

in a scintillation-well detector. In the 8 ^{111}Ag -colloid-injected animals, over 50% of the injected dose was recovered in the regional lymph nodes; the particles leaving the lymphatics were mainly retained by the reticulo endothelial system and were recovered from the liver. In X-ray films, in most animals injected with ^{131}I -Lipiodol, an excellent filling of the regional lymphatics could be observed. It was, however, established that on the average less than 10% of the injected radioactive oil remains in the regional lymph nodes, about $\frac{1}{4}$ of the injected dose was recovered from the lung tissue. Total recoveries in the organs which were examined varied between 17 and 88% (mean 46%). In 5 dogs injected with 0.5 ml/kg ^{131}I -labelled triolein in the leg lymphatics 81% of the injected radioisotope was recovered from the lungs 4 h later⁶.

Accordingly, it can be assumed that only a fraction of the injected radioactive oil remains in the lymphatic system; and it seems improbable that the intralymphatic fraction could be substantially increased by the reduction of the injected volume. Irradiation of regional lymph nodes by intralymphatic injections of radioactive substances is nevertheless an efficient means for the prolongation of homograft survival.

Zusammenfassung. Injektion von ^{131}I -Lipiodol oder ^{111}Ag -Kolloid beim Kaninchen in ein Ohrlymphgefäß verzögert die Abstoßung eines Hautlappen-Hormotransplantates am Ohre wesentlich. Bei der Untersuchung der Verteilung intralymphatisch verabreichter Radioisotopen in den einzelnen Geweben wurde festgestellt, dass etwa 50% des ^{111}Ag -Kolloids, aber unter 10% des ^{131}I -Lipiodols von den regionären Lymphknoten aufgenommen wird und dass Lipiodol hauptsächlich im Lungengewebe, Ag-Kolloid in der Leber gespeichert wird.

G. SZABÓ, ZSUZSA MAGYAR
and J. BÁLINT

National Institute of Traumatology,
Budapest (Hungary), 28 July 1967

⁶ G. SZABÓ, in *Progress in Lymphology* (Ed. A. RÜTTIMANN; G. Thieme, Stuttgart 1967).

Excretion of C_{19} -Steroids in Human Seminal Fluid

Recently the presence of dehydroepiandrosterone (DHEA) glucuronoside¹ and sulphate² in human seminal fluid has been demonstrated. Since the direct conversion of circulating DHEA sulphate or sulphatide respectively apparently plays a major role in the metabolism of C_{19} -steroids³⁻⁵, it seemed of interest to ascertain such processes in tissue connected with the formation of seminal fluid. The present communication therefore deals with the assay of free and conjugated C_{19} -steroids in this material following the administration of double-labelled DHEA sulphate.

Six hours after i.v. injection of 43.0 μg Na-7 α - ^3H -DHEA- ^{35}S -sulphate with 4,640,000 dpm ^3H and 1,611,000 dpm ^{35}S ($^3\text{H}/^{35}\text{S} = 2.88$) into a 43-year-old male subject 4.3 ml of seminal fluid were obtained. The sample was diluted with water to 10 ml and thoroughly extracted with 3×20 ml chloroform for removal of free steroids. Subsequently, the preextracted material was treated with 60 ml ethanol-acetone (1:1 v/v). After filtration of precipitated proteins the filtrate was evaporated to approximately 2.5 ml, diluted with 12.5 ml chloroform-methanol (1:9 v/v) and submitted to ion exchange chromatography on activated and pretreated DEAH-Sephadex A-50⁶. Separation and purification of steroid sulphatides, sulphates and glucuronosides could be achieved by means of thin-layer chromatography on silica gel G in chloroform-methanol-ammonia (20:5:0.2 v/v). For cleavage of the conjugates the solvolysis in ether/perchloric acid proved efficient⁷. Free steroids were separated by thin-layer chromatography on silica gel G in chloroform-dioxane (94:6 v/v) (A), on aluminium oxide in cyclohexane-butyl acetate-butanol (50:45:5 v/v) (B), eventually subjected to the 2,4-dinitrophenylhydrazine reaction⁸ and rechromatographed in system A, whereas the non-ketonic C_{19} -steroids were rerun in cyclohexane-ethyl acetate (1:2 v/v) (C). Aliquots of all fractions, localized in a Berthold Dünnenschicht-Scanner LB 2720, were assayed for ^{35}S and/or ^3H in a Packard Tricarb Spectrometer 3003.

Of the 1520 dpm ^3H or 0.033% of administered ^3H -activity, found in the seminal fluid, free steroids represented 481 dpm ^3H (0.010%), sulphoconjugates 967 dpm ^3H (0.021%) and glucuronosides 72 dpm ^3H (0.002%). The fraction of sulphoconjugates consisted of steroid

^3H -labelled C_{19} -steroids in human seminal fluid after i.v. administration of double-labelled DHEA sulphate

Steroid	dpm ^3H in		
	free steroids	sulphoconjugates	glucuronosides
Dehydroepiandrosterone	158	440	23
Androsterone	128	214	22
Androstenedione	37	64	
Androstenediol	15	84	
Etiocanolone	34	36	
Testosterone	40	19	
Androstenetriol		16	

¹ W. DIRSCHERL and H. BREUER, *Acta endocr.*, Copenh. 44, 403 (1963).

² O. STEENO, C. SCHIRREN, W. HEYNS and P. DE MOOR, *J. clin. Endocr. Metab.* 26, 353 (1966).

³ G. W. OERTEL, P. KNAPSTEIN and L. TREIBER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 345, 221 (1966).

⁴ E. E. BAULIEU, C. CORPECHOT, F. DRAY, R. EMILIOZZI, M. C. LEBEAU, P. MAUVAIS-JARVIS and P. ROBET, *Recent Prog. Horm. Res.* 20, 411 (1965).

⁵ P. KNAPSTEIN, F. WENDLBERGER and G. W. OERTEL, *Experientia* 23, 480 (1967).

⁶ G. W. OERTEL, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 336, 236 (1964).

⁷ L. TREIBER and G. W. OERTEL, *Clinica chim. Acta* 17, 81 (1967).

⁸ L. TREIBER and G. W. OERTEL, *Z. klin. Chem.* 5, 83 (1967).

sulphatides with 763 dpm ³H and 202 dpm ³⁵S (³H/³⁵S = 3.78) and of steroid sulphates with 204 dpm ³H and 60 dpm ³⁵S (³H/³⁵S = 3.40). The composition of the various fractions is shown in the Table.

In contrast to the findings of STEENO et al.², the present data indicate the excretion of metabolites of plasma DHEA sulphate or sulphatide respectively in human seminal fluid. Besides the prevailing sulphoconjugated C₁₉-steroids and a minute fraction of labelled steroid glucuronosides, a substantial portion of ³H-activity was detected in the fraction of free steroids, suggesting partial hydrolysis of conjugated compounds. Although the composition of the sulphoconjugated C₁₉-steroids with an only slightly altered ³H/³⁵S ratio resembles that of sulphoconjugated C₁₉-steroids in peripheral human plasma, the further and preferably direct metabolism of circulating plasma sulphoconjugates in tissue, connected with the formation of seminal fluid, cannot be excluded. However, since the seminal fluid represents a mixture of secretions from seminal vesicles,

prostrate, epididymis, Cowper's glands etc., the site of such assumed transformations remains unknown.

Zusammenfassung. Sechs Stunden nach i.v. Verabreichung von 7α-³H-Dehydroepiandrosteron-³⁵S-sulfat enthielt das Sperma eines 43jährigen Mannes 0.033% injizierter ³H-Aktivität. Hiervon entfielen 0.010% auf freie Steroide, 0.021% auf Sulfokonjugate und 0.002% auf Steroid-glucuronoside. Die aus Steroid-sulfatiden und -sulfaten bestehenden Sulfokonjugate wiesen ein nur geringfügig verschobenes Isotopenverhältnis ³H/³⁵S auf (3.78 und 3.40 gegenüber 2.88). In den verschiedenen Fraktionen konnten ausser Dehydroepiandrosteron auch Androsteron, Androstendion und weitere C₁₉-Steroide nachgewiesen werden.

G. W. OERTEL and L. TREIBER

Ableitung für experimentelle Endokrinologie, Universitäts-Frauenklinik, 65 Mainz (Germany), 28 August 1967.

«LH-Releasing-Factor» beim Menschen

Von den ersten Darstellungen über eine physiologische Verbindung zwischen Zentralnervensystem und Hypophysenvorderlappen^{1,2} über die anatomische Beschreibung des hypophysären Pfortadersystems³ als funktionellem Verbindungsglied zwischen Hypothalamus und Hypophyse⁴ bis zur Erstdarstellung neurohumoraler Substanzen^{5,6} aus Gewebsextrakten der medianen Eminenz vergingen rund 30 Jahre. Ein «LH-Releasing-Factor» (LH-RF) ist 1959 bei Vertebraten gefunden worden^{7,8}.

Es war nun von grossem Interesse zu wissen, ob solche neurohumoralen Substanzen auch beim Menschen vorkommen. Für die Kenntnis der Physiologie der Reproduk-

tion am bedeutendsten erscheint die Frage nach einem LH-RF beim Menschen.

CROXATTO et al.⁹ testeten 1964 Extrakte der medianen Eminenz menschlicher Hypothalami an hypophysektomierten bzw. Proöstrus-Ratten und im Ovar-Ascorbinsäure-Test (OAAD); es gelang diesen Autoren nicht, zwischen LH- und LH-RF-Wirkung zu differenzieren.

Wir haben in der auf Figur 1 dargestellten Weise (vgl.⁷) Präparationen der medianen Eminenz menschlicher Hypothalami in der Geschlechtsreife verstorbener männlicher und weiblicher Individuen aufgearbeitet; das Feuchtgewicht der Präparate schwankte zwischen 1,122 und 1,822 g.

Der Extrakt wurde ovariectomierten, Östrogen-Progesteronblockierten Ratten¹⁰ in die Schwanzvene injiziert. Zehn min nach der Injektion wurden 4–6 ml von jedem Tier durch Entbluten aus der Vena jugularis gewonnen und zentrifugiert; der Serum-LH-Gehalt wurde in einer von uns früher beschriebenen Weise¹¹ im OAAD-Test¹² bestimmt; Serum-LH-Werte nicht belasteter steroidblockierter ovariectomierter Ratten variieren beim 2-Ovar-3h-Test unterhalb von 13 OAAD-%¹³; das doppelte

Hypothalamusextraktion Mediane Eminenz		
1. Homogenisation 2.0 ml 0.1 nHCl,		0 °C
Nachextraktion 0.5 ml 0.1 nHCl,		
2. Zentrifugation 3500 rpm,	40 min,	4 °C
3. LH-Eliminierung Überstand	10 min,	100 °C
4. Zentrifugation 3500 rpm,	40 min,	4 °C
5. Filtration Whatman No. 1 Nachextraktion 0.5 ml 0.1 nHCl		
6. Einfrieren – 18 °C bis Bioassay		

Fig. 1. Aufarbeitung der Präparationen medianer Eminenzen aus humanen Hypothalami.

¹ F. H. A. MARSHALL, Phil. Trans. R. Soc. 226, 423 (1936).
² H. SELVE, Nature 138, 32 (1936).
³ G. T. POPA und U. FIELDING, J. Anat. 65, 88 (1930).
⁴ J. D. GREEN und G. W. HARRIS, J. Physiol. 108, 359 (1949).
⁵ W. BARGMANN, Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 34, 610 (1949).
⁶ M. SAFFRAN, A. V. SCHALLY und B. G. BENFAY, Endocrinology 57, 439 (1955).
⁷ S. M. McCANN, S. TALEISNIK und H. M. FRIEDMANN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 104, 432 (1960).
⁸ R. GUILLEMIN, Recent Prog. Horm. Res. 20, 89 (1964).
⁹ Ho. CROXATTO, J. ARRAU und He. CROXATTO, Nature 204, 584 (1964).
¹⁰ V. D. RAMIREZ und S. M. McCANN, Endocrinology 73, 193 (1963).
¹¹ H. P. G. SCHNEIDER und L. SACHS, Z. Geburtsh. Gynäk. 167, 28 (1967).
¹² A. F. PARLOW, Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol. 17, 402 (1958).
¹³ H. P. G. SCHNEIDER, H.-J. STAEMMLER, K. STRAEHLER-POHL und L. SACHS, Acta endocr., im Druck.