

sections of the valves and myocardium. Staining specificity of the different types of coxsackie B antisera was confirmed by: (a) positive fluorescence when the respective types of antisera were reacted with monkey kidney cell culture infected with known types of coxsackie virus (Figure 1a, 1b), (b) a positive staining reaction in both valves and myocardial tissue of mice infected with a B₄ strain of coxsackie virus when reacted with type specific (B₄) antiserum, (c) a negative staining reaction when antiserum to the proteins of monkey kidney cell medium was used in the positive human valvular and myocardial tissue sections, and (d) a strictly cytoplasmic localization of the fluorescence.

Seventeen hearts were positive for coxsackie viral antigens within the myocardium. Fourteen cases showed more than one type of coxsackie B antigen. The most frequent types were B₂ and B₅. Antigen displayed a bright intracellular cytoplasmic fluorescence scattered focally throughout the myocardium (Figures 1, 2). Of the 40 patients less than 30 years of age 15 showed varying degrees of antigen present within the myofibers. Focal chronic interstitial myocarditis was observed in the 17 patients in hematoxylin-eosin stained sections.

There were 3 cases of viral valvulitis. They were positive for types B₁, B₄ and B₅, respectively. Fluorescent viral antigen was located discretely within the stromal tissue elements of the mitral valves in all instances (Figure 3). Hematoxylin-eosin stained sections showed mononuclear cellular infiltration and fibrosis. One patient was 3 days old, another 5 years, and a third 55 years. The latter had gross valvular thickening.

This study demonstrates that coxsackie viral antigen can be identified in both valves and myocardium by immunofluorescent techniques in a significant number of patients coming to routine autopsy. It seems that the incidence of valvulitis and myocarditis may well be significantly higher than the current literature suggests. The

demonstration that this antigen can invade and cause an inflammatory reaction within the valvular tissue seems important. It seems quite likely that a certain proportion of chronic valvular disease now thought to be of rheumatic or unknown origin may well be the result of viral infection. Since the incidence of these infections is much higher in the infants and the young adults it is likely that viral invasion at this time may produce a subclinical slowly progressive valvular damage. These studies will be reported more extensively elsewhere⁸. The role of the immunofluorescent methods in the diagnosis of viral disease of the heart and valves needs further exploration⁹.

Zusammenfassung. Die Gegenwart von Coxsackie-Virus Antigen wurde mit Antikörper-Test in Klappen und Herzmuskel junger Patienten mit verschiedener Todesursache festgestellt. Von 55 Herzuntersuchungen waren 17 Herzmuskeln und 3 Mitralklappen für Coxsackie-Virus Antigen positiv. In den meisten Fällen konnte B-2 und B-5 beobachtet werden. In allen positiven Fällen zeigten die histologischen Untersuchungen interstitielle Herzmuskel- und chronische Klappenentzündung.

G. E. BURCH, S. C. SUN,
H. L. COLCOLOUGH, R. S. SOHAL
and N. P. DE PASQUALE

Department of Medicine of the Tulane University School of Medicine and Charity Hospital of Louisiana, New Orleans (Louisiana 70112, USA), 5 June 1967.

⁸ G. E. BURCH, S. C. SUN, H. L. COLCOLOUGH, R. S. SOHAL and N. P. DEPASQUALE, *Am. Heart J.* 74, 13 (1967).

⁹ Supported by grants from the United States Public Health Service and the Rudolph Matas Fund for the Kate Prewitt Hess Laboratory.

Teratogene Wirkung von 1-Phenyl-3,3-dimethyl-triazin, Erzeugung von Gaumenspalten bei BD-Ratten

N-Äthyl-N-nitrosoharnstoff^{1,2}, 1,2-Diäthyl-hydrazin, Azo-, oder Azoxy-äthan (noch nicht veröffentlicht), als einmalige Dosis von 25% der LD 50 schwangeren Ratten des Stammes BD IX am 15. Tage post coitum gegeben, erzeugten bei fast allen Nachkommen Missbildungen der Pfoten, aber niemals Gaumenspalten. Demgegenüber fanden wir im Phenyl-dimethyl-triazin eine Substanz, die am gleichen Objekt und unter gleichen Bedingungen vorwiegend Gaumenspalten hervorruft. Da die Möglichkeit selektiver Wirkungen für die Teratogenese-Forschung wichtig erscheint, und da PEARN³ kürzlich die spezifische Erzeugung gerade dieser Missbildung mit rohen Extrakten aus *Indigofera spicata* beschrieb, soll über unsere Ergebnisse kurz berichtet werden.

1-Phenyl-3,3-dimethyl-triazin (PDMT), C₈H₈N=N-N-(CH₃)₂, ist ein ausgesprochen neurotropes Carcinogen⁴. Schwangere Ratten der Stämme BD VI (CPaH, schwarz) und BD IX (CPaH, wildfarben) erhielten am 15. Tage post coitum eine einmalige Dosis von 75 mg/kg Körpergewicht in Öl gelöst als s.c. Injektion. Die zeitgerecht spontan geborenen Nachkommen waren kurz nach der Geburt gestorben und z.T. von der Mutter aufgefressen. Daher

konnten nur 7 Neugeborene untersucht werden. Sie hatten sämtlich Gaumenspalten (Figur a). Die Atemwege waren mit Schleim verstopft. Im Magen fand sich keine Milch. Das Ergebnis konnte in mehreren Wiederholungsversuchen bestätigt werden. Trotz zahlreicher Verluste beobachteten wir unter 23 Nachkommen 16 Fälle von Gaumenspalten, davon nur 5 gleichzeitig mit Missbildungen der Pfoten. Ein spontanes Auftreten von Gaumenspalten haben wir bei BD-Ratten niemals beobachtet.

Kleinere Dosen von PDMT, die zur Prüfung auf transplacentare carcinogene Wirkung gegeben wurden, waren nicht teratogen. Das Gleiche hatten wir bereits bei den oben genannten Substanzen beobachtet. In allen Fällen erwies sich die teratogene Wirkung – im Gegensatz zur carcinogenen – als Funktion der Konzentration des Giftes («Konzentrations-Wirkung»).

¹ H. DRUCKREY, S. IVANKOVIC und R. PREUSSMANN, *Nature* 210, 1378 (1966).

² H. DRUCKREY, R. PREUSSMANN, S. IVANKOVIC und D. SCHMÄHL, *Z. Krebsforsch. mikrosk. Anat.* 69, 103 (1967).

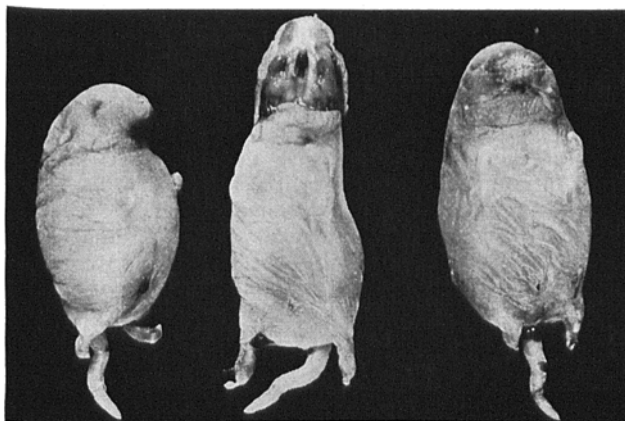
³ J. H. PEARN, *Nature* 215, 980 (1967).

⁴ H. DRUCKREY, S. IVANKOVIC und R. PREUSSMANN, *Naturwissenschaften* 54, 171 (1967).

Äthyl-nitrosoharnstoff², 1,2-Diäthyl-hydrazin⁵, Azo- und Azoxyäthan⁶ sind stark wirksame Carcinogene. Nach transplacentaler Einwirkung erzeugten auch sehr geringe Dosen bei fast sämtlichen Nachkommen (insgesamt etwa 600) im Alter von meist 150–300 Tagen maligne Tumoren im Gehirn und Nervensystem^{1,2}. Dagegen haben wir nach Gabe von PDMT am 15. Tage post coitum bei den aufgezogenen Nachkommen bis zum Alter von 500 Tagen bisher keinen einzigen Tumor beobachtet. Daher sind für die teratogene und die carcinogene Wirkung des PDMT verschiedene Mechanismen anzunehmen.



a



b

Teratogene Wirkungen an BD IX-Ratten. Oben (a) Gaumenspalten nach $C_6H_5-N=N-N(CH_3)_2$, unten (b) Gaumenspalten, Phokomelie, Mikrognathie und Adaktylie nach $C_6H_5-NH-N=N-CH_3$ jeweils einmal 75 mg/kg am 15. Tage post coitum.

PDMT zerfällt nach Protonierung (pH 6) in Dimethylamin und Phenyl-diazonium. Bei der relativ sauren Reaktion im Föt käme dieser Mechanismus für die teratogene Wirkung in Frage. Andererseits konnten wir nachweisen⁴, dass PDMT metabolisch z.B. durch Leber-Mikrosomen von erwachsenen Ratten bei Anwesenheit von TPNH und Sauerstoff unter Abspaltung von Formaldehyd zum Phenyl-monomethyl-triazen (PMT) demethyliert wird. PMT verhält sich wie ein stabilisiertes Diazomethan^{7,8}, das bereits bei pH 9 neben Anilin freigesetzt wird. Hierauf beruht wahrscheinlich die spezifisch neurotrope carcinogene Wirkung des PDMT.

In einem weiteren Versuch, bei dem das PDMT erst am letzten Tage der Schwangerschaft injiziert wurde, haben wir bei Nachkommen bereits die Entstehung von Hirntumoren beobachtet. Danach ist anzunehmen, dass die Fähigkeit zur oxydativen Demethylierung von PDMT am 15. Tage der fötalen Entwicklung noch nicht vorhanden ist, sondern erst später erworben wird.

Zur weiteren Klärung haben wir die Monomethyl-Verbindung (PMT) auf teratogene Wirkung untersucht. Die einmalige s.c. Injektion von 75 mg/kg am 15. Tag post coitum führte bei allen 22 beobachteten Nachkommen zu Gaumenspalten und weiteren Missbildungen, darunter Phokomelie, Adaktylie und Mikrostomie, (Figur b). PMT ist offenbar stärker wirksam, als PDMT. Der Wirkungsmechanismus wird in weiteren Versuchen geprüft.

Summary. 1-Phenyl-3,3-dimethyl-triazene and its monomethyl-derivative, when given as single s.c. injection of 75 mg/kg b.w. to pregnant rats on the 15th day of gestation, proved to be powerful cleft palate teratogens.

H. DRUCKREY, S. IVANKOVIC,
R. PREUSSMANN und U. BRUNNER

Forscherguppe Präventivmedizin am Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg i.B. (Deutschland), 27. September 1967.

⁵ H. DRUCKREY, R. PREUSSMANN, F. MATZKIES und S. IVANKOVIC *Naturwissenschaften* 21, 557 (1966).

⁶ H. DRUCKREY, R. PREUSSMANN, S. IVANKOVIC, C. H. SCHMIDT, B. T. SO und C. THOMAS, *Z. Krebsforsch. mikrosk. Anat.* 67, 31 (1965).

⁷ O. DIMROTH, *Chem. Ber.* 38, 670 (1905).

⁸ E. H. WHITE und H. SCHERER, *Tetrahedron Lett.* 758 (1961).

The Enhancing Effect of EDTA on the Antibacterial Activity of Nalidixic Acid against *Pseudomonas aeruginosa*

Nalidixic acid, one of a series of 1,8-naph-thyridine derivatives, was first synthesized by LESHER et al.¹ and introduced into general clinical use in 1964. In vitro and in vivo experience suggests that the medication has many advantages over other available agents (McDONALD²). However, as in other antibacterial agents, the microbial resistance is induced relatively quickly, especially in the case of *Pseudomonas aeruginosa* (BUCHBINDER et al.³). During treatment or during performance of in vitro studies, susceptible microorganisms are eradicated, leaving their resistant counterparts to emerge. The epidemiological importance of these organisms is unknown, but it

is conceivable that they may become prevalent in a hospital environment in which nalidixic acid is used extensively. Besides this epidemiological hazard, the chance that resistant organisms will develop in 25% of patients treated with nalidixic acid sharply limits the usefulness of the drug (RONALD et al.⁴). Therefore we attempted, in

¹ G. Y. LESHER, E. J. FROELICH, M. D. GRUETT, J. H. BAILEY and R. P. BRUNDAGE, *J. mednl pharm. Chem.* 5, 1063 (1962).

² D. F. McDONALD and H. B. SHORT, in *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Ed. J. C. SYLVESTER; New York 1965), p. 628.

³ M. BUCHBINDER, J. C. WEBB, LA V. ANDERSON and W. R. McCABE, in *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Ed. J. C. SYLVESTER; New York 1963), p. 308.

⁴ A. R. RONALD, M. TRUCK and R. G. PETERSDORF, *New Engl. J. Med.* 275, 1081 (1966).