

EVOLUTION DE LA RADIOACTIVITÉ SPÉCIFIQUE DE LA NORADRÉNALINE-³H DANS DIFFÉRENTS ORGANES DU RAT *IN VIVO* APRÈS INHIBITION DE LA TYROSINE HYDROXYLASE

J. BRALET, A. BELEY, A. M. LALLEMANT et A. M. BRALET

Laboratoire de Physiologie Pharmaceutique, Faculté de Médecine et Pharmacie,
Boulevard Jeanne d'Arc, 21 Dijon, France

(Received 30 July 1971; accepted 8 October 1971)

Abstract—Rats were injected with *l*-noradrenaline-³H (NAd). Four hr later tyrosine hydroxylase was inhibited by administration of α -methyl-paratyrosine; both endogenous and radioactive NAd were determined at various intervals in the heart, sub-maxillary glands, femoral muscle and small intestine. The specific radioactivity of NAd and the disappearance rates for endogenous and ³H NAd were estimated. In the heart and muscle, the specific activity of NAd-³H decreased significantly after α -methyl-paratyrosine injection, the NAd-³H being released preferentially to the endogenous NAd. In the sub-maxillary gland and small intestine, the specific activity of NAd-³H was not significantly modified after inhibition of the NAd synthesis, the endogenous and ³H NAd disappearing from these two organs at equivalent rates. These results suggest that the rate of equilibration of exogenous with endogenous NAd may vary with the type of organ.

PARMI les méthodes qui ont été proposées (voir Costa et Neff¹) pour mesurer le taux de renouvellement de la noradrénaline (NAd) tissulaire, deux d'entre elles sont fondées sur l'évaluation de la vitesse de disparition du médiateur sympathique. La première consiste à administrer à l'animal une dose traceuse² de NAd radioactive et à suivre sa disparition au cours du temps: cette méthode nécessite que l'amine radioactive soit distribuée de façon homogène au sein de la NAd endogène. La seconde³ mesure la diminution des teneurs en NAd endogène après blocage de sa biosynthèse par l' α -méthyl-paratyrosine (α -MPT), un puissant inhibiteur⁴ de la tyrosine hydroxylase.

Comparant les résultats fournis par ces deux méthodes au niveau du cerveau de rat, Iversen et Glowinski⁵ observent que la vitesse de disparition de la NAd-³H administrée par voie intraventriculaire est sensiblement identique à la vitesse de disparition de la NAd endogène après traitement par l' α -MPT. Au niveau du coeur de rat, Brodie *et al.*³ obtiennent des résultats identiques par utilisation des deux méthodes mais cette concordance n'est pas retrouvée dans les travaux de Westfall et Osada⁶ et de Nakamura *et al.*⁷ De même, une étude récente (Bralet *et al.*, à paraître) nous a montré que selon la nature de l'organe considéré (coeur, rate, glandes sous-maxillaires, muscle squelettique, intestin) des discordances parfois très importantes apparaissent entre les résultats fournis par chacune de ces deux méthodes.

Ces divergences peuvent avoir comme origine une distribution hétérogène du traceur radioactif au sein du médiateur endogène. Ce problème complexe de la dilution de la NAd exogène dans la NAd endogène a été abordé dans le présent travail par l'étude

de l'évolution de la radioactivité spécifique de la NAd-³H dans différents organes du rat traité par l' α -MPT, la NAd tissulaire de l'animal ayant été préalablement marquée par administration de *L*-NAd-³H.

METHODE

Des rats mâles Charles River (200–220 g) reçoivent dans une veine de la queue une injection de *L* NAd-³H (Radiochemical Centre Amersham, activité spécifique 2,18 ou 4,10 c/mM): la dose de NAd-³H injectée est, selon les expériences, de 0,50 ou de 1,35 μ g/kg. Quatre heures après l'administration de l'amine radioactive, les animaux reçoivent une première injection intrapéritonéale de 250 mg/kg d' α -MPT suivie, 2 hr plus tard, d'une seconde injection de 100 mg/kg. L' α -MPT (α -méthyl-DL tyrosine, Regis Chemical) est dissoute immédiatement avant l'injection dans quelques gouttes de NaOH 5N et la solution est ramenée à pH 7,5 par addition de HCl N.

Les animaux sont répartis en quatre lots qui sont sacrifiés respectivement 4, 6, 9, 12 hr après l'injection de la NAd radioactive. Le coeur, les glandes sous-maxillaires, une partie d'environ 1g du muscle de la cuisse et de l'intestin grêle (partie duodénale) sont prélevés, rincés dans une solution de NaCl à 9 g/l., essuyés, pesés et broyés à l'Ultra-Turrax dans 10 ml de HClO₄ 0,4 N contenant du métabisulfite de Na (0,5 g/100 ml) et de l'EDTA disodique (0,5 g/100 ml). Après centrifugation, le surnageant perchlorique est utilisé pour la détermination de la NAd-³H et de la NAd endogène. Ces dernières sont isolées par adsorption sur alumine selon la technique d'Anton et Sayre⁸ et éluées par 5 ml de CH₃COOH 0,2 N. Deux ml de l'éluat acétique sont utilisés pour le dosage fluorimétrique de la NAd endogène par la technique de Von Euler et Lishajko.⁹ La radioactivité présente dans l'éluat acétique (NAd-³H et catéchols désaminés-³H) est mesurée (Packard 3380) par addition de 2 ml d'éluat à 15 ml de liquide scintillant (PPO, 4 g; diméthyl-POPOP, 0,1 g; Triton \times 100, 500 ml; toluène, 1 l.); la contamination de l'éluat acétique par les catéchols désaminés-³H (acide dihydroxy-mandélique, dihydroxy-phénylglycol) a été évaluée par extraction de 0,5 ml d'éluat par l'acétate d'éthyle selon la technique décrite par Crout.¹⁰ Dans tous les cas ces dérivés représentaient moins de 5 pour cent de la radioactivité présente dans l'éluat acétique et aucune correction n'a été effectuée. L'autoextinction des échantillons a été évaluée par la méthode du standard externe.

Pour chacun des organes étudiés, on calcule les vitesses de disparition de la NAd endogène et de la NAd-³H. Les teneurs en amine, corrigées en fonction du rendement des méthodes employées, sont exprimées en ng/g pour la NAd endogène et en dpm/g pour la NAd-³H puis transformées en logarithmes pour le calcul de l'équation de la droite de régression. La vérification de la linéarité de la régression et la détermination de l'erreur sur le coefficient de régression sont effectuées selon Snedecor.¹¹ A partir de la pente de la droite on détermine la vitesse de libération de la NAd (k hr⁻¹) et sa demi-vie biologique ($T_{1/2} = 0,693/k$).

RESULTATS

1. Evolution de la radioactivité spécifique de la NAd-³H sous l'influence du traitement par l' α -MPT

La radioactivité spécifique de la NAd-³H a été déterminée dans le coeur, les glandes sous-maxillaires, le muscle fémoral et l'intestin grêle chez des rats qui ont reçu une

injection de $1\text{ NAd-}^3\text{H}$, 4 hr avant l'administration d' α -MPT. Lors des études réalisées au niveau du coeur et des glandes sous-maxillaires, les animaux ont reçu $0,50\text{ }\mu\text{g/kg}$ de $\text{NAd-}^3\text{H}$ (activité spécifique $4,10\text{ c/mM}$): pour le muscle et l'intestin, la dose de $\text{NAd-}^3\text{H}$ (activité spécifique $2,18\text{ c/mM}$) administrée aux animaux est de $1,35\text{ }\mu\text{g/kg}$, cette dose s'étant avérée nécessaire pour évaluer avec précision les teneurs en $\text{NAd-}^3\text{H}$ de ces deux organes.

Le Tableau 1 montre les valeurs de la radioactivité spécifique $[(\text{NAd-}^3\text{H dpm/g})/\text{NAd endogène ng/g}]$ dans les différents organes, d'une part immédiatement avant l'inhibition de la biosynthèse (temps zéro) et d'autre part après 8 heures d'inhibition; cette dernière est réalisée par administration d' α -MPT à la dose de 250 mg/kg au temps zéro suivis de 100 mg/kg 2 hr plus tard.

TABLEAU 1. EVOLUTION DE LA RADIOACTIVITÉ SPÉCIFIQUE DE LA $\text{NAd-}^3\text{H}$ SOUS L'INFLUENCE DU TRAITEMENT PAR L' α -MPT

Organe	Radioactivité spécifique	$\text{NAd-}^3\text{H dpm/g}$ NAd endogène ng/g
	Immédiatement avant l'inhibition de la biosynthèse	Après 8 hr d'inhibition de la biosynthèse
Coeur	127 ± 13	59 ± 9 ($P < 0,001$)
Muscle	106 ± 4	76 ± 11 ($P < 0,05$)
Glandes sous-maxillaires	24 ± 6	16 ± 2
Intestin grêle	52 ± 4	71 ± 11

Chaque valeur de la radioactivité spécifique est la moyenne, affectée de l'erreur moyenne, d'au moins six déterminations.

Tous les animaux ont reçu la $\text{NAd-}^3\text{H}$ 4 hr avant que la biosynthèse soit inhibée par l' α MPT. Dans le cas du coeur et des glandes sous-maxillaires, la $\text{NAd-}^3\text{H}$ ($4,1\text{ c/mM}$) est injectée à la dose de $0,5\text{ }\mu\text{g/kg}$; dans le cas du muscle et de l'intestin, la dose de $\text{NAd-}^3\text{H}$ ($2,18\text{ c/mM}$) est de $1,35\text{ }\mu\text{g/kg}$.

Au niveau du coeur, on constate une diminution importante de la radioactivité spécifique de la $\text{NAd-}^3\text{H}$ qui passe de 127 ± 13 au temps zéro à 59 ± 9 au temps 8 hr ($P < 0,001$). Une variation de même sens mais moins marquée est retrouvée dans le muscle dont la radioactivité spécifique passe de 106 ± 4 à 76 ± 11 ($P < 0,05$).

Dans les glandes sous-maxillaires, on note également une chute de la radioactivité spécifique, de 24 ± 6 au temps zéro à 16 ± 2 au temps 8 hr mais cette variation n'est pas statistiquement significative. Au niveau de l'intestin l'administration d' α -MPT provoque une légère augmentation, non significative, de la radioactivité spécifique qui passe de 52 ± 4 à 71 ± 11 .

2. Comparaison des vitesses de disparition de la NAd endogène et de la $\text{NAd-}^3\text{H}$

L'évolution de la radioactivité spécifique de la $\text{NAd-}^3\text{H}$ est illustrée de façon plus précise par la comparaison des vitesses de disparition de la NAd endogène et ^3H (Tableau 2). Dans tous les organes étudiés, les concentrations en NAd , aussi bien endogène que radioactive, disparaissent de façon apparemment monoexponentielle, la linéarité des droites de régression étant vérifiée dans tous les cas ($P < 0,05$).

TABLEAU 2. VITESSES DE DISPARITION DE LA NAd ENDOGÈNE ET DE LA NAd-³H SOUS L'INFLUENCE DU TRAITEMENT PAR L' α -MPT

Organe	NAd endogène		NAd- ³ H	
	Vitesse de disparition (hr ⁻¹)	T _{1/2} (hr)	Vitesse de disparition (hr ⁻¹)	T _{1/2} (hr)
Coeur	0,0278 \pm 0,0140	24,9	0,116 \pm 0,024*	5,9
Muscle	0,086 \pm 0,014	8,0	0,142 \pm 0,020†	4,9
Glandes				
sous-maxillaires	0,073 \pm 0,015	9,5	0,086 \pm 0,030	8,1
Intestin grêle	0,234 \pm 0,027	3,0	0,232 \pm 0,024	3,0

* P < 0,05

† 0,05 < P < 0,1

} comparé à la vitesse de disparition de la NAd endogène.

La NAd-³H est injectée 4 hr avant le début du traitement par l' α -MPT.

Les vitesses de disparition de la NAd endogène et ³H sont calculées au cours des 8 hr qui suivent l'administration de l' α -MPT: elles sont affectées de leurs écart-types.

Au niveau du coeur (Fig. 1), la vitesse de disparition de la NAd endogène, après inhibition de sa biosynthèse, est trouvée égale à 0,0278 \pm 0,0140 hr⁻¹, ce qui correspond à une demi-vie biologique de 24,9 hr. Dans les mêmes conditions, la NAd-³H (T_{1/2} = 5,9 hr) disparaît environ 4 fois plus vite (P < 0,05).

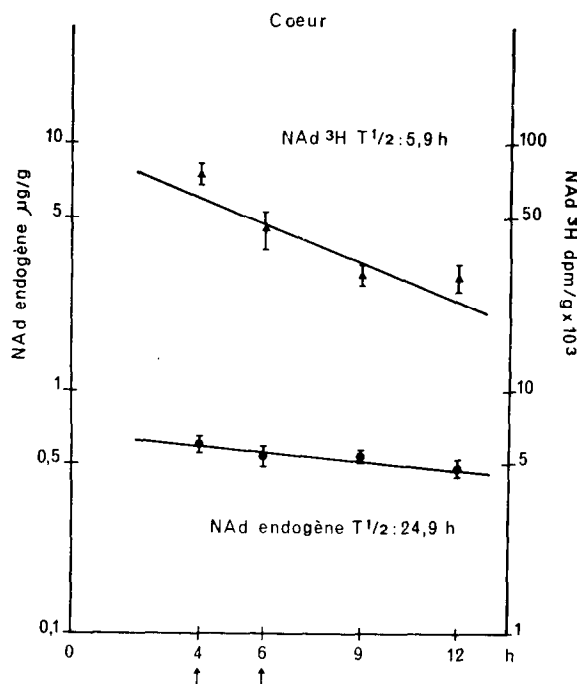


FIG. 1. Disparitions de la NAd endogène et de la NAd-³H à partir du coeur de rat après inhibition de la tyrosine hydroxylase par l' α -MPT. Au temps zéro, les animaux ont reçu une injection intraveineuse de 0,5 μ g/kg de l'NAd-³H (4,10 c/mM). L' α -MPT est administrée aux endroits marqués d'une flèche, c'est à dire 4 hr (250 mg/kg) et 6 hr (100 mg/kg) après la NAd-³H. Chaque point est la moyenne, affectée de l'erreur moyenne, d'au moins six déterminations. Les pentes des droites sont calculées par la méthode des moindres carrés.

Dans le muscle (Fig. 2), on observe également une différence ($0,05 < P < 0,1$) entre les vitesses de disparition de la NAd endogène ($T_{1/2} = 8,0$ hr) et radioactive ($T_{1/2} = 4,9$ hr).

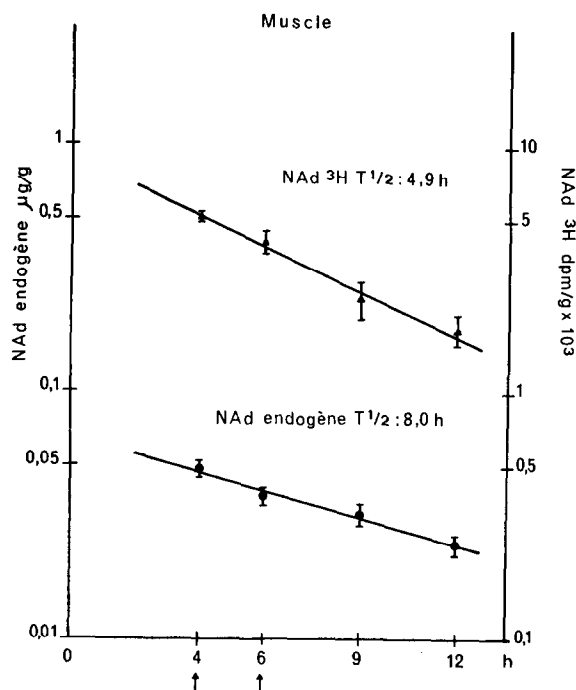


FIG. 2. Disparitions de la NAd endogène et de la NAd- ^3H à partir du muscle fémoral de rat après inhibition de la tyrosine hydroxylase par l' α -MPT. Au temps zéro, les animaux ont reçu une injection intraveineuse de $1,35 \mu\text{g/kg}$ de l NAd- ^3H ($2,18 \text{ c/mM}$). Les modalités d'administration de l' α -MPT et les conditions d'obtention des droites sont les mêmes que pour la Fig. 1.

Au niveau des glandes sous-maxillaires (Fig. 3), la NAd- ^3H disparaît ($T_{1/2} = 8,1$ hr) légèrement plus vite que la NAd endogène ($T_{1/2} = 9,5$ hr) mais la différence n'est pas statistiquement significative. Dans l'intestin (Fig. 4), les vitesses de disparition de l'amine radioactive et endogène sont identiques ($T_{1/2} = 3,0$ hr).

DISCUSSION

Les résultats obtenus dans le présent travail montrent qu'après inhibition de la biosynthèse de la NAd par l' α -MPT, la radioactivité spécifique de l'amine évolue de façon différente selon la nature de l'organe considéré. Dans le coeur et le muscle squelettique, la NAd- ^3H est libérée préférentiellement à la NAd endogène alors qu'au niveau des glandes sous-maxillaires et de l'intestin grêle, on n'observe pas de différences significatives entre les vitesses de libération des deux amines, endogène et radioactive. Ces résultats posent le problème de l'incorporation de la NAd exogène au sein du médiateur endogène.

S'il paraît admis (voir Iversen¹²) que la NAd exogène administrée à l'animal est localisée au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques, les modalités de son

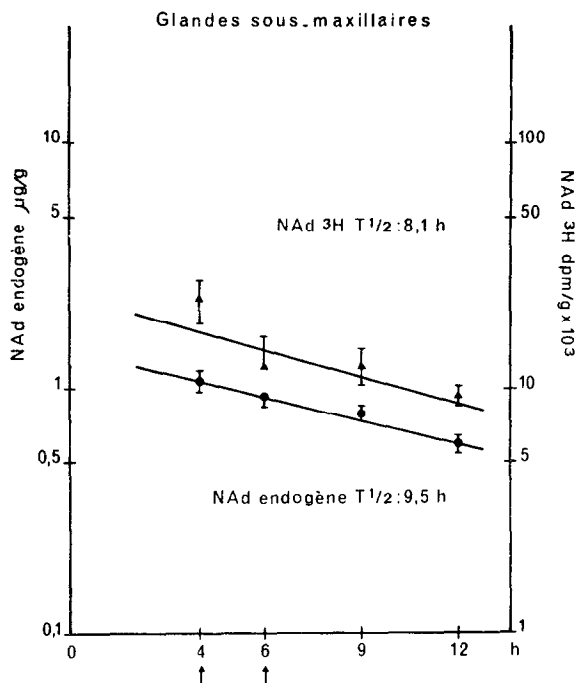


FIG. 3. Disparitions de la NAd endogène et de la NAd-³H à partir des glandes sous-maxillaires de rat après inhibition de la tyrosine hydroxylase par l' α -MPT. Au temps zéro, les animaux ont reçu une injection intraveineuse de 0,5 μ g/kg de l'NAd-³H (4,10 c/mM). Les modalités d'administration de l' α -MPT et les conditions d'obtention des droites sont les mêmes que pour la Fig. 1.

incorporation à l'amine endogène ont fait l'objet de très nombreux travaux dont les résultats ont pu paraître contradictoires. Les conclusions des premières études cinétiques relatives à la fixation¹³ ou à la libération^{10,14,15} de la NAd-³H à partir du coeur indiquaient que l'amine radioactive était localisée dans au moins deux compartiments différents. Des recherches ultérieures² ont montré que l'allure de la disparition de la NAd-³H à partir du coeur de rat était en fait liée à l'importance de la dose d'amine radioactive administrée à l'animal.

Après l'injection d'une dose faible (dose traceuse, inférieure à 1 μ g/kg) de NAd-³H, cette dernière disparaît du coeur de façon monoexponentielle. Avec l'utilisation d'une dose plus forte de NAd-³H (dose non traceuse), on voit apparaître une libération biexponentielle consistant en une phase initiale rapide, d'une durée de quelques heures, suivie d'une seconde phase beaucoup plus lente. Cette seconde phase présente des caractéristiques cinétiques identiques² à celles qui sont observées après administration d'une dose traceuse de NAd-³H. La première phase de libération qui est observée après injection de doses non traceuses est considérée² comme un artefact dû à la création artificielle ou à la surcharge d'un petit compartiment de NAd.

Il ressort de ces résultats qu'à condition d'utiliser une dose suffisamment faible de NAd-³H ou de se placer à un temps suffisamment long après l'injection d'une dose non traceuse, la NAd-³H disparaît du coeur de façon monoexponentielle ce qui constitue un argument en faveur de sa distribution homogène au sein du médiateur endogène. Nous avons personnellement obtenu des résultats similaires dans divers autres organes

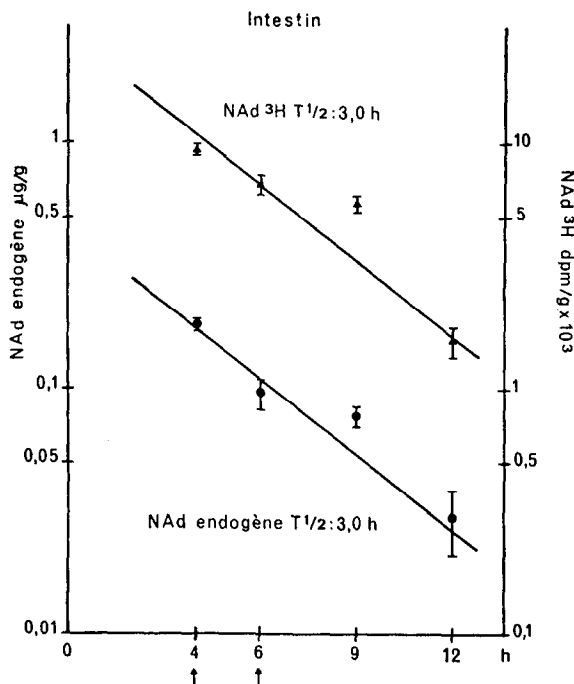


FIG. 4. Disparitions de la NAd endogène et de la NAd- ^3H à partir de l'intestin grêle de rat après inhibition de la tyrosine hydroxylase par l' α -MPT. Au temps zéro, les animaux ont reçu une injection intraveineuse de 1,35 $\mu\text{g/kg}$ de l NAd- ^3H (2,18 c/mM). Les modalités d'administration de l' α -MPT et les conditions d'obtention des droites sont les mêmes que pour la Fig. 1.

périphériques du rat¹⁶ (en particulier les glandes sous-maxillaires, le muscle et l'intestin grêle), la disparition de la NAd- ^3H s'effectuant de façon apparemment monoexponentielle entre 2 et 24 hr après l'injection de 1,35 $\mu\text{g/kg}$ de l NAd- ^3H .

Si l'on admet que la NAd- ^3H est distribuée uniformément dans la NAd endogène de ces divers organes, on devrait observer, après inhibition de la biosynthèse de la NAd, des vitesses de disparition similaires pour l'amine endogène et radioactive. Un tel résultat est effectivement trouvé au niveau des glandes sous-maxillaires et de l'intestin grêle, mais dans le coeur et le muscle, la NAd- ^3H disparaît plus rapidement que la NAd endogène. Un tel phénomène peut avoir deux origines: soit une inhibition incomplète de la biosynthèse par l' α -MPT, soit une distribution hétérogène de la NAd radioactive dans le médiateur endogène.

Une inhibition incomplète de la tyrosine hydroxylase entraînerait effectivement une diminution progressive de la radioactivité spécifique de la NAd- ^3H , l'amine radioactive étant constamment diluée par la NAd nouvellement synthétisée. La dose d' α -MPT utilisée dans le présent travail a été choisie à partir des données de la littérature^{3,4} qui indiquent que l'activité de la tyrosine hydroxylase est réduite d'une façon considérable dans ces conditions. Bien qu'il ne soit pas possible d'affirmer que la biosynthèse de la NAd est bloquée à 100% par l' α -MPT chez l'animal *in vivo*,¹⁷ il semble difficile qu'une persistance minime de l'activité de la tyrosine hydroxylase puisse entraîner une différence aussi nette entre les vitesses de libération de la NAd endogène et radioactive telle qu'elle apparaît au niveau du coeur.

Divers travaux récents¹⁸⁻²⁰ ont montré que la NAd des terminaisons nerveuses n'était pas également mobilisable par l'influx nerveux, la NAd nouvellement synthétisée étant libérée préférentiellement par rapport à la NAd préexistante. L'hypothèse a été avancée que cette fraction de NAd à taux de renouvellement élevé était localisée dans les granules situés au voisinage de la membrane neuronale. On peut supposer qu'aussitôt après l'injection de NAd-³H, il y ait un marquage préférentiel des granules adjacents à la membrane neuronale.¹⁰ La NAd de cette zone faisant l'objet d'un renouvellement intense, l'amine radioactive va être rapidement diluée par la NAd nouvellement synthétisée, la vitesse de dilution étant fonction du taux de renouvellement du médiateur. D'autre part la NAd-³H va s'équilibrer plus lentement avec la NAd stockée dans les granules profonds.

On peut ainsi concevoir que la radioactivité spécifique de la NAd-³H libérée par un organe donné puisse varier en fonction, d'une part de l'ancienneté du marquage de l'organe par le traceur radioactif et d'autre part de l'intensité de la stimulation nerveuse. Ainsi Chidsey et Harrison²¹ rapportent que moins de six heures après l'administration de NAd-³H, l'activité spécifique de la NAd libérée par le coeur de chien sous l'effet de la stimulation nerveuse est plus élevée que l'activité spécifique retrouvée dans le coeur. Chez le chat ayant reçu une injection de NAd-³H 16 à 20 hr auparavant et dont la rate est perfusée par un liquide physiologique, Kopin *et al.*¹⁸ observent que sous l'effet d'une stimulation électrique intense, la radioactivité spécifique de la NAd libérée dans le perfusat est plus faible que celle qui reste dans la rate. Ces mêmes auteurs constatent qu'après inhibition de la biosynthèse du médiateur par addition d' α -MPT au liquide de perfusion, les activités spécifiques de la NAd libérée et de la NAd tissulaire sont identiques.

Cette dernière observation peut être reliée aux résultats que nous avons obtenus *in vivo* dans le présent travail au niveau des glandes sous-maxillaires et de l'intestin. Dans ces deux organes, la NAd radioactive paraît être distribuée de façon homogène dans la NAd endogène 4 hr après l'administration de la NAd-³H alors que cet équilibre ne semble pas atteint dans le coeur et le muscle. La vitesse d'équilibration de la NAd exogène au sein du médiateur endogène semble donc dépendre de la nature de l'organe considéré.

Résumé—La biosynthèse de la noradrénaline (NAd) est inhibée par administration d' α -méthyl-paratyrosine chez des rats qui ont reçu, 4 hr auparavant, une injection intraveineuse de NAd-³H. Les teneurs en NAd endogène et en NAd-³H sont évaluées à différents temps après l'administration d' α -méthyl-paratyrosine dans le coeur, le muscle fémoral, les glandes sous-maxillaires et l'intestin grêle. On détermine dans chaque organe l'évolution de la radioactivité spécifique de la NAd ainsi que les vitesses de disparition de la NAd endogène et radioactive. Dans le coeur et le muscle, l'activité spécifique de la NAd-³H diminue significativement sous l'influence du traitement par l' α -méthyl-paratyrosine, la NAd-³H étant libérée préférentiellement à la NAd endogène. Au niveau des glandes sous-maxillaires et de l'intestin l'activité spécifique de la NAd-³H n'est pas modifiée de façon significative après inhibition de la biosynthèse, la NAd endogène et radioactive disparaissant sensiblement à la même vitesse. Ces résultats suggèrent que la vitesse d'équilibration de la NAd exogène au sein du médiateur endogène est fonction de la nature de l'organe.

BIBLIOGRAPHIE

1. E. COSTA et N. H. NEFF, in *Topics in Medical Chemistry*. Interscience, Publ. 2, pp. 65-95. New York (1968).
2. N. H. NEFF, T. N. TOZER, W. HAMMER, E. COSTA et B. B. BRODIE, *J. Pharmac. exp. Ther.* **160**, 48 (1968).

3. B. B. BRODIE, E. COSTA, A. DLABAC, N. H. NEFF et H. H. SMOOKLER, *J. Pharmac. exp. Ther.* **154**, 493 (1966).
4. S. SPECTOR, A. SJOERDSMA et S. UDENFRIEND, *J. Pharmac. exp. Ther.* **147**, 86 (1965).
5. L. L. IVERSEN et J. GLOWINSKI, *J. Neurochem.* **13**, 671 (1966).
6. T. C. WESTFALL et H. OSADA, *J. Pharmac. exp. Ther.* **167**, 300 (1969).
7. K. NAKAMURA, M. GEROLD et H. THOENEN, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **268**, 125 (1971).
8. A. H. ANTON et D. F. SAYRE, *J. Pharmac. exp. Ther.* **138**, 360 (1962).
9. U. S. VON EULER et F. LISHAJKO, *Acta Physiol. Scand.* **51**, 348 (1961).
10. J. R. CROUT, *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* **248**, 85 (1964).
11. G. W. SNEDECOR, *Statistical Methods*. Iowa state University Press, Ames (1967).
12. L. L. IVERSEN, *The Uptake and Storage of Noradrenaline in Sympathetic Nerves*. Cambridge University Press (1967).
13. L. L. IVERSEN, *Br. J. Pharmacol.* **21**, 523 (1963).
14. J. AXELROD, G. HERTTING et R. W. PATRICK, *J. Pharmac. exp. Ther.* **134**, 325 (1961).
15. R. MONTANARI, E. COSTA, M. A. BEAVEN et B. B. BRODIE, *Life Sci.* **2**, 232 (1963).
16. J. BRALET, A. BELEY, A. M. BRALET et J. WEPIERRE, *Pflügers Arch.* **323**, 297 (1971).
17. R. J. WURTMANN, F. ANTON-TAY et S. ANTON, *Life Sci.* **8**, 1015 (1969).
18. I. J. KOPIN, G. R. BREESE, K. R. KRAUSS et V. K. WEISE, *J. Pharmac. exp. Ther.* **161**, 271 (1968).
19. G. P. GEWIRTZ et I. J. KOPIN, *J. Pharmac. exp. Ther.* **175**, 514 (1970).
20. L. STJÄRNE et A. WENNMALM, *Acta physiol. scand.* **80**, 428 (1970).
21. C. A. CHIDSEY et D. C. HARRISON, *J. Pharmac. exp. Ther.* **140**, 217 (1963).