

after administration of pituitary homogenate from normal animals, a statistically significant drop in the blood-sugar level was recorded ( $P < 0.01$ ), the changes after injection of homogenate from diabetic rats were slight or insignificant.

The above results thus provide evidence that animals with chronic diabetes, not treated with insulin, have a

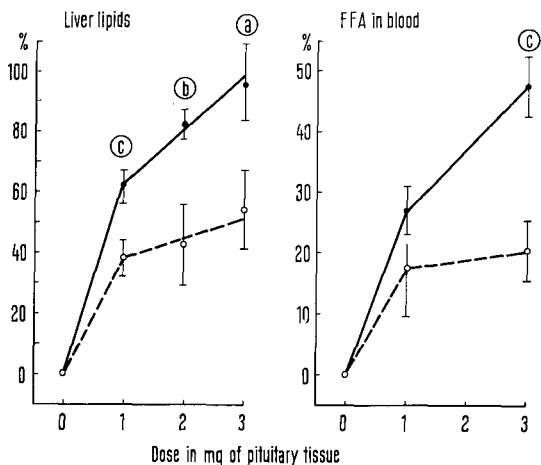


Fig. 1. Changes in the content of liver lipids and the free fatty acid level in the blood of mice after injection of pituitary homogenate from intact rats (●—●) and alloxan-diabetic rats (○---○). Expressed in % of value obtained in controls to which the same amount of solvent was injected. Individual values are averages of groups comprising 5–14 animals  $\pm$  S.E. Symbols for statistical significance between compared group averages: <sup>a</sup> ( $P < 0.05$ ); <sup>b</sup> ( $P < 0.02$ ); <sup>c</sup> ( $P < 0.01$ ).

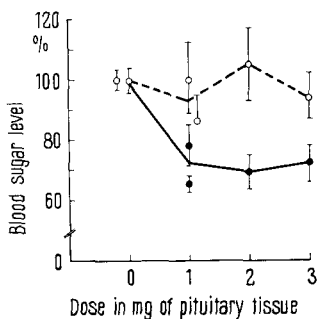


Fig. 2. Changes in blood sugar level of rats after injection of pituitary gland homogenate from intact rats (●—●) and alloxan-diabetic rats (○---○). Expressed in % of value obtained in controls to which same volume of solvent was injected. Individual values are averages of groups comprising 6–8 animals  $\pm$  S.E.

markedly reduced lipid-mobilizing and hypoglycaemic activity of the pituitaries. In alloxan-diabetic rats a reduced content of growth hormone was found in the pituitary and blood<sup>7,8</sup>, while the content of other pituitary hormones was unaltered<sup>7</sup>. The interpretation that for the observed decrease of lipid-mobilizing and hypoglycaemic activity the decreased amount of growth hormone in the pituitary is responsible, is however refuted by some of our unpublished experiments from which it appears that the decrease of growth hormone, e.g. during fasting<sup>9</sup>, need not be associated with a simultaneous decrease of the lipid-mobilizing activity of pituitary homogenates. It may be assumed that another factor or factors are involved which during fasting maintain the lipid-mobilizing activity of pituitaries, the decreased content of which in the pituitary of diabetic rats may participate in the observed changes. Perhaps lipid-mobilizing peptides described recently<sup>10–12</sup> are involved.

It is probable that the reduced lipid-mobilizing activity of homogenates of pituitaries from diabetic rats is rather the reflection of reduced formation of lipid-mobilizing substances than their increased turnover, as in other experiments we did not find an increased lipid-mobilizing activity in blood of alloxan-diabetic animals<sup>13</sup>. We may speculate whether or not it is a compensatory limitation of synthesis and secretion of pituitary lipid-mobilizing substances in alloxan-diabetic animals, which are more sensitive to lipid-mobilizing stimuli<sup>14</sup>.

*Zusammenfassung.* Die fettmobilisierende und hypoglykämische Aktivität in Hypophysenhomogenaten alloxandiabetischer Ratten ohne Insulinbehandlung ist nach achtwöchentlicher Diabetesdauer stark vermindert.

T. BRAUN and P. FÁBRY

*Physiological Department of the Institute of Human Nutrition, Prague-Krč (Czechoslovakia), November 8, 1965.*

<sup>7</sup> A. LAWRENCE, A. CONTOPOULOS, and M. SIMPSON, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **99**, 35 (1958).

<sup>8</sup> R. L. HAZELWOOD and B. S. HAZELWOOD, *Am. J. Physiol.* **206**, 1137 (1964).

<sup>9</sup> R. C. FRIEDMAN and S. REICHLIN, *Endocrinology* **76**, 787 (1965).

<sup>10</sup> D. RUDMAN, R. L. HIRSCH, F. E. KENDALL, F. SEIDMAN, and S. J. BROWN, *Recent Prog. Horm. Res.* **18**, 89 (1962).

<sup>11</sup> E. B. ASTWOOD, R. J. BARRETT, and H. FRIESEN, *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **47**, 1525 (1961).

<sup>12</sup> H. FRIESEN, R. J. BARRETT, and E. B. ASTWOOD, *Endocrinology* **70**, 579 (1962).

<sup>13</sup> T. BRAUN, Thesis, Czechoslov. Acad. Sci., Prague 1963.

<sup>14</sup> M. S. RABEN and C. H. HOLLENBERG, *J. clin. Invest.* **38**, 484 (1959).

### Mikrohistoautoradiographische Untersuchungen über die Verteilung von tritiummarkierten Phenothiazinen im Auge

Die Frage nach der Gewebs-Verteilung von Phenothiazinderivaten in den Strukturen des Auges wurde erstmals aktuell, als bei der klinischen Erprobung eines Versuchspräparates (NP 207 = 3-Chlor-10[2'-(N-methylpiperidyl-2'')-äthyl]-phenothiazin) Sehstörungen und abnorme

Netzhautpigmentierung festgestellt wurden<sup>1–6</sup>. Bevor noch die genauere Pathogenese dieser Schädigung aufgeklärt werden konnte, stellten wir in unseren Laboratorien fest, dass diverse substituierte Phenothiazine, inklusive Chlorpromazin, eine ausgeprägte Akkumulation im Bereich der melaninhaltigen Strukturen von Iris und Retina zeigten. Auf Grund mündlicher Mitteilung dieser erst später von RUTSCHMANN et al.<sup>7</sup> publizierten Ergebnisse konnte POTTS<sup>8–12</sup> unsere Beobachtung einer selektiven

Affinität von Phenothiazinderivaten gegenüber dem Melanin des Auges bestätigen. Da es seither auch gelungen ist, mittels chronischer NP 207-Verabreichung den Netzhautschaden am Auge der Katze experimentell zu reproduzieren<sup>13</sup>, gewinnt die exakte histotopische Lokalisation der Phenothiazinspeicherung im Auge weitere Bedeutung, zumal sich zeigen liess, dass die Schädigung durch Phenothiazin an den Ellipsoiden der Stäbchen angreift.

**Methodik.** Unsere Untersuchungen führten wir mit in 5-Stellung markiertem <sup>3</sup>H-Chlorpromazin, <sup>3</sup>H-NP 207 und <sup>3</sup>H-3-Chlorphenothiazin durch<sup>14</sup>. Die intravenös applizierte Dosis der <sup>3</sup>H-markierten Phenothiazine betrug 10 mg/kg. Die spezifischen Aktivitäten lauteten: <sup>3</sup>H-Chlorpromazin = 112 mC/mM, <sup>3</sup>H-NP 207 = 110 mC/mM, <sup>3</sup>H-3-Chlorphenothiazin = 112 mC/mM. Die Ermittlung der Verteilung der Phenothiazine im Gesamtorganismus erfolgte an 4 Katzen. 16 h nach intravenöser Injektion der markierten Substanzen wurden die Tiere mit Äther getötet und unmittelbar darauf die verschiedenen Organe, insbesondere die Augen, für die Radioaktivitätsbestimmung und für die autoradiographische Untersuchung entnommen. Die Frage der Bedeutung des Melaningehaltes für die Akkumulation von Phenothiazin wurde an 2 pigmentierten und 2 albinotischen Kaninchen untersucht. Es wurde hierzu <sup>35</sup>S-Melleril mit einer spezifischen Aktivität von 7,5 mC/mM in einer Dosis von 20 mg/kg intravenös gespritzt. Die Tötung der Tiere erfolgte 16 h post injectionem.

Die historadiographische und quantitative radiometrische Technik entsprach im wesentlichen unseren früheren Untersuchungen<sup>15</sup>.

Ein Teil der Schnitte wurde nach der Entwicklung einer protrahierten Bleichung des Melanins durch Wasserstoffsuperoxyd während 24 h unterzogen, um die starke Pigmentierung im Bereich der Melanin-tragenden Schichten der Chorioidea zu reduzieren und die Schwärzung des Filmes über diesem Gewebsbezirk sichtbar zu machen.

**Ergebnisse.** Mikroautoradiographisch ist zu beobachten, dass NP 207 und Chlorpromazin elektiv in den pigmentierten Schichten des Auges gespeichert werden (Figur 1).

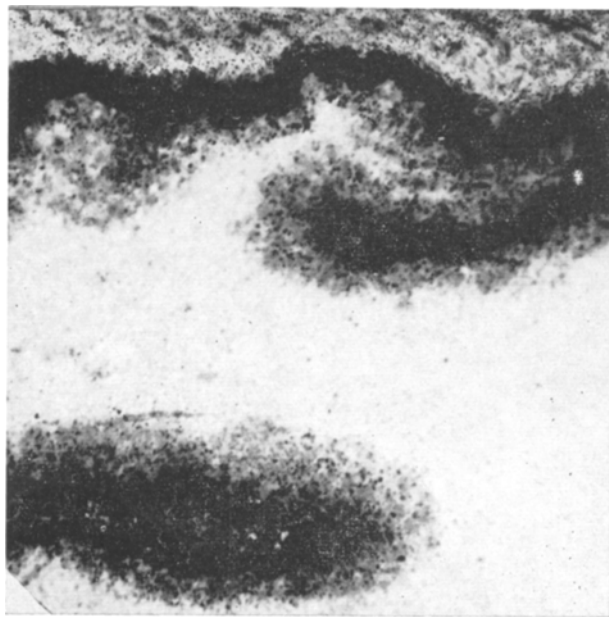


Fig. 1. <sup>3</sup>H-NP 207-Akkumulation in den pigmenttragenden Anteilen des Processus ciliaris. Pigment total gebleicht. Die hohe Silberkorn-dichte bedingt die intensive Schwärzung ( $\times 240$ ).

tierten Schichten des Auges gespeichert werden (Figur 1). Im Gegensatz hierzu ist 3-Chlorphenothiazin im Auge nur in geringer Konzentration nachweisbar, was vielleicht auf die Schwerlöslichkeit dieser Substanz zurückzuführen ist, so dass sie das Auge unter Umständen gar nicht erreicht (Figur 2, Tabelle III). Von albinotischen Tieren wird keines der untersuchten Phenothiazine akkumuliert (Tabelle I).

Nach Bleichung der pigmentierten Strukturen erkennt man die durch die markierten, N-substituierten Phenothiazine erzeugte kräftige Schwärzung der Filmschicht über der Chorioidea und dem Melanin-reichen Processus ciliaris (Figur 1). In den übrigen Teilen des Auges ist nur eine geringe, diffus verteilte Aktivität nachweisbar. Dass die Phenothiazine wenigstens zum Teil eine sehr stabile

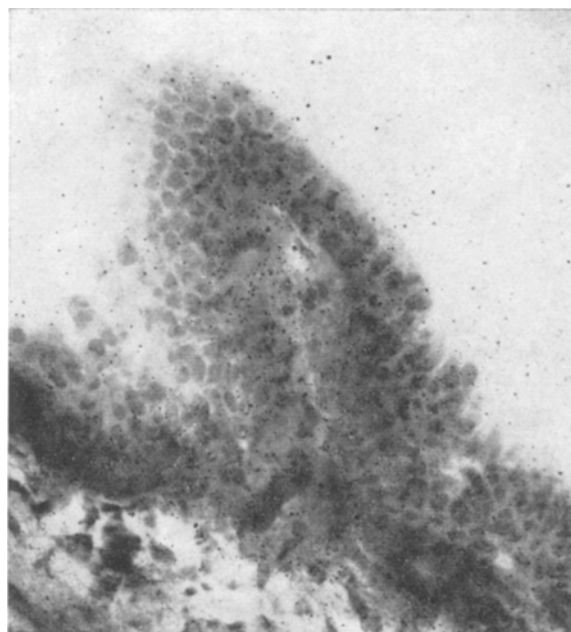


Fig. 2. <sup>3</sup>H-3-Chlorphenothiazin-Verteilung im Processus ciliaris (Irisbereich). Melanin total gebleicht ( $\times 240$ ).

- <sup>1</sup> F. VERREY, *Ophthalmologica* 131, 296 (1956).
- <sup>2</sup> E. A. GOAR und M. C. FLETCHER, *Trans. Am. ophthal. Soc.* 54, 129 (1956).
- <sup>3</sup> E. A. GOAR und M. C. FLETCHER, *Am. J. Ophthal.* 44, 603 (1957).
- <sup>4</sup> V. J. KINGROSS-WRIGHT, *Psychiat. Res. Rep. Am. Psychiat. Ass.* 4, 89 (1956).
- <sup>5</sup> F. RINTELEN, *Ophthalmologica* 131, 296 (1956).
- <sup>6</sup> F. RINTELEN, G. HOTZ und P. WAGNER, *Ophthalmologica* 133, 277 (1957).
- <sup>7</sup> R. H. MAY, P. SELYMES, R. O. WEEKLY und A. M. POTTS, *J. nerv. ment. Dis.* 130, 230 (1960).
- <sup>8</sup> R. D. WEEKLY, A. M. POTTS, J. REBOTON und R. H. MAY, *Arch. Ophthal.* 64, 65 (1960).
- <sup>9</sup> J. RUTSCHMANN, F. KALBERER, W. R. SCHALCH und H. STÄHELIN, *Psychopharmac. Serv. Cent. Bull.* 2, 73 (1962).
- <sup>10</sup> A. M. POTTS, *Trans. Am. ophthal. Soc.* 60, 517 (1962).
- <sup>11</sup> A. M. POTTS, *Invest. Ophthal.* 1, 522 (1962).
- <sup>12</sup> A. M. POTTS, *Invest. Ophthal.* 3, 399, 405 (1964).
- <sup>13</sup> W. MEIER-RUGE und A. CERLETTI, *Ophthalmologica*, im Druck.
- <sup>14</sup> F. KALBERER und J. RUTSCHMANN, *Helv. chim. Acta* 46, 586 (1963).
- <sup>15</sup> W. MEIER-RUGE, F. KALBERER und J. GRAUWILER, *Klin. Wschr.* 42, 1024 (1964).

Bindung mit dem Melanin eingehen, ergab sich aus einer parallel zu den Gefrierschnitten ausgeführten Serie, in welcher selbst nach Formalinfixierung und Paraffin-einbettung die gleichen Strukturen autoradiographisch nachweisbar waren.

Die quantitative radiometrische Bestimmung der Ver-teilung von NP 207 und Chlorpromazin zeigt ebenfalls in der pigmentierten Chorioidea die höchsten Konzentra-tionen (Tabelle III). Werden die Tiere 1 bis 2 Wochen mit

Tabelle I. Verteilungsfaktoren (F-Werte) von <sup>35</sup>S-Melleril bei pig-mentierten und unpigmentierten Kaninchen

	Sklera	Chorioidea + Retina
Schwarz pigmentiertes Kaninchen	0,27	3,99
Albinotisches Kaninchen	0,02	0,11

Tabelle II. Verteilung von <sup>3</sup>H-NP 207 (F-Werte) im Auge der Katze vor und nach chron. Vorbehandlung mit inaktivem NP 207

	<sup>3</sup> H-Piperidyl- chloropheno- thiazin	<sup>3</sup> H-Piperidylchloro- phenothiazin nach Vorbehandlung mit inaktivem Piperi- dylchloropheno- thiazin
Cornea	0,06	0,14
Linse	0,00	0,01
Iris	12,75	6,66
Chorioidea + Retina	9,82	4,09
Sehnerv	0,65	0,70

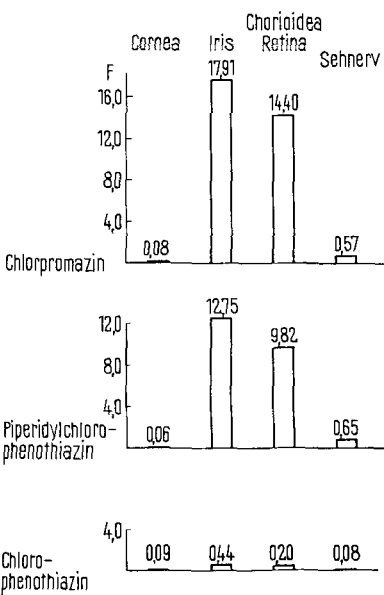


Tabelle III. Verteilung von <sup>3</sup>H-Chlorpromazin, <sup>3</sup>H-NP 207 (Piperi-dylchlorophenothiazin) und <sup>3</sup>H-3-Chlorphenothiazin im Auge der Katze

Phenothiazinen behandelt, so wird ein Teil der Bindungs-kapazität des Melanin abgesättigt, wie im Fall des NP 207 gezeigt werden konnte. Wenn man nach der Vorbehand-lung mit inaktivem Material markiertes NP 207 verab-folgt, so ergeben die Radioaktivitätsbestimmungen im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Tieren niedrigere Werte (Tabelle II).

*Diskussion.* Die besonders ausgeprägte Affinität der Phenothiazine zu den Melanin-tragenden Teilen des Auges kommt in den auffallend hohen Verteilungsfaktoren der Iris zum Ausdruck, welche beim NP 207 13mal und beim Chlorpromazin sogar 18mal grösser sind, als einer homo-genen Verteilung entsprechen würde. Bemerkenswert ist dabei, dass das Chlorpromazin, obwohl es im Auge in stärkerem Masse gespeichert wird als NP 207, nicht retinotoxisch wirkt.

Diese Tatsache zeigt, dass die Bindung an Melanin lediglich die Voraussetzung für das Auftreten der Retino-pathie bildet<sup>16</sup>, jedoch letztendlich die primäre Toxizität des gespeicherten Stoffes für das Zustandekommen des Netzhautschadens verantwortlich ist. Die Beobachtung, dass nach Vorbehandlung mit Phenothiazin eine bedeu-tend geringere Menge der tritiummarkierten Substanz an Melanin gebunden wird, findet eine Parallele in den Unter-suchungen von Porrs<sup>10-12</sup>, welcher zeigte, dass die Ak-kumulation von Phenothiazinen an Melanin der Bindung eines Ionenaustauschers entspricht und in vitro den Ge-setzen einer Adsorptionsisotherme folgt.

Das Zustandekommen der Netzhautschädigung durch NP 207 ist nicht allein an die Adsorption des Pheno-thiazins an Melanin und die Toxizität des letzteren gebunden. So gelingt es beispielsweise nicht, an Tieren wie dem Kaninchen, der pigmentierten Ratte, dem Meer-schweinchen usw. eine Retinopathie zu erzeugen. Ein weiterer wesentlicher Faktor für das Zustandekommen der Netzhautschädigung, wie sie sich bei der Katze beob-achten lässt, ist durch die besondere Gefäßversorgung und Stoffwechselsituation der Katzen-Netzhaut ge-gaben<sup>13</sup>. Das Unvermögen albinotischer Retinen, Pheno-thiazine zu akkumulieren (Tabelle I), lässt hier keine Retinaschädigungen zustande kommen. Da die Pheno-thiazinspeicherung der Chorioidea vom Melanin-Gehalt abhängig ist, dürfte die individuell verschieden rasche Entwicklung der Retinopathie wahrscheinlich auch Folge eines differenten Melanin-Gehaltes<sup>17</sup> sein.

*Summary.* Microhistoautoradiographic and radiometric investigations show that phenothiazines electively accu-mulate in the melanin-bearing structures of the eye, es-pecially in the chorioid. Retinotoxicity is not only the effect of an accumulation of melanin, but also the conse-quence of the specific substance-toxicity and the bio-logical importance of the chorio-capillaris which varies between the different species.

W. MEIER-RUGE, F. KALBERER  
und A. CERLETTI

Medizinisch-Biologische Forschung der Sandoz AG,  
Basel (Schweiz), 10. Dezember 1965.

<sup>16</sup> W. MEIER-RUGE, Arch. Ophthal. 73, 540 (1965).  
<sup>17</sup> W. MEIER-RUGE, Ophthalmologica, 150, 127 (1965).