

Discussion. It is very evident, in our opinion, that the intermediate megaloblastic changes in the bone marrows of the patients in question are due to folate deficiency. Because the patients have received combined PAS-INH treatment it is naturally impossible to decide which of the drugs might be responsible, or if they might act in a sort of synergism. In a recent paper an undesirable effect of PAS-therapy has been described, in which it specifically counteracts the absorption of vitamin B₁₂²⁰. If this is so, it might perhaps be advisable to investigate the untoward effects of PAS which possibly influence the fate of folates, too. According to these preliminary observations of ours there are at least 2 possibilities: anti-tuberculous drugs may have adverse effects on the digestion of naturally occurring folate conjugates (conjugase defect or inhibition?) and/or on their absorption (biochemical defect(s) in the mucosal cells?). A wider question is also raised: how this antituberculous treatment interferes with the availability and metabolism of trace nutrients as investigated on a wider scale.

Zusammenfassung. Absorption natürlicher Folsäurekonjugate (in der Form vom Leberbrei) wurde bei 13 Kontrollen und 14 tuberkulösen Patienten nach monatelanger PAS-INH-Therapie untersucht. Die Folsäureaktivität im Serum wurde mit *L. casei* analysiert. Fünf von 14 Patienten hatten pathologisch niedrige Absorptionskurven und intermediär megaloblastische Veränderungen im Knochenmark, offenbar ein Zeichen für Folsäuremangel.

T. MARKKANEN, A. LEVANTO,
V. SALLINEN, and E. SÄLMELA

Department of Medicine, Department of Medical Microbiology, The Hospital Laboratory, University Central Hospital, Turku, and The Paimio Sanatorium, Preitilä (Finland), May 15, 1966.

²⁰ O. HEINIVAARA and I. P. PALVA, *Acta med. scand.* 775, 469 (1964).

Depletion and Resynthesis of Pituitary FSH: Time Course of Events Following Treatment with Hypothalamic FSH-Releasing Factor

Studies from a variety of laboratories seem to denote the presence, in the stalk-median eminence (SME) area of the hypothalamus, of a neurohormonal factor capable of stimulating the release of pituitary follicle stimulating hormone (FSH)¹⁻³.

Recently, DAVID et al.⁴ have developed a procedure permitting the quantitative evaluation of the FSH-releasing factor (FSH-RF), utilizing the sexually mature male rat. This method, which is based on the ability of SME extracts to reduce (deplete) pituitary FSH stores in vivo, has been modified in this laboratory. Furthermore, in the course of determining the proper time to kill the animals (i.e. the period of maximum pituitary FSH depletion), following the SME injections, it was discovered that after such maximum depletion, the resynthesis of hypophysial FSH ensued. This report will therefore provide preliminary information on the sequential changes occurring in pituitary FSH subsequent to treatment with SME extracts.

Intact, mature male rats (Sprague-Dawley, 196 ± 5 g) were used as the recipients (5 rats/group) of the crude, acidic SME extracts which were derived from 60-day-old, intact, normally cycling Sprague-Dawley females (killed in diestrous/metestrous stage of cycle). The material was injected into the jugular vein at a dose of 2 SME/ml/recipient rat. The animals were decapitated at varying intervals following treatment; their pituitaries were then removed, weighed, appropriately pooled, homogenized and diluted with saline for employment in the FSH assay of STEELMAN and POHLEY⁵. A 2 + 1 design was utilized (5 animals/dose), the reference standard being NIH-FSH-S2. The results were converted for expression in terms of NIH-FSH-S1.

The results (see Table) demonstrate that within 15 min following the jugular vein injection of the SME extract, pituitary FSH depletion ensues. It is not until 45 min post-treatment that maximum depletion takes place. Resynthesis of FSH then occurs, with normal pituitary FSH values being restored approximately 4 h after treatment.

The rate at which pituitary FSH depletion takes place appears rather rapid – requiring approximately 3 h from the point of maximum depletion to the re-establishment of near normal storage levels (rate of resynthesis during this latter time period = 15 µg FSH/h/mg pituitary).

It is important to direct attention to the recent study of MÜLLER and PECILE⁶, who demonstrated, in a similar manner, the time course of events in pituitary growth hormone (GH) following an initial treatment with a rat SME extract containing GH-releasing factor.

Depletion and repletion of rat pituitary FSH following jugular vein injection of SME extract

Treatment	Time interval, treatment to sacrifice	µg FSH/mg pituitary	% FSH depletion	λ ^b
Uninjected	–	98 (47.1–203.8) ^a	0	0.264
Saline	45 min	95 (54.0–167.2)	0 (initial control value)	0.204
2 SME/rat	15 min	65 (36.3–116.4)	32	0.211
2 SME/rat	30 min	53 (25.2–111.3)	44	0.270
2 SME/rat	45 min	41 (22.9–73.0)	54	0.210
2 SME/rat	1 h	54 (25.7–113.4)	43	0.269
2 SME/rat	2 h	75 (41.7–135.0)	21	0.213
2 SME/rat	4 h	90 (76.7–156.6)	5	0.200

^a Mean (95% confidence limits). ^b Index of precision.

¹ M. IGARASHI, R. NALLAR, and S. M. McCANN, *Endocrinology* 75, 901 (1964).

² A. KUROSHIMA, Y. ISHIDA, C. Y. BOWERS, and A. V. SCHALLY *Endocrinology* 76, 614 (1965).

³ M. A. DAVID, F. FRASCHINI, and L. MARTINI, *C. r. Acad. Sci. Paris*, 267, 2249 (1965).

⁴ M. A. DAVID, F. FRASCHINI, and L. MARTINI, *Experientia* 27, 483 (1965).

⁵ S. L. STEELMAN and F. M. POHLEY, *Endocrinology* 53, 604 (1953).

⁶ E. MÜLLER and A. PECILE, *Experientia* 22, 108 (1966).

It would be of interest to know, after maximum pituitary FSH depletion has occurred, if a second treatment with the SME extract could induce hypophysial FSH to be resynthesized at a faster rate than was demonstrated in the present experiment. Perhaps, this then might provide us with a clue as to whether or not the SME also contains (synonymous with or different from, FSH-RF) an FSH-synthesizing factor (FSH-SF).

The 45 min maximum pituitary FSH depletion period has proved to be sufficiently reproducible so as to be employed in the routine FSH-RF assaying of samples obtained from the fractionation of porcine and bovine hypothalamic extracts.

Résumé. Après une période de 45 min, l'injection intrajugulaire des extraits hypothalamiques provoque une chute maximale du niveau de FSH hypophysaire, qui atteste la présence de FSH-RF. De plus, l'enchaînement des résultats démontre le rétablissement des niveaux normaux de FSH hypophysaire, 4 h après le traitement.

A. CORBIN and J. C. STORY

Abbott Laboratories, Biochemical Research, North Chicago (Illinois, USA), May 20, 1966.

Hydroxyprolin-Ausscheidung im Rattenharn nach Injektion von Schlangengift

Bisher liegen über die Kollagenase-Aktivität der Schlangengifte nur Untersuchungen in vitro vor. Einerseits fand sich eine Wirkung verschiedener Gifte gegen Azokoll, andererseits kam es aber zu keiner Andauung von Kollagenfasern aus Rattenschwanzsehnen¹. Auf Grund dieser widersprechenden Befunde scheinen weitere Untersuchungen angezeigt.

Hydroxyprolin kommt im menschlichen und tierischen Organismus praktisch ausschließlich im Kollagen vor. Die Bestimmung dieser Aminosäure im 24h-Harn läßt Rückschlüsse auf den Stoffwechsel des Kollagens zu. In Verfolgung der Fragestellung nach der Kollagenase-Aktivität der Schlangengifte erfolgten Bestimmungen des Gesamt-Hydroxyprolins im Rattenharn nach Injektion eines Crotalidengiftes.

Material und Methoden: (1) Versuchstiere: Der Harn von Albinoratten (140–150 g) wurde in Stoffwechselkäfigen aufgefangen und in 24-Stunden-Portionen untersucht. Nach Bestimmung der normalen Hydroxyprolin-Ausscheidung in 24 h an 50 Ratten erhielten 50 Tiere eine s.c. Injektion von 15 mg/kg des Giftes der Wassermokassin-schlange (*Aghistrodon piscivorus* Lacépède) in 0,1 ml einer 0,15 M Kochsalzlösung. (2) Hydroxyprolinbestimmung: 2 ml Harn wurden mit 1,0 ml 10 N HCl durch 3 h bei 130°C hydrolysiert. Nach Klärung mit Tierkohle und Filtration erfolgte eine Einstellung des pH-Wertes auf etwa 7. Danach wurde mit destilliertem Wasser auf 8,0 ml Volumen aufgefüllt. 2 ml dieser Lösung wurden nun zur Hydroxyprolinbestimmung nach STEGEMANN² verwendet.

Ergebnisse. Die normale Hydroxyprolin-Ausscheidung in 24 h beträgt bei den untersuchten Ratten $0,56 \pm 0,20$ mg (Mittelwert $\pm 2\sigma$). In den 24-Stunden-Harnportionen nach Injektion des Crotalidengiftes findet sich eine statistisch signifikante Erhöhung der Hydroxyprolin-Ausscheidung auf $1,47 \pm 0,58$ mg ($P < 0,001$). In der darauffolgenden Harnportion war nur noch eine geringe Erhöhung des Hydroxyprolin-Gehaltes zu verzeichnen ($0,78 \pm 0,35$ mg). Ab dem dritten Tag lagen wieder normale Werte vor.

Diskussion. Wie die Steigerung der Hydroxyprolin-Ausscheidung im Harn beweist, kommt es bei der Ratte durch Verabreichung eines Crotalidengiftes zu einer signifikanten Beeinflussung des Kollagenstoffwechsels. Der Abbau der infolge vaskulärer Veränderungen³ an der Injektionsstelle entstehenden Nekrose durch körpereigene Enzyme setzt nicht so unmittelbar ein, daß bereits binnen 24 h eine wesentliche Erhöhung der Hydroxyprolin-Aus-

scheidung im Harn auftreten könnte. Die gesteigerte Hydroxyprolin-Ausscheidung innerhalb der ersten 24 h ist nicht ausschließlich auf die Kollagenase-Aktivität des verwendeten Giftes zurückzuführen; als Folge des anaphylaktoiden Schocks kommt es zu einer Mobilisierung hydroxyprolin-haltiger Kollagenvorstufen durch Degranulierung der Mastzellen⁴. In eigenen Versuchsserien konnte festgestellt werden⁵, daß die Auslösung eines anaphylaktoiden Schocks durch Compound 48/80 zu einer Erhöhung der Hydroxyprolin-Ausscheidung im Rattenharn führt ($0,68 \pm 0,21$ mg/24 h). Diese Steigerung ist allerdings wesentlich geringer als der Anstieg nach Injektion von Schlangengift.

Die Hydroxyprolinausscheidung im 24-Stunden-Harn der Ratte nach Injektion eines Crotalidengiftes

Versuchstiere	mg Hydroxyprolin in 24 h (Mittelwert $\pm 2\sigma$)
Normale Ratten (50)	$0,56 \pm 0,29$
Ratten nach Injektion des Giftes der Wassermokassin-schlange (15 mg/kg)	
0–24 h nachher	$1,47 \pm 0,58$
24–48 h nachher	$0,78 \pm 0,35$

Summary. In rats, a statistically significant increase in hydroxyproline excretion occurs following injection of crotalus toxin (*Aghistrodon piscivorus* Lacépède). The significance of this finding is briefly discussed.

W. RAAB

Universitätsinstitut für medizinische Chemie
A-1090 Wien (Österreich), 28. März 1966.

¹ P. A. CHRISTENSEN, *South African snake venoms and antivenoms* (South African Inst. med. Res., Johannesburg, 1955). – E. KAISER und H. MICHL, *Biochemie der tierischen Gifte* (F. Deuticke, Wien, 1958).

² H. STEGEMANN, *Z. physiol. Chemie* 311, 41 (1958).

³ W. RAAB und E. KAISER, *Toxicon* 3, 49 (1965).

⁴ H. SELYE, *The mast cells* (Butterworths, London, 1965).

⁵ W. RAAB, unveröffentlichte Ergebnisse.