

EFFETS ANTIHYPERTENSEURS ET NORADRÉNALINODÉPLÉTEURS DE L' α -MÉTHYL-TYRAMINE ET DE L' α -MÉTHYL-OCTOPAMINE CHEZ LE RAT

L. MAÎTRE et H. BRUNNER

Laboratoires Biologiques du Département Pharmaceutique de CIBA Société Anonyme, Bâle, Suisse

(Received 1 June 1970; accepted 8 July 1970)

Abstract— α -methyl-tyramine (Paredrine®) and α -methyl-octopamine (*p*-OH-norephedrine) lowered the arterial blood pressure of the renal hypertensive rat in a dose-dependent manner. When the drugs were given once a day for 11 days, no cumulative effect could be detected but the action of α -methyl-octopamine seemed to be of longer duration than that of α -methyl-tyramine. Catecholamine determinations in renal hypertensive and in normotensive rats showed a strong, dose-dependent noradrenaline-depleting effect of both α -methyl-amines in heart and brain. The depletion produced by α -methyl-tyramine was greater in the brain and smaller in the heart than that caused by α -methyl-octopamine in acute experiments as well as after repeated treatment. Both drugs reduced the amount of [3 H]-noradrenaline found in the heart after intravenous injection of the labelled amine. In this respect, α -methyl-octopamine was more active than α -methyl-tyramine.

Differences and similarities between these *p*-hydroxylated amines and their structural analogue metaraminol are discussed.

IVERSEN a montré que l' α -méthyl-tyramine avait une très grande affinité pour les sites de captation de la noradrénaline dans le cœur du rat.¹ Cette amine a des propriétés sympathicomimétiques mais est toutefois capable, après administration prolongée, de provoquer une hypotension chez l'homme normotendu.² Par ces effets, comme par sa structure, elle s'apparente au métaraminol dont les propriétés anti-hypertensives, noradrénalinodéplétrices et inhibitrices de la captation de la noradrénaline chez le rat ont été décrites.³⁻⁵ D'autres part l' α -méthyl-tyramine peut être transformée en α -méthyl-octopamine dans l'organisme, car elle est un substrat de la dopamine- β -hydroxylase chez l'animal^{6,7} et chez l'homme.⁸ C'est pourquoi nous avons étudié les effets de l' α -méthyl-tyramine et de son dérivé β -hydroxylé, l' α -méthyl-octopamine, sur la pression artérielle du rat hypertendu, sur le contenu des catécholamines du cœur et du cerveau ainsi que sur le processus de la captation de la noradrénaline dans le cœur.*

METHODES

(a) *Effet antihypertenseur*

L'hypertension a été produite par constriction de l'artère rénale gauche chez des rats blancs, mâles, pesant 120-140 g. L'opération a été effectuée sous narcose à

* Une partie de ces résultats a été présentée à la session d'automne de la Société Allemande de Pharmacologie, à Kiel, en 1966.

l'éther. La pression systolique a été mesurée à intervalles d'une semaine après l'opération selon la méthode pléthysmographique de Wilson et Byrom.⁹ Après obtention d'une pression stable d'au moins 170 mm Hg, les animaux ont été répartis en groupes de 5 ou 6 pour le traitement.

L' α -méthyl-tyramine et l' α -méthyl-octopamine ont été injectées quotidiennement à raison de 0,3, 3 et 30 mg/kg par la voie sous-cutanée. L' α -méthyl-tyramine a en outre été administrée quotidiennement à raison de 1, 3, 10 et 30 mg/kg par la voie orale. La durée du traitement a été de 11 jours, sauf pour les deux groupes ayant reçu 30 mg/kg, s.c., où elle a été de 4 jours.

Durant le traitement de 11 jours, la pression artérielle a été mesurée 5 fois, sous légère anesthésie à l'éther: 2 et 24 hr après l'application du 3ème jour, 2 et 24 hr après l'application du 7ème jour, et 2 hr après celle du 11ème jour. Pour les 2 groupes, où le traitement a été de 4 jours, 3 mesures de la pression artérielle ont été effectuées: 2 et 24 hr après l'application du 2ème jour et 2 heures après celle du 4ème jour.

(b) Détermination des catécholamines

Le contenu de noradrénaline a été déterminé dans le coeur et le cerveau des rats hypertendus, sacrifiés 2,5 hr après la dernière application, soit 0,5 hr après la dernière mesure de la pression artérielle. Une série d'expériences à court terme a en outre été réalisée chez des rats mâles normaux (180–230 g), où le contenu de la noradrénaline du coeur a été estimé, ainsi que le contenu de la noradrénaline et de la dopamine du cerveau.

La noradrénaline a été extraite sur alumine et déterminée par spectrofluorimétrie d'après une méthode déjà décrite⁵ et fondée sur la technique proposée par von Euler et Lishajko.¹⁰ La dopamine a été également extraite sur alumine et dosée par fluorimétrie selon Anton et Sayre.¹¹

(c) Détermination de la captation de la [³H]-noradrénaline dans le coeur

Des rats mâles normaux (180–230 g) ont été traités par l' α -méthyl-tyramine ou l' α -méthyl-octopamine 2 hr avant de recevoir une injection intraveineuse de DL-[³H]-noradrénaline (1,07 c/mM, The Radiochemical Centre, Amersham, England) de 50 μ C/ml/kg. Les coeurs ont été prélevés 1 hr après administration de l'amine marquée. Leur noradrénaline a été extraite comme décrit ci-dessus et la radioactivité a été mesurée dans un spectromètre à scintillation liquide (Packard-Tri-Carb). Les échantillons à compter étaient composés de 0,2 ml d'extrait, 2,0 ml d'éthanol, 1,5 ml de méthanol et 10,0 ml d'une solution à 0,6 pour cent de butyl-PBD (Scintillateur CIBA) dans du toluène. La quantité de [³H]-noradrénaline retenue dans le coeur dans ces conditions a été considérée comme une mesure de sa captation.

L'évaluation statistique a été réalisée selon Lord¹² et Hogben.¹³

RESULTATS

(a) Rats hypertendus

L' α -méthyl-tyramine et l' α -méthyl-octopamine ont provoqué un abaissement de la pression artérielle du rat hypertendu. Pour les deux substances, cet abaissement a été fonction de la dose. Lorsque les substances ont été administrées par la voie sous-cutanée, il a été du même ordre de grandeur pour des mêmes doses d' α -méthyl-tyramine et d' α -méthyl-octopamine. Administrée par la voie orale, l' α -méthyl-tyramine

TABLE 1. EFFETS DE L' α -MÉTHYL-TYRAMINE ET DE L' α -MÉTHYL-OCTOPAMINE SUR LA PRESSION ARTÉRIELLE DU RAT HYPERTENDU

	α -Méthyl-tyramine				α -Méthyl-octopamine			
	1 mg/kg po n=6	3 mg/kg po n=6	10 mg/kg po n=6	30 mg/kg po n=6	0,3 mg/kg sc n=6	3 mg/kg sc n=6	0,3 mg/kg sc n=6	30 mg/kg sc n=6
Pression artérielle au début du traitement (mm Hg)	192 \pm 7	194 \pm 6	201 \pm 7	194 \pm 5	193 \pm 6	195 \pm 4	192 \pm 10	193 \pm 10
Abaissement de la pression artérielle (mm Hg)								
2 hr après 2 ^e applic.							-87 \pm 10	-95 \pm 6
24 hr après 2 ^e applic.							-26 \pm 6	-55 \pm 6
2 hr après 3 ^e applic.	-3 \pm 5	-16 \pm 6	-22 \pm 7	-32 \pm 5	-13 \pm 4	-39 \pm 9		
24 hr après 3 ^e applic.	-3 \pm 3	-8 \pm 5	-8 \pm 7	-12 \pm 3	-8 \pm 5	-23 \pm 8	-23 \pm 3	-31 \pm 3
2 hr après 4 ^e applic.							-23 \pm 3	-25 \pm 6
2 hr après 7 ^e applic.	-5 \pm 4	-13 \pm 6	-23 \pm 7	-34 \pm 4	-14 \pm 6	-38 \pm 9	-20 \pm 2	-33 \pm 1
24 hr après 7 ^e applic.	-6 \pm 5	-16 \pm 5	-18 \pm 6	-24 \pm 5	-22 \pm 5	-31 \pm 6	-22 \pm 3	-27 \pm 6
2 hr après 11 ^e applic.	-5 \pm 3	-3 \pm 5	-21 \pm 5	-25 \pm 4	-21 \pm 4	-34 \pm 8	-23 \pm 6	-31 \pm 7
							-96 \pm 6	

n'a pas eu d'effet anti-hypertenseur marqué, c'est-à-dire qu'elle a été au moins 10 fois moins active que par la voie sous-cutanée.

Un effet prononcé n'a toutefois été observé que dans les deux groupes ayant reçu la plus haute dose de l'une ou de l'autre amine par la voie sous-cutanée. Dans les deux cas, l'effet était déjà maximal après la deuxième injection. Pour les doses inférieures des deux amines, aucun effet cumulatif n'a été observé (Table 1).

Le dernier jour du traitement, le taux de la noradrénaline cardiaque et cérébrale de ces rats hypertendus a été déterminé. Les animaux ont été sacrifiés 30 min après la mesure de la pression artérielle. Les concentrations de noradrénaline sont montrées dans la Fig. 1 en regard, pour chaque groupe, de l'abaissement de la pression artérielle noté à la dernière mesure.

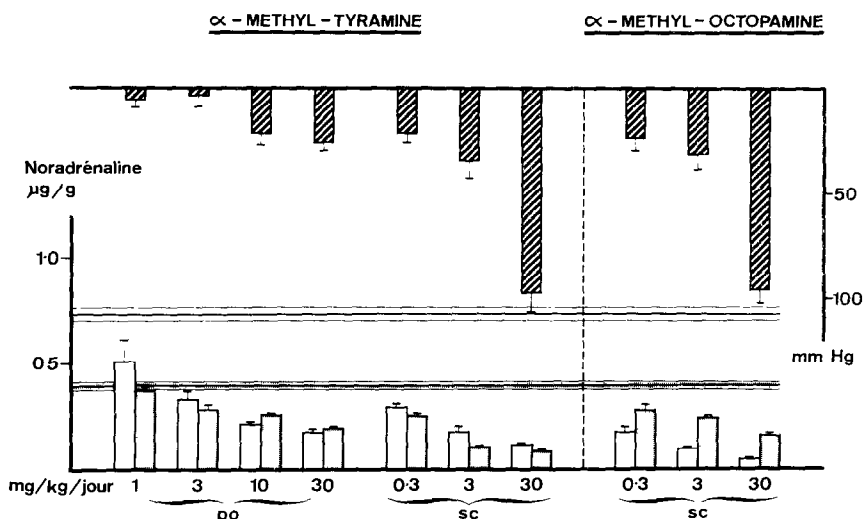


FIG. 1. Effets de l' α -méthyl-tyramine et de l' α -méthyl-octopamine sur la pression artérielle et sur le contenu de noradrénaline dans le coeur et le cerveau du rat hypertendu.

Les colonnes hachurées représentent l'abaissement de la pression artérielle le dernier jour du traitement et correspondent à la dernière mesure qui figure, pour chaque groupe, dans la Table 1. Les colonnes vides indiquent le contenu de noradrénaline dans le coeur, les colonnes pointillées le contenu de la noradrénaline dans le cerveau. Pour la détermination de la noradrénaline, les rats ont été sacrifiés 30 min après la mesure de la pression artérielle.

Tous les rats traités ont été utilisés pour les estimations de la noradrénaline. Leur nombre figure sur la Table 2. Huit rats hypertendus non traités ont servi aux estimations-témoins. Les barres indiquent l'écart-type de la moyenne (S.E.).

L' α -méthyl-tyramine et l' α -méthyl-octopamine ont produit une déplétion de la noradrénaline cardiaque et cérébrale du rat hypertendu. Comme les effets anti-hypertenseurs, les déplétions ont été fonction des doses administrées et chaque fois plus prononcées dans le coeur que dans le cerveau. On a pu, cependant, constater une différence fondamentale quant au degré des déplétions produites dans ces deux organes. Ainsi, à doses égales, l' α -méthyl-tyramine a vidé plus fortement les dépôts de la noradrénaline du cerveau que l' α -méthyl-octopamine, et moins fortement les dépôts de la noradrénaline du coeur. L' α -méthyl-tyramine a été 10-30 fois moins noradré-
alinodépétrice par la voie orale que par la voie sous-cutanée.

(b) *Rats normaux*

(1) *Concentration des catécholamines endogènes.* Une seule administration d' α -méthyl-tyramine ou d' α -méthyl-octopamine à des rats normotendus a eu, après 2 hr, qualitativement les mêmes effets noradrélinodépoteurs que les administrations répétées quotidiennement durant 4 ou 11 jours aux rats hypertendus. Ainsi, à toutes les doses essayées, l' α -méthyl-octopamine a vidé les dépôts de la noradréline plus fortement dans le coeur et moins fortement dans le cerveau que l' α -méthyl-tyramine (Fig. 2).

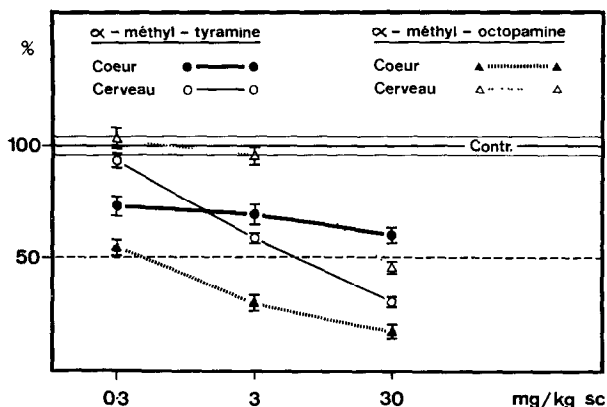


FIG. 2. Effets de l' α -méthyl-tyramine et de l' α -méthyl-octopamine sur la concentration en noradréline du coeur et du cerveau.

Les organes ont été prélevés 2 hr après une seule injection sous-cutanée. Deux organes ont été réunis pour un extrait. Abscisse: dose injectée. Ordonnée: contenu de noradréline, exprimé en pourcentage des contrôles. Chez les contrôles ($n=12$), les valeurs absolues sont: $0,97 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$ coeur et $0,425 \pm 0,018 \mu\text{g/g}$ cerveau. Chaque symbole représente la valeur moyenne \pm l'écart-type (S.E.) de 5-8 extraits.

Il faut remarquer particulièrement deux phénomènes:

(i) L' α -méthyl-tyramine, à doses relativement faibles ($< 3 \text{ mg/kg}$) produit une déplétion qui est du même ordre de grandeur dans les deux organes. L' α -méthyl-octopamine, par contre, n'exerce une activité noradrélinodépoteuse dans le cerveau qu'à partir de doses au moins 10 fois supérieures à celles qui réduisent de 50 pour cent environ la concentration de la noradréline dans le coeur.

(ii) Entre les doses extrêmes injectées, l'effet de l' α -méthyl-tyramine sur le taux de la noradréline cardiaque n'est proportionnel à la dose que dans une très faible mesure. En effet, les doses de 0,3 et 3 mg/kg ont produit pratiquement le même effet, la déplétion moyenne causée par 30 mg/kg ayant été légèrement plus importante sans toutefois qu'elle se différencie significativement de celle produite par les deux doses inférieures.

Dans une autre expérience, l' α -méthyl-tyramine et l' α -méthyl-octopamine ont été injectées 2 jours consécutivement à raison de 30 mg/kg par la voie sous-cutanée, la seconde injection ayant été effectuée 16 hr après la première. Les deux substances ont provoqué dans le coeur et dans le cerveau un abaissement de la concentration en noradréline plus considérable que celui noté 2 hr après une seule injection (Table 2). Ceci indique que sous l'effet de ces doses relativement élevées, les taux de la noradréline dans ces deux organes n'étaient certainement pas revenus à leurs valeurs normales.

TABLE 2. EFFETS DE L' α -MÉTHYL-TYRAMINE ET DE L' α -MÉTHYL-OCTOPAMINE SUR LA CONCENTRATION DES CATÉCHOLAMINES DANS LE COEUR ET LE CERVEAU DU RAT

Traitement	n	Coeur		Cerveau			
		Noradrénaline $\mu\text{g/g}$	P†	P§	Noradrénaline $\mu\text{g/g}$	P†	P§
NaCl 0,9 %	13	0,95 \pm 0,055					
α -méthyl-tyramine 2 heures†	8	0,56 \pm 0,031	***		0,43 \pm 0,015	***	
α -méthyl-octopamine 2 heures†	4	0,17 \pm 0,017	***		0,13 \pm 0,011	***	
α -méthyl-tyramine 2 heures + 18 heures†	3	0,25 \pm 0,024		***	0,19 \pm 0,007	***	
α -méthyl-octopamine 2 heures + 18 heures†	3	0,06 \pm 0,014		**	0,08 \pm 0,005	*	
					0,53 \pm 0,058	*	
					0,71 \pm 0,041		***
					0,33 \pm 0,022		

† Temps écoulé entre l'injection (ou les injections) et le prélèvement des organes.

‡ P calculé par rapport aux rats traités au NaCl 0,9 %.

§ P calculé par rapport aux rats traités une seule fois, 2 heures avant le prélèvement des organes.

* 0-01 < P < 0-05.

** 0-001 < P < 0-01.

*** P < 0-001.

Les amines ont été injectées une fois ou deux fois par la voie sous-cutanée à la dose de 30 mg/kg. n = nombre d'extraits. Deux organes ont été réunis pour chaque extrait.

après 16 hr. Ce phénomène était particulièrement marqué dans le coeur. Enfin, la quantité absolue de noradrénaline restant dans le coeur après ce traitement était environ quatre fois plus petite après injection de l' α -méthyl-octopamine qu'après injection de l' α -méthyl-tyramine.

La concentration de la dopamine dans le cerveau a été abaissée par les deux amines. Comme pour l'abaissement de la noradrénaline dans cet organe, l'effet de l' α -méthyl-tyramine a été plus prononcé que celui de l' α -méthyl-octopamine. Dans les deux cas, la déplétion de la noradrénaline a été plus grande que celle de la dopamine (Table 2).

(2) *Captation de la [3 H]-noradrénaline.* La captation de la [3 H]-noradrénaline dans le coeur a été réduite en fonction des doses d' α -méthyl-tyramine ou d' α -méthyl-octopamine (Fig. 3). Comme pour les dépôts de la noradrénaline endogène dans cet organe,

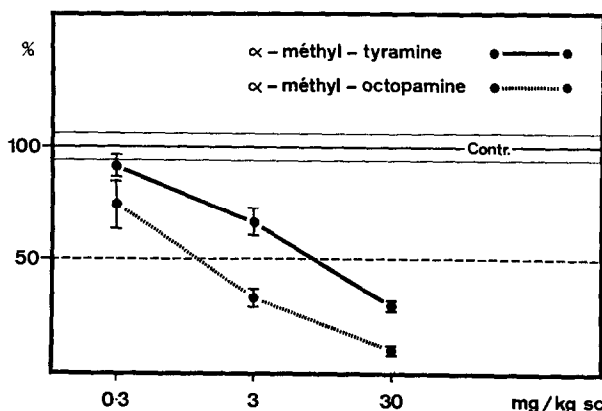


FIG. 3. Effets de l' α -méthyl-tyramine et de l' α -méthyl-octopamine sur la captation de la [3 H]-noradrénaline dans le coeur.

Les rats ont reçu une injection intraveineuse de DL- 3 H]-noradrénaline (50 μ Ci/ml/kg) 2 hr après avoir été traités par l' α -méthyl-tyramine ou l' α -méthyl-octopamine. Les coeurs ont été prélevés 1 hr plus tard pour le dosage de la [3 H]-noradrénaline. Deux coeurs ont été réunis pour un extrait. Abscisse: dose injectée. Ordonnée: teneur en [3 H]-noradrénaline, exprimée en pour cent des contrôles. La teneur moyenne absolue de huit témoins est de 225 ± 15 μ Ci/g coeur. Chaque symbole représente la valeur moyenne \pm l'écart-type (S.E.) de 4-7 extraits.

l'effet de l' α -méthyl-octopamine a été nettement plus marqué que celui de l' α -méthyl-tyramine. Les ED_{50} estimées par lecture du graphique, sont de 1,1 mg/kg pour l' α -méthyl-octopamine et de 8 mg/kg pour l' α -méthyl-tyramine.

DISCUSSION

L' α -méthyl-tyramine et l' α -méthyl-octopamine sont capables d'abaisser et, à doses suffisantes, de normaliser la pression artérielle du rat hypertendu. Elles ressemblent en cela au métaraminol, leur analogue méta-hydroxylé. Toutefois, tandis que l'effet antihypertenseur de petites doses de métaraminol augmente en cours du traitement,⁵ celui de l' α -méthyl-tyramine et de l' α -méthyl-octopamine ne paraît pas cumulatif. En effet, pour les doses des deux amines qui n'ont produit qu'un abaissement modéré de la pression artérielle, on n'a pas observé de modification de l'effet anti hypertenseur entre le 3ème et le 11ème jour du traitement. Les doses fortement antihypertensives, par contre, ont montré un maximum d'efficacité déjà le deuxième jour du traitement. Il est ainsi manifeste que l'action des deux amines *p*-hydroxylées est plus brève que

celle du métaraminol. L'action de l' α -méthyl-octopamine elle-même paraît plus durable que celle de l' α -méthyl-tyramine puisque l'abaissement de la pression artérielle mesuré 24 hr après la deuxième administration était encore très marqué (-55 mm Hg) pour la première, tandis qu'il n'était plus que marginal (-26 mm Hg) pour la seconde.

Les deux amines abaissent fortement et rapidement la concentration endogène des catécholamines du coeur et du cerveau. L'effet périphérique ressemble qualitativement à celui du métaraminol, l'effet au niveau du cerveau s'en distingue nettement. Le métaraminol ne diminue la noradrénaline cérébrale qu'après traitement prolongé avec des doses relativement élevées et la déplétion n'excède pas 40-50 pour cent.⁵ Déjà 2 hr après une seule administration d' α -méthyl-tyramine (3 mg/kg) ou d' α -méthyl-octopamine (30 mg/kg), on peut noter une déplétion au moins aussi importante et l'expérience effectuée sur les rats hypertendus montre que l' α -méthyltyramine peut vider les dépôts de la noradrénaline cérébrale de manière considérable provoquant une baisse de l'ordre de 80 pour cent, ce qui n'est jamais le cas avec le métaraminol et qui est d'autre part tout à fait inhabituel avec des amines de ce type. L'efficacité de l' α -méthyl-octopamine dans le cerveau est nettement moindre, que ce soit dans l'expérience à court terme ou après traitement prolongé. Que sa pénétration dans le cerveau soit rendue difficile par la présence du groupement $-OH$ en position β est vraisemblable. On reconnaît par contre à ce même groupement $-OH$ la faculté de renforcer l'attachement aux sites de la noradrénaline au niveau des granules intraneuronaux des terminaisons nerveuses sympathiques.¹⁴ Ceci peut expliquer l'affinité particulièrement grande de l' α -méthyl-octopamine pour le tissu cardiaque, ainsi qu'il ressort des détermination de la noradrénaline endogène dans cet organe tout comme des essais sur la captation de la noradrénaline marquée. La latence de l'effet de l' α -méthyl-tyramine permet d'ailleurs de supposer qu'une β -hydroxylation in situ conditionne au moins une partie de son efficacité sur les dépôts eux-mêmes ou sur les phénomènes de la captation et de la rétention dans ces dépôts.

Les résultats des essais sur la captation de la noradrénaline exogène ne permettent pas d'attribuer l'inhibition trouvée à une déficience de la pompe membranaire des cellules nerveuses (du type imipramine) ou à une réduction de la faculté de captation au niveau subcellulaire des granules de dépôt (du type réserpine), ou encore à un effet conjoint des deux α -méthyl-amines aux deux niveaux. La parenté de ces substances avec le métaraminol ne permet pas, à elle seule, de conclure que leurs effets respectifs sur les processus de la captation de la noradrénaline sont similaires.

Compte tenu de l'observation globale de ces deux effets, il n'est même pas possible de prétendre que l'action plus durable de l' α -méthyl-octopamine sur la pression artérielle peut être mise directement en relation avec son affinité plus grande pour les sites de la noradrénaline cardiaque. La constatation la plus manifeste qui ressort de la comparaison des activités noradréalinodéplétrices et antihypertensives est que les rats peuvent conserver leur hypertension même lorsque la concentration de noradrénaline dans le coeur et le cerveau est fortement réduite. Ceci a déjà été remarqué pour d'autres substances produisant ces deux types d'effets⁵ et ne se distingue pas, en cela, de ce qui est actuellement connu de la biochimie pharmacologique des substances à activité antihypertensive.

Remerciements—Nous remercions les Laboratoires Smith, Kline & French de Philadelphia d'avoir aimablement mis à notre disposition l' α -méthyl-tyramine et l' α -méthyl-octopamine. Nous remercions également Mme G. Schlicht, Mr. B. Fehr et Mr. P. De Herdt pour leur excellente assistance technique.

Résumé—L' α -méthyl-tyramine (Parédrine®) et l' α -méthyl-octopamine (p -OH-noréphédrine) ont abaissé la pression artérielle du rat hypertendu. Lorsque ces substances ont été administrées une fois par jour pendant 11 jours, aucun effet cumulatif n'a été observé, cependant que la durée d'action de l' α -méthyl-octopamine paraissait plus longue que celle de l' α -méthyl-tyramine. La détermination des catécholamines dans le cerveau et le coeur de rats hypertendus ou normotendus a montré que les deux α -méthyl-amines causaient une déplétion prononcée de la noradrénaline dans les deux organes, la déplétion étant proportionnelle à la dose administrée. L' α -méthyl-tyramine a vidé les dépôts de la noradrénaline plus fortement dans le cerveau et moins fortement dans le coeur que l' α -méthyl-octopamine, que ce soit dans l'expérience à court terme ou après traitement prolongé. Les deux substances ont en outre réduit la quantité de [3 H]-noradrénaline retenue dans le coeur après injection intraveineuse de l'amine marquée. A cet égard, l' α -méthyl-octopamine a été plus active que l' α -méthyl-tyramine.

On discute les différences et ressemblances entre ces amines p -hydroxylées et leur analogue structurel, le métaraminol.

REFERENCES

1. L. L. IVERSEN, *J. Pharm. Pharmac.* **18**, 481 (1966).
2. J. R. GILL, JR., D. T. MASON et F. C. BARTTER, *J. Pharmac. exp. Ther.* **155**, 288 (1967).
3. L. L. IVERSEN, *The Uptake and Storage of Noradrenaline in Sympathetic Nerves*, Cambridge University Press (1967).
4. E. MUSCHOLL, *Ann. Rev. Pharmac.* **6**, 107 (1966).
5. H. BRUNNER, P. R. HEDWALL, L. MAITRE et M. MEIER, *Br. J. Pharmac. Chemother.* **30**, 108 (1967).
6. C. R. CREVELING, J. W. DALY, B. WITKOP et S. UDENFRIEND, *Biochim. biophys. Acta* **64**, 125 (1962).
7. J. M. MUSACCHIO, M. GOLDSTEIN, B. ANAGNOSTE, G. POCH et I. J. KOPIN, *J. Pharmac. exp. Ther.* **152**, 56 (1966).
8. A. SJOERDSEMA et W. VON STUDNITZ, *Br. J. Pharmac. Chemother.* **20**, 278 (1963).
9. C. WILSON et F. B. BYROM, *Lancet* **1**, 136 (1939).
10. U. S. VON EULER et F. LISHAJKO, *Acta physiol. scand.* **45**, 122 (1959).
11. A. H. ANTON et D. F. SAYRE, *J. Pharmac. exp. Ther.* **145**, 326 (1964).
12. E. LORD, *Biometrika* **34**, 41 (1947).
13. C. A. M. HOGGEN, *J. Lab. clin. Med.* **64**, 815 (1964).
14. J. M. MUSACCHIO, I. J. KOPIN et V. K. WEISE, *J. Pharmac. exp. Ther.* **148**, 22 (1965).