

into -lytic. From a combination of both types of substitution, a more pronounced decrease of the intrinsic activity can be expected. This was confirmed by the experiments. In this way in the various homologous series, the intrinsic activity reached zero for Bu-F-Me₃, Pr-F-Me₂Et, Et-F-MeEt₂ and Me-F-Et₃ (see the table).

Not only for the intrinsic activity but also for the affinity, regular changes with the molecular structure were observed.

It was mentioned before that the charge distribution and the sterical configuration of the drug may be considered to be of special importance for the effect. For drugs with an affinity to cholinergic receptors the most pronounced electrical charge is found on the quaternary N⁺-atom.

Ethylation, which means introduction of larger and electron-repulsing groups, results in a decrease of this positive charge. At the same time as a consequence of sterical hindrance, the influence of this charge on the field of the receptors is decreased. Possibly a kind of masking of the charge by ethyl groups may also be involved. From the experiments it may be concluded that there is a strong correlation between the molecular properties just mentioned and the intrinsic activity. With respect to the affinity, it was found that for the parasympathomimetics ethylation resulted in a decrease of the affinity, while for the -lytics no correlation was found.

Substitution on the negative side has hardly any influence on the charge of the quaternary N⁺-atom. The decrease in the intrinsic activity caused by the elongation of R' probably has to be ascribed to a sterical interference with respect to the approach of the positive charge to the receptors. The negative grouping is not essential with respect to parasympathetic activity on the rat jejunum. This is clearly demonstrated by the results obtained with some series of homologous alkyltrialkylammonium compounds (R'-N⁺-R₃), which closely resemble those obtained with the dioxolane compounds (see table).

Introducing affinity and intrinsic activity into the receptor theory, it was possible to predict biological properties for a large number of new dioxolane compounds and a series of alkyltrialkylammonium compounds.

Acknowledgments. Grateful appreciation is expressed to Misses S. J. M. BRINKHOFF, A. DE MOTS, A. M. MULDER, I. R. M. OBBEMA, and A. M. A. J. PONSIOEN for their valuable technical assistance.

We are indebted to SPECIA, Paris, for the supply of Dilvasène (H-F-Me₃).

J. M. VAN ROSSUM and E. J. ARIËNS

Pharmacological Institute, R. C. University of Nijmegen, Netherlands, December 29, 1956.

Zusammenfassung

Auf Grund der theoretischen Befunde war zu erwarten, dass Änderungen an der negativen und positiven Seite der Dioxolan-Verbindung 2249 F zu graduellen Übergängen von Parasympathikomimetika zu Parasympathikolytika führen würden. Die Experimente bestätigten die Erwartungen vollauf.

Untersuchung homologer Reihen von Alkyltrialkylammonium-Verbindungen zeigte die negative Gruppe als nicht wesentlich für die parasympathische Wirkung und ergab ebenso einen graduellen Übergang von Mimetika zu Lytika.

Einfluss von Isonikotinsäurehydraziden auf den Verlauf der Körpertemperatur nach Reserpin, Monoaminen und Chlorpromazin

Reserpin, das bei Kaninchen Sedation und Miosis verursacht, bewirkt nach Vorbehandlung mit Isopropylisonikotinsäurehydrazid (Iproniazid, *Marsilid*) Exzitation, Mydriasis und Pilo-Erektion, ähnlich wie Lysergsäure-diäthylamid (LSD)¹. Reserpin setzt gewebegebundenes 5-Hydroxytryptamin (5HT) und Catecholamine in Gehirn und anderen Organen frei². Diese Amine werden zum Teil durch Wirkung von Monoaminoxidase inaktiviert, einem Ferment, das durch Iproniazid und in viel schwächerem Masse durch Isonikotinsäurehydrazid (Isoniazid, *Rimiform*) gehemmt wird³. Die Abbauhemmung der infolge Reserpin-Wirkung freigesetzten Monoamine durch Iproniazid führt möglicherweise zu unphysiologisch hoher Konzentration von freien Monoaminen im Gehirn. Diese Hypothese könnte den LSD-artigen Effekt von Reserpin nach Iproniazid-Vorbehandlung erklären⁴.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung der Monoaminoxidase bei der Wirkung von Reserpin und einigen Monoaminen weiter abgeklärt werden. Dazu wurde der Einfluss von Iproniazid und Isoniazid auf die Temperaturwirkung von Reserpin und verschiedenen Monoaminen bei Kaninchen untersucht und mit LSD sowie Chlorpromazin verglichen. Chlorpromazin setzt im Gegensatz zu Reserpin kein 5HT frei⁵.

Methodik. Bei Kaninchen wurde 24 h nach Iproniazid-Behandlung bzw. ohne Vorbehandlung Reserpin, 5HT, Adrenalin, Tyramin, Phenyläthylamin, Mezcalin und Chlorpromazin injiziert. Weitere Tiere erhielten 24 h nach Isoniazidinjektion Reserpin und 5HT, sowie LSD ohne Vorbehandlung. Die rektale Temperatur wurde mit Thermoelementen zweimal vor und achtmal nach Verabreichung von Reserpin, Chlorpromazin und der Amine halbstündlich gemessen⁶.

Resultate.

a) 0,5 und 1 mg/kg Reserpin intravenös erzeugten bei Kaninchen Hypothermie, während LSD hypertherm

¹ B. B. BRODIE, A. PLETSCHER und P. A. SHORE, J. Pharmacol. exp. Therap. **119**, 9 (1956). – H. BESENDORF und A. PLETSCHER, Helv. physiol. pharmacol. Acta **14**, 383 (1956).

² A. PLETSCHER, P. A. SHORE und B. B. BRODIE, J. Pharmacol. exp. Therap. **116**, 84 (1956); Science **122**, 374 (1955). – P. A. SHORE, A. PLETSCHER, A. TOMICH, R. KUNTZMAN und B. B. BRODIE, J. Pharmacol. exp. Therap. **117**, 232 (1956). – A. CARLSSON und N. A. HIL-LARP, Kungl. Fysiografiska Sällskapets i Lund Föreläsningar **26**, Nr. 8 (1956). – M. BURGER, Helv. physiol. pharmacol. Acta **14**, C13 (1956). – M. HOLZBAUER und M. VOGT, J. Neurochem. **1**, 8 (1956).

³ A. SJOERDSMA, T. E. SMITH, T. D. STEVENSON und S. UDEN-FRIEND, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **89**, 36 (1955). – E. A. ZELLER, J. BARSKY, J. R. FOUTS, W. F. KIRCHHEIMER und L. S. VAN ORDEN, Exper. **8**, 349 (1952). – E. A. ZELLER, J. BARSKY, E. R. BERMAN und J. R. FOUTS, J. lab. Clin. Med. **40**, 965 (1952). – E. A. ZELLER und J. BARSKY, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **81**, 459 (1952). – R. W. SCHAYER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **84**, 60 (1953). – E. A. ZELLER, J. BARSKY und E. R. BERMAN, J. biol. Chem. **214**, 267 (1955).

⁴ B. B. BRODIE, A. PLETSCHER und P. A. SHORE, J. Pharmacol. exp. Therap. **119**, 9 (1956). – B. B. BRODIE und P. A. SHORE, Ann. N. Y. Acad. Sci. (1956), im Druck. – H. BESENDORF und A. PLETSCHER, Helv. physiol. pharmacol. Acta, **14**, 383 (1956).

⁵ B. B. BRODIE, P. A. SHORE und A. PLETSCHER, Science **123**, 992 (1956).

⁶ Die Temperaturmessung wurde im pharmakologischen Laboratorium der F. Hoffmann-La Roche & Co. A.-G. (Leiter: Dr. B. PELL-MONT) durchgeführt.

Präparat	Dosis mg/kg	Mittlere Beeinflussung der Körpertemperatur in °C (je drei Tiere)	p = *	p = **
<i>Ohne Vorbehandlung</i>				
Reserpin	0,5 intravenös	– 0,92	0,04	
Reserpin	1,0 intravenös	– 1,33	0,001	
5-Hydroxytryptamin	25,0 intravenös	+ 0,34	0,05	
Adrenalin	0,25 subkutan	– 0,07***	0,7	
Tyramin	37,5 intravenös	+ 0,57	0,001	
Phenyläthylamin	8,5 intravenös	+ 0,34	< 0,001	
Mezcalin	50,0 subkutan	+ 0,34	0,008	
LSD	0,02 subkutan	+ 1,20	< 0,001	
	0,05 subkutan			
Chlorpromazin	5,0 intravenös	+ 1,39	< 0,001	
		– 0,61	0,001	
<i>Vorbehandlung mit 100 mg/kg Iproniazid intravenös</i>				
Reserpin	0,5 intravenös	+ 1,09	< 0,001	< 0,001
Reserpin	0,75 intravenös	+ 1,83	< 0,001	
5-Hydroxytryptamin	25,0 intravenös	+ 1,83	< 0,001	< 0,001
Adrenalin	0,25 subkutan	+ 0,77***	0,05	0,002
Tyramin	37,5 intravenös	+ 2,87	< 0,001	< 0,001
Phenyläthylamin	8,5 intravenös	+ 1,64	0,01	< 0,001
Mezcalin	50,0 subkutan	+ 2,28	0,001	< 0,001
Chlorpromazin	5,0 intravenös	– 1,03	< 0,001	0,5
<i>Vorbehandlung mit 100 mg/kg Isoniazid intravenös</i>				
Reserpin	1,0 intravenös	– 1,04	< 0,001	0,45
5-Hydroxytryptamin	25,0 intravenös	– 0,14	0,5	

* Vergleich mit Ausgangswerten.

** Vergleich mit entsprechender Gruppe ohne Vorbehandlung.

*** 2-Stunden-Versuch.

wirkte (siehe auch ⁷). Nach Iproniazidvorbehandlung verursachten 0,5 und 0,75 mg/kg Reserpin intravenös Erhöhung der Körpertemperatur, 1 mg/kg Reserpin intravenös bewirkte letale Hyperpyrexie.

- Bei nicht mit Iproniazid vorbehandelten Tieren hatten 5HT, Tyramin, Phenyläthylamin und Mezcalin leicht hyperthermen, 0,25 mg/kg Adrenalin keinen Effekt. Nach Vorbehandlung mit Iproniazid wurde die hypertherme Wirkung signifikant verstärkt, und auch 0,25 mg/kg Adrenalin verursachten signifikante Temperatursteigerung.
- Isoniazidvorbehandlung beeinflusste weder den Temperatureffekt von Reserpin, noch von 5HT.
- Die hypotherme Wirkung von Chlorpromazin wurde durch Iproniazidvorbehandlung nicht abgeschwächt.

Diskussion. Nach den erwähnten Befunden erzeugte Reserpin bei Kaninchen nach Iproniazidvorbehandlung nicht nur Exzitation, Mydriasis und Pilo-Erektion, sondern auch Steigerung der Körpertemperatur. Die Kombination Iproniazid/Reserpin hatte also auch in bezug auf Beeinflussung der Körpertemperatur LSD-artige Wirkung.

Bei der Erhöhung der Körpertemperatur durch Reserpin und 5HT nach Iproniazidbehandlung spielte

wahrscheinlich Hemmung der Monoaminoxidase eine Rolle. Dies geht daraus hervor, dass Isoniazid, welches die Monoaminoxidase nicht wesentlich hemmt, die Temperaturwirkung von Reserpin und 5HT nicht beeinflusste.

Die Befunde über Beeinflussung des Temperatureffektes von Reserpin, 5HT, Adrenalin und Chlorpromazin durch Iproniazid sprechen dafür, dass die Temperaturerhöhung nach Iproniazid/Reserpinbehandlung durch freigesetzte endogene Monoamine, zum Beispiel 5HT, Adrenalin, zustande kam. Reserpin, das Freisetzung von Monoaminen aus dem Gehirn bewirkt, hatte beim nicht-iproniazidbehandelten Tier temperatursenkende Wirkung. Nach Iproniazidvorbehandlung erzeugte es Hyperpyrexie. Dies kann durch erhöhte Konzentration von freigesetzten endogenen Aminen im Gehirn infolge Monoaminoxidasehemmung erklärt werden. Auch 5HT und Adrenalin hatten nach Iproniazidvorbehandlung deutliche Temperatursteigerung zur Folge. Die hypotherme Wirkung von Chlorpromazin wurde durch Iproniazidbehandlung nicht abgeschwächt. Chlorpromazin bewirkt keine 5HT-Freisetzung, eine Akkumulation von freiem 5HT im Gehirn ist also nicht möglich.

Exzitation und Hyperpyrexie nach Iproniazid/Reserpinbehandlung sind nicht bei allen Tierarten ausgeprägt. Bei Mäusen bewirkte Iproniazidvorbehandlung lediglich Abschwächung der sedativen und hypothermen Wirkung von Reserpin⁸.

⁷ H. J. BEIN, Exper. 9, 107 (1953). – H. J. BEIN, J. TRIPOD und R. MEIER, Schweiz. med. Wschr. 83, 1007 (1953). – A. HORITA und J. M. DILLE, Science 120, 1100 (1954). – Z. SUPEK und S. MILKOVIC, Lancet 1955/II, 562.

⁸ A. W. LESSIN und M. W. PARKES (1957), in Vorbereitung.

Nach Iproniazid-Applikation hatten nicht nur 5HT und Adrenalin, sondern auch andere Monoamine (Phenyläthylamin, Tyramin, Mezcalin) verstärkte temperatursteigernde Wirkung. Durch Hemmung der Monoaminoxidase fällt möglicherweise ein allgemeiner Schutzmechanismus des ZNS gegen die Einwirkung von Monoaminen aus. Die Befunde bei kombinierter Iproniazid/Reserpin-Applikation lassen daran denken, dass endogene Monoamine (zum Beispiel 5HT, Adrenalin, Noradrenalin) bei gestörter Aktivität der Monoaminoxidase erregende Wirkung auf das ZNS ausüben können.

H. BÄCHTOLD und A. PLETSCHER

Medizinische Forschungsabteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co., AG., Basel, den 31. Januar 1957.

Summary

The influence of isopropyl-isonicotinic acid hydrazide (Iproniazid) on the course of body temperature after reserpine, 5HT, adrenaline, various other monoamines, as well as chlorpromazine, was investigated in rabbits and compared with the temperature effect of lysergic acid diethylamide. Furthermore, the influence of isonicotinic acid hydrazide (Isoniazid) on the temperature effect of reserpine and 5-hydroxytryptamine (5HT) was measured. The following results were obtained:

- (1) After pretreatment with Iproniazid, reserpine no longer produced hypothermia, but marked hyperthermia.
- (2) The hyperthermic effect of 5HT and various other monoamines was significantly increased by Iproniazid-pretreatment.
- (3) Isoniazid-pretreatment did not influence the temperature effect of reserpine and 5HT.
- (4) The hypothermic effect of chlorpromazine was not significantly changed by Iproniazid-pretreatment.

DISPUTANDUM

Effects of Pyriethamine and Oxythiamine on the Thiamine Content of Tissues and Blood Pyruvate in Mice

DE CARO *et al.* have stated in their paper in *Experientia* 12, 300 (1956) that WOOLLEY and MERRIFIELD based their evidence on the fact that pyriethamine did not decrease the thiamine content of tissues. This statement is not true. WOOLLEY and MERRIFIELD showed that the cocarboxylase content of tissues and the pyruvate content of blood were not reduced by pyriethamine. Actually they feel very strongly that pyriethamine should reduce the *thiamine* content of tissues. The fundamental mode of action of an antimetabolite is to displace the related metabolite and thus to lower the content of this metabolite in the tissues. In the case of pyriethamine then, one would expect the thiamine content of the tissues to be lowered.

The whole point of WOOLLEY and MERRIFIELD's argument was not that the thiamine content was unchanged, but rather that the cocarboxylase content was not changed. Consequently, the demonstration by DE CARO

et al. that the thiamine content of brain is decreased in animals previously treated with pyriethamine does not differ from the concept of WOOLLEY and MERRIFIELD and most certainly cannot be taken as evidence that the view of the latter authors with respect to a new function for thiamine is erroneous.

D. W. WOOLLEY

We think that in our paper the essential points of WOOLLEY and MERRIFIELD hypothesis are clearly exposed, the importance of cocarboxylase content of the tissues being sufficiently emphasized.

In fact exposing our experimental data we clearly referred to the total thiamine content, once in the text and once in the table. The term 'total thiamine' cannot be misleading: as is well known, it means free thiamine + phosphorylated thiamine (cocarboxylase). After the indications in the text and in the table, we spoke often of thiamine, but, obviously, always in the sense of total thiamine: we did not consider it necessary to repeat it every time.

Further, it is well known that the thiamine in the tissues is nearly all in the form of cocarboxylase, especially in the nervous and muscular tissues.

In particular in normal mice brain, we recently found the following results:

total thiamine μg 3.16/g
free thiamine μg 0.05/g

Hence it is clear that a significant decrease of the total thiamine can only be a consequence of a significant decrease of the cocarboxylase. Now, it is out the question that the Pyriethamine sharply lowers (from 2.16 to 0.74 $\mu\text{g/g}$) the total thiamine content and, therefore, the cocarboxylase content in the mice brain.

In our recent paper [*Intern. Z. Vitaminforsch.* 26, 343 (1956)] on the rats (treated by mg 2.5 of Pyriethamine for 6 days), we were able to show the behaviour of free and phosphorylated thiamine (or cocarboxylase). Actually the Pyriethamine lowered, in these experiments, the brain phosphorylated thiamine from 2.8 $\mu\text{g/g}$ to 0.72 $\mu\text{g/g}$, while the free thiamine decreased from 0.08 $\mu\text{g/g}$ to 0.02 $\mu\text{g/g}$. In the muscle and in the liver too, the Pyriethamine lowered the phosphorylated thiamine content.

Therefore we still consider our conclusion right that the WOOLLEY and MERRIFIELD hypothesis, based on the claim that the Pyriethamine does not modify the cocarboxylase content of the tissues, is not experimentally sustainable.

L. DE CARO, G. RINDI, V. PERRI,
and G. FERRARI

Allow me to say once again that DE CARO *et al.* have not stated the findings of WOOLLEY and MERRIFIELD correctly. Their findings about thiamine content of tissues are *not* contradictory to the observations of WOOLLEY and MERRIFIELD and consequently they are unjustified in stating in your journal that they have been unable to confirm the experimental findings on which WOOLLEY and MERRIFIELD based their conclusions. WOOLLEY and MERRIFIELD made their measurements of cocarboxylase. DE CARO, RINDI, PERRI, and FERRARI are consequently unjustified in stating in their paper that WOOLLEY and MERRIFIELD made measurements on thiamine. Thiamine is not the same substance as cocarboxylase.

Although it is widely believed that much of the thiamine in normal tissues is present in a combined form, it