

Table II

The mobilities of catecholamine triacetate derivatives and methoxy-catecholamine diacetate derivatives in Bush «C» chromatography system*

Acetate derivate of:	Distance from starting line in cm	Mobility in cm/h
Norepinephrine	7-9	2
Methoxynorepinephrine . .	11-13	3
Epinephrine	18-20	4.75
Methoxyepinephrine	20-22	5.25
3-hydroxytyramine	23-25	6
3-methoxytyramine	27-29	7

* Descending technique with Whatman No. 1 filter paper pre-washed with benzene: methylalcohol (1:1) was used. The catecholamines were developed by passing a narrow strip through a solution of 1% $FeCl_3$ and 2% potassium-ferricyanide, blotting and then passing it through a solution of 10% KOH in methylalcohol:water (1:1). The methoxy catecholamines were developed by passing a narrow strip through a solution of 0.1% dichloroquinone chlorimide in alcohol, blotting and then passing it through a solution of 0.1 M borate buffer pH 10, blotting again and exposing the strip to ammonia vapors.

total radioactivity of the acetylated fraction from incubate A and 6.5% from incubate B. Peak No. 3 has the same mobility as 3-methoxytyramine diacetate. After addition of 0.1 mg nonradioactive 3-methoxytyramine diacetate and rechromatography in the Bush «C» solvent system, the radioactive zone was eluted and treated with acylase from hog kidney at 37°C for 3 h. This removed the O-acetyl group from 3-methoxytyramine diacetate. The removal of the O-Acetyl group was demonstrated by the development of an olive color upon treatment with dichloroquinone chlorimide in alcohol and borate buffer, pH 10. This reaction is specific for the free phenolic group. The N-acetyl 3-methoxytyramine was then chromatographed in *n*-butanol acetic acid-water solvent system, and the radioactivity was found to be associated with this compound.

The present investigation demonstrates that 3,4-dihydroxyphenylacetic acid is the main metabolite of 3-hydroxytyramine in brain tissue. Although our results are based on the metabolism of 3-hydroxytyramine in cow brain homogenates, a preliminary study of brain homogenates obtained from rats shows the same pattern. The small differences in the radioactivity of the amine fraction of incubates A and B indicate that iproniazid has no significant effect as a monamine oxidase inhibitor in whole brain tissue homogenates. The isolation of 3-methoxytyramine indicates that some O-methylation of the intact amine occurs. It is of interest that in urine of rats the main metabolite of 3-hydroxytyramine was found to be 3-methoxy-4-hydroxyphenylacetic acid and not 3,4-dihydroxyphenylacetic acid³. These excretion studies demonstrate that 3-hydroxytyramine is metabolized by both O-methyl transferase and amine oxidase. However, from the present investigation it is evident that amine oxidase alone accounts for most of the metabolites of 3-hydroxytyramine in the brain.

Though the role of the corpus striatum in the etiology of Parkinson's disease is not completely understood, the presence of 3-hydroxytyramine in this area of the brain suggests that it may be related to this syndrome². There

are clinical reports⁶, which indicate that reserpine can produce Parkinson like symptoms and reserpine is known to cause depletion of 3-hydroxytyramine from the brain⁷. This suggests that either the depletion of 3-hydroxytyramine or the activity of its metabolites may be related to Parkinson's syndrome. The possible relationship of the metabolites of 3-hydroxytyramine to Parkinson's disease is being investigated.

M. GOLDSTEIN, A. J. FRIEDHOFF,
C. SIMMONS, and N. N. PROCHOROFF

New York University College of Medicine, Department of Psychiatry and Neurology, Psychopharmacology Research Unit, New York, March 19, 1958.

Zusammenfassung

Homogenate aus Gehirn wurden mit 3-Hydroxytyramine-1-C¹⁴ inkubiert. Als Stoffwechselprodukt wurde aus der sauren Fraktion radioaktive 3,4-Dioxyphenylessigsäure isoliert. Aus der basischen Fraktion wurden drei radioaktive Zonen papierchromatographisch isoliert. Die erste Zone konnte noch nicht identifiziert werden. Die zweite wurde als 3-Hydroxytyramin und die dritte als 3-Methoxytyramin erkannt. Die mögliche Rolle der Stoffwechselprodukte von 3-Hydroxytyramin beim Parkinson-Syndrom wird diskutiert.

⁶ S. KLINE, *Clinical Applications of Reserpine*, in *Psychopharmacology* (éd. N. S. KLINE, published by American Association for the Advance of Science, Washington, D. C. 1956), p. 81-108.

⁷ A. CARLSON, E. ROSENGREN, A. BERTLER, and J. NILSSON, *Psychotropic Drugs* (Eds. S. GARATTINI and V. GHETTI, published by Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1957), p. 363.

Note added in Proof: Peak No. 1 has also been shown to have similar mobility as acetylated 3,4,5-trihydroxyphenylethylamine.

The Authors wish to thank Dr. S. UDENFRIEND, National Institute of Health, Bethesda, Md., for providing this compound.

Messung der Serum-Insulin-Aktivität mit epididymalem Ratten-Fettgewebe *in vitro*

MARTIN¹ beschrieb eine Bestimmungsmethode für Serum-Insulin-Aktivität mit epididymalem Fettgewebe *in vitro*, wobei die C¹⁴O₂-Produktion aus 1-C¹⁴-Glukose als Index für das vorhandene Insulin benutzt wird. Aus unserem Labor berichtete STAUB² über eine Nachweismethode für Insulin mit Hilfe der Glukoseaufnahme von epididymalem Rattenfettgewebe *in vitro*. Modifikationen seiner Technik erlauben es uns jetzt, die Serum-Insulin-Aktivität zuverlässig, konstant und relativ spezifisch zu messen.

Methodik. Als Versuchstiere dienten männliche Albino-ratten (Spitalstamm), ernährt mit NAFAG-Rattenfutter und Wasser *ad libitum*, von einem Gewicht von 120-160 g.

Als Inkubationsmedium wurde Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer³ verwendet, pH 7.4, mit Zusatz von 200 mg% Gelatine und 200 mg% Glukose. Die Pufferlösung wurde für jeden Versuch aus Stammlösungen frisch zubereitet.

¹ D. B. MARTIN, A. E. RENOLD und Y. M. DAGENAIS, *Lancet* II/1958, 76.

² M. STAUB, *Schweiz. med. Wschr.* 88, 831 (1958).

³ W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS und J. F. STAUFFER, *Manometric Techniques and Related Methods for the Study of Tissue Metabolism* (Minneapolis 1945), p. 194.

Tabelle I

Glukoseaufnahme von epididymalem Rattenfettgewebe *in vitro* in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration

N	Insulin μE/ml	Glukose- aufnahme mg/g/h	s	% des Basal- wertes	p
12	0	0,70	± 0,18	100	
16	10	1,13	± 0,19	161	< 0,001
11	100	1,76	± 0,20	251	< 0,001
14	1000	2,38	± 0,20	340	< 0,001

Tabelle II

«Recoveries» von bekannten Insulinkräften, zugesetzt zu unbehandeltem Serum

Versuch Nr.	Insulin- Aktivität μE/ml	Insulin hinzugefügt	Insulin gefunden	% «reco- veries»
164	1400	1000	2300	96
168	20	500	470	90
169	16	500	640	124

Als Insulin stand uns mehrfach rekristallisiertes, glukagonfreies Schweine-Insulin Novo mit 23,9 I. E./mg (Fabrikangabe) zur Verfügung. Auflösung in 1/250 n HCl in einer Konzentration von 10 I. E./ml, anschliessende Verdünnung mit Puffer. Einmal gelöstes Insulin wurde während höchstens 3 Tagen verwendet.

Bestimmung der Glukose nach SOMOGYI-NELSON^{4,5} oder mit der enzymatischen Methode der Firma C. F. Boehringer, Söhne, Mannheim.

Blutentnahmen erfolgten aus ungestauter Vene, ohne gerinnungshemmenden Zusatz. Abtrennung des Serums durch sofortiges Zentrifugieren. Untersuchung des Serums möglichst am gleichen Tag oder nach Aufbewahrung bei + 4°C.

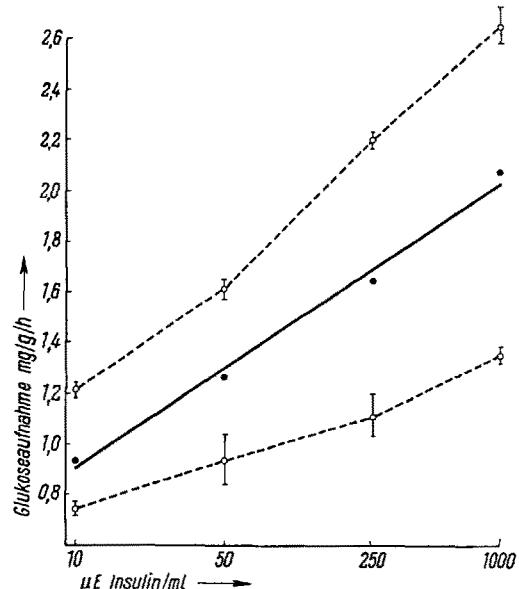
Für einen Versuch werden 4 während 24 h fastende Ratten von möglichst gleichem Alter und Gewicht benötigt. Die Tiere werden durch Schlag auf den Kopf und Ausbluten getötet und das Abdomen breit eröffnet. Die Testes werden, wenn nötig, durch leichten Druck ins Abdomen verlagert. Die beiden der Epididymis aufsitzenden Fettgewebszipfel werden etwas distal des gut sichtbaren epididymalen Blutgefäßes mit der Schere abgetrennt. Jeder der beiden Zipfel wird in je 4 möglichst gleiche Teile zerschnitten und in 8 Inkubationsgefäßes gebracht. Jedes der 8 Gefäße enthält so je 4 Fettgewebsstücke, von jeder Ratte eines, im Gesamtgewicht von etwa 100 mg. Das Gelingen des Versuches hängt von möglichst schonender Behandlung und gleichmässiger Verteilung der Fettgewebsstücke ab.

Als Inkubationsgefäß werden 10-ml-Ampullenfläschchen mit Gummistopfen verwendet, als Inkubationsmedien 0,7 ml folgender Lösungen: in Gefäß Nr. 1 + 2 Pufferlösung mit 10 μE Insulin/ml, in Nr. 3 + 4 Pufferlösung mit 1000 μE Insulin/ml, in Nr. 5-8 ein oder zwei zu testende Seren, deren Glukosekonzentrationen auf 200 mg% ergänzt wurden. Das Serum wird je nach der zu erwartenden Höhe der Insulinaktivität unverdünnt oder 1:10 verdünnt verwendet.

Die so mit den Fettgewebsstücken beschickten Inkubationsgefäßes werden mit dem Gummistopfen verschlossen und durch eine Kanüle mit 95% O₂ und 5% CO₂ während 2 min durchströmt. Inkubation in einem Dubnoff-shaker bei 37,5°C, Schüttelfrequenz etwa 80/min, Inkubationsdauer 120-180 min. Nach der Inkubation wird das Gewebe auf Filterpapier leicht getrocknet und auf einer Torsionswaage gewogen. Berechnung der Glukoseaufnahme als mg Glukose/g Gewebe (Feuchtgewicht)/60 min. Die Glukoseaufnahme mit den beiden bekannten Insulinkonzentrationen ergibt für jeden Versuch eine eigene Eichkurve, an der die Insulinaktivität der beiden Seren abgelesen wird.

Alle Glaswaren wurden mit Haemosol (Fa. Meinecke und Co. Inc., New York) gewaschen.

Ergebnisse. Tabelle I zeigt die Durchschnittswerte der Glukoseaufnahme von epididymalem Fettgewebe in Abhängigkeit der vorhandenen Insulinkonzentration. Die kleinste mit Sicherheit nachweisbare Insulinkonzentration ist 10 μE/ml (Glukoseaufnahme 161% der Kontrollwerte, p < 0,001). Die Standardabweichung s des Mittelwertes ist gross, weil sowohl die basale Glukoseaufnahme als auch die Insulinempfindlichkeit des Fettgewebes von Versuch zu Versuch innerhalb weiter Grenzen schwankt.



Lineare Beziehung zwischen Glukoseaufnahme und log Insulinkonzentration im Bereich von 10-1000 μE/ml. Ausgezogene Linie = Durchschnittswerte von 5 Versuchen. Unterbrochene Linien = 2 typische Einzelversuche mit Doppelbestimmungen und Mittelwert.

Die Abbildung zeigt, dass die Beziehung zwischen Glukoseaufnahme und Logarithmus der Insulinkonzentration im Bereich zwischen 10-1000 μE/ml linear ist. Gleichzeitig sind zwei einzelne Versuche aufgezeichnet, um die Variation der Glukoseaufnahme von Versuch zu Versuch zu veranschaulichen. Die Höhe der basalen Glukoseaufnahme (ohne Insulin) wird weitgehend durch den Ernährungszustand der Ratten bestimmt. Je länger die Fastenperiode, desto niedriger die basale Glukoseaufnahme. Die Neigung der Kurve, das heisst die Insulinempfindlichkeit, wird wesentlich durch die Grösse der Fettgewebszipfel bestimmt: je grösser sie sind, desto geringer die Insulinempfindlichkeit. Offenbar spielen sich die Stoffwechselvorgänge des *in vitro* inkubierten Fettgewebsstückes vor allem an seiner Oberfläche ab⁶.

⁴ M. SOMOGYI, J. biol. Chem. 160, 69 (1945).

⁵ N. NELSON, J. biol. Chem. 153, 375 (1944).

⁶ P. BALLY, persönliche Mitteilung.

Tabelle III

Einfluss von Adrenalin auf die Insulinwirkung am epididymalen Fettgewebe

N	Adrenalin γ/ml	Insulin μE/ml	Glukose- aufnahme mg/g/h	\bar{d}	s^*	t	p
12	0	0-10 000	1,505				
12	0,01		1,630	+0,125	± 0,26	1,67	> 0,1

$$* s = \sqrt{\frac{\sum (d - \bar{d})^2}{N-1}}, \quad t = \frac{\bar{d}}{s}$$

Die Insulinaktivität im Serum gesunder Kontrollpersonen betrug 20-800 μE/ml (eine Zusammenstellung der gefundenen Serum-Insulin-Aktivitäten bei Gesunden und endokrin Erkrankten ist einer späteren Publikation vorbehalten). Die Linearität der Beziehung zwischen Glukoseaufnahme und Insulinkonzentration *in vitro* liegt demnach im Bereich der physiologischen Insulinkonzentration im Serum.

Um zu zeigen, dass für die Förderung der Glukoseaufnahme durch Serum wirklich dessen Insulingehalt verantwortlich ist, wurde das Serum mit Zystein inkubiert⁷, worauf keine Insulinaktivität mehr festgestellt werden konnte (vor Zystein: 20 μE/ml, nach Zystein: 0 μE/ml), bzw. auf sehr geringe Werte absank (vor Zystein: 5000 μE/ml, nach Zystein: 15 μE/ml).

Ferner wurden bekannte Mengen Insulin einem Serum zugesetzt und die «recoveries» bestimmt. Diese betragen im Durchschnitt 104% (Tab. II).

Verdünnung des Serums (1:10) hat keinen Einfluss auf seine Insulinaktivität.

(Serum 1 unverd.: 350 μE/ml, 1:10 verd.: 34 μE/ml;
Serum 2 unverd.: 44 μE/ml, 1:10 verd.: 5,3 μE/ml).

Adrenalin in einer Konzentration von 10^{-2} γ/ml ist ohne Einfluss auf die Insulinwirkung *in vitro* (Tab. III) (physiologische Konzentration von Adrenalin + Noradrenalin im menschlichen Blut höchstens 4×10^{-3} γ/ml⁸).

Diskussion. RANDLE⁹ hat kürzlich die gesamte Problematik der biologischen Insulin-Bestimmungsmethoden aufgerollt. Eine wesentliche methodische Verbesserung scheint uns durch die Verwendung von epididymalem Fettgewebe anstelle von Zwerchfellmuskel als Testgewebe gegeben. Da das Fettgewebe ohne Nachteile in mehrere Stücke zerlegt werden kann, wird der Vergleich von Standard-Insulinlösungen und Unbekannten am Gewebe des gleichen Tieres möglich^{1,2}. Dies ist deshalb wichtig, weil die basale Glukoseaufnahme und die Insulinempfindlichkeit der Gewebe verschiedener Ratten erheblich voneinander abweichen können, auch wenn die Tiere in Rasse und Gewicht übereinstimmen.

Ferner scheint Fettgewebe den aktiveren Glukosestoffwechsel als Muskulatur – bezogen auf den N-Gehalt – zu haben und insulinempfindlicher zu sein¹⁰. Insulin ist für die vor allem im Fettgewebe stattfindende Fettsynthese unerlässlich¹¹, so dass dieses Gewebe auch vom physio-

logischen Standpunkt aus für eine Insulin-Bestimmungsmethode geeignet erscheint. Die Insulinwirkung auf das Muskelgewebe ist in vielen Belangen unspezifischer; so wird zum Beispiel die Glukoseaufnahme auch durch Muskelarbeit wesentlich gefördert.

Ein weiterer Vorteil des Fettgewebes ist die Unbeeinflussbarkeit der Glukoseaufnahme durch Adrenalin, das bei der Zwerchfellmethode stören soll¹².

«Recoveries» von 104%, die fast vollständige Inaktivierung der Serum-Insulin-Aktivität durch Zystein und die Unbeeinflussbarkeit durch Adrenalin sprechen für eine weitgehende Spezifität der in diesen Versuchen verwendeten Fettgewebsmethode. Inwieweit andere Hormone, wie STH, Glukagon oder Cortison interferieren können, soll erst noch überprüft werden.

Auch die Frage der Insulin-Antikörper, die ein zu niedriges Serum-Insulin vortäuschen könnten^{13,14}, wurde bis jetzt nicht überprüft.

Es scheint somit weiterhin angezeigt, von Insulin-Aktivität (insulin-like activity) und nicht von Serum-Insulin schlechthin zu sprechen^{1,9}.

R. E. HUMBEL

Medizinische Klinik der Universität Zürich, 16. März 1959.

Summary

A modified technique for the estimation of insulin-like activity of serum, using the glucose-uptake of isolated rat epididymal fat tissue is described. The method seems to be reliable, accurate, relatively specific and – in our hands – superior to the diaphragm method.

¹² J. GROEN, A. F. WILLEBRANDS, H. G. VAN DER GELD und R. E. BOLINGER, Ciba Fdt. Coll. Endocrin. 12, 255 (London 1958).

¹³ J. BORNSTEIN, J. biol. Chem. 205, 513 (1953).

¹⁴ J. VALLANCE-OWEN, B. HURLOCK und N. W. PLEASE, Lancet II/1955, 583.

Relations du «métabolisme respiratoire» des bactéries et du type de bactériophage avec l'activité de substances antiphages

Ayant mis en évidence la différence d'attaque¹ des bactériophages de la série T, différence qui permet de subdiviser ceux-ci en deux groupes selon la lyse provoquée, nous avons étudié l'action de substances antiphages sur le cours du métabolisme respiratoire de l'ensemble (bactéries-bactériophage) afin de déceler une éventuelle différence d'action entre des types T de caractère différent tels T₁ et T₂. Nous avons utilisé la méthode de Warburg précédemment décrite² en la considérant en même temps comme un test quantitatif de démonstration de la spécificité et du caractère de l'action antiphage. Parmi nos substances antiphages, nous avons choisi le dérivé 9238, c'est-à-dire: Tetra-chlorhydrate de bis-*p*,*p*'-[4-*p*-(diéthylamino-éthylamino)-7-méthoxy-quinazolyl-(2-amino)-diphénylsulfone.

Cette substance possède une «zone d'action» relativement large, c'est-à-dire qu'elle inhibe encore le bactériophage T₁ à une dose environ dix fois plus faible que la dose bactériostatique de sa souche sensible. L'inhibition du

¹ R. MEIER, L. NEIPP et W. KUNZ, Schweiz. med. Wschr. 87, 1427 (1957). – L. NEIPP, W. KUNZ et R. MEIER, Exper. 13, 74 (1957).

² L. NEIPP, W. KUNZ et R. MEIER, Schweiz. Z. Path. Bakt. 19, 331 (1956).

⁷ E. W. SUTHERLAND und C. F. CORI, J. biol. Chem. 172, 737 (1948).

⁸ J. KÄGI und H. LANGMANN, Schweiz. med. Wschr. 85, 402 (1955).

⁹ P. J. RANDLE, Ciba Fdt. Coll. Endocrin. 11, 115 (London 1957).

¹⁰ A. E. RENOLD, A. I. WINEGRAD und D. B. MARTIN, Helv. med. Acta 24, 322 (1957).

¹¹ A. I. WINEGRAD und A. E. RENOLD, J. biol. Chem. 233, 267 (1958).