

Automatic Recording of the Abstinence Syndrome in Opioid-Dependent Mice

The possibility of demonstrating physical dependence on strong analgesics in mice has only recently been appreciated¹⁻³ despite the pioneer experiments of HUIDOBRO et al.⁴⁻⁶, first reported a decade ago.

The development of dependence on morphine is enhanced by multiple injections with regular dose increments or, more conveniently, by the implantation of the alkaloid in the dorsal subcutaneous tissue⁷. Subsequent challenge by narcotic antagonists, especially diprenorphine or naloxone, precipitates an immediate abstinence syndrome which is characterized by tremor, piloerection, increased locomotor activity, defecation and, most strikingly, by uncontrollable jumping. Despite the difficulty of assessing the value of one sign in comparison with another, the jumping response has been reported predominantly over the last 4 years^{8,9}, and the possibility

of using this measure in the estimation of the physical dependence capacities of novel analgesics has latterly been proposed¹⁰⁻¹².

We have observed rather a high incidence of jumping with our non-abstinent (control) mice (OLAC/TO strain, 18-22 g, female) when using the circular platform described by WAY et al.¹, while the table referred to by HUIDOBRO¹³ presents an area too large for automatic recording. A convenient system, which accurately records the frequency of stereotyped jumping and allows an estimation of the extent of defecation at the end of the experiment, is shown in Figures 1 and 2. 12 mice are individually housed in ventilated, conical glass bottles (height 21 cm; base diameter 7 cm). A discrete jump, as opposed to a rear, is required to break the beam which passes from the centrally located light bulb (150 watts) to each of the 12 phototransistors (Type 2N 5777, General Electric) positioned at a height of 14 cm on the circumference of the apparatus. The performance of each mouse

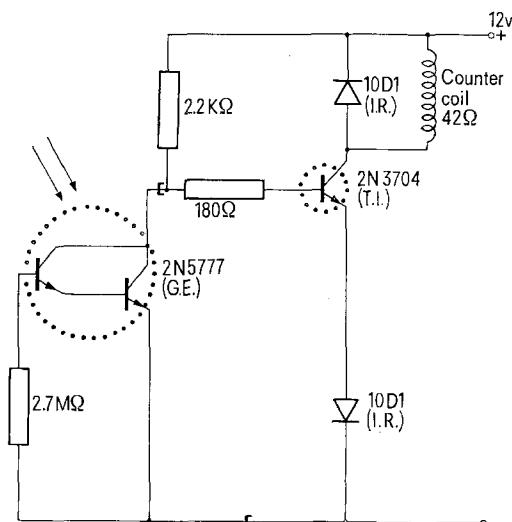


Fig. 1. Circuit diagram of phototransistors, amplifier and counting system suitable for total counts.

- 1 E. L. WAY, H. H. LOH and F. SHEN, *J. Pharmac. exp. Ther.* **167**, 1 (1969).
- 2 D. L. CHENEY and A. GOLDSTEIN, *Nature, Lond.* **232**, 477 (1971).
- 3 H. KANETO and H. NAKANISHI, *Jap. J. Pharmac.* **27**, 411 (1971).
- 4 C. MAGGIOLI and F. HUIDOBRO, *Acta physiol. latinoam.* **11**, 70 (1961).
- 5 F. HUIDOBRO and C. MAGGIOLI, *Acta physiol. latinoam.* **11**, 201 (1961).
- 6 F. HUIDOBRO and E. CONTRERAS, *Arch. int. Pharmacodyn.* **144**, 206 (1963).
- 7 R. D. GIBSON and J. E. TINGSTAD, *J. Pharm. Sci.* **59**, 426 (1970).
- 8 Y. MARUYAMA, G. HAYASHI, S. E. SMITS and A. E. TAKEMORI, *J. Pharmac. exp. Ther.* **178**, 20 (1971).
- 9 D. L. CHENEY, A. GOLDSTEIN, S. ALGERI and E. COSTA, *Science* **171**, 1169 (1971).
- 10 A. COWAN, J. W. LEWIS and I. R. MACFARLANE, *Br. J. Pharmac.* **43**, 461 P (1971).
- 11 I. MARSHALL and M. WEINSTOCK, *Nature, Lond.* **234**, 223 (1971).
- 12 J. K. SAELENS, F. R. GRANAT and W. K. SAWYER, *Arch. int. Pharmacodyn.* **190**, 213 (1971).
- 13 F. HUIDOBRO, *Eur. J. Pharmac.* **15**, 79 (1971).

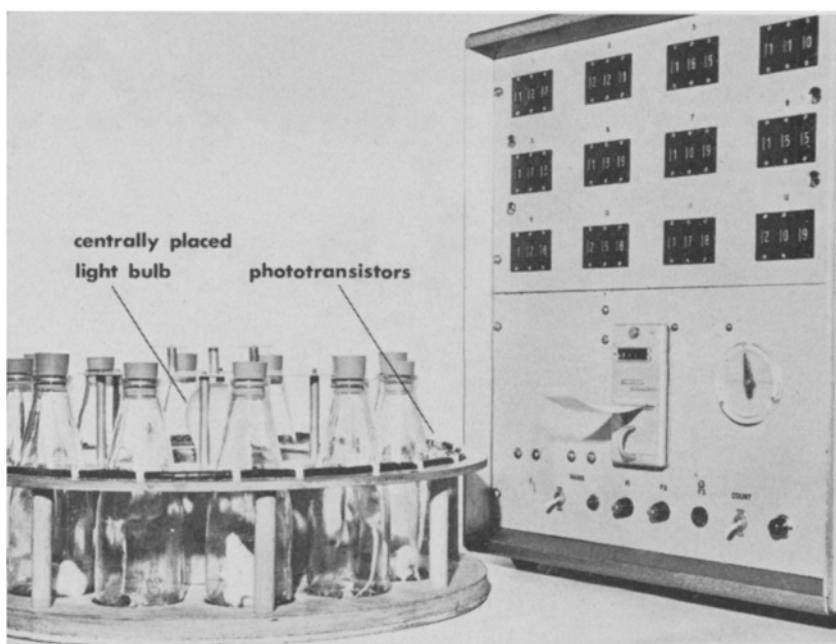


Fig. 2. Apparatus used in recording the incidence of jumping in 12 mice, each containing a subcutaneous implant of morphine alkaloid. The abstinence syndrome was precipitated by the administration of diprenorphine hydrochloride (0.5 mg/kg s.c.).

can be readily assessed by connecting each cell to a counter which is programmed to print total jumps at 15 min intervals.

In general, the antagonist-induced abstinence syndrome is followed over 1 h. The automated system is particularly advantageous when monitoring the gradual onset of withdrawal in mice after abrupt termination of drug treatment or in cases where the influence of neurohumoral modulators are being investigated on the development of the syndrome.

Résumé. On décrit un dispositif simple et automatique enregistrant photoélectriquement le syndrome d'abstinence caractéristique, le 'stereotyped jumping', chez des lots de douze souris dépendant des opioïdes.

A. COWAN and P. COWAN

*Pharmaceutical Research Laboratories,
Pharmaceutical Division, Reckitt and Colman Ltd.,
Hull HU8 7DS (England), 21 February 1972.*

Etude de l'agrégation plaquettaire par le Thrombofax®¹

On a décrit de nombreuses substances capables de déclencher l'agrégation des plaquettes dans des conditions expérimentales bien établies^{2,3}; toutefois, seulement peu d'entre elles sont employées couramment; il s'agit notamment de l'adénosine-5'-diphosphate (ADP), du collagène, de l'adrénaline et de la thrombine. Chacune de ces substances, cependant, présente quelques désavantages qui rendent parfois difficile l'interprétation des résultats: l'ADP est instable, même à de basses températures et provoque deux vagues distinctes d'agrégation seulement à des concentrations critiques, variables d'un sujet à l'autre⁴. Les méthodes de préparation du «collagène» varient tellement entre différents laboratoires que le même terme de «collagène» indique en réalité des substances très différentes les unes des autres et difficilement comparables entre elles⁵. L'adrénaline est disponible commercialement sous forme standardisée, mais elle est très instable, une fois que l'ampoule qui la contient a été ouverte; en outre la morphologie des agrégations par adrénaline est extrêmement variable d'un sujet à l'autre, aussi bien que chez le même sujet, de façon que seulement une évaluation qualitative (deuxième vague présente ou absente) peut être établie⁶. La thrombine est aussi disponible en commerce sous forme standardisée pour les tests d'agrégation; il faut en choisir une concentration telle qu'elle soit active sur les plaquettes mais pas sur la transformation du fibrinogène plasmatique en fibrine; il est cependant difficile d'éviter l'apparition (souvent précoce) de fibrine qui rend la lecture des résultats pratiquement impossible. Dans cette note préliminaire nous désirons présenter l'activité agrégante d'une thromboplastine partielle (Thrombofax, Ortho) qui nous a parue digne d'intérêt; en effet, pour l'étude de l'agrégation, il est possible d'utiliser ce réactif tel qu'il est disponible commercialement, sans aucune manipulation ultérieure de la part du biologiste; en outre, la stabilité du Thrombofax et la reproductibilité de son action agrégante, étudiées depuis 3 ans, ont été excellentes.

L'adjonction de 0.2 ml de Thrombofax (non dilué) à 0.8 ml de plasma humain, citraté, riche en plaquettes (PRP, 300.000 plaquettes/ μ l) dans l'agrégomètre de BORN⁷, sans effet sur la transmission initiale de la lumière, provoque une agrégation plaquettaire, si le système est sous agitation continue. Cette agrégation est toujours précédée d'une période de latence (Figure). Dans quelques PRP (environ 10%) l'agrégation par Thrombofax est constituée de 2 vagues distinctes (rappelant l'agrégation par adrénaline): une première vague petite et réversible suivie d'une deuxième beaucoup plus évidente et irréversible. Des courbes obtenues par enregistrement automatique des variations de transmission de la lumière, il est possible de calculer au moins 3 paramètres: la période de latence peut être mesurée en schématisant la courbe comme indiqué dans la Figure (droite a). La vitesse maxi-

male d'agrégation est mesurée comme indiqué par la droite b de la Figure; b exprime en unités, la variation maximale de la transmission extrapolée sur 1 min, le plasma pauvre en plaquettes ayant, par définition, une transmission de 100 unités et le PRP possédant en général une transmission variant entre 10 et 20 unités. L'amplitude maximale, exprimée en unités de transmission, est calculée (Figure, droite c) comme la différence entre la valeur initiale et la valeur finale de transmission; cette dernière est obtenue comme indiqué dans la Figure.

Les résultats acquis dans 50 sujets normaux sont regroupés dans le Tableau I. Ces tests ont été effectués avec un intervalle de 17 jours entre le premier et le dernier, en employant au total 7 échantillons différents de Thrombofax, provenant de 2 lots (2 J 89 et 1 J 88).

La reproductibilité de l'agrégation par Thrombofax a été étudiée au moyen des expériences rapportées dans les Tableaux II et III.

Du Tableau II on peut voir que l'erreur technique du test est variable pour les différents paramètres mesurés mais assez petit (de l'ordre de 5 à 10%).

Une fois ouvert le flacon, le Thrombofax garde son activité pratiquement inchangée pendant au moins 20 jours, si le réactif est soigneusement gardé entre 4° et 8°C.

Le Tableau III montre que la variabilité de la réponse au Thrombofax d'un même sujet, étudiée à différents intervalles, est minime et rentre dans les limites de l'erreur technique. L'ensemble de ces résultats indique que la reproductibilité de la méthode est excellente et que les

Tableau I. Moyennes et déviations standard (D.S.) de 3 paramètres de l'agrégation plaquettaire par Thrombofax étudiée sur 50 sujets normaux

	Moyenne	D.S.	D.S. de la moyenne (%)
a) Période de latence (sec)	65,3	24,6	37,7
b) Vitesse maximale (unités de transmission/min)	36,6	8,0	21,8
c) Amplitude maximale (unités de transmission)	44,9	7,1	15,8

¹ Recherches effectuées avec l'appui financier du Fonds voor Wetenschappelijk Geneeskundig Onderzoek, Brussel (contrat No. 1216).

² J. F. MUSTARD et M. A. PACKHAM, Pharmac. Rev. 22, 97 (1970).

³ G. DE GAETANO, J. VERMYLEN et M. VERSTRAETE, Nouv. Rev. fr. Hémat. 11, 339 (1971).

⁴ R. M. HARDISTY, R. A. HUTTON, D. MONTGOMERY, S. RICKARD et H. TREBILCOCK, Br. J. Haemat. 19, 307 (1970).

⁵ G. BAELE, P. VANDEN BOGAERT et F. BARBIER, Acta med. scand., suppl. 525, 131 (1971).

⁶ J. R. O'BRIEN, Nature, Lond. 202, 1188 (1964).

⁷ G. V. R. BORN, Nature, Lond. 194, 927 (1962).