

Nicotinamide in Adenocarcinoma 755 and in the Milk of Mice Carrying the 'Agent' of Spontaneous Mammary Tumor

The presence of pyridine nucleotides and of nicotinamide in a variety of normal tissues and in certain neoplastic growths, either of spontaneous origin or resulting from implants in laboratory animals, has been described in the literature¹. This is a brief report of the identification of nicotinamide in implanted mammary adenocarcinoma 755 in C57Bl mice and in the milk of Paris RIII mice with mammary carcinoma acquired in infancy through the nursing influence referred to as the 'milk agent'. Identification was made by means of (1) R_f values, (2) light-absorption curves and (3) conversion to nicotinic acid. In the course of this work a previously unreported color reaction of nicotinamide with ninhydrin was observed and will be described.

The tumors were dropped into liquid nitrogen immediately on removal from the ether-killed mice, disintegrated and dried from the frozen state. The dried tissue was treated exhaustively with ether and the extract stirred vigorously with acidified water. The last step was repeated. The combined water solutions were concentrated under reduced pressure and used for paper chromatographic analysis. Despite precautions it is possible that some of the nicotinamide was derived from splitting of pyridine nucleotides.

R_f Values. Four solvent systems were used. (1) 60 ml *n*-butanol and 10 ml 0.7 *M* NH_4OH ; (2) 77 ml *n*-butanol, 10 ml formic acid and 13 ml water; (3) 72% phenol and (4) 40 ml *n*-butanol, 10 ml acetic acid and 10 ml water. The R_f values were 0.64, 0.41, 0.92 and 0.64, respectively. They were the same, within 5%, for sample of known nicotinamide.

Light-Absorption. To free it of possible contamination before making measurements the compound was eluted from the chromatogram with *N*/100 HCl, the solution concentrated under reduced pressure and respotted using a different solvent system. The eluted compound from the second chromatogram had the same ultraviolet light-absorption curves in *N*/100 HCl and at pH 9 as those of corresponding solutions of known nicotinamide similarly processed².

Conversion to Nicotinic Acid. When the eluates from chromatograms of tumor extracts were evaporated to dryness and the residues taken up in a small volume of *N*/1 HCl and heated for 2 h at 100° the nicotinamide was converted to nicotinic acid. Using solvent systems 1, 2 and 4 the R_f values of the product were 0.18, 0.17 and 0.22; they were the same for acid-treated, known nicotinamide. Also the ultraviolet light-absorption curves in *N*/100 HCl and at pH 9 of the eluted product were the same as those of the corresponding solutions of eluted, known nicotinic acid³.

Nicotinamide was similarly extracted from the kidneys, livers and spleens of the tumor-bearing mice.

Reaction with Ninhydrin. The tissue-extracted compound gave a pale-rose color similar to that obtained with

very small amounts of glycine when paper chromatograms on which it was present were sprayed with a solution of ninhydrin (0.1% in absolute ethanol). An authentic sample of nicotinamide gave the same color; the intensity resulting from 40 μ was about equal to that given by 4 μ of glycine.

Mouse Milk. The fat-free milk was dried from the frozen state and then treated as was the tumor tissue. A chromatogram showed the presence of a compound having the same ultraviolet light-absorption curve as that of nicotinamide and responding to the above-described color test with ninhydrin; its R_f value, however, was 0.14 (solvent 2). Evaporation of a solution in *N*/100 HCl with mild heating gave a compound with R_f values of 0.64 and 0.41 (solvents 1 and 2) which are the same as those of the tumor-extracted compound and of known nicotinamide. This compound also had the typical nicotinamide absorption curve in the ultraviolet and formed nicotinic acid when heated with *N*/1 HCl at 100°.

V. Ross

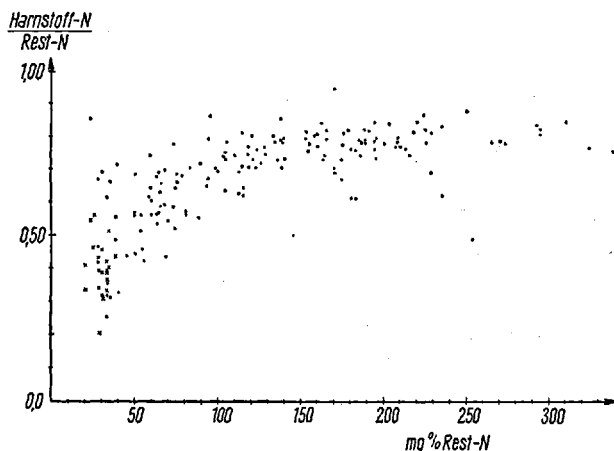
Department of Biochemistry, College of Physicians and Surgeons, Columbia University and Francis Delafield Hospital, New York City, April 23, 1957.

Résumé

L'auteur montre que la nicotinamide se trouve dans l'adénocarcinome 755 et aussi, sous forme d'un dérivé non-identifié, dans le lait de souris porteuses du «milk agent». Il décrit en outre une réaction colorée de la nicotinamide avec la ninhydrine.

Das Verhalten des Quotienten Harnstoff-N:Rest-N bei normalen und nephrektomierten, urämischen Ratten

Der Quotient Harnstoff-N:Rest-N beträgt bei 22 leber-, herz- und nierengesunden Menschen 0,39. 156 Bestimmungen bei 36 nierenkranken Patienten mit N-Re-



Harnstoff-N/Rest-N bei 36 Nierenpatienten (+) und 22 herz-, leber- und nierengesunden Kontrollpersonen (x)

tention ergaben einen Quotienten von 0,69 im Durchschnitt (Abb. 1). Theoretisch kann die Erhöhung des Harnstoff-N-Anteils am Rest-N hepatogen oder nephrogen sein.

¹ F. BERNHEIM and A. V. FÉLDOVANYI, *Science* 81, 76 (1940). – H. V. EULER, F. SCHLENK, H. HEIWINKEL, and B. HÖGBERG, *Z. physiol. Chem.* 266, 208 (1938). – C. CARRUTHERS and V. SUNTZEFF, *Arch. Biochem. Biophys.* 45, 140 (1953); *J. Cancer Res.* 12, 879 (1952). – B. CHANCE, *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 16, 74 (1953).

² H. H. G. JELLINEK and M. G. WAYNE, *J. phys. Chem.* 55, 173 (1951).

³ R. F. EVANS, E. F. G. HERINGTON, and W. KYNASTON, *Trans. Faraday Soc.* 49, 1284 (1953).

Tabelle I

Rest-N und Harnstoff-N im Plasma normaler und nephrektomierter Ratten

Versuch Nr.	Normale Ratten		Nephrektomierte Ratten	
	Rest-N mg%	Harnstoff-N mg%	Rest-N mg%	Harnstoff-N mg%
1	34	8	290	228
2	41	13	146	101
3	44	14	216	153
4	56	28	198	141
5	38	15	218	165
6	44	18	311	268
7	36	9	204	154
8	38	10	309	247
9	42	13	234	164
10	42	14	380	221
11	45	11	220	168
12	55	20	300	232
13	35	18	220	156
14	45	13	256	197
15	49	17	275	216
16	47	13	296	215
17	54	16	201	151
18	48	16	279	223
19	48	17	175	120
20	14	12	275	211
21	51	18	186	133
22	39	12	281	212
23	53	16	284	214
24	45	12	329	261
M=43,5		M=14,7	M=253,5	M=189,6
$\frac{\text{Harnstoff-N}}{\text{Rest-N}}$	0,33		0,74	

Tabelle II

Desaminierungsfähigkeit und Harnstoffbildung überlebender Leberschnitte von normalen und nephrektomierten, urämischen Ratten; Substrat D,L-Alanin

Versuch Nr.	γ NH ₂ -N/mg/h			Q _{Hst} (mm ³ CO ₂ /mg/h)	
	Normale Ratten	Nephrektomierte Ratten	Differenz II-I	Normale Ratten	Nephrektomierte Ratten
1	1,04	4,76	3,72	7,75	6,09
2	0,80	0,14	- 0,66	2,87	4,12
3	0,40	0,84	0,44	6,95	8,02
4	3,19	2,80	- 0,39	10,64	11,56
5	1,87	2,60	0,73	4,13	6,43
7	0,49	3,53	3,04	4,19	8,59
8	1,19	2,29	1,10	5,89	3,68
9	0,59	2,44	1,85	8,91	6,59
10	0,89	2,28	1,39	5,10	4,30
11	0,67	1,19	0,52	5,13	6,88
12	0,43	2,39	1,96	4,73	5,82
13	0,61	2,76	2,15	5,85	5,19
14	3,05	3,24	0,19	9,23	7,28
15	0,85	1,73	0,88	7,77	8,54
16	2,51	3,88	1,37	5,18	8,13
17	1,79	2,07	0,28	4,95	5,87
18	1,34	4,73	3,39	10,10	10,52
19	5,47	5,27	- 0,20	6,36	7,33
21	1,01	2,38	1,37	7,15	8,78
22	1,42	2,50	1,08	6,86	8,67
23	0,61	5,43	4,82	5,64	9,70
24	1,55	2,56	1,01	8,00	6,77
25	4,39	3,65	- 0,74	15,70	11,81
M _I = 1,57		M _{II} = 2,85		M _I = 6,9	M _{II} = 7,4
$\sigma_I = \pm 1,33$		$\sigma_{II} = \pm 1,34$			
Der Unterschied von M _I und M _{II} ist signifikant ($p < 0,01$).					

1. Von der Leberfunktion sind abhängig: a) Vermehrte Desaminierung und Transaminierung retinierter Substanzen und nachfolgend b) vermehrte Harnstoffbildung.

2. Von der Nierenfunktion sind abhängig: I. a) Verminderte Harnstofffiltration; b) vermehrte tubuläre Harnstoffrückdiffusion; II. a) verminderte Filtration der Residual-N-Substanzen (Rest-N minus Harnstoff-N); b) verminderte tubuläre Rückresorption der Residual-N-Substanzen.

Um die Frage zu entscheiden, ob die Erhöhung des Quotienten Harnstoff-N: Rest-N auf Leber- oder Nierenfunktionsstörungen zurückzuführen sei, wurden Quotienten normaler Ratten mit solchen nephrektomierter, urämischer Tiere verglichen. Ferner wurden an Leberschnitten dieser Tiere Desaminierungsfähigkeit und Harnstoffbildung untersucht.

Methodik

1. Bestimmung von Rest-N (KJELDAHL) und Harnstoff (CONWAY) im Plasma von 24 Ratten 2–4 Tage nach Nephrektomie und 24 Kontrolltieren.

2. Harnstoff-Synthese überlebender Leberschnitte aus Ammoniak und Kohlensäure¹ (24 Ratten 2–4 Tage nach Nephrektomie und 24 Kontrolltiere):

a) Inkubationslösung: 4,48 ml Krebs-Ringerlösung, 0,31 ml 1% Ammoniumchloridlösung, 0,1 ml 5% Brenztraubensäurelösung, 0,11 ml 0,9% Ornithinlösung. Sätti-

gung der Lösung mit Gasgemisch von 95% Sauerstoff und 5% Kohlensäure.

b) Inkubationsdauer 2 h bei 37,5°C.

c) Harnstoffbildung wurde gemessen durch den Quotienten $Q_{Hst} = \text{mm}^3 \text{CO}_2/\text{mg Trockengewicht/h}$ ($22,4 \text{ mm}^3 \text{CO}_2 = 60 \gamma \text{ Harnstoff}$). Im Hauptraum des Warburg-Gefäßes 1,9 ml Inkubationslösung und 0,3 ml Acetatpuffer², im Anhang des Gefäßes 0,3 ml Urease-lösung³. Versuchsdauer 30 min, Ablesen 5, 10, 20 und 30 min nach Erreichen der Druckkonstanz im Thermobarometer. Wägen der Gewebsschnitte 2 h nach Trocknen bei 105°C.

3. Desaminierungsfähigkeit und Harnstoffbildung überlebender Leberschnitte mit D,L-Alanin als Substrat. Bestimmung von Ammoniak⁴ und Harnstoff (siehe Methodik 2c) in der Inkubationslösung.

Resultate

1. Der Quotient Harnstoff-N: Rest-N betrug bei urämischen Ratten 0,74, bei Kontrollen 0,33 (Tab. I).

2. Die Harnstoffbildung aus Ammoniak und Kohlensäure in der Leber normaler und nephrektomierter Ratten zeigte keine Unterschiede.

² 27,2 g Natriumazetat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$) mit 6 g Eisessig versetzt und mit Aq. dest. ad 100 ml aufgefüllt, pH 5,0.

³ 500 mg Jack-Bohnen-Urease (Paul Lewis Lab., Milwaukee, Wis.) in 5 ml Aq. dest. gelöst.

⁴ E. J. CONWAY, Biochem. J. 29, 2755 (1935).

¹ H. A. KREBS und K. HENSELEIT, Hoppe-Seylers Z. 210, 33 (1932).

3. Die aus D,L-Alanin entstandene Harnstoffmenge war in beiden Gruppen gleich. Intermediär kam es bei urämischen Ratten zu einer signifikanten Steigerung der Ammoniakbildung durch Leberschnitte im Vergleich zu Kontrollen (Tab. II).

Diskussion

1. Bei nephrektomierten, urämischen Ratten wurden zwei wesentliche Befunde erhoben: a) signifikante Erhöhung des Quotienten Harnstoff-N:Rest-N, b) signifikante Steigerung der intermediären Ammoniakbildung (Harnstoffsynthese aus D,L-Alanin). Diese Befunde sprechen für gesteigerte Desaminierungs- und Transaminierungsvorgänge in der Leber von Ratten mit Stickstoff-Retention.

2. Die Harnstoffbildung aus Ammoniak und Kohlensäure und aus D,L-Alanin ergab keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Dies kann folgendermassen erklärt werden: Das citrullinbildende Fermentsystem (1. Stufe der Harnstoffbildung) in den Mitochondrien der Leberzellen ist unter anderem abhängig von der Adenosintriphosphorsäure. Da diese Phosphorverbindung sehr labil ist, muss sie ständig resynthetisiert werden. Die Resynthese der Adenosintriphosphorsäure ist an das Vorhandensein von Glutaminsäure gekoppelt⁶. Glutaminsäure entsteht in Leberschnitten bei Gegenwart von Ammoniumsalzen⁷. Möglicherweise war die Menge der *in situ* gebildeten Glutaminsäure zu gering, um die Adenosintriphosphorsäurebildung zu gewährleisten. Zusatz von Glutaminsäure zur Inkubationsflüssigkeit hätte die Adenosintriphosphorsäuresynthese nicht beschleunigt, da die Glutaminsäure sehr langsam in intakte Gewebszellen diffundiert⁷.

3. Die gesteigerten Desaminierungs- und Transaminierungsvorgänge bei urämischen Ratten führen zu vermehrter Harnstoffbildung. Die Ursache der gesteigerten Harnstoffsynthese ist wahrscheinlich in der Entgiftung toxischer Amine zu suchen. Verminderte Desaminierung und Transaminierung bedingen Residual-N-Erhöhung. Untersuchungen urämischer Patienten weisen auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Residual-N-Erhöhung und Auftreten von Bewusstseinsstörungen hin⁸. In solchen Fällen werden wahrscheinlich die betreffenden Fermentsysteme in der Leber durch Störungen im Säuren-Basengleichgewicht, im Elektrolytstoffwechsel und in der Sauerstoffversorgung der Leber (Anämie) gehemmt.

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds für die Unterstützung der Arbeit.

R. BOSSHARDT, H. THÖLEN und
F. ENDERLIN

Medizinische Universitätsklinik, Basel, 1. Oktober 1957.

Summary

(1) The quotient urea nitrogen:non-protein nitrogen was determined in nephrectomized uremic rats and compared with the quotient in control animals. The quotient in nephrectomized uremic animals was 0.74,

⁵ Z. STARY in *Physiologische Chemie* von B. FLASCHENTRÄGER und E. LEHNARTZ, II/2/a (Berlin, Göttingen, Heidelberg 1956).

⁶ H. FAHLÄNDER, P. FAVARGER und F. LEUTHARDT, *Helv. chim. Acta* 31, 942 (1948).

⁷ F. LEUTHARDT, H. FAHLÄNDER und H. NIELSEN, *Helv. phys. Acta* 5, 282 (1947).

⁸ H. CHABANIER und A. DE CASTRO GALHARDO, *C. R. Soc. Biol.* 83, 723 (1920). – W. FREY, *Hdb. inn. Med.* VIII (Springer-Verlag, Berlin 1951). – H. THÖLEN und R. BOSSHARDT (im Druck).

in control animals 0.35. The elevation of the quotient is of hepatic origin.

(2) The desamination was increased in the liver of nephrectomized uremic animals in comparison to controls; the urea production was unchanged.

Influence of *in vitro* Added Thyroxin upon the Glucose Uptake of the Rat Diaphragm

The influence of thyroxin (added to the medium) upon isolated organs has been investigated by a great number of authors¹.

The conclusions are entirely controversial; positive and negative results have been reported to about the same extent. The experiment which is principally used, of the influence of added thyroxin upon the oxygen consumption of liver slices gave almost negative results. But, this might be due to the destruction of the thyroxin in the liver which is notoriously very active. Thus we preferred to use muscle tissue in our experiments.

Method.—The diaphragm was taken under deep chloroform anaesthesia from female rats of 150 to 200 g. It was placed into ice-cooled KREBS-HENSELEIT saline added with 1.5% of glucose. The muscle was dissected free from the tendinous center and divided into 7 parts of about 30 mg.

The apparatus of KREBS and HENSELEIT² was used for incubation. The 8 flasks of the apparatus were provided with 0.5 ml of the glucosed saline mentioned above. They were stoppered and weighed. Flask No. 1 was kept for control; the diaphragm fragments were blotted, placed into flasks No. 2–8, stoppered and weighed again.

The flasks were mounted upon the apparatus; the whole was filled with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂ and incubated for 1 h in a stirred water bath at 39°C. The remaining glucose was determined with the method of HAGEDORN and JENSEN. Results were recalculated for 1 g of tissue.

Thyroxin was dissolved in 0.01 NaOH at 2 mg/ml. The further dilutions were carried out with glucosed saline. For the determinations of the influence upon the glucose uptake, it was added to flasks No. 3–8 at concentrations from 10⁻¹⁰ to 10⁻⁵.

Flask No. 2 was kept without thyroxin for control.

Results.—The method was used prior to us by many authors for different experimental purposes. It is generally admitted that there are large differences of the glucose uptake from one animal to another, but that several determinations upon different fragments of the same diaphragm give valid average values. To this we agree; our preliminary determinations gave the following results (see Table I).

For the influence of the thyroxin see Table II.

It can be seen that the glucose uptake rate is increased under the influence of thyroxin. This was observed constantly if thyroxin was added at the concentration of 10⁻⁷ or 10⁻⁶. The inconstancy of the results obtained with a concentration of 10⁻⁵ may be understood, since this concentration is very near to the saturation limit of thyroxin in KREBS-HENSELEIT's saline.

¹ For references see J. COMSA, *Les antithyroïdiens biologiques* (Doin édit., Paris 1953).

² H. A. KREBS and D. HENSELEIT, *K. Schr. physiol. Chem.* 212, 33 (1932).