

Effect of urine extracts from fasting and cachectic humans, and humans on a normal diet (control group) on the ketone bodies, liver fat and blood sugar in mice 6 h after s.c. injection (mean $\pm$ S.E.; in parentheses the number of experimental animals in the test)

Material tested	Ketone bodies (mg%)	Liver fat (%)	Blood sugar (mg%)
Extract from urine			
1. Placebo ^a	6.40 $\pm$ 0.93 (8)	5.85 $\pm$ 0.26 (9)	81.2 $\pm$ 7.93 (8)
Control ^b	5.53 $\pm$ 0.62 (8)	5.22 $\pm$ 0.29 (9)	82.9 $\pm$ 4.60 (9)
Fasting ^b	2.33 $\pm$ 0.26 (9) ^c	4.92 $\pm$ 0.15 (9) ^d	90.1 $\pm$ 5.17 (8)
2. Control	4.75 $\pm$ 0.39 (9)	5.91 $\pm$ 0.20 (10)	83.6 $\pm$ 4.84 (9)
Fasting	2.89 $\pm$ 0.39 (10) ^d	5.18 $\pm$ 0.23 (10) ^a	86.2 $\pm$ 5.35 (10)
3. Control	4.62 $\pm$ 0.27 (11)	5.16 $\pm$ 0.16 (11)	—
Cachectic	1.40 $\pm$ 0.15 (10) ^c	4.45 $\pm$ 0.12 (10) ^d	—
'Fraction B' of extracts			
1. Placebo ^a	3.12 $\pm$ 0.27 (8)	5.76 $\pm$ 0.22 (8)	96.7 $\pm$ 5.40 (8)
Control	3.28 $\pm$ 0.54 (7)	5.62 $\pm$ 0.15 (7)	99.9 $\pm$ 5.97 (7)
2. Control	5.07 $\pm$ 0.44 (8)	5.55 $\pm$ 0.18 (12)	84.0 $\pm$ 7.27 (9)
Fasting	1.87 $\pm$ 0.27 (16) ^c	5.43 $\pm$ 0.09 (20)	92.8 $\pm$ 4.30 (18)
3. Control	5.25 $\pm$ 0.21 (10)	6.41 $\pm$ 0.43 (10)	72.0 $\pm$ 4.14 (10)
Cachectic	3.15 $\pm$ 0.24 (8) ^c	4.81 $\pm$ 0.19 (8) ^d	81.1 $\pm$ 3.95 (8)

^a The same volume of solvent (0.5% Na₂CO₃ neutralized before injection). ^b Without adsorption on carboxymethylcellulose. ^c Statistically significant for $P < 0.001$; ^d for $P < 0.01$; * for $P < 0.05$.

than oxycellulose was used for adsorption in the final stage. A part of each extract was further fractionated on Sephadex G-25 in 0.1N aqueous ammonia; the 'Fraction B' referred to below was obtained from the pooled eluates containing material with distribution coefficients K_d , between about 0.05 and 0.25. The extracts and fractions were tested by subcutaneous injection into mice (H strain) in doses corresponding to 50–100 ml of the original urine; after 6 h the mice were exsanguinated and the blood sugar⁶ and ketone bodies⁷ as well as the liver fat content were determined.

The results collected in the Table show that the urine extracts from the fasting and cachectic groups, and the 'Fraction B' of such extracts, caused a marked drop in the ketone body blood level. In most cases this was accompanied by a significant decrease in liver fat and a slight, statistically not significant but nevertheless consistently repeated, increase in the blood sugar. These changes did not take place when the corresponding extracts, or their fractions, from the control groups on normal diet were given. It should be noted that in some experiments the inhibitory effect could be demonstrated in urine extracts even without adsorption on carboxymethylcellulose.

As an additional criterion, the *in vitro* release of fatty acids from rat epididymal fat pads was studied. Addition of the extracts of fractions active *in vivo* to the medium (0.5–1.0 mg per ml of Krebs–Ringer phosphate with 3% albumin, pH 7.4) caused a significant decrease, by 30–70%, of the release of free fatty acids, both in the presence of glucose (100–150 mg%) and its absence.

The results indicate that the urine of fasting or cachectic humans contains a mixture of substances with antagonistic effects on these parameters of lipid metabolism. In addition to a fraction of relatively low molecular weight with lipid mobilizing activity, we have found a fraction of

higher molecular weight showing the opposite effect on lipid metabolism. The presence of this latter factor may be one of the reasons for the poor reproducibility of attempts to isolate the lipid mobilizing factor from the urine of diabetic⁸ or fasting individuals. The physiological significance and chemical nature of these factors is being further examined.

Zusammenfassung. Ein im Urin hungernder oder kachektischer Personen vorhandener Faktor, führt bei Mäusen nach s.c. Injektion im Blut zur Senkung des Ketonkörperspiegels. Der Leberfettgehalt wird herabgesetzt und eine schwache, jedoch regelmässig auftretende Erhöhung des Blutzuckerspiegels herbeigeführt. Bei der Ratte hemmt der Faktor *in vitro* die Freisetzung von Fettsäuren aus dem epididymalen Fettgewebe. Er beeinflusst möglicherweise den im Harn hungernder Menschen vorhandenen 'lipid mobilizing factor' antagonistisch.

T. BRAUN, P. FÁBRY,
R. PETRÁSEK, and J. RUDINGER

Physiological Department of the Institute of Human Nutrition, Prague, and Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czechoslovak Academy of Science, Prague (Czechoslovakia), December 28, 1963.

⁵ P. FLODIN, *Dextran Gels and their Applications in Gel Filtration* (Pharmacia, Uppsala 1962), p. 35.

⁶ H. FRANK and E. KIRBERGER, *Biochem. Z.* 320, 359 (1950).

⁷ S. P. BESSMAN and M. ANDERSON, *Fed. Proc.* 16, 154 (1957).

⁸ K. J. ANSELMINO and F. HOFFMANN, *Endokrinologie* 17, 1 (1936).

Über die Wirkung von synthetischem ACTH (β^{1-24} Corticotropin) beim Menschen

Das von KAPPELER und SCHWYZER¹ synthetisierte β^{1-24} Corticotropin (CIBA 30920-Ba) besteht aus einer Kette von 24 Aminosäuren, die in gleicher Reihenfolge wie die ersten 24 Aminosäuren des natürlichen Cortico-

tropins (mit 39 Aminosäuren) angeordnet sind². Es ist bekannt, dass die Struktur des natürlichen Corticotropins nicht bei allen Tierarten gleich ist. Die Unterschiede bestehen in der Zusammensetzung und Anordnung der 25.

¹ H. KAPPELER und R. SCHWYZER, *Helv. chim. Acta* 44, 1136 (1961).

² P. H. BELL, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 5565 (1954).

bis 33. Aminosäure. Man kann deshalb vermuten, dass die biologische Aktivität von ACTH in erster Linie an die Reihenfolge der ersten 24 Aminosäuren gebunden ist. Für diese Annahme sprechen auch die Resultate, die von FORSHAM und LI mit einem synthetischen Nonadecapeptid³ sowie von HOFMANN⁴ mit einem Polypeptid der ersten 23 Aminosäuren erhalten wurden. Diese beiden Polypeptide zeigten im biologischen Versuch ACTH-Aktivität.

β^{1-24} Corticotropin (CIBA 30920-Ba) ist das längste synthetische Polypeptid. Es ist im Tierversuch *in vivo* (Sayers-Test) und *in vitro* (Saffran-Schally-Test) sehr wirksam. Nach subkutaner Verabreichung wurde im Sayers-Test eine Aktivität von 106 IE/mg gefunden⁵.

Methoden. Bei unseren Versuchen über die adrenocorticotrope Wirkung des synthetischen Polypeptides am Menschen wurde die Substanz einheitlich in einer 8 h laufenden Infusion von 1000 ml 5%-Glukose von 8–16 Uhr intravenös verabreicht. Vor Beginn der Infusion sowie nach 4 und 8 h wurden je 15 ml Blut entnommen. Die Bestimmung der freien 17-Hydroxycorticoide im Plasma erfolgte nach PETERSON⁶. Der Urin wurde sowohl am Tage vor der Infusion als auch am Tag der Infusion von 8 Uhr an während je 24 h gesammelt. Die Bestimmung der Total-17-Hydroxycorticoide im Urin erfolgte nach LIDDLE und PETERSON⁷. Bei den Versuchspersonen handelte es sich um endokrin gesunde Rekonvaleszenten.

Resultate. Die gewählte Versuchsanordnung erlaubt, die adrenocorticotrope Wirkung einer Substanz am Menschen zu beurteilen. Der Anstieg der freien 17-Hydroxycorticoide im Plasma nach ACTH wird besser nach 4 h als nach 8 h bestimmt, weil die Konjugation der freien Corticosteroide dann noch nicht sehr fortgeschritten ist. In Figur 1 ist die Zunahme der freien 17-Hydroxycorticoide 4 h nach β^{1-24} Corticotropin-Infusion wiedergegeben. Mit 1,5 E in 4 h ist gerade noch ein geringer Anstieg der freien 17-Hydroxycorticoide festzustellen. Bei Steigerung der Dosis von 6 auf 12,5 Einheiten ist kaum mehr eine weitere Zunahme der Plasmasteroide nachzuweisen. Bei der Bestimmung der 17-Hydroxycorticoide im Urin werden die freien und die an Glukuronsäure gebundenen Steroide gemessen. In Figur 2 sind die bei der gleichen Versuchsperson gewonnenen Ergebnisse dargestellt. Es geht daraus hervor, dass die Zunahme der Ausscheidung der 17-Hydroxycorticoide nach β^{1-24} Corticotropin in direkter Beziehung zur Dosis steht. Die Resultate der bisherigen Versuche mit 8stündiger Infusion und Bestimmung der Aus-

scheidung der 17-Hydroxycorticoide, welche in Figur 3 aufgezeichnet sind, lassen eine lineare Beziehung zur logarithmischen Dosis erkennen.

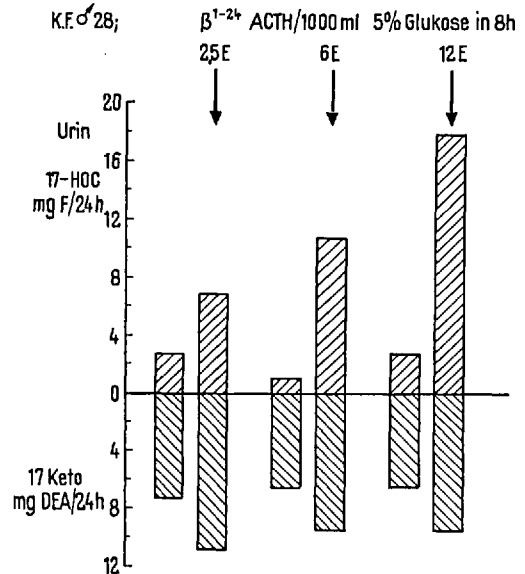


Fig. 2. Ausscheidung der Corticosteroide im 24-h-Urin nach 8stündiger β^{1-24} ACTH-Infusion bei einer Versuchsperson.

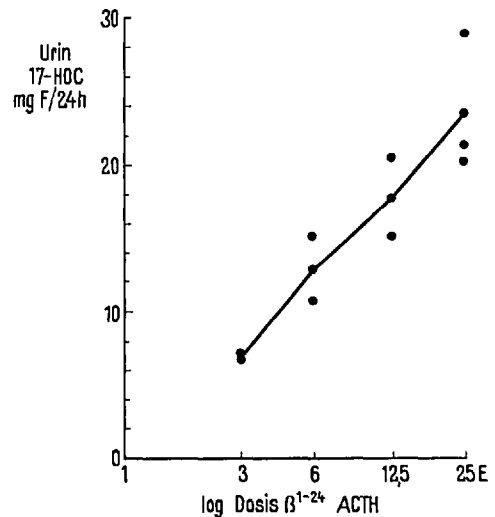


Fig. 3. Dosiswirkungskurve der Ausscheidung der 17-Hydroxycorticoide im Urin nach 8stündiger β^{1-24} ACTH-Infusion.

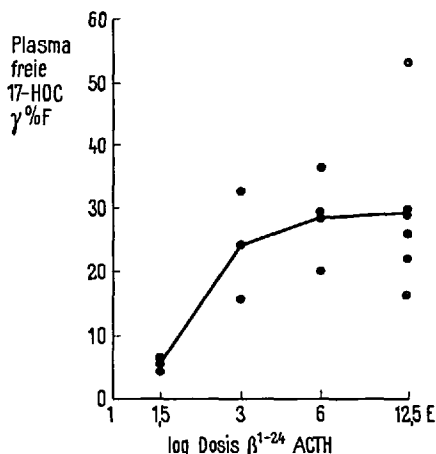


Fig. 1. Zunahme der freien 17-Hydroxycorticoide im Plasma gegenüber dem Ausgangswert nach 4stündiger β^{1-24} ACTH-Infusion.

³ P. H. FORSHAM, V. C. DIRAIMONDO, E. G. BIGLIERI und CH. H. LI, *Metabolism* 10, 335 (1961).

⁴ A. E. AXELROD, A. C. TRAKATELLIS und K. HOFMANN, *Nature* 197, 146 (1963).

⁵ Die Versuchsmengen des synthetischen Corticotropins wurden uns in verdankenswerter Weise von der CIBA AG, Basel, zur Verfügung gestellt.

⁶ R. E. PETERSON, A. KARRER und S. L. GUERRA, *Analyt. Chem.* 29, 144 (1957).

⁷ G. W. LIDDLE, J. E. RICHARD und R. E. PETERSON, *Endocrinology* 57, 594 (1955).

Die ersten vergleichenden Untersuchungen zwischen synthetischem und dem verwendeten natürlichem ACTH-Präparat (Cortrophin Organon) sprechen dafür, dass sie bezüglich Wirkungseintritt und Wirkungsmaximum sich wahrscheinlich voneinander unterscheiden. Die Zunahme der Ausscheidung der 17-Hydroxycorticoide im Urin setzt mit dem synthetischen Corticotropin schneller ein, hält aber nach Ende der Infusion weniger lange an.

Ausscheidung der 17-Hydroxycorticoide im Urin nach 8stündiger Infusion von 12,5 Einheiten ACTH während der ersten Urinsammelperiode von 8–16 h bei einer 53jährigen Patientin

	8–16	16–24	0–8	Total 24 h
β^1 - 24 Corticotropin	12,5	3,3	5,2	21,0 mg
Cortrophin	8,1	7,1	23,6	38,8 mg

Es ist denkbar, dass der Abbau des kürzeren synthetischen Polypeptides schneller einsetzt als derjenige der längeren Polypeptidkette des natürlichen Hormons. Das β^1 - 24 Corticotropin hätte nach intravenöser Verabreichung demnach eine kürzere biologische Halbwertszeit.

Summary. Synthetic β^1 - 24 Corticotropin (CIBA 30920-Ba) administered intravenously over 8 h to humans produced a significant rise in free plasma 17-hydroxycorticoids, urinary 17-hydroxycorticoids and 17-ketosteroids. The logarithmic dose response curve of the urinary 17-hydroxycorticoids was linear from 3 to 25 units. The comparison of the steroidogenic effect of the synthetic and natural ACTH (Cortrophin) revealed a more rapid but less sustained activity of the synthetic product.

A. WALSER und F. KOLLER

Medizinische Universitätsklinik Basel (Schweiz),
30. April 1963.

DISPUTANDUM

The Free Amino Acid Pattern in Tadpole Tails

While studying the marked increase of cathepsin in regressing tadpole's tail (*Xenopus laevis*), WEBER¹ pointed out that nothing definite was known about the factor controlling catheptic activity. (This increase in catheptic action means the release of lysosomal enzymes. BRACHET² attempted to generalize this phenomenon in order to explain the regression of Muellierian ducts in chick embryo and of the tails of tadpoles, suffering metamorphosis.) However, WEBER noticed that paper chromatography of methanol extracts of tails altered remarkably during the regressing stage. More recently DEUCHAR³ detected a considerable increase in catheptic activity in chick embryo following treatment with an amino acid (leucine) analogue. Further, DINGLE⁴ and FELL et al.⁵ have shown that vitamin A releases protease from lysosomes and WEISSMAN⁶ has detected regression of tadpole's tail due to hypervitaminosis. Similarly, BHATTACHARYA⁷ and BHATTACHARYA and MEDDA⁸ detected a role of vitamin B₁₂ in the metamorphosis of tadpoles. Now, amino acids may be involved in vitamin production, e.g. biosynthesis of vitamin A might utilize a pool of leucine through the intermediary of some isoprene like precursor⁹. Again, GOODWIN and McEVoy¹⁰ found certain amino acids to inhibit riboflavin biosynthesis.

Thus, amino acids may play a role in the rupture of lysosomes, either directly, as the findings of WEBER or DEUCHAR might suggest, or indirectly, by being involved in vitamin production. With this in view, I repeated WEBER's work with a local anuran species, *Bufo melanostictus*.

Instead of using methanol extracts of tails, I used the classic method of HADORN and MITCHELL¹¹, namely to crush the tissue directly on whatman paper No. 1. The usefulness of this method has been emphasized by BUZZATI-TRAVERSO¹² who pointed out, on the basis of a remarkable investigation by CHEN and BALTZER¹³, that direct crushing gives a more correct picture. I have also found¹⁴ that in case of snails, amino acids are lost in the process of extraction.

In most cases I have tried (insects, snails, seeds, plants), the resolution following direct crushing was poor or absolutely nil (i.e. one long streak). Fortunately, there was quite a good resolution of ninhydrin positive spots on whatman paper No. 1 after direct crushing of tadpole tails and developing with the solvent, n-Butanol: acetic acid: water, 4:1:1. Therefore, in the case of tadpole tails, one dimensional chromatograms could conveniently be used.

On the basis of the results obtained, it is very clear that, unlike WEBER's case, there is practically no change in the pattern of free amino acids in regressing tails of *Bufo melanostictus*. It is interesting that in the first set of experiments there were four spots in the chromatograms developed from non-regressing tails, but two of them grew very faint in case of regressing tadpoles. However, as all these tadpoles were either given no food at all or fed very sparingly, the experiment was repeated with tadpoles freshly caught from a big pond. A large number of spots were now detected in the chromatogram, though the resolution was no longer so good. A number of chromatograms was developed after crushing on the same paper a

¹ R. Weber, *Exper.* 13, 153 (1957).

² J. BRACHET, *The Biochemistry of Development* (Pergamon, 1960).

³ E. M. DEUCHAR, *Develop. Biol.* 2, 129 (1962).

⁴ J. T. DINGLE, *Biochem. J.* 79, 509 (1961).

⁵ M. B. FELL et al., *Biochem. J.* 83, 64 (1962).

⁶ G. WEISSMAN, *J. expt. Med.* 114, 581 (1961).

⁷ G. C. BHATTACHARYA, *Science and Culture* 19, 571 (1954).

⁸ G. C. BHATTACHARYA and A. K. MEDDA, *Science and Culture* 23, 380 (1958).

⁹ S. KIT, in *Fundamental Aspects of Normal and Malignant Growth* (Ed. Nowinski, Elsevier 1960).

¹⁰ T. W. GOODWIN and D. McEVoy, *Biochem. J.* 71, 742 (1959).

¹¹ E. HADORN and M. K. MITCHELL, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 37, 650 (1951).

¹² A. A. BUZZATI-TRAVERSO, in *New Approaches in Cell Biology* (Ed. Walker, Academic Press, 1960), p. 95.

¹³ P. S. CHEN and F. BALTZER, *Nature* 181, 98 (1958).

¹⁴ R. L. BRAHMACHARYA and A. BHATTACHARYA, *Exper.* 19, 143 (1963).