

GREEN, BLANCHARD, NOCITO et RATNER¹ isolèrent du rein un enzyme désaminant électivement 14 amino-acides naturels, dont la L-phénylalanine, après avoir inhibé la D-acidaminodéhydrase. Mais le tissu rénal lui-même manifeste toujours primitivement une activité désaminante beaucoup plus marquée envers les D-aminoacides qu'envers leurs énantiomorphes naturels.

Dans le cas particulier de la L(—)-phénylalanine, l'oxydation enzymatique a fait l'objet des recherches de LANG et WESPHAL² qui montrèrent son utilisation spécifique par le foie sans libération d'ammoniac, BERNHEIM et BERNHEIM³ ont étudié sa transformation en L-tyrosine. De leur côté, EDLBACHER et GRAUER⁴ ont reconnu l'existence, dans le foie, d'un système enzymatique spécifique de la L-phénylalanine, distinct de la L-acidaminodéhydrase, de par sa sensibilité à différents inhibiteurs. Mais jamais on n'avait reconnu à un organe la faculté de dégrader plus électivement la phénylalanine naturelle.

Un test olfactif nous avait permis de déceler la transformation de la phényléthylamine en phénylacétaldéhyde par l'odeur reconnaissable d'essence de jasmin, et ainsi permis de caractériser l'amine oxydase⁵ dans la plupart des tissus; le caractère ubiquitaire de cette diastase avait échappé à des tests moins sensibles⁶. Or, une légère odeur d'essence de jasmin se développe, lorsqu'on met en présence des extraits salins de certains organes, la L(—)-phénylalanine.

Etant donné le caractère trop subjectif de ce test et son aspect purement qualitatif, nous avons cherché à déceler et à doser les composés carbonyles, phénylacétaldéhyde et acide phénylpyruvique éventuellement formés, par leurs dinitrophénylhydrazones dont les solutions en milieu alcalin se prêtent à un dosage photométrique. Les résultats sont conventionnellement exprimés en densité optique pour une longueur d'onde de 4500 Å. On constate que, dans le cas du foie et du rein, les composés carbonyles sont plus abondants lorsque le substrat est la D(+)-phénylalanine, ce qui est conforme aux données classiques. Dans le cas de la rate, du muscle, de la surrénale, l'activité enzymatique n'est pas mesurable par cette technique quel que soit l'isomère optique en cause; au contraire, les extraits de testicules de cobaye et de lapin sont nettement plus actifs vis-à-vis du dérivé naturel L.

Organes	L(—)-phénylalanine	D(+)-phénylalanine	DL-phénylalanine
Foie (cobaye)	0,05	0,029	0,12
Rein (cobaye)	0	0,51	0,35
Testicule (cobaye) . . .	0,52	0,07	0,41
Testicule (lapin) . . .	0,58	0,08	0,48

Cette action particulière des extraits testiculaires ne pouvait être interprétée, selon le modèle de HOLTZ⁷ par l'existence hypothétique d'une L-phénylalanine-décarboxylase, et l'action secondaire d'une amine-

oxydase transformant la phényléthylamine, intermédiairement apparue, en phénylacétaldéhyde. A cette explication s'opposent, en effet, l'absence de toute trace de phényléthylamine dans les produits de la réaction enzymatique, ainsi que les quantités insignifiantes de phénylacétaldéhyde isolables sous forme de dinitrophénylhydrazone.

L'absence de quantités notables de phénylacétaldéhyde permet d'éliminer aussi l'hypothèse d'un processus oxydatif direct au niveau du carbone de la phénylalanine, avec libération simultanée de NH₃ et CO₂.

Force était donc d'envisager comme seule hypothèse vraisemblable un processus de désamination oxydative par une L-phénylalanine-déshydrogénase, qui se trouverait particulièrement extractible par les solutions salines, à l'inverse, dans ce cas particulier, de la D-phénylalanine-déshydrogénase. Cette hypothèse s'est trouvée confirmée du fait que nous avons pu mettre en évidence, au cours de la réaction, la formation d'acide phénylpyruvique, en isolant sa p-dinitrophénylhydrazone par une technique inspirée de la méthode chromatographique de STRAIN¹: la chromatographie sur talc des dinitrophénylhydrazones brutes, préparées par action de la 2-4-dinitro-phénylhydrazine sur le produit de la réaction enzymatique après défécation métaphosphorique, nous a permis, en effet, de séparer des hydrazones brutes une hydrazone identique à celle de l'acide phénylpyruvique préparé par synthèse. La p-dinitrophénylhydrazone de la phénylacétaldéhyde n'a pu être isolée qu'en quantités minimes et les traces d'aldéhyde responsables de l'odeur de jasmin, s'expliquent probablement par une décarboxylation secondaire très partielle de l'acide phénylpyruvique.

Ainsi les extraits testiculaires en solution saline contiennent un système enzymatique susceptible de transformer la L(—)-phénylalanine en acide phénylpyruvique plus activement qu'il ne transforme la D(+)-phénylalanine. M. POLONOVSKI et G. SCHAPIRA

Laboratoire de biochimie médicale de la Faculté de médecine, Paris, le 10 janvier 1949.

Zusammenfassung

Hodenextrakte, die mit Salzlösungen erhalten werden, enthalten ein enzymatisches System, das imstande ist, L(—)-Phenylalanin erheblich schneller als D(+)-Phenylalanin durch oxydative Desaminierung in Phenylbrenztraubensäure umzuwandeln.

¹ H. H. STRAIN, J. Amer. Chem. Soc. 57, 758 (1937).

The Influence of Polar Solvents on the Metachromatic Reaction *in vitro*

The specificity of the metachromatic colour reaction in various tissue elements stained with certain basic aniline dyes is still a matter of discussion. With the methods yet published it is not possible to differentiate the various chromotrope substances in connective tissue.

The well-known effect of polar solvents on macromolecular systems suggests that they may alter the bond between the chromotrope substance and the basic dye. Furthermore, there is the possibility that, using the same polar solvent, the annulment of the metachromatic reaction between the chromotrope substances and

¹ M. BLANCHARD, D. E. GREEN, V. NOCITO et S. RATNER, J. Biol. Chem. 155, 421 (1944). – D. E. GREEN, D. H. MOORE, V. NOCITO et S. RATNER, J. Biol. Chem. 156, 383 (1944).
² K. LANG et U. WESPHAL, Z. physiol. Chem. 276, 179 (1942).
³ F. BERNHEIM et M. L. C. BERNHEIM, J. Biol. Chem. 152, 481 (1944).
⁴ E. S. EDLBACHER et H. GRAUER, Helv. chim. acta 27, 153, 928 (1944).
⁵ G. FLORENCE et G. SCHAPIRA, C. R. Soc. Biol. 139, 35 (1945).
⁶ G. SCHAPIRA, C. R. Soc. Biol. 139, 36 (1945).
⁷ P. HOLTZ, Z. physiol. Chem. 273, 201 (1942).

the dye occurs at a concentration of the solvent characteristic of the respective substance.

It would be of general interest to investigate whether the effect of various polar solvents on the metachromatic reaction of a chemically defined chromotrope substance could be correlated with any known physico-chemical properties of the solvent.

In order to test these hypotheses the following experiments were devised:—

Chromotrope substance:— Water solutions of the sodium salts of chondroitin sulfuric acid¹, hyaluronic acid¹, and heparin were used. Each solution had a concentration of 200 mg p. 100 ml. The heparin used had a strength of 80 Toronto units per mg substance.

Dye:—Toluidine blue 0.4 mg p. 100 ml in water. Serial dilutions of the chromotrope substances with concentrations ranging from 200 mg p. 100 ml to 12.5 mg p. 100 ml were made. To one ml of each dilution of the different substances was added 9 ml of the solution of the stain.

A purple, metachromatic colour reaction took place in all the concentrations of the chromotrope substances. In no case was there any precipitation.

The following solvents were then added to these test solutions: dioxan, ethanol, methanol, isopropyl alcohol, and acetone until the purple colour completely disappeared and changed to a blue as compared to a standard solution of toluidine blue in water (9 ml dye solution, 0.4 mg p. 100 ml and one ml water).

Results:—With this very crude method it was found that the required amount of the same solvent was relatively constant for the same chromotrope substance, despite the varying concentrations of the latter. However, different amounts of a certain solvent were required by the three different chromotrope substances (see Tables I and II).

Experimental data from a typical experiment given thus would seem to imply that the amount of each polar

solvent required to annul the metachromatic reaction between the dye and the various chromotrope substances is not the same. Furthermore, the calculated dielectric increments given in the Table II suggest the possibility that *the dielectric change required to alter the metachromatic bond is of the same order of magnitude for a specific substance*.

Spectrophotometric analyses and measurements of dielectric constants in relation to the phenomenon described above, as well as staining experiments on tissue sections, are in progress.

T. EDLUND and B. H. PERSSON

Institute of Physiology and Institute of Histology, University of Uppsala (Sweden), December 10, 1948.

Zusammenfassung

Gewisse basische Anilinfarbstoffe geben im Bindegewebe eine metachromatische Farbreaktion, welche jedoch die verschiedenen chromotropen Substanzen nicht differenziert zur Darstellung bringt. Die Vermutung, daß polare Lösungsmittel die Bindung zwischen basischem Farbstoff und chromotroper Substanz verändern und daß die Aufhebung der Farbreaktion für verschiedene Substanzen bei verschiedenen charakteristischen Lösungsmittelkonzentrationen erfolgt, wird *in vitro* an Serienverdünnungen mit Toluidinblau geprüft. Die purpurrote Farbe konnte mit polaren Lösungsmitteln ausgelöscht werden. Die zur Auslöschung benötigte Menge des Lösungsmittels ist für verschiedene chromotrope Substanzen charakteristisch und die damit verbundene dielektrische Änderung ist für eine spezifische Substanz von gleichbleibender Größenordnung.

The Thyroxine Sensitivity of Normal and Thyroidectomized Rats

Though several investigators mention that thyroidectomized animals are more sensitive to thyroxine than normal ones, only very few quantitative data are available. MEYER and WERTZ¹ administered thyroxine to normal and thyroidectomized rats during three days, measured O₂-consumption on the fifth day, and found that the latter rats are 25–30 times as sensitive as the former. Repeated doses of thyroxine are known to be more effective than the same amount administered in a single dose², and therefore these data could not be valid for the relative effectiveness of single doses. The minimal effective dose of thyroxine in thyroidectomized animals has apparently not been established and was therefore investigated.

Methods:—Male rats of approximately 250 g body-weight and well accustomed to the determination of O₂-consumption were used. O₂-consumption was estimated before and 24 hours after the subcutaneous administration of thyroxine (Schering) in the somewhat modified apparatus of BELÁK and ILLÉNYI³.

The O₂-consumption of the thyroidectomized animals was 30–40 p. c. below normal before the administration of thyroxine, while that of the controls was within normal limits.

Fig. 1 demonstrates that subcutaneous injection of 2 µg are followed after 24 hours by a marked rise of O₂-

¹ A. E. MEYER and A. WERTZ, *Endocrinol.* 24, 683 (1939) cit. *Ber. Physiol.* 114, 458.

² E. LE BRETON and G. SCHAEFFER, *C. R. Soc. Biol.* 118, 445 (1935).

³ K. BELÁK and A. ILLÉNYI, *Biochem. Z.* 281, 27 (1935).

Table I
Dielectric increments of polar solvents used (for 1 molar, aqueous solutions). According to the literature.

Solvent	Dielectric increment
Dioxan	−8.3
Ethanol.	−2.6
Methanol	−1.4
Isopropyl alcohol	−4.3
Acetone.	−3.2

Table II
Dielectric increment required to annul the metachromatic reaction. Calculated from the concentration of the solvents in the test solution.

Chromotrope substance Sodium salts of:	Dioxan	Ethanol	Methanol	Isopropyl alcohol	Acetone
Chondroitin sulphuric acid . . .	−13.7	−10.6	− 8.9	−10.8	− 9.0
Hyaluronic acid . . .	− 8.3	− 7.8	− 7.9	− 8.6	− 7.7
Heparin	−24.2	−20.1	−18.0	−18.8	−20.0

¹ Obtained by courtesy of Prof. G. BLIX, Institute of Medical Chemistry, Uppsala.