

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,

prostate, 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 Sulfokongugate und 0.002% auf Steroid-glucuronoside. Die aus Steroid-sulfatiden und -sulfaten bestehenden Sulfokongugate 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.

«priming» der infantilen Holtzman-Ratten führt zu einer erhöhten LH-Sensibilität der pseudograviden Ovarien, so dass wir mit deutlichen Effekten rechnen durften.

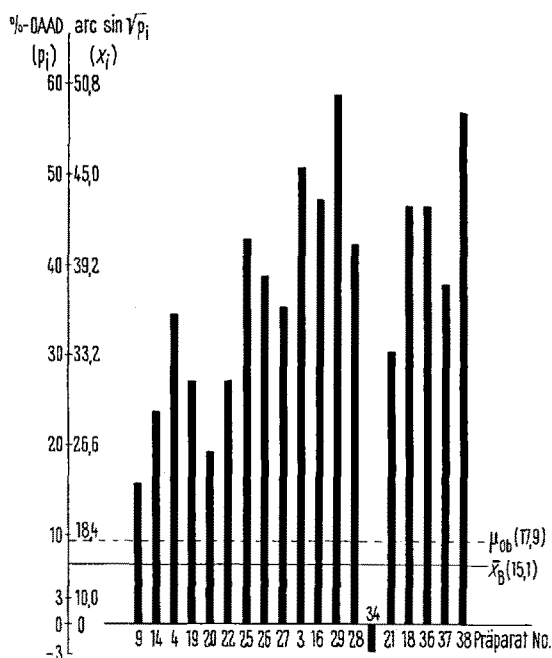


Fig. 2. Serum-LH-Werte (OAAD-%) nach Belastung vorbehandelter ovariectomierter Ratten mit humanen Hypothalamusextrakten verglichen mit dem mittleren Basiswert der Rechts-Links-Differenz nicht behandelter pseudogravider Tiere; in $\arcsin \sqrt{p_i}$ -Werten: $\bar{x}_B = 15,1$ ($s_B^2 = 5,5$; $n = 7$) mit oberer 99%-Vertrauensgrenze $\mu_{Ob.} = \bar{x} + ts/\sqrt{n} = 17,9$ entsprechend 9,4 OAAD-%.

Die Figur 2 stellt die Ergebnisse von 19 Belastungen mit menschlichen Hypothalamus-Extrakten dar. Die OAAD-Prozente wurden auf den mittleren Basiswert einer Vergleichsbestimmung des Ascorbinsäuregehaltes von rechtem und linkem Ovar pseudogravider Holtzman-Ratten¹¹ bezogen (vgl. Figur 2).

Alle oberhalb $\mu_{Ob.}$ ($\alpha = 0,01$) liegenden Werte, und das sind alle bis auf Fall 34, in dem keinerlei LH-Aktivität nachgewiesen werden konnte, belegen sehr eindeutig den Nachweis einer LH-Releasing-Aktivität in den Extrakten menschlicher Hypothalami. Die Aufgabe der Zukunft besteht darin, die Molekularstruktur speziell des LH-RF aufzuklären und einen Weg zu seiner Synthese zu finden, damit mögliche neue und bessere Wege zur Behandlung physiologischer und soziologischer Probleme der Reproduktion beschränkt werden können¹⁴.

Summary. There is evidence for LH-releasing-factor (LH-RF) in 18 crude acid extracts of human median eminence preparation following the procedure described by RAMIREZ and McCANN.

H. P. G. SCHNEIDER, H.-J. STAEMMLER,
L. SACHS und CHR. GLÖCKNER

Universitäts-Frauenklinik, 23 Kiel, Städtische Frauenklinik Ludwigshafen/Rhein und Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation der Universität Kiel (Deutschland), 2. August 1967.

¹⁴ Wir danken dem Institut für Gerichtliche und Soziale Medizin der Universität Kiel (Dir.: Prof. Dr. W. HALLERMANN) für die Sammlung der Präparate.

Hydrolysis of DHEA Sulphate after Oral Application

In recent investigations^{1,2}, the reabsorption of free and conjugated C₁₉-steroids from human intestines has been demonstrated *in vivo*. From such experiments it was concluded that double-labelled dehydroepiandrosterone (DHEA) sulphate is completely but slowly reabsorbed through the intestinal wall by virtue of its conversion to the lipophile steroid sulphatide. Hence, the oral application of DHEA sulphate should be as effective as the *i.v.* infusion, provided the conjugate reaches the small intestines without breakdown or alteration of the molecule. In order to obtain pertinent information, a fasting 23-year-old female subject was given orally 6.45 μ g 4-¹⁴C-DHEA with 493,000 dpm and 0.05 μ g Na-7 α -³H-DHEA sulphate with 1,050,000 dpm dissolved in 20 ml water. Following the administration 91 ml of duodenal juice were collected over 45 min by means of a tube laying in the upper duodenum. The sample was processed by routine methods^{1,3}. While free steroids were extracted with 3 times 2 volumes of chloroform, the combined extracts being extensively washed with alkali and water, total steroid conjugates were removed by extraction with ethyl acetate after addition of 50% (w/v) ammonium sulphate

and acidification to pH 1. For cleavage of the conjugates the solvolysis in ether-perchloric acid⁴ proved adequate. The fractions of free and liberated steroids were subjected to thin layer chromatography on silica gel G in chloroform-dioxane (94:6 v/v) (A) and the different labelled compounds rechromatographed on aluminum oxide in cyclohexane-butylacetate-*n*-butanol (50:45:5 v/v) (B). Subsequently, the individual steroids were converted into their corresponding 2,4-dinitrophenylhydrazones⁵ and chromatographed in system (A). Radioactive zones on chromatograms were localized in a Berthold Dünnschicht-scanner LB-2720, while simultaneous counting of ³H and

¹ P. Knapstein, L. Treiber, F. Wendlberger and G. W. Oertel, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 401 (1967).

² P. Knapstein, F. Wendlberger and G. W. Oertel, Experientia 23 (1967).

³ G. W. Oertel, P. Knapstein and L. Treiber, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 345, 221 (1966).

⁴ L. Treiber and G. W. Oertel, Clin. chim. Acta, in press (1967).

⁵ L. Treiber and G. W. Oertel, Z. klin. Chem. 5, 83 (1967).