

The Semi-quantitative Determination of Cholesterol and Cholesteryl Esters by Paper Chromatography

In previous papers we described the one-dimensional separation of cholesterol and its esters¹. We mentioned the possibility of the semi-quantitative determination. Further details of this procedure are given here:

To 1 ml of blood serum 9 ml of ethanol-ether mixture 3:1 (v/v) were added. After 10 min standing, the mixture was centrifuged and 5 ml of clear supernatant were evaporated to dryness in a test tube. The residue having been extracted with 0.1 ml of chloroform, 0.04 ml of this solution were spotted on Whatman No. 3 paper impregnated with paraffin oil². The mixture of acetic acid-chloroform-paraffin oil 65:25:10 (v/v/v) was used as a mobile phase. After 12–15 h of ascending run, the chromatogram was dried and cut into strips 1 cm wide and these eluted with 3 ml of chloroform for 5–6 h at room temperature, in test tubes with occasional stirring. Then 1 ml of acetic anhydride and 0.1 ml of concentrated sulphuric acid were added and the density of the coloured solution was measured at 610 m μ after 10 min.

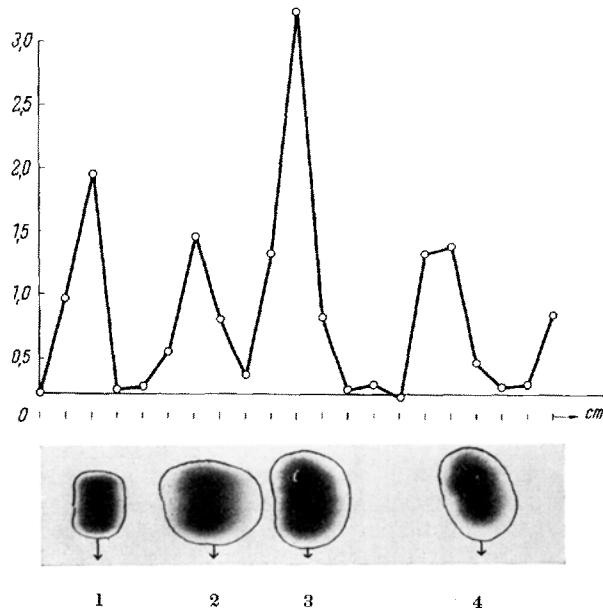


Fig. 1.—Mixture of synthetic cholesteryl esters. 1 Cholesteryl oleate; 2 Cholesteryl caproate; 3 Cholesteryl formate and acetate; 4 Cholesterol.

The calibration curve was prepared from the standard solution of cholesterol. The calculation was carried out by addition of all extinction values of every individual spot and subtraction of the blanks and then multiplication with the factor calculated from the calibration curve.

For the calculation of only relative percentage, it is possible to weigh the individual pieces of paper obtained by cutting out the individual peaks of the graph representing relation between the extinction values and the distances in cm.

The results are in good agreement with those obtained by other methods.

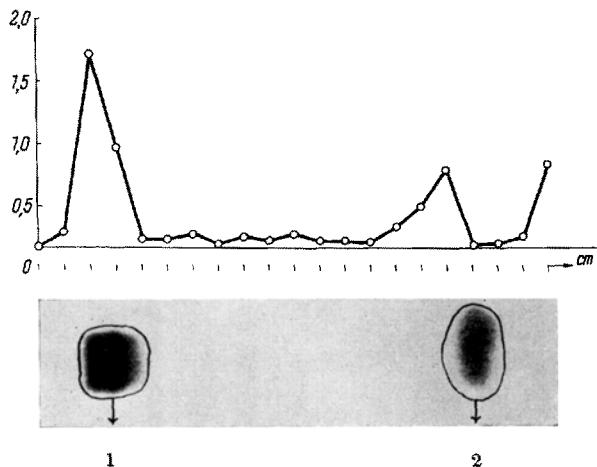


Fig. 2.—Human blood serum. 1 Cholesteryl esters with higher fatty acids (oleate, palmitate, linoleate); 2 Free cholesterol.

The present method is simple and permits a comparatively rapid determination of free and esterified cholesterol in blood serum and other biological fluids and organs.

Č. MICHALEC, V. JIRGL, and J. PODZIMEK

Central Biochemical Laboratories of the University Hospital, Prague (Czechoslovakia), February 8, 1957.

Zusammenfassung

Eine papierchromatographische Methode zur semi-quantitativen Bestimmung von Cholesterin und Cholesterinester in biologischem Material wird beschrieben.

Application vaginale de cystamine et Radio-Protection locale

1. *Introduction.* Dans un travail antérieur publié dans cette même revue, l'un de nous¹ a pu montrer que l'administration de Bécaptan par voie générale protège la muqueuse vaginale de la rate contre les effets d'une irradiation locale.

Les travaux expérimentaux consacrés aux radio-protecteurs en général et au Bécaptan en particulier ont été le plus souvent réalisés en administrant la substance protectrice par voie générale; l'effet est alors étudié soit sur l'organisme *in toto* (courbes de mortalité, chute de poids) soit au niveau d'un tissu déterminé (ovaire, intestin grêle, foie, rate, thymus, lignée rouge, leucocytes, muqueuse vaginale etc.).

Peu de recherches ont été consacrées à l'action protectrice de l'application locale d'une substance déterminée au niveau de l'organe à protéger. Nous pouvons cependant citer:

¹ L. DARCIS, P. HOTTERBEECK et C. ONKELINX, Exper. 12, 286 (1956).

² Č. MICHALEC, Naturwissenschaften 42, 509 (1955).

² Č. MICHALEC, Biochim. biophys. Acta 19, 187 (1956).

Pourcentages des lésions cellulaires observées dans les jours qui suivent l'irradiation pendant 4 heures de rates protégées localement par la cystamine

Jours	Rates									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
4	17	18	14	—	20	—	19	—	25	—
5	16	20	17	15	27	24	26	17	21	18
6	19	25	23	19	29	17	22	27	16	27
7	20	15	20	22	18	15	14	12	13	—
8	—	16	18	16	15	10	16	9	—	15
9	11	10	19	—	12	8	11	8	10	—
10	8	—	10	11	—	7	8	5	9	8

1° FORSSBERG² qui a pu démontrer l'action protectrice locale de la cystéine, en prenant comme test l'épilation de la peau du cobaye sous l'effet des rayons X; la cystéine était administrée par la voie intra-dermique.

2° BACQ et HERVÉ³ qui, dans des travaux encore inédits, ont mis en évidence que la régénération des poils est favorisée par l'application d'une pommade à base de cystamine (2% de cystamine dans du Carbowax) préalablement à l'irradiation de la peau rasée, chez le rat.

Le présent travail étudie l'action protectrice, au niveau du vagin de la rate de la cystamine administrée *in loco*.

II. Techniques et méthodes. Nous ne ferons que les résumer.

1° L'irradiation locale est réalisée au moyen d'un tube de radium que l'on introduit dans la cavité vaginale, sous anesthésie générale, et dont les caractères physiques sont: longueur totale: 16 mm; longueur active: 12 mm; diamètre extérieur: 4 mm; diamètre intérieur: 2 mm; filtration: 1 mm Pt., charge: 50 mg radium.

De cette façon, la dose reçue par la muqueuse vaginale est d'environ 2275 r · γ/h. L'anesthésie est prolongée pendant toute la durée de l'irradiation pour éviter l'expulsion du tube; au cours de cette série d'expériences, chaque irradiation a duré 4 h.

2° L'étude des frottis vaginaux (colorés par la méthode de Papanicolaou) prélevés quotidiennement pendant les 15 jours qui suivent l'irradiation met en évidence l'existence de cellules radio-lésées. Nous considérons comme cellule radio-lésée toute cellule nucléée dont le plus grand diamètre dépasse 45 μ ou qui renferme plusieurs noyaux.

3° Pour une même durée d'irradiation, le pourcentage de cellules radiolésées varie en fonction du temps qui sépare l'irradiation du prélèvement du frottis.

a) Il existe constamment une période de latence s'étendant habituellement sur 3 à 5 jours, au cours desquels le pourcentage d'altérations cellulaires reste dans la limite de la normale (un frottis vaginal normal ne renferme pas plus de 10% de cellules présentant les caractères définis plus haut).

b) Les cellules radio-lésées apparaissent dans les frottis du 4^e au 6^e jour; leur pourcentage passe par un maximum entre le 6^e et le 10^e jour puis décroît pour reprendre, entre le 8^e et le 15^e jour, voire au-delà, des valeurs normales.

4° L'application locale de cystamine a été réalisée par une irrigation continue au moyen d'une solution aqueuse renfermant 10% de cystamine. Cette irrigation fut faite au moyen d'un très fin tube de polythène introduit dans

le vagin de la rate et raccordé à un petit «Baxter» de fortune (flacon à pénicilline modifié pour la circonstance) rempli de la solution. Cette irrigation est mise en train ½ h avant le début de l'irradiation et se prolonge pendant toute la durée de celle-ci (durée totale d'application: 4 ½ h), ce qui entraîne l'écoulement d'environ 5 cm³ de la solution dans le vagin. Pour chaque rate, la solution a été préparée extemporanément.

5° Enfin, les animaux utilisés sont des rates vierges provenant de l'élevage sélectionné du Centre Anticancéreux près l'Université de Liège. Chacune pesait au départ, environ 150 g.

III. Résultats. Trois groupes d'animaux ont été étudiés:

1° 18 animaux ont été irradiés pendant 4 h, sans administration de protecteur: les pourcentages maxima de cellules radio-lésées oscillent entre 45 et 70%, soit en moyenne $60 \pm 2\%$.

2° Rappelons les résultats obtenus chez 13 rats ayant reçu 15 mg de Bécaptan par la voie intra-péritonéale immédiatement avant l'irradiation; dans ce groupe d'animaux, les pourcentages maxima de cellules radio-lésées oscillent entre 20% et 34%, en moyenne $27 \pm 3\%$.

3° Enfin, le Tableau rassemble les résultats obtenus chez 10 rates auxquelles nous avons administrés localement de la cystamine suivant la technique décrite plus haut.

Nous voyons que les pourcentages maxima oscillent entre 20% et 29%, en moyenne $24 \pm 1\%$. Il ressort de cette expérience que la protection vaginale obtenue par l'administration locale de cystamine est équivalente à celle obtenue par l'administration intra-péritonéale de cystéamine.

Il reste à déterminer si cette protection est strictement locale ou si, résorbé en quantité suffisante, le protecteur a été lancé dans la circulation générale comme au cours d'une administration intra-péritonéale. Nous pensons pouvoir donner prochainement une solution à ce problème.

L. DARCIS et G. GILSON

Centre Anticancéreux de l'Université de Liège (Belgique), le 27 décembre 1956.

Summary

In a previous paper, the authors showed that intraperitoneally administered cystamine protects the vaginal mucosa of rats against local irradiation.

Using the same technique (study of radiation-lesions in vaginal smears), they demonstrate that locally administered cystamine is also effective.

² A. FORSSBERG, Acta radiologica 33, 296 (1950).

³ Z. BACQ et A. HERVÉ, Communication personnelle.