

Table

No experiment	Control glucose uptake mg/g/h	Metahexamide		D 860		% Variation	Average
		γ /ml	Glucose uptake mg/g/h	γ /ml	Glucose uptake mg/g/h		
1	7.2	5	8.5	—	—	+ 22	22
2	5.4	5	6.7	—	—	+ 24	
3	7.0	5	8.4	—	—	+ 20	
4	5.6	10	6.9	—	—	+ 23.5	
5	6.0	10	7.7	—	—	+ 28.4	26
6	4.5	10	5.4	—	—	+ 20.0	
7	6.5	10	8.9	—	—	+ 36.9	
8	7.8	10	9.8	—	—	+ 25.7	
9	4.9	10	6.2	—	—	+ 26.5	1.7
10	5.6	—	—	10	6.03	+ 7.7	
11	6.9	—	—	10	7.20	+ 4.3	
12	4.3	—	—	10	4.00	— 7.0	
13	5.2	—	—	20	6.30	+ 21	24.8
14	6	—	—	20	7.60	+ 26.7	
15	7.2	—	—	20	8.95	+ 24.5	
16	6.6	—	—	20	8.20	+ 26.6	

is longer lasting than that of D 860, the first being present up to 8 h after administration. Similar results have been obtained in rabbits.

b) *absorption and excretion.* After a single dose of 40 mg/kg intraperitoneally in rat, the maximum blood concentration of Metahexamide was detected after 4 h (average 7.9 mg/100 ml), but also after 12 h a concentration of 6.4 mg/100 ml was present. The kidney Metahexamide concentration closely parallels that of blood, being 5.2 mg/100 g after 4 h and 4 mg/100 g, after 12 h.

The rapid absorption and the slow disappearance from blood of Metahexamide may account for the rapid onset of hypoglycemia and the long lasting effect.

c) *glucose uptake.* In the Table are reported the effects of Meta hexamide and D 860 on glucose uptake by rat hemidiaphragm *in vitro*.

As already shown for sulfanilylbutylurea (BZ 55) and D 860, Metahexamide also increases glucose uptake by isolated rat diaphragm. In this test Metahexamide is considerably more active than D 860.

From our findings we may conclude that the remarkable hypoglycemizing action of Metahexamide is justified by two properties: the slow metabolism and the strongly enhanced peripheral glucose utilization. These two effects could explain the higher hypoglycemic activity of Metahexamide in comparison with related compounds.

We want to thank Prof. C. RUNTI, Institute of Chemistry, University of Trieste, for the synthesis of Metahexamide

S. GARATTINI, A. JORI, V. PALMA, and L. TESSARI

Institute of Pharmacology, University of Milan (Italy), April 17, 1959.

Riassunto

La Metahexamide, N(3amino-4-metilbenzenesulfonil)N'-cicloesilurea, possiede nel ratto e nel coniglio un effetto ipoglicemizzante più marcato rispetto al *p*-tolilsulfanilbutilurea (D 860). Il nuovo farmaco si dimostra più attivo del D 860 nell'accelerare la scomparsa di glucosio da parte del diaframma isolato di ratto. La Metahexamide si distribuisce rapidamente in tutti gli organi e scompare dal sangue molto lentamente. Il maggiore effetto della Meta-

hexamide, rispetto a composti similari, viene interpretato sulla base di un lento metabolismo e in rapporto all'intenso effetto favorevole la metabolizzazione del glucosio a livello periferico.

Les glycoprotéines sériques dans le granulome expérimental provoqué par la carrageenine

Les travaux de CATCHPOLE *et al.*¹ ont déjà établi une liaison entre la prolifération du tissu conjonctif dans les états inflammatoires et l'augmentation des mucoides sériques et urinaires. On sait d'autre part que l'haptoglobine constitue la fraction des globulines α_2 dont l'augmentation chez l'homme est parallèle à celle des mucoides perchloro- ou sulfosalicylosolubles dans de nombreux états pathologiques² (exception faite pour la plupart des tumeurs malignes³ et certaines affections hépatiques⁴). Dans une revue générale l'un de nous et BOUSSIER ont exposé les arguments en faveur de la production par le tissu cojonctif proliféré des mucoides α_1 et α_2 qui augmentent dans les états inflammatoires⁵. Cette augmentation constitue le reflet humoral de l'importance de la réaction inflammatoire de la substance fondamentale.

Nous avons entrepris une série d'études afin d'obtenir des renseignements d'ordre quantitatifs sur la teneur en mucopolysaccharides «neutres» du tissu conjonctif et sur les rapports qui existent entre ces mucopolysaccharides neutres et les glycoprotéines sériques. Dans ce travail nous étudierons le comportement des glycoprotéines sériques et en particulier celui de la fraction sulfosalicylosoluble et de l'haptoglobine au cours du développement du granulome expérimental.

¹ I. GERSCH et H. R. CATCHPOLE, *Amer. J. Anat.* 85, 457 (1949). — M. B. ENGEL et H. R. CATCHPOLE, *Proc. Soc. exp. Biol. Med. N. Y.* 84, 336 (1953). — H. R. CATCHPOLE, C. L. PIRANI et A. BESTETTI, *Fed. Proc.* 17, 21 (1958).

² M. F. JAYLE, J. SERPICELLI et L. ROBERT, *Clin. chim. Acta* 1, 452 (1956).

³ L. ROBERT, J. SERPICELLI et M. F. JAYLE, *Rev. Franç. Etud. clin. biol.* 1, 976 (1956).

⁴ M. NYMAN, *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 11, Suppl. 39 (1959).

⁵ M. F. JAYLE et G. BOUSSIER, *Exposés Ann. Biochim. méd.* 17, 157 (1955).

Tableau I

Comportement des glycoprotéines sériques du cobaye et du rat au cours du développement du granulome expérimental. Déterminations faites avant l'injection de la carrageenine et au bout du 6^e jour après l'injection. Les chiffres représentent la moyenne obtenue sur 11 cobayes (de 400 à 600 g) et 8 rats (de 160 à 200 g) et l'erreur standard de la moyenne $\sigma/\sqrt{n}$. $\Delta\%$ représente la variation en % calculée par rapport à la valeur initiale

	Glycoprotéines totales mg acide sialique par 100 serum		$\Delta\%$	Glycoprotéines sulfosalicylosolubles mg acide sialique par 100 serum		$\Delta\%$	Glycoprotéines sulfosalicylosolubles mg p. 100 glyco- protéines totales		$\Delta\%$	Indice d'haptoglobine		$\Delta\%$
	avant	après		avant	après		avant	après		avant	après	
Cobaye .	98,6 $\pm$ 4,6	105 $\pm$ 3,5	6,5	31,2 $\pm$ 4,2	42 $\pm$ 1,6	32,7	31,9 $\pm$ 4,5	40,2 $\pm$ 1,8	26	0,48 $\pm$ 0,17	0,99 $\pm$ 0,13	106
Rat . .	130 $\pm$ 10,3	164 $\pm$ 4,8	26	23,1 $\pm$ 6,7	51,2 $\pm$ 6,0	122	19,7 $\pm$ 3,3	31,2 $\pm$ 3,1	58,5	0,59 $\pm$ 0,18	2,43 $\pm$ 0,31	312

L'haptoglobine (Hp) se prête plus facilement que d'autres glycoprotéines à une caractérisation qualitative et quantitative grâce à son affinité spécifique pour l'hémoglobine⁶.

Le granulome expérimental a été provoqué par injection souscutanée de carrageenine dans la région abdominale des cobayes et des rats⁶. Nous avons utilisé la carrageenine de Seaplant Co.⁷ après l'avoir précipitée 3 fois de suite par du propanol à partir de sa solution aqueuse⁸. On injecte 50 mg dans 5 ml de sérum physiologique, l'injection étant précédée d'une prise de sang dans le sinus rétroorbitaire, avec des capillaires héparinées⁹. Le 6^e jour après l'injection de la carrageenine on refait une prise de sang, puis on tue les animaux, on dissèque le tissu de granulation formé et on procède aux analyses. Nous avons dosé l'acide sialique total du sérum par la méthode de SVENNERHOLM¹⁰ légèrement modifiée¹¹ ainsi que l'acide sialique du filtrat sulfosalicylique (0,5 ml de sérum, 1,5 ml de KOH 0,1 N et 2 ml d'acide sulfosalicylique à 20%; centrifugé au bout de 10 min). L'indice d'haptoglobine du sérum fut déterminé selon la méthode de l'un de nous¹² sur 0,02 à 0,1 ml de sérum. Le Tableau I montre les résultats. La comparaison statistique des données expérimentales est faite selon les recommandations de LAMOTTE¹³. Les résultats sont différents chez les cobayes et chez les rats.

On voit sur ce Tableau que les glycoprotéines sériques totales (mesurées par l'acide sialique) augmentent d'une façon significative après l'injection de carrageenine chez les rats. Cette augmentation s'explique très bien par celle de l'haptoglobine et celle des glycoprotéines sulfosalicylosolubles. Chez les cobayes par contre le taux des glycoprotéines totales reste inchangé aux erreurs d'expériences près; l'augmentation de la fraction sulfosalicylosoluble est moins forte que chez les rats (34% chez les cobayes, contre 122% chez les rats), mais significative à un coefficient de sécurité de 95%. L'haptoglobine augmente nettement chez les cobayes traités (106% d'augmentation en moyenne). Chez les rats l'augmentation de l'acide sialique total (34 mg/100 ml de sérum) est à peu de chose près

égale à la somme de l'augmentation de l'acide sialique sulfosalicylosoluble et de l'acide sialique de l'haptoglobine (37,4 mg/100 ml de sérum). Il résulte des recherches de l'un de nous avec BOUSSIER⁵ qu'une unité de l'index

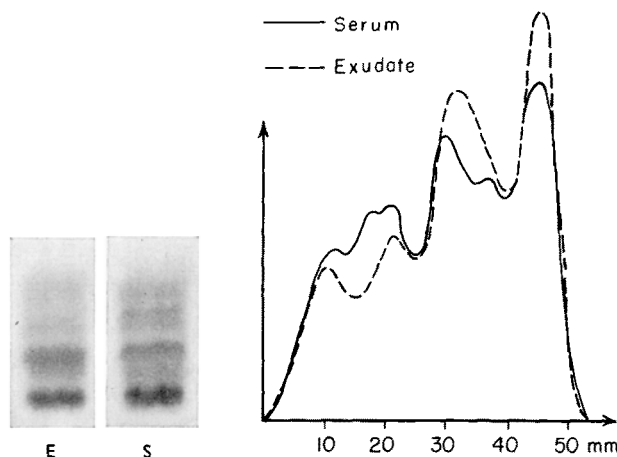


Diagramme d'électrophorèse sur papier du sérum et de l'exsudat de cobaye 6 jours après l'injection de carrageenine. L'exsudat est plus pauvre en β - et γ -globulines, un peu plus riche en albumine que le sérum. La forte bande en α de l'exsudat correspond au complexe hémoglobine-haptoglobine.

d'haptoglobine correspond en chiffres rond à une concentration sérique de 1 mg Hp/ml et que la teneur en acide sialique de l'Hp est de 5%. Chez les cobayes l'acide sialique de la fraction sulfosalicylosoluble et de l'haptoglobine augmente en moyenne de 13,4 mg% pour une élévation de l'acide sialique total de 6,4 mg%. Il se peut donc que l'augmentation des glycoprotéines sulfosalicylosolubles et celle de l'haptoglobine soit accompagnée d'une baisse d'autres glycoprotéines. WINZLER¹⁴ et WEIMER *et al.*¹⁵ arrivent à des conclusions analogues au cours de l'étude des glycoprotéines perchlorosolubles chez les rats ayant reçu des implants de carcinome Walker cc256.

Le granulome des cobayes est le plus souvent riche en exsudat. Les déterminations effectuées sur 5 exsudats donnent une teneur nettement plus faible en acide sialique et en haptoglobine par rapport au sérum. Le Tableau II montre que cette différence disparaît si l'on ramène la teneur en acide sialique à 1 mg des protéines totales (déterminée par la réaction au biuret). C'est que l'exsudat est moins riche en protéines que le sérum: sa teneur en pro-

⁶ W. VAN B. ROBERTSON et B. SCHWARTZ, J. biol. Chem. 201, 689 (1953).

⁷ New Bedford, Mass. USA. Nous tenons à remercier M. L. STOLOFF, directeur de recherches du Seaplant Co., pour l'envoi gracieux d'une échantillon de carrageenine.

⁸ L. STOLOFF, Communication privée de Seaplant Co., New Bedford, Mass. U.S.A.

⁹ B. N. HALPERN et A. PACAUD, C. r. Soc. biol. 145, 1465 (1951).

¹⁰ L. SVENNERHOLM, Biochem. biophys. Acta 24, 604 (1957).

¹¹ L. ROBERT et J. SERPICELLI, en préparation.

¹² M. F. JAYLE, Bull. Soc. Chim. biol. 33, 876 (1951).

¹³ M. LAMOTTE, Initiation aux méthodes statistiques en biologie (Masson, Paris 1957), p. 81.

¹⁴ R. J. WINZLER, in Methods of Biochemistry, tome 2 (Ed. Glick, 1955), p. 279.

¹⁵ H. E. WEIMER, F. A. QUINN, J. REDLICH-MOSCHIN et H. NISHIHARA, J. nat. Cancer Inst. 19, 409 (1957).

téines varie entre 18 et 55 mg/ml, celle du sérum entre 46 et 62 mg/ml.

Tableau II

Comparaison de la teneur en acide sialique et en haptoglobine du sérum et de l'exsudat chez le cobaye traité à la carrageenine. Les chiffres représentent la moyenne et l'erreur standard de la moyenne

	Indice d'haptoglobine	mg d'haptoglobine p. 100 mg protéines totales	mg acide sialique p. 100 ml	mg acide sialique p. 100 mg protéines totales
Sérum	0,99±0,13	2,05±0,32	105 ±3,5	2,0 ±0,11
Exsudat . . .	0,78±0,04	2,42±0,43	73,4±4,8	2,23±0,33

En comparant le diagramme d'électrophorèse sur papier (tampon véronal pH 8,6) de l'exsudat et du sérum du même animal, on constate le plus souvent une diminution très nette de l'intensité de la tache des β - et γ -globulines dans l'exsudat (Figure). La région des α -globulines est difficile à comparer car les exsudats sont le plus souvent hémolysés. On observe alors une bande forte correspondant au complexe Hb-Hp.

BARBARA ROBERT, L. ROBERT et M. F. JAYLE
avec la collaboration technique de
Mlle MONIQUE DE MONCUIT

Service de Biochimie Médicale, Faculté de Médecine,
Paris, le 11 juin 1959.

Summary

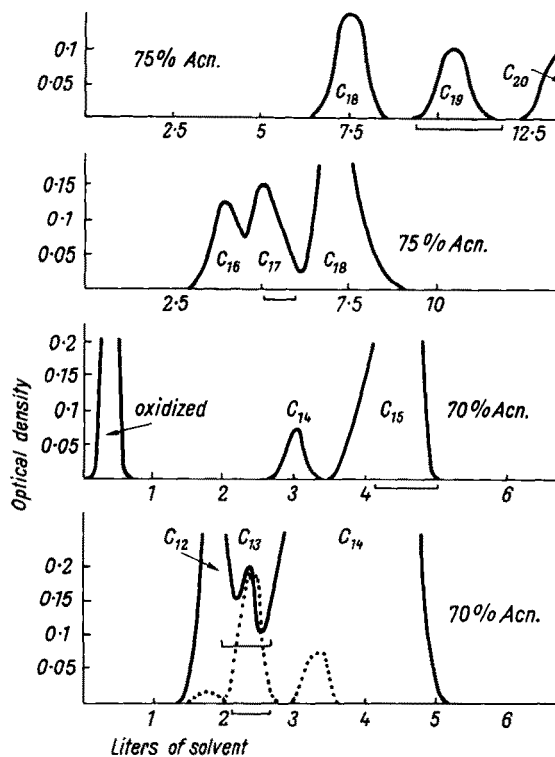
We studied serum glycoproteins in rats and guinea pigs during the development of granulomas, provoked by carrageenin injection. In rats total serum sialic acid was raised as well as sialic acid soluble in sulfosalicylic acid and haptoglobin. The rise of these 2 fractions, seromucoid and haptoglobin accounts quantitatively for the rise of the total sialic acid. In guinea pigs total serum sialic acid was unchanged, but sulfosalicylosoluble sialic acid as well as haptoglobin were much higher than basal values. Quantitatively the serum glycoprotein reaction was much higher in rats than in guinea pigs.

Column Chromatography of Lipides: Odd-Numbered Straight-Chain Fatty Acids of Menhaden Oil¹

The occurrence of *n*-nona-, *n*-hepta-, and *n*-penta-decanoic acids in menhaden oil fatty acids had been indicated by microanalytical methods but positive identification was lacking^{2,3}. The isolation of these acids and of *n*-tridecanoic acid from menhaden oil is reported here. The essential step after an initial distillation is partition

in a reversed-phase column. A novel procedure was developed which enlarges to a preparative scale, the paper chromatographic methods described earlier for the separation of lipides^{2,4}.

Menhaden fatty acid methyl esters (637 g) were distilled and the fractions analyzed by paper chromatography (acetic and peracetic acid-silicone systems at 30°C and 2°C) or by column chromatography (similar to that described below). Aliquots of the fractions containing saturated normal C₁₉, C₁₇ and C₁₃ esters were hydrogenated before separation on the column. The fraction rich in C₁₅ ester contained *n*-pentadecanoate as the only straight-chain ester of this chain length, together with some myristate and a considerable amount of unsaturated C₁₆ esters. Therefore an aliquot of this fraction was oxidized with peracetic acid to facilitate the isolation of the saturated components^{4,5}.



The separation of methyl esters of saturated fatty acids in a column of silicone on Celite and aqueous acetonitrile (Acn.)

A column, 2.6 cm in diameter and 90 cm in length, was packed with 280 g of a mixture (1:1) of silicone (Dow Corning 200, 10 c. s.) and Celite (Johns-Manville). The mobile phase was 70 or 75 % aqueous acetonitrile. The separations represented in the Figure were performed at 25°C with one packing; sample sizes were, in the order of decreasing chain lengths, 0.6, 0.85, 1.4, and 3.9 g of esters. A few milliliters of effluent fractions were diluted with equal volumes of water and the presence of esters was determined under standardized conditions in a spectrophotometer (extinction turbidimetry). A plot of optical density against volume of effluent gave the curves shown in the Figure. Esters located in this manner were chromatographed on paper for tentative identification. The

¹ This work has been supported by a research grant from the National Institutes of Health (USPHS RG 4226) and by the Hormel Foundation.

² H. SCHLENK, J. L. GELLERMAN, J. A. TILLOTSON, and H. K. MANGOLD, J. Amer. Oil Chem. Soc. 34, 377 (1957).

³ R. K. BEERTHUIS, G. DIJKSTRA, J. G. KEPPLER, and J. H. RE-COURT, Ann. N. Y. Acad. Sci. 72, 616 (1959).

⁴ H. K. MANGOLD, J. L. GELLERMAN, and H. SCHLENK, Fed. Proc. 17, 268 (1958).

⁵ D. SWERN and C. H. DICKEL, J. Amer. chem. Soc. 76, 1957 (1954).