

Results and discussion. The results obtained are presented in the figure. One may see that incorporation of the different amino acids used is similar. Very little radioactivity is present in the first hour after the amino acid injection and the maximum occurs between 2 and 4 h. The incorporation of alanine and glycine presents its maximum around $2\frac{1}{2}$ h, while for histidine this maximum is around 4 h. The maximal incorporation of methionine and phenylalanine is between those two values, i.e. $3\frac{1}{2}$ h. No significance can be attributed to these differences in time owing to the variability observed from animal to animal, as already described in the experiment with glycine¹.

It is difficult to compare the results regarding the specific activity of the samples of pancreatic juice proteins obtained with the different amino acids injected. Although the same amount of μC was injected in all animals, only half of this activity is available to the cell in the case of the DL-amino acids. Even so, wide discrepancies are observed, probably due to the different content of the several amino acids and their conversion products in the proteins studied.

The data above presented suggest that the results and conclusions obtained working with glycine may be extended to the other four amino acids, i.e. that the rat pancreatic juice proteins are synthesized from the free amino acids of the blood.

HANNA A. ROTHSCILD, G. C. HIRSCH⁴,
and L. C. U. JUNQUEIRA

Laboratory for Cell Physiology, Faculdade de Medicina,
Universidade de São Paulo, Brasil, November 19, 1956.

Zusammenfassung

Es wurde der zeitliche Verlauf des Einbaus radioaktiver Aminosäuren (Phenylalanin- 3-C^{14} , Alanin- 1-C^{14} , Histidin- 2-C^{14} und Methionin- S^{35}) in die Proteine des Pankreassaftes der Ratte untersucht. Ein Maximum des Einbaus kommt zwischen der zweiten und vierten Stunde nach Injektion der Aminosäuren vor, während in der ersten Stunde praktisch keine radioaktiven Proteine nachgewiesen werden konnten. Die Ergebnisse werden verglichen mit denen früher beschriebener Versuche mit Glyzin- C^{14} .

⁴ Permanent address: Zoologisches Institut, Göttingen.

Versuche zur chromatographischen Trennung der im Augentstiel von *Astacus astacus* enthal- tenen myotropen Wirkstoffe

Nachdem durch frühere Arbeiten erwiesen war, dass im Augentstiel des Flusskrebsses (*Astacus astacus*) ein Wirkstoff gebildet wird, der die Bewegungen isolierter Därme von Insekten (Larven von *Tenebrio molitor*)¹ und Säugern (Meerschweinchen und Kaninchen)² positiv myotrop beeinflusst, wurden Versuche unternommen, die aus dem Augentstiel gewonnenen Extrakte durch Methoden der Papierchromatographie zu reinigen. Die

in diesem Extrakt enthaltenen Substanzen sollten getrennt werden, um nach Möglichkeit den Wirkstoff zu isolieren und seine chemische Natur näher zu definieren.

Zur Extraktbereitung wurden jeweils 2 Paar Augentstiele im Achatmörser zerrieben, in 0,15 ml Aqua destillata aufgenommen und 15 min bei 2400 Touren zentrifugiert. Von dem überstehenden Extrakt wurden jeweils 0,02 ml auf das Papier gebracht. Der Startpunkt war 3 cm vom unteren Rand entfernt.

Zur Entwicklung der Chromatogramme wurde aufsteigend in Rundzylindern von 38 cm lichter Höhe und 9 cm Durchmesser gearbeitet. Als die geeignetste Papiersorte erwies sich S und S 2043 a Gl. Als Lösungsmittel diente ein Gemisch aus Butanol-Essigsäure-Wasser 8:5:2, eine Abwandlung des sogenannten «Patridge-Gemisches»³.

Nachdem die aufgebrauchte Lösung gut getrocknet war, wurden die Chromatogramme 10–20 h in die Atmosphäre des Lösungsmittels gebracht. Dann wurde entwickelt. Die Laufzeiten betrugen 16–72 h, die Laufstrecken 15–30 cm. Die Chromatogramme wurden danach getrocknet und die einzelnen Flecke mit Ninhydrin (2% in 95% Butanol + 5% 2n Essigsäure) sichtbar gemacht.

Es zeigten sich dann 6 Flecke, deren R_F -Werte bei 0,079, 0,112, 0,174, 0,207, 0,250 und 0,368 liegen. Der erste Fleck hat im Kern eine rosa Färbung, die nach dem Rand zu violett wird. Die übrigen 5 Flecke färben sich violett an.

Nicht nachgewiesen werden konnten in den Chromatogrammen Zucker oder allgemein reduzierende Substanzen (Reagenzien: 1% KMnO_4 + 2% Na_2CO_3 in wässriger Lösung, sowie 1% Anilinphthalat in wassergesättigtem Butanol), Adrenalin und Noradrenalin (Reagenz: 2% 4-Dimethyl-aminobenzaldehyd in Butanol), sowie Cholin und dessen Ester (Reagenz: 0,2% Dipikrylamin in Aceton-Wasser 1:1). Auch freie Sulfhydrylgruppen konnten durch Besprühen mit 5% Nitroprussidnatrium in 5% Essigsäure, die mit Ammoniumsulfat gesättigt ist, und anschließendes Einbringen in eine Atmosphäre von konzentriertem Ammoniak nicht festgestellt werden. Freie Sulfhydrylgruppen färben sich nach dieser Methode leuchtend rot, um später in eine beständige Blaufärbung überzugehen.

Zur Prüfung der Wirksamkeit der einzelnen Substanzen wurden auf 7,5 cm breiten Papierstreifen 6 Chromatogramme nebeneinander entwickelt. Eines wurde abgetrennt und mit Ninhydrin sichtbar gemacht. Nach diesem Leitchromatogramm wurden aus den übrigen 5 Streifen die einzelnen Substanzen 24 h in $n/10$ Salzsäure eluiert. Die Eluate wurden nach dieser Zeit auf dem Wasserbade abgedampft, die Salzsäure abgeraucht und die Rückstände in 1 ml Warmblutringer aufgenommen.

Diese Extrakte wurden am isolierten Meerschweinchenileum untersucht. Hierbei zeigte sich, dass der positiv myotrope Wirkstoff in Zone 1 lokalisiert ist. Das Eluat dieser Zone ruft am isolierten Darm dieselben Bewegungsänderungen hervor (Steigerung von Tonus, Amplitude und Frequenz) wie der rohe Augentstiel-extrakt². Die Eluate aller anderen Zonen des Chromatogrammes waren ebenso wirkungslos wie die Eluate der durchgeführten Blindversuche.

Es ist somit möglich, die myotrop wirksame Phase von den anhaftenden Begleitstoffen zu trennen und, wenigstens in Lösung, mit dem isolierten Wirkstoff zu arbeiten.

¹ G. KOLLER, Verh. dtsch. Zool. Ges., Tübingen 1954, 18, 417 (1955).

² H. KUHNEN, Verh. dtsch. Zool. Ges., Erlangen 1955, 19, 117 (1956).

³ F. CRAMER, *Papierchromatographie*, 2. Aufl. (Verlag Chemie, Weinheim 1953).

Wie Farbwechselversuche mit der Sandgarnele (*Crangon crangon*) zeigten, ist der gefundene positiv myotrope Wirkstoff mit dem Farbwechsellhormon der Crustaceen nicht identisch: Garnelen, die an weissen, schwarzen und mittelhellen Untergrund angepasst waren, wurden Eluate der myotrop wirksamen Zone 1 injiziert. Die Tiere zeigten keine Farbveränderungen.

Zum Vergleich wurden aus Augentstielextrakten von *Crangon* Chromatogramme unter denselben Bedingungen, wie für *Astacus* beschrieben, entwickelt. Diese Chromatogramme sind denjenigen von *Astacus* gleich oder zumindest sehr ähnlich. Sie färben sich mit denselben Reagenzien in gleicher Weise an, und die Substanzen, die bei *Astacus* nicht nachweisbar waren, wurden hier ebenfalls nicht gefunden. Auch die R_F -Werte der einzelnen Zonen scheinen bei beiden Arten übereinzustimmen. Jedoch ist die Anzahl der Versuche, die mit *Crangon* durchgeführt werden konnten, zu gering, um hier bindende Aussagen zu machen.

Um einen weiteren Einblick in die chemische Natur des Wirkstoffes zu gewinnen, wurden Eluate der Zone 1 48 h in 5*N* Salzsäure gekocht und dann in einem 2dimensionalen Chromatogramm entwickelt. Es wurde hierbei nach der Methode von ZAHN³ vorgegangen. Dieses 2dimensionale Chromatogramm zeigte 6 Flecke, deren chemische Konstitution noch nicht näher bestimmt wurde. Jedoch geht aus diesen Versuchen hervor, dass der myotrop wirksame Bestandteil des Augentstielextraktes eine Verbindung ist, die aus mehreren Aminosäuren besteht. Es handelt sich also höchstwahrscheinlich um ein Peptid.

Eine ausführliche Besprechung der Versuche und ihrer Ergebnisse wird an anderer Stelle erfolgen.

G. KOLLER und H. KUHNEN

Zoologisches Institut der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, den 19. Dezember 1956.

Summary

The detection of two myotropic substances in the eyestalk and the brain of the crayfish *Astacus astacus* and the shrimp *Crangon crangon* was described². Both substances have an action on the isolated ileum of the guinea pig. The substance extracted from the eyestalk has a positive myotropic one, the substance extracted from the brain an inhibiting one.

Further a method is given for the separation and purification of the positive myotropic substance of the eyestalk by paper-chromatography.

Primary Cancer of the Liver in Rats after Subcutaneous Implantation of Pellets of Progesterone and Testosterone Propionate

The object of this communication is to report the development of primary hepatocellular carcinoma of the liver in castrated female rats implanted subcutaneously with pellets of testosterone propionate and progesterone.

During a recent investigation into the relation of diet to the incidence of spontaneous tumours in our strain of rat, the ovaries of aged female rats, receiving a diet which increased significantly the frequency of uterine

cancers, often contained large corpora lutea, the function of which was not reflected by the state of the vagina or uterus. In view of the presence of a large interstitial body on the ovary, together with the corpora lutea, it was suspected that the uterine and vaginal reactions were the consequence in part of the combined effects of variable amounts of progesterone and of androgen. The possibility was therefore entertained that prolonged stimulation with progesterone and testosterone might in some way be causally related to the increased incidence of uterine cancer observed in our experimental rats. Accordingly, this possibility was tested experimentally.

A group of 11, six-week old female rats, were castrated and immediately thereafter implanted subcutaneously with two pellets, one of progesterone (8 to 10 mg) and one of testosterone propionate (8 to 10 mg). The pellets were prepared in a special mould from the pure, crystalline hormones. As soon as palpation revealed a marked decrease in the size of either pellet, a further pellet was implanted while the rat was under ether anaesthesia. These rats received the same ration as fed our stock animals¹.

Six of the rats died from various causes between the 112th and 543 rd days of the experiment. Apart from reproducing the uterine and vaginal pictures observed in the rats used for the dietary experiments mentioned above, no noteworthy reactions were detected.

In one of the five surviving rats a greatly enlarged liver was palpated on the 696th day after the implantation of the pellets. The animal was killed and a large tumour was found in the left median lobe with multiple secondary nodules in the other lobes. Histological examination disclosed the tumour to be a primary liver cancer of the hepatocellular, trabecular variety. The main portal vein in the hilum contained masses of tumour cells and this was apparently responsible for widespread intrahepatic dissemination. Palpation of the abdomen of the 4 remaining rats disclosed the presence of another liver tumour in one rat which proved on microscopic examination also to be an hepatocellular carcinoma. Macroscopically, this tumour was 2 cm in diameter and was confined to the left lateral lobe. The rest of the liver appeared normal. No tumours were found at laparotomy in the other 3 rats, which are still alive.

The occurrence of two cases of primary liver cancer in this small series of rats is highly significant for the following reasons: (a) CURTIS and BULLOCK² found only 1 benign 'hepatoma' in 2450 rats surveyed during their study of tumours; (b) in 1954 we³ reported our failure to produce liver cancer by methods other than those requiring the use of carcinogens, despite the fact that we had induced many varieties of liver pathology in several hundreds of rats; (c) in a special study of spontaneously-occurring tumours in approximately 1500 rats in our colony we did not find a single case of primary liver cancer; (d) GUERIN⁴ commented on the absence of primary liver cancer in 16,500 rats investigated.

The liver tumours developing in our hormone treated rats were not preceded by cholangio-fibrosis, necrosis or cirrhosis. However, fibrosis did occur between and around the large cancerous nodules. In the same way as fibrosis of the liver can be dissociated from an antecedent

¹ J. GILLMAN, C. GILBERT, and I. SPENCE, *Cancer* 6, 494 (1953).

² F. D. CURTIS and M. R. BULLOCK, *J. Cancer Res.* 14, 1 (1930).

³ J. GILLMAN and C. GILBERT, *Cancer* 7, 1109 (1954).

⁴ M. GUERIN, D. C., *Tumeurs Spontanées des Animaux de Laboratoire* (Amédée Legrand 1954).