

## Der Einbau von $^{35}\text{S}$ in die Kostalknorpel von Meerschweinchen unter Einfluss verschiedener Glucocorticoide

Von LAYTON<sup>1,2</sup> wurde erstmals mittels radioaktiv markiertem Natriumsulfat untersucht, ob Cortison die Chondroitinsulfat-Synthese zu beeinflussen vermag. Das Mucopolysaccharid Chondroitinsulfat ist Hauptbestandteil von Knorpel- und Bindegewebe (Grundsubstanz und Kollagen) und spielt im Organismus eine vielseitige und wichtige Rolle. LAYTON<sup>1</sup> stellte bei cortisonbehandelten Ratten in der Grundsubstanz und im Kollagen der Haut einen geringeren  $^{35}\text{S}$ -Gehalt fest als bei normalen Kontrolltieren. Dieser Befund konnte später von BOSTRÖM und ODEBLAD<sup>3</sup> und von SCHILLER und DORFMAN<sup>4</sup> bestätigt werden. Außerdem fanden BOSTRÖM und ODEBLAD<sup>3</sup> im Kostalknorpel von Versuchsratten eine stark verminderte  $^{35}\text{S}$ -Einlagerung unter Cortisoneinfluss. Ergänzend beobachtete HUBLE<sup>5</sup> in den Röhrenknochen von Cortison-Kücken eine Hemmung der Chondrogenese, eine Ver schmälerung der Knorpelzone, eine verlangsamte Verknöcherung und insgesamt ein verzögertes Wachstum. Übereinstimmend konnte auch bei *in-vitro*-Versuchen mit Kalbs- oder Rattenknorpel ein verminderter  $^{35}\text{S}$ -Einbau in das Chondroitinsulfat bei Zugabe von Cortison festgestellt werden (BOSTRÖM und ODEBLAD<sup>3</sup>, CLARK und UMBREIT<sup>6</sup>). In früheren *in-vitro*-Versuchen von LAYTON<sup>2</sup> an Wundgewebe von Kücken liess sich sogar eine völlige Hemmung der Chondroitinsulfat-Synthese bei Zugabe von Cortisonazetat beobachten. In ähnlichen Versuchen mit Meerschweinchen-Wundgewebe trat nach KODICEK und LOEWI<sup>7</sup> mit Cortisonazetat keine Hemmung der Schwefelaufnahme auf, während mit Cortisonalkohol eine gewisse Förderung festzustellen war.

Zusammenfassend ergibt sich somit, dass das Glucocorticoid Cortison – abgesehen vom letzterwähnten *in-vitro*-Befund – die Chondroitinsulfatsynthese hemmt. Dies ist sowohl *in vivo* wie *in vitro* für verschiedene Gewebe, wie Knorpel, Haut, u. a., von den bisherigen Autoren übereinstimmend festgestellt worden.

Da Cortison im Organismus nicht oder doch nur in geringen Mengen gebildet wird, so schien es uns interessant,

vergleichsweise auch das natürliche Nebennierenrinden-Glucocorticoid, das Hydrocortison und das ihm nächstverwandte Prednisolon in bezug auf die Chondroitinsulfat-Synthese zu prüfen. Ferner sollten auch die in neuester Zeit synthetisierten und therapeutisch empfohlenen Corticoide, das  $6\alpha$ -Methyl-prednisolon und die beiden  $9\alpha$ -Fluor-derivate, das Triamcinolon und Dexamethason, in die Untersuchung einbezogen werden<sup>8</sup>. Der Schwefeleinbau in Knorpelgewebe unter Hydrocortison-Einfluss ist schon untersucht worden, während für die anderen der genannten Glucocorticoide noch keine entsprechenden Arbeiten vorliegen. CLARK und UMBREIT<sup>6</sup> stellten bei *in-vitro*-Versuchen an Rattenknorpel eine erhöhte Schwefelaufnahme unter Zugabe von Hydrocortison fest, während sich in den Vergleichsversuchen mit Cortison, wie schon erwähnt, eine gewisse Hemmung ergeben hatte. COLLINS und ANILANE<sup>10</sup> fanden in ihren jüngst durchgeführten *in-vivo*-Versuchen, dass der Einbau von  $^{35}\text{S}$  in die Kostalknorpel von Ratten durch Hydrocortison weder in förderndem, noch in hemmendem Sinne beeinflusst wird; die Knorpelsubstanz enthielt gleichviel markierten Schwefel wie jene der Kontrolltiere. Der Vollständigkeit wegen sei noch die Arbeit von SCHILLER und DORFMAN<sup>4</sup> angeführt; die Autoren prüften allerdings nicht den  $^{35}\text{S}$ -Einbau an sich, sondern die zeitliche Abnahme des  $^{35}\text{S}$ -Gehaltes in der Rattenhaut unter Hydrocortison-Einfluss. Sie fanden vom vierten Tage an einen etwas verlangsamten «turnover».

<sup>1</sup> L. L. LAYTON, Arch. Biochem. Biophys. 32, 224 (1951).

<sup>2</sup> L. L. LAYTON, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N.Y. 76, 596 (1951).

<sup>3</sup> H. BOSTRÖM und E. ODEBLAD, Ark. Kemi 6, 39 (1953).

<sup>4</sup> S. SCHILLER and A. DORFMAN, Endocrinology 60, 376 (1957).

<sup>5</sup> J. HUBLE, Acta endocr. 25, 59 (1957).

<sup>6</sup> I. CLARK and W. W. UMBREIT, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N.Y. 86, 558 (1954).

<sup>7</sup> E. KODICEK and G. LOEWI, Proc. R. Soc. [B] 144, 100 (1955).

<sup>8</sup> Für nähere Angaben über Chemie und Wirkungsweise der natürlichen und synthetischen in der Therapie gebräuchlichen Corticoid-Derivate sei auf die ausgezeichnete Übersicht von BEIGLBÖCK<sup>9</sup> verwiesen.

<sup>9</sup> W. BEIGLBÖCK, Wien. med. Wschr. 109, 585 (1959).

<sup>10</sup> E. J. COLLINS and J. ANILANE, Exper. 15, 116 (1959).

<sup>11</sup> K. BAILEY, Biochem. J. 31, 1396 (1937).

### Schwefeleinbau ( $^{35}\text{S}$ ) in die Kostalknorpel von Meerschweinchen, unter Einfluss von Corticosteroiden

Während 7 Tagen täglich Injektion bzw. Verfütterung von Corticosteroiden. Am 7. Tag intraperitoneal 1 ml trügerfrei  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  ( $2,3 \times 10^5$  cpm). Am 9. Tag Sektion

Verwendete Corticosteroide	Anzahl Versuchstiere	Injektion bzw. Verfütterung	Tägliche Dosis pro Tier	cpm/g Knorpel-trocken-gewicht	Statistische Sicherung: Unterschied gegenüber den Kontrolltieren
Kontrollen . . . . .	28	—	—	$1540 \pm 106$	—
Cortison (-azetat) . . . . .	13	subkutan (Suspension)	3,0 mg	$945 \pm 118$	gesichert $P > 0,01$ $\sigma = 425$
Cortone Merck					Kein Unterschied
Hydrocortison (-azetat) . . . . .	14	subkutan (Suspension)	2,0 mg	$1550 \pm 152$	$\sigma = 570$
Cortisol Organon					nicht gesichert
Prednisolon (Na-tetrahydro-phthalicum) Ultracorten H Ciba	16	subkutan (Lösung)	0,5 mg	$1710 \pm 220$	$P = 0,5$ $\sigma = 887$
$6\alpha$ -Methyl-Prednisolon . . . . .	10	oral (Tabletten)	0,5 mg	$810 \pm 94$	gesichert
Suprametil Geistlich					$P > 0,01$ $\sigma = 297$
$9\alpha$ -fluoro- $16\alpha$ -hydroxy-Prednisolon = Triamcinolon, Ledercort Lederle	10	oral (Tabletten)	0,5 mg	$1060 \pm 146$	gesichert
$9\alpha$ -fluoro- $16\alpha$ -methyl-Prednisolon = Dexamethason, Decadron Merck	10	subkutan (Lösung)	0,1 mg	$940 \pm 103$	$P = 0,01$ $\sigma = 460$
					gesichert $P > 0,01$ $\sigma = 325$

**Methode:** Im Laufe der Monate Juli–Dezember 1959 führten wir vier Versuchsreihen mit 250–350 g schweren, weiblichen Meerschweinchen durch. Abgesehen von den Kontrollen erhielten die Tiere während 7 Tagen einmal täglich die zu prüfenden Corticoide, entweder subkutan injiziert oder einzeln verfüttert. Die tägliche Menge war entsprechend den in der Humanmedizin gebräuchlichen Dosen abgestuft: zum Beispiel Hydrocortison  $1/3$  mal schwächer als Cortison, Prednisolon 6 mal schwächer, Dexamethason 30 mal schwächer usw. (vgl. Tab.). Am 7. Tag erhielten alle Tiere, inkl. die Kontrollen, zusätzlich 1 ml radioaktive, trägerfreie Natriumsulfat-Lösung ( $^{35}\text{S}$ ) intraperitoneal injiziert ( $2,3 \times 10^5 \text{ cpm}$ ). Zwei Tage danach erfolgte die Sektion. Insgesamt kamen 28 Kontrolltiere und 73 Corticoid-Tiere zur Untersuchung. Für jedes Tier wurden die präparierten Kostalknorpel einzeln weiter verarbeitet. Nach Aufschliessen des Knorpelmaterials mit der Methode nach BAILEY<sup>11</sup> und Zugabe von 0,25 ml normaler Natriumsulfat-Lösung als Trägersubstanz wurde der Gesamtschwefel durch Bariumchlorid gefällt. Die Radioaktivität (cpm) des Sulfatniederschlages wurde bestimmt, entsprechend aufgewertet (Halbwertszeit von  $^{35}\text{S} = 87$  Tage) und auf 1 g Knorpeltrockengewicht umgerechnet.

Obwohl in den vier Versuchen gleiche Bedingungen vorlagen, wiesen die Mittelwerte der 6–8 Kontrolltiere jeder Reihe doch gewisse Unterschiede auf. Um nun die cpm-Werte der Corticoid-Gruppen nicht nur innerhalb ihrer eigenen Versuchsreihen mit dem Kontroll-Mittelwert in Vergleich setzen zu können, war es nötig, die für die Kontrolltiere erhaltenen cpm-Werte auf den Mittelwert einer einzelnen Versuchsreihe umzurechnen und danach auch die Werte der einzelnen Corticoid-Gruppen mit dem entsprechenden Rechnungsfaktor zu multiplizieren, bzw. zu dividieren. In der Tabelle ist das so erhaltene Zahlenmaterial niedergelegt.

**Ergebnis:** Die sechs von uns geprüften Glucocorticoide können in ihrer Wirkung in zwei deutlich unterscheidbare Gruppen eingeteilt werden. Vier der Corticoide ergaben eine statistisch stark gesicherte Hemmung des  $^{35}\text{S}$ -Einbaus in den Kostalknorpel, während bei den beiden anderen der  $^{35}\text{S}$ -Gehalt des Knorpelmaterials mit jenem der Kontrolltiere übereinstimmte (Tabelle). Es sind dies das natürlicherweise im Organismus vorkommende Hydrocortison und das sich nur durch eine Doppelbindung zwischen C1 und C2 von diesem unterscheidende Prednisolon. Eine Erhöhung der Schwefelaufnahme unter Hydrocortison-Einfluss, wie dies von CLARK und UMBREIT<sup>6</sup> in ihren *in-vitro*-Versuchen beobachtet werden konnte, scheint im lebenden Tier nicht aufzutreten. Die vier hemmenden Glucocorticoide dagegen weisen im Vergleich zu Hydrocortison bestimmte chemische Veränderungen auf: Cortison C11-Ketogruppe, Methyl-prednisolon  $6\alpha$ -CH<sub>3</sub>-Gruppe, Triamcinolon  $9\alpha$ -Fluor- $16\alpha$ -OH-Gruppe, Dexamethason  $9\alpha$ -Fluor- $16\alpha$ -CH<sub>3</sub>-Gruppe.

RUTH LOTMAR

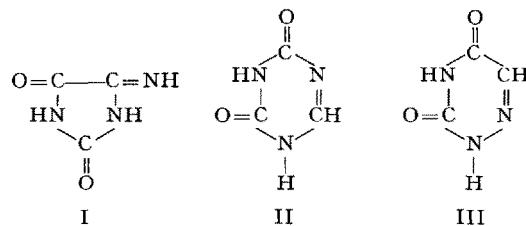
Rheumaklinik und Institut für Physikalische Therapie der Universität Zürich, 24. Februar 1960.

### Summary

The uptake of  $^{35}\text{S}$ , in the chondroitin sulfate of the costal cartilage of guinea pigs, is inhibited by cortisone, methyl-prednisolon, triamcinolon, and dexamethason. No inhibition could be seen under the influence of the natural adrenal hormone hydrocortisone and its nearest relation, prednisolon.

### Antagonism between 5-Azauracil and Pyrimidine Precursors of Ribonucleic Acids in *Escherichia coli*

5-Azauracil was known in the older literature under the name of allantoxaidine<sup>1–3</sup>, and was originally considered to be 2, 5-dioxo-4-imino-imidazolidine (I). The correct formulation of allantoxaidine structure, however, was arrived at later, and it was BRANDENBERGER and BRANDENBERGER<sup>4</sup>, CANELLAKIS and COHEN<sup>5</sup>, and most recently GUT *et al.*<sup>6</sup>, who showed that allantoxaidine is actually 2, 4-dioxo-1, 2, 3, 4-tetrahydro-1, 3, 5-triazine (II). The results presented in this communication confirm the last-named structure.



In analogy to 6-azauracil (III) allantoxaidine was later<sup>7</sup> named 5-azauracil.

Biological effects of 5-azauracil were studied by HAKALA, LAW, and WELCH, who found that 5-azauracil in the doses applied does not affect the growth of experimental lymphoma L 1210. On the other hand, ELION *et al.*<sup>8</sup> found that 5-azauracil acts as a powerful inhibitor of growth of adenocarcinoma 755, at non-toxic doses.

As far as the antibacterial effect of 5-azauracil is concerned, no data are available in the existing literature. Therefore, we attempted to study the inhibitory effect of 5-azauracil on the growth of *E. coli* B and devoted our attention to the antagonistic relation of 5-azauracil to a number of purine and pyrimidine components of nucleic acids.

**Experimental and Results.** The inhibition of growth of *E. coli* B, and the antagonism of 5-azauracil toward purine and pyrimidine derivatives, were studied in a synthetic medium containing glucose and inorganic salts<sup>9</sup>. The bacteria were grown in 10 ml of medium in test-tubes provided with Kapsenberg stoppers at 37°C for 15 h, analogously as in previous work<sup>9</sup>. The growth was estimated turbidimetrically at 575 m $\mu$ .

5-Azauracil used in the work described was prepared by a modification<sup>6</sup> of HARTMAN's method<sup>10</sup>.

<sup>1</sup> H. BILTZ and R. ROBL, Ber. deutsch. chem. Ges. 53, 1967 (1920).

<sup>2</sup> C. S. VENABLE, J. Amer. chem. Soc. 40, 1099 (1918).

<sup>3</sup> F. J. MOORE and R. M. THOMAS, J. Amer. chem. Soc. 40, 1120 (1918).

<sup>4</sup> H. BRANDENBERGER and R. H. BRANDENBERGER, Helv. chim. Acta 37, 2207 (1954).

<sup>5</sup> E. S. CANELLAKIS and P. P. COHEN, J. biol. Chem. 213, 379 (1955).

<sup>6</sup> J. GUT *et al.*, in press.

<sup>7</sup> M. T. HAKALA, L. W. LAW, and A. D. WELCH, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 2, 113 (1956).

<sup>8</sup> G. B. ELION, S. BIEBER, H. NATHAN, and G. H. HITCHINGS, Cancer Res. 18, 802 (1958).

<sup>9</sup> J. ŠKODA and F. ŠORM, Coll. czech. chem. Comm. 21, 1331 (1956).

<sup>10</sup> S. C. HARTMAN and J. FELLIG, J. Amer. chem. Soc. 77, 1051 (1955).

<sup>11</sup> F. ŠORM and J. ŠKODA, Coll. czech. chem. Comm. 21, 487 (1956).

<sup>12</sup> A. M. MOORE and J. B. BOYLEN, Arch. Biochem. Biophys. 54, 312 (1955).