

spinal white matter possesses histochemically demonstrable cholinesterase activity¹³, although presumably low and therefore only small amounts of Ach could have been destroyed during perfusion. Moreover, the present experiments failed to demonstrate cholinesterase activity in cat meninges, and in humans it appeared tenuously and only in nerve fibers accompanying vessels¹⁴. In view of the gradual clearance of Ach, one could speculate that it could have been removed by an active transport mechanism similar to that reported for iodide¹⁵.

The increase of outflow volume could be attributed to vasodilatation and/or increased permeability elicited by Ach on plexus choroid vessels. This view is supported by the higher outflow obtained from c), which included all the plexuses choroides, and by the lower outflow from d) where the 4th ventricle was excluded. It may also be possible that during b), some Ach reached the 4th ventricle, and this could explain the increase in outflow. It should be recalled that, in dog, the plexus choroides of 4th ventricle produce two thirds of the total CSF¹⁶. The possibility that Ach acts on non-choroidal CSF-secreting structures, such as ventricular ependyma^{1,17} and thus contributing to the increase of effluent, cannot be ruled out.

On the other hand, the reduction of outflow from a) could have been due to the fact that no plexus choroides came in contact with Ach. An additional reason could be the action of choline, which must have been produced as a result of Ach destruction and is known to reduce¹⁸ CSF production¹⁹.

Zusammenfassung. Bei Perfusion der Liquorräume im Katzensgehirn verschwindet Acetylcholin zu 90% aus dem Subarachnoidalraum, zu 60% aus den Ventrikeln. Eine fortlaufende Abnahme wurde im spinalen Subarachnoidalraum beobachtet. Acetylcholin erweiterte den Ast der Choroidarterie und vergrößerte stark das Abflussvolumen aus Ventrikeln und dem spinalen Subarachnoidalraum.

I. M. LEVINGER and H. EDERY

*Department of Life Sciences,
Bar Ilan University, Ramat Gan, and
Israel Institute for Biological Research,
Tel-Aviv University Medical School,
P.O. B19, Ness-Ziona (Israel), 15 September 1970.*

¹³ D. C. GWYN and J. H. WOLSTENCROFT, *Science* **153**, 1534 (1966).

¹⁴ E. APPEL, *Studii Cercer. Neurol.* **11**, 465 (1966).

¹⁵ J. P. HAMMERSTAD, A. V. LORENZO and R. W. P. CUTLER, *Am. J. Physiol.* **216**, 353 (1969).

¹⁶ H. DAVSON, *Physiology of the Cerebrospinal Fluid* (Churchill, London 1967), p. 131.

¹⁷ M. POLLAY and F. CURL, *Am. J. Physiol.* **213**, 1031 (1967).

¹⁸ M. MONNIER, *Functions of the Nervous System* (Elsevier, Amsterdam 1968), vol. 1, p. 559.

¹⁹ This work was partially supported by a Grant to I.M.L. of the Research Committee of Bar Ilan University.

Beeinflussung mikrosomaler Enzyme durch Tetrachlorkohlenstoff mit und ohne Phenobarbitalvorbehandlung¹

Tetrachlorkohlenstoff führt bei Versuchstieren und bei exponierten Personen zu erheblichen Leberschäden. Der genaue Mechanismus der akuten Schädigung ist bisher noch nicht bekannt. Verschiedene Befunde sprechen dafür (McLEAN², SASAME³ und SMUCKLER⁴), dass der Tetrachlorkohlenstoff zu einem aktiven Metaboliten abgebaut wird.

Wir untersuchten, ob die toxische Wirkung des CCl₄ in einem Zusammenhang mit den mikrosomalen Arzneimittel-metabolisierenden Enzymen und anderen mikrosomalen Enzyme steht, und ob sich die Toxizität nach Phenobarbitalvorbehandlung verstärken lässt.

Unsere Untersuchungen wurden 3 h nach oraler Gabe des CCl₄ durchgeführt, nachdem DINGELL und HEIMBERG⁵ zeigen konnten, dass 2–3 h nach oraler Gabe von ¹⁴CCl₄ in der Mikrosomenfraktion die höchste Aktivität nachweisbar ist.

Männliche 140–160 g schwere Wistar-Ratten wurden mit Altramin-Standardfutter und Wasser ad libitum ernährt. Eine andere Gruppe erhielt ausserdem 3 Tage lang je 80 mg/kg Körpergewicht Phenobarbital-Natrium i.p. injiziert. Am 4. Tag bekamen die Tiere nach 12stündigem Nahrungsentzug verschiedene Mengen CCl₄ (1:1 in Olivenöl gelöst) durch eine Schlundsonde verabreicht. Die Kontrolltiere beider Gruppen bekamen entsprechende Mengen Olivenöl.

Die Mikrosomenpräparation führten wir nach REMMER⁶ durch und untersuchten folgende Enzyme: Das Cytochrom b₅ und das Cytochrom P₄₅₀ nach OMURA und SATO⁷, die Desmethylase und die Hydroxylase, wobei wir das in vitro gebildete Formaldehyd bzw. para-

Aminophenol nach SCHENKMANN⁸ bestimmten, die NADPH-Cytochrom-c-Reduktase nach PHILLIPS et al.⁹ und die Glukose-6-Phosphatase nach HARPER¹⁰. Ausserdem bestimmten wir die Bindungsfähigkeit des endoplasmatischen Reticulums für Anilin und Hexobarbital nach SCHENKMANN et al.⁸.

Einige der von uns untersuchten Enzyme, so das Cytochrom P₄₅₀, die Desmethylase, die Hydroxylase und die Glukose-6-Phosphatase, zeigten nach CCl₄-Gabe eine dosisabhängige, statistisch signifikante Aktivitätsabnahme (Tabellen I und III). Das Cytochrom b₅ und die

¹ Die Ergebnisse wurden teilweise auf der 11. Pharmakologischen Frühjahrstagung in Mainz im März 1970 vorgetragen.

² A. E. M. McLEAN, *Biochem. Pharmac.* **16**, 2030 (1967).

³ H. A. SASAME, J. A. CASTRO und J. R. GILETTE, *Biochem. Pharmac.* **17**, 1759 (1968).

⁴ E. A. SMUCKLER, E. A. BARKER und E. P. BENDITT, *Fedn. Proc. Fedn. Am. Soc. exp. Biol.* **22**, 369 (1963).

⁵ J. V. DINGELL und M. HEIMBERG, *Biochem. Pharmac.* **17**, 1269 (1968).

⁶ H. REMMER, H. GREIM, J. B. SCHENKMANN und R. W. ESTABROOK, in *Methods in Enzymology* (Academic Press, New York and London 1967), Vol. 10, p. 703.

⁷ T. OMURA und R. SATO, *J. biol. Chem.* **239**, 2370 (1964).

⁸ J. B. SCHENKMANN, H. REMMER und R. W. ESTABROOK, *Molec. Pharmac.* **3**, 113 (1967).

⁹ A. H. PHILLIPS und R. C. LANGDON, *J. biol. Chem.* **237**, 2652 (1963).

¹⁰ A. E. HARPER, in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Ed. H. V. BERGMAYER; Verlag Chemie, Weinheim 1962), p. 788.

Tabelle I. Verhalten des Cytochroms b_5 , des Cytochroms P_{450} , der Demethylierung von Aminopyrin und der Hydroxylierung von Anilin nach Zugabe steigender Mengen Tetrachlorkohlenstoff ($\bar{x} \pm s$)

Vorbehandlung	(n)	Cytochrom b_5 nmol/mg Protein	Cytochrom P_{450} nmol/mg Protein	Formaldehyd nmol/min per mg Protein	p-Aminophenol nmol/min per mg Protein
Kontrolltiere	8	$0,47 \pm 0,051$	$0,57 \pm 0,050$	$6,90 \pm 0,95$	$0,60 \pm 0,082$
1,25 ml CCl_4 /kg	6	$0,45 \pm 0,047$	$0,47 \pm 0,042$	$3,50 \pm 0,41^a$	$0,34 \pm 0,052^a$
2,50 ml CCl_4 /kg	6	$0,47 \pm 0,050$	$0,42 \pm 0,038^a$	$3,10 \pm 0,25^b$	$0,27 \pm 0,035^b$
5,00 ml CCl_4 /kg	6	$0,45 \pm 0,040$	$0,38 \pm 0,030^a$	$2,30 \pm 0,21^b$	
nach Phenobarbitalvorbehandlung (3×80 mg/kg)					
Kontrolltiere	8	$0,54 \pm 0,062$	$1,15 \pm 0,095$	$16,30 \pm 1,95$	$1,05 \pm 0,112$
0,75 ml CCl_4 /kg	5	$0,56 \pm 0,055$	$0,82 \pm 0,070^b$	$10,89 \pm 1,02^b$	
1,25 ml CCl_4 /kg	6	$0,52 \pm 0,070$	$0,60 \pm 0,052^b$	$7,60 \pm 0,85^b$	$0,55 \pm 0,060^c$
2,50 ml CCl_4 /kg	6	$0,54 \pm 0,061$	$0,46 \pm 0,035^c$	$5,60 \pm 0,45^c$	$0,35 \pm 0,041^c$
5,00 ml CCl_4 /kg	6	$0,57 \pm 0,048$	$0,37 \pm 0,035^c$	$4,30 \pm 0,35^c$	$0,18 \pm 0,022^c$

* $p < 0,05$; $^b p < 0,01$; $^c p < 0,001$.Tabelle II. Bindungsspektren von Hexobarbital (10 mmol) und Anilin (10 mmol) nach Zugabe steigender Mengen Tetrachlorkohlenstoff ($\bar{x} \pm s$)

Vorbehandlung	(n)	Hexobarbital $\Delta E \times 10^{-3}/mg$ Protein	Anilin $\Delta E \times 10^{-3}/mg$ Protein
Kontrolltiere	6	$5,1 \pm 0,71$	$9,1 \pm 1,09$
1,25 ml CCl_4 /kg	5	$4,5 \pm 0,52$	$6,6 \pm 0,78^a$
2,50 ml CCl_4 /kg	5	$4,1 \pm 0,45^a$	$5,6 \pm 0,59^b$
5,00 ml CCl_4 /kg	5	$3,6 \pm 0,38^a$	$4,8 \pm 0,51^b$
nach Phenobarbitalvorbehandlung (3×80 mg/kg)			
Kontrolltiere	6	$11,5 \pm 1,52$	$22,0 \pm 4,15$
1,25 ml CCl_4 /kg	5	$7,3 \pm 0,91^b$	$10,7 \pm 1,27^b$
2,50 ml CCl_4 /kg	5	$6,4 \pm 0,66^c$	$8,6 \pm 0,95^c$
5,00 ml CCl_4 /kg	5	$5,1 \pm 0,54^c$	$6,5 \pm 0,74^c$

* $p < 0,05$; $^b p < 0,01$; $^c p < 0,001$.Tabelle III. Verhalten der Glukose-6-Phosphatase und der NADPH-abhängigen Cytochrom-c-Reduktase nach Gabe steigender Tetrachlorkohlenstoffdosen ($\bar{x} \pm s$)

Vorbehandlung	(n)	μ Mol PO_4 g Leber/min	m μ Mol red. Cyt. c mg mikros. Protein/min
Kontrolltiere	6	$13,30 \pm 2,15$	134 ± 15
0,75 ml CCl_4 /kg	5	$9,50 \pm 1,24^a$	127 ± 18
1,25 ml CCl_4 /kg	5		132 ± 21
2,50 ml CCl_4 /kg	5	$7,05 \pm 0,95^b$	138 ± 18
5,00 ml CCl_4 /kg	5	$5,60 \pm 0,60^b$	141 ± 20
nach Phenobarbitalvorbehandlung (3×80 mg/kg)			
Kontrolltiere	6	$11,60 \pm 1,85$	250 ± 22
0,75 ml CCl_4 /kg	5	$8,60 \pm 0,95^a$	
1,25 ml CCl_4 /kg	5		244 ± 27
2,50 ml CCl_4 /kg	5	$6,60 \pm 0,48^b$	252 ± 30
5,00 ml CCl_4 /kg	5	$5,80 \pm 0,37^b$	248 ± 28

* $p < 0,05$; $^b p < 0,01$;

NADPH-Cytochrom-c-Reduktase zeigten dagegen keine Aktivitätsänderung (Tabellen I und III). Bereits früher konnten wir zeigen, dass auch die mikrosomale Pseudocholinesterase unbeeinflusst bleibt¹¹.

Nach Phenobarbitalvorbehandlung war die toxische Wirkung des Tetrachlorkohlenstoffs wesentlich gesteigert. So nahm bei der maximalen Dosis von 5,0 ml CCl_4 /kg der Cytochrom P_{450} -Gehalt von 0,57 nMol um 33% auf 0,38 nMol/mg Protein ab, während er bei der gleichen Dosis nach Phenobarbitalvorbehandlung viel stärker, und zwar um 68% von 1,15 nMol auf 0,37 nMol erniedrigt wurde (Tabelle I). Eine ähnlich starke Aktivitätsabnahme konnten wir auch bei der Desmethylase und Hydroxylase beobachten (Tabelle I). Bei der Glukose-6-Phosphatase entsprach die Schädigung derjenigen bei nicht mit Phenobarbital vorbehandelten Tieren (Tabelle III). Das Cytochrom b_5 und die NADPH-Cytochrom-c-Reduktase, welche nach Phenobarbitalvorbehandlung deutlich an Aktivität zunahm, wurden nicht durch Tetrachlorkohlenstoff beeinflusst. Bei den Bindungsspektren von Anilin und Hexobarbital (Typ I und II) konnten wir nach CCl_4 -Gabe eine Abnahme der Bindungsfähigkeit feststellen (Tabelle II). Die Abnahme war ebenfalls deutlich dosisabhängig und liess sich durch Phenobarbitalvorbehandlung wesentlich verstärken. Eine Verschiebung des Maximums oder Minimums der Absorption trat nicht auf.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass Tetrachlorkohlenstoff 3 h nach oraler Gabe nicht alle Enzyme des endoplasmatischen Reticulums beeinflusst. Es handelt sich vielmehr um eine spezifische Schädigung, die besonders die Endoxydase des Arzneimittel-metabolisierenden Enzymsystems, das Cytochrom P_{450} , betrifft. Damit zusammenhängend ist auch die Bindung von Arzneimitteln und ihre Metabolisierung vermindert, während das Cytochrom b_5 , die NADPH-Cytochrom-c-Reduktase und die mikrosomale Pseudocholinesterase¹¹ unbeeinflusst bleiben. Die Aktivitätsabnahme der untersuchten Enzyme nach Tetrachlorkohlenstoffgabe war deutlich dosisabhängig, statistisch signifikant und konnte ausser bei

¹¹ N. HENI und H. REMMER, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac. 266, 354 (1970).

¹² R. C. GARNER und A. E. M. McLEAN, Biochem. Pharmac. 18, 645 (1969).

der Glukose-6-Phosphatase durch Phenobarbitalvorbehandlung wesentlich gesteigert werden.

GARNER und McLEAN¹² konnten durch Nachweis von ¹⁴CO₂ in der Atemluft mit ¹⁴CCl₄ behandelter Tiere zeigen, dass Tetrachlorkohlenstoff in vivo abgebaut wird. Auch unsere Untersuchungen deuten darauf hin, dass nach Gabe von CCl₄ durch die Arzneimittel-metabolisierenden Enzyme ein toxischer Metabolit gebildet wird, der die Endoxydase dieses Enzymsystems, das Cytochrom P₄₅₀, zerstört. Der toxische Metabolit beeinflusst jedoch nicht nur dieses Cytochrom, sondern auch seine lipophile Umgebung. Dadurch kommt es nicht nur zu einer verminderten Bindungsfähigkeit für Substanzen vom Typ II wie Anilin, die direkt an das Cytochrom P₄₅₀ gebunden werden, sondern auch für Substanzen vom Typ I wie

Hexobarbital, deren Bindung durch die lipophile Umgebung vermittelt wird.

Summary. Isolated damage of the drug-metabolizing enzyme system, the binding power of the endoplasmic reticulum for hexobarbital and aniline, and glucose-6-phosphatase, appears 3 h after oral administration of carbon tetrachloride. The damage is evidently dependent on the dose and can become enlarged after phenobarbital pretreatment.

N. HENI

*Medizinische Klinik der Universität,
Hugstetterstrasse 55, D-78 Freiburg (Deutschland),
26. August 1970.*

Enhancement of the Positive Inotropic and Pressor Effects of Ouabain in Nephrectomized Dogs

Bilateral nephrectomy in dogs was shown to enhance the pressor effects of renin, angiotensin or norepinephrine. This increased response to pressor agents was attributed to an increase in vascular reactivity typical for a prehypertensive state. The increase was not mediated through the central nervous system and was not dependent on the excretory function of the kidney. It has been suggested that a nonexcretory renal function and specifically the absence of an antihypertensive substance of renal origin may be responsible for an increase in vascular reactivity after nephrectomy¹⁻³. We recently found that not only the pressor but also the positive inotropic effects of ouabain are enhanced in dogs by nephrectomy.

Mongrel dogs of either sex and of 6.8 to 11.2 kg body weight were anesthetized with sodium vinbarbital, 50 mg/kg i.v. Bilateral nephrectomy was performed by retroperitoneal approach. The duration of the procedure did not exceed 40 min. The animals were tracheotomized and vagotomized; they were respired artificially with a respiratory pump Model AR-2 (Electro-Med, Inc., Minneapolis, Minn.) at the rate of 18 per min. The thorax was opened bilaterally at the fourth intercostal space. A BRODIE-WALTON⁴ strain gauge was sutured on the right ventricle. The left ventricular wall was punctured with Teflon No. 6437 tubing, 0.066 inches O.D. The right femoral vein and artery were catheterized. The left ventricular and femoral arterial pressures were

recorded through Statham Model 23Db pressure transducers. Heart rate was measured with a cardi tachometer driven from the amplified pressure signal. The first derivative of the left ventricular pressure, dp/dt max, was obtained with Lexington Model A-111 differentiator (Lexington Instruments Co. Waltham, Mass.). All variables were recorded on a Hewlett-Packard 8-channel recorder of 7700 series. Ouabain was dissolved in distilled water at 1 mg/ml and administered i.v. at 60 to 75 min after nephrectomy. Student's *t*-test was used for evaluation of significance of the differences in the effects of ouabain in normal and nephrectomized dogs.

The results are summarized in the Table. Under our experimental conditions ouabain had a relatively rapid onset of action. The maximal effect was usually seen within 15 min after administration of the drug. The data in the table refer, therefore, to the maximal effects of ouabain observed within 15 min after treatment. At 25 µg/kg ouabain had slight positive inotropic and pressor

- ¹ J. W. McCUBBIN and I. H. PAGE, *Circulation Res.* 2, 35 (1954).
- ² J. C. VANATTA, I. DANHOFF and M. McMULLEN, *Am. J. Physiol.* 185, 167 (1956).
- ³ E. M. KRIEGER and W. F. HAMILTON, *Am. J. Physiol.* 194, 268 (1958).
- ⁴ R. P. WALTON, O. J. BRODIE, J. S. LEARY, M. DE V. COTTEN and P. C. GAZES, *Am. J. Physiol.* 159, 594 (1949).

Effect of ouabain on right ventricular contractile force, left ventricular dp/dt max, mean arterial pressure and heart rate in anesthetized dogs^a

Group No.	Dogs	Dose of ouabain (µg/kg i.v.)	No. of dogs	Right ventricular contractile force (g)		Left ventricular dp/dt max (mm Hg/sec)		Mean arterial pressure (mm Hg)		Heart rate beats/min	
				Before ouabain	Change ^b	Before ouabain	Change ^b	Before ouabain	Change ^b	Before ouabain	Change ^b
1	Normal	25	4	51	+ 5 ^d	2376	+ 270 ^d	85	+ 9 ^d	159	— 11
2	Normal	50	8	65	+ 33 ^e	1652	+ 805 ^e	88	+ 26 ^e	140	— 10 ^d
3	Nephrectomized	25	4	54	+ 31 ^{e, f}	1620	+ 270 ^e	86	+ 11 ^d	135	— 8
4	Nephrectomized	50	8	55	+ 82 ^{e, *}	1674	+ 2398 ^{e, *}	103	+ 63 ^{e, *}	120	+ 24 ^{d, *}

^a Average values for 4 or 8 animals. ^b Maximal change within 15 min after ouabain. ^c Post-treatment values were significantly different from control values in the same animals, *p* < 0.01. ^d Same as ^c, but *p* > 0.01 and < 0.05. ^e Significantly different from the corresponding changes in dogs of group No. 2 (*p* < 0.05). ^f Significantly different from the corresponding changes in dogs of group No. 1 (*p* < 0.05).