

Results. The results are given in the Table. Thyroid weight in animals treated with Melatonin (group E) was markedly lower (23.5%) than in the control group (A) and the difference was statistically significant ($t = 2.23$). In the animals treated with MTU and Melatonin (F), thyroid weight was lower (29.7%) than in animals which received only MTU (B) and the statistical difference was very significant ($t = 3.56$).

In animals treated with hydroalcoholic solution (C) thyroid weight was lower than in the control group (A) but the difference was not statistically significant ($t = 1.13$). On the contrary, in the group treated with MTU and hydroalcoholic solution (D) the thyroid weight was markedly lower (24.7%) than in the group treated by MTU only (B) and the difference was statistically significant ($t = 4.07$). Since the difference between groups treated only by hydroalcoholic solution and groups treated by a hydroalcoholic solution of Melatonin is low and not statistically significant, it is reasonable to think that the weight difference between C and A is mainly due to the influence of alcohol.

Histologically the differences are more evident (Figure). The height of the cells in the animals treated with Melatonin (E) and in those treated with Melatonin and MTU (F) was markedly lower than in the control group (A) and in the group treated with MTU (B). The difference were more significant respectively ($t = 15$, $t = 9.5$). There was no difference between animals treated with hydroalcoholic solution and MTU (D) and animals treated with MTU only (B).

The discrepancy observed between the behaviour of gland weight and cell height could be explained by supposing that the weight modification induced by alcohol is due to reduction of the thyroid colloid or of the thyroid vascularity.

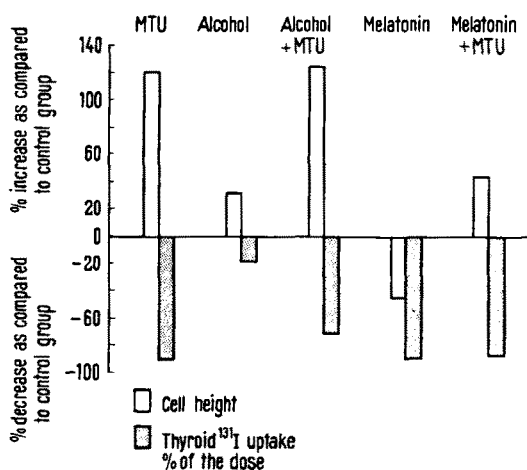


Fig. 2. Cell height (evaluated on 100 cells) of follicular thyroid epithelium and ¹³¹I uptake changes in Melatonin, Alcohol, MTU, Alcohol + MTU, Melatonin, Melatonin + MTU treated rats.

The ¹³¹I uptake was definitely lower (95.2%) in animals treated with Melatonin (E) than in the control group (A) and the difference was statistically significant ($t = 10.8$). As was to be expected, the ¹³¹I uptake was reduced in animals treated with MTU (90.9%) (B), but the administration of Melatonin did not produce any further reduction of ¹³¹I uptake (F). In animals treated with hydroalcoholic solution (C), the ¹³¹I uptake was slightly lower (16%) than in the control group (A), but the difference was not statistically significant ($t = 1.16$); in animals which received hydroalcoholic solution and MTU (D) the ¹³¹I uptake was lower (74%) than in control group (A), but the reduction was less than in animals who received MTU only (B). The value of these results is difficult to explain. The experience was repeated with a solution of Melatonin in glycerol. This solution decreased thyroidal ¹³¹I uptake only by 43% compared with the controls.

Discussion. According to our results Melatonin has an inhibitory effect on thyroid function. This substance is able to prevent thyroid hyperplasia by MTU, and to reduce the thyroidal ¹³¹I uptake. These results suggest that the modifications produced by a pineal extract (DE LUCA et al.¹) may be due to Melatonin.

Rats treated with alcohol showed a decrease in thyroid weight, those treated with MTU and alcohol showed a smaller increase of thyroid weight than those treated with MTU only. On the other hand, the height of thyroid cells and ¹³¹I uptake were not affected by the administration of alcohol. The significance of these modifications is not clear. ASCHKENASY and GUERIN² have observed in rats a moderate effect of alcohol on thyroid function.

On the basis of our results, we cannot entirely explain the influence of Melatonin on thyroid activity. As this substance prevents the increase of thyroid weight in animals treated with thiouracil, it is reasonable to think that melatonin could have an inhibitory effect on TSH secretion or on the action of this hormone on thyroid gland. Both of these hypotheses are now under further investigation in our Department.

Riassunto. Gli autori hanno studiato la funzione tiroidea in ratti trattati con soluzione idroalcoolica di Melatonina ed hanno osservato che negli animali così trattati il peso della ghiandola, l'altezza delle cellule follicolari, e la captazione del radioiodio si riduceva.

La Melatonina ha anche inibito la formazione della iperplasia tiroidea da tiouracile.

L. BASCHIERI, F. DE LUCA, L. CRAMAROSSA, C. DE MARTINO, A. OLIVERIO, and M. NEGRI

Istituto di Patologia Speciale Medica e Metodologia Clinica dell'Università di Roma (Italy), August 6, 1962.

¹ P. ASCHKENASY, P. LELU, and M. T. GUERIN, C. R. Soc. Biol. 154, 1409 (1960).

weiss gespeichert, wobei auf 1 Molekül ATP ungefähr 4 Moleküle Amine entfallen (BLASCHKO, BORN, D'IORIO und EADE¹, FALK, HILLARP und HÖGBERG², SCHÜ-

¹ H. BLASCHKO, G. V. BORN, A. D'IORIO und N. R. EADE, J. Physiol. 132, 44P (1956).

² B. FALCK, N. A. HILLARP und B. HÖGBERG, Acta physiol. scand. 36, 306 (1956).

Ribonuclease- und Trypsinwirkung auf isolierte Nebennierenmark-Granula

Die Brenzcatechinamine – Adrenalin und Noradrenalin – werden nach den heutigen Vorstellungen in den Nebennierenmarkgranula, cytoplasmatischen Organellen der chromaffinen Zelle, als Komplex mit ATP und Ei-

MANN³). WRIGHT und TRAGER⁴ haben in Inkubationsversuchen mit Leberhomogenaten gefunden, dass ein Ribonucleoprotein oder Ribonucleinsäure notwendig sind, um den ATP-Gehalt der Homogenate aufrechtzuerhalten, und dass nach Ribonucleaseeinwirkung der ATP-Gehalt der Homogenate stark abnimmt. Um festzustellen, ob ein Ribonucleoprotein oder Ribonucleinsäure auch für die Speicherung des ATP in den Granula von Bedeutung sind, haben wir isolierte Nebennierenmarkgranula vom Rind mit Ribonuclease inkubiert und den Einfluss des Enzyms auf den ATP-, Brenzcatechinamin- und Eiweissgehalt der Granula untersucht. Zu Vergleichszwecken wurde auch Trypsin verwendet.

Methoden. Die Granula wurden nach der von SCHÜMANN und WEIGMANN⁵ angegebenen Methode durch Differentialzentrifugieren aus Nebennierenmarkhomogenaten vom Rind gewonnen und in isotonischer Saccha-

roselösung (0,3 M mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt) suspendiert. Die Ansätze enthielten in 2,5 ml: 1 ml Granulasuspension, 1,5 ml Saccharose pH 7,0, 0,1–2,7 mg Enzym und 1 μ Mol/ml CaCl_2 . Sie wurden bei 37°C 60 min lang unter Schütteln inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Granula durch Zentrifugieren mit 12 000 g sedimentiert, mit 0,4 N HClO_4 extrahiert und der Eiweissniederschlag abzentrifugiert. Im Sediment wurde der Eiweissstickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt. Der Extrakt wurde durch Zugabe von K_2CO_3 -Lösung auf pH 5,0 gebracht, vom ausgefallenen KClO_4 abzentrifugiert und im Überstand der Brenzcatechinamingehalt nach v. EULER und HAMBERG⁶, der ATP-Gehalt nach STREHLER und TOTTER⁷ (siehe auch SCHÜMANN⁸) bestimmt. Es wurde Ribonuclease der Firma Worthington und Trypsin der Firma Merck verwendet.

Versuche. Inkubiert man Nebennierenmarkgranula bei 37°C, so kommt es spontan zu einer Brenzcatechinamin- und ATP-Freisetzung (Figur 1). Durch Zugabe von Ribonuclease wird die Brenzcatechinamin- und ATP-Freisetzung in prozentual gleichem Umfang gesteigert. Die wirksame Grenzkonzentration beträgt 0,1 mg RN-ase pro Ansatz. Die Freisetzung ist von keiner wesentlichen Eiweissabgabe aus den Granula begleitet, d.h., dass Ribonuclease die Durchlässigkeit der Granulamembran für lösliche Proteine praktisch nicht erhöht. Da die Inkubation mit inaktivierter RN-ase (90 min, 1 N HCl , 100°C) zu keiner Brenzcatechinamin- und ATP-Freisetzung führt, kann angenommen werden, dass diese Freisetzung enzymatisch bedingt ist.

Auch Inkubation mit Trypsin führt zu gesteigerter Brenzcatechinamin- und ATP-Freisetzung. Im Gegensatz zur RN-ase jedoch ist Trypsin nur in der Lage, Amine und ATP freizusetzen, wenn gleichzeitig auch Eiweiss mit freigesetzt wird (Figur 2). Unter der proteolytischen Trypsinwirkung wird wahrscheinlich die Membranstruktur so verändert, dass mit dem Eiweiss auch Amin und ATP austreten können. Diese Ergebnisse könnten dafür sprechen, dass Ribonucleinsäuren für die ATP- und Brenzcatechinaminspeicherung in den Nebennierenmarkgranula von Bedeutung sind.

Summary. Incubation experiments on isolated chromaffin granules of suprarenal medulla of cattle at 37°C with ribonuclease and trypsin have shown that both enzymes release catechol amines together with ATP. The effect of these two enzymes can be distinguished, in so far as ribonuclease releases besides catechol amines and ATP practically no protein, whereas trypsin causes additionally a significant and dose-dependent loss of protein from the granules.

A. PHILIPPU und H. J. SCHÜMANN⁹

Pharmakologisches Institut der Universität Frankfurt am Main (Deutschland), 6. November 1962.

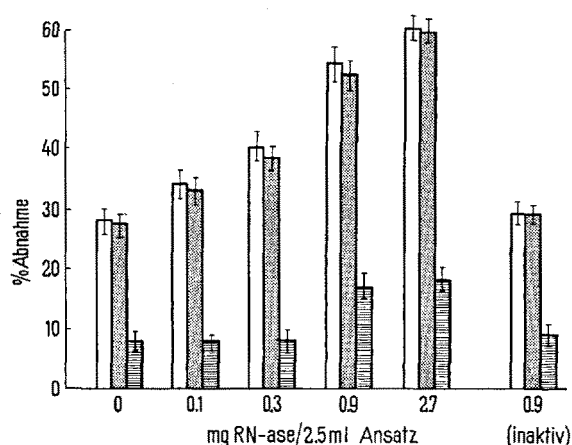


Fig. 1. Wirkung von Ribonuclease auf den Brenzcatechinamin-, ATP- und Eiweissgehalt der Granula nach 60 min Inkubation bei 37°C. Mittelwerte von mindestens 4 Versuchen und deren Standardabweichung. □ Brenzcatechinamine, :::: ATP, ≡ Eiweiss.

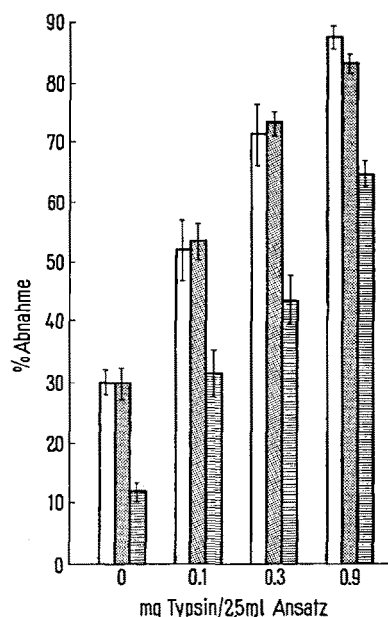


Fig. 2. Wirkung von Trypsin auf den Brenzcatechinamin-, ATP- und Eiweissgehalt der Granula nach 60 min Inkubation bei 37°C. Mittelwerte von 3 Versuchen und deren Standardabweichung. □ Brenzcatechinamine, :::: ATP, ≡ Eiweiss.

³ H. J. SCHÜMANN, *Adrenergic Mechanisms* (J. & A. Churchill Ltd., London 1960), p. 6.

⁴ L. D. WRIGHT und R. TRAGER, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 106, 21 (1961).

⁵ H. J. SCHÜMANN und E. WEIGMANN, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 240, 275 (1960).

⁶ U. S. v. EULER und U. HAMBERG, *Acta physiol. scand.* 19, 74 (1949).

⁷ B. L. STREHLER und J. R. TOTTER, *Arch. Biochem. Biophys.* 40, 28 (1952).

⁸ H. J. SCHÜMANN, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 233, 237 (1958).

⁹ Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.