

WELCH and COUCH<sup>1</sup> observed in 1951 an interrelationship between vitamin B<sub>12</sub> and pantothenic acid in chicken liver cells. The nature of this phenomenon is still unexplained.

The phenomenon observed by the author has also no explanation, but because of its biological importance it deserves more investigation.

J. JÄNNES

Department of Medical Chemistry, University of Helsinki, July 4, 1953.

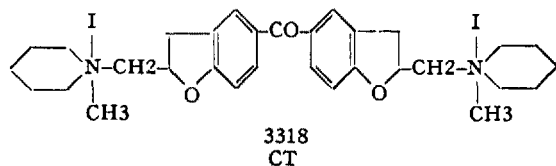
#### Zusammenfassung

Drei «wilde» Stämme von *Escherichia coli* wurden auf vitaminfreien Nährböden gezüchtet. Zusatz von Vitamin B<sub>12</sub> in Konzentrationen von 0,03 bis 0,06  $\gamma$  je ml ergab bei verschiedenen Stämmen eine ungleiche Hemmung der Pantothenäure-Synthese. Die eindeutigsten Resultate wurden mit frischen Stämmen erzielt, die nur kurz auf Agar gezüchtet wurden.

<sup>1</sup> B. E. WELCH and J. R. COUCH, Abstracts Amer. Chem. Soc. Southwest Regional Meeting 35-36 (Austin, Texas, Dec. 1951), cited by A. D. WELCH, and C. A. NICHOL in Ann. Rev. Biochem. 1952 Stanford, Calif. p. 674.

### Sur l'inhibition sélective des acétylcholinestérases *in vivo* chez le chien

HAWKINS et MENDEL<sup>1</sup> ont récemment décrit un agent anticholinestérasique, le N-p-chlorophényl-N-méthylcarbamate de m-hydroxy-phényl-triméthylammonium (Nu-1250) grâce auquel ils ont, chez le rat, inactivé les acétylcholinestérases (AcChE) plasmatiques sans inhiber les cholinestérases non spécifiques de l'acétylcholine (XChE); dans ces conditions ils ont observé l'apparition de différents symptômes acétylcholinomimétiques et ils ont conclu, de ce fait, que les XChE n'ont aucun rôle, même auxiliaire, dans l'hydrolyse *in vivo* de l'acétylcholine. Il eût convenu, pour étayer cette conclusion, de réaliser des expériences similaires chez des animaux se prêtant à des analyses pharmacologiques plus détaillées, mais le Nu-1250 s'avéra, chez le chien, dépourvu d'activité antiacétylcholinestérasique sélective (CASIER et DE VLEESCHOUWER<sup>2</sup>).



<sup>1</sup> R. D. HAWKINS et B. MENDEL, Biochem. J. 44, 260 (1949).

<sup>2</sup> H. CASIER et G. R. DE VLEESCHOUWER, Arch. int. Pharmacodyn. 90, 412 (1952).

La synthèse, par FUNKE et VON DÄNIKEN<sup>1</sup>, d'un nouvel antiacétylcholinestérasique<sup>2</sup>, le di-iodométhylate de la bis(pipéridinométhylcoumaranyl-5) cétone (3318 CT), nous a permis d'entreprendre une étude de l'inhibition préférentielle des AcChE chez le chien, et nous résumons ici les résultats observés jusqu'à présent.

#### I.—Activités anticholinestérasiques du 3318 CT

a) *Essais in vitro* (Tableau I). Les expériences ont été réalisées avec la méthode de WARBURG-AMMON<sup>3</sup>, et cela dans des conditions classiques, en utilisant l'acétylcholine elle-même comme substrat. — Comme le Nu-1250, le 3318 CT inhibe l'AcChE globulaire de l'homme pour des concentrations environ 10 000 fois inférieures à celles nécessaires pour inactiver la ChE plasmatique dans les mêmes proportions. — En outre, et contrairement au Nu-1250, le 3318 CT est aussi un antiacétylcholinestérasique sélectif dans le cas des enzymes du chien, le rapport activité anti-AcChE : activité anti-ChE étant ici de 10 000 à 100 000; cette activité antiacétylcholinestérasique est très élevée, environ 10 fois supérieure à celle du Nu-1250 sur l'AcChE globulaire humaine et de 10 à 100 fois supérieure à celle de la Prostigmine sur l'AcChE globulaire du chien. Comme la prostigmine et comme le Nu-1250, le 3318 CT est un inhibiteur réversible car l'inhibition observée rétrocede lorsque le complexe enzyme-substrat est dilué.

b) *Essais in vivo*. L'existence d'un effet de dilution nous a conduit à réaliser la majorité de nos déterminations (Tableau II) avec du sang (ou du plasma) aussi peu dilué que possible et avec des substrats dits spécifiques, c'est-à-dire avec de la benzoylcholine (0,01 M) pour les activités des XChE, et de l'acétyl- $\beta$ -méthylcholine (0,03 M) pour celles des AcChE. En plus des corrections classiques, ceci a nécessité la détermination des coefficients de rétention du sang (ou du plasma)<sup>4</sup>. Le sang était systématiquement prélevé avant et une demi-heure après l'injection de 3318 CT. Dans ces conditions, aucune inhibition significative des XChE sanguines ne fut observée, même après 1 mg/kg i.v., alors qu'une inactivation nette des AcChE apparut dès après 0,01 mg/kg. Des déterminations réalisées dans d'autres conditions, avec l'acétylcholine comme substrat, ont confirmé, dans les limites des erreurs qu'elles impliquent, le caractère sélectif de l'inhibition des AcChE par le 3318 CT.

<sup>1</sup> A. FUNKE et K. VON DÄNIKEN, Bull. Soc. Chim. France, 457 (1953).

<sup>2</sup> A. FUNKE, J. JACOB et K. VON DÄNIKEN, C. r. Acad. Sci. 236, 149 (1953).

<sup>3</sup> R. AMMON, Pflügers Arch. 38, 729 (1934).

<sup>4</sup> W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS et J. F. STAUFFER, *Manometric Techniques* (Burgess Publ. Co., Minneapolis 1945), p. 115.

Tableau I  
Inhibitions, *in vitro* (en %), de cholinestérases sanguines par le 3318 CT

Source d'enzyme			Concentration du substrat (AcCh)	Concentrations de 3318 CT (M)					
				10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>
Homme	Plasma	(1/30) . . .	0,06 M	82	45	10	5	5	7
	Globules	(1/60) . . .	0,005 M	—	—	—	97	80	56
Chien	Plasma	(1/30) . . .	0,06 M	43	9	3	—	0	0
	Globules	(1/24) . . .	0,005 M	—	95	94	84	60	34

Tableau II. Inhibitions, *in vivo*, des cholinestérases du sang de chien par le 3318 CT

Chien N°	3318 CT injection i.v. (mg/kg)	Source d'enzyme (concentration terminale: = 0,75)	Inhibition (en %) des	
			XChE (substrat: benz. Ch : 0,01 M)	AcChE (substrat: Ac. -méthyl-Ch. 0,03 M)**
1	0,001	sang total	—	0
1	0,01	sang total	—	20
1	0,10	sang total	—	65
2	0,10	sang total	3	60
3	0,20	plasma séparé	0	65
4	0,25	sang total	8	70
5*	0,25	sang total	0	—
6*	0,40	sang total	—	> 50
7	1	sang total	8	> 50

\* Les chiens 5\* et 6\* étaient éveillés, les autres animaux chloralosés et ventilés artificiellement.

\*\* La précision de ces déterminations est faible en raison de causes d'erreurs dans le détail desquelles nous ne pouvons entrer ici.

### II.—Propriétés pharmacologiques du 3318 CT

L'administration intraveineuse de 0,02 à 0,5 mg/kg de 3318 CT est suivie de myosis, de salivation, de lacrymation, de diarrhée, de secousses musculaires fibrillaires et fasciculaires, de parésie et de dyspnée. Le chien éveillé meurt par asphyxie, avec 0,3 à 0,5 mg/kg i.v.; le chien narcosé et ventilé artificiellement supporte des doses plus élevées; l'atropinisation prévient ou abolit les symptômes muscariniques. Dans l'ensemble, et à l'exception de la parésie motrice, les actions du 3318 CT nous ont paru moins intenses que celles provoquées par des doses égales de prostigmine; cette différence est extrême dans le cas de l'effet sur la fréquence cardiaque: chez le chien chloralosé, cette dernière n'est qu'exceptionnellement ralentie – et seulement très modérément – par le 3318 CT. Cette substance sensibilise nettement la bradycardie acétylcholinique dès après 0,5 µg par kg et la bradycardie par faradisation prolongée (1 min ou plus) du nerf vague après 5-20 µg par kg; la bradycardie par faradisation brève (5 s) et la bradycardie réflexe à l'hypertension adrénalinique sont moins nettement influencées, la bradycardie réflexe à la désocclusion carotidienne ne l'est pratiquement pas; en outre, la sensibilisation des bradycardies acétylcholinique et vagale est incomplète en ce sens que, lorsqu'elle ne progresse plus malgré l'administration répétée de 0,3 à 0,5 mg/kg de 3318 CT, il reste possible de l'accroître considérablement par l'injection de 0,1 à 0,2 mg/kg de prostigmine. Enfin, les hypertensions acétylcholinique (chez l'animal atropinisé) et nicotinique sont accrues; il n'en est pas de même pour l'hypertension réflexe par occlusion des carotides.

En somme, le 3318 CT est capable de provoquer l'apparition de symptômes acétylcholinomimétiques et de sensibiliser divers phénomènes acétylcholiniques ou attribués à l'acétylcholine. Il existe cependant des différences nettes entre les effets du 3318 CT et ceux d'agents – comme la Prostigmine – capables, entre autres, d'inactiver à la fois les AcChE et les XChE; ces différences sont d'autant plus curieuses qu'elles traduisent surtout une activité moins étendue et moins intense pour le 3318 CT alors que son pouvoir antiacétylcholinestérasique, *in vitro*, est plus élevé que celui de la prostigmine. L'interprétation de ces différences est délicate (KOELLE et GILMAN<sup>1</sup>, HEYMANS<sup>2</sup>) et il ne nous est pas possible de

la discuter ici; leur seule existence nous paraît cependant montrer qu'il est prématuré de dénier aux XChE tout rôle dans la limitation des effets de la stimulation de nerfs cholinergiques.

J. JACOB

Laboratoire de pharmacologie, Service de chimie thérapeutique de l'Institut Pasteur, Paris, le 6 juin 1953.

### Summary

3318 CT [bis(piperidinométhylcoumaranyl-5) cetone diméthiodide] a compound recently synthesized by A. FUNKE and K. VON DÄNIKEN, is shown to be a potent and selective inhibitor, both *in vitro* and *in vivo*, of the blood acetyl-cholinesterase (AcChE) of the dog. It produces acetylcholinomimetic symptoms in the animal and sensitizes different responses to acetylcholine and to stimulation of cholinergic nerves without inhibiting the blood non-specific cholinesterase (XChE). However, the action of 3318 CT appears to be limited, both in nature and in intensity, when compared to that of prostigmine, although the latter substance is a less potent inhibitor of AcChE *in vitro* than is 3318 CT. This difference is probably related to many factors, one of which may be the fact that prostigmine inhibits not only AcChE but also XChE; and it is not yet ascertained that XChE plays no role at all in the limitation of the effect of the stimulations of cholinergic nerves.

### PRO EXPERIMENTIS

#### Eine Methode zur titrimetrischen Bestimmung des Eisens im Blut mit Hilfe von Komplexon

In der neuern Literatur finden sich bereits verschiedene Arbeiten über die komplexometrische Bestimmung des Kalziums im Blutserum<sup>1</sup>, die dank ihrer bestechenden Einfachheit den klassischen Methoden weit überlegen ist. Da sich Eisen mit Komplexon nach SCHWARZEN-

<sup>1</sup> G. B. KOELLE et A. GILMAN, J. Pharmacol 95, Part. II, p. 166 (1949).

<sup>2</sup> C. HEYMANS, Exposés annuels de Biochimie médicale, 12<sup>e</sup> Série (Masson & Cie, Paris 1951).

<sup>1</sup> H. FLASCHKA und A. HOLASEK, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 288, 244 (1951). – A. H. HOLTZ, Nederl. Tijdschr. Geneeskunde 95, 2420 (1951). Chem. Weekblad 47, 907 (1951). – E. KAUFMANN, Schweiz. Apotheker-Z. 90, 797 (1952).