

Fig. 2. Cortical vascular resistance as a function of blood pressure in untreated animals (broken line) and in animals given 10 mg of furosemide i.p. (full line).

chloride electrode at the neck were connected to the input of a Keithley 414 A Picoammeter, which output led to a D.C. channel of a Nihon-Kohden polygraph to record permanently the electrocorticogram and the change in hydrogen current. Hydrogen was admitted to the tracheal cannula and the gas flow maintained constant until the current from the tissue electrode showed a steady state. Hydrogen flow to the tracheal cannula was then stopped and the desaturation curve recorded. The half time for washout was determined from the record and local blood flow calculated from it as described elsewhere<sup>7</sup>. To allow the topical application of the drug, a ring, of 3.5 mm internal diameter and 2 mm height, was positioned over the exposed cerebral cortex by means of a micro-manipulator. The rest of the cortex not covered by the ring was sealed with vaseline. The ring was provided with inlet and outlet tubing connected to syringes to allow renewal of artificial C.S.F. in which furosemide was dissolved. In a group of animals, a femoral artery was cannulated in addition and blood pressure permanently recorded by means of Statham P 23 BB transducer connected to a Beckman polygraph.

**Results and discussion.** Topical application of furosemide at the concentration of 10 mg/ml induced a significant increase in cortical blood flow (Figure 1). The change in blood flow did not reach a maximum in the first determination after application but grew steadily as time ensued, a fact probably dependent on diffusion of the drug into the cortex. In the experiments in which the drug was administered systemically, cortical vascular resistance (CVR) was calculated from flow and pressure data. A positive correlation was found between blood

pressure and CVR representative of autorregulation, both in controls and treated animals. The slope of the regression line, however, was significantly lower in the group receiving the drug (Figure 2). From these results it is concluded that systemic furosemide is effective in decreasing cortical vascular resistance, although a correlation between CVR and blood pressure (autorregulation) is still demonstrable under the drug.

The mechanism by which furosemide decreases resistance of cortical vessels cannot be discovered by the present experiments but it probably depends on a direct action on vascular smooth muscle.

**Resumen.** Se estudió el efecto de furosemida administrada tópicamente o sistémicamente sobre el flujo sanguíneo cortical en la rata, medido por el método de la desaturación de hidrógeno. Se encontró que por ambas vías de administración la droga produce una disminución significativa de resistencia vascular cortical.

A. A. ROVERE and O. U. SCREMIN<sup>8</sup>

*Departamento Ciencias Fisiológicas, Universidad de Rosario, Santa Fe 3100 (Rosario, Argentina), 2 July 1973.*

<sup>7</sup> O. U. SCREMIN, A. A. ROVERE, A. RAYNALD and A. GIARDINI, *Stroke* 4, 232 (1973).

<sup>8</sup> Investigators from Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina.

## Influence du DDT sur la population germinale des gonades indifférenciées de jeunes embryons de Poulet et de Caille

Dans des travaux antérieurs<sup>1,2</sup>, nous avons mis en évidence un fort déficit en cellules germinales primordiales dans les gonades embryonnaires d'oiseau, sous l'effet d'un pesticide organochloré: le DDT. C'est ainsi, qu'aux stades 29 pour le poulet<sup>3</sup> et 20 pour la caille<sup>4</sup>, l'index gonocytaire des embryons issus d'œufs traités au DDT, à la concentration de 5 g par l d'eau, n'est que de 37% chez le poulet et 43% chez la caille (celui des embryons témoins est de 100%). Le dénombrement des gonocytes en voie de division et de ceux en dégénérescence (cellules hypertrophiées) indique que le DDT n'inhibe que faiblement le pouvoir mitotique mais provoque, par contre, la pycnose de nom-

breuses cellules. Il ne semble pas toutefois que ces deux faits puissent motiver entièrement le fort déficit des gonades en cellules germinales. Pour essayer de déterminer à quel moment le pesticide agit sur la lignée germinale, nous dénombrons les gonocytes dans les ébauches gonadiques à un stade plus précoce du développement, à la fin de leur phase de migration.

<sup>1</sup> D. DAVID, *Experientia* 29, 815 (1973).

<sup>2</sup> D. DAVID, *Archs Anat. Histol. Embryol.* 56, sous presse (1973).

<sup>3</sup> V. HAMBURGER et H. L. HAMILTON, *J. Morph.* 88, 49 (1951).

<sup>4</sup> A. M. ZACCHERI, *Archo ital. Anat. Embriol.* 66, 36 (1961).

**Matériel et méthodes.** Les œufs de poule de race Hubbard et de caille (*Coturnix coturnix japonica*) de la souche élevée dans le laboratoire « Caille de l'Est » sont plongés, au stade non incubé, pendant une courte durée (30 sec), dans une suspension aqueuse de DDT commercial dosé à 50% de substance active. La concentration employée est de 5 g/l d'eau tiédie, ce qui correspond à la quantité conseillée par le fabricant pour l'épandage du produit. A titre de témoins, des œufs sont immergés dans de l'eau pure, dans les mêmes conditions de température, d'âge et de durée.

Les dénombrements gonocytaires dans les gonades sont pratiqués sur des embryons de poulet ayant atteint le stade 24 suivant HAMBURGER et HAMILTON<sup>3</sup> et sur des embryons de caille au même niveau de développement (stade 18 de ZACCHEI<sup>4</sup>). Comme dans les travaux antérieurs, nous déterminons le nombre moyen de cellules germinales présentes dans les deux gonades, l'erreur standard et l'intervalle de confiance avec un coefficient de sécurité de 95%. Nous calculons également le nombre moyen de gonocytes en division ou bien en cours de pycnose.

**Résultats.** Le taux de mortalité des embryons issus d'œufs traités au DDT s'élève à 18% chez le poulet (17 morts sur 92 embryons) et à 22% chez la caille (14 morts sur 108 individus). Pour les embryons témoins, ce taux est d'environ 4 à 5% (4 morts sur 93 embryons chez le poulet, 4 sur 84 chez la caille). Si l'on compare ces pourcentages à ceux obtenus aux stades 29 dans le cas du poulet (21%) et 20 dans celui de la caille (22%), on constate qu'ils sont sensiblement égaux ou légèrement plus faibles.

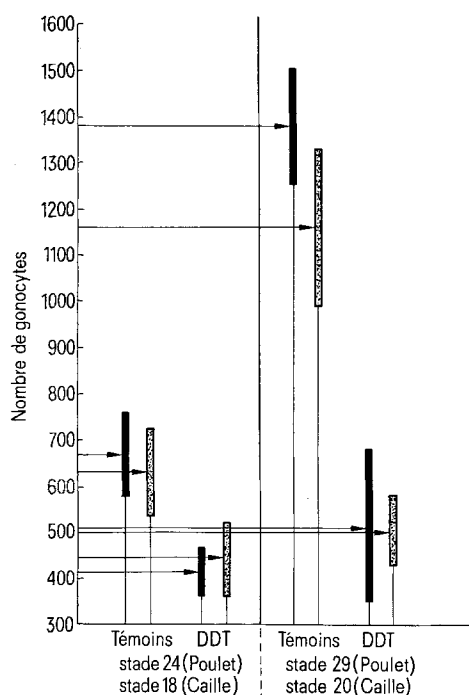
Aux jeunes stades étudiés ici, la différence de taille entre les embryons témoins et les embryons traités, déjà

observée plus avant dans le développement<sup>1,2</sup>, est également sensible. Ainsi, près de 90% des embryons issus d'œufs traités au pesticide sont plus petits que les témoins bien qu'ils atteignent, comme ces derniers, le stade 24 pour le poulet et 18 pour la caille.

En ce qui concerne le nombre de gonocytes présents dans les gonades, le Tableau I donne la récapitulation des résultats. Chez le poulet, on dénombre en moyenne 670 cellules germinales primordiales dans les ébauches gonadiques des embryons témoins, et seulement 415 après traitement au pesticide. Dans le cas de la caille, le nombre moyen de gonocytes est de 633 chez les témoins et de 445 chez les embryons issus d'œufs imprégnés au DDT.

Le pourcentage de cellules germinales des embryons traités, par rapport à celui des témoins que nous considérons égal à 100%, est de 61% chez le poulet et 70% chez la caille. Si l'on compare ces index gonocytaires à ceux obtenus à des stades plus tardifs du développement, soit 37% au stade 29 pour le poulet et 43% au stade 20 pour la caille, on remarque qu'ils sont nettement plus élevés. Ces résultats montrent que l'effet du DDT doit s'exercer progressivement; déjà sensible chez les jeunes embryons, il est encore plus prononcé après quelques heures supplémentaires d'incubation.

Si nous représentons (Figure), par une bande continue pour le poulet et pointillée pour la caille, les intervalles de confiance déterminés chez les embryons témoins et après traitement aux stades équivalents de développement 24 (poulet) et 18 (caille), et que nous portons sur le même schéma les intervalles obtenus antérieurement pour les stades 29 (poulet) et 20 (caille), nous constatons les faits suivants: La population gonocyttaire des ébauches gonadiques du poulet est très voisine de celle de la caille prise à un stade équivalent de développement et après traitement semblable. Ainsi, pour chaque catégorie d'expériences, les bandes continue et pointillée sont situées au même niveau de l'échelle. Aux jeunes stades, l'écart entre la population germinale des embryons traités et celle des témoins est plus faible qu'à un âge plus avancé. Après traitement au DDT à la concentration de 50/00, le nombre moyen de cellules germinales dans les ébauches gonadiques des jeunes embryons par rapport à celui des plus âgés, n'est que légèrement inférieur: chez le poulet, il est de 513 au stade 29 pour 415 au stade 24, et chez la caille, de 505 au stade 20 pour 445 au stade 18. Par contre, aux stades 24 (poulet) et 18 (caille), le nombre moyen de gonocytes chez les témoins est déjà nettement plus élevé que celui des gonades traitées au DDT et prélevées aux stades 29 (poulet) et 20 (caille).



Représentation graphique de la population germinale des gonades d'embryons de poulet et de caille issus d'œufs témoins et d'œufs traités au DDT, prélevés à deux âges différents: aux stades 24 et 29 pour le poulet, 18 et 20 pour la caille. Les intervalles de confiance sont schématisés par une bande continue chez le poulet et pointillée chez la caille. Pour chaque série, une flèche indique le nombre moyen de cellules germinales.

Tableau I. Dénombrement des cellules germinales dans les crêtes génitales d'embryons de poulet et de caille issus d'œufs témoins et d'œufs traités au DDT

	Poulet Témoins	DDT	Caille Témoins	DDT
Nombre de cas	25	27	23	23
N° moyen de gonocytes dans les 2 gonades	670	415	633	445
Gonade gauche	(524)	(307)	(471)	(308)
Gonade droite	(146)	(108)	(162)	(137)
Erreur standard	42	28	48	43
Intervalle de confiance (coef. de séc. 95%)	584-756	358-472	534-732	357-533
Index gonocyttaire (%)	100	61	100	70

Tableau II. Dénombrement des cellules germinales en division (MGm) et en dégénérescence dans les ébauches gonadiques d'embryons de poulet et de caille issus d'œufs témoins et d'œufs traités au DDT

	Poulet Témoins	DDT	Caille Témoins	DDT
N° moyen de gonocytes dans les 2 gonades (MG)	670	415	633	445
MGm (mitoses)	24	7	26	12
MGm/MG	1/27	1/59	1/24	1/57
% de	2	10	4	20
MG en dégénérescence	0,3	2,4	0,6	4,5

Les résultats des dénombrements de cellules germinales en cours de mitose ainsi qu'en dégénérescence sont donnés dans le Tableau II. Dans le premier cas, après simple immersion des œufs de poule et de caille dans une suspension aqueuse de DDT, l'index mitotique des gonocytes contenus dans les ébauches gonadiques est deux fois plus faible que celui des embryons témoins analysés au même stade de développement.

Quant aux cellules germinales pycnotiques, chez les embryons témoins, elles se rencontrent à des pourcentages très faibles, voisins de ceux obtenus pour des embryons plus âgés<sup>2</sup>. Par contre, après traitement au DDT, les taux de gonocytes en dégénérescence sont nettement plus élevés mais néanmoins légèrement inférieurs à ceux déterminés à un stade ultérieur du développement.

**Conclusions.** Aux jeunes stades étudiés ici, il existe un décalage sensible entre la population germinale des em-

bryons témoins et celle des embryons traités. Ceci montre que le pesticide agit déjà à un stade plus précoce du développement, peut-être avant ou lors de la migration des gonocytes du croissant germinale vers les ébauches gonadiques. Des dénombrements à des stades plus précoces, nous permettront de conclure sur ce point. Cependant, le fait que le déficit au stade 29 pour le poulet et 20 pour la caille soit deux fois plus élevé qu'aux stades 24 (poulet) et 18 (caille), indique que l'effet du pesticide sur la population germinale des gonades doit s'exercer progressivement, peut-être par blocage des mitoses (phénomène important aux jeunes stades, sinon à un âge plus avancé) ainsi que par dégénérescence d'une partie des gonocytes déjà en place dans les gonades.

**Summary.** In consequence of treatment of bird's eggs with DDT, before the incubation, a strong reduction of gonadic germ stocking is observed. However, at the 24 (chick) and 18 (quail) stage of embryonic development, the germ deficit is lower than at older stages: 29 (chick) and 20 (quail). The pesticide provokes a significant decrease in the mitotic activity and some pycnotic hypertrophy of several gonocytes. DDT acts already at the earliest stages of development.

D. DAVID

Laboratoire de Biologie Animale,  
Equipe associée au CNRS n° 408,  
Université de Clermont, B.P. 45,  
F-63170 Aubière (France),  
18 janvier 1974.

## Effects of the 3',5'-Cyclic Phosphates of 2-Methylthioadenosine, 2-Chloroadenosine and Adenosine on Platelet Aggregation

Exogenous adenosine 3',5'-cyclic phosphate (cAMP) has been reported to be a weak inhibitor of the ADP-induced aggregation of human platelets<sup>1-3</sup>. Derivatives of ADP having methylthio or chlorogroups in position 2 of the purine ring possess greatly enhanced platelet aggregating properties compared to ADP<sup>4</sup>, and 2-methylthioadenosine 5'-phosphate and 2-chloroadenosine are more potent inhibitors of platelet aggregation than, respectively, AMP and adenosine<sup>5-7</sup>. In view of the potency enhancing effects of these two substituents on the activity of certain adenine nucleotides in platelet systems, we prepared 2-methylthioadenosine 3',5'-cyclic phosphate (c2-MeSAMP) and 2-chloroadenosine 3',5'-cyclic phosphate (c2-ClAMP)<sup>8</sup> and investigated their effects, and those of cAMP, on the ADP-induced clumping of platelets in sheep platelet-rich plasma (PRP).

**Synthetic procedures.** c2-MeSAMP and c2-ClAMP were obtained by the cyclization of 2-methylthioadenosine 5'-phosphate<sup>5</sup> and 2-chloroadenosine 5'-phosphate<sup>7</sup> respectively, using a modification of the method of SMITH et al.<sup>9</sup>. A solution of 0.5 mmole of the appropriate AMP analog as its 4-morpholine-*N,N'*-dicyclohexylcarboxamidinium salt in anhydrous pyridine (50 ml) was added to a refluxing solution of dicyclohexylcarbodiimide (412 mg, 2 mmoles) in 50 ml pyridine over a period of 2 h, and refluxing was continued for a further 1.5 h. The solution was evaporated and the residue was treated with H<sub>2</sub>O

(40 ml). Dicyclohexylurea was removed by filtration and washed with H<sub>2</sub>O, and the combined filtrate and washings were concentrated to about 3 ml and passed through a column (1 × 5 cm) of Bio-Rad AG2 (formate form). The column was washed with H<sub>2</sub>O (in the preparation of c2-ClAMP a by-product which had a yellow fluorescence in UV-light was eluted at this stage), and the cyclic nucleo-

<sup>1</sup> N. R. MARQUIS, R. L. VIGDAHL and P. A. TAVORMINA, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **36**, 965 (1969).

<sup>2</sup> S. CLAYTON, G. V. R. BORN and M. J. CROSS, *Nature, Lond.* **200**, 138 (1963).

<sup>3</sup> E. W. SALZMAN and L. LEVINE, *J. clin. Invest.* **50**, 131 (1971).

<sup>4</sup> G. GOUGH, M. H. MAGUIRE and F. PENGLIS, *Molec. Pharmac.* **8**, 170 (1972).

<sup>5</sup> F. MICHAL, M. H. MAGUIRE and G. GOUGH, *Nature, Lond.* **222**, 1073 (1969).

<sup>6</sup> M. H. MAGUIRE and F. MICHAL, *Nature, Lond.* **217**, 571 (1968).

<sup>7</sup> G. GOUGH, M. H. MAGUIRE and F. MICHAL, *J. med. Chem.* **12**, 494 (1969).

<sup>8</sup> A brief report of the synthesis of c2-ClAMP recently appeared: B. JASTORFF and W. FREIST, *Angew. Chem., int. edn. Engl.* **11**, 713 (1972).

<sup>9</sup> M. SMITH, G. I. DRUMMOND and H. G. KHORANA, *J. Am. chem. Soc.* **83**, 698 (1961).