

to the β -globulin fraction and also a significant quantity to the albumin. The solvents treatment after the electrophoresis eliminates most of the activity present in the slot (slow moving lipoproteins) and also a part of that corresponding to the different fractions of plasma pro-

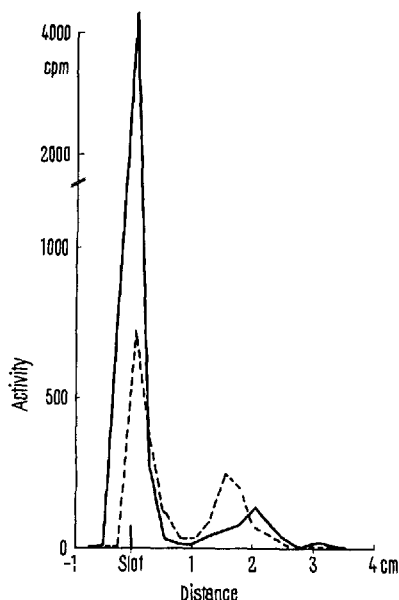


Fig. 3. Radioactivity distribution in the starch gel electrophoresis without solvents treatment. ---- plasma lipid-extracted, — plasma.

teins. The fraction of the original activity that remains after this treatment is approximately $1/40$ for the slot, $1/3$ for the β -globulin fraction and also $1/3$ for the albumin (Figure 1). As can be seen in Figure 2, the radioactivity distribution is the same in whole plasma and in lipid-extracted plasma after the treatment with solvents. If the plasma has been extracted with solvents previously to the electrophoresis (WATERS), it is a similar pattern of radioactivity distribution, in both cases, with a new post-electrophoresis treatment (HEIDELBERGER) or not.

These experimental values demonstrate that most of the benzpyrene is bound or dissolved into the β -lipoprotein fraction and the high activity observed in the proximity of the slot suggest that, because of this hydrocarbon association, the lipoprotein mobility changes are slowing down. The solvents treatment eliminates this activity, giving a residual benzpyrene assumed to be bound to the other different protein fractions³.

Zusammenfassung. Es wird gezeigt, dass die Verteilung von Benzpyren auf die Proteine von octanolextrahiertem Plasma einen Einblick in die bei der Plasmapbindung von Substanzen vorkommenden Konkurrenzreaktionen erlaubt.

L. J. ANGHILERI

Deutsches Krebsforschungszentrum, Institut für Nuklearmedizin, Heidelberg (Germany), 28th February 1967.

³ This research work has been performed at the Institut du Radium (Paris) during the tenure of a Bourse Joliot-Curie.

Trasmissione del tumore di Yoshida con estratti acellulari del medesimo

Sono molte, come è noto, le difficoltà relative alla dimostrazione della etiologia virale delle neoplasie. Tali difficoltà, di ordine prevalentemente metodologico, sono soprattutto dovute alla necessità di ottenere la riproduzione della neoplasia in assenza degli elementi cellulari specifici che entrano nella sua costituzione.

Con riferimento al tumore di Yoshida, sia esso in forma ascitica, sia esso a struttura solida, le cennate difficoltà persistono a tutt'oggi, malgrado le importanti osservazioni in proposito di HAMAZAKI e coll.¹, i quali sono riusciti ad ottenere la riproduzione delle forme solide della neoplasia con la somministrazione ai ratti di pappe tumorali.

SCHMIDT², in esperienze di controllo eseguite con tecniche similari a quelle degli Autori giapponesi, è riuscito ad ottenere gli stessi risultati. Ciò malgrado, esaminando questi ultimi criticamente, è pervenuto alla conclusione che non si può escludere in modo certo, nella riproduzione del tumore, l'intervento di elementi cellulari sopravvissuti alla digestione gastro-intestinale.

Pertanto, ci siamo proposti di esaminare, sulla base dell'esperienza già in passato acquisita da uno di noi, la possibilità di indurre il tumore di Yoshida con estratti tumorali sicuramente acellulari, nel tentativo di ottenere valida dimostrazione della etiologia virale di tale forma neoplastica.

Abbiamo, a tal fine, utilizzato del tumore di Yoshida in forma ascitica ottenuto da ratti adulti, maschi e femmine, al 6°-7° giorno dall'inoculazione. Il liquido ascitico, in quantità di ml 180 circa, è stato sottoposto a centrifugazione a 1000 g/10 min, onde ottenere le cellule tumorali, che sono state sottoposte ad omogeneizzazione in omogeneizzatore meccanico MSE a 10.000 giri. L'omogenato, diluito con ml 100 circa di plasma dello stesso tumore ascitico, è stato centrifugato a 13.000 g/20 min. Al termine di tale operazione sono stati prelevati, con molta cautela, circa i tre quarti del liquido sovranatante mediante pipettamento ed evitando ogni scuotimento delle provette. Tale sovranatante è stato ancora centrifugato a 105.000 g/60 min, allo scopo di ottenere, in corrispondenza del sedimento, il maggiore arricchimento possibile del presunto agente etiologico. Il sedimento, equivalente a circa ml 1,5 in volume, è stato diluito con circa ml 6 di sovranatante della stessa centrifugazione, e quindi omogeneizzato come già indicato per le cellule. Gli accertamenti microscopici condotti su strisci del sedimento, hanno consentito di accertare l'assenza di elementi cellulari.

¹ Y. HAMAZAKI, K. OGAWA, I. ARIKI and M. KONDO, Proc. Japan Acad. 31, 480 (1955).

² F. SCHMIDT, *Krebs, Virus und Induktor* (Akad. Verlag, Berlin 1960).

Riteniamo opportuno precisare che nelle varie fasi della tecnica esposta, abbiamo preferito adoperare, come diluente, lo stesso liquido plasmatico del tumore, via via ottenuto con le varie centrifugazioni, allo scopo di eliminare, ogni shock derivante dal cambiamento del veicolo liquido. Tale precauzione ci è parsa tanto più opportuna, in quanto sconosciamo le caratteristiche biologiche, e particolarmente quelle di resistenza, del presunto agente etiologico.

In una prima fase dell'esperienza sono stati inoculati, con ml 0,2 ciascuno di tale estratto tumorale n. 7 rattini neonati di circa 36 h, e con ml 1 ciascuno n. 4 ratti femmine adulte. Le inoculazioni sono state, in ogni caso, effettuate in sede peritoneale, nella regione ombelicale sinistra.

In una seconda fase sono stati invece inoculati, con le medesime modalità, n. 10 rattini neonati di 14 h e n. 2 ratti maschi adulti.

A distanza di qualche giorno sono deceduti, per ragioni estranee all'esperienza, 2 rattini del primo gruppo di soggetti e 3 del secondo gruppo.

Dei 12 rattini neonati sopravvissuti in complesso, 1 ha contratto il tumore di Yoshida solo in forma solida, e 10 sia in forma ascitica che solida. Quest'ultima, costituita da nodi e noduli tumorali, trovava sede nel fegato, nel pancreas, nel diaframma e, soprattutto, nel parenchima polmonare. La neoplasia si è resa clinicamente manifesta in un periodo di tempo compreso fra 16 e 30 giorni dall'inoculo.

Dei 6 ratti adulti inoculati, soltanto in 1 si è sviluppata la forma ascitica del tumore.

La natura neoplastica delle lesioni ottenute è stata sempre accertata con l'esame istologico o citologico secondo la forma del tumore sviluppatosi.

Il liquido ascitico ottenuto dai rattini neonati, si è dimostrato a sua volta perfettamente idoneo a determinare la consueta neoplasia ascitica nei ratti adulti³.

Summary. The authors demonstrate the transmissibility of the tumour of Yoshida by means of definitely acellular, tumoural extracts. Neoplasia occurred in 11 out of 12 new-born mice i.p. inoculated as above. It is noteworthy that the neoplasia developed not only ascitic but also solid (nodes and tumoural nodules) prevalently at pulmonary level. Derived tumoural ascites are transmissible to the adult rat.

A. GIMBO e G. COSTANZO

Istituto di Ostetricia e Ginecologia Veterinaria, Istituto di Zoologia e Centro Universitario di Ricerca sui Tumori, Università di Messina (Italia), 14 Febbraio 1967.

³ Lavoro eseguito con i contributi del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma.

The Effect of Thyroid Application and Fasting on 7 α -Hydroxylation of Dehydroepiandrosterone in Rat Liver in vitro

The effect of thyroid hormone on steroidogenesis and steroid hormone metabolism has been thoroughly studied in human and experimental animals. Thus JAO and KORITZ¹, for instance, have found an inhibiting influence of thyroxine on 2 stages of corticoid biosynthesis from cholesterol, but not on 11 β -hydroxylation. In oestrogen catabolism thyroxine increases 2-methoxylation and 2-hydroxylation, since C-2 and C-16 hydroxylation of oestrone are competitive reactions which are inhibited by thyroxine in different ways². The activity of steroid 4 α -5 α -reductase in rat liver microsomes is enhanced by thyroxine administration as well³.

It was of interest to ascertain whether the enzyme system hydroxylating dehydroepiandrosterone (4 Δ^5 -androstene-3 β -ol-17-on, DHA) in the 7 α -position in rat liver homogenates, would be affected by thyroxine and possibly also by keeping the animals in the fasting state.

The rats used (Wistar females, weight 160–200 g) were divided into 2 groups; one was fed by a standard diet (controls) and the diet of the other group was augmented by a daily dose of 4.0 mg L-thyroxine per animal for a duration of 7 days. Food intake was recorded. Then 8 animals of the control group and 8 thyroxine treated animals were sacrificed by decapitation, 0, 12, 36 and 48 h respectively after cessation of food intake (water was allowed ad libitum). To 10 ml of homogenate prepared from 1 g liver in Ringer-Krebs phosphate buffer (pH 7.4) was added 0.12 ml of 5% glucose solution and 2 mg DHA

in 1.0 ml triethylene glycol and after saturation with oxygen incubation at 38 °C was maintained under constant agitation for 60 min. The incubation mixture was then extracted with ethyl acetate, the extract washed with saturated sodium bicarbonate solution and water and after evaporation to dryness chromatographed on a thin layer of alumina and then rechromatographed on paper in Bush B5 system as previously described⁴. Estimation of 7 α -OH-DHA was performed densitometrically.

The results of 7 α -OH-DHA estimation in the individual groups of animals are presented in the Table. It is apparent that thyroxine application suppressed 7 α -hydroxylation in liver. The lowering is statistically significant (significance level 0.05) and it may be observed both in normally fed rats as well as in rats after 12 and 36 h fasting. The effect of fasting appears only 36 h after cessation of food intake; at this stage there is a three-fold content of 7 α -OH-DHA (as compared to zero time) in the incubated samples both in the controls as well as in the thyroxine treated animals (the increase is also statistically significant at the 0.05 level). After a further 12 h fasting, however, there again appears a decrease, which is particularly pronounced in the control animals.

¹ J. JAO and S. B. KORITZ, *Metabolism* 11, 1302 (1962).

² J. FISHMAN, L. HELLMAN, B. ZUMOFF and T. F. GALLAGHER, *J. clin. Endocr. Metab.* 25, 365 (1965).

³ G. M. TOMKINS and J. S. MCGUIRE JR., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 86, 600 (1960).

⁴ L. STÁRKA and J. KÜTOVÁ, *Biochim. biophys. Acta* 56, 76 (1962).