

Comparison between liver and blood catalase inhibition, in tumor-bearing and in tyrosine and denatured albumin injected mice, 24 h after treatment

Number of mice	Treatment	% inhibition of hepatic catalase activity	Optical density of hemolysates at 575 m μ E	Catalase activity of hemolysates Ko 0.10 ⁴	Ko/E
20	none	—	0.487 $\pm$ 0.024	507 $\pm$ 27	0.104
10	S. 180 of 10 days	30	0.465 $\pm$ 0.011	475 $\pm$ 47	0.103
16	S. 180 of 17 days	49	0.512 $\pm$ 0.004	550 $\pm$ 42	0.107
10	Tyrosine 5 mg	32	0.520 $\pm$ 0.015	517 $\pm$ 63	0.099
15	Tyrosine 10 mg	40	0.502 $\pm$ 0.006	555 $\pm$ 57	0.111
10	Denatured albumin 25 mg	37	0.570 $\pm$ 0.010	615 $\pm$ 31	0.120

The substances tested were: tyrosine which is active both *in vitro*⁶ and *in vivo*⁷ and a denatured albumin fraction from human neoplastic ascitic fluid, which is active only *in vivo*⁸. The latter material, before denaturation, is active also *in vitro*, but it loses this property when denatured by treatment with acetic acid at pH 4 for 1 h and is subsequently precipitated with acetone.

Tyrosine was injected subcutaneously in 10 mg doses, in 1 ml, as a fine suspension, obtained by neutralizing its acid solution.

The denatured albumin was injected subcutaneously in doses of 25 mg, suspended in 1 ml of physiological saline.

Male albino mice of the strain IVB (Institut Curie, Paris) of 18–22 g of weight were used. They were killed 24 h after the injection by decapitation, and the blood collected in citrated physiological saline. The erythrocytes were washed twice with the same solution and twice with plain saline. They were then lysed with 4 ml of distilled water, by repeated freezing and thawing. After centrifugation, the solutions were diluted to an optical density of approximately 0.500, when read on a Beckman DU spectrophotometer at 575 m μ . 1 ml of this solution was poured into 50 ml of 0.01N H₂O₂ and catalase activity determined by the method of VON EULER and JOSEPHSON⁹. The catalase activity was referred to the hemoglobin content, by the ratio Ko to the optical density at 575 m μ . The activity of liver catalase was also determined using 1 ml of a homogenate diluted with phosphate buffer 1/150 M, pH 6.8, to have 1 mg of fresh liver/ml.

As control, normal healthy mice, and mice bearing Sarcoma 180, 10 and 17 days after implantation, were used.

As appears from the Table, the erythrocyte catalase is not affected either by tyrosine or by denatured albumin; on the contrary, there is a marked decrease of liver catalase activity for both treatments. The picture is therefore superimposable to that given by tumors.

Apparently, 'toxohormone' is not the only material acting like tumors, and it is not sufficient to observe a depression of liver catalase, without a corresponding decrease of erythrocyte catalase, to correlate the activity found with that of living tumors.

Riassunto. La tirosina che inibisce *in vivo* l'attività della catalasi epatica dei topi ed *in vitro* l'attività della catalasi cristallizzata, ed una frazione di albumine denaturate attiva sulla catalasi solo *in vivo*, si sono dimostrate inattive sulla catalasi eritrocitaria.

A. AGRADI¹⁰

Centro Studio Tumori di Busto Arsizio (Italy), September 21, 1960.

⁶ G. CERIOTTI, L. SPANDRIO, and E. BERTI, *Biochim. biophys. Acta* 23, 362 (1957).

⁷ G. CERIOTTI, L. SPANDRIO, and A. AGRADI, *Biochem. J.*, in press.

⁸ G. CERIOTTI, L. SPANDRIO, and A. AGRADI, *Tumori* 46, 486 (1960).

⁹ H. VON EULER and H. JOSEPHSON, *Liebigs Ann.* 452, 158 (1927).

¹⁰ *Acknowledgment.* The present research was partially supported by a grant from Farmitalia S.p.A.

Étude électrophorétique concernant les protéines et les acides nucléiques tissulaires a propos de l'inhibition de la cancérogenèse

L'inhibition de la cancérogenèse par administration d'implants cancéreux passés 24 h sous la peau du lapin, a donné des résultats très encourageants soit pour le cancer mammaire des souris RIII, soit pour les souris AkR leucémiques¹, enfin ces mêmes techniques furent appliquées au cancer chez l'homme.

Nous avons analysé avant et après passage sur lapin les protéines et les acides nucléiques de divers tissus de souris et humains, normaux et cancéreux, pour mieux connaître nos implants néoplastiques. L'importance des acides nucléiques dans la cancérogenèse est généralement admise; notamment LATARJET et al.² sont parvenus à produire des cancers multiples chez la souris par administration d'acides nucléiques extraits de tissus leucémiques.

Matériel et méthodes. Les analyses électrophorétiques³ et immunoélectrophorétiques⁴ ont été effectuées sur lames de verre gélosées en milieu tampon véronal (pH = 8,6; μ = 0,06; 6 volts/cm). La durée a été de 2 h pour les protéines (1 h pour l'immunoélectrophorèse) et de 30 min pour les acides nucléiques.

Les analyses électrophorétiques des protéines ont été effectuées soit directement sur le tissu (0,5 à 2 mg), soit après extraction à + 4° (5 à 40 mg) par un tampon phosphate 0,02 M, pH = 7,3 (coloration: Amidosschwarz).

Les acides nucléiques⁵ examinés également après électrophorèse, ont été extraits selon la méthode de SCHUSTER et al.⁶ sur 5 à 20 mg de tissu frais (coloration: vert de méthyl-pyronine). Leur concentration a été appréciée d'après une échelle étalon effectuée avec un acide nucléique

¹ R. FISCHER et G. RUDALL, *Exper.* 16, 33 (1960).

² R. LATARJET, N. REBEYROTTE et E. MOUSTACCHI, *C. R. Acad. Sci. Paris* 246, 853 (1958).

³ J. MONNIER et R. FISCHER, *Rev. Hemat.* 13, 458 (1958).

⁴ J. J. SCHEIDEGGER, *Int. Arch. Allergy* 7, 103 (1955).

⁵ Le terme «acide nucléique» utilisé dans ce travail se rapporte évidemment aux produits d'extraction de la méthode utilisée.

⁶ H. SCHUSTER, G. SCHRAMM et W. ZILLIG, *2. Naturforsch.* 11b, 339 (1956).

extrait de la levure (provenance Mann Research Lab. New-York) (Fig. 1). Toutes ces analyses ont été faites dans des conditions de concentration identiques, soit donc comparables entre elles.

Résultats. 1. Tissus de souris. Nous avons examiné les protéines et les acides nucléiques de tissus de souris normales, AkR (leucémiques) et d'une souris R III (tumeur mammaire). Pour chaque animal nous avons étudié: le cœur, les muscles striés, les reins, la rate, le foie, le thymus, les surrénales, le cerveau, les ganglions lymphatiques et leucémiques (souris AkR) de même que les tumeurs mammaires (souris R III).

Toutes les expériences ont été faites sur des tissus non désanguinés. Nous avons constaté dans tous les tissus avant passage sur lapin des fractions protéiques non décelées dans le sérum de souris; ces tissus tant des souris normales que AkR et R III ont donné comparativement dans ces trois groupes, des images très proches. Après passage, il y a diminution des protéines du type tissulaire, l'image se rapprochant de celle du sérum de lapin, avec cependant en général une fraction albuminique légèrement plus rapide.

La concentration des acides nucléiques décelés avant passage a varié considérablement selon les tissus (Fig. 2).

Après passage de 24 h sur lapin les acides nucléiques des tissus présentent des spots d'intensité faible et comparable, ce qui représente une forte diminution de ceux-ci dans

mines et de γ -globulines humaines. Dans le cas d'un glioblastome nous avons constaté, après passage, une ligne immunoélectrophorétique dans la zone des préalbumines.

Les acides nucléiques extraits des divers tissus examinés ont tous donné des spots très nets. Après passage sous la peau du lapin, nous avons fait les mêmes constatations que pour les tissus de souris. Dans un cas de carcinome du sein, la diminution des acides nucléiques initiaux a été d'environ 65% alors qu'elle a été d'environ 90% pour un glioblastome.

Les analyses des tissus lyophilisés avant et après passage sur lapin ont donné des résultats comparables aux tissus frais.

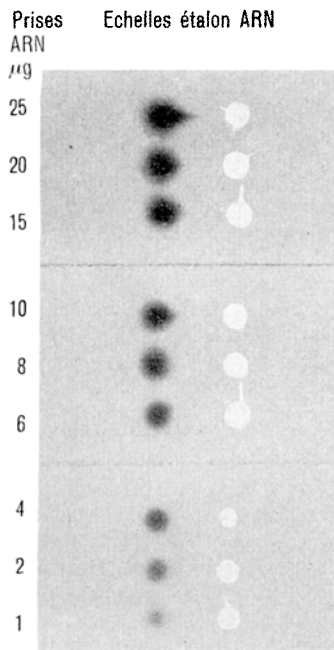


Fig. 1

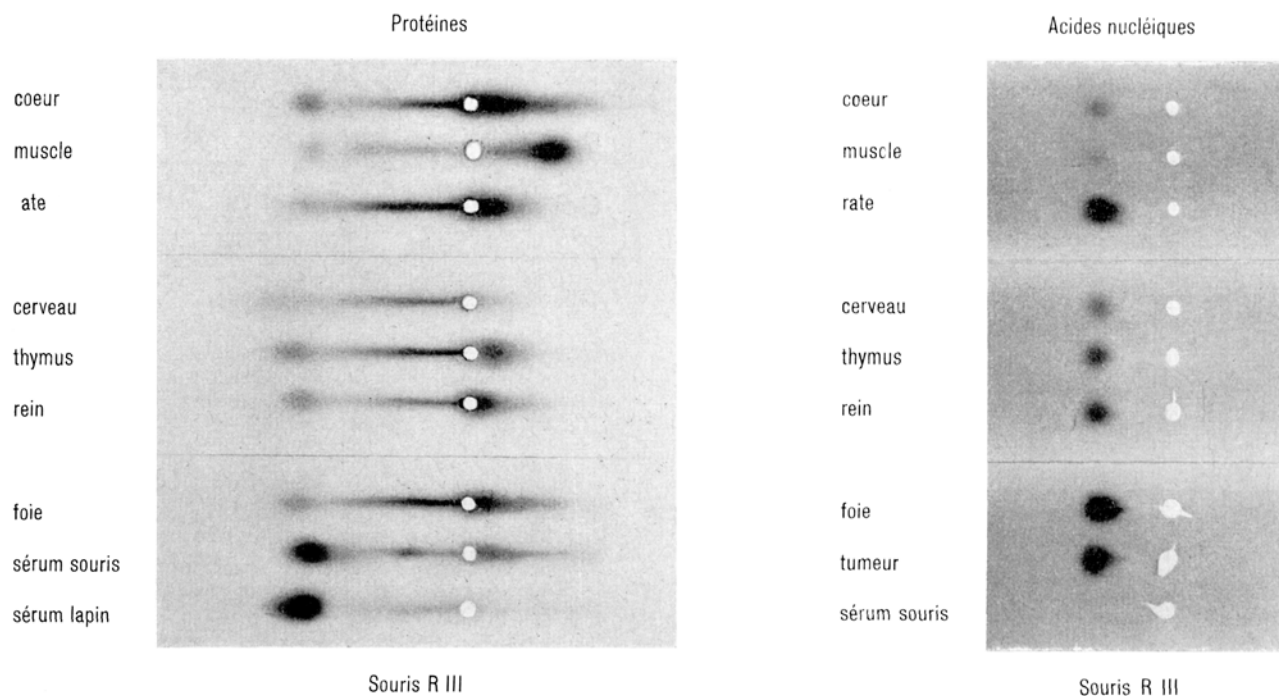


Fig. 2

les tissus riches avant passage (95% de perte pour les ganglions leucémiques AkR). Par contre il y a peu ou pas de perte dans les tissus initialement pauvres en acides nucléiques (Fig. 3).

2. Tissus humains. Nous avons examiné plusieurs types de tissus humains néoplastiques. Lors de leur passage sous la peau du lapin, il y a diminution progressive des protéines humaines, celle-ci étant fonction du temps de passage, de la forme et de la texture du tissu. Nous l'avons vérifié par immunoélectrophorèse, méthode qui après 24 h de passage décelait encore la présence d'albu-

Summary. Cancerous or leukotic tissue fragments modified by a 24 h subcutaneous implantation in the rabbit, become capable of favouring the inhibition of cancerogenesis.

This paper is concerned with the study of proteins and nucleic acids of the so-treated implants.

⁷ Qu'il nous soit permis de remercier ici Madame Docteur GLARNER pour l'aide précieuse qu'elle nous a apportée en pratiquant les passages sous la peau du lapin.

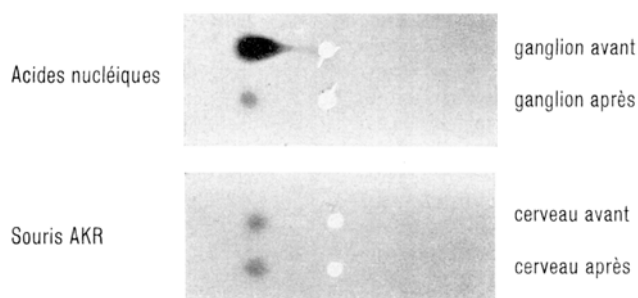


Fig. 3

R. FISCHER⁷ et J. MONNIER*Centre de Transfusion Sanguine, Hôpital Cantonal, Genève (Suisse), le 29 novembre 1960.*

Beitrag zur Papierchromatographie der Phytoöstrogene

Im Anschluss an die erfolgreichen chromatographischen Arbeiten von BOSE und CHANDRAN¹, BIGGERS und CURNOW², LYMAN et al.³ wird in der vorliegenden Mitteilung die papierchromatographische Trennung von Phytoöstrogenen aus Pflanzenextrakten beschrieben.

Das Pflanzenmaterial wurde jeweils mit 96% Alkohol extrahiert, der Alkohol unter vermindertem Druck abdestilliert und das Residuum in 1–2 ml Azeton gelöst. Von dieser Lösung wurden Proben in Form eines 2 mm breiten und 4 cm langen Streifens auf Papier Whatman Nr. 2 und 4 aufgetragen. Als Entwickler wurde eine Mischung von 2 Teilen Chloroform, 1 Teil konzentrierter Essigsäure und 1 Teil Wasser benutzt, und zwar in zwei Modifikationen: 1. untere Schicht dieser Mischung, 2. obere Schicht.

Die Chromatogramme wurden luftgetrocknet und die Stoffe mit UV-Licht und 0,1% Ferrichlorid-Lösung nachgewiesen. Die östrogene Aktivität der nachgewiesenen

Stoffe konnte nach vorheriger Extraktion mit Methanol an infantilen Mäuseweibchen von 6–8 g bestimmt werden (Methodik der Bestimmung wie in der früheren Arbeit: CHURÝ⁴).

Die untere Schicht der Entwicklungsmischung ist für die Trennung der Stoffe nicht geeignet, da das Chlorophyll mitgerissen und die Stoffe maskiert werden. Bei der Anwendung der oberen Schicht bleibt das Chlorophyll am Start zurück, was eine gute Trennung der anwesenden Stoffe ermöglicht. Im UV-Licht bei Anwendung von Kobaltglasfilter können mindestens 4, höchstens 8 Streifen sichtbar werden, deren Rf-Werte in der Tabelle I angeführt sind.

Die Ergebnisse der geprüften biologischen Aktivität der in den einzelnen Streifen anwesenden Stoffe sind der Tabelle II zu entnehmen:

Es ergibt sich, dass man chromatographisch auch solche Spuren von sexualaktiven Stoffen im Pflanzenmaterial nachweisen kann, die sonst in gereinigten Auszügen mittels biologischer Tests nicht erfassbar sind.

Den Detektionsergebnissen mit 0,1% Ferrichlorid-Lösung nach, sind die Stoffe in den Streifen mit Rf 0,95 bis 0,97 wahrscheinlich von Flavonoiden-Charakter. Ob der blau fluoreszierende Stoff (Rf 0,49) mit dem Cumestrol identisch ist, müssen spektrophotometrische Messungen beantworten. Beim hellblau fluoreszierenden Stoff (Rf 0,85) nehmen wir an, dass es sich um eine wahrscheinlich noch unbekannte sexualaktive Substanz handelt, zu deren näherer Charakterisierung Versuche im Gange sind.

Résumé. Description d'une méthode chromatographique sur papier pour la séparation des phytoestrogènes dans les extraits non purifiés de plantes. En utilisant la couche supérieure d'un mélange de deux parts de chloroforme, d'une part d'acide acétique et d'une part d'eau distillée, on a extrait 3 substances, qui, soumises au test biologique sur des souris infantiles, se montrèrent estrogènes.

J. CHURÝ

Biologisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät, Brno (CSR), 30. Juni 1960.

Tabelle I

Streifen	Fluoreszenz	Rf-Wert	Bemerkung
I	rot	—	—
II	hellblau	0,37	—
III	blau	0,49	aktiv
IV	dunkel	0,65	—
V	grün	0,76	—
VI	hellblau	0,85	aktiv
VII	grünlichgelb	0,94	aktiv
VIII	gelb-grün	0,97	aktiv

Tabelle II

Fluoreszenz	mg Uterusgewicht	% Zuwachs gegen Kontrolle
rot	3,7 ± 0,35	—
blau	10,7 ± 0,80	+ 163%
hellblau	13,00 ± 3,00	+ 242%
grünlich-gelb	6,50 ± 0,30	+ 71%
Kontrolle	3,80 ± 0,40	—

Further Studies on the Influence of Chloride on the Renal Tubular Reabsorption of Bicarbonate in the Dog

The influence of NaCl-induced rises in plasma chloride concentration (P_{Cl}) on tubular bicarbonate reabsorption was studied during $NaHCO_3$ loading 1. in normal dogs, 2. in respiratory acidotic dogs and 3. in dogs treated with acetazolamide¹. The data of these experiments were compared with the results previously obtained in this laboratory in normochloremic² and in hypochloremic^{3–5} animals.

¹ Diamox was generously supplied by the Lederle Laboratories.² CH. TOUSSAINT and P. VEREERSTRAETEN, *Exper.* 16, 309 (1960).³ CH. TOUSSAINT, M. TERLERMAN, and P. VEREERSTRAETEN, *Exper.* 14, 417 (1958).⁴ CH. TOUSSAINT, M. TERLERMAN, and P. VEREERSTRAETEN, *Exper.* 15, 232 (1959).⁵ CH. TOUSSAINT, M. TERLERMAN, and P. VEREERSTRAETEN, *Exper.* 15, 434 (1959).