

Table 1. Plasma Insulin Effect in Normal Rats

	Mean	σ	t	P	No. exp.
with cystein	0.435	0.057	8.950	< 0.01	6
without cystein	0.625	0.032			

The plasma treated with cystein, to destroy insulin, induces to a lower consumption of glucose by the diaphragm. The difference between the consumption induced by the native plasma and treated plasma, is the insulinic effect, expressed here in mg of glucose consumed per 100 mg of diaphragm during 1 h incubation in Warburg apparatus. Statistically, the result is significant.

Table 2. Plasma Insulin Effect in Alloxan Diabetes

	Mean	σ	t	P	No. exp.
with cystein	0.470	0.050	1.453	0.1 < P < 0.2	10
without cystein	0.505	0.038			

Once the Langerhans islets are destroyed (B cells only), the insulinic effect of the plasma disappears. The small difference between the effect of both plasmas is not significant from a statistical standpoint.

Table 3. Plasma Insulin Effect in Pancreoprive Diabetes

	Mean	σ	t	P	No. exp.
with cystein	0.571	0.047	0.967	0.3 < P < 0.4	9
without cystein	0.600	0.068			

As is logical, there is no insulinic effect of the plasma. The slight difference in the effect between both plasma is not statistically significant.

Table 4. Plasma Insulin Effect After Hypophysectomy

	Mean	σ	t	P	No. exp.
with cystein	0.468	0.033	0.857	0.4 < P < 0.5	7
without cystein	0.486	0.037			

The consumption of glucose induced by the plasma, either treated or untreated with cystein, is the same in both cases. The plasma of the hypophysectomized rat has no insulinic effect.

Table 5. Plasma Insulin Effect in Hypophysectomized Rat Treated with Glucagon

	Mean	σ	t	P	No. exp.
with cystein	0.472	0.127	2.128	$P = < 0.05$	9
without cystein	0.638	0.141			

The insulinic effect which disappeared on hypophysectomy, reappears again.

Full-grown rats of both sexes have been utilized (140 to 180 g), coming from our own stock and fed with a 'standard' diet. The alloxan diabetes, pancreatectomy, and hypophysectomy were carried out by the methods described in previous works⁵. The evaluation of insulin in the plasma was carried out by the technique already described¹, modified in that only 0.1 cm³ of plasma were

utilized instead of 1 cm³ as described in the first of our works. The insulinic effect of the plasma is expressed by the difference in glucose uptake induced by the addition of normal plasma and treated with cystein. In hypophysectomized rats treated with glucagon, 0.5 mg of this hormone dissolved in Bayol-F were used. Two subcutaneous injections were made, the second one three days after the first. The animals were sacrificed three days after the second injection. The absence of hypophysis was always ascertained after the sacrifice of the animal.

Discussion. The disappearance of the insulinic effect of the plasma after the removing of the pancreas or the alloxan diabetes, does not logically require any comment. However, the reason why in acromegaly (RANDLE, CANDELA, VALLADARES, and CANDELA) the insulinic activity in the plasma is very high and disappears with hypophysectomy, has not been explained. RANDLE and YOUNG have also observed that if hypophysectomized animals are submitted to an early treatment with hormones for growth, the insulinic effect does not disappear. The fact that by treatment with glucagon, the insulinic effect of the plasma is maintained within the normal range has undoubted interest, among other reasons because it would suggest that its secretion is governed (stimulated) by the pituitary gland as was presumed by BORNSTEIN⁶.

R. R-CANDELA

*Instituto de Metabolismo y Nutrición, Madrid (Spain),
December 24, 1959.*

Résumé

La disparition de l'effet insulinique du plasma que l'on observe après l'hypophysectomie n'a pas lieu quand les animaux (rats) ont été préalablement soumis à un traitement de glucagon (0,5 mg suspendu en Bayol F).

⁵ I thank Dr. P. M. GONZ for the carrying out of the pancreatectomies and hypophysectomies.

⁶ J. BORNSTEIN, Personal communication to J. L. R-CANDELA.

Beeinflussung der Bromsulphalein-Clearance durch Sulfonamide beim Kaninchen

Bromsulphalein (BSP) gehört zusammen mit Bilirubin, Fluoreszein u. a. zu einer Gruppe von Substanzen, welche in bezug auf ihr Verhalten im Blut und in der Leber mehrere gemeinsame Züge aufweisen. Eine dieser Eigenschaften ist die Neigung, mit den Bluteiweissen Komplexe zu bilden, und es darf vermutet werden, dass diese Bindung nicht nur für den Transport dieser Farbstoffe, sondern auch für den Aufnahmemechanismus in der Leber irgendwie von Bedeutung ist. Auch Sulfonamide finden sich im Blut zum Teil an Eiweiss gebunden, wobei sie Bilirubin von der Bindungsstelle zu verdrängen scheinen^{1,2}. In diesem Zusammenhang interessiert die Frage, ob Sulfonamide die BSP-Clearance beeinflussen würden.

Methodik: Injektion von 5 mg/kg BSP intravenös, anschliessend Infusion von 0,5 bzw. 0,75 mg/kg/min BSP intravenös an 2 bis 3 kg schwere Kaninchen während etwa

¹ G. B. ODELL, J. clin. Invest. 38, 823 (1959).

² G. B. ODELL, J. Pediat. 55, 268 (1959).

BSP-Konzentrationen im Plasma während kontinuierlicher Infusion an Kaninchen vor bzw. nach Verabreichung von Sulfonamiden

Präparat	Dosis mg/kg	BSP-Infusion mg/kg/min	BSP in Plasma (mg%)		
			vor Sulfonamid	nach Sulfonamid	% Abnahme
Sulfisoxazol i. v.	288	0,5	3,2	1,9	41
	286	0,5	3,5	1,5	57
	267	0,75	8,0	2,9	64
	293	0,75	4,8	3,0	38
	83	0,75	4,2	2,0	52
	34	0,75	5,7	1,9	67
	8	0,75	4,4	3,8	14
	8	0,75	5,9	4,4	25
	2	0,75	5,0	4,6	8
	824	0,75	5,3	2,3	57
in den Magen	455	0,75	9,2	5,1	45
	229	0,75	5,3	2,1	60
	23	0,75	5,4	4,2	22
Sulfasomidin i. v.	145	0,75	14,1	5,3	62
Sulfadimethoxin i. v.	18	0,75	4,4	2,4	45
	81	0,75	4,9	2,1	57
	39	0,75	3,9	2,2	44
	4	0,75	5,4	4,2	22
	3	0,75	5,2	4,1	21
in den Magen	224	0,75	7,7	2,8	64
	22	0,75	4,0	2,5	38
	20	0,75	5,0	3,3	34
Sulfaphenazol in den Magen	236	0,75	7,4	2,7	64
Kombination von N ¹ -(4-Isopropoxy-benzoyl)-sulfanilamid + Sulfamerazin	334	0,75	6,2	3,1	50
	175	0,75	9,3	4,7	49
Sulfamethoxypyridazin in den Magen . . .	42	0,75	6,0	2,0	67

2 h. Nach Einstellung einer relativ konstanten Blutkonzentration Verabreichung des zu prüfenden Sulfonamids (Sulfisoxazol³, Sulfasomidin, Sulfadimethoxin⁴, Sulfaphenazol, eine Kombination von N¹-(4-Isopropoxy-benzoyl)-sulfanilamid + Sulfamerazin und Sulfamethoxypyridazin) entweder ebenfalls intravenös am «Entnahme-Ohr» oder in den Magen durch einen Tage bis Wochen vorher eingenähten Polyäthylenkatheter.

In Einzelfällen operative Vorbereitung in Pentothal-Äthernarkose mit Ligatur des Cysticus, Kanülierung des Choledochus und Einnähen eines Magenkatheters; 24 bis 48 h später BSP-Infusion am wachen Tier mit laufender Untersuchung der Galle bei erhaltenem enterohepatischem Kreislauf. BSP-Bestimmung kolorimetrisch nach SELIGSON *et al.*⁵.

Ergebnisse. Während der BSP-Infusionen von 0,75 mg/kg/min stellte sich bei den nicht operierten Tieren ein Gleichgewicht bei $4,89 \pm 0,63$ mg/100 ml Plasma ein, entsprechend einer Clearance von 15,3 ml/kg/min. Dieser Normalwert stimmt mit dem von LEWIS angegebenen (16,2 ml/kg/min) gut überein⁶. Bei den Fällen mit vorgängiger Operation waren die Ausgangswerte im Plasma bis zum 4. postoperativen Tag oft etwas höher.

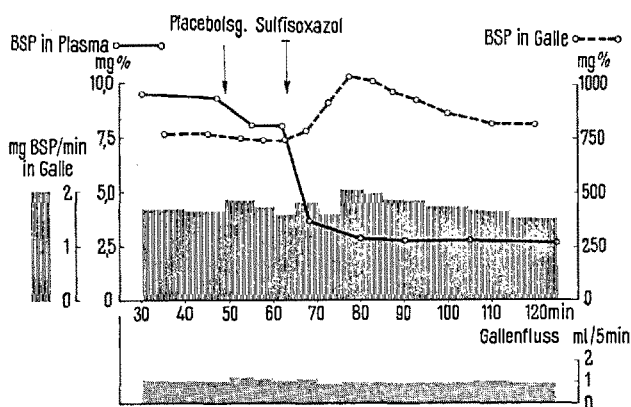
Sulfonamidverabreichung führte im Plasma sowohl bei intravenöser wie bei intragastrischer Applikation zu einem sehr rasch einsetzenden und anhaltenden Absinken der BSP-Konzentration. Die Gegenüberstellung des letzten Wertes unmittelbar vor und des niedrigsten Wertes innert 20 min nach der Sulfonamidgabe wurde in der Tabelle vorgenommen. Ein fassbarer Effekt tritt schon bei wenigen mg in Erscheinung; der beobachtete Abfall erreicht bei Steigerung der Sulfonamiddosis sehr bald ein Maximum von etwa 60%, bezogen auf den Ausgangswert, welches auch bei massiver Dosierung offenbar nicht überschritten wird.

Die Abbildung zeigt einen typischen Versuch bei kanüliertem Choledochus. Bereits 5 min nach der Sulfonamidgabe ist die Wirkung auf den BSP-Gehalt des Plasmas voll ausgebildet und bleibt während der weiteren Beobachtungszeit von über 1 h erhalten. Die Gallensekretion wird volumenmässig nicht beeinflusst, und trotz der verminderten Blutkonzentration hält sich die Konzentration in der Galle und damit die Ausscheidungsgeschwindigkeit konstant. Diese beiden Grössen nehmen vorübergehend eher noch etwas zu.

Besprechung der Befunde. Nachdem *in-vitro*-Kontrollmessungen ergeben haben, dass Zusatz von Sulfisoxazol zu einer BSP-Plasmalösung die Messwerte nicht wesentlich beeinflusst, muss angenommen werden, dass Sulfonamide bei Kaninchen die Blutkonzentration von BSP im Verlauf von intravenösen Infusionen regelmässig und akut zu senken vermögen. Eine naheliegende Erklärung läge in der Annahme einer Diffusion des Farbstoffes ins Gewebe infolge Verdrängung vom Plasmaalbumin. Ein ähn-

³ Gantrisin (Markenname).
⁴ Madribon (Markenname).
⁵ B. SELIGSON, J. MARINO und E. DODSON, Clin. Chem. 3, 638 (1957).
⁶ A. E. LEWIS, Amer. J. Physiol. 163, 54 (1950).
⁷ W. A. SILVERMAN, D. H. ANDERSON, W. A. BLANC und D. N. CROZIER, Pediatrics 18, 614 (1956).
⁸ R. C. HARRIS, J. F. LUCEY und J. R. MACLEAN, Pediatrics 21, 875 (1958).
⁹ W. A. BLANC und L. JOHNSON, J. Neuropath. exp. Neurol. 18, 165 (1959).
¹⁰ R. W. BRAUER und R. L. PESSOTTI, J. Pharmacol. exp. Therap. 97, 358 (1949).
¹¹ H. W. H. ANDREWS, J. Physiol., London 143, 49 P (1958).

licher Mechanismus wird für die wahrscheinlich ungünstige Wirkung von Sulfonamiden beim Icterus neonatorum gravis in bezug auf das Entstehen eines Kernikterus vermutet⁷⁻⁹. Ein vermehrtes Abwandern von BSP ins Gewebe erklärt die vorliegenden Befunde jedoch insofern nicht, als die Sekretion trotz herabgesetzten Blutgehalts mit unverminderter Geschwindigkeit weitergeht. Offensichtlich stellt sich ein neues Gleichgewicht ein mit Erhöhung der BSP-Clearance auf ungefähr das Doppelte der Norm.



Infusion von 0,75 mg/kg/min BSP am Kaninchen. Während des Lösungsmittel von Sulfisoxazol (Placebo) ohne wesentlichen Einfluss bleibt, führt 267 mg/kg Sulfisoxazol i. v. zu einem akuten Abfall der BSP-Blutkonzentration. Die BSP-Sekretion hingegen wird vorübergehend eher noch beschleunigt

Eine Kreislaufwirkung der Sulfonamide von dieser Größenordnung kommt nicht in Frage. Entweder wird die Farbstoffaufnahme im Bereiche der Leber erleichtert oder der Transport durch die Leberzellen hindurch wird irgendwie beschleunigt. Vermutlich handelt es sich um einen physikalisch-chemischen Vorgang. *In-vitro*-Versuche haben nämlich gezeigt, dass in Gegenwart von Plasma die Aufnahme von BSP durch Leberschnitte verzögert wird^{10,11}. In Analogie zum Bilirubin, welches durch Sulfonamide von seiner Eiweissbindung verdrängt wird, kann vermutet werden, dass Sulfonamide auch die BSP-Eiweiss-Bindung irgendwie lockern und damit die Aufnahme in der Leber erleichtern, auch wenn es in den übrigen Gefäßgebieten nicht zu einem vermehrten Abwandern ins Gewebe kommt.

Vielleicht besteht zwischen BSP und Bilirubin noch eine weitergehende Ähnlichkeit in dem Sinne, dass auch die Bilirubin-Clearance durch Sulfonamide gesteigert würde. Damit könnten die niedrigen Bilirubinwerte bei Sulfonamid-behandelten Frühgeburten⁸ zwanglos erklärt werden. Entsprechende Untersuchungen mit Bilirubin sind im Gange.

M. PILLER

Abteilung für experimentelle Medizin der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel, 4. April 1960.

Summary

Investigations in the rabbit demonstrate that even low doses of sulfonamides increase BSP clearance to about twice its normal level.

Antioxidant Activity of Mouse Liver and Kidney Extracts

Antioxidants have been postulated to play a central role in cellular metabolic processes by preventing spontaneous oxidative reactions which may yield products deleterious to the cell¹. They may be of specific importance in regulating melanin formation by mammalian pigment cells^{2,3}, and in stabilizing adrenaline within the adrenal medulla⁴. As yet, little is known concerning the chemical nature of tissue antioxidants, particularly with regard to their qualitative and quantitative variation among different mammalian tissues. Several investigators have clearly demonstrated the ability of aqueous extracts of mammalian skin to inhibit the autoxidative conversion of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) to melanin *in vitro*^{2,3,5}. During a recent study designed in part to characterize the chemical nature of inhibitory substances in skin extracts^{3,6}, parallel examination of mouse liver and kidney extracts was made for comparative purposes. The results are summarized in the present report.

The techniques were essentially those reported previously⁶. Briefly, livers and kidneys were removed from adult C3H mice, dissected free of adhering fat, weighed, and suspended in cold double glass-distilled water to yield 50 mg wet weight of tissue/ml. Following homogenization in a chilled Potter-Elvehjem homogenizer, the tissue extracts were stored at -20°C . Thawed extracts were centrifuged at $12,800 \times g$ for 15 min at 0°C , and an aliquot of the supernatant was tested for inhibition of DOPA autoxidation; dry weight of tissue extract was determined for each sample. The test system consisted of 1 ml $5 \times 10^{-3} M$ L-DOPA, 3 ml $0.05 M$ KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 buffer (pH 7.4), $0.1 \text{ ml } 1.6 \times 10^{-4} M$ CuSO_4 , and water and/or tissue extract to a final volume of 5.1 ml. All reactions were carried out in calibrated test tubes, which were incubated at 37°C . Progress of melanin formation was followed by taking hourly readings on a Klett-Summerson colorimeter with a KS-42 (blue) filter. The percent inhibition of DOPA autoxidation by tissue extracts was calculated as a function of experimental and control values at the fourth hour of incubation. Precipitation of proteins was performed by adding $5 M$ trichloroacetic acid (TCA) to tissue extracts (final concentration TCA = $0.8 M$). Following centrifugation, the precipitate was dissolved in a volume of $0.1 N$ NaOH such that the pH did not exceed 9.0; the resulting mixture was neutralized with HCl. Neutralization of the supernatant was accomplished with NaOH. The fractions thus obtained were tested for action on DOPA autoxidation. Tissue extracts were also tested for heat stability, dialyzability, and reversibility of inhibitory activity by sulfhydryl blocking agents⁶.

In confirmation of HIRSCH⁷, liver and kidney extracts produced a marked inhibition of DOPA autoxidation. Liver yielded 9.1 ± 0.3 mg dry weight of extract from 50 mg wet weight, and the percentage inhibition of DOPA autoxidation was 56.4 ± 3.7 per 0.5 mg dry weight of extract (means $\pm$ mean S. E. based on 6 determinations).

¹ H. M. HIRSCH, in, *Pigment Cell Biology* (M. GORDON, Ed., Academic Press, Inc., New York 1959), p. 327.

² P. FLESCH and S. ROTHMAN, *Science* **108**, 505 (1948).

³ W. C. QUEVEDO, JR. and J. E. ISHERWOOD, *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* **3**, 54 (1959).

⁴ D. G. HUMM, M. ROEDER, M. LANDEW, and E. E. CLARK, *Brit. J. Pharmacol.* **10**, 163 (1955).

⁵ P. FLESCH, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, N. Y. **70**, 136 (1949).

⁶ W. C. QUEVEDO, JR. and J. E. ISHERWOOD, *J. Invest. Derm.*, in press.

⁷ H. M. HIRSCH, *Cancer Res.* **15**, 249 (1955).