

The Effect of 2-Ethylisothionicotinamide (TH₁₃₁₄) on the Ascorbic Acid and Cholesterol Content of the Adrenal Glands in Rats

It has been suggested in several investigations that antituberculous drugs, isoniazid (INH) and para-aminosalicylic acid (PAS), cause changes in the organism which resemble those caused by adrenocorticotrophin (ACTH). In animal experiments, the ascorbic acid and cholesterol content of the adrenal gland is reduced after relatively high INH doses¹⁻³ and the concentration of plasma 17-hydroxycorticosteroids is increased⁴. Similar changes have been demonstrated after the administration of PAS, i.e. a decrease in the ascorbic acid and cholesterol level⁵ and an increase in the 17-hydroxycorticosteroids⁴ of the adrenal gland.

2-Ethylisothionicotinamide (TH₁₃₁₄) which was synthesised by LIBERMANN in 1956, has been in clinical use a relatively short time and there is little experience of its use and few reports of animal experiments⁶. There are no reports in the literature on its effect on the hypophysial-adrenal system. The present work is a study of the effect of TH₁₃₁₄ on the weight and ascorbic acid and cholesterol content of adrenal glands in rats.

The experimental animals used were 90 female rats weighing 210–290 g, aged about one year. They were divided into groups of equal weight, each group consisting of 10 rats. TH₁₃₁₄ (Trescatyl)⁷, 100 mg/kg of body weight/24 h, was administered in a suspension of 2 ml of water by catheter into the stomach. The control animals were given the corresponding amount of water. The experi-

mental period was 1, 3 and 5 days, after which the animals were weighed and killed by decapitation on the first, third and fifth day. All the animals were killed at 10–12 a.m. The adrenal glands were carefully freed from the surrounding tissue and weighed on a torsion balance. The right adrenal of each rat was homogenised in 4% trichloroacetic acid and the total ascorbic acid content of the homogenate was determined by the method of SCHAFFERT and KINGSLEY⁸. The left adrenal gland was homogenised in acetic acid anhydride and the total cholesterol was determined in the homogenate according to LEPPÄNEN⁹. Student's 't' test was used in the statistical analysis of the results.

The results are shown in Tables I and II. No significant difference was established between the various groups in the weights of the experimental animals and the adrenal glands. The ascorbic acid content of the adrenal gland was significantly depressed in all the experimental groups 2 h after the administration of TH₁₃₁₄. In the animals receiving treatment for 1 day and 3 days, the change was highly significant ($P < 0.001$) compared with the controls; in the animals treated for 5 days, significant

¹ L. EIDUS and J. NURIDSÁNY, *Acta physiol. hung.* 10, 101 (1956).
² G. VELTMAN, *Ärztl. Wschr.* 10, 751 (1955).
³ M. KOHOUT and R. KRULÍK, *Rozhl. Tuberk.* 20, 4 (1960).
⁴ M. KOHOUT and R. KRULÍK, *Exper.* 17, 224 (1961).
⁵ H. CAUWENBERGE, *Lancet* 1951/II, 686.
⁶ N. RIST, *Adv. Tuberc. Res.* 10, 69 (1960).
⁷ Kindly supplied by May & Baker Ltd.
⁸ R. R. SCHAFFERT and R. KINGSLEY, *J. biol. Chem.* 212, 59 (1955).
⁹ V. LEPPÄNEN, *Scand. J. clin. lab. Invest.* 201, 8 (1956).

Tab. I

The effect of 100 mg/kg of perorally administered TH₁₃₁₄ on the body weight, the weight of the adrenal glands, ascorbic acid and cholesterol content of the adrenal gland (mean and S.E.) of the rat determined 2 h (Table I) and 14 h (Table II) after the last TH₁₃₁₄ administration

Treatment	Number	Initial weight of experimental animals	Final weight	Weight of the adrenal glands	Ascorbic acid		Cholesterol
		g	g	mg	γ/mg	P	γ/mg
Control	20	248 6.1	251 6.4	57.2 1.8	2.98 0.10		40.0 1.4
TH ₁₃₁₄ 1st day	10	247 9.0	249 8.8	53.7 3.4	2.19 < 0.001 0.18		36.2 3.2
TH ₁₃₁₄ 3rd day	10	249 9.7	246 9.3	62.6 2.7	2.25 < 0.001 0.16		34.3 3.6
TH ₁₃₁₄ 5th day	10	250 8.1	247 8.4	62.0 1.6	2.58 < 0.01 0.10		34.2 2.8

Tab. II

Treatment	Number	Initial weight of experimental animals	Final weight	Weight of the adrenal glands	Ascorbic acid		Cholesterol
		g	g	mg	γ/mg		γ/mg P
Control	10	246 7.8	248 8.1	58.0 3.2	2.89 0.12		39.0 2.9
TH ₁₃₁₄ 1st day	10	249 8.5	259 8.3	55.1 2.8	2.66 0.09		49.7 < 0.05 4.1
TH ₁₃₁₄ 3rd day	10	245 9.0	245 9.2	58.2 2.8	2.77 0.12		51.3 < 0.01 2.6
TH ₁₃₁₄ 5th day	10	250 9.7	249 10.0	62.7 3.7	2.74 0.20		60.4 < 0.001 4.2

($P < 0.01$). The values were normalised in all the groups 14 h after the administration of TH_{1314} .

None of the groups showed a significant difference from the controls in the cholesterol content of the adrenal gland 2 h after the administration of the drug. The values had risen significantly in all the experimental groups after 14 h. The change was significant in the group treated for 24 h ($P < 0.05$) and that treated for 3 days ($P < 0.01$) and highly significant ($P < 0.001$) in the group treated for 5 days.

The ascorbic acid level of the adrenal gland is used extensively in animal experiments as an indicator of adrenocortical activity^{10,11}. The cholesterol content of the adrenal gland has also been found to decrease when adrenocortical activity increases and, on the other hand, a decrease in activity seems to be accompanied by an elevation of the cholesterol content which varies greatly in the different animal species^{12,13}.

The results obtained in the present investigation show that TH_{1314} increases adrenocortical activity. Whether this stimulating influence is transmitted only via the hypophysis, or whether TH_{1314} is also capable of stimulating the adrenal cortex directly, is a question that has still to be solved. It has been shown that INH stimulates the adrenal cortex also in hypophysectomised rats¹, where as PAS does not stimulate it directly⁶. Whether TH_{1314}

is able directly to stimulate the adrenal cortex is a point that requires further study.

Zusammenfassung. Bei ein- bis fünftägiger Verabreichung von 100 mg 2-Aethylisothionicotinamide (TH_{1314})/kg peroral kommt es bei Ratten nach 2 h zu einer Absenkung des Ascorbinsäuregehalts in den Nebennieren. Nach 14 h ist der Ascorbinsäuregehalt der Nebennieren wieder normal geworden. Nach 2 h wurden keine bedeutenden Veränderungen im Cholesterolgehalt der Nebennieren bemerkt, dagegen stieg der Cholesterolgehalt nach 14 h. stark an. Bei den absoluten Gewichten wurden keine bedeutenden Unterschiede beobachtet. Die Resultate zeigen, dass TH_{1314} die adrenocorticale Aktivität steigert.

S. J. SIMILÄ, M. J. LAINE, and E. NÄÄTÄNEN¹⁴

Department of Anatomy, University of Turku (Finland), June 12, 1962.

¹⁰ G. SAYERS, *Physiol. Rev.* 30, 241 (1950).

¹¹ M. A. SLUSHER and S. ROBERTS, *Endocrinology* 67, 873 (1960).

¹² W. B. KESSLER and J. LEATHAM, *Fed. Proc.* 11, 362 (1952).

¹³ M. ALPERT, *Endocrinology* 46, 166 (1950).

¹⁴ Aided by a grant from the Sigrid Jusélius Foundation.

Der Übertritt von Antikörpern gegen Nahrungsmittel-Antigene in die Frauenmilch

Der Nachweis von Antikörpern in der Frauenmilch ist wiederholt beschrieben worden¹⁻⁴. In den bisher veröffentlichten Arbeiten wurde die Frauenmilch fast durchweg auf ihren Gehalt an Immunstoffen gegen Krankheits-erreger untersucht. Studien über Antikörper gegen unbelebte Antigene wurden, wenn wir von den Untersuchungen WITEBSKY⁵ über das Vorkommen von Rhesusantikörpern in der Frauenmilch absehen, bisher nicht vorgenommen.

Diese Lücke auszufüllen, war im Rahmen unserer seit Jahren durchgeführten Untersuchungen über die Bedeutung von Lebensmittelantigenen und Antikörpern eine notwendige Aufgabe, deren Lösung Gegenstand der folgenden Ausführungen ist.

Methode. Frauenmilch: Die frühestens am 4. Tag *post partum* gewonnenen Milchproben wurden durch Zentrifugieren (30 min bei 3000 Umdrehungen/min) entfettet, indem wir die Fettschicht durch Applizieren von zwei Löchern durchbrachen und das fettfreie Medium abpipettierten. Anschliessend wurde das fettfreie Medium 30 min bei 56°C inaktiviert.

Nachweis von Antikörpern gegen Kuhmilch in Frauenmilch
4–48 Tage *post partum* (70 untersuchte Frauen)

Anzahl Mütter	Titer der Antikörper gegen Kuhmilch
4	1:160–320
8	1: 40
5	1: 20
3	1: 10
4	1: 5
Total	
24 = 34,3%	positiv
29 = 41,4%	fraglich
17 = 24,3%	negativ

Hämagglutinationstest: Wir führten den Test in der Weise aus, dass wir fallende Verdünnungen (1:5, 1:10 usw. bis 1:320 in Veronal-Puffer) der entfetteten Frauenmilchproben in Röhrchen brachten, die gleiche Volumina tanninisierten und mit Kuhmilch beladener O-Erythrocyten enthielten (Methode siehe bei ⁶ und ⁷). Der positive Ausfall ist durch die Bildung eines charakteristischen Bodensatzes mit gezacktem Rand gekennzeichnet, welcher sich durch Schütteln nicht homogenisieren lässt. Besonders deutlich wird eine erfolgte Hämagglutination, wenn man den Ansatz etwa 15 h bei +4°C stehen lässt und ihn anschliessend während 10 min bei 2000 Umdrehungen/min zentrifugiert.

Resultate. Wir untersuchten mit der oben erwähnten Methode Milchproben von 70 Frauen in der Weise, dass wir die an *verschiedenen* Tagen erhaltene Milch auf ihren Gehalt an Antikörpern gegen Kuhmilch prüften. Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, konnten Antikörper in der Milch von 24 stillenden Frauen nachgewiesen werden. Bei 29 Probanden fiel der Hämagglutinationstest fraglich und bei 17 negativ aus (s. Tabelle).

Das Vorkommen von Antikörpern in der Frauenmilch ist *Schwankungen* unterworfen, was die mehrmalige Untersuchung der Milch der gleichen Mutter an verschiedenen Tagen deutlich erkennen liess. Die Figur 1 zeigt am Beispiel von drei stillenden Müttern, deren Milch siebenmal (bzw. sechsmal) zu verschiedenen Zeiten untersucht wurde, dass der Kuhmilch-Antikörpertiter in der Frauenmilch erheblich variiert. Es ist demnach auch anzu-

¹ R. DEGWITZ, *Handbuch der Kinderheilkunde* (Verlag F. C. W. Vogel, Berlin 1931), 4. Aufl. Bd. 1, p. 270.

² G. EDSALL, *Ann. New-York Acad. Sci.* 66, 32 (1956).

³ A. B. SABIN und A. H. FIELDSTEEL, *Pediatrics* 29, 105 (1962).

⁴ J. C. LEISSRING, J. ANDERJON und D. W. SMITH, *Amer. J. Dis. Children* 103, 160 (1962).

⁵ E. WITEBSKY, G. W. ANDERSON und A. HEIDE, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 49, 179 (1942).

⁶ E. BERGER und R. CH. BAUER, *Exper.* 15, 108 (1959).

⁷ E. BERGER, *Z. allg. Path. Bakt.* 22, 676 (1959).