

**In vitro Inhibition of Anaerobic Glycolysis
by Phenothiazine Ataractic Drugs**

Although a variety of enzymatic effects have been demonstrated with chlorpromazine and related phenothiazine derivatives, relatively little attention has been given to the effect of such compounds on anaerobic glycolysis. BERNSOHN, NAMAJUSKA, and COCHRANE reported that rat brain hexokinase activity was inhibited markedly by 10^{-3} M chlorpromazine but that the anaerobic glycolytic activity of fortified rat brain homogenates was not altered by this rather high concentration of the drug¹. More recently, MORACZEWSKI and DU BOIS found that the same concentration of chlorpromazine had no effect on anaerobic glycolysis in rat or mouse liver homogenates and that a single, massive dose of the drug did not reduce the glycolytic activity of mouse liver slices². In addition, these workers demonstrated slight inhibition of glycolysis in rat and mouse liver homogenates by 10^{-3} M chlorpromazine sulfoxide. Studies in this laboratory have shown that several phenothiazines, including chlorpromazine, are capable of inhibiting anaerobic glycolysis in rat brain homogenates provided that the incubation time is extended beyond the 30–40-min periods employed by BERNSOHN *et al.* and MORACZEWSKI and DU BOIS.

The results presented in the Table show that while 10^{-5} M chlorpromazine has no effect on glycolysis in rat brain homogenates, 10^{-3} M concentrations of the drug produce a striking effect after 1 h. Essentially identical results were observed with two other phenothiazine ataractic agents, promazine and mepazine. From a consideration of the structures of these three drugs it can be inferred that neither the 2-chloro substitution nor the N-(3'-dimethylaminopropyl) of chlorpromazine moiety is essential for inhibition of anaerobic glycolysis by phenothiazines.

Inhibition of Anaerobic Glycolysis in Rat Brain Homogenates by Chlorpromazine

System	Glucose added	$Q_{CO_2}^{N_2}$		
		1 h	2 h	3 h
Endogenous . .	—	1.99±0.64	0.99±0.41	0.90±0.19
Control	+	5.32±0.61	3.48±0.83	3.46±0.41
Chlorpromazine, 10^{-5} M	+	5.70	2.70	3.30
Chlorpromazine, 10^{-3} M	+	4.60	1.66	1.70

This finding, together with the positive results reported by BERNSOHN *et al.*¹ and MORACZEWSKI and DU BOIS², suggest that phenothiazines may be converted slowly under anaerobic conditions, more rapidly in the presence of oxygen, to metabolic products which are capable of inhibiting anaerobic glycolysis, possibly through altering the rate of the hexokinase reaction. The fact that high concentrations of chlorpromazine are required to bring about this effect could be ascribed to the quantitative aspects of this postulated metabolic pathway, or perhaps interpreted as being related to the toxic rather than the therapeutic mechanism of action of the drug.

Conditions

Normal, male albino rats were decapitated, the brains removed and the cerebral cortex homogenized immediately in a Potter-Elvehjem grinder in 4 parts of ice-cold

Krebs-Ringer bicarbonate buffer³. To the main compartment of standard Warburg flasks, containing 2.3 ml of buffer or a glucose-buffer solution, was added 0.7 ml of homogenate (about 33 mg dry weight). The compounds to be studied⁴ were dissolved in the glucose-buffer solution and added to give a final concentration of 10^{-5} M or 10^{-3} M. Where present, the final concentration of glucose was 0.2%.

All flasks were gassed with N₂-CO₂ (95%–5%) and equilibrated to 38°C over a 20-min period. Measurements of gas production were made at 15 min intervals and results expressed in terms of $Q_{CO_2}^{N_2}$ (μ l CO₂/mg dry weight/h) calculated over the indicated periods. Data reported are averages of 12 determinations $\pm$ one standard deviation ('endogenous' and 'controls' systems) or averages of two experiments ('chlorpromazine' systems).

J. A. BUZARD

Biochemistry Section, Eaton Laboratories, Norwich (New York), July 28, 1959.

Zusammenfassung

Im Gegensatz zu Feststellungen anderer Forscher hemmten Chlorpromazin und zwei strukturell verwandte ataraktisch wirkende Phenothiazinderivate die anaerobe Glykolyse von homogenisiertem Rattenhirn. Der Nachweis dieser Hemmung bedarf einer längeren Inkubation, was auf die Mitwirkung eines zeitbedingten Vorgangs, wie metabolische Umwandlung der Phenothiazine in Hemmstoffe, deutet.

¹ J. BERNSOHN, I. NAMAJUSKA, and L. S. G. COCHRANE, Arch. Biochem. Biophys. 62, 274 (1956).
² A. S. MORACZEWSKI and K. P. DU BOIS, Arch. int. Pharmacodyn. 120, 201 (1959).
³ W. W. UMBREIT, R. H. BURIS, and J. F. STAUFFER, *Manometric Techniques and Tissue Metabolism* (2nd Edition, Burgess Publishing Co., Minneapolis 1949), p. 119.
⁴ Chlorpromazine was obtained from Smith, Kline and French Laboratories, Philadelphia, mepazine from Warner-Chilcott Laboratories, Morris Plains, New Jersey, and promazine from Wyeth Laboratories, Inc., Philadelphia.

**Aufhebung der Knospenruhe von Reben
durch Rindite**

Die Knospenruhe der Reben erreicht in den Monaten September bis November ihre grösste Tiefe. Durch eine Kältebehandlung ist sie nicht zu verkürzen, während Gibberellinsäure je nach Sorte und Zeitpunkt der Behandlung austriebshemmend wirkt¹. Es wurde darum versucht, die Knospenruhe durch Behandlung mit dem von DENNY² an Kartoffelknollen entwickelten, austriebsfördernden Gemisch von Äthylenchlorhydrin, Äthylen-dichlorid und Tetrachlorkohlenstoff (Volumenverhältnis 7:3:1), das als Rindite bekannt ist, zu brechen, da dieses Substanzgemisch bereits mehrfach erfolgreich zur Aufhebung der Samenruhe^{3,4} und auch vereinzelt zur Förderung des Austriebes ruhender Winterknospen⁵ verwendet wurde.

¹ G. ALLEWELDT, Naturwiss. 46, 434 (1959).
² F. E. DENNY, Contr. Boyce Thompson Inst. 14, 1 (1945).
³ I. SZALAI, Acta agron. Acad. Sci. hungaricae 7, 25 (1957).
⁴ O. FISCHNICH, A. GRAHL und M. THIELEBEIN, Landbauforschg. Völknerode 8, 4 (1958).
⁵ S. THORUP, Physiol. Plantarum 10, 728 (1957).

Tabelle I. Die Wirkung von Rindite, Äthylenchlorhydrin und Äthylenchlorid auf den Austrieb der Winterknospen 1jähriger Reben (Zuchtstamm FS. 4-201-39)

Versuchs- beginn	Variante	Pflanzenzahl <i>n</i>	Tage bis zum Austrieb		ausgetriebene			
			<i>x</i>	$\pm m$	Pflanzen		Knospen	
					Σ	%	Σ	%
13. 9. 59	unbehandelt	20	18,3	1,59	4	20	6	7
	Rindite	10	10,0	0,01	10	100	28	70
28. 9. 59	unbehandelt	8	—	—	—	—	—	—
	Rindite	8	12,1	0,50	8	100	15	47
23. 10. 59	Äthylenchlorhydrin	8	11,6	0,34	8	100	16	50
	Äthylenchlorid	8	27,0	—	4	50	4	13
	unbehandelt	6	—	—	—	—	—	50
	Rindite	12	19,7	0,23	12	100	24	—

Tabelle II. Austriebsförderung von 1-Augenstecklingen durch Rindite

Versuchs- beginn	Sorte	Variante	Pflanzenzahl	Tage bis zum Austrieb		ausgetriebene Knospen	
			<i>n</i>	<i>x</i>	$\pm m$	Σ	%
17. 9. 59	Sbl. 2-19-58	unbehandelt	34	—	—	—	—
		Rindite	20	12,2	0,40	16	80
5. 10. 59	Sbl. 2-19-58	unbehandelt	31	—	—	—	—
		Rindite	33	18,7	0,33	24	73
15. 10. 59	Sbl. 2-19-58	unbehandelt	25	—	—	—	—
		Rindite	20	23,2	1,62	18	90
5. 10. 59	Sylvaner	unbehandelt	17	—	—	—	—
		Rindite	27	16,0	0,35	24	89
15. 10. 59	Sylvaner	unbehandelt	25	—	—	—	—
		Rindite	22	18,5	1,16	16	73
19. 10. 59	Müller-Thurgau	unbehandelt	20	—	—	—	—
		Rindite	20	21,1	0,90	16	80
19. 10. 59	Riesling	unbehandelt	20	—	—	—	—
		Rindite	20	19,8	0,78	15	75

Zu diesem Zweck wurden nun die Knospen von 1jährigen Topfreben, die auf 4 Augen zurückgeschnitten waren, und von 1-Augenstecklingen mittels einer fein ausgezogenen Glaskapillare mit Rindite betropft. Jede Knospe erhielt auf diese Weise im Mittel 4-6 mg Rindite.

Die Ergebnisse mehrerer Versuche sind in den Tabellen I und II zusammengefasst. Stets erwies sich bei allen Sorten Rindite als hochwirksames Agens zur Aufhebung der Knospenruhe. Von den in diesem Gemisch enthaltenen Komponenten war Äthylenchlorhydrin genau so wirksam wie Rindite, während Äthylchlorid⁶ eine nur sehr schwache Austriebsförderung besass. Die unbehandelten Kontrollen trieben nur sehr spärlich (Tabelle I) oder auch nach mehrwöchentlicher Versuchsdauer erwartungsgemäss nicht aus. Bei zeitiger Anwendung (Ende September) führten höhere Gaben – mehrmalige tropfenförmige Applikation in Abständen von 12 und 24 h – zu einer leichten, zeitlichen Austriebsverzögerung. Nur vereinzelt wurden hierbei geringfügige Blattschäden beobachtet, die aber mit fortschreitendem Wachstum sehr bald völlig überwunden wurden. Die Wurzelentwicklung der Stecklinge war normal. Unterschiedliche Sortenreaktionen können zum Teil auf die verschiedene Geschlossenheit und Dichte der Knospenschuppen zurückgeführt werden, da sie das Eindringen von Rindite in das Knospengewebe erschweren.

Wirksam erwies sich auch die Behandlung von Stecklingen mit 2 ml Rindite/1 kg Stecklingsfrischgewicht in einem geschlossenen Glasbehälter (Inhalt 2 l) für die Dauer von 24 h und einer Temperatur von 28°C. Eine gleichzeitige Behandlung mit Gibberellinsäure (1 mg auf 1 g Lanolin) erwies sich wieder als austriebshemmend.

Durch Verwendung von Rindite oder Äthylenchlorhydrin besteht somit die Möglichkeit, den Knospenaustrieb von Reben auch während der Winterruhe herbeizuführen, was besonders für eine Reihe wissenschaftlicher Untersuchungen⁷ von Interesse ist.

G. ALLEWELDT

Bundesforschungsanstalt für Rebenzüchtung Geilweilerhof, Siebeldingen über Landau (Pfalz), 7. Dezember 1959.

Summary

Rindite and ethylene chlorhydrin have a promotive effect on breaking dormant buds of grape cuttings and of one year old pot-grown plants. The optimal dosis was approximately 6 mg Rindite per bud.

⁶ Äthylendichlorid wurde in diesen Versuchen durch Äthylenchlorid ersetzt.
⁷ R. J. WEAVER, Nature 183, 1198 (1959).