

olds. A ganglion would seem unaffected by low concentrations, but as higher concentrations were tried, one would appear at which an effect was noticed. For example, in Figure 2(B) there is no response to $1.6 \cdot 10^{-4} M$ or $4.9 \cdot 10^{-4} M$ GABA, but a drop in activity follows application of $16 \cdot 10^{-4} M$. Subsequent recovery with the syringe off showed this was not due to deterioration of the ganglion. Comparison with the pronounced effect of $0.57 \cdot 10^{-4} M$ GABA seen in Figure 2(A) indicates the wide variability in sensitivity of these neurons to GABA. In general, complete cessation of activity occurred more often at concentrations $> 10 \cdot 10^{-4} M$. For lower concentrations the usual response was a decrease in activity but not complete cessation.

Figure 2(C) shows an example where the syringe was left on, driven by the pulse rate signal. The oscillations about a level demonstrate that an activity clamp can be achieved.

The initial increase in neural firing rate which usually preceded the decline in activity in our experiments was not anticipated, since most reports on effects of GABA emphasize its inhibitory action. With the large electrodes we used, the pulse rate from a ganglion is a sum of the individual pulse rates of many neurons. The rise in activity at the start of GABA injection might come from some neurons which are stimulated by GABA, with the subsequent decline indicating the more commonly observed inhibition. Another possibility is that the excitatory and inhibitory phases are due to action of the drug on different parts of the neurons. As GABA diffused into

a ganglion from the saline solution, it would reach the peripherally-disposed cell bodies before passing into the neuropile region. KUFFLER and EDWARDS³ proposed that a mechanism for action of GABA is to cause increased conductance in dendrite and cell body membranes. Perhaps the observed excitatory effect comes from increased conductance in the cell body, while the inhibitory effect results from a similar action on the dendrites⁷.

Zusammenfassung. γ -Aminobuttersäure (GABA) vermindert die Impulsfrequenz der spontan-aktiven Nervenzellen beim Insekt. Wirksame Konzentrationen betragen $0,1-25 \cdot 10^{-4} M$. Ein unerwartetes Ergebnis war die Beobachtung, dass nach Applikation von GABA eine Erhöhung der Impulsfrequenz vor der Verminderung stattfindet.

O. D. SITTLER and R. J. DEREMER

Physics Department, Texas A & M University, College Station, Texas, and Physics Department, California State College at San Bernardino, San Bernardino (California, USA), 14th November 1966.

⁷ This investigation was supported in part by the NSF College Teacher Research Participation Program, Grant No. GY-682, and by NSF Undergraduate Research Participation Program, Grant No. GY-151. — We thank Mr. A. McAfee, our undergraduate participant, for his assistance in this investigation.

Über einen die Samenbläschen hemmenden Stoff aus Luzerne

Dass Fütterung von Luzerne die Fertilität der Haus- und Laboratoriumstiere negativ beeinflussen kann, beweisen mehrere Forschungsergebnisse (ZADINA und GEISSLER¹, FOLTYN², ADLER und TRAININ³, CHURÝ und PÁNEK⁴). Der Mechanismus dieser Wirkung infolge Luzernefütterung konnte bisher nicht näher abgeklärt werden. ADLER und TRAININ³ nehmen zum Beispiel an, dass diese Wirkung eng mit dem Phytoöstrogengehalt dieser Pflanze zusammenhängt; ZADINA und GEISSLER¹ glauben, dass es sich um den Effekt eines Glykosids oder antithyreoidalen Stoffes handle. Nach den Angaben von ZADINA und GEISSLER¹ ähnelt die Wirkung von Luzernefütterung sehr dem Effekt von Lithospermum-Arten; bei diesen wurde der antigonadale Effekt von verschiedenen Autoren festgestellt (CRANSTON⁵, DRASHER⁶, PLUNKET und NOBLE⁷, JURAND⁸, KEMPER und LOESER^{9,10}, BRENE-MAN et al.¹¹). Nach GASSNER et al.¹² soll für den Effekt bei Lithospermum-Arten eine Polyphenolsäure verantwortlich sein. Untersuchungen von Luzerne zeigen, dass diese Pflanze östrogen sowie auch antiöstrogen wirksame Stoffe enthält (CHENG et al.¹³, ANDREWS¹⁴, CHURÝ¹⁵, ADLER¹⁶, ROLIŃSKI¹⁷). Man könnte darum diesen Effekt von Luzernefütterung auf den Gehalt der genannten Stoffe zurückführen. Da aber in der Luzerne die Menge von Phytoöstrogenen verhältnismässig stark schwankt (CHURÝ¹⁸) und weil dieser antifertile Effekt der Luzernefütterung auch nach Entfernung von Phytoöstrogenen und Antiöstrogenen erhalten bleibt (PÁNEK und CHURÝ¹⁹),

muss angenommen werden, dass ausserdem noch ein unbekannter Stoff mit dem antifertilen Effekt der Luzerne zu tun hat. Für eine solche Annahme sprechen auch die Angaben von KARG²⁰. Anknüpfend an unsere Voraussetzungen und früheren Versuche bemühten wir uns, die antifertile Wirkung der Luzerne genauer abzuklären.

Als Ausgangsmaterial diente uns trockene Luzerne, welche von verschiedenen Orten stammte. Das Pflanzen-

¹ R. ZADINA und M. GEISSLER, Biol. Listy 31, 41 (1951).

² E. FOLTYN, Refuah vet. 76, 193 (1959).

³ J. H. ADLER und D. TRAININ, Int. Congr. Anim. reprod., Vol. III, 451 (1961).

⁴ J. CHURÝ und K. PÁNEK, Vet. Med. 9, 99 (1964); 70, 241 (1965).

⁵ E. CRANSTON, J. pharmac. exp. Ther. 83, 130 (1945).

⁶ M. L. DRASHER, Endocrinology 47, 399 (1951).

⁷ E. R. PLUNKET und R. L. NOBLE, Endocrinology 49, 1 (1951).

⁸ A. JURAND, C. r. Séanc. Soc. Biol. 746, 1034 (1952).

⁹ FR. KEMPER und A. LOESER, Arzneimittelforsch. 7, 81 (1957).

¹⁰ FR. KEMPER und A. LOESER, Wld Congr. Fert. Steril. 96, 6 (1961).

¹¹ W. R. BRENE-MAN et al., Endocrinology 67, 583 (1960).

¹² F. X. GASSNER et al., Proc. Soc. exp. Biol. Med. 114, 20 (1963).

¹³ E. CHENG et al., J. Anim. Sci. 72, 507 (1953).

¹⁴ F. N. ANDREWS, Feedstuffs Minneap. 30, 349 (1958).

¹⁵ J. CHURÝ, Vet. med. 6, 597 (1961).

¹⁶ J. H. ADLER, Vet. Rec. 74, 1148 (1962).

¹⁷ ZB. ROLIŃSKI, Medycyna wet. 21, 275 (1965).

¹⁸ J. CHURÝ, Sb. vys. Sk. zemed. les. Fac. Brne, B 74, 59 (1965).

¹⁹ K. PÁNEK und J. CHURÝ, Sb. vys. Sk. zemed. les. Fac. Brne, B (im Druck).

²⁰ H. KARG, V. Congr. Fortpflanzung und künstl. Besamung, Trento, Vol. VII, 336 (1964).

material wurde mit 0,1 n HCl extrahiert und der Extrakt nach dem Verfahren von ADLER¹⁶ verarbeitet. Der Phytoöstrogenanteil wurde mit Äther abgetrennt, die Antiöstrogene wurden mit Chloroform entfernt. Der verbleibende 0,1 n HCl-Extrakt wurde dann so lange mit Bleiazetat gefällt, bis kein Niederschlag mehr entstand. Der Niederschlag wurde durch Abfiltrieren entfernt und das gelblich gefärbte Filtrat im Wasserbad abgedampft. Der Rückstand von rötlichbrauner Farbe wurde nach

dem Abkühlen mit Pyridin extrahiert. Der Pyridin-extrakt wurde abgegossen und bei Zimmertemperatur verdunstet. Auf diese Weise wurden lange, gelblich gefärbte, nadelförmige Kristalle gewonnen, welche mit kaltem Pyridin gereinigt wurden. Die chemische Zusammensetzung dieses Stoffes ist noch nicht bekannt. Er ist unlöslich in konzentriertem Ethanol, Methanol, Azeton, Äther und Chloroform, löst sich hingegen ziemlich gut in kaltem Wasser. Hydrolyse mit HCl gibt einen Zucker,

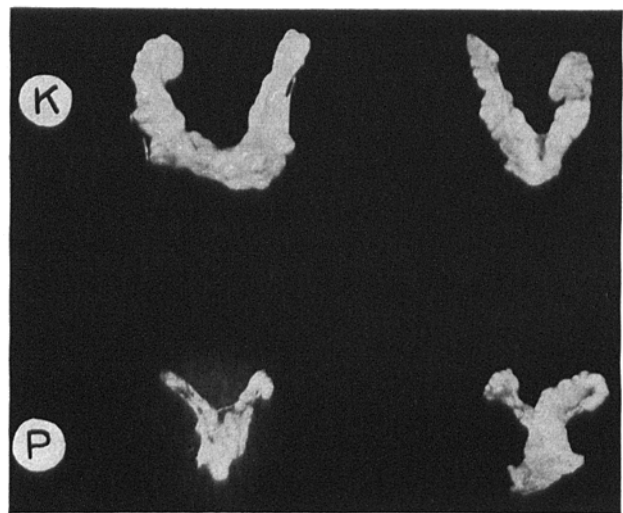


Fig. 1. Samenbläschen der Kontrollratten (K) und der Versuchsratten (P).

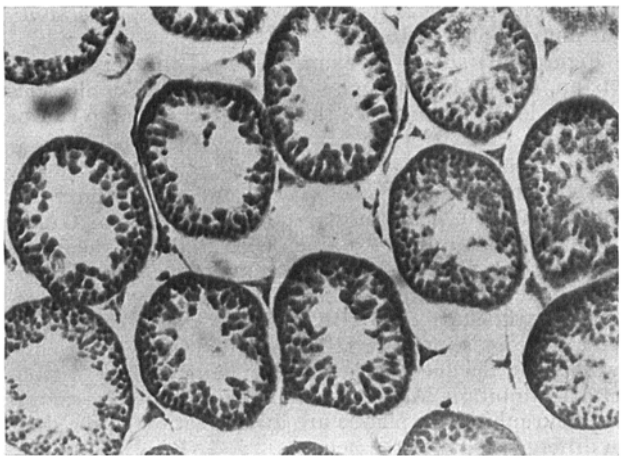


Fig. 3. Histologisches Bild von Hoden der Kontrollratten.

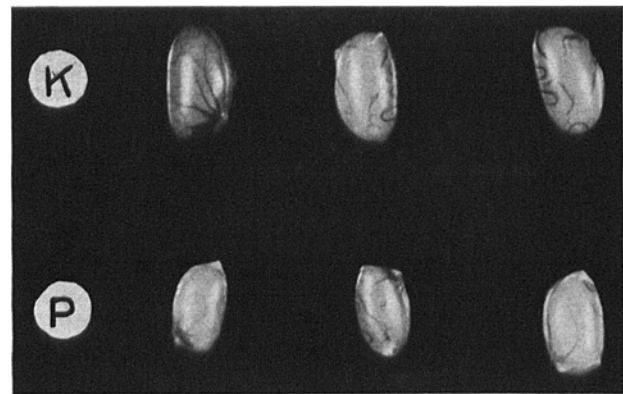


Fig. 2. Hoden der Kontrollratten (K) und der Versuchsratten (P). Alter der Tiere 28 Tage, Verabreichungsdauer 5 Tage.

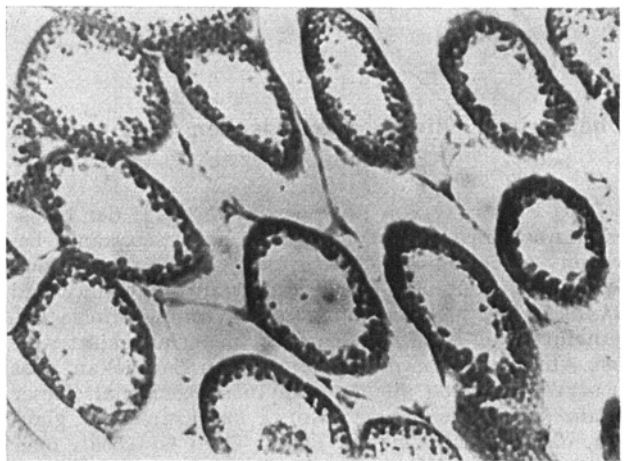


Fig. 4. Histologisches Bild von Hoden der Versuchsratten.

Kontrollratten				Versuchsratten				Diff. \pm Sd	P	
No.	Samen- bläschen, mg	Hoden mg	Körper- gewicht, g	No.	Samen- bläschen, mg	Hoden mg	Körper- gewicht, g			
I	4	16,8 \pm 3,5	244,7 \pm 30	38,4 \pm 4	4	8,7 \pm 2,1	147 \pm 20	32,9 \pm 3,3	8,1 \pm 2,3	0,01
II	5	154 \pm 9,3	745,0 \pm 20	95,0 \pm 6	5	74,2 \pm 18,0	800 \pm 64	84,5 \pm 21	80 \pm 13,2	0,02
III	4	8,3 \pm 1,4	88,3 \pm 9	26,2 \pm 0,8	5	6,1 \pm 1,4	76 \pm 6	23,4 \pm 1,2	2,2 \pm 0,85	0,05

No., Zahl der Tiere; I, 28 Tage alt; II, 70 Tage alt; III, 21 Tage alt; I, frisch gewonnener Extrakt; III, 3 Monate alter Extrakt; Diff. \pm Sd, Differenz der Mittelwerte und deren Signifikanz, diese Werte werden nur für die Samenbläschen angeführt.

bei dem es sich den chromatographischen Untersuchungen zufolge höchstwahrscheinlich um Glukose handelt.

Der biologische Effekt des isolierten Extraktes wurde an Rattenmännchen verschiedenen Alters und an Mäusemännchen untersucht. Die Lösung wurde den Tieren s.c. eingespritzt, und zwar 0,3–0,5 ml/Tier und Tag während 5 Tagen. Es wurden insgesamt 27 Ratten und 10 Mäuse untersucht. In jeder Versuchsgruppe und Kontrollgruppe befanden sich Tiere aus demselben Wurf. Die Rattenmännchen waren 21–70 Tage alt. Die Wirkung des Extraktes wurde sofort nach dessen Gewinnung sowie nach 3 Monate dauerndem Aufbewahren bei Zimmertemperatur untersucht. Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle angeführt.

Die Angaben in der Tabelle zeigen, dass der Extrakt bei Rattenmännchen das Gewicht und die Grösse der Samenbläschen beeinflusst (Figur 1). Im frischen Zustand übt der Extrakt auch auf den Hoden seine Wirkung aus, und diese ist stärker, als wenn er längere Zeit aufbewahrt wurde. Bei jungen Tieren wird auch das Gewicht der Hoden erniedrigt, was bei älteren Tieren nicht der Fall ist. Der Hoden ist kleiner, sein Turgor ist herabgesetzt

(Figur 2). Histologisch kann man in Hodenschnitten eine starke Gonozytenzellenreduktion beobachten (Figuren 3 und 4). Bei Mäusemännchen wurde bei derselben Menge Extrakt kein Einfluss auf die Samenbläschen gefunden, und das Gewicht dieses Organs entsprach demjenigen der Kontrolltiere.

Summary. Extracts of lucerne with 0.1 N HCl prepared and fractionated by the method of ADLER¹⁶ give a filtrate which contains anantigonadal substance. This can be obtained from the extract after precipitation with lead acetate and evaporation. The residue after extraction with cold pyridin contains long needle-crystals insoluble in ethanol, methanol, ether and chloroform. A solution of these crystals injected into rats caused a decrease in weight of the seminal vesicles. In the mouse this substance is without effect.

J. CHURÝ

Biologisches Institut, Fakultät für Veterinärmedizin, Brno (ČSSR), 28. Oktober 1966.

Uridinediphosphoglucose: Glycogen α -4-Glucosyltransferase of Human Myometrium

It is now known that in animal tissues glycogen is synthesized from uridinediphosphoglucose. It was therefore surprising that Bo and SMITH¹ could not demonstrate uridinediphosphoglucose-glycogen glucosyltransferase activity in the rat uterus, so that it had to be admitted that glycogen synthesis occurs in the uterus through the phosphorylase reaction. RUBULIS et al.², on the other hand, showed that uridinediphosphoglucose-glycogen glucosyltransferase is active in the rat uterus as well as in the human endometrium, while BARGONI et al.³ observed this reaction in the smooth muscle of the pigeon gizzard. Therefore I have measured uridinediphosphoglucose-glycogen glucosyltransferase, believed to be the rate-limiting enzyme for glycogen synthesis⁴, in myometrial tissue. Determinations of α -1,4-glucan:orthophosphate glucosyltransferase and glycogen were also made.

Table I. Uridinediphosphoglucose-glycogen glucosyltransferase in the human myometrium

Tissue	μ g uridinediphosphate formed/mg protein/15 min
Myometrium:	
Non-gravid	29
Gravid, at term	35 46 49 53
Prolonged pregnancy	25
Placenta praevia	18
Myoma	16

Human myometrial tissue obtained from the lower uterine segment during Caesarean section and from the anterior wall of uterine body during hysterectomy, was used for the experiments. The homogenate, prepared with 0.25 M sucrose and 0.001 M ethylenediaminetetraacetate, was centrifuged at 1200 rpm at 0°C for 10 min; 0.05 ml of the supernatant was used for the assay carried out according to LELOIR and GOLDEMBERG⁵. Glycogen phos-

Table II. Glycogen in the human myometrium

Tissue	mg glycogen/g fresh tissue
Myometrium:	
Post-menopausal	1.90 1.80
Non-gravid	3.09 3.10
Gravid, at term	3.50 3.50 4.20 3.70 4.10
Myoma	2.50

¹ M. J. Bo and M. S. SMITH, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 173, 814 (1963).

² A. RUBULIS, R. D. JACOBSON and E. C. HUGHES, Biochim. biophys. Acta 99, 584 (1965).

³ N. BARGONI, A. SISINI and C. MAJORANO, G. Biochim. 73, 54 (1964).

⁴ C. VILLAR-PALASI and J. LARNER, Archs Biochem. Biophys. 94, 436 (1961).

⁵ L. F. LELOIR and S. H. GOLDEMBERG, J. biol. Chem. 235, 919 (1960).