

La sostanza 1., che mostra evidente attività somministrata sottocute, esplica una protezione di entità minore quando viene data per via orale. Per contro il monoacetil-derivato di questo prodotto possiede, per via orale, un'attività protettiva superiore a quella della base corrispondente.

Questa osservazione sperimentale e la bassa tossicità del derivato acetilato, DL_{50} per os nel ratto = 4000 mg/kg, ci hanno indotto a compiere studi più approfonditi su questo composto al fine di poter effettuare una sperimentazione clinica in malattie da virus nell'uomo.

La sperimentazione clinica è stata fatta in soggetti affetti da epatite virale, morbillo, varicella, parotite epidemica e anche in varie dermatopatie virali.

I risultati finora in nostro possesso rivelano che il composto è in grado di influenzare favorevolmente nel 70% dei casi studiati, le forme di *Herpes zoster*.

Complessivamente sono stati trattati con il prodotto 83 soggetti affetti da questa malattia.

Summary. A number of 2-amino-4-morpholinyl-s-triazine derivatives has been synthesized by the authors, and the activity of these compounds has been tested against some viral infections in laboratory animals.

Among these substances, the compounds having the NH_2 group free or monosubstituted, and the 6-CH group unsubstituted, revealed an interesting protective activity in Swiss albino mice infected with influenza virus type B.

The compound 2-morpholinyl-4-acetylaminos-triazine, able to protect the animals when administered by oral route and non-toxic, has been tried in viral diseases in human beings.

R. ANGELUCCI, D. ARTINI, P. N. GIRALDI,
W. LOGEMANN, and G. NANNINI

Istituto «Carlo Erba» per Ricerche Terapeutiche, Milano (Italia), il 6 Dicembre, 1962.

Activité de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase dans la rétine du lapin et dans la rétinite pigmentaire expérimentale provoquée par le monoiodacétate. Etude histo-chimique

L'étude de la rétinite pigmentaire expérimentale a pris un grand essor lorsqu'on a découvert que l'iode («septo-iodé») employé comme antiseptique, provoquait chez l'homme, en analogie avec les résultats expérimentaux chez le lapin, de graves altérations rétinienues ressemblant aux altérations caractéristiques de la rétinopathie pigmentaire humaine (RIEHM¹, VITO²).

A dater de ces découvertes, on a utilisé plusieurs sels iodés destinés à provoquer une rétinite pigmentaire chez différentes espèces d'animaux de laboratoire. Parmi ces sels iodés, le monoiodacétate (MIA) qui agit rapidement et de façon durable, s'est révélé le plus efficace. A l'aide de ce sel, on a réussi à provoquer une altération du type de la dégénérescence pigmentaire chez divers animaux (NOELL³ chez le lapin, RABINOVITCH et al.⁴ chez la poule, SORSBY et al.⁵, GRAYMORE et TANSLEY⁶ chez le rat, PONTE⁷ chez le canard).

Les études les plus approfondies ont été faites chez le lapin qui se prête le mieux à ce genre d'expérimentation. Un grand nombre d'expériences ont été faites pour étudier les altérations structurales et fonctionnelles de la rétinite pigmentaire expérimentale chez le lapin provoquée par le MIA. Au point de vue structural, on a examiné les altérations rétinienues par voie ophtalmoscopique et microscopique (NOELL⁸, KARLI⁹, BABEL et ZIV¹⁰, LUCAS et NEWHOUSE¹¹) et électromicroscopique (LASANSZKY et DE ROBERTIS¹²) tandis qu'au point de vue fonctionnel on étudiait les altérations électrorétinographiques (BABEL et ZIV¹⁰, SCHUBERT et BORNSCHNEIN¹³, NOELL¹⁴) ainsi que les troubles du métabolisme rétinien (NOELL¹⁴, DE BERARDINIS¹⁵).

Sans vouloir décrire en détail les résultats ainsi obtenus, notons brièvement que 5 à 7 min après l'injection intraveineuse de 20 mg/kg de MIA, tout tracé électrorétinographique est disparu et, après 3 h, on a réussi à mettre en évidence, à l'aide du microscope électronique, des lésions dans le segment externe des bâtonnets. A la fin de la première semaine, les altérations ophtalmoscopiques et microscopiques, débutant le lendemain de l'injection,

aboutissent à une dégénérescence pigmentaire typique plus ou moins étendue de la rétine.

L'abolition complète et immédiate de la réponse électrorétinographique suggère que l'origine de l'action du MIA doit être recherchée dans l'atteinte brusque du métabolisme rétinien. En effet, toutes les recherches faites dans ce sens ont mis en évidence une altération profonde de celui-ci. Et par nos expériences histo-chimiques, nous avons cherché à en apporter une nouvelle preuve.

Expériences personnelles. Nous avons étudié par des nouvelles méthodes histo-chimiques chez le lapin, la distribution des déshydrogénases participant dans les différents cycles du métabolisme des hydrates de carbone de la rétine (glucose-6-phosphate, glyceraldéhyde-3-phosphate, lactate, α -glycérophosphate, succinate, isocitrate-DPN, malate). De même nous avons examiné le comportement de ces enzymes au moment de l'extinction de la réponse électrorétinographique, qui démontre une profonde lésion de la fonction rétinienne, sans que des altérations structurales soient apparentes.

Méthodes. Chez des lapins pesant 2000 à 2500 g, nous avons injecté dans la veine de l'oreille 20 mg/kg de MIA. Un examen électrorétinographique a été fait juste avant et tout de suite après l'injection, selon la méthode décrite par BABEL et ZIV¹⁰. Lorsque la réponse électrorétinographique était éteinte, nous avons prélevé la rétine et

¹ W. RIEHM, Arch. Augenhk. 100, 872 (1929).

² P. VITO, Boll. Ocul. 14, 945 (1935).

³ W. K. NOELL, J. cell. comp. Physiol. 37, 283 (1951).

⁴ M. RABINOVITCH, I. MOTA et S. LOVEDA, Exper. 10, 187 (1954).

⁵ A. SORSBY, J. T. NEWHOUSE et D. R. LUCAS, Brit. J. Ophth. 41, 309 (1957).

⁶ C. GRAYMORE et K. TANSLEY, Brit. J. Ophth. 43, 117 (1959).

⁷ F. PONTE, G. ital. Oftal. 11, 350 (1958).

⁸ W. K. NOELL, Amer. J. Ophth. 36, 103 (1953).

⁹ P. KARLI, Ophthalmologica 128, 137 (1954).

¹⁰ J. BABEL et B. ZIV, Ophthalmologica 132, 65 (1956).

¹¹ D. R. LUCAS et J. P. NEWHOUSE, Brit. J. Ophth. 13, 147 (1959).

¹² A. LASANSKY et E. DE ROBERTIS, J. biophys. biochem. Cytol. 5, 245 (1959).

¹³ G. SCHUBERT et H. BORNSCHNEIN, Exper. 7, 461 (1951).

¹⁴ W. K. NOELL, Amer. J. Ophth. 48, 347 (1959).

¹⁵ E. DE BERARDINIS, Rass. ital. Oftal. 22, 345 (1953).

nous l'avons placée dans le milieu d'incubation en même temps qu'une rétine normale faisant office de contrôle.

Du point de vue de la technique histo-chimique, nous avons travaillé avec deux sels de tétrazolium, le Nitro-BT (nitro-tétrazolium blue) et le MTT (diméthylthiazolyl-phenyl-tétrazolium bromid). Le milieu d'incubation a été composé d'après les indications de NACHLAS et al.¹⁶ pour le Nitro-BT, selon celles de PEARSE¹⁷ pour le MTT. Le glycéraldéhyde-3-phosphate a été obtenu à partir du glycéraldéhyde-3-phosphate diéthyle-acétate (monobarium sigma) en transformant le sel de barium en acide libre. Le milieu d'incubation pour ce dernier substrat a été semblable à celui décrit par HIMMELHOCH et KARNOVSKY¹⁸. (Concentration du substrat: 1×10^{-2} ; diphosphopyridine nucléotide: 5,0 mg/ml; Nitro-Bt- 5,0 mg/ml; cyanide: 0,1 M; tampon: 0,2 M phosphate; pH 7,2).

Après 30 min d'incubation, nous avons fixé le tissu rétinien dans du formol salé à 10% et, après l'inclusion dans la gélatine, nous avons procédé à des coupes en congélation¹⁹.

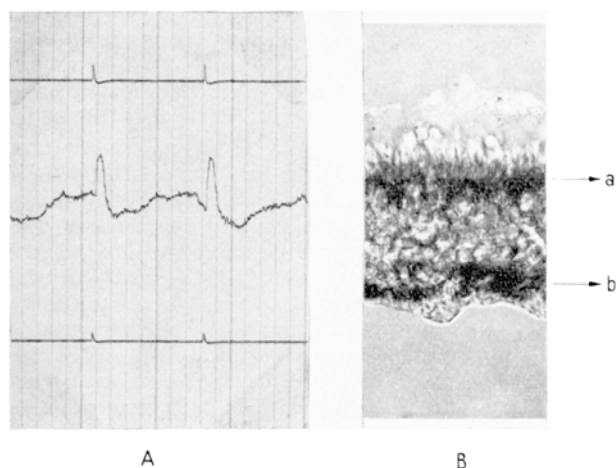


Fig. 1. (A) Réponse électrorétinographique normale du lapin. (B) Activité de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase dans la rétine normale du lapin (Nitro-BT, 384 x); (a) couche des photorécepteurs, (b) couche des cellules ganglionnaires (obs. pers.).

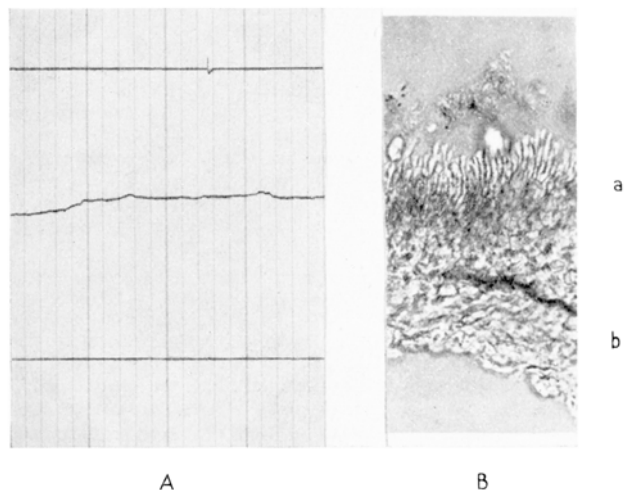


Fig. 2. (A) Réponse électrorétinographique du lapin 5 à 7 min après l'injection intraveineuse de 20 mg/kg de MIA. (B) Activité de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase dans la rétine du lapin quelques 10 min après l'injection intraveineuse de 20 mg/kg de MIA (Nitro-BT, 384 x). Pour (a) et (b), voir Figure 1.

Résultats. La disposition des différentes déshydrogénases dans la rétine fera le sujet d'un travail ultérieur. Nous voulons relever ici que les résultats concernant l'activité du glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase qui se manifeste dans le segment interne des photorécepteurs, dans la couche plexiforme externe et à un moindre degré dans la couche ganglionnaire (Figure 1). Cette localisation correspond d'ailleurs aux résultats de SCHIMKE²⁰ obtenus dans l'homogénat du tissu séché au froid.

5 à 8 min après l'injection intraveineuse de 20 mg/kg de MIA, nous avons pu constater que la réponse électrorétinographique était complètement éteinte. A ce moment-là, l'activité de toutes les déshydrogénases était encore conservée, à l'exception de celle du glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase qui a presque complètement disparu (Figure 2).

Discussion. Le fait que la rétine présente *in vitro* une glycolyse très élevée est bien connu. Les expériences plus récentes faites sur le métabolisme rétinien de jeunes animaux, d'une part, et d'animaux adultes, d'autre part (NOELL¹⁴, COHEN et NOELL²¹) ont démontré que le cycle d'Embden-Meyerhof (EM) représente la source la plus importante d'énergie pour la fonction rétinienne. On a constaté également qu'après l'injection intraveineuse du MIA, qui abolit presque instantanément l'activité glycolytique de la rétine chez le lapin, l'activité du cycle pentosephosphate et celle du cycle de Krebs demeurent intactes. Ainsi le point d'attaque de ce poison doit être recherché dans le cycle EM (NOELL¹⁴). Or nous savons que le MIA exerce une action destructrice sur les enzymes SH (BARRON²², RACKER²³). Parmi ces derniers, le glycéraldéhyde-3-phosphate occupe une place centrale dans la glycolyse. Cet enzyme catalyse les réactions produisant des phosphates riches en énergie. Depuis les recherches de CORI et al.²⁴ nous connaissons l'action annihilante du MIA sur cet enzyme.

SORSBY et al.⁵ mettent en doute que le MIA agisse sur le groupe SH des enzymes, étant donné qu'un grand nombre des substances appartenant au groupe des réactifs SH n'ont aucun effet sur la fonction rétinienne. Néanmoins, on explique l'effet du MIA sur le métabolisme rétinien par la destruction du glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase.

Dans nos expériences, nous avons démontré par des méthodes histo-chimiques l'extinction de l'activité glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase après l'injection intraveineuse du MIA chez le lapin, dans la phase la plus précoce de l'effet du MIA sur la rétine, c'est-à-dire au moment où disparaît la réponse électrorétinographique. Ainsi, nous pouvons considérer la destruction de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase comme le point de départ des lésions qui se produisent dans la rétine du lapin, après l'injection du MIA. Ceci n'empêche évidemment pas d'admettre que, par la suite, la lésion de la structure rétinienne soit l'effet de la destruction de

¹⁶ M. M. NACHLAS, D. G. WALKER et A. M. SELIGMAN, J. biophys. biochem. Cytol. 4, 29 (1958).

¹⁷ E. A. G. PEARSE, J. Histochem. Cytochem. 5, 517 (1957).

¹⁸ S. R. HIMMELHOCH et M. J. KARNOVSKY, J. biophys. biochem. Cytol. 9, 573 (1961).

¹⁹ Nous tenons à remercier Monsieur R. ZENDER, chimiste en chef du Laboratoire Central de l'Hôpital Cantonal de Genève, de l'aide technique et des conseils très précieux qu'il a bien voulu nous donner.

²⁰ R. T. SCHIMKE, Fed. Proc. 16, 334 (1957).

²¹ L. H. COHEN et W. K. NOELL, J. Neurochem. 5, 253 (1960).

²² E. S. G. BARRON, Advanc. Enzymol. 11, 201 (1951).

²³ F. RACKER, Physiol. Rev. 35, 1 (1955).

²⁴ G. T. CORI, W. M. SLEIN et F. C. CORI, J. biol. Chem. 173, 605 (1948).

plusieurs enzymes SH en même temps, comme le pensent LUCAS et NEWHOUSE¹¹.

Plusieurs auteurs considèrent la dégénérescence pigmentaire expérimentale et celle de l'homme comme identiques, vu que le tableau clinique et les lésions fonctionnelles sont très semblables. Sans vouloir prendre une position aussi affirmative, nos résultats expérimentaux soulèvent la question de savoir si certains types de dégénérescence pigmentaire humaine ne pourraient pas être considérés comme une enzymopathie familiale ou acquise.

Summary. The author established that, at the moment of the extinction of the electroretinographic response after i.v. injection of iodacetate, the glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase activity is suppressed in the retina of the rabbit.

J. FORGACS

Clinique Universitaire d'Ophtalmologie, Genève (Suisse), le 12 novembre, 1963.

On the Topographical Differences in the Localization of Certain Enzymes in Trigeminal Ganglion Cells of Rat¹

Previously we have described the localization of a variety of enzymes in the spinal ganglion cells of rat². The present study is concerned with the distribution of certain enzymes in trigeminal ganglion cells of the same animal. From the words of PEEL³, 'the semilunar, or gasserian ganglion, comparable to the posterior root ganglion of a spinal nerve' we would expect the enzymatic distribution in trigeminal ganglia to be the same as that in spinal ganglia, yet we find that there are distinct topographical differences in localization of certain enzymes, between the two.

In the present experiments trigeminal ganglia, obtained from normal healthy rats, were subjected to the techniques for alkaline and acid phosphatases and simple esterase⁴, succinic dehydrogenase⁵, cytochrome oxidase⁶, glucose-6-phosphatase⁷, 5-nucleotidase⁸, and specific cholinesterase⁹.

Alkaline phosphatase has been exclusively localized at the periphery of the ganglion cells, similar to the pattern found in spinal ganglion cells. There is no reaction in the nuclei or central cytoplasm (Figure 1). Adenosine triphosphatase activity is similar in reaction to the above, although a moderate amount of activity is also present in the cytoplasm (Figure 2). Although in spinal ganglia, some cells show a peripheral concentration of adenosine triphosphatase, in none of them has the activity been seen in the pericellular area. However, all the cells of the trigeminal ganglion have invariably shown a heavy concentration of adenosine triphosphatase activity in the pericellular zones.

5-Nucleotidase preparations of these cells have given a positive reaction only among small cells though not restricted to the periphery of the cytoplasm (cells a, Figure 7), while most of the large cells are negative (cells b, Figure 7). This is again in sharp contrast to the condition seen in spinal ganglion cells which have shown 5-nucleotidase activity to some degree or other in all the cells.

Succinic dehydrogenase preparations (Figure 4) as well as cytochrome oxidase preparations show a cytoplasmic reaction, some cells demonstrating a perinuclear concentration of the enzyme (arrows P, Figure 4) while others show a general distribution (arrows, Figure 4). The former pattern has been seen in those cases where the nucleoli touch the nuclear wall, whereas the latter arrangement is observed when nucleoli are lying in the center of the nuclei. It should be mentioned that in oxidative preparations some cells show a more intense cytoplasmic reaction than others. Unlike alkaline phosphatase and adenosine

triphosphatase preparations no peripheral accumulation of oxidative enzymes is seen.

It is interesting that glucose-6-phosphatase preparations (Figure 5) have given a positive reaction in all the trigeminal ganglion cells. No peripheral concentration of the enzyme was noticed, as occurs in adenosine triphosphatase reactions, although the cytoplasmic reaction in other parts of the cell bears an identical topographical relationship with the distribution of adenosine triphosphatase¹⁰ and also with acid phosphatase and the oxidative enzymes.

It is of interest that in spinal ganglion cells², Purkinje cells¹¹, and in cerebral neurons¹², we have already shown that whenever the nucleolus touches the nuclear wall there is a concentration of mitochondria around the nucleus. However, when the nucleolus shifts to the central part of the nucleus the mitochondria are spread uniformly throughout the cytoplasm. Since it is well known that oxidative enzymes are exclusively located in mitochondria¹³, there is every likelihood that the perinuclear concentration and general distribution of oxidative enzymes, as seen in the present observations, represent the localization of the enzymes in mitochondria distributed in these patterns.

There is some difficulty in associating the perinuclear and general distribution of acid phosphatase with particular organelles which may be concentrated or distributed

¹ Supported by Grant B-1914 from the National Institute of Neurological Diseases and Blindness.

² H. B. TEWARI and G. H. BOURNE, *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 42 (1962).

³ T. L. PEEL, *The Neuroanatomical Basis for Clinical Neurology* (The Blakiston Division, McGraw-Hill, New York 1954).

⁴ M. S. BURSTONE, *J. Histochem. Cytochem.* **6**, 322 (1958).

⁵ M. NACHLAS, K. C. TSO, E. DE SOUZA, C. S. CHENG, and A. M. SELIGMAN, *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 420 (1957).

⁶ M. S. BURSTONE, *J. Histochem. Cytochem.* **7**, 112 (1959).

⁷ M. WACHSTEIN and E. MEISEL technique for glucose-6-phosphatase. See PEARSE, *Histochemistry* (Little, Brown and Co., Boston 1960).

⁸ M. WACHSTEIN and E. MEISEL technique for 5-nucleotidase. See PEARSE, *Histochemistry* (Little, Brown and Co., Boston 1960).

⁹ GOMORI's modification of KOELLE's technique for specific cholinesterase. See PEARSE, *Histochemistry* (Little, Brown and Co., Boston 1960).

¹⁰ H. B. TEWARI and G. H. BOURNE, *J. Histochem. Cytochem.*, in press (1962).

¹¹ H. B. TEWARI and G. H. BOURNE, in preparation.

¹² H. B. TEWARI and G. H. BOURNE, *J. Histochem. Cytochem.* **11**, 121 (1963).

¹³ G. H. HOGEBOM, A. CLAUDE, and R. D. HOTCHKISS, *J. biol. Chem.* **165**, 615 (1946).