

histologically (patients with pathological changes were omitted from this study). In the second part of the specimen glycogen concentration was determined by the anthrone method⁶ after repeated ethanol precipitation.

Results. Table II presents the results of glycogen analysis. The mean value of glycogen concentration in control

Table II. Liver glycogen g/100 g wet weight

	Controls	Uremic patients glucose tolerance	
		normal	abnormal
	5,25	3,90	4,30
	4,15	3,88	0,89
	6,10	3,11	2,58
	5,14	0,49	3,47
	5,32	4,35	6,48
	1,92		
	2,62		
	5,15		
	1,39		
M	4,34	3,15	3,55
σ	$\pm 1,70$	$\pm 1,59$	$\pm 2,07$

M, arithmetic mean, σ , standard deviation.

patients conforms well with the results of other authors^{7,8}. The differences between the arithmetic means of either group are not significant. Nevertheless in 2 uremic patients (one in each group) the liver glycogen concentration was lower than normal with 97,5% probability (the lowest normal glycogen concentration limited by 2 standard deviations is 0.94 g/100 g wet weight). On the base of these results, impaired glycolysis rather than decreased glycogenesis seems to play a part in impaired glucose tolerance in uremia.

Zusammenfassung. Die Glykogenkonzentration in der Leber von urämischen Patienten und gestörter Glukosetoleranz ist nicht signifikant niedriger als diejenige bei den Kontrollen.

R. DZÚRIK and E. BRIXOVÁ

III. Medical Clinic, Comenius University,
Medical School, Bratislava (Czechoslovakia).

⁶ D. L. MORRIS, Science 107, 254 (1948).

⁷ J. E. SOKAL and K. E. GERSZI, J. lab. clin. Med. 53, 876 (1959).

⁸ A. MARTINSSON, H. SUNZEL and B. HOOD, Acta med. scand. 173, 745 (1963).

Fehlende Wasserstoff-Übertragung von Östradiol auf Androstendion im Diäthylnitrosamin-induzierten Hepatom der Ratte

In Leberschnitten von erwachsenen männlichen Ratten ist eine Kopplung der Östradiol-Oxydation mit der Reduktion von Androgenen nachweisbar^{1,2}. Dabei wird das Tritium des Östradiol-17 α -T in der Leber von weiblichen Tieren in die 3- und 17-Stellung des aus Δ_4 -Androsten-3,17-dion entstehenden 5 α -Androstan-3 α ,17 β -diols eingebaut, während in der Leber von Rattenmännchen *trans*-Androstandiole entstehen, die Tritium in Position 4 oder 5 enthalten.

Die vorliegende Arbeit vergleicht den Tritiumeinbau aus Östradiol-17 α -T in Reduktionsprodukte des Androstendions und in Wasser bei der Leber von gesunden Weibchen und bei experimentell erzeugtem Leberkarzinom.

Ausserdem wurde bei gesunden Ratten und bei Tieren mit Leberkarzinom die zeitliche Abhängigkeit der In-vivo-Oxydation von Östradiol-17 α -T gemessen³.

Material und Methoden. Tiere: Ausgewachsene weibliche Wistar-Albino-Ratten eigener Zucht erhielten zur Erzeugung von isolierten Leberkarzinomen hepatozellulären Typs täglich für die Dauer von 7 Monaten ungefähr 2,5 mg Diäthylnitrosamin/kg Ratte im Trinkwasser⁴ verabreicht.

Gewebe: Die Ratten wurden durch Äther getötet; nach dem Ausbluten wurden die Lebern entnommen, die makroskopisch als Karzinome imponierenden Knoten freipräpariert und nach der Methode von DEUTSCH⁵ in Gewebeschnitte zerlegt. Ausserdem wurden Leberschnitte normaler Tiere hergestellt.

Die Inkubation und die Aufarbeitung der Ansätze ist in ² ausführlich beschrieben.

Isolierung und Identifizierung der Metaboliten: Nach Inkubation von Östradiol-17 α -T und inaktivem Androstendion mit Gewebeschnitten von Hepatomen wurde das radioaktive Haupt-Maximum nach Dünnschicht-Chromatographie durch folgende Schritte identifiziert: 1. Dünnschichtchromatographie in unterschiedlichen Entwicklungssystemen und Vergleich mit authentischen Referenzsubstanzen; 2. Acetylierung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin; 3. mehrmaliges Umkristallisieren aus verschiedenen Lösungsmitteln mit 0,2 g inaktiven Östradiols bis zur Konstanz der spezifischen Aktivität.

Messung der Radioaktivität: Ein- und zweidimensionale Dünnschichtchromatogramme wurden direkt auf der unveränderten Platte mit dem Berthold-«Dünnschicht-Scanner»⁶ ausgemessen⁷. Radioaktive Lösungen wurden in einer Dioxan-Szintillationslösung nach Butler im Flüssig-Szintillationszähler «Tri-Carb» der Firma Packard

¹ M. WENZEL, K. POLLOW und T. ZIEBARTH, Z. Naturf. 22b, 894 (1967).

² M. WENZEL und K. POLLOW, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 1667 (1967).

³ M. WENZEL, H. KLEUKER und P. E. SCHULZE, Z. Naturf. 21b, 1178 (1966).

⁴ Wir danken Herrn Dr. KURRECK vom Organ.-Chem. Institut der Freien Universität Berlin für die Überlassung von Diäthylnitrosamin.

⁵ W. DEUTSCH, J. Physiol. 87, 56P (1936).

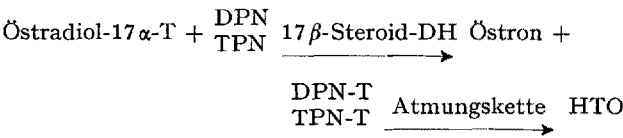
⁶ Laboratorium Prof. Dr. BERTHOLD, 7547 Wildbad (Schwarzwald).

⁷ F. BERTHOLD und M. WENZEL, in *Instrumentation in Nuclear Medicine* (Ed. G. HINE; Academic Press, New York 1967), p. 251.

gemessen. Die Zählausbeute wurde durch einen internen Standard bestimmt⁸.

In-vivo-Messung der Östradiol-Oxydation^{8,9}: Nach i.m. Injektion von Östradiol-17 α -T (0,14 mg/kg) werden die Tiere in einen speziellen Käfig gesetzt, der mit trockener Luft durchströmt wird. Der in der Ausatemluft der Tiere enthaltene Wasserdampf wird kondensiert und in diesen Wasserproben die spezifische Tritium-Aktivität (HTO) gemessen.

Gemäss folgender Gleichung entspricht dann die Oxydation von einem Molekül Östradiol dem Erscheinen von einem Molekül HTO im Körperwasser:



Ergebnisse. Versuche mit Gewebeschnitten: Die Ergebnisse der Inkubationsversuche von Schnitten solider, grossknotiger Leberkarzinome und von normaler Leber weiblicher Ratten mit Östradiol-17 α -T und Androstendion sind in der Tabelle zusammengefasst. Die Tabelle gibt die Abhängigkeit des Umsatzes von Östradiol-17 α -T zu HTO und die Bildung von tritiiertem 5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol von der Östradiol-Konzentration wieder. Unter den hier gewählten Bedingungen betrug die Oxydation in 17-Position von Östradiol in Tumorgewebe zwischen 0,5 und 2,4% gemessen an der HTO-Bildung. Bestätigt wird dieser Befund durch den hohen Anteil an wiedergefundenem, unverändertem Östradiol-17 α -T (bis zu Werten über 90%). Dass diese Substanz tatsächlich Östradiol war, konnte durch eine Reihe von Identifizierungsreaktionen (vgl. Methodik) bewiesen werden.

Tritiierte Androstendion-Metabolite waren nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu erhält man in Leberschnitten von gesunden Rattenweibchen unter analogen Versuchsbedingungen zwischen 10–30% HTO und 20–30% tritiiertes 5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol bezogen auf die eingesetzte Aktivität von Östradiol-17 α -T^{1,2}.

In-vivo-Oxydation von Östradiol-17 α -T in Tumortieren und in normalen Ratten: Die Zeitabhängigkeit der Oxydation von Östradiol-17 α -T an der 17 β -Hydroxy-Gruppe bei geschlechtsreifen weiblichen Tieren und bei Diäthyl-nitrosamin-behandelten Rattenweibchen ist in der Figur

dargestellt. Danach ist der Anstieg des Tritium-Spiegels im Körperwasser von Normaltieren und vorbehandelten Tieren in den ersten 5 h nach Östradiol-Injektion fast identisch. Erst nach 8 h verminderte sich die Oxydationsrate bei Tumortieren im Vergleich zu Normaltieren deutlich. Nach 30 h war ein Unterschied von 20–30% erreicht.

Die Werte von Tumortieren wurden nur verwendet, wenn nach Sektion der Tiere makroskopisch grossknotige Tumorbildung nachgewiesen wurde. Ausserdem wurden die Tumoren histologisch kontrolliert.

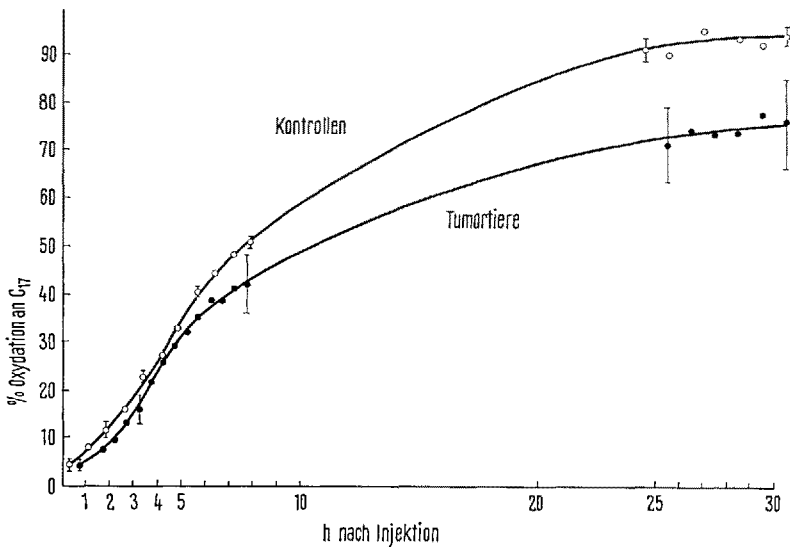
Diskussion. Die hier wiedergegebenen Befunde zeigen bei experimentell erzeugtem Leberkarzinom eine starke Verminderung der Oxydation von Östradiol zu Östron und HTO im Vergleich zu normalem Lebergewebe (vgl. Tabelle). Ferner wird im Tumor nicht der am C₁₇-Atom stehende Wasserstoff des Östradiols zur Reduktion von Androgenen verwendet. Das bedeutet: Der in normalem Lebergewebe intensive oxydative Östradiolstoffwechsel ist

⁸ M. WENZEL und P. E. SCHULZE, *Tritium-Markierung* (Walter de Gruyter Co., Berlin 1962), p. 123.
⁹ M. WENZEL und E. KRAAS, *Acta Endocr.* 56, 385 (1967).

Vergleich der Reduktion von Androstendion durch Östradiol-17 α -T in Hepatomen und normaler Leber weiblicher Wistar-Ratten

Gewebe	Östradiol-Konzentration $\mu\text{Mol/l}$	Tritiumeinbau in % der eingesetzten Aktivität HTO	5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol	Nicht umgesetztes Östradiol
Leberkarzinom	28,7	0,7	*	90,1
	9,6	1,2	*	90,5
	2,4	2,3	*	87,8
	1	2,4	*	92,8
Normale Leber	28,7	6,2	21,3	73
	1	31,2	29,1	30

Androstendion-Konzentration: 86 $\mu\text{Mol/l}$. * nicht nachweisbar. Methodik vergleiche Text.



Vergleich der Zeitabhängigkeit der Oxydation von Östradiol zu Östron und HTO bei normalen, geschlechtsreifen weiblichen Ratten und bei Tumortieren. Einzelheiten der Methodik siehe Text. Injektionslösung: Äthanol/physiologische Kochsalzlösung (1:1); 0,5 ml mit 24,7 μCi Östradiol-17 α -T (0,14 mg/kg Ratte). Die Messpunkte stellen den Mittelwert aus Versuchen mit je 8 Tieren dar, die Balken den mittleren Fehler der Einzelmessung.

in der durch Diäthylnitrosamin induzierten Krebszelle gestört. Dieses Ergebnis entspricht den Befunden von RYAN und ENGEL bei *p*-Dimethylaminoazobenzol-induzierten Hepatomen¹⁰. Auch bei den Untersuchungen von BREUER und Mitarbeitern¹¹ ist die Oxydation von Östradiol zu Östron in Diäthylnitrosamin-induzierten Hepatomen erniedrigt. Dass das nicht im gleichen Ausmass wie bei unseren Versuchen der Fall ist, mag darin liegen, dass BREUER et al. 4mal solange und in Anwesenheit von Glukose inkubiert haben.

Diese an Gewebeschnitten erhobenen Befunde entsprechen in ihrer Tendenz den In-vivo-Untersuchungen über die Oxydation von Östradiol-17 α -T (vgl. Figur).

Ratten mit Leberkarzinom zeigen ebenfalls eine Reduktion der Östradiol-Oxydation, die wahrscheinlich durch den teilweisen Ausfall (20–50% Tumormasse in der Leber) von Lebergewebe bedingt ist. Diese Verminderung der Östradiol-Oxydation in vivo ist jedoch weit weniger ausgeprägt als die Verminderung bei den Hepatomschnitten. Offensichtlich reicht bei den In-vivo-Versuchen der Restbestand an normalem Lebergewebe aus, um das Östradiol fast mit normaler Geschwindigkeit zu oxydieren.

Wir konnten ja bereits früher zeigen, dass die Kapazität der Östradioloxydation in vivo selbst bei der Injektion von 2,6 mg/kg bei weitem nicht ausgelastet ist.

Die Ursache der verminderten Östradiol-Oxydation im Hepatomgewebe konnte bisher nicht aufgeklärt werden.

Summary. In liver-tissue of female rats estradiol-17 α -T is oxydized by NAD or NADP, yielding the tritium-labelled coenzymes NAD-T or NADP-T which can transfer the tritium to androstendione. So tritium-labelled androstendiol is obtained. Of the added activity 10–30% is oxydized to water. In diethylnitrosamine-induced hepatomas estradiol-17 α -T is oxydized to tritium-water in a comparatively small amount and no transport of the tritium to reduction-products of androstendions occurs. Testing the in-vivo-oxydation of estradiol in normal female rats and in females with hepatoma with the aid of the 'Stoffwechsel-labil' labelling (measuring the specific activity of tritium in body-water after injecting estradiol-17 α -T) a lower oxydation-rate was also found in rats with hepatoma than in normal rats.

M. WENZEL und K. FOLLOW^{*}

Physiologisch-Chemisches Institut der Freien Universität, 1 Berlin-Dahlem (Deutschland), 15. Dezember 1967.

¹⁰ K. RYAN und L. ENGEL, *Endocrinology* 52, 277 (1953).

¹¹ H. BREUER, J. BREUER und D. SCHMÄHL, *Z. Krebsforsch.* 67, 247 (1965).

Importance de l'étude des transferrines sériques dans la différenciation des espèces. Résultats acquis dans le genre *Anguilla*

L'histoire de l'Anguille, de ses migrations, de sa reproduction, ont donné lieu à un nombre important de travaux. D'excellents ouvrages ont exposé les faits dans leur ensemble¹⁻³.

Des moyens nouveaux d'investigations, en particulier l'étude des protéines génétiquement transmises, permettent une meilleure connaissance des populations animales et peuvent éclairer certains problèmes d'une optique nouvelle.

Une protéine sérique particulière, la Transferrine (ou Sidérophiline), caractérisée par sa capacité de fixation et de transport du Fer dans l'organisme, en est un exemple.

On sait en effet, depuis les travaux de SMITHIES en 1959⁴ que l'analyse par électrophorèse en gel d'amidon, d'un sérum marqué au Fe⁵⁹, permet de distinguer, à l'intérieur d'une même espèce, plusieurs variétés ou «types» de transferrines différant entre eux par leur mobilité électrophorétique.

La pluralité des types de la Transferrine entraîne des différences entre individus d'une même espèce, différences génétiquement transmises et identifiant chaque individu par son «phénotype» de transferrine.

Analogues aux groupes sanguins, ces groupes sériques peuvent permettre de comparer des populations (ou des races) du point de vue de la répartition de ces phénotypes: deux populations ayant une répartition identique de leurs groupes de transferrines peuvent être considérées comme identiques par ce critère.

De tels groupes de transferrines sont bien connus chez l'homme, chez de nombreux mammifères (primates, équidés, bovidés, ovidés, etc.) et, plus récemment, ont pu être mis en évidence chez certains reptiles et amphibiens⁵.

Dès 1960⁶ nous avons étendu cette notion de différences entre individus d'une même espèce en montrant l'existence

de variations individuelles portées par les β globulines chez *Anguilla anguilla*. Puis en 1964⁷ nous avons pu confirmer, par l'emploi des techniques isotopiques et autoradiographiques utilisant le Fer 59, que le support de ces variations individuelles étaient bien la Transferrine.

Ainsi, chez *A. anguilla*, il existe 3 transferrines principales différant entre elles par leur mobilité électrophorétique. Celles-ci sont, par ordre de mobilité décroissante: la TfA, la TfB et la TfC. Une autre Transferrine, très rare et plus rapide que la TfA a reçu le nom de TfD.

Les phénotypes que nous avons observés sont actuellement au nombre de 9: A, B, C, AB, BC, AC, ABC, DA et DAB (voir Figure). Ces phénotypes sont mis en évidence par simple électrophorèse sur papier, en tampon véronal-lactate de calcium pH 8,6 après avoir préalablement marqué le sérum par addition de 30 μ l/ml d'une solution de 59 Fe Cl³ d'activité spécifique de 10 μ Ci/ml.

Après électrophorèse et fixation de la bande de papier, par une source d'infra-rouge, on effectue une révélation autoradiographique des zones ayant fixé le Fer, dévoilant ainsi le phénotype de transferrine de l'individu examiné.

¹ J. SCHMIDT, Rapport Cons. perm. Int. Exp. Med. (Copenhague 1906).

² H. BERTIN, *Les Anguilles* (Payot, Paris 1942).

³ H. BERTIN, *Eels. A Biological Study* (Cleaver-Hume, London 1956).

⁴ O. SMITHIES et O. HILLER, *Biochem. J.* 72, 121 (1959).

⁵ H. C. DESSAUER, W. FOX et Q. L. HARTWIG, *Comp. Biochem. Physiol.* 5, 17 (1962).

⁶ A. DRILHON et J. M. FINE, *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris* 250, 4044 (1960).

⁷ J. M. FINE, A. DRILHON, P. AMOUCH et G. A. BOFFA, *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris* 258, 753 (1964).