enzymatiques induits. Il est vraisemblable qu'un "signal déclencheur" précoce mette en branle une séquence stéréotypée de synthèses métaboliques. Des études de localisation en fonction du temps, de BaP tritié ont montré que la fixation du traceur passait par un maximum, au niveau du foie, entre la 4^{ème} et la 6^{ème} hr après l'injection,³ tandis que l'accroissement des activités enzymatiques se manifeste déjà après 6 hr.¹

On sait par ailleurs que certains types d'induction enzymatique sont radiosensibles, pour une dose déterminée de rayonnements et pour autant que l'irradiation affecte un horaire précis;⁴ dans certains cas l'induction par substrat paraît modifiée sous l'effet de l'irradiation immédiate⁵ et la capacité de répondre à l'induction est déprimée à la suite d'irradiations reçues dans le jeune âge.⁶ Comme ces divers types d'induction enzymatique semblent répondre à des modèles différents nous avons voulu

vérifier si l'induction par le BaP d'enzymes microsomiaux était radiosensible, du moins à certains moments du processus.

Auparavant nous avons étudié l'action de l'irradiation elle-même sur le niveau des hydroxylases hépatiques du BaP, et l'effet éventuel de la cystamine.

TECHNIQUE

(a) L'animal d'expérience est le rat mâle albinos en croissance (poids moyen 70 g). Le BaP est administré dans les conditions décrites précédemment⁷ et les animaux sont sacrifiés par décapitation 24 hr après. La mesure des activités enzymatiques sur le surnageant à 9000 *g* d'homogénat hépatique est opérée selon la technique habituelle.⁷

(b) Les irradiations ont été effectuées par le rayonnement gamma monochromatique (660 keV) d'une source de 2000 Ci de ¹³⁷Cs [Installation du Laboratoire de Radiobiologie de l'Université de Liège (Prof. Z. Bacq)]. Les variations d'intensité de dose sont déterminées par la distance de l'animal au foyer d'irradiation, ce qui permet un débit constant et une durée d'irradiation uniforme de 10 min. Comme l'irradiation entraîne une perte d'appétit, les animaux témoins aussi bien que les animaux irradiés ont été tenus au jeûne (mais avec eau "ad libitum") entre le moment de l'irradiation et le sacrifice de l'animal: on évite ainsi les perturbations qu'entraînerait une différence d'alimentation entre les deux groupes. Les doses délivrées ont été échelonnées de 500 R à 2000 R, elles permettent une survie dans de bonnes conditions biologiques pendant le délai de 24 à 48 hr nécessaire à la réalisation des expériences d'induction.

Dans les cas d'utilisation de cystamine, cette substance a été administrée à la dose de 100 mg/kg en injection intrapéritonéale dans 0.5 ml de liquide physiologique, et 20 min avant le début de l'irradiation, moment où l'effet radioprotecteur a le plus de chance de se manifester.

D'autre part, la cystamine a également été employée chez des animaux témoins et chez ceux soumis à l'induction par BaP.

RESULTATS

(1) Dans une première série d'expériences, nous avons étudié l'influence de doses croissantes d'irradiation sur l'hydroxylation du BaP, d'une part chez des animaux témoins, d'autre part chez des animaux ayant reçu 20 mg/kg de BaP comme inducteur. Dans ce dernier cas, l'irradiation a eu lieu 4 hr après l'injection intrapéritonéale de l'hydrocarbure, ce délai correspondant au moment de fixation maximum au niveau des viscères de la substance administrée.³ Un autre groupe de rats a été traité de manière identique, mais a reçu 10 mg de cystamine 20 min avant le début de l'irradiation. Le tableau I représente les résultats obtenus, en μM de BaP métabolisé en 30 min/mg de protéines du milieu d'incubation. La valeur témoin a été établie sur une moyenne de huit animaux; elle présente une dispersion de 7 pour cent.

TABLEAU I. EFFETS DE L'IRRADIATION GAMMA ET DE L'ADMINISTRATION DE BaP SUR LES HYDROXYLASES HEPATIQUES

Irradiations (R)	Témoins	BaP: 0	Témoins	BaP: 20 mg/kg
		Cystamine 10 mg		Cystamine 10 mg
0	3.1	3.2	12.8	11.1
500	5.1	2.9	16.4	14.3
1000	8.2	6.2	15.4	14.7
1500	8.6	6.6	18.1	14.8
2000	5.3	5.5	14.5	14.8

* Activités enzymatiques en μM /mg prot. /30 min.

L'irradiation seule entraîne chez les animaux témoins un accroissement des activités enzymatiques, moindre toutefois que celui dû à l'induction chimique. La cystamine, qui, par elle-même, n'exerce aucune action sur les animaux non irradiés contrecarre quelque peu cet effet. Dans ces expériences les animaux sont sacrifiés 20 hr après l'irradiation.

En cas d'administration de BaP inducteur 4 hr avant l'irradiation on constate une augmentation des activités enzymatiques plus marquée que chez l'animal non irradié, mais traité au BaP.

Ces effets présentent un maximum pour la dose de 1500 R, un fléchissement se marquant à 2000 R. La cystamine n'exerce dans ces cas qu'un effet nul ou très minime.

(2) Dans une seconde série, nous avons étudié, pour des doses de 500, 1000 et 2000 R, l'influence du moment de l'irradiation par rapport à l'administration du BaP inducteur, les animaux étant, dans tous les cas, sacrifiés 24 hr après l'injection de ce dernier. Les irradiations ont été échelonnées de la façon suivante par rapport à l'induction: 24 hr et $\frac{1}{2}$ hr avant, $\frac{1}{2}$, 2, 4 et 6 hr après. Les activités enzymatiques étant déjà accrues 6-8 hr après l'administration de l'inducteur, il a semblé inutile de poursuivre l'observation au-delà, les phénomènes essentiels devant se manifester auparavant. D'autre part, nous nous sommes limités à un délai de 24 hr pour l'irradiation antérieure, car un délai plus long aggrave les perturbations métaboliques générales dues aux rayonnements et peut créer des interférences avec le phénomène étudié.

Le Tableau 2 présente les résultats; chaque valeur est la moyenne de trois animaux. Quoique assez dispersées, elles permettent de conclure que l'irradiation n'exerce un effet, dans le sens des résultats du Tableau 1, que lorsqu'elle a lieu 2 hr ou 4 hr après l'administration de l'inducteur; singulièrement, l'irradiation effectuée 24 hr avant ou 6 hr après l'induction chimique ne semble entraîner aucune perturbation.

TABLEAU 2. EFFET DE L'HORAIRE DE L'IRRADIATION SUR L'INDUCTION
D'HYDROXYLASES HEPATIQUES PAR LE BaP

Irradiations (R)	Délai entre l'irradiation et l'administration de BaP					
	Irrad. antérieure		10 min	Irrad. postérieure		
	24 hr	10 min		2 hr	4 hr	6 hr
500	10.3	—	—	10.4	18.0	—
1000	10.9	13.6	10.6	18.3	17.7	10.0
2000	11.2	9.4	9.8	15.7	16.3	12.8

Témoin non irradié, avec 20 mg/kg BaP: 11.5 ± 1.1 .

Témoin absolu de la série: 2.7 ± 0.2 .

Activités enzymatiques en $\mu\text{M}/\text{mg prot.}/30 \text{ min}$.

DISCUSSION

(1) L'augmentation après un certain délai des activités enzymatiques sous l'effet de l'irradiation est un phénomène bien connu en radiobiologie;⁸ l'accroissement, 24 hr après une dose élevée de rayonnement γ , des hydroxylations microsomiales hépatiques s'inscrit donc normalement dans le cadre des données prévisibles. La cystamine, dans nos conditions expérimentales, n'exerce sur ce phénomène qu'un effet douteux.

(2) En cas d'administration conjointe des rayonnements et de BaP, on peut formuler les remarques suivantes:

le phénomène d'induction, considéré globalement, n'est pas inhibé en ce qui concerne les systèmes microsomaux d'hydroxylation. La dose administrée ni son horaire ne semblent jouer de rôle à cet égard;

pour des irradiations de 500 à 1500 R survenant 2-4 hr après l'administration de l'inducteur, on note même des accroissements d'activité enzymatique supérieurs à ceux qu'on enregistre après l'injection seule de l'inducteur;

cependant, par rapport aux rats témoins, irradiés sans inducteur, les taux d'accroissement que fournit le BaP administré conjointement aux rayonnements, sont nettement moindres que ceux qu'occasionne l'effet inducteur chez les animaux non irradiés, de sorte qu'il n'existe pas de potentiation réelle: le maximum d'effet obtenu est inférieur à la somme des deux processus considérés isolément.

Dans ces conditions, il se manifeste peut-être un certain effet d'inhibition du processus d'induction enzymatique, du moins à l'une ou l'autre de ses étapes.

D'autre part, il n'est nullement exclu que les augmentations d'activité enzymatique dans ces deux cas répondent à des processus indépendants.⁹

CONCLUSIONS

L'irradiation par rayonnement γ entraîne, dans un délai de 24 hr, un accroissement des activités enzymatiques microsomiales d'hydroxylation du BaP. Cet effet paraît peu sensible à la cystamine. D'autre part, l'irradiation n'inhibe pas le phénomène global d'induction enzymatique de ces enzymes: l'horaire d'irradiation ni dans certaines limites, la dose ne jouent de rôle marquant. Cependant un effet inhibiteur partiel ne peut être exclu.

*Service de Chimie Médicale, Toxicologie & Hygiène,
Université de Liège,
151 Bd. de la Constitution,
Liège, Belgium*

P. DELWAIDE
D. RONDIA
C. HEUSGHEM

BIBLIOGRAPHIE

1. A. H. CONNEY, E. C. MILLER and J. A. MILLER, *J. biol. Chem.* **228**, 753 (1957).
2. J. C. ARCOS, A. H. CONNEY et N. P. BUU-HOI, *J. biol. Chem.* **236**, 1291 (1961).
3. P. DELWAIDE *Biochem Pharmacol.*, sous presse.
4. H. PITOT, C. PERAINO et C. LAMAR, *Science* **150**, 901 (1965).
5. O. GREENGARD, G. T. BAKER, M. L. HOROWITZ et W. E. KNOX, *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* **56**, 1303 (1966).
6. K. DUBOIS, *Radiat. Res.* **30**, 342 (1967).
7. D. RONDIA et P. DELWAIDE, *Biochem. Pharmacol.* **17**, 2171 (1968).
8. Z. M. BACQ et P. ALEXANDER, *Fundamentals of Radiobiology*. Pergamon, Oxford (1961).
9. M. TAKESHITA et S. TANAKA, *Biological and Chemical Aspects of Oxygenases*, p. 146, Maruzen Co, Tokyo (1966).

Biochemical Pharmacology, Vol. 18, pp. 962-964. Pergamon Press. 1969. Printed in Great Britain

Inhibiting effect of angiotensin on potassium accumulation of adrenal cortex

(Received 21 October 1968; accepted 15 November 1968)

THE MAIN sites of effects of angiotensin are: smooth muscle cells of the vascular walls, renal tubular cells and the adrenal cortex. Its vasoconstrictor effect is associated with the decrease of potassium content and increase of sodium content in the aorta cellular phase *in vivo*¹ and *in vitro*² but there are also data for its opposite effect.³

Large doses of angiotensin inhibit tubular reabsorption of sodium *in vivo*,⁴ and inhibit uphill sodium movements in tissue slices of kidney as well.⁵ From these data angiotensin seems to inhibit active sodium transport at its sites of effect.

The regulation of aldosterone secretion is not quite clarified yet, but it is established that the following stimuli have a direct effect on the adrenal which specifically stimulate aldosterone secretion: angiotensin, increase of potassium or decrease of sodium in the extracellular surroundings.⁶ We supposed that angiotensin would inhibit active sodium-potassium transport in the adrenal cortex too; thereby decreasing the extracellular Na/K ratio, which condition is favourable for increasing aldosterone production.

A suitable method for testing active ion transport of tissues is the study of potassium reaccumulation. As we did not find any data in the literature concerning the potassium accumulation of adrenal cortex, we used the method described for liver⁷ after some modification.