

NAUČNO DRUŠTVO NR BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA IX

ODJELJENJE MEDICINSKIH NAUKA

Knjiga 5



Sarajevo

1958

PAVEL ŠTERN

O PRENOSU PODRAŽAJA U CENTRALNOM NERVNOM SISTEMU

s osobitim osvrtom na Supstancu P.

(Primljeno na sjednici Odjeljenja medicinskih nauka 29. X.. 1957 g.)

U v o d

U zadnjih nekoliko godina kemoterapija duševnih bolesti kroči napred neobično brzim koracima (1). Možemo mirno reći da je u tom kratkom periodu od 5 do 6 godina učinjen veći napredak, nego u cijeloj dosadašnjoj modernoj psihijatriji. Otkriće chlorpromazina i njegovih derivata te reserpina, derivata diphenylmetana i derivata propandiola sa njegovim najvažnijim pretstavnikom meprobramatom potpuno je izmijenilo terapiju u psihijatriji i ogromno olakšalo tešku situaciju na ovom sektoru medicine. Ovo je razumljivo ako uočimo i napredak svih ostalih grana nauke koji služe istraživanjima funkcije centralnog nervnog sistema (CNS). Mislimo tu prvenstveno na veliki napredak biokemije CNS, elektrofiziologije, uvođenje markiranih farmaka itd. Fiziologiju i patofiziologiju CNS osobito je obogatilo poznavanje funkcije biogenih amina (acethylcholin (2), adrenalin, noradrenalin (3), 5-hydroxytryptamin (4), histamin (5), butirilholin (6), ATP (7)). To područje fiziologije, koje je započeo na autonomnom i perifernom nervnom sistemu svojim genijalnim eksperimentima Oto Loewi (8) 1921, silno se odonda razvila. Vrlo rano postavilo se pitanje da li ono što vrijedi za periferni nervni sistem ne vrijedi možda i za centralni. To je bilo utoliko više opravdano jer je vrlo brzo nađen acethylcholin (2) (Ach) i adrenalin (3) (A), i u CNS. U CNS nađeni su i fermenti koji ih razaraju, holinesteraza (2) i monoaminooksidaza (9).

Treba odmah na početku istaknuti da je metoda ispitivanja prenosa podražaja, odnosno širenja podražaja, u CNS neusporedivo teža nego u autonomnom ili perifernom nervnom sistemu. To je potpuno razumljivo jer u CNS ne možemo raditi sa izoliranim ganglijima ili jednim nervom kojemu lako pratimo put. Kod perifernog i autonomnog

*) Materijalna sredstva za ovaj rad dobivena su iz fonda za naučna istraživanja Rektorata Univerziteta u Sarajevu tokom 1956 i 1957, na čemu se još jednom najsrdačnije zahvaljujemo.

nervnog sistema možemo čak raditi sa jednim aksonom. U tom području potpuno nam je jasan i pristupačan izvršni organ. Sve to manjka u CNS.

(Sjetimo se samo krasnog eksperimenta Kibjakova (10). On je izradio metodu perfuzije izoliranog ganglion cervicale superius mačke. Postoji laka mogućnost draženja pre — i postganglionarnih niti tog ganglija, a izvršni organ mu je membrana nictans. Tako je i dokazano da su sve preganglionarne niti holinergičnog karaktera. Taj objekat pripada adrenergičnom dijelu autonomnog nervnog sistema. Emmelin i Muren (11) dokazali su postojanje preganglionarnih holinergičnih niti u parasimpatičnom dijelu autonomnog nervnog sistema. Oni su perfundirali pljuvačnu žlijezdu. Prije toga dali su velike doze curare-a, koje blokiraju ganglije, tako da nije dolazilo više do sekrecije žlijezde. Iza draženja preganglioniranih niti (chorde timpani) Ach je ipak bio u perfuzatu. To može poticati samo od preganglionarnih niti).

Izrađene su izvanredno suptilne metode i za ispitivanje funkcija motorne ploče (12). Ovdje su dakle anatomske odnosi mnogo jednostavniji nego u CNS. Mi (13) smo uspjeli pokazati da postoji jedan »red« u perifernom i autonomnom nervnom sistemu i da postoje sve mogućnosti kombinacije pre — i postganglionarnih neurona koji teoretski dolaze u obzir. Takav jedan plan građe za CNS zasada se ne može ni zamisliti. CNS se sastoji iz bezbroj stanica i aksona isprepletenih na neobično kompliciran način. Još danas, nakon više od 100 godina anatomske i funkcionalne analize, nije rasvijetljena topografija svih puteva i njihovih međusobnih veza. Mi ne znamo uvijek i svagdje točno kako su pojedine regije međusobno povezane, gdje počinje jedan put, gdje se prebacuje, odnosno povezuje na koji drugi. Iz anatomske razloga je prema tome nemoguće raditi na jednom izoliranom skupu stanica koje čine jednu sinapsu ili nukleus, kao što je to slučaj kod autonomnog ili perifernog nervnog sistema. Istina, mi možemo danas pomoću stereotaksičkog Horsley-Clarkeovog (14) aparata dopreti do svakog nukleusa ili bilo koje točke ili jednog puta, te ga podraživati i pratiti njegovu sekreciju bez veze sa okolinom, kao što je to naprimjer slučaj kod perifernih ganglija. Horsley-Clarkeov aparat može nam dobro poslužiti specijalno kod rada na mački, ali i na štakoru i na čovjeku. Princip tog aparata je sljedeći: ravnina koju dobijemo presjekom kroz vanjski slušni hodnik, sa donjim rubom orbite je u odnosu na ostale dijelove glave konstantna, pretstavivši da je glava uvijek iste forme. Ako nad tom ravinom imamo jednu iglu koju možemo pomicati od nule u sva tri smjera, možemo pomoću određenih atlasa doći do svake točke u CNS, podražiti je, uništiti koagulacijom ili injicirati neku supstancu itd. Najnoviji razvitak histokemije isto je mnogo doprinio upoznavanju funkcije CNS, specijalno fermentata. Nije ni potrebno naglašavati ogromnu ulogu encefalografije, pa angiografije za upoznavanje fiziologije i patofiziologije CNS.

Ima mnogo razloga koji nam dozvoljavaju da pravimo analogiju i da uporedimo biokemijske procese sa perifernog i autonomnog nervnog sistema sa procesima u CNS. To nam dozvoljavaju upravo farmakološka ispitivanja, jer se pokazalo da razna farmaka za koje pouzdano znamo kako djeluju na periferiju, djeluju slično i u CNS (15, 79). Konačno, filogenetski to je ista materija. Harrazzi (79) smatra autonomni ganglij malim modelom CNS.

Ako je dakle takva analogija moguća, onda postoji i u CNS humoralni prenos podražaja kao i na periferiji.

Za egzaktno ispitivanje postoje li humoralni prenosi u CNS osobito je zaslužan Marrazzi (15). No apsolutni dokaz da je širenje podražaja u CNS humoralnog karaktera dao je tek prošle godine Purpura (16). On je radio tako da je samo glavu jedne mačke povezao sa krvotokom druge mačke, dakle od prve mačke živio je samo CNS. Ako je dražio *formatio reticularis* prve mačke, elektroencefalografska krivulja izolirane glave pokazala je aktivaciju. To je jasno moglo uslijediti samo humoralnim putem.

Pita se šta su transmittorne supstance u CNS. Sigurno to ni izdaleka nije riješeno. Možemo reći, oni isti biogeni amini koje smo nabrojili kao transmittore, za periferiju vrijede kao transmittori i za CNS s time tu dolaze i neki polipeptidi, kao »Supstanca »P« (17) (SP), Floreyeva (18) supstanca, a možda i neki drugi (19). Uglavnom možemo ih dijeliti na biogene amine i polipeptide. U svom najnovijem radu Zettler (20) misli da je našao još jednu aktivnu supstancu u CNS koja nije polipeptid, nego možda nukleotid ili lipoproteid. Fedlberg (21) je najpre zastupao mišljenje da samo Ach djeluje kao prenosilac podražaja u CNS, ali je brzo odustao od toga. Funkcija CNS je prekomplikirana da bi se mogla rastumačiti samo sa jednom transmittornom supstancom. I ovih osam do deset faktora koje smo mi nabrojili sigurno nisu ni izdaleka svi, ali to je ono što danas znamo. Kombinacijom svih tih faktora dobivamo već ogromni broj varijacija. Ako uzmemo da ista supstanca može djelovati na jednu ćeliju kao inhibitor, a na drugu kao ekscitator, broj kombinacija se i dalje povećava. Mnogi putevi se prekidaju tri i više puta, pa broj mogućih kombinacija izmjene transmittornih supstanci u jednom nervnom putu raste upravo neizmjerljivo. Kako smo rekli, u CNS dolaze i fermenti za sintezu i razgradnju biogenih amina.

(Usput bismo htjeli spomenuti da mi smatramo one fermente koji razgrađuju te amine istovremeno receptorima, što smo Župančić (22) i mi (23) razradili za periferni nervni sistem, a nama je nedavno to uspjelo učiniti vjerojatnim i za centralni. Pokazali smo da gotovo svi inhibitori monoaminooksidaze djeluju halucinogeno (24). Mi monoaminooksidazu smatramo receptorom za 5-hydroxytryptamin (25) (5 HT). Inhibitori tog fermenta dovode do duševnih poremećaja zbog skupljanja 5 HT u prevelikim količinama. Iz istih razloga djeluju i antagonisti 5 HT halucinogeno. Konačno nam je histohemijskim dokazivanjem uspjelo pokazati da višak 5 HT isto inhibira monoaminooksidazu (26).

Literatura o funkciji transmittornih supstanci u CNS i o uplivu raznih farmaka i raznih stanja u organizmu na njih je upravo ogromna, tako da je teško u jednom referatu dati pregled situacije. Sjetimo se samo intenzivnog istraživanja o ulozi 5 HT u CNS i njenom odnosu prema LSD-u i reserpinu (27), koja istraživanja obećavaju vanredno mnogo i daju nade da se rasvijetli barem dijelom biohemijski problem psihičkih funkcija i duševnih bolesti. Vrlo je vjerojatno da se u organizmu konstantno stvaraju aktivne supstance sa fiziološkom funkcijom, koje u određenoj situaciji mogu biti uzrok i duševnih bolesti. Mislimo tu na 5 HT i adrenohrom (28), a možda tako djeluju i drugi derivati indola. Sve ovo o funkciji i biokemizmu nekih biogenih amina izneseno je samo letimično, da se vidi složenost problema biokemijskih procesa u CNS, u odnosu na

periferni i autonomni nervni sistem. Mi ćemo se zato zadržati samo na funkciji SP, jer je ona danas u centru pažnje mnogih istraživača, a sami smo dali nekoliko priloga o poznavanju njezinog djelovanja, a koji nam dozvoljavaju da tvrdimo da ima važnu, a vjerojatno i transmitsornu funkciju u CNS. U tom radu daćemo pregled naših dosadanih eksperimenata, ali i nekih još neobjavljenih.

Općenito o SP.

Osvrnućemo se ukratko na historijat, svojstva i metode dobivanja i čišćenja SP, te njenu raspodjelu. Opširnije smo o tom pisali nedavno u jednom zbirnom referatu, pa upozoravamo za detaljnije informacije na taj rad (29).

SP je otkrivena 1931 godine od Eulera i Gadduma (17), prvenstveno u crijevu i CNS. Njena glavna farmakološka svojstva su kontrakcija glatke muskulature i sniženje krvnog pritiska. Prema tome posjeduje svojstva kao u ono doba već dobro poznati biogeni amini, acethylcholin i histamin. Spomenuti autori su mogli odmah isključiti indentičnost SP sa tim aminima, budući da SP djeluje i u prisutnosti atropina, a danas znamo da i antihistaminika ne sprečavaju njeno djelovanje. SP nije indentična ni sa 5 HT, koji je otkriven tek pred 5 godina. Specifični antagonisti 5 HT ne sprečavaju djelovanje SP (17 c). Isto tako znamo da SP nije indentična sa polipeptidom bradikininom. Vogt (30) je to mogao dokazati pokazavši da postoje kemijske razlike između ta dva polipeptida. Zettler (31) je pokazao da SP utiče na CNS, za razliku od bradikinina. Florey (18) izričito naglašava da je njegova supstanca različita od SP. Prema svemu tome što danas znamo postoje na izoliranom crevu posebni receptori za SP (32). Dakle na organu na kojem određujemo SP skoro svi transmittori izazivaju kontrakciju glatke muskulature, ali neki preko svog zasebnog receptora.

Metode dobivanja SP.

Razlikujemo principijelno dva načina ekstrakcije SP. Jedan kad hoćemo izolirati čistu SP i drugi kad ju ekstrahiramo iz malih regija nepročišćenu, sa primjesom drugih aktivnih tvari. Kad želimo dobiti veće količine čiste SP, uzimamo kao izvor crevo konja ili mozak goveda. Creva se očiste od masti, isjeckaju, a isto se tako čini i sa mozgom. Obično se radi po metodi Eulera (33), opisanoj 1942. Na 1 kg. tkiva dodajemo 1,5 l destilirane vode i tu smjesu zakiselimo na pH4. Iza 10 min. kuhanja filtrira se, i ekstrakcija, jednom ponovi. Oba ekstrakta se pomiješaju i ispare na najmanji mogući volumen, kod 25° C, tako da 1 cc ekstrata odgovara 10—20 g tkiva. Sada dodamo dvostruki volumen 96% etanola i ostavimo u frižideru 12 sati. Iza toga filtriramo i ponovimo ekstrakciju s alkoholom, koji se u vakuumu koncentrira do najmanje mogućeg volumena. Dobije se žuti sirupasti koncentrat. Pomoću etanola ponovo odstranimo neaktivne bjelančevine i isparimo u vakuumu. Preostali vodeni ekstrakt se zakiseli octenom kiselinom i centrifugira. Bistrom vodenom ekstraktu dodajemo zasićenu otopinu amonsulfata do 70% zasićenja i ostavimo u frižideru preko noći. Iza filtriranja dobijemo talog, koji se u vakuumu osuši uz fosforpentoksid. Prema Euleru iz 100 kg creva dobivamo oko 900.000 jed., dok 10 kg mozga (bez malog

mozga) daje oko 70.000 jed. Daljnje čišćenje postižemo tako da onaj suhi prašak otopimo u NaOH kod pH8, da otopina bude 15—20%. Tome dodamo 4 volumena 96% etanola. Obore se inertne bjelančevine sa natriumsulfatom kod otjerivanja amonijaka u vakuumu. Takvim čišćenjem može se postići da jedna jedinica bude sadržana u 0,17 mg.

Pernovljeva je zasluga što je izradio odlične detalje metode čišćenja SP, upotrebljavajući adsorpcionu kromatografiju na aluminium-oksidi i eluiranja pomoću metilnog alkohola (17b). Time se postiže koncentracija do 30 puta. Maksimalno čišćenje SP postigao je Pernov kromatografijom na celulozi. Njemu je uspjelo na taj način dobiti preparate koji sadrže 3000 jed. u 1 mg.

Kod ispitivanja SP u malim količinama tkiva postupak je potpuno drukčiji i kraći. Opisali su ga Lembeck, Gaddum i Zettler. Mi radimo kod malih količina kad napr. određujemo SP u mozgu štakora ili retini po metodi Zettlera. Ovakav način ekstrakcije je vrlo važan zato jer se na taj način može odrediti koncentracija SP u pojedinim nukleusima ili uopće u malim regijama CNS, što je od najveće važnosti za problematiku SP uopće.

Prema Euleru, 1 jed. SP je ona količina SP čija aktivnost je ekvivalentna sa djelovanjem 2—4 (liminalne) doze na izoliranom jejunumu kunića u 30 cc, Tyrodeove tekućine. Možemo raditi i sa ileumom zamorca u bazenu od 3 cc (7—10 praznih doza). Za danas nažalost nemamo bolje metode testiranja. Gotovo svi istraživači služe se standardom koji stavlja na raspolaganje B. Pernow, saradnik prof. Eulera, kojemu i mi dugujemo zahvalnost za standard.

Svojstva SP.

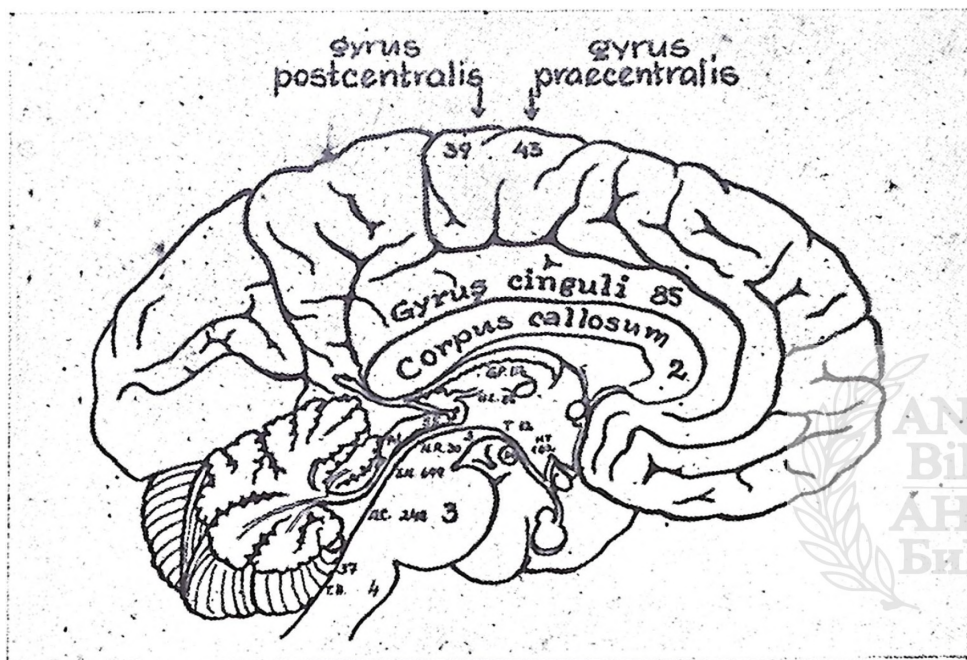
SP je termostabilna u kiselom mediju, topiva je u vodi, dijalizira kroz celofanske i koloidne membrane, prilično je otporna prema autolizi. Tkivo iz kojeg vadimo SP može i 24 sata stajati pri sobnoj temperaturi, a da ne gubi na aktivnosti. Arvidsson, Pernov i Swedin (34) izolirali su iz konjskog bubrega i ferment koji inaktivira SP, a mogli su ga odijeliti od histaminaze (Nečista histaminaza, naime, isto razara SP). U vezi s tim htjeli bismo spomenuti da je Krivoj (35) pokazao da LSD inhibira jedan ferment koji razara SP. Da li je to isti ferment koji su našli Ariksson i saradnici ili nije, zasada nije poznato. Eber i Lembeck (36) su našli također da bubreg vanredno brzo razara SP, ali su pokazali da je i drugi organi razaraju, ali slabije. Oni su upotrebljavali sirove ekstrakte organa. Interesantno je da je CNS bio vrlo malo aktivan.

Već smo rekli da se SP određuje na izoliranom ileumu zamorca uz dodatak 10—7 atropina, 10—7 antihistaminika i 10—7 triptamina. Time se sprečava interferencija sa eventualno prisutnim Ach, histaminom ili 5 HT. Temperatura treba biti 38° C. Interesantno je da crijevo pokazuje sezonske varijacije, ono je najosjetljivije u jesen, a najmanje osjetljivo uproljeće. Crevo bez O₂ (37) brže postaje neosjetljivo za SP nego za druge aktivne supstance.

Raspodjela SP u organizmu.

SP dolazi uglavnom u crijevu, CNS i perifernom nervnom sistemu. Mi ćemo se ovdje osvrnuti samo na raspodjelu u CNS, jer je ona za nas od osobite važnosti. Potrebno je naglasiti da je SP iz probavnog trakta potpuno identična sa onom iz CNS, što je Pernow (17 b, c) uspio dokazati, pomoću papirnatih kromatografija. Ovo je važno jer kad se eksperimentira sa SP irelevantno je kojeg je ona porijekla.

Slika I



Presjek mozga
Vrijednosti supstance P
unesene prema Zetleru.

Iz slike I. vidimo raspored SP u CNS kako ju je dao Zettler (38). Te su vrednosti korigirane u odnosu na one vrednosti što su dali Lembeck (39), Kopera i Lazarini (40), jer su odbijene vrednosti 5 HT. Kako vidimo iz slike i tabele, vanredno varira raspored SP u CNS. Kora je sadrži vrlo malo, a osobito je mnogo ima u t. zv. formatio reticularis i uopće u bazalnim ganglijama. Zettler (41) je svojom analizom pokazao da regije bogate na holinacetilazi sadrže malo SP i obrnuto. To je od osobite važnosti za razumijevanje funkcije i transmitora u CNS. Znamo iz rada Vogtove (3) da u tim predjelima dolazi vrlo bogato i adrenalin i 5 HT.

Prije 4 godine saradnici Instituta za farmakologiju u Grazu, Kopera i Lazarini (40) s jedne strane, te Lembeck (39) s druge strane, objavili su dva rada o SP, u počast Ottu Loewiu, nekadašnjem šefu tog Instituta i otkrivaču transmitornih supstanci u autonomnom nervnom

sistemu. To je dalo povoda da se naučnici više pozabave tom materijom. Do onda se znalo da ona dolazi u CNS, ali se nije znala njezina prava funkcija. Oni su prvi ukazali na mogućnost da SP igra funkciju prenosne supstance u CNS, upravo na temelju njezine karakteristične raspodjele u CNS. Lembeck je upozorio da dorzalni koreni medule spinalis sadrže neuporedivo više SP nego ventralni i postavlja pitanje da li SP ne igra ulogu kao prenosna supstanca prvog senzibiliziranog neurona, što su potvrdili Amin i saradnici (42). 1956 godine je Zettler (38) objavio jedan rad, gdje je ukazao na važnu funkciju SP u CNS. Njemu je uspjelo pokazati da SP djeluje sedativno i da djeluje antagonistički na ekscitatore CNS-a (harmin, strihnin, pikrotoksin, pervitin i morfin). SP pojačava na miševima centralne efekte evipana i bulbokapnina. SP uzrokuje hiperalgeziju, ali sprečava uslijed morfija. SP djeluje antagonistički na inhibitornu funkciju morfija, na centar za disanje. Iz svega toga zaključuje Zettler da SP ima neku fiziološku ulogu u CNS i to kao transmitsorna supstanca inhibitornih i senzibilnih neurona. On postavlja pitanje da li SP ne igra ulogu u CNS kod funkcije analgetika i privikavanja na morfij (2).

Vlastiti eksperimenti.

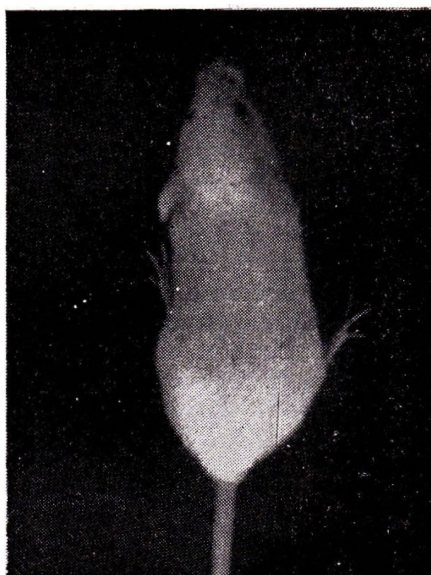
Studirajući spomenuti rad Zettlera, nama je upalo u oči da SP djeluje vrlo slično mefenezinu (43) (MF). MF je farmakum koji djeluje prvenstveno na medulu spinalis, uklanjajući strihninske grčeve (44). Naoko on djeluje kao curare, ali mu je mehanizam djelovanja posve drukčiji, jer ne djeluje na motornu ploču, nego na motorne stanice prednjeg roga medule spinalis. Osim toga on djeluje na formatio reticularis (45) i ima izrazito trankvilizirajuće djelovanje (46), iako slabije nego meprobramat (MB), čiji je on prethodnik (47). Iz tog razloga mi smo postavili pitanje da li SP i MF ne djeluju sinergistički. Kasnije smo to pitanje proširili i na klasični trankvilans MB (48). Mi smo usporedili efekte SP na CNS, kako ih je objavio Zettler, sa onima koji su već bili opisani za MF. Kako se vidi iz tabele, stvarno postoji jedan izraziti sinergizam. Tako jedna i druga supstanca djeluju sedativno, sprečavaju strihninske grčeve, vrlo su slabe protiv kardijazolskog i elektro-šoka, uklanjaju psihomotorni nemir uslijed morfija i produbljuju evfpanšku narkozu. Kod ove usporedbe pokazalo se, da bi slika bila kompletnija, da treba izvesti još neke eksperimente koji nisu izvedeni sa SP, da bi se mogli usporediti sa MF, i obrnuto, trebalo je izvesti takove eksperimente koji su izvedeni sa SP, a nisu sa MF.

Mi smo zbog toga najprije izveli eksperimente sa tetanustoksinom (49), jer je već bilo poznato da se MF sa uspjehom upotrebljava protiv tetanusa (50). Ovo je bilo utoliko više potrebno jer je Lembeck (39), kako smo rekli, pokazao da bi SP mogla biti prenosna supstanca prvog senzibilnog neurona. U pokusu je bilo 30 miševa, težine 20 g., od kojih je 15 služilo za kontrolu. Svi su primili tetanustoksin i. m. Dlm našeg tetanustoksina je bila 0,76 γ na miša.). 15 miševa primilo je 48 sati nakon primanja tetanus toksina (1 γ na miša), oko 30 jed. SP). 30—60 min. nakon davanja SP miševi su bili mnogo mirniji, grčevi vrlo slabo izraženi. To se vrlo lijepo vidi ako se miš objesi za rep. Skolioza na onu stranu na koju je injiciran tetanustoksin kod kontrola je mnogo jače izražen nego kod životinja koje su dobile SP.

Slika II



Lijevo: Miš koji je dobio tetanus-toxin. Konakavitet skolioze okrenut na stranu u koju je injiciran toksin.



Desno: Miš otrovan tetanustoxinom 15 min. iza supstance P. Skolioza mnogo slabije izražena. Ekstremitet u koji je injiciran toxin više privučen tijelu.

Ekstremitet u koji je dat tetanustoksin mogao se opet upotrebljavati. Ovi eksperimenti su daljni dokaz sinergizma SP i MF i dokaz su inhibitorne transitorne funkcije ove supstance. Vrlo je interesantno ovdje naglasiti da su Brooks i saradnici (51) pokazali da strihnin i tetanustoksin djeluju na isti način u meduli spinalis, potiskujući sve sinaptičke mehanizme.

Nedavno smo mogli pokazati da SKF 525 A (diethylaminoethyl-diphenylpropilacetat) potencira djelovanje SP (52). Za ovaj spoj znamo da prolongira mnoga neurotropna farmaka (53). Miš koji je primio 30 jed. SP miruje oko 75 min., a ako dobije 15 min. prije toga SKF 525 A, 50 mg/kg, miruje do 3 sata. Već prije je Maco (54) pokazao da i SKF 525 A pojačava djelovanje MF. Ovaj eksperiment također jasno ukazuje na neurotropnost SP.

Berger, otkrivač MF i MB, pokazao je da W 181 (1 -n- butylamino-3-p-toluidino-2-propanol) izaziva teške grčeve, koji se mogu potisnuti samo sa MF i nijednim drugim antikonvulzivnim sredstvom. Nama je uspjelo pokazati da i SP poput MF na miševima produžuje latentno vrijeme izbijanja grčeva izazvanih pomoću W 181 (48). Osim toga W 181 inhibira djelovanje SP na izoliranom crijevu zamorca. To doduše nije specifični efekat, jer inhibira isto tako djelovanje histamina, acethylcholina i 5 HT, ali je zbog toga od važnosti, jer druga analeptika, kao koframin, kardiazol i pikrotoksin, nisu imala takav efekat na crevo. Budući da je W 181 specifični antagonist MF, ovo je jedan odličan dokaz sinergizma SP i MF. Kad već spominjemo efekte SP i MF na crevu, spome-

nućemo i naše neobjavljene radove o djelovanju MF na SP. Mi smo se zapravo počeli baviti tom problematikom, misleći prije objava Zettle-rovog rada, a na temelju Lembeckovog otkrića o odnosu SP u stražnjem i prednjem korenu medule spinalis, da su SP i MF možda antagonisti. Brzo se pokazalo već na izoliranom crevu da nisu antagonisti nego vrlo često djeluju i sinergistički (56). U vrlo velikim koncentracijama 1:10.000 MF stvarno koči djelovanje SP na crevu. To bi se moglo možda rastumačiti time da SP i MF konkuriraju za isti receptor.

TABELA I

	Mefenezin	SP
Sedativni efekt	postoji	postoji
Striktni grčevi	uklanja	uklanja
Tetanustoksični grčevi	uklanja	uklanja
Heksobarbitalna narkoza	produžuje	produžuje
Kardiazolski grčevi	ne djeluje	slabo djeluje
Elektrošok grčevi	ne djeluje	ne djeluje
Pikrotoksin grčevi	produžuje latentno vrijeme	produžuje latentno vrijeme
Harminski tremor	sprečava	sprečava
Bulbokapninska katepsija	produžuje	produžuje
Psihomotorni nemir uzrokovan morfinom	smanjuje	smanjuje
Analgezija usljed morfija	uklanja	uklanja
Grčevi i smrt usljed W 181	produžuje latentno vrijeme	produžuje latentno vrijeme
Potenciranje sedacije usljed SKF 525 A	pojačava sedaciju	pojačava sedaciju
Uklidanje psihomotornog nemira uzrokovanog sa JDPN	uklanja	uklanja

Kako se vidi iz tabele, mi smo izveli još nekoliko eksperimenata da bismo dokazali spomenuti sinergizam. Tako smo mogli pokazati da MF produžuje latentno vrijeme potrebno za nastup pikrotoksinških grčeva i da smanjuje i harminski tremor. MF produžuje i bulbokapninsku katepsiju, a kasnije smo to mogli pokazati i za MB. Konačno mogli smo pokazati da MF inhibira analgetski efekat izazvan morfinom. Dakle, analizom 14 raznih farmakoloških procesa mogli smo pokazati da te dvije supstance, SP i MF, djeluju sinergistički. U pokusima sa bulbokapninom mogli smo čak dokazati da se djelovanje MF i SP sumira. Ako smo dali subdjelotvorne doze MF i subdjelotvorne doze SP zajedno potenciralo se trajanje bulbokapninske katepsije do 60 min., dok sa samom djelotvornom dozom MF ili SP djeluje oko 45 min.

Još smo izveli jedan veoma interesantan eksperiment, koji jasno govori za trankvilizirajući efekt SP. Nedavno su Thullier i Nakajima (57) pokazali da IDPN (Amino — β — diprophenitril) izaziva trajan i vanredno jak psihomotorni nemir kod miševa, koji se da ukloniti sa MF i MB. Mi (58) smo stvarno kod miševa izazvali takav nemir, dajući spomenutu supstancu. Kad je izbilo djelovanje, a to je peti ili šesti dan iza početka davanja IDPN, 20—80 jed./20 g miša, izazvalo je potpuno psihičko i motorno umirenje životinja. Kod malih doza trajalo je to otprilike 20 min., a kod velikih doza i čitav dan. Trankvilizirajući efekat SP u ovim pokusima bio je neobično impresivan.

Jedan daljni dokaz centralnog djelovanja SP je njegov efekt na nistagmus. Longo i Bovet (59) su pokazali na kunićima da MF inhibira horizontalni rotatorni nistagmus. Mi smo naše eksperimente izveli na miševima, okrećući ih uvijek u istom horizontalnom smjeru, po metodi koju su opisali Keller i saradnici (60), dajući im 20 do 30 jed. SP i. p. Nistagmus je bio izrazito inhibiran.

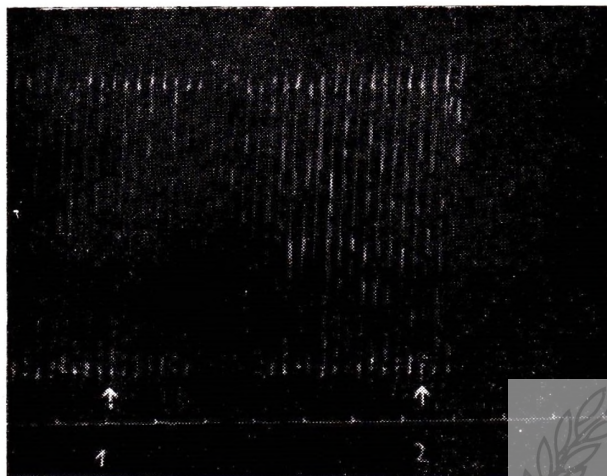
Unna i saradnici pokazali su da MF djeluje tako da inhibira polisinaptičke, a ostavlja nederirane monosinaptičke neurone (45). Oni su se poslužili Horsley-Clarkeovim (14) stereotaksičkim aparatom. Bilo je zato za nas od velike važnosti da li ovako djeluje i SP. Mi smo, kao i spomenuti autori, ispitivali upliv SP na monosinaptički i polisinaptički refleks na mačkama (61). Kako znamo, isto svojstvo ima i MB (47). Osim toga, kako smo rekli, i SP dolazi u meduli spinalis, specijalno u dorsalnim korenima (39, 42).

Metoda: Radili smo na mačkama tež. 2—3 kg. U početku eksperimenta životinje su narkotizirane eterom, uz umjetno disanje pomoću Starlingove pumpe. Obe karotide se podvežu, a vagusi prerežu. Vena iugularis se ispreparira i stavi u nju jedna kanila kroz koju se injicira željeni farmakum. Na desnoj stražnjoj nozi ispreparira se nervus opturatorius, tibialis, fibularis i safenus. Na lijevoj nozi opturatorius, femoralis i safenus. Sad se mačka dekorticira i obustavi se dovod etera. Ispreparirani nervi se po mogućnosti što centralnije prerežu, osim nervus tibialis i fibularisa, koji se prerežu što perifernije. Kroz oba epicondyla femoris jednim električnim svrdlom napravi se rupa u koju se uvuče jedna čelična žica, koja služi kao točka oko koje se okreće podkoljenica. Mačka se sada fiksira tako da visi obješena za kožu leđa i glave, a ekstremiteti slobodno vise u zraku. Nervi tibialis i fibularis spoje se sa platinskim elektrodama i refleksi se registruju pomoću Keith-Lucasove (62) poluge. Podražaje smo izazivali pomoću aparata za podraživanje po Becku i Frommelu (63), nakon što je mačka najmanje pola sata iza operacije mirovala. Frekvencija podražaja je bila 40/sek, a dužina impulsa 4,5 m/sek. Jačina podražaja 0,8 do 1,4 m. A. Nervi su bili podraživani svakih 30 sek. pomoću jednog automatskog prekidača, koji je bio uključen u krug struje. Na taj način mogli smo ispitati vrlo lijepo i homolateralni fleksorni refleks i kontralateralni ekstenzorni refleks. Kod ispitivanja monosinaptičkog patelnog refleksa upotrebili smo jedan automatski čekić, koji je izazvao refleks svakih 30 sek. Kod izazivanja patelnog refleksa uzimali smo i takve mačke koje nisu bile dekorticirane, nego narkotizirane pomoću chloralne (70 mg/kg) i. p. U tom slučaju životinje nisu dobile umjetno disanje.

Slika III



Lijevo: Mačka, polisinaptički refleks kontralateralni ekstenzorni gore, homolateralni dolje.
 1. Supstanca P. 500 jed.
 2. Nikotin bitartarat 500 kg.
 3. Nikotin bitartarat 500 kg.
 Vrijeme u minutama.



Desno: Mačka, monosinaptički patelarni refleks
 1. Supstanca P. 500 jed.
 2. Nikotin bitartarat 500 kg.
 Vrijeme 2 min.

Kako se vidi iz slika, SP u dozi od 500 jed. na životinju izaziva inhibiciju polisinaptičkih refleksa. U svim našim pokusima inhibicija homolateralnog fleksornog refleksa bila je jače izražena od inhibicije ekstenzornog kontralateralnog refleksa. Poznato je da nikotin pojačava polisinaptičke reflekse (64). Mogli smo pokazati da SP sprečava ovaj efekt nikotina. Patelarni monosinaptički refleks nije bio inhibiran pomoću SP ako smo je dali u istim dozama kao kod eksperimenata sa polisinaptičkim. Dakle isto kao kod MF i MB.

Mislimo da je time jasno dokazano da SP djeluje na sinaptičke ćelije u CNS i da se prema tome može smatrati fiziološkim transmittorom.

Budući da smo dobili ovakove rezultate sa neuvjetnim refleksima, bilo je interesantno ispitati i utjecaj SP na uvjetni refleks. Tu smo se poslužili metodom Courvoisiera i saradnika (65). Stavimo li štakora na pod na kojem je žičana mreža, da ga možemo podražiti strujom, i istovremeno stavimo u pogon jedno zvonce, štakor će pobjeći penjući se uz jedan štap, koji je u sredini poda, pod krov kutije gdje ne može da

bude elektriziran. Brzo se razvio uvjetni refleks, tako da štakor bježi na ono povišeno neopasno mjesto, samo uz zvuk zvonca. Ako smo takovim štakorima (tež. 100—150 g.) dali i. p. 60 mg. SP, t. j. oko 200 jed. štakor je bio vrlo miran, ali je uvjetni refleks ostao održan.

Mi smo ispitivali i višu nervnu djelatnost štakora uz SP, budući da je to jedna trankvilizirajuća supstanca. Poslužili smo se t. zv. »Irgartnom« (66). Princip metode je sljedeći: štakoru se napravi jedan komplicirani put do hrane. Na tom putu ima mnogo sporednih slijepih puteva. Gladan štakor brzo nauči da dođe najkraćim putem do hrane, ne skretajući u slijepo puteve. Ako smo takvim štakorima davali SP isto u dozi od oko 200 jed., oni su bez daljnjeg znali naći najbrži put do hrane, iako su bili vrlo mirni.

SP sprečava i bljuvanje goluba, izazvano digitalisom, isto kao i MF (67). Ovaj nalaz je osobito interesantan zato jer area postrema, kako znamo, sadrži najviše SP u CNS uopće, 42,68 i odgovorna je kao »trigger zona« za refleks bljuvanja (69,70). Ako se sjetimo maloprije opisanih eksperimenata sa nistagmusom, nameće se sama od sebe potreba da se SP ispita kod vertiga i morske bolesti.

Zbog svih ovih centralnih efekata mi smo postavili pitanje, da li SP ulazi u mozak. To je od bitne važnosti za tumačenje mehanizma djelovanja SP i analize svih ovih eksperimenata koje smo izveli mi ili drugi autori. Stvarno, uspjelo nam je pokazati da ako štakoru damo oko 150 jed. SP i. p. na 100 g., da se količina SP u mozgu štakora za najmanje dvostruko povećava (71) 2—3h iza injekcije (normalno štakor ima oko 12—16 jed. na grma mozga) 24h iza injekcije SP je opet normalna količina SP u mozgu. Osim toga SP sprečava strihninske grčeve na mišu, što je pokazao Zettler (38), a mi smo to isto mogli dokazati na štakoru (72). I to je dokaz ulaska SP u CNS.

Razvijajući dalje svoju tezu o funkciji SP u prenosu sensiblnog podražaja, Lembeck (73) je izveo jedan vrlo važan eksperiment. Poslužio se preparatom Mirzojana i Doblatijana (74). Uho zeca, koje je spojeno sa tijelom još samo pomoću n. auricularisa, koji je čisto senzibilni nerv, perfundira se kroz a. auricularis toplom Tyrodovom otopinom koja izlazi kroz venu uha. Neke supstance, napr. Ach, podraže senzibilne okončine nerva i to se odražava u padu krvnog tlaka. SP izaziva isto pad krvnog tlaka. Mi smo pokušali i uticaj MF na taj preparat, ali nismo dobili pad krvnog tlaka. To je i jedini eksperiment gdje nismo mogli potvrditi sinergistički efekat SP i MF. U tom svom radu Lembeck dolazi do zaključka da SP djeluje pošve drukčije nego sinaptotropna farmaka. Ali sinaptotropno djelovanje je jedino specijalno djelovanje koje imaju sva neurotropna farmaka. To naglašavamo zato jer smatramo da je neurotropni efekat SP i MF isti, iako se u ovom pokusu nije mogao pokazati. Zato se mi ne slažemo sa mišljenjem Lembecka (73) iznesenim baš u tom radu, da je djelovanje SP potpuno drukčije nego ono sinaptotropika, što slijedi i iz pokusa sa polisinaptičkim refleksima.

Konačno izveli smo još jedan eksperiment, koji nam se čini od najveće (71,75) vrednosti. Paasonen i Vogt (68) te Zettler (20), a i mi izveli smo eksperimente, pokušajući uticati na aktivitet CNS sa raznim farmacima koji izazivaju ekscitaciju ili djeluju sedativno. Kako ćemo vidjeti iz diskusije, ti su rezultati veoma kontradiktorni i onemogućuju zasad bio kakav zaključak o stanju organa, t.j. CNS i količine SP.

Zato smo pokušali izvesti jedan prirodni podražaj na jedan nervni organ, a ne farmakološki. Poznato je da i retina sadrži SP (76). Mi smo kravama zamračili jedno oko, a drugo je ostalo slobodno. Iza 90—120 min. krave su ubijene i oba oka izvađena. I u retini zamračenog i nezamračenog oka odredili smo SP. Normalna retina goveda sadži oko 2 jed. SP na g. svježeg tkiva. Dunerovi podaci se odnose na suhi ostatak (76). Redovno smo našli u retini zamračenog oka do 100% više SP, nego u nezamračenom. Ovo bi se slagalo sa Zettlerovim nalazom da podražaj CNS povećava SP u tom organu. Mi možemo zasada postavljati samo hipoteze u vezi s tim nalazom. SP je odgovorna za senzibilni podražaj, a možda nakupljanje SP u retini omogućava bolje primanje svjetlosnih podražaja u tami, ili možda uklanja neke inhibitorne mehanizme koje donosi svjetlo. Daljnji eksperimenti su pokazali da svjetlo smanjuje SP u retini.

Rekli smo da je Krivoy našao da LSD 25 inhibira ferment koji razara SP. Apter i Pfeiffer (77) misle da LSD djeluje preko retine i da nema halucinacija sa LSD bez oka. Kod slijepaca LSD 25 ne djeluje halucinogeno. Ovo je vanredno interesantno i našem nalazu da tama povećava SP u oku daje posve novo značenje.

Diskusija

Naveli smo jedan niz eksperimenata vlastitih i drugih autora, izvedenih sa SP, zapravo sve što je do danas učinjeno s tim polipeptidom. Radi se o eksperimentima u zadnje 4 godine. Možemo reći da mnogo starija nije ni era psihofarmaka, misleći pri tom prvenstveno na hloropromazin, hydroxyzin, MB i reserpin, te u vezi s tim na funkciju 5 HT. SP dolazi prvenstveno u srednjem mozgu i formatio reticularis, gdje dolazi vrlo bogato i simpstin i HT (3).

Karakteristično je za raspodjelu SP da vrlo bliske regije CNS sadrže vrlo različite količine SP, (29) bez obzira da li se radi o predjelima sa više motornom ili senzornom funkcijom. Već smo rekli da gdje ima mnogo holinacetilaze, koja je izraz intenziteta funkcije Ach u jednom predjelu u toj regiji, dolazi malo SP i obrnuto (41). Kopera i Lazarini našli su da dijelovi bogati na SP pokazuju slabu potrošnju kisika, a oni bogati na Ach troše više kisika (40). Što je fiziološka uloga ovog polipeptida, teško je reći sa sigurnošću, ali je vrlo vjerojatno da on djeluje kao transmitorna supstanca pored drugih biogenih amina i polipeptida. Mi se potpuno slažemo sa Zettlerovom teorijom na temelju njegovih vlastitih eksperimenata, da SP djeluje kod prenosa podražaja inhibitornih sistema u CNS i kod prenosa senzibilnih podražaja. Mi mislimo da to ne mora biti samo u prvom senzibilnom neuronu, što je pokazao Lembeck, (39) nego i u višim formacijama. Od osobite je važnosti za naše razmatranje nalaz Angelucia (78), koji je pokazao da se SP luči kod prefuzije medule spinalis žabe, pored Ach i 5 HT (On doduše nije našao da SP pojačava kod žabe fleksorni refleks, ako se doda perfuzionoj tekućini, ali se naglašava da to ne isključuje mogućnost da ona sudjeluje u mehanizmu refleksa. To nije čak mogao dokazati za 5HT, za koji znamo sigurno da utiče na sinaptičke mehanizme) (79). Svi pokusi govore zato da SP djeluje inhibitoryno u tom smislu, da poput MF i MB pojačava one funkcije u CNS koje inhibiraju motoričke funkcije na-

pr. bulbokapnin, produljenje evipanske narkoze, opće sedativno djelovanje itd. a sprečava ekscitatorna farmaka (strihnim, tetatunstoksin, pikrotoksin, harmin, W 181 i td.). Ovi naši rezultati se odlično poklapaju sa onima koje su dobili Euler i Pernov (80) kod injiciranja vrlo čiste SP intracisternalno. Glavni efekt je bio inhibicija spontanosti, što jasno govori za trankvilizirajuće djelovanje SP. Svi naši eksperimenti potvrđuju sinergizam MF i SP, te MB, koji je klasični trankvilans, a za koje znamo da djeluje u razini formatio reticularis, uklanjajući njen fascilatorni i inhibitorni mehanizam. Ovo područje odgovorno je i za duševne funkcije (81). S tim u vezi interesantni su radovi sa MF kod divljih zečeva (48). Poznato je da divlji zec, ako ga zatvorimo u kavez, od straha dobiva Basedow (82). Mi smo mogli pokazati da MF to može potpuno sprečiti, čak jače od hlorpromazina (83) i reserpina (84). Životinja se ponaša kao pitomi kunić i može se nositi na rukama. Pita se u prvom redu da li SP nije smanjena kod divljih zečeva. To ćemo pokušati da ispitamo. Ali isto tako se pita koju ulogu SP ima kod duševnih bolesti, ako je ona fiziološki trankvilans. To pitanje mi postavljamo zato jer MF i MB utječu povoljno na tok duševnih oboljenja (1) a pokazali smo da su sinergisti sa SP. Prema najnovijim istraživanjima izgleda da SP ili jedan faktor koji dolazi u njoj utječe na regulaciju lučenja ACTH (85). Ako gojimo in vitro hipofizu, ona će naskoro prestati sa lučenjem ACTH, međutim ako joj dodamo tkivo hipotalamusa, ono će u takvom mediju sama početi da raste i nešto će lučiti, što omogućava ponovno stvaranje ACTH. Tkivo kore, naprimjer, nije u stanju potstaknuti stvaranje ACTH. U medijumu u kojem je rasla hipofiza sa hipotalamusom nije se mogao dokazati nijedan biogeni amin, pa ni oksitocin i vasopresin. Vrlo vjerovatno se tu radi o SP. Time bi uloga SP postala zaista vrlo važna i mogli bismo protumačiti funkciju SP, MF i MB kod duševnih bolesti. Znamo da skupljanje ACTH u Hirnstamu sprečava osjet straha (86), a MB sinergist SP zovu »pilule sreće«. Interesantno je da SP ne djeluje na višu nervnu djelatnost kod štakora pa ni na uvjetni refleks, a to se slaže sa farmakološkim osobinama MF i MB, koji u terapijskim dozama ne utječu na spomenute funkcije kod čovjeka (87).

Rekli smo da adrenohrom izaziva teške duševne poremećaje, što se pokušalo dovesti u vezu sa njegovom indolskom konstitucijom. Mi smo stvarno mogli pokazati da adrenohrom inhibira i djelovanje 5 HT i SP (88). Krivoy (35) je pokazao da LSD, koji sam izaziva teške psihičke poremećaje kod ljudi, sprečava razaranja SP. To je doduše teško dovesti u vezu sa trankvilizirajućim efektom SP, ali ukazuje na činjenicu da SP djeluje u CNS kod duševnih zbivanja. Euforija koju izaziva LSD je svakako suprotni fenomen od straha.

Konačno mi smo rekli da SP inhibira bljuvanje izazvano digitalisom, kod goluba, a znamo da upravo area postrema (t. zv. trigger zona), odgovorna za refleks bljuvanja (69), sadrži enormne količine (42, 68) SP. Ovi pokusi sa onima koje smo izveli na mišu, a koji pokazuju da SP uklanja nistagmus, govore jasno za sudjelovanje SP i kod ekstrapiramidalnih funkcija, koje su opet u vezi sa postankom spazma, za koje smo rekli da SP uklanja (38, 56).

U svom zadnjem radu, isto veoma interesantnom, pokušao je Zettler ispitati utjecaj nekih narkotika i nekih ekscitancija na sadržaj SP u mozgu miša. On je upotrijebio pikrotoksin, amfetamin, morfij i LSD, te hloroform, uretan i luminalnatrium. Došao je do općeg zaključka da centralna ekscitancija povećavaju SP u mozgu miša, a narkotika smanjuju. U našem Institutu napr. našli smo da cardiazol smanjuje SP u mozgu štakora. Paasonen i Vogt (68) nisu našli nikakav utjecaj na količinu SP u hipotalamusu i nucleus caudatusu psa, sa amfetaminom, efedrinom, inzulinom, cofeinom, eterom i reserpinom. Neka od tih farmaka (amfetamin i reserpin) smanjivala su 5 HT (68). Prema tome, ovi rezultati Zettlera, Paasonena i Vogta, te naši, zasada ne dozvoljavaju da se postavi jedno generalno pravilo kako utiče aktivitet CNS na koncentraciju SP. Nama se čini osobito važno to da morfij povećava SP u mozgu zato jer je on interneuronski otrov, s istim efektom kao i MF. No i za barbiturate je to poznato, ali za njih Zettler (89) spominje obrnuto nego za morfij. Oni smanjuju SP u mozgu miša.

Ako smijemo usporediti podražaj izveden farmacima na CNS, s onim svjetlosnim podražajem na retinu, onda bi to ipak govorilo za to da centralna ekscitancija povećavaju, a narkotika smanjuju SP u mozgu. To može biti uzrok ekscitacije, ali i posljedica. Ako je to uzrok, onda bi to značilo da skupljanja SP aktivacijom inhibitornog mehanizma izaziva neki podražaj retine. Ako je posljedica, onda bi to mogao biti i kompenzatorni mehanizam. Zettler (20) upozorava da SP kao polipeptid može da bude isto brzo metaboliziran, kao i inače bjelančevine u CNS.

Berger (87) je podijelio trankvilancije s obzirom na njihov mehanizam djelovanja na dvije grupe. I. takozvane autonomne depresore i II. centralne relaksancije. U prvu grupu spadaju derivati phenotiazina, reserpin i derivati dyphenilmetana, a u drugu derivati propandiola, kao MF i MB i glycetal. Prva grupa antagonizira Ach, histamin i 5 HT, koji sigurno imaju udjela u psihičkim funkcijama, inhibiraju uvjetni refleks i višu nervnu djelatnost (memorija, učenje), povećavaju toksicitet strihni-na, agresivne životinje čine pitomim, ali už gubitak interesa za okolinu i gubitak inicijativa, itd. Derivati propandiola djeluju drukčije. Ne utječu na autonomne funkcije, smanjuju strihinske grčeve. Životinje i čovjek se umire, ali interes za okolinu ostaje održan, kao i intelektualne funkcije. Sprečavaju strihinske grčeve, a ne sprečavaju uvjetni refleks. Berger je to skupio u jednoj tabeli koju mi donosimo, s time da smo dodali i treću kolonu koja pretstavlja kvalitete SP. Vidimo potpuno podudaranje druge kolone, t.j. pretstavnika propandiola, a specijalno tu mislimo MB sa SP.

Teško je staviti pod jedan nazivnik sve ove fenomene koje je u stanju izazvati SP, ali je činjenica da ona djeluje trankvilizirajući na motorne i psihičke funkcije. Ovaj njen efekat najljepše smo mogli demonstrirati pomoću IDPN. SP stvarno ulazi u CNS, kako smo to mogli pokazati i prema tome sve te efekte koje smo izveli mi ili drugi autori moramo pripisati njezinom centralnom efektu. Spomenuti pokus Eulera i Pernova (80) sa intracisternalnim injekcijama SP to samo potvrđuje. Imamo dakle pred sobom jednu interesantnu fiziološku materiju, koja nam daje velike mogućnosti za daljnje ispitivanje fiziologije i patofiziologije nervnih i duševnih funkcija.

TABELA II
Razlika između dvije grupe trankvilancija i SP.

Vrsta akcije	Autonomni supresori	Centralni relaksansi	SP
Adrenalično djelovanje	postoji	ne djeluje	neispitano
Antiholinergično djelovanje	postoji	ne djeluje	ne djeluje
Antihistaminsko djelovanje	postoji	ne djeluje	ne djeluje
Toksičnost strihnina	pojačan	smanjen	smanjen
Sinergizam sa heksobarbitalom	izrazit	postoji	postoji
Uvjetni refleksi	oslabljen	nepromijenjen	nepromijenjen
Mijenjanje EEG	generaliziran	lokaliziran	neispitan
Prag grčeva	oslabljen	povišen	povišen
Polisnaptički refleksi	bez efekta	oslabljen	oslabljen
Afterdischarges*)	bez efekta	oslabljen	neispitan
Spazam mišića	bez efekta	otpušta	otpušta

Nužno se postavlja zahtjev da se nastave ovi eksperimenti prvenstveno sa prečišćenom supstancom, ako je moguće i na ljudima, i da se odredi da li je SP jedinstvena supstanca ili ima u njoj više komponenata. Mislimo da se može kod takovih eksperimenata dobiti mnogo jasniji i definitivniji odgovor. Jedno nam se zasada čini sigurno, a to je da je SP fiziološki trankvilans.

Z a k l j u č a k

Problem prenosa podražaja u CNS veoma je kompliciran u odnosu na periferni i autonomni nervni sistem. Kompliciranost organa usljed anatomske građe ne dozvoljava nam izvesti onako jednostavne eksperimente kao na autonomnom nervnom sistemu, pa su istraživanja na tom sektoru veoma teška. Rezultati su manje jasni i teže ih je interpretirati. Za primjer se navode slične eksperimentalne metode koje nam služe za istraživanje na perifernom nervnom sistemu (perfuzija ganglija, rad na jednom aksonskom vlaknu, rad na samoj motornoj ploči itd.) Na CNS je tako nešto nemoguće. Uspjelo nam je čak pokazati da u perifernom i autonomnom nervnom sistemu postoji potpuni »red« što se tiče teoretski mogućih kombinacija holinergičnih i adrenergičnih neurona. Upozorava se da pored drugih metoda osobitu važnost za ispitivanje

*) je naknadno ispražnjavanje simpatičkog ganglija nakon prestanka draženja preganglionarnog neurona (Howell's Textbook of Physiology 15. izdanje 1946).

CNS ima Horsley-Clarkeov aparat, pa moderne biokemijske metode, elektroencefalografija itd. Nove biokemijske metode dale su velike rezultate zadnjih nekoliko godina, specijalno u istraživanju funkcije biogenih amina. Biogeni amini koji dolaze na periferiji dolaze i u CNS (Ach, adrenalin, noradrenalin 5 HT, histamin, butiril holin). Iz te činjenice kao i iz nekih drugih zaključuje se da su oni isto transmitori u CNS kao i na periferiji. Samo sa Ach ne može se rastumačiti silna raznolikost prenosa podražaja u CNS. Pored biogenih amina dolaze u obzir kao transmittorne supstance polipeptidi, SP i Floreyeva supstanca i vjerojatno neki drugi, a možda i neki liponukleotidi. Ovako veliki broj transmittora omogućava enormni broj varijacija, odnosno kombinacija. To se još više povećava ako uzmemo u obzir da svaka supstanca može da djeluje ekscitatorno i inhibitorno. Osim toga, imamo puteve koji se prekidaju jedan ili više puta, pa broj varijacija raznih transmittora u jednom moždanom putu još više raste. To je i potrebno pretpostaviti u CNS. To su samo one supstance koje poznajemo. Sigurno još ima i takvih za koje danas ne znamo.

Teško je u jednom referatu obuhvatiti sve nabrojene transmittore. Zato se u ovom referatu iznosi samo današnje gledanje na polipeptid, zvan »Supstanca P«, jer smo u zadnje vrijeme sami mnogo radili s njom. Iznose se opća svojstva »Supstance P«, njena izolacija u većim količinama i iz malih količina tkiva, njena fiziološka i farmakološka svojstva, testiranje i raspodjela, specijalno u CNS. Upozorava se da dolazi vrlo bogato u bazalnim ganglijima i u formatii reticularis i to često jedna regija sadrži mnogo, a već susjedna vrlo malo. To govori za njenu transmittornu funkciju. Ona ne interferira sa histaminom, adrenalinom i 5 HT. SP je poznata već preko 25 godina, ali tek objavljivanjem rada Pernova i Lembecka 1953 g i Zettlera 1956 saznali smo nešto više o njevoj funkciji. Lembeck je prvi ukazao da ona dolazi veoma mnogo u dorzalnim korijenima medule spinalis i da valjda ima transmittornu funkciju u prvom sensibilnom neuronu, a Zettler je pokazao da sudjeluje u CNS kao transmittorna supstanca nekih inhibitornih sistema. On je izveo niz eksperimenata sa SP, ispitavši njen odnos prema raznim neurotrofnim farmacima. Palo nam je u oči da postoji velika sličnost između svojstva mefenezina (jednog odličnog sredstva za relaksaciju muskulature) i svojstva SP, kako ih je prikazao Zettler. On je napr. našao da SP djeluje sedativno, sprečava strihninske grčeve, produljuje evipansku narkozu, produljuje latenciju nastupa pikrotoksinskih grčeva itd. Da bismo kompletirali ovu sliku, mi smo izveli one eksperimente koje Zettler nije izveo sa SP, a bili su izvedeni sa mefenezinom i obrnuto, one eksperimente koji nisu bili izvedeni, sa mefenezinom a Zettler ih je izveo sa SP. Tako smo mogli pokazati da SP smanjuje grčeve izazvane tetanustoksinom i grčeve izazvane sa W 181. Znamo da strihnin i tetanustoksin djeluju na isti način. Sprečavanje grčeva izazvanih sa W 181 govori za sinergizam SP i mefenezina već i zato jer je prema Bergeru mefenezin jedini antikonvulzivni farmakum koji sprečava konvulzije izazvane sa W 181. Mi smo kasnije pokazali da mefenezin sprečava i tremor izazvan harminom i katepsiju izazvanu bulbokapninom i da uklanjanje analgetički efekt izazvan morfijem. Konačno smo izveli i eksperimente iz kojih se vidi da SKF 525 A, koji prolongira i potencira djelovanje mnogih neurotrofnih farmaka prolongira i djelovanje SP. IDNH,

jedno sredstvo koje izaziva vanredno jaki psihomotorni nemir, da se ukloniti i pomoću supstance P. Kako se vidi iz tabele četrnaest raznih eksperimenata izvedenih sa mefenezinom daju se izvesti i sa supstancom P. To apsolutno govori za sinergizam supstance P i mefenezina. Kasnije smo te eksperimente komparirali sa meprobamatom, klasičnim trankvilansom. I on u ogromnom broju slučajeva pokazuje sinergizam sa supstancom P. Budući da mefenezin i meproamat ne uklanjaju monosinaptičke reflekse, a djeluju na polisinaptičke, pokušali smo i ovdje povući paralelu. Pokazalo se stvarno da ako izazovemo na decereoriranoj mački polisinaptičke reflekse (homolateralni fleksorni i kontralateralni ekstenzorni), supstanca P ih uklanja, dok monosinaptičke patelarne ne uklanja. Isto tako supstanca P inhibira pojačavajuće djelovanje nikotina na polisinaptičke reflekse. Osim ovih bezuvjetnih refleksa izveli smo i eksperimente sa uvjetnim refleksom kod štakora (podražaj struje uz zvuk zvonca). Pokazalo se da supstanca P ne djeluje na uvjetni refleks. Isto tako mogli smo pokazati da supstanca P ne utiče na višu nervnu djelatnost kod štakora, što je bilo dokazano u t. zv. »irgartnu«. Supstanca P, poput mefenezina, uklanja bljuvanje kod goluba izazvanog digitalisom. To je od interesa zato jer area postrema sadrži vrlo mnogo supstance P, a za nju znamo da je t. zv. receptorna zona za refleks bljuvanja. Nismo mogli pokazati da postoji sinergizam supstance P i mefenezina jedino na perifernom aferentnom sensibilnom impulsu na uhu zeca, kako je to za supstancu P mogao pokazati Lembeck. Pokazalo se da supstanca P uklanja rotatorni nistagmus na mišu, što je poznato i za mefenezin. Neki autori pokušali su ispitati koncentracije supstance P, dajući razna farmaka koja ekscitiraju ili djeluju sedativno na CNS. Rezultati su zasada dijelom kontradiktorni i ne dozvoljavaju nikakve općenite zaključke. Zbog toga smo izveli podražaj na jedan nervni organ na drugi način. Pokazalo se da u zamračenom oku krave dolazi do skupljanja supstance P. Ovo je vrlo interesantno u vezi sa nalazom Krivoya da LSD inhibira jedan ferment koji razara supstancu P. S druge strane Pfeiffer misli da LSD djeluje samo periferno preko oka, jer kod slijepaca ne izaziva halucinacije.

Ovi svi efekti idu stvarno na račun djelovanja supstance P u CNS, jer smo mogli dokazati povišenje supstance P u mozgu štakora iza davanja većih doza intraperitonealno.

Prikazano je prema tome današnje stanje fiziologije i farmakologije supstance P. Potvrđuju se rezultati Lembecka i Zettlera. Velika je vjerojatnost da je ona transmitorna supstanca u CNS. Uglavnom djeluje podražavajući inhibitorne mehanizme. To se poklapa sa nalazom Perova i Eulera, da čista supstanca P dana intracisternalno izaziva inhibiciju spontanosti. Pokazano je na velikom broju eksperimenata da postoji sinergizam između supstance P, mefenezina i meprobamata i da se prema tomu radi o jednom fiziološkom trankvilansu. Zbog toga se postavlja pitanje kako bi ona utjecala na tok duševnih bolesti. To pitanje je utoliko interesantnije što smo već pokazali da mefenzin odlično umiruje divljeg zeca i jer postoji pretpostavka da bi supstanca P mogla biti ona tvar koja je odgovorna za lučenje ACTH, a znamo da skupljanje ACTH u hipotalamusu dovodi do otklanjanja osjeta straha. Berger je podijelio trankvilancije na dvije velike grupe. U jednu, t.zv. grupu autonomnih suppresora, spadaju derivati chlorpromazna, diphenyemetana i reserpin.

U drugu grupu, t.zv. centralnih relaksancija, spadaju derivati propan-diola, dakle meprobramat i mefenezin. On ih je sredio u jednoj tabeli i pokazao je, u čemu sve ove dvije grupe diferiraju. Mi smo u tabelu dali treću kolonu, koja označuje supstancu P i opet našli potpunu analogiju, t. j. supstanca P i centralni relaksans su sinergisti. Teško je danas uopće dati mišljenje o supstanci P. Dalji eksperimenti, specijalno sa pročišćenom supstancom i pomoću modernijih metoda, pa i na ljudima, daće sigurno brzo nove podatke. Zasada možemo reći da se radi o jednom neurotropnom agensu, koji vrlo vjerovatno možemo smatrati fiziološkim trankvilansom.

(Farmakološki institut Medicinskog fakulteta u Sarajevu)

P. STERN, ON TRANSMISSION OF STIMULI IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM WITH SPECIAL REFERENCES TO SUBSTANCE P.

S U M M A R Y

Transmission of stimuli in the central nervous system in relation to the peripheral and autonomic nervous systems presents serious difficulties to the research worker trying to solve this highly complicated problem. Because of the very complex nature of the organs concerned owing to their anatomic structure we are precluded from making any simple experiments, such as those regarding the autonomic nervous system, which makes research work in this field most difficult. Hence, the results obtained are as a rule not clear enough to allow of any definite interpretation.

To illustrate the point reference is made to similar experimental methods used in research work about the peripheral nervous system (perfusion of ganglia, work on axonal fibres and the end-plate, etc.). Any application of such methods to the central nervous system would obviously be impossible. Indeed, we were entirely successful in demonstrating the existence of a complete »order« in the peripheral and anatomic systems as regards the theoretically possible combinations of holinergetic and adrenergic neurons.

Among other methods and techniques used in research work concerned with the central nervous system, attention is drawn to the great value of Horsley-Clarke apparatus and to the importance of modern biochemical methods, electroencephalography, etc. Novel biochemical methods have produced great results, especially as regards the function of biogenous amines. The latter peripheral amines are also to be found in the central nervous system (Ach, adrenaline, noradrenaline 5 HT, histamine, butyryl choline). This fact, and many others as well, leads to the conclusion that the latter substances are transmitters in the central nervous system and in the periphery alike. The extreme diversity and multiplicity of transmission of stimuli in the central nervous system cannot be accounted for by Ach alone. In addition to biogenous amines, due consideration should be given to polypeptides, SP, and Florey's substance as possible transmitters, and to some other substance as well, including lipo-nucleotides. Such an imposing array of transmitters makes possible an extremely wide range of variations and combinations. The number grows even greater when account is taken of the fact that each substance may have an excitatory and (or) inhibitory action. Moreover, there are tracts that break off in places again and again, which makes the number of possible variations grow out of all proportion. In dealing with the central nervous system,

this is a supposition that must of necessity be recognised. The substance mentioned above are merely those we are familiar with; there must be some others as well which we have failed to discover.

To deal adequately with each transmitter enumerated above within the limits of a single paper would obviously be impossible; we will instead confine ourselves to a discussion about the present views held on the position of the polypeptide called Substance P, which has been the object of our special studies lately.

By way of introduction, some general properties of the substance P will need to be reported on (its isolation in larger quantities as well as from smaller tissues, its physiological and pharmacologic properties, testing and distribution, especially in the central nervous system).

Substance P is found distributed in large amounts in the basal ganglia and in the formatio reticularis, one region often containing much of it and the next one very little. This fact speaks for its transmitting function. The substance interferes with neither histamine nor adrenaline nor 5 HT. The substance P has been known for over twentyfive years, yet it is only since the publication of the work of Pernov and Lambeck in 1953 and that of Zettler in 1956 that we have learnt more about its function. Lembeck was the first to show that the substance is to be found in quantity in the dorsal roots of medulla spinalis, which suggested the possibility of its having a transmitting function in the first sensible neuron. Zettler pointed out that the substance P participates in the central nervous system as the transmitting substance of certain inhibitory systems. After a series of experiments Zettler succeeded in testing the substance P in its relation to various neurotropic pharmacons. We have been particularly impressed by the great similarity between the properties of mephenesine — an excellent relaxant of musculature — and those of the substance P, as demonstrated by Zettler. He found, for instance, that the substance P has a sedative effect, preventing strychnine cramps and prolonging at the same time the evipan narcosis and latency of the onset of picrotoxin spasm, etc.

In order to complete the picture, we decided to carry out experiments with the substance P as done by Zettler with mephenesine, and vice versa, experiments with mephenesine as done by Zettler with the substance P only. The results went to show that the substance P reduces the intensity of cramps due to tetanus toxin as well as those provoked by W 181. Strychnine and tetanus toxin are known to act in the same way, so the prevention of cramps brought about by W 181 speaks for the synergism of substance P and that of mephenesine, if only because of the fact that mephenesine is the only anticonvulsant — according to Berger — that prevents convulsions due to W 181.

In subsequent experiments we were able to show that mephenesine prevents tremor due to harmine and catalepsy provoked by bulbocapnine, in addition to its removing the analgetic effect due to morphine. Eventually, we carried out experiments that established the fact that SKT 525 A, which prolongs and potentiates the effect of a number of neurotropic pharmaceutical drugs, also prolongs the action of the substance P. IDNH, which is provocative of intense psycho-motor agitation, can also be removed by the substance P. As the Table shows, the results of fourteen various experiments made with mephenesine can also be obtained with the substance P. This fact speaks definitely for the synergism of the substance P and that of mephene-

sine. Subsequently, we compared the results of these experiments with those obtained with meprobamat, the classic tranquilliser. The latter also showed, in a great majority of cases, synergism with the substance P. Since mephensine and meprobamat do not remove monosynaptic reflexes, while being able to do so in respect of polysynaptic reflexes, we attempted to draw a parallel in this instance also. The results went to show that the substance P does in fact remove the polysynaptic reflexes (homolateral flexoral and contralateral extensory) provoked in a decerebrated cat, while it fails to do so when the reflexes are monosynaptic patellar. Likewise, the substance P inhibits the stimulating action of nicotine on polysynaptic reflexes.

In addition to these non-conditioned reflexes we also made experiments with a conditioned reflex on rats (stimulus of current and sound of bell). We found Substance P to have no effect on the conditioned reflex. The results of further experiments on rats — in the so-called »Irrgarten« — showed that the substance P has no appreciable influence, as a stimulant, upon nervous activity of the animals. At the same time, the substance P was found to stop vomiting, in pigeons, provoked by digitalis. This is of interest because area postrema contains large quantities of Substance P, and the area is known to be the so-called receptor zone of the vomiting reflex. We failed to establish the existence of synergism of Substance P and mephensine only on the peripheral-afferent impulse of a hare's ear, as shown by Lambeck in respect of the substance P. However, we did find the substance P to remove the rotatory nystagmus of the mouse, which is known to be the effect of mephensine also. Some authors were reported to have tried to test concentrations of Substance P by administration of various pharmaceutical drugs known to have an exciting or sedative effect on the central nervous system. The results so far have been contradictory in parts, allowing of no general conclusions. For this reason we effected stimulation of a nerve organ in a different way, it was shown that in a darkened eye of a cow there occurs a gathering together of the substance P. This is most interesting when related to Krivoya's finding that LSD has an inhibitory effect upon a ferment that acts destructively on the substance P. On the other hand, Pfeffer is of the opinion that LSD only acts peripherally over the eye since it does not cause hallucinations in the blind.

In actual fact, all these effects are to be accounted for by the action of the substance P in the central nervous system, for we were able to show an increase in the level of the substance P in the brain of rats after intraperitoneal injection of larger doses.

Present position of Substance P and its physiology and pharmacology has thus been reviewed. The findings of Lambeck and Zettler stand confirmed. In all probability the substance P is the transmitter substance in the central nervous system. In the main it has a rousing effect on inhibitory mechanisms. This corresponds with the findings of Perov and Euler to the effect that Substance P administered intracystically provokes inhibition of spontaneity. A great number of experiments go to show that there is synergism between Substance P, mephensine and meprobamat; consequently, that we are concerned with a physiological tranquilliser. Hence, the question arises what effects, if any, might the substance have on the course of mental diseases. The question is all the more interesting as mephensine has been found to produce an excellent sedative effect on hares, and also because of the hypothesis that Substance P might be the substance responsible for se-

cretion of ACTH — knowing as we do that an accumulation of ACTH in hypothalamus produces inhibition of the sensation of tear. It was Berger who divided tranquillisers in two major groups a) autonomic suppressors — derivatives of chlopromazine, diphenylmethane and reserpine, and b) central relaxants — derivatives of propandiol, i. e. meprobamat and maphesine. Berger arranged them in tabular form showing their points of difference. We have added a third column to the Table introducing the substance P; the result, once more, was a complete analogy, i. e. the substance P and the central relaxant are synergists.

It is by no means easy to formulate a definite opinion about the substance P. Further experiments and tests — more especially those with the substance purified and by methods more advanced and up-to-date, and on humans as well — are likely to result in additional data and more information. All that can be said with any certainty so far is that the substance P is a neurotropic agent which in all probability may be regarded as a physiological tranquilliser.

(Pharmacological Institute, Faculty of Medicine, Sarajevo University).

LITERATURA

1. Marrazzi A.: Neurology and Psychiatry 9,565 (1956)
Annals of the New York Academy of Science 66, 3
Published by the Academy New-York 1957.
Annals of the New York Academy of Science 67, 10
Published by the Academy New York 1957.
2. Feldberg W.: Brit. Med. Bulletin 6,312 (1950)
3. Vogt M.: J. Physiol. 123,451 (1954)
4. Gaddum H.: Abstracts of Rev. XX. Internat. Physiol. Congress Brussel 1956, 442
5. Hausler H., Sterz H.: J. Mt. Sinai Hosp. 19, 121 (1952)
Trendelenburg U.: Ciba Symposium on Histamine 278, Churchill London (1956).
6. Holtz P., Schumann H.: Naturwissenschaften 41, 306 (1954)
7. Feldberg W.: Pharmacol Rev. 6,85 (1954)
8. Loewi O.: Pflüger's Arch. 189, 239 (1921)
9. Langemann H.: Helv. Physiol. Acta 2,376 (1944).
10. Kibjakoov A.: Pflüger's Archiv 232, 432 (1933)
11. Emmelin N., Muren A.: Acta Physiol. Scand. 20, 13 (1950)
12. Brock L., Combs J., Eccles J.: J. Physiol. 117, 431 (1952)
13. Zec N., Stern P.: Acta Neurovegetativa 6, 273 (1953)
14. Horsley V., Clarke R.: Brain 31, 45 (1908)
15. Marrazzi A.: Arzneimittelforschung 3, 338 (1953)
16. Purpura D.: Amer. J. Physiol. 186, 250 (1956)
17. Euler U., Gaddum H.: J. Physiol. 72, 74 (1931)
Pernov B.: Acta Physiol. Scand 29, Suppl. 105 (1953)
Pernov B.: Z. Vitam. — Hormon u. Fermentforschung 7, 59 (1955)
Gaddum H.: Polypeptides, Ed. S. Livingstone Ltd, Edinburgh and London (1955)
18. Florey E., McLennan H.: J. Physiol. 129, 384 (1955) 130, 446 (1955)
19. Lissak K., Endroczy E.: Acta Physiol. Hung. 9, 111 (1956)
Pfeifer A., Pataki J.: Acta Physiol. Hung. 8, 209 (1955)
20. Zetler G., Ohnesorge I.: Arch. exper. Path. u. Pharm. 231, 199 (1957)
21. Feldberg W.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmakl. 212, 64 (1950)

22. Župančić A.: *Acta physiol. Scand.* 29, 63 (1953)
23. Stern P.: *Acta Neurovegetativa* 13, 209 (1956)
24. Stern P.: *Wien. Z. Nervenheilkunde und Gränzgebiete* — U štampi.
25. Stern P.: *Allergie und Asthma* — U štampi.
26. Stern P. Džinić S., Tomić-Vukčević S.: U pripremi za štampu.
27. Vidi literaturu pod 1.
28. Hoffer A., Osmond H., Smythies J.: *J. Men. Sci.* 100, 29 (1954)
29. Madarek Z., Stern P.: *Archiv bioloških nauka* 8, 1 (1956)
30. Vogt W.: *Naturwissenschaften* 42, 607, (1955)
31. Zetler G.: *Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol.* 229, 148 (1956)
32. Gaddum H.: *J. Physiol.* 119, 363 (1953)
33. Euler U. v.: *Acta Physiol. Scand.* 4, 373 (1942)
34. Arvidsson U., Pernow B., Swedin B.: *Acta Physiol. Scand.* 35, 338 (1956)
35. Krivoy M.: *Brit. J. Pharmacol.* 12, 361 (1957)
36. Eber O., Lembeck F.: *Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol.* 229 139 (1956)
37. Blair M., Clark B.: *J. Pharmacol. Exper. Therapeut.* 117, 467 (1956)
38. Zetler G.: *Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol.* 228, 513 (1956)
39. Lembeck F.: *Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol.* 219, 197 (1953)
40. Kopera H., Lazarini W.: *Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol.* 219, 214 (1953)
41. Zetler G., Schlosser L.: *Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol.* 224, 159 (1955)
42. Amin A., Crawford T., Gaddum H.: *J. Physiol.* 126, 596 (1954)
43. Stern P., Dobroić V., Kocić-Mitrović D.: *Arch. Int. Pharmacodyn* — 112, 102 (1957)
44. Berger F., Bradley W.: *Brit. J. Pharmacol.* 1, 265 (1946)
45. Henneman E., Kapland A., Una K.: *J. Pharmacol. Exper. Mherap.* 97, 331 (1949)
46. Schlan L., Unna K.: *J. A. M. A.* 140, 627 (1949)
Mc. Laughlin J., Schlan L.: *Illinois Med. Journal* 103, 247 (1949)
47. Berger F.: *J. Pharmacol. exper. Therapeut* 112, 413 (1954)
48. Berger F.: *International Record of Medicine* 169, 184 (1956)
49. Stern P., Huković S.: *Naturwissenschaften* 1956, 538
50. Edwards P.: *Anaesthesia (London)* 3, 160 (1948)
51. Brooks W., Curtis D., Eccles J.: *Nature* 175, 120 (1955)
52. Stern P., Dobroić V.: *Buletin Scientifique* — U štampi.
53. Cook L., Toner J., Fellows E.: *J. Pharmacol. exper. Therapeut* 111, 131 (1954)
Cook L., Navis G., Felows E.: *J. Pharmacol. exper. Therapeut.* 112, 473 (1954)
54. Macko E., Cook L., Toer J., Fellows E.: *Fet. Proc.* 12, 346 (1953)
55. Berger F.: *J. Pharmacol exper Therapeut.* 107, 250 (1953)
56. Stern P., Huković S.: Neobjavljeno.
57. Thuillier J., Nakajima H.: *Internat. Simposium f. Psychopharmaka Milano* 1957
58. Stern P., Dobroić V.: *Naturwissenschaften* 44, 517 (1957)
59. Napolitano L., Longo W.: *Arch. Int. Pharmacodyn* 90, 343 (1952)
60. Keller H., Krüpe W., Sous H., Mucter H.: *Arzenmittelforschung* 6, 61 (1956)
61. Stern P., Misirlija A., Dobroić V., Kocić-Mitrović D.: *Acta Med. Jug.* U štampi.

62. Keith Lucas: Zit. prema Ther L. Pharmakologischen Methoden Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 1949
63. Beck T., Frommel E.: Helv. Physiol. Acta 6, C. 3 (1948)
64. Taugner R., Culp W.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol. 220, 423 (1953)
65. Courvoisier S., Lean O.: Antibiotic and Chemotherapy 6, 411 (1956)
66. Witt P: Arzneimittelforschung 6, 359 (1956)
67. Stern P., Mađarek Z.: Neobjavljeno.
68. Paasonn M. Vogt M.: J. Physiol. 131, 617 (1956)
69. Borison L., Wang S.: Phaemend. Rev. 593 (1953)
70. Wang S., Borison H.: Arch. Neurol. Psychiatr. 63, 928 (1950)
71. Kocić-Mitrović D.: Disertacija — U pripremi.
72. Stern P.: Neobjavljeno.
73. Lembeck F.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol. 230,1 (1957)
74. Mirsojan S., Doblatian S.: Farmakol i Toksikol. 11, 1955, Zit. prema 73.
75. Stern P., Kocić-Mitrović D.: U pripremi za štampu.
76. Duner H., Euler v. U., Pernow B.: Acta Physiol. Scand 61,113 (1954)
77. Apter J., Pfeiffer C.: Annales New York Academy 66,508 (1957)
78. Angeluci L.: Brit. J. Pharmacol. 11,161 (1956)
79. Marrazzi A.: Brain Mechanism and Drug Action, Charles Thomas Publ. 45
80. Euler v. U., Pernow B.: Acta Physiol. Scand, 36,625 (1956)
81. Bovet H.: Abstracts of Rev. XX Inter. Physiol. Congres Brussel 1956, 306
82. Craht J., Craht U.: Virchows Arch. Path. Anat. 321,238 (1952)
83. Milin R., Stern P., Džinić B.: Compt. Rend. Assoc. Anatom XLII Reunion Paris 1955,1041
84. Stern P. Milin R., Šćepović M.: Schweiz. Med. Wschr. 1956,415.
85. Guillemain R., Rosenberg B.: Endocrinology 57,599 (1955).
Swingle W., Branick W., Parlow L., Barret W.: Proc. Soc. exper. Biol. Med. 92,594 (1956)
86. Fortier C.: Abstracts of Rev. XX. Congres Internat Physiol 490
87. Berger F.: Annales New York Academy 67,685 (1957)
88. Stern P., Huković S., Muičević G.: Naturwissenschaften 43,162 (1956)
89. Zetler G.: Med. Klin. 50,1644 (1955)