

hältniszahlen beziehen sich auf die in Tabelle II erwähnten Versuchsreihen. Es bedeutet zum Beispiel 1:2, dass die Gewebsatmung ohne Zusatz, mit der Atmung nach Herzextraktzusatz verglichen wird.

Tabelle III

Wahrscheinlichkeit  $P$  eines Unterschieds der Ergebnisse aus Tabelle II

Vergleich	Herzgewebe			Lebergewebe	
	normal $P$	Skorbut $P$		normal $P$	Skorbut $P$
1:2	< 0,001	< 0,001	1:2	< 0,05	< 0,05
1:3	< 0,1	< 0,1	1:3	< 0,001	< 0,001
1:4	< 0,05	< 0,05	1:4	< 0,05	< 0,02

Die Tabelle III legt klar, dass die höchste Wahrscheinlichkeit eines Unterschiedes der Messergebnisse ( $P < 0,001$ ) beim Sauerstoffverbrauch von Herzschnitten beider Versuchsgruppen nur vom Herzextrakt, bei den Leberschnitten nur vom Leberextrakt erreicht wird. Die Steigerung der Atmung durch die anderen Extrakte ist weniger gesichert.

G. GRUPP und F. C. ROULET

Pharmakologisches Institut der Universität Freiburg i. Br. und Versuchsabteilung der Robapharm Laboratoriums AG., Basel, den 1. August 1956.

#### Résumé

1° La consommation en  $O_2$  des tissus cardiaque et hépatique de cobayes sains et atteints de scorbut est augmentée par l'apport de différents extraits organiques (extraits de cœur, foie et estomac-intestin). L'extrait de cœur augmente fortement la respiration des coupes du muscle cardiaque et l'extrait de foie celles des coupes du foie (ceci est prouvé d'une manière significative par les statistiques).

2° La respiration de coupes de tissus de cobayes atteints de scorbut est plus forte que celle d'animaux d'expériences sains.

3° Ces résultats soulignent le fait que les extraits d'organes exercent une influence particulière sur les tissus dont ils proviennent.

des extraits de ce muscle sont capables d'hydrolyser non seulement l'acétylcholine mais aussi la butyrylcholine, cette dernière très lentement; on ne sait cependant pas si ces hydrolyses sont réalisées par un seul enzyme ou par des estérasés différentes. – D'autre part, dans une note antérieure<sup>4</sup> nous avons observé, avec des anticholinestérasiques sélectifs, des potentialisations préférentielles, tantôt de l'acétylcholine, tantôt de la butyrylcholine, mais des mécanismes de potentialisations non enzymatiques ont été invoqués, en particulier dans le cas de la butyrylcholine, par COHEN et POSTHUMUS.

Dans ce travail nous avons recherché:

- si les hydrolyses de l'acétylcholine et de la butyrylcholine pouvaient ou non être attribuées à des enzymes différents, et cela en déterminant leur sensibilité à divers anticholinestérasiques (néostigmine, 3318 CT, D.F.P.);
- b) s'il existait ou non une corrélation satisfaisante entre les activités inhibitrices de ces substances et leurs pouvoirs potentialisateurs.

Nos essais ont été réalisés avec la méthode manométrique de WARBURG-AMMON. – Les extraits musculaires étaient obtenus par congélation à  $-25^{\circ}\text{C}$ , puis broyage dans un mortier, et enfin suspension dans du bicarbonate de sodium 0,025 M; leur concentration terminale était de 1/15. – Les substrats étaient du chlorure d'acétylcholine 0,01 M et du perchlorate de butyrylcholine 0,03 M. – Les solutions de 3318 CT et de néostigmine étaient préparées extemporanément; celles de D.F.P. l'étaient, chaque jour, à partir d'une solution stock à 2% dans du propyléneglycol. – Dans une première série d'essais (*in vitro*), l'inhibiteur était ajouté à l'extrait musculaire 1 h avant l'addition du substrat; dans une deuxième série (*in vivo*), réalisée seulement avec le D.F.P., l'inhibiteur était ajouté au bain où plonge le muscle lui-même; on le laissait, comme dans les essais de potentialisation, 30 min au contact de la préparation qui était ensuite lavée à deux reprises avant d'être congelée et broyée.

Nous signalerons tout d'abord que les extraits de rectus ont fourni les dégagements de  $\text{CO}_2$  moyens suivants: avec l'acétylcholine 0,01 M: 48,4 mm<sup>3</sup> par h et pour 0,1 g de muscle (déviation standard: 16,2); et avec la butyrylcholine 0,03 M: 13,4 mm<sup>3</sup> par h et pour 0,1 g de muscle (déviation standard: 2,8). Ces valeurs concordent avec celles fournies par COHEN et POSTHUMUS<sup>3</sup>. Elles permettent de calculer que la dose contracturante moyenne de chlorure d'acétylcholine (25 µ) peut être hydrolysée en environ 2 min par un rectus de 200 mg, et celle de perchlorate de butyrylcholine (15 µ) en environ 3 min; la contracture du rectus se développant en 3 à 5 min, une hydrolyse limitatrice très importante peut donc, *a priori*, intervenir aussi bien pour la butyrylcholine que pour l'acétylcholine.

Les deux hydrolyses sont inhibées de façon sensiblement égales par la néostigmine dont les CI-50 sont respectivement de  $1,1 \cdot 10^{-7}$  M dans le cas de l'acétylcholine et de  $1,5 \cdot 10^{-7}$  M dans celui de la butyrylcholine.

Par contre, des inhibitions très nettement préférentielles sont obtenues avec le 3318 CT (fig. 1) et avec le D.F.P. (fig. 2).

Le 3318 CT – qui, avec d'autres préparations enzymatiques, est un anti-AcChE sélectif (JACOB<sup>5</sup>) – est un

<sup>4</sup> J. JACOB et M. DECHAVASSINE, Exper. 11, 235 (1955).

<sup>5</sup> J. JACOB, Exper. 10, 33 (1954); Arch. int. Pharmacodyn. 101, 446 (1955).

<sup>1</sup> G. B. KOELLE, J. Pharmacol. 100, 158 (1950). – V. B. BROOKS et D. K. MYERS, J. of Physiol. 116, 158 (1952).

<sup>2</sup> A. N. DAVISON, Biochem. J. 54, 583 (1953). – F. A. DENZ, J. exp. Path. 34, 329 (1953). – J. M. BARNES et J. I. DUFF, Brit. J. Pharmacol. 8, 334 (1953).

<sup>3</sup> J. A. COHEN et C. H. POSTHUMUS, Acta physiol. pharmacol. Neerl. 4, 17 (1955).

## Relations entre les activités inhibitrices et les pouvoirs potentialisateurs du D.F.P.

Concentrations (M)	Butyrylcholine			Acétylcholine			Amyltriméthyl- ammonium
	Inhibition des hydrolyses en %		Potentia- lisation <sup>2</sup>	Inhibition des hydrolyses en %		Potentia- lisation	Potentia- lisation
	<i>in vitro</i> <sup>1</sup>	<i>in vivo</i> <sup>1</sup>		<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>		
1·10 <sup>-8</sup>	89	21	2,7	—	—	—	1
5·10 <sup>-8</sup>	89	36	4,1	—	—	—	1
1·10 <sup>-7</sup>	95	76	6,4	7	14	1,1	1,1
1·10 <sup>-6</sup>	100	93	5	12	14	—	1,3
1·10 <sup>-5</sup>				43	15	1,1	1,1
3·10 <sup>-5</sup>				73	27	1,6	1
1·10 <sup>-4</sup>				100	67	3,5	0,8
3·10 <sup>-4</sup>				100	83	9	0,7

<sup>1</sup> Voir texte.<sup>2</sup> Potentialisation exprimée par le rapport de doses provoquant une contracture d'environ 50% avant et après administration du D.F.P. Depuis la note précédente (<sup>4</sup>), ces essais ont été multipliés et les valeurs publiées ici représentent mieux le phénomène.

inhibiteur très actif de l'hydrolyse de l'acétylcholine (CI-50:  $3,2 \cdot 10^{-7} M$ ), très médiocre par contre de celle de la butyrylcholine (CI-50:  $3 \cdot 10^{-4} M$ ); sa sélectivité – identique à celles signalées par DENZ<sup>6</sup> pour le Nu-1250 et le 284 C-51 dans le cas du diaphragme du rat – n'est toutefois pas suffisante pour permettre d'inhiber l'hydrolyse de l'acétylcholine au-delà de 80% sans affecter, modérément mais nettement (10%), l'hydrolyse de la butyrylcholine.

D'autre part, il existe des corrélations satisfaisantes entre les activités anti-AcChE et anti-XChE des substances étudiées et leurs pouvoirs de potentialiser les contractures par l'AcCh et la BuCh.

Pour la néostigmine et le 3318 CT, inhibiteurs réversibles, nous nous limiterons ici à signaler que les potentialisations apparaissent seulement pour des concentrations provoquant, *in vitro*, des inhibitions nettes de l'hydrolyse de l'ester correspondant.

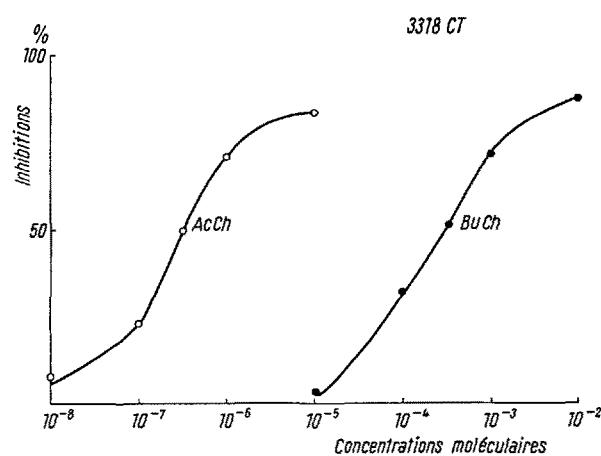


Fig. 1. – Inhibition, *in vitro*, des cholinestérases du rectus de grenouille par le 3318 CT.

En abscisses: Concentrations moléculaires de 3318 CT.

En ordonnées: Inhibitions en %.

○—○ Acétylcholine 0,01 M. ●—● Butyrylcholine 0,03 M

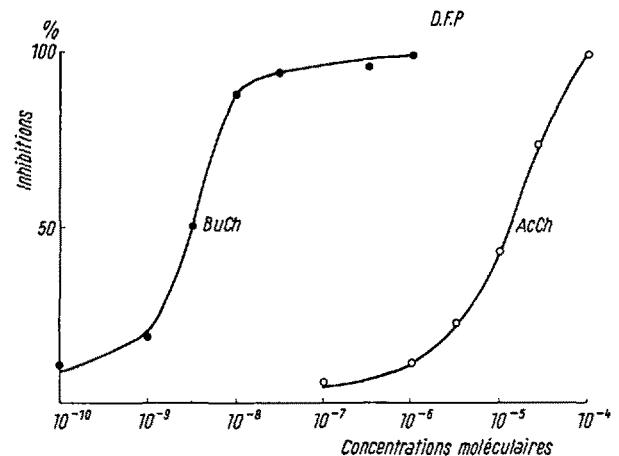


Fig. 2. – Inhibition, *in vitro*, des cholinestérases du rectus de grenouille par le D.F.P.

En abscisses: Concentrations moléculaires de D.F.P.

En ordonnées: Inhibitions en %.

○—○ Acétylcholine 0,01 M. ●—● Butyrylcholine 0,03 M

Le D.F.P. inhibe très sélectivement l'hydrolyse de la butyrylcholine, la CI-50 ( $3 \cdot 10^{-9} M$ ) étant, dans ce cas, environ 4000 fois plus faible que dans celui de l'acétylcholine ( $1,3 \cdot 10^{-5} M$ ). Pour des concentrations convenables ( $1 \cdot 10^{-7} M$ ) l'hydrolyse de la BuCh est presque totalement (95%) supprimée alors que celle de l'AcCh ne l'est que dans les limites des erreurs expérimentales (5%).

Il semble donc bien que les hydrolyses de l'AcCh et de la BuCh soient réalisées par deux enzymes différents, se comportant comme une AcChE et une XChE, et que chacun de ces deux enzymes intervienne peu, s'il le fait, dans l'hydrolyse de l'ester «non spécifique».

Dans le cas du D.F.P., des inhibitions, *in vivo*, ont été mesurées dans des conditions expérimentales superposables – abstraction faite du délai nécessaire à la réalisation ultérieure des extraits et des mesures – à celles dans lesquelles ont été observées les potentialisations. D'une façon générale, ces inhibitions sont inférieures à celles déterminées *in vitro*. Ceci résulte vraisemblablement de ce que le D.F.P. accède plus lentement aux cholinestérases dans le rectus entier que dans l'extrait. La corrélation entre ces inhibitions *in vivo* et les potentialisations des esters respectifs est étroite. Dans l'un et l'autre cas des sensibilisations nettes apparaissent dès que des inhibitions de 20 à 30% sont réalisées. L'amyltriméthylammonium est, contrairement aux esters de la cho-

<sup>6</sup> F. A. DENZ, J. exp. Path., 34, 329 (1953).

line, peu ou pas potentialisé; il en a été de même pour la choline, étudiée dans quelques essais supplémentaires.

Dans ces conditions, on ne peut s'empêcher de penser que la sensibilisation du rectus de grenouille aux deux esters résulte essentiellement d'inhibitions enzymatiques affectant une AcChE, dans le cas de l'acétylcholine, et une XChE, dans celui de la butyrylcholine, et que, dans cet organe, il n'existe pas de «réserve» importante de l'une ou l'autre estérase.

J. JACOB et M. DECHAVASSINE

*Laboratoire de Pharmacologie de l'Institut Pasteur, Paris, le 4 juillet 1956.*

### Summary

The hydrolysis of acetylcholine chloride ( $0.01\text{ M}$ ) by frog's rectus extracts, is inhibited by low concentrations of 3318 CT ( $\text{CI}-50 3.2 \times 10^{-7}$ ) and high concentrations of D.F.P. ( $\text{CI}-50 1.3 \times 10^{-5}$ ). Inversely, the hydrolysis of butyrylcholine perchlorate is inhibited by low concentrations of D.F.P. ( $\text{CI}-50 3 \times 10^{-9}$ ) and high concentrations of 3318 CT ( $\text{CI}-50 3 \times 10^{-4}$ ). Both are inhibited by similar concentrations of neostigmine ( $\text{CI}-50 1.1 \times 10^{-7}$  and  $1.5 \times 10^{-7}$ ). Frog's rectus thus contains true and pseudo-cholinesterases. The inhibitions produced by D.F.P. added to the muscle itself (and not the extract) correlates well with the potentiation of the corresponding ester. Sensitization to AcCh and to BuCh appears to be specifically related to the inhibition of AcChE for the former ester, of XChE for the second one.

### Selective Activity of Morphine on the 'EEG Arousal Reaction' to Painful Stimuli

Consulting the accumulated literature on the effect of morphine on the electrical activity of the brain (WIKLER<sup>1</sup>; FUJTA *et al.*<sup>2</sup>; GANGLOFF and MONNIER<sup>3</sup>), it would appear that no systematic investigation has been carried out on the influence of morphine on the central brain stem activating system (MORUZZI and MAGOUN<sup>4</sup>). Many authors, however, have attributed to this system an important role. In fact it was recently demonstrated that potentials evoked by peripheral stimulation may be conducted corticopetally as well through the reticular formation and through the great lemniscal fillets and thalamic relay nuclei (FRENCH *et al.*<sup>5</sup>). It was assumed that the reticular conduction is related to the maintenance of the alert, wakeful state and with the central integration of sensations<sup>6</sup>. A significant feature of the analgesia is that it occurs in the absence of sleep and without impairment of consciousness and of other sensory perceptions. It therefore seemed reasonable to investigate whether the specific analgesic action of

morphine corresponded to a selective influence on different types of afferent stimulations which activate the central brain stem desynchronizing system. The present work considers the influence of morphine on the EEG arousal reaction elicited by sensitive, sensorial, noxious and by electrical stimulation of the reticular substance at the mesencephalic and diencephalic level.

The experiments were performed using unanaesthetized uncurarized rabbits. The registrations of the cortical and subcortical activity, together with the stimulation of deep structures, was carried out with a technique described elsewhere (LONGO *et al.*<sup>7</sup>).

The electrical activity of the brain was recorded in the animal at rest and during various types of sensory stimulations (blowing on the nose, buzzer, touching of the back) and of painful stimulations (thermic stimuli applied to the hind leg, pinching of the ear, electrical stimulation of the central end of the cut sciatic nerve and of the auricular nerve). All these kinds of stimulation produce at the cortical and subcortical level a generalized change of the EEG, called desynchronization, or 'arousal response'. This response can also be obtained with electrical stimulation of some deep structures located on the central core of the brain stem (reticular formation) and of the diencephalon (thalamus and hypothalamus). During the experiments, the provocation threshold of the EEG arousal was carefully determined by electrical stimulation of the reticular substance situated in the periaqueductal gray matter at the level of the anterior quadrigemini body and of the antero-medial nuclei of the thalamus.

After the administration of small amounts of morphine intravenously (5–10 mg/kg), a selective depression of the arousal reaction following painful stimuli can be noticed, while the arousal reaction to the sensory stimuli remains unaltered. At the same time there is a rise in the stimulation threshold of the anteromedial nuclei of the thalamus, not accompanied by a similar variation at the mesencephalic level. As the dose of morphine is increased (10–25 mg/kg), the selective effect becomes less marked and the arousal reaction to any type of stimulation is blocked.

On the other hand, in control experiments small amounts of scopolamine (0.01–0.02 mg/kg intravenously) and Pentobarbital (5–15 mg/kg intravenously) blocked more significantly the sensitivo-sensorial arousal reaction than that provoked by the nociceptive stimuli. Moreover, these drugs act equally on the reticular substance of the thalamus and mesencephalon.

BERNHAUT *et al.*<sup>8</sup>, studying the effectiveness of various stimuli in eliciting the arousal reaction, found that the sequence of the stimuli, listed in order to produce an arousal reaction, are: pain, proprioception, auditory stimulation, optic stimulation. The ability of morphine to change this sequence would appear to be highly significant.

One of the more important factors of the analgesic action of morphine is its influence on the differentiation between suffering and pain experience. The patients, after morphine administration, still affirm that they perceive the painful stimulations, but without suffering (WOLFF<sup>9</sup>). This selective blocking by morphine of the arousal reaction with respect to painful stimuli would indicate that it has a specific action on the

<sup>1</sup> A. WIKLER, Pharmacol. Rev. 2, 435 (1950).

<sup>2</sup> S. FUJTA, M. YASUHARA, S. YAMAMOTO, and K. OGII, Jap. J. Pharmacol. 4, 41 (1954).

<sup>3</sup> H. GANGLOFF and M. MONNIER, Helv. physiol. Acta 13, 47C (1955).

<sup>4</sup> G. MORUZZI and H. W. MAGOUN, EEG Clin. Neurophysiol. 1, 455 (1949).

<sup>5</sup> J. D. FRENCH, M. VERZEANO, and H. W. MAGOUN, Arch. Neurol. Psychiat. 69, 505 (1953).

<sup>6</sup> Brain Mechanisms and Consciousness, A Symposium (Blackwell, Oxford 1954).

<sup>7</sup> V. G. LONGO, G. P. VON BERGER, and D. BOVET, J. Pharmacol. 111, 349 (1954).

<sup>8</sup> M. BERNHAUT, E. GELLIHORN, and A. T. RASMUSSEN, J. Neurophysiol. 16, 21 (1953).

<sup>9</sup> H. G. WOLFF, Physiol. Rev. 27, 167 (1947).