

physiological formation of estrone-type substances is still obscure. Nevertheless, the ability of mammalian tissue to introduce oxygen at C<sub>(10)</sub>, described here, would tend to support the idea that removal of the angular group as a one-carbon fragment in the course of ring A aromatization is a possible pathway. Biochemical experiments to prove or disprove this hypothesis are now being initiated in our laboratory. In this connection it might also be recalled that estrone itself has been isolated from bovine adrenal extracts<sup>1</sup>. From structural considerations, the *in vitro* biohydroxylation of an angular methyl group, first demonstrated here, is unlikely to be preceded by dehydrogenation to an olefine since this would imply fission and re-formation of a C-C-linkage. The 11-β-hydroxylation of A<sup>4</sup>-pregnene-17-α, 21-diol-3, 20-dione by a similar adrenal preparation does also not involve an olefinic intermediate with the subsequent addition of one mole of water; this has recently been shown by the use of deuterium oxide<sup>2</sup>. Whether these hydroxylations are effected as substitution reactions or a more complex oxidative sequence by way of either an ionic or a radical mechanism is still a matter of speculation.

The author is indebted for assistance in certain phases of the work to MARJORIE C. LINDBERG and PAUL SKOGSTROM. The investigation was supported by a grant of G. D. SEARLE and Company, Chicago, Illinois.

A. S. MEYER

*Worcester Foundation for Experimental Biology,  
Shrewsbury, Mass., January 2, 1955.*

#### Zusammenfassung

Die Aufklärung der Struktur von 19-Oxy-A<sup>4</sup>-androst-3,17-dion (VI), einer Substanz, isoliert nach Inkubation von A<sup>4</sup>-Androsten-3,17-dion und von Dehydroepiandrosteron mit einem Rinder-Nebennieren-Homogenat, ist beschrieben. Dies ist unseres Wissens die erste Beobachtung der Hydroxylierung *in vitro* einer angulären Methylgruppe eines Steroids. Mehrere Folgerungen sind erörtert.

<sup>1</sup> D. BEALL, J. Endocr. 2, 81 (1940).

<sup>2</sup> M. HAYANO and R. I. DORFMAN, J. Biol. Chem. 211, 227 (1954).

#### Sul comportamento della sostanza fondamentale in membrane connettivali di ratto albino durante il passaggio di una soluzione salina

È noto che la diffusione di una soluzione acquosa nel derma è influenzata dalla presenza in esso di mucopolisaccaridi e dal loro grado di polimerizzazione (CHAIN e DUTHIE<sup>1</sup>, DURAN-REYNALS<sup>2</sup>, FAVILLI<sup>3</sup>). In un suo recente lavoro, DAY<sup>4</sup> ha provato che la velocità di passaggio di soluzione fisiologica attraverso membrane di connettivo sottocutaneo di topo albino aumenta grandemente sotto l'azione della jaluronidasi. Egli conclude pertanto che la sostanza interfibrillare può essere considerata come costituita da una microstruttura proteica, relativamente impermeabilizzata, in condizioni normali, da acido jaluronico.

La presente nota espone i risultati di ricerche eseguite per definire ulteriormente le particolarità del passaggio di una soluzione salina attraverso membrane

connettivali, e per accettare se è possibile ottenere serie di valori relativamente omogenei, tali da permettere uno studio di eventuali modificazioni patologiche del connettivo anche sotto questo punto di vista e con questa tecnica, che presenta il vantaggio di poter essere seguita *in vitro*, al riparo da possibili interferenze di fattori estranei (regime del circolo locale, od altri).

La tecnica è quella proposta da DAY<sup>1</sup>. Le membrane, prelevate dal fianco degli animali, erano fissate a mezzo di un anello elastico piuttosto alto ad un estremo di un tubo immerso in un beaker contenente NaCl 9% in H<sub>2</sub>O distillata e riempito della stessa soluzione fino ad una altezza di cm 4 sopra il livello del liquido nel beaker. Si cronometrava il tempo impiegato dal menisco della soluzione nel tubo a scendere fra due traguardi posti a mm 3 l'uno dall'altro; il volume della porzione di cilindro compresa fra questi due traguardi era pari a mm<sup>3</sup> 71,2. Si è curato di mantenere costante la temperatura, operando in termostato: generalmente sono state usate temperature tra 32° e 34°C.

Come anche DAY riconosce, non è possibile ottenere serie di membrane di spessore omogeneo; si che i tempi di passaggio della soluzione clorurosodica variano grandemente tra loro, anche quando si confrontino membrane provenienti dallo stesso animale. Si poteva tuttavia pensare, supponendo che nel normale sia contenuta entro limiti non troppo larghi la quantità di mucopolisaccaridi presenti, che fossero confrontabili i valori, ottenuti da vari individui, del rapporto tra tempo di passaggio della soluzione salina e tempo di passaggio della stessa soluzione addizionata di jaluronidasi (S/J). È stata usata in queste ricerche jaluronidasi liofilizzata da testicolo di toro (Kinetin, della casa Schering di Berlino), in quantità di 4 U.R.V. Schering per ml. In numerose prove eseguite i valori di tale rapporto, in ratti normali giovani di peso tra 30 e 125 g, hanno variato essenzialmente fra 6 e 18. Si è inoltre potuto osservare, usando successivamente membrane provenienti dallo stesso ratto, che, se i tempi di passaggio della soluzione clorurosodica (S) così come quelli della soluzione clorurosodica più jaluronidasi (J) possono singolarmente presi differire moltissimo da una membrana all'altra, i rapporti S/J sono generalmente simili; il che porta a supporre che la quota di mucopolisaccaridi nel connettivo sottocutaneo di uno stesso animale sia sensibilmente del medesimo ordine di grandezza per le regioni prese in esame (vedi tabella).

Valori, in secondi, dei tempi di deflusso di soluzione clorurosodica 0,9% e della stessa + jaluronidasi, e rapporti tra questi due valori per copie di membrane connettivali provenienti dal medesimo animale

Ratti e relativo peso	Tempo di deflusso della soluzione salina (S), in secondi	Tempo di deflusso della soluzione con enzima (J), in s	Rapporto S/J
1) ♀ g 30	226 1294	14,8 72	15 18
2) ♀ g 75	113 217	14 31	8,1 7
3) ♀ g 83	668 93	40 5,8	16,7 16
4) ♀ g 125	95 66	8 4,4	11,9 15
5) ♂ g 110	95 99	14,6 17	6,5 5,8
6) ♂ g 33	86,8 54	12,2 9	7,1 6

<sup>1</sup> T. D. DAY, J. Physiol. 117, 1 (1952).

<sup>1</sup> E. CHAIN e E. S. DUTHIE, Brit. J. exp. Path. 21, 324 (1940).  
<sup>2</sup> F. DURAN-REYNALS, Bact. Rev. 6, 197 (1942).  
<sup>3</sup> G. FAVILLI, Fenomeni di diffusione nei tessuti nel loro aspetto fisiologico e patologico (I.T.E.R. ed., Torino 1941).

<sup>4</sup> T. D. DAY, J. Physiol. 117, 1 (1952).

Per le concentrazioni di fermento usate, largamente in eccesso rispetto al substrato, la diminuzione del tempo di deflusso dopo aggiunta di jaluronidasi raggiunge pressocchè immediatamente il suo valore massimo.

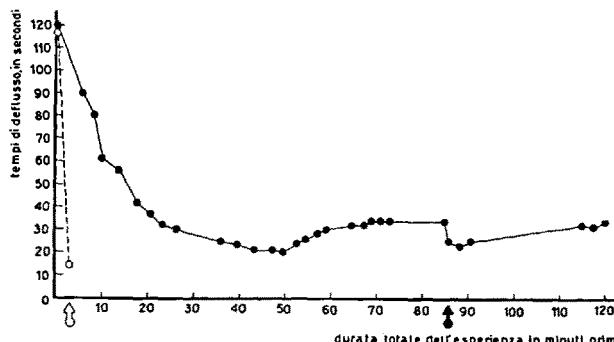


Figura 1. La linea tratteggiata con cerchi vuoti rappresenta una prova eseguita sottoponendo una membrana all'azione della jaluronidasi (freccia vuota su cerchio vuoto) dopo un solo passaggio del menisco tra i due traguardi. La linea continua con cerchi pieni rappresenta una prova eseguita facendo defluire a lungo attraverso una membrana soluzione clorurosodica; alla freccia piena su cerchio pieno fu aggiunta jaluronidasi.

Per avere indicazioni sulla natura del mucopolisaccaride, è stata usata in alcune prove jaluronidasi da veleno di *Bothrops jararaca* (1/500 in soluzione clorurosodica 9 %) che, come è noto (REGGIANINI<sup>1</sup>), a differenza di quella testicolare non è attiva sull'acido condroitinsolforico. La diminuzione del tempo di deflusso è stata anche in queste prove immediata e dello stesso ordine di grandezza; inoltre, aggiungendo dopo l'azione del veleno di *Bothrops jaluronidasi* testicolare, non si è avuto alcun ulteriore aumento della velocità di passaggio del liquido attraverso la membrana. La stessa cosa si è avverata facendo agire prima jaluronidasi testicolare e poi jaluronidasi da *Bothrops*.

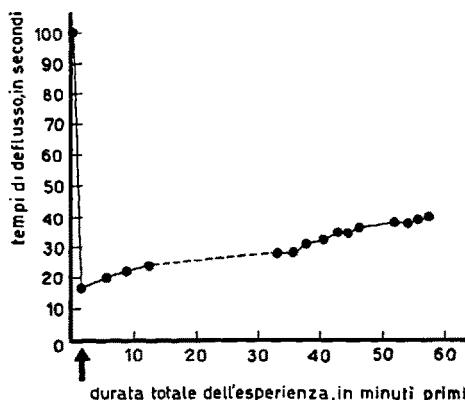


Figura 2. Aumento dei tempi di deflusso dopo il raggiungimento del tempo minimo. Alla freccia (secondo passaggio del menisco fra i due traguardi) fu aggiunta jaluronidasi. Dove la linea è tratteggiata il livello del liquido nel tubo fu lasciato cadere.

Si è d'altra parte osservato che, perfondendo la membrana in continuità con soluzione salina, il tempo di passaggio diminuisce progressivamente, fino al punto che la jaluronidasi sembra non esercitare più alcuna azione (v. fig. 1).

Sipuò quindi pensare che il mucopolisaccaride sia almeno in massima parte asportabile anche per una debole azione meccanica, oltre che di solubilizzazione, quale quella del liquido che fluisce dal tubo; si che il fermento non può

più agire per carenza del substrato. Inoltre in varie esperienze, eseguite sia con la sola perfusione della soluzione salina, sia con l'intervento dell'azione enzimatica, è stato notato che i tempi di passaggio, dopo aver raggiunto un valore minimo, tendevano lentamente ma progressivamente ad aumentare. Tale fenomeno, seppur non del tutto costantemente, si è presentato con notevole frequenza; l'aumento è stato sensibile, fino a raddoppiamento, in alcuni casi, del valore del tempo più breve nello spazio di poco meno di un'ora (v. fig. 2). In conclusione mi sembra di poter affermare che:

1. Nel connettivo sottocutaneo del ratto è contenuto un mucopolisaccaride, verosimilmente acido jaluronico, alla cui presenza è dovuta in gran parte la scarsa permeabilità della membrana alle soluzioni acquose. È possibile, tenendo presente che la quantità di tale sostanza probabilmente non è molta (BENASSI e PRODI<sup>1</sup>) e che si tratta di materiale grandemente idratabile, che la sua funzione di ostacolo sia prevalentemente dovuta alla relativa immobilizzazione delle molecole di acqua nelle sue vicinanze.

2. Nel ratto giovane normale il rapporto tra tempo di passaggio di soluzione clorurosodica al 9 % e tempo di passaggio della stessa soluzione addizionata di jaluronidasi oscilla, per il sottocutaneo del fianco e nelle condizioni dette, tra 6 e 18. Valori al di sotto o al di sopra di questi sono, se ottenuti nelle stesse condizioni, da ritenersi con ogni probabilità dovuti ad un contenuto anormale di acido jaluronico.

3. L'acido jaluronico, nella sostanza fondamentale di questo connettivo, è trattenuto da qualche altra struttura molecolare, ma non così saldamente da non essere gradatamente asportabile ad opera del semplice passaggio di liquido attraverso il tessuto; il che porta a pensare che il suo legame con una eventuale proteina sia molto labile.

4. L'aumento dei tempi di deflusso al di sopra del valore minimo raggiunto può far pensare che qualche substrato (proteina? altro mucopolisaccaride?) una volta asportato il mezzo impermeabilizzante costituito dall'acido jaluronico venga ad idratarsi a sua volta, restringendo in tal modo nuovamente gli interstizi lasciati liberi ed esercitando una più debole azione di rallentamento sulle molecole dell'acqua durante il loro tragitto attraverso la membrana.

Ho il piacere di ringraziare la Signorina ANNA M. GARAU, allieva interna dell'Istituto, per la valida collaborazione e la preziosa assistenza tecnica.

G. BENASSI

Istituto di Patologia Generale dell'Università di Bologna, il 28 luglio 1954.

#### Summary

The author has studied some details of the passage of saline through connective membranes of normal albino young rats. A mucopolysaccharide is present in such membranes which can be removed soon after addition of hyaluronidase and, at a much slower rate, by the mere passage of fluids through the tissue. Such mucopolysaccharide, most likely hyaluronic acid, seems to be present in quantities not too different from one membrane to another and it appears to be bound to some other tissue microstructure by means of rather loose chemical bonds. Once the mucopolysaccharide removed, the hydration of some other substrate probably takes place, thus causing the free interstices to get narrower with consequent decrease in the flowing velocity of the saline.

<sup>1</sup> G. BENASSI e G. PRODI, Giorn. di Biochimica 2, 424 (1953).

<sup>1</sup> O. REGGIANINI, Boll. Ist. Sieroter. Milanese 29, 456 (1950).