

Ainsi, l'action la plus frappante de l'acétazolamide consiste en une diminution de l'excitabilité du *diencephale*. Dans l'interprétation de nos résultats, il est malaisé de faire la part de l'acidose sanguine que provoque le Diamox et d'une inhibition spécifique de la carboanhydrase cérébrale. Ce dernier mécanisme est suggéré notamment par l'action relativement précoce de la substance étudiée, de même que par son effet presque électif sur une structure cérébrale. Dans trois cas<sup>1</sup>, nous avons mesuré le pH sanguin veineux en cours d'expérience, au moyen d'une «cup-electrode» de BECKMAN: le seuil d'excitabilité diencéphalique s'est élevé avant toute variation du pH sanguin. Cependant, on ne peut exclure complètement la participation de l'acidose, même compensée, dans l'action de l'acétazolamide sur le système nerveux.

Il serait intéressant d'établir des corrélations entre l'action sédatrice du Diamox sur l'excitabilité diencéphalique, que nous avons observée, et la répartition topographique de l'anhydrase carbonique cérébrale. Cependant, selon ASHBY, cette répartition est variable suivant chaque espèce animale et les éléments dont nous disposons, en ce qui concerne le lapin, portent sur un nombre de cas limité (1). Des données topographiques plus précises, confrontées avec les effets de l'acétazolamide, permettraient d'approfondir le rôle de la carboanhydrase dans le système nerveux central.

<sup>1</sup> Nous remercions vivement, pour sa précieuse collaboration, Monsieur A. ZEHNDER, chimiste, Laboratoire central de l'Hôpital cantonal.

A. FALBRIARD et H. GANGLOFF

Laboratoire de Neurophysiologie appliquée, Genève, et Clinique de Thérapeutique Universitaire de Genève, le 3 mars 1955.

#### Summary

The electrical activity induced by stimulation of the cortex, diencephalon and rhinencephalon was studied in the rabbit under the influence of a carbonic anhydrase inhibitor, acetazolamide or Diamox. A significant decrease of the excitability was found in the diencephalon.

The rapidity and the electivity of this action, as well as the blood pH variations simultaneously registered, suggest a specific inhibition of cerebral carbonic anhydrase by Diamox, although a participation of the metabolic acidosis cannot be fully excluded.

#### Actions de la néostigmine, du D.F.P. et du 3318 CT sur la sensibilité du rectus de grenouille aux esters acétique, propionique et butyrique de la choline

En 1933, CHANG et GADDUM<sup>1</sup> ont montré que l'ésérine sensibilise le rectus de grenouille aux trois esters, acétique, propionique et butyrique de la choline; cet effet est classiquement attribué à une inhibition des cholinestérases. Toutefois, depuis cette date, les problèmes relatifs aux enzymes hydrolysant les esters de choline sont devenus très complexes: en particulier, il a été montré (cf. WHITTAKER<sup>2</sup>) que les trois esters cités ne sont pas, *in vitro*, hydrolysés par les mêmes estérases, l'acétylcholine l'étant surtout par les cholinestérases «vraies» (acétylcholinestérases, AcChE), les propionyl- et buty-

rylcholines surtout par des «pseudo»-cholinestérases (XChE). En outre, des phénomènes de sensibilisation, indépendants d'une inhibition enzymatique, ont été décrits par divers auteurs (cf RIKER<sup>1</sup>).

Il nous a semblé utile de reprendre l'étude des potentialisations de ces trois esters en mettant en œuvre des agents anticholinestérasiques de types différents et en comparant ces potentialisations à celle d'un sel d'ammonium quaternaire non hydrolysable, l'amyltriméthylammonium.

Les inhibiteurs utilisés sont: la néostigmine qui inactive indifféremment la plupart des cholinestérases, le diisopropylfluorophosphate (D.F.P.) qui inhibe préférentiellement les XChE, et le diiodométhylate de la bis(pipéridinométhylcoumaranyl-5)-cétone (3318 CT), agent anti-AcChE sélectif décrit dans des notes antérieures de ce Laboratoire<sup>2</sup>.

Les effets de la néostigmine sont illustrés par la Figure 1. Comme l'ésérine, cet agent potentialise les trois esters étudiés; aucune différence nette n'apparaît entre la sensibilisation à l'acétylcholine et celle à la propionylcholine, mais la butyrylcholine est moins affectée que ses deux homologues inférieurs. Cette potentialisation de la butyrylcholine est cependant beaucoup plus importante que l'accroissement de l'action de l'amyltriméthylammonium et résulte donc, comme celle des deux autres esters, essentiellement d'inhibitions enzymatiques. Dans ces essais, comme dans ceux de CHANG et GADDUM, la propionylcholine est le plus efficace des agents contracturants étudiés.

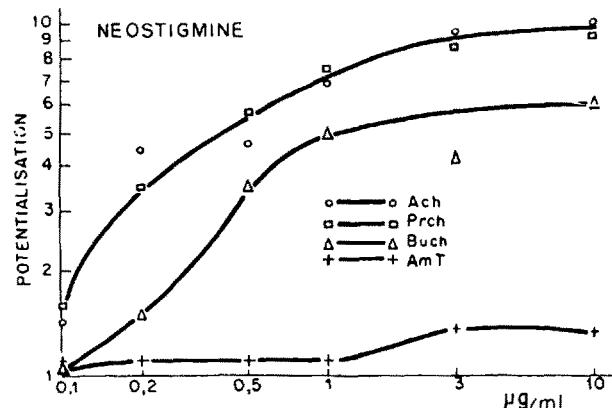


Fig. 1. En abscisse: Concentrations de Néostigmine en  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (échelle logarithmique). En ordonnée: Potentialisation exprimée par le rapport des doses provoquant une contracture d'environ 50% avant et après administration de l'anticholinestérasique (échelle logarithmique): ○—○ Acétylcholine (chlorure); □—□ Propionylcholine (bromure); Δ—Δ Butyrylcholine (bromure); +—+ Amyltriméthylammonium (iodure). Chaque point correspond à la moyenne d'au moins trois essais.

Le D.F.P. (Fig. 2) différencie très nettement la butyrylcholine des deux autres esters; la butyrylcholine est potentialisée par les faibles concentrations (1  $\mu\text{g}$  et 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) de cet inhibiteur et la sensibilisation ne progresse plus si on accroît la dose de D.F.P.; les deux autres esters sont seulement potentialisés à partir de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , mais le phénomène progresse avec des concentrations de D.F.P. croissant jusqu'à 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; pour

<sup>1</sup> W. F. RIKER, Pharmacol. Rev. 5, 1 (1953).

<sup>2</sup> A. FUNKE, J. JACOB et K. VON DÄNIKEN, C. r. Acad. Sci. 236, 149 (1953). — J. JACOB et A. FUNKE, C. r. Acad. Sci. 237, 1809 (1953). — J. JACOB, Exper. 10, 83 (1954); Arch. Int. Pharmacodyn. (sous presse).

les doses supérieures les diverses potentialisations rétrocèdent. Comme avec la néostigmine, la sensibilisation maximale observée pour la butyrylcholine est inférieure à celle qui peut être obtenue pour l'acétyl et la propionylcholine. Encore une fois, la potentialisation de l'amyltriméthylammonium est de loin inférieure à celle des esters; à partir de 5 µg/ml de D.F.P., elle fait place à un antagonisme modéré. Bacq<sup>1</sup> avait déjà signalé l'effet dépresseur des fortes concentrations de D.F.P.

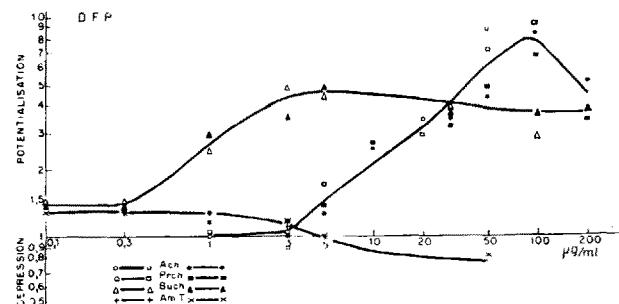


Fig. 2. En abscisse: Concentrations de D.F.P. en µg/ml (échelle logarithmique). En ordonnée: Potentialisation exprimée par le rapport de doses provoquant une contracture d'environ 50% avant et après administration de l'anticholinestérasique (échelle logarithmique): ○—○ Acétylcholine; □—□ Propionylcholine; △—△ Butyrylcholine; +—+ Amyltriméthylammonium. Figurent également les rapports des effets obtenus avec une même dose d'agent contracturant avant et après administration de l'anticholinestérasique: ●—● Acétylcholine; ■—■ Propionylcholine; ▲—▲ Butyrylcholine; ×—× Amyltriméthylammonium.

Le 3318 CT (Fig. 3) ne sensibilise pas le rectus à la butyrylcholine; pour toutes les doses étudiées on observe, au contraire, un antagonisme qui est quantitativement semblable à celui exercé vis à vis de l'amyltriméthylammonium. Par contre, les esters acétique et propionique sont potentialisés, faiblement en valeur absolue, fortement si l'on tient compte de l'interférence de l'effet dépresseur; ce dernier correspond vraisemblablement à l'activité curarisante qu'exerce le 3318 CT sur la transmission neuromusculaire du chat<sup>2</sup>.

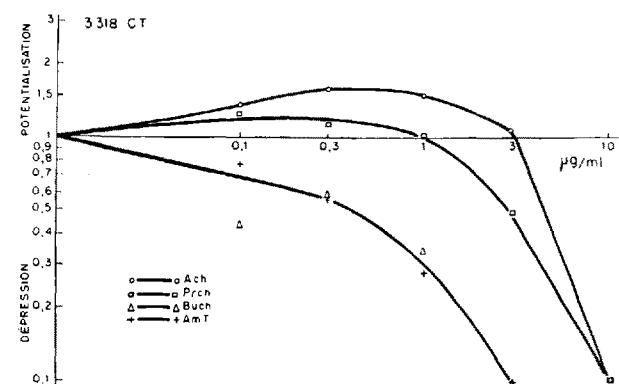


Fig. 3. En abscisse: Concentrations de 3318 CT en µg/ml (échelle logarithmique). En ordonnée: Potentialisation et dépression exprimées par les rapports de doses provoquant une contracture d'environ 50% avant et après administration de l'anticholinestérasique (échelle logarithmique) ○—○ Acétylcholine; □—□ Propionylcholine; △—△ Butyrylcholine; +—+ Amyltriméthylammonium. Chaque point correspond à la moyenne d'au moins trois essais.

<sup>1</sup> Z. M. Bacq, C. r. Soc. Biol. 141, 857 (1947).

<sup>2</sup> J. JACOB, Exper. 10, 496 (1954).

Dans des expériences complémentaires nous avons observé que:

1° après de faibles doses (3–5 µg/ml) de D.F.P., le 3318 CT exerce les mêmes effets que sur le rectus normal. Après de fortes concentrations de D.F.P. le 3318 CT antagonise les trois esters; il en est de même après néostigmine.

2° après 3318 CT, le D.F.P., à faibles doses, potentialise nettement la butyrylcholine mais peu ou pas les deux autres esters; il en est de même pour la néostigmine à ceci près qu'une potentialisation modérée de la propionylcholine apparaît plus fréquemment. D'autre part, les concentrations élevées de D.F.P. (100 µg/ml) qui, normalement, potentialisent les acetyl- et propionyl-cholines, les antagonisent après 3318 CT.

Cet ensemble de faits est le plus simplement interprété en admettant que la butyrylcholine est essentiellement hydrolysée par une XChE, les acetyl- et propionyl-cholines par un ou des enzymes appartenant à la catégorie des AcChE; rien ne permet de penser — au contraire toutes nos observations s'y opposent — que les AcChE puissent intervenir, même à titre palliatif, dans l'hydrolyse de la butyryl-choline qui est potentialisée de façon maximale par les faibles doses de D.F.P. Dans le cas de l'acetylcholine, et surtout de la propionylcholine, une intervention palliative des XChE, en tout état de cause modérée, ne peut pas être exclue avec certitude.

Dans le cadre de cette interprétation on serait conduit à considérer que la spécificité des enzymes, observée *in vitro* pour des concentrations relativement élevées d'un ester déterminé de la choline, est valable également, *in vivo*, pour les doses pharmacologiquement actives de ces substances: pareille conclusion ne serait cependant valable que pour le cas simple considéré, celui du rectus isolé car, chez l'animal *in toto* et tout au moins pour certaines actions de l'acetylcholine, les faits apparaissent d'interprétation beaucoup plus malaisée (cf. HEYMANS, VERBEKE et VOTAVA<sup>1</sup>; KOPPANYI, KARCZMAR et SHEATZ<sup>2</sup>; JACOB<sup>3</sup>).

Enfin, il est curieux de constater que le comportement de la propionylcholine est, dans ces expériences, sinon superposable, tout au moins très voisin de celui de l'acetylcholine. Ce comportement nous paraît être d'autant plus intéressant que la nature physiologique de la propionylcholine a été récemment démontrée (BANNISTER, WHITTAKER et WIJESUNDERA<sup>4</sup>; GARDINER et WHITTAKER<sup>5</sup>) et que cet ester est plus efficace que l'acetylcholine sur le rectus normal ou prostigminisé (ou éserinisé), ce qui pourrait signifier qu'il s'adapte aux «récepteurs» de cet organe de façon plus adéquate.

J. JACOB et M. DECHAVASSINE

Laboratoire de Pharmacologie, Service de Chimie Thérapeutique, Institut Pasteur Paris, le 22 janvier 1955.

### Summary

The potentiating effects of Neostigmine, D.F.P. and 3318 CT (a selective "true" cholinesterase inhibitor) on acetylcholine (ACh), propionylcholine (PrCh), butyrylcholine (BuCh) and amyłtrimethylammonium (AmT), have been studied using the frog's rectus abdominis.

<sup>1</sup> C. HEYMANS, R. VERBEKE et Z. VOTAVA, Arch. Int. Pharmacodyn. 77, 486 (1948).

<sup>2</sup> T. KOPPANYI, A. G. KARCZMAR et G. C. SHEATZ, J. Pharmacol. 107, 482 (1953).

<sup>3</sup> J. JACOB, Exper. 10, 33 (1954).

<sup>4</sup> J. BANNISTER, V. P. WHITTAKER et S. WIJESUNDERA, J. Physiol. 121, 55 (1953).

<sup>5</sup> J. E. GARDINER et V. P. WHITTAKER, Biochem. J. 58, 24 (1954).

Neostigmine increases the actions of the three esters much more than that of AmT. Low concentrations of D.F.P. potentiate maximally BuCh but have practically no effect on ACh, PrCh, and AmT. 3318 CT potentiates AcCh and PrCh but inhibits BuCh and AmT.

These results indicate the specificity of the hydrolysis of pharmacologically active doses of BuCh, on the one hand, of AcCh and PrCh, on the other hand, by different enzymes of the frog's rectus.

Results obtained with high concentrations of D.F.P. and with association of the different anticholinesterases indicate that a maximal or nearly maximal potentiation of one of these esters is already obtained with the specific inhibitor concerned; the supplementary inhibition of the non-specific enzymes thus appears to have no or only a poor effect.

### Die C-17-Ketosteroidausschüttung nach Gaben von Äthanol und Wein

Orale Gaben von Weisswein, nicht aber von gleichen Mengen Äthanol, führen im Tierversuch zu einer «progressiven Transformation»<sup>1</sup>, einer statistisch signifikanten Vergrößerung der Zellkerne im Faszikulatargebiet der Nebennierenrinde (NNR.)<sup>2</sup>. Diese morphologischen Veränderungen sind nicht nur Ausdruck einer vermehrten Bereitstellung sekretionstauglichen Gewebes, sondern bedeuten einen entsprechend veränderten Funktionszustand<sup>3</sup>. LAVES<sup>4</sup> beobachtete mit dem Thorn-test einen Antagonismus zwischen Alkohol (Weinbrand) und Cortison. Das Ausmass dieses Antagonismus wurde entsprechend früheren Untersuchungen<sup>5</sup> über die Äthanolempfindlichkeit durch den Konstitutionstypus der Probanden beeinflusst.

Die C-17-Ketosteroidausschüttung (KSt.) nach Gaben von Wein und Äthanol wurde nicht beschrieben. Zur Untersuchung dieser Frage wählten wir die Zimmermannsche Methode<sup>6</sup> und männliche Ratten von 140 bis 160 g in früher beschriebener Weise<sup>3</sup>. Bei  $n = 30$  betrug im Leerversuch die mittlere Ausscheidung 40,1 γ KSt./Tier/Tag, bei einem wahrscheinlichen mittleren Fehler von  $\pm 7,5\%$  ( $3\sigma = 22,5\%$ ).

Gruppen von je 3 Tieren erhielten täglich zweimal je 5 cm<sup>3</sup> Weisswein mit der Schlundsonde verabreicht (Versuch 1). Die KSt.-Bestimmung erfolgte täglich. In Versuch 2 wurde die äquivalente Menge Äthanol in demselben Volumen gegeben (12%). Die Tiere von Versuch 3 erhielten nur am 1. Tag im Abstand von 4 h zweimal 5 cm<sup>3</sup> Weisswein.

Einmalige oder protrahierte Weingaben bewirken danach eine statistisch signifikante Erhöhung der KSt.-Ausschüttung. Bei alleiniger Applikation am 1. Tag sind die Werte bis zum 2. Tag wieder zur Norm abgesunken. Dieses Ergebnis stimmt mit der früher gemachten Feststellung einer progressiven Transformation der Faszikulatakerne der NNR. nach Weingaben überein. Dagegen bewirkt die tägliche Verabreichung gleich grosser Mengen Äthanol keinen Anstieg der KSt.-Ausschüttung. Alle Werte bewegen sich im Normbereich. Dieses Resultat entspricht insofern demjenigen von

### C-17-Ketosteroid-Ausscheidung nach Gaben von Wein

Tage nach Versuchs- beginn	Täglich zweimal 5 cm <sup>3</sup> Wein		Zweimal 5 cm <sup>3</sup> Wein am 1. Versuchstag	
	Abweichung der KSt.-Ausscheidung in Prozent vom normalen Mittelwert			
	1. Serie	2. Serie	1. Serie	2. Serie
1	+ 62,4	+ 74,3	+ 50,1	+ 54,2
2	+ 60,1	+ 52,6	+ 11,0 N.	+ 2,8 N.
3	+ 66,0	+ 70,1	+ 3,3 N.	+ 0,3 N.
4	+ 52,6	+ 64,5	—	—
5	+ 53,2	+ 52,7	—	—

### C-17-Ketosteroidausscheidung nach Gaben von Äthanol

Tage nach Versuchsbeginn	Absolute KSt.-Werte in γ/Tier/Tag	
	1. Serie	2. Serie
1	+ 37,4	+ 40,3
2	+ 42,0	+ 38,0
3	+ 40,4 N.	+ 35,8 N.
4	+ 38,8	+ 42,2
5	+ 38,0	+ 36,8

N. = Normbereich

LAVES<sup>1</sup>, als auch bei unseren Versuchen keine Stressreaktion deutlich wurde. Allerdings liess sich mit dieser Methode eine statistisch signifikante Unterschreitung des Normbereichs nicht darstellen, wie es nach den Versuchen von LAVES zu erwarten gewesen wäre. Eine weitere Abklärung ist mit dieser Methode unter Verwendung eines Antagonisten denkbar.

H. KLIEWE und G. GILLISSEN

Hygiene-Institut der Universität Mainz, den 7. Februar 1955.

### Summary

Single or repeated doses of wine result in a statistically significant rise of excretion of C-17-Cetosteroids. After application of the same quantity of ethylalcohol, this effect was not seen. These results can be correlated with former observations on the changes of the nuclei-volumes of the zona fasciculata.

<sup>1</sup> W. LAVES, loc. cit.

### Der Antagonismus von schwefliger Säure und Äthanol im Hinblick auf die NNR.-Funktion

Orale Gaben von Weisswein bewirken im Gegensatz zu äquivalenten Mengen Äthanol einen statistisch signifikanten Anstieg der Ausscheidung von C-17-Ketosteroiden (KSt.)<sup>1</sup>. Nicht geklärt ist die Frage nach den wirksamen Weinbestandteilen. In Tierversuchen mit männlichen Ratten von 120 bis 140 g wurde, wie früher beschrieben<sup>1</sup>, die tägliche Ausscheidungsgröße von KSt. nach oralen Gaben von schwefliger Säure bestimmt. In Leerversuchen ( $n = 30$ ) betrug die mittlere Ausscheidung 40,1 γ KSt./Tier/Tag bei einem wahrscheinlichen mittleren Fehler von  $\pm 7,5\%$  ( $3\sigma = 22,5\%$ ).

Jedes der 3 Tiere einer Gruppe erhielt am 1. Tag im Abstand von 4 h zweimal 5 cm<sup>3</sup> einer wässrigen Lösung von 50 mg SO<sub>2</sub>/l (die in Deutschland für Wein erlaubte Höchstkonzentration an freier schwefliger Säure) oral

<sup>1</sup> W. BOGUTH, H. LANGENDORFF und E. TONUTTI, Med. Welt 13, 408 (1951).

<sup>2</sup> G. GILLISSEN, Z. Hyg. 135, 341 (1952).

<sup>3</sup> G. GILLISSEN und A. MERSCHKÖTTER, Zbl. Bakter. I. Orig. 169, 239 (1953).

<sup>4</sup> W. LAVES, Arch. exp. Path. Pharmakol. 222, 482 (1954).

<sup>5</sup> W. LAVES, Beitr. gerichtl. Med. 19, 86 (1952). — A. TINTERA und H. LOVELL, Dig. Neurol. Psychiatr., Hartford 17, 521 (1949).

<sup>6</sup> W. ZIMMERMANN, Z. physiol. Chem. 245, 47 (1936).

<sup>1</sup> H. KLIEWE und G. GILLISSEN, Exper. 11, 237 (1955).