

Table I

Influence of orally-administered amphetamine on the food intake (g/day) of normal and of hyperphagic rats

Normal animals				Hyperphagic animals			
Rat. No.	Pre-treatment week	Treatment week	Post-treatment week	Rat No.	Pre-treatment week	Treatment week	Post-treatment week
<i>I</i>	20.9	16.8	23.2	1	43.4	23.9	34.5
<i>A</i>	21.7	18.7	26.1	5	32.7	5.3	0.0
<i>B</i>	22.6	17.8	25.5	6	38.7	24.1	44.8
<i>C</i>	24.7	19.2	23.6	7	44.5	5.8	27.9
<i>F</i>	22.9	16.7	25.0	16	40.5	29.7	38.5
Average	22.6	17.8	24.7	Average	40.0	17.8	29.1

Table II

Influence of subcutaneously-administered amphetamine on the food intake (g/day) of normal and of hyperphagic rats

Normal animals				Hyperphagic animals			
Rat No.	Pre-treatment week	Treatment week	Post-treatment week	Rat No.	Pre-treatment week	Treatment week	Post-treatment week
<i>A</i>	24.3	22.7	22.8	1	33.2	14.8	36.0
<i>B</i>	23.1	19.9	24.7	6	32.9	10.7	29.6
<i>D</i>	27.6	21.8	21.6	16	43.3	26.1	36.3
Average	25.0	21.5	23.0	Average	36.5	17.2	34.0

so either by stimulating the satiety center or by inhibiting the feeding center. The evidence presented in this report favors the latter view. It would be of interest to know whether the increased electrical activity recorded in the medial portion of the hypothalamus following the parenteral administration of amphetamine (BROBECK *et al.*¹) would also occur in animals whose ventromedian nucleus (satiety center) had been bilaterally destroyed.

F. R. STOWE, Jr. and A. T. MILLER, Jr.

Department of Physiology, University of North Carolina Medical School, Chapel Hill, N. C., November 5, 1956.

Zusammenfassung

Amphetamin vermindert die Nahrungsaufnahme von durch beidseitige Zerstörung des ventromedialen Nucleus des Hypothalamus hyperphagisch gemachten Ratten. Es scheint den Appetit durch die Hemmung des lateralen Nahrungsaufnahmezentrums, nicht aber durch Reizung des medialen Sättigungszentrums herabzusetzen.

Activité gonadotrope d'un extrait d'urines de femmes en ménopause*

Dans une première communication¹, nous avons pu mettre en évidence l'effet de gonadostimulines provenant de l'urine de femmes en ménopause, sur le testicule du

* 2^e Communication: Effets sur les ovaires de rates impubères hypophysectomisées.

¹ R. BORTH, B. LUNENFELD et H. DE WATTEVILLE, *Exper.* 10, 266 (1954).

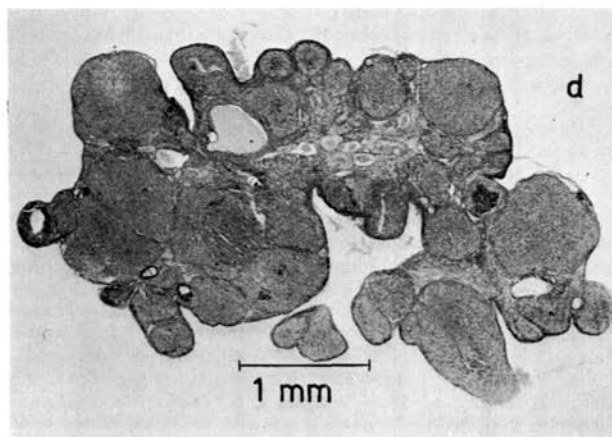
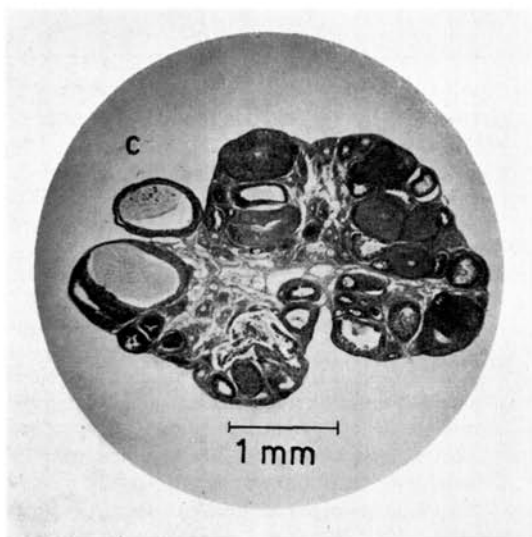
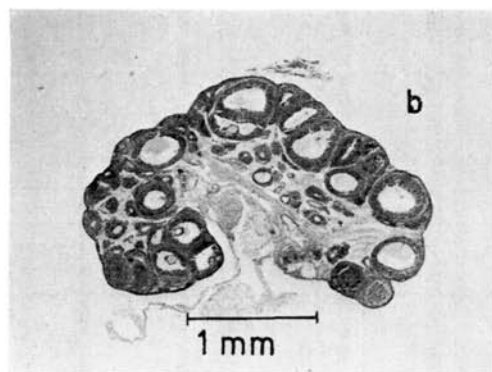
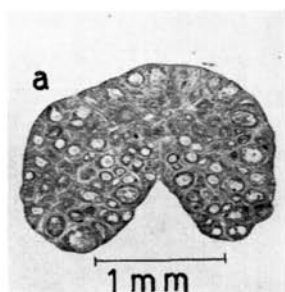
rat impubère hypophysectomisé. Avec 8 mg de la préparation «HMG-A» employée alors – dose équivalente à 3,2 unités² – nous avons obtenu non seulement le rétablissement morphologique et fonctionnel des cellules interstitielles avec sécrétion d'androgènes (démontrée par la croissance de la prostate ventrale), mais également une spermatogenèse allant jusqu'à la formation de spermatozoïdes. A la même époque, nous avons injecté des doses équivalentes du même extrait à des rates impubères hypophysectomisées sans obtenir une augmentation des poids ovariens ou utérins. A l'examen histologique, les ovaires ne montraient ni une maturation des follicules ni la formation de corps jaunes. Nous n'avons pas pu examiner l'effet biologique de doses plus élevées de la même préparation en raison de leur toxicité.

Par adsorption sur permutite, JOHNSON³ a obtenu récemment, à partir d'urines de femmes en ménopause, des extraits gonadotropes très actifs et peu toxiques, avec un rendement d'environ 5 mg/l. Nous communiquons dans ce travail les effets biologiques obtenus avec une de ces préparations, nommée HMG-J₂⁴.

² Selon un accord de plusieurs laboratoires européens (2nd Meeting of the Gonadotrophin Club, Birmingham, 17 au 19 août 1955), une unité de gonadostimulines hypophysaires urinaires humaines a été définie provisoirement comme égale à l'activité gonadotrope contenue dans 1,0 mg de la préparation HMG-20A qui a été préparée par la Maison Organon à Newhouse en Ecosse, à partir d'une grande quantité d'urine provenant de très nombreuses femmes en ménopause (Human Menopausal Gonadotrophin). Cette préparation sert actuellement comme standard de référence pour le dosage des gonadotrophines urinaires humaines en dehors de la grossesse. Cf. J. A. LORAIN et J. B. BROWN, *J. clin. Endocrin.* 16, 1180 (1956).

³ S. G. JOHNSON, *Acta endocr. (Kbh.)* 20, 101 (1955).

⁴ Nous remercions vivement le Dr S. G. JOHNSON (Copenhague) qui a bien voulu mettre à notre disposition des échantillons de cet extrait.



L'activité gonadotrope totale de l'extrait a été dosée sur des *souris impubères intactes* en comparant l'augmentation du poids utérin provoquée par l'injection de 56 et de 112 μg de l'extrait à celle suivant l'administration de 0,8 et 1,6 unités du standard HMG-20A. Nous avons employé 5 animaux par dose et les résultats ont été évalués suivant la méthode simplifiée de GADDUM⁵. Les indices de précision du dosage étaient $\lambda = 0,16$, $L = 6$ et $g = 0,25$, et l'activité trouvée du HMG-J₂ était de 22 U/mg, avec les limites fiduciaires (pour une probabilité de $P = 0,05$) de 16 et 41 U/mg. Pour la même préparation et avec la même méthode de dosage, LORAINÉ (communication personnelle) a trouvé 42 (34...56) U/mg et $\lambda = 0,07$, $L = 14$ et $g = 0,06$. En combinant ces deux résultats par une méthode approximative⁶, on peut admettre que l'activité du HMG-J₂ est probablement de 37 (30...46) U/mg. Il est important de souligner que, dans ces deux dosages sur la souris intacte, la courbe des réponses du HMG-J₂ était parfaitement parallèle à celle du standard. Il n'y a donc aucune indication que les deux extraits diffèrent qualitativement quoique l'un fût préparé par adsorption sur permutoite, l'autre par adsorption sur kaolin.

En nous basant sur l'activité dosée sur les souris intactes, nous avons injecté des doses élevées de la même préparation HMG-J₂ à des *rates impubères hypophysectomisées*. Chaque animal a reçu ou 460 ou 920 μg divisés en trois portions égales qui ont été administrées, par voie sous-cutanée, le 5^e, 6^e et 7^e jour après l'hypophysectomie. Les animaux survivants ont été sacrifiés le 8^e jour. Les crânes ont été ouverts pour contrôler si l'hypophysectomie avait été complète. Un petit débris grisâtre trouvé dans la selle turcique d'un des animaux, fut fixé et coupé et se révéla comme étant du sang coagulé. Les ovaires et les utérus ont été pesés et nous avons observé les poids suivants:

Dose du HMG-J ₂	Poids utérins mg	Poids ovariens mg
0 (témoin)	14	7
460 μg = 17 U	78	26
	60	25
	96	24
920 μg = 34 U	100	34
	61	61

Il y avait donc une augmentation du poids moyen des *ovaires* avec la dose croissante, mais le petit nombre des animaux survivants ne nous a pas permis d'obtenir une droite de régression statistiquement valable, en raison du fait connu que l'augmentation des poids ovariens provoquée par les gonadostimulines montre une grande

⁵ J. H. GADDUM, J. Pharmacol. 6, 345 (1953).

⁶ Après transformation en logarithmes, on calcule la moyenne pesée, le poids d'un résultat étant égal à la valeur réciproque du carré de l'intervalle fiduciaire. Les nouvelles limites fiduciaires sont placées à la distance $\pm e$ de la moyenne pesée, $(2e)^2$ étant égal à la valeur réciproque de la somme des poids.

Légende des figures à gauche:

Coupes histologiques d'ovaires de rates, fixés à la formoline, colorés à l'hématoxyline-éosine. a Animal impubère non traité, 8 jours après hypophysectomie. b, c Animaux impubères, 8 jours après hypophysectomie et traités: b avec 460 μg (17 U), c avec 920 μg (34 U) d'un extrait d'urine de femmes en ménopause. d Animal intact de 20 mois.

variabilité. La plus petite des deux doses a déjà entraîné une augmentation maximale des poids *utérins* si bien que les poids observés après la dose plus grande étaient du même ordre de grandeur. Les chiffres indiquent cependant que l'extrait administré a stimulé la croissance de l'ovaire et la sécrétion d'œstrogènes par cet organe. Nous avons tâché d'étudier la nature de la réaction ovarique par un *examen histologique*.

Les ovaires prélevés ont été fixés dans la formaline à 4% et coupés en séries. Les coupes de 6 μ d'épaisseur ont été colorées à l'hématoxyline-éosine. Chez le témoin im-pubère hypophysectomisé non traité (fig. a), les follicules sont de grandeur variable mais tous relativement petits. Chez les trois rates hypophysectomisées ayant reçu 460 μ g (17 U) du HMG-J₂ (fig. b), nous avons vu des follicules plus larges que chez le témoin non traité, mais nous n'avons décelé ni une lutéinisation des follicules ni la formation de corps jaunes. Enfin, les ovaires des deux animaux traités par la double dose (920 μ g = 34 U) de l'extrait (fig. c) contiennent non seulement des follicules en maturation à grande cavité, mais également des corps jaunes typiques, démontrant la présence du facteur lutéinisant. Cette image se rapproche donc de celle qu'on voit chez l'animal intact âgé de 20 mois (fig. d).

Ce travail a bénéficié de l'appui du Fonds national suisse de la Recherche scientifique. Nous tenons à remercier la CIBA S.A. à Bâle pour les rates hypophysectomisées et Melles K. SCHNIDER et E. SIMON pour leur précieuse assistance technique.

R. BORTH, B. LUNENFELD,
G. RIOTTON et H. DE WATTEVILLE

Laboratoire d'Hormonologie de la Maternité, Genève, le 30 novembre 1956.

Summary

In agreement with earlier observations on hypophysectomized male rats, a purified extract from pooled menopausal urine has been shown to contain follicle-stimulating (FSH) as well as luteinizing (LH) activity. Its administration to immature hypophysectomized female rats increased ovarian and uterine weights and induced follicle growth and the formation of corpora lutea. If the activity of the extract is measured in standardized units by bioassay in intact female mice using the uterine weight, the dose needed for corpus luteum formation in the hypophysectomized female rat seems to be approximately ten times higher than the dose producing interstitial cell repair and complete spermatogenesis in the hypophysectomized male.

Adenosine Triphosphate Concentration in Guinea Pig Muscle after Denervation

It has been reported in a previous paper¹ that the ATP content is strongly decreased in the muscles of guinea pigs treated with tetanus toxin. ATPase activity of isolated myofibrils is increased. It is known that tetanus toxin acts mainly on the cells of the nervous system and that tetanus does not occur in denervated muscles. It therefore seemed interesting to study the effects of denervation on ATP content and on ATPase activity of the

muscles of normal guinea pigs and of guinea pigs treated with tetanus toxin.

Male guinea pigs weighing 250–300 g fed on a standard diet were used. They were divided in three groups. The first one consisted of normal animals, in which the sciatic nerve of the right leg was cut and removed for the length of 1 cm. These animals were killed by decapitation at different times after denervation. The second group received a similar treatment, but 10 lethal doses of tetanus toxin² were injected intramuscularly in the left leg of the animals immediately after denervation of the other leg. These animals were killed after the development of a generalized tetanus. The third group consisted of guinea pigs which were submitted to the same surgical operation as other animals, but without cutting the nerve. These animals were retained as normal controls.

Immediately after the death of the animals, gastrocnemius muscles of both legs were removed, deprived of all tendons and aponeurosis, weighed and homogenized in the cold room at 2° with a Potter-Elvehjem homogenizer, 0.25 M sucrose being the suspension medium. The methods for the isolation of sarcosomes and of myofibrils, as well as those for the determination of nitrogen and of phosphorus and for the fractionation of organic phosphorylated compounds, were the same as have been reported in the previous paper¹. Oxidative phosphorylation was determined according to DIANZANI and SCURO³. The amount of sarcosomes used corresponded to 200 mg tissue. ATPase activity of sarcosomes and of myofibrils was studied in a medium containing 0.067 M borate buffer, pH 6.9, $1 \cdot 10^{-3}$ M MgCl₂; $1 \cdot 10^{-3}$ M CaCl₂; 0.03 M ATP potassium salt. This medium was made isotonic for red cells by preparing all solutions in 0.25 M sucrose. The final volume was 3 ml. The reaction mixture was incubated for 15 min at 37°. After this time the reaction was stopped by addition of 2 ml 40% cold trichloroacetic acid.

As shown in Table I, denervation produced a marked depletion of ATP from the muscles, as well as a corresponding increase of ADP. It is interesting to note that in guinea pigs treated with tetanus toxin, ATP decreased more in denervated non-contracted muscles than in those of the other leg which showed tetanus.

Table II shows that P:O ratios are markedly decreased in the denervated muscles and that this decrease is still consistent 12–16 h after cutting of the nerve. ATPase activity increases in the sarcosomes from the denervated muscle in the very first hours after denervation, while ATPase activity of myofibrils does not show any modification. 12–16 h after denervation, a decrease of ATPase activity occurs in both sarcosomes and myofibrils. No difference was found between normal guinea pigs and those treated with tetanus toxin, with respect to the behaviour of ATPase activity and of P:O ratios in the denervated muscles. It is interesting to remark that ATPase activity of the non-denervated leg, which showed tetanus, was increased in animals treated with toxin, as it has been pointed out in the previous paper¹. Phase contrast examination of denervated muscles showed the presence of sarcosome swelling.

It seems evident from these experiments that the decrease of ATP occurring in denervated muscles is the consequence of at least two phenomena, *i.e.* decreased synthesis through oxidative phosphorylation, and increased destruction through ATPase action. It seems probable that these phenomena are concerned with

¹ L. MICHELAZZI, M. A. MOR, and M. U. DIANZANI, *Exper.* 11, 73 (1955).

² Istituto Sieroterapico Toscano, Siena, Italy.

³ M. U. DIANZANI and S. SCURO, *Biochem. J.* 62, 205 (1956).