

Table II. Fluorescence emission attributable to reduced pyridine nucleotide and acid secreted by 2 frog gastric mucosae

Time (min)	Fluorescence emission (relative intensity)	H <sup>+</sup> secreted ( $\mu$ Equiv.)	Fluorescence emission (relative intensity)	H <sup>+</sup> secreted ( $\mu$ Equiv.)
	(A)		(B)	
0	100		100	
5	95.6		97.8	
10	93.8	0.68	94.5	0.72
15	93.1		91.6	
20	92.6		90.3	
25	92	0.46	90.3	0.42
30	91.5		90.0	
35	90.8		89.8	
40	90.6	0.42	90.7	0.38
45	90.6		90.9	
50	90.6		91.4	
55	90.1	0.42	91.6	0.40
60	89.9		91.4	
65	89.4		91.4	
70	89	0.30	91.4	0.40
75	89		90.7	
80	88.5		90.5	
85	88	0.24	89.8	0.40
90	88		89.8	

in parallel with the amount of acid secreted. This may be seen from Table II, which gives the time course of the intensity of the fluorescence emission and the acid secreted by 2 mucosae.

These experiments demonstrate the possibility of studying the level of the total reduced pyridine nucleotide in intact gastric mucosa during the process of acid secretion. It would appear from the results that there is an association between the level of intracellular reduced pyridine nucleotide and the rate of acid secretion, as implied in the redox theory of CONWAY and BRADY<sup>1</sup>. This association deserves further investigation<sup>4</sup>.

**Zusammenfassung.** In Magenschleimhaut des Frosches wird das Nicotinamid-adenin-dinucleotid nur im oxydier-ten Zustand gefunden. Die Absonderung der Säure in der Schleimhaut scheint von der Konzentration des reduzierten Pyridinnucleotids abhängig zu sein.

W. H. BANNISTER

Department of Physiology, Royal University of Malta,  
Valletta (Malta), 30th March 1967.

<sup>4</sup> This work was supported by a grant from the Smith Kline and French Foundation.

## Die Wirkung von Progesteron und Progesteron-metaboliten auf das Wachstum von embryonalem Knorpel in vitro

Nach S. MUROTA und Mitarbeitern entstehen bei Zusatz von Cortisol zu embryonalem Knorpel in vitro 11 $\beta$ -Hydroxyandrosten-3,17-dion, 5 $\beta$ -Dihydrocortisol und 3 $\alpha$ -OH, 5 $\beta$ -Tetrahydrocortisol<sup>1</sup>. Diese Metaboliten zeigen die für Cortisol charakteristischen Wirkungen auf den embryonalen Knorpel nicht mehr<sup>2,3</sup>. MUROTA et al. fanden weiterhin, dass Knorpel Progesteron in 5 $\beta$ -Dihydroprogesteron, in 3 $\alpha$ -OH, 5 $\beta$ -Tetrahydroprogesteron und in 5 $\beta$ -Pregn-3 $\alpha$ , 20 $\beta$ -diol überführt; Angaben über die Wirkung dieser Metaboliten werden nicht gemacht<sup>4</sup>. Im Anschluss an Arbeiten über den Einfluss von Steroiden auf Zellen in vitro<sup>5</sup> fanden wir, dass Progesteron das organotypische Wachstum des Knorpels in vitro charakteristisch verändert. Wir untersuchten eine Reihe von Pregnen- und Pregn-3 $\alpha$ -Derivaten, darunter zum Teil auch die von MUROTA beschriebenen Progesteronmetaboliten.

**Methode.** Femur und Tibia von 7 Tage bebrüteten Hühnerembryonen wurden während 8 Tagen in Carrelflaschen gezüchtet. Pro Hinterextremität wurde je eine Carrelflasche verwendet. Das feste Nährmilieu bestand aus 1,5 ml 0,5% Agar in Medium 199 (Difco) und Geysscher Lösung 1:1, und aus 0,5 ml flüssigem Milieu, Medium 199 mit Zusatz von 0,138% NaHCO<sub>3</sub>. Die zu prüfenden Verbindungen wurden im flüssigen Milieu gelöst. Dieses wurde bei Versuch und Kontrolle nur einmal, nämlich am 4. Tag, erneuert. Am 8. Tag wurden die Konturen der Knorpel mit Hilfe eines Projektionsapparates gezeichnet und die Bilder ausgemessen. Nachher wurden die Knorpel nach kurzem Waschen mit Aqua

bidest. während 10 Tagen bei 80 °C getrocknet. Anschließend erfolgte die Wägung und Bestimmung des Stickstoffgehaltes nach KJELDAHL.

Es wurden 5 Embryonen pro Versuch ( $n$ ) verwendet. Für die Bestimmung der pharmakologischen Wirkung wurden die Summe der Längen- und Flächenmasse, das Total des Trockengewichtes und des Stickstoffgewichtes

<sup>1</sup> Den in der Arbeit aufgeführten Trivialnamen entsprechen folgende Verbindungen:

5 $\beta$ -Dihydroprogesteron	= 5 $\beta$ -Pregn-3,20-dion
5 $\alpha$ -Dihydroprogesteron	= 5 $\alpha$ -Pregn-3,20-dion
3 $\alpha$ -OH, 5 $\beta$ -Tetrahydroprogesteron	= 5 $\beta$ -Pregn-3 $\alpha$ -ol-20-on
3 $\beta$ -OH, 5 $\beta$ -Tetrahydroprogesteron	= 5 $\beta$ -Pregn-3 $\beta$ -ol-20-on
3 $\alpha$ -OH, 5 $\alpha$ -Tetrahydroprogesteron	= 5 $\alpha$ -Pregn-3 $\alpha$ -ol-20-on
3 $\beta$ -OH, 5 $\alpha$ -Tetrahydroprogesteron	= 5 $\alpha$ -Pregn-3 $\beta$ -ol-20-on
20 $\alpha$ -OH-Dihydroprogesteron	= $\Delta^4$ -Pregn-20 $\alpha$ -ol-3-on
20 $\beta$ -OH-Dihydroprogesteron	= $\Delta^4$ -Pregn-20 $\beta$ -ol-3-on
11 $\beta$ -Hydroxyprogesteron	= $\Delta^4$ -Pregn-11 $\beta$ -ol-3,20-dion
17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron	= $\Delta^4$ -Pregn-17 $\alpha$ -ol-3,20-dion
11 $\beta$ , 17 $\alpha$ -Dihydroxyprogesteron	= $\Delta^4$ -Pregn-11 $\beta$ , 17 $\alpha$ -diol-3,20-dion

<sup>2</sup> S. MUROTA, M. SHIKITA und B. TAMAOKI, Biochim. biophys. Acta 117, 424 (1966).

<sup>3</sup> S. MUROTA, H. ENDO und B. TAMAOKI, Biochim. biophys. Acta 136, 379 (1966).

<sup>4</sup> S. MUROTA und B. TAMAOKI, Biochim. biophys. Acta 137, 347 (1967).

<sup>5</sup> R. MEIER, F. GROSS, P. DESAULLES und B. SCHÄR, Bull. schweiz. Akad. med. Wiss. 8, 34 (1952). — R. MEIER, P. DESAULLES und B. SCHÄR, Verh. naturf. Ges. Basel 67, 447 (1956). — R. MEIER und B. SCHÄR, Pathologia Microbiol. 23, 344 (1960). — B. SCHÄR und R. MEIER, Experientia 16, 315 (1960). — B. SCHÄR und J. SCHMIDLIN, Eur. J. Steroids 7, 333 (1966).

Wirkung verschiedener Progesteronderivate auf das Wachstum von embryonalem Hühnerknorpel in vitro. Konzentration der geprüften Steroide 1,0  $\mu$ g/ml Nährmedium

	n	Länge <sup>a</sup>	Fläche <sup>a</sup>	Trocken- gewicht <sup>a</sup>	Stickstoff- gewicht <sup>a</sup>	Quotient Trockengewicht/Stickstoff- gewicht		
						Kontrolle	Versuch	P <sup>b</sup>
Progesteron	4	51 $\pm$ 0,5	39 $\pm$ 0,5	43 $\pm$ 1,9	53 $\pm$ 2,2	10,22 $\pm$ 0,09	8,50 $\pm$ 0,17	< 0,01
5 $\beta$ -Dihydroprogesteron	6	72 $\pm$ 1,4	63 $\pm$ 2,3	67 $\pm$ 2,3	76 $\pm$ 3,3	10,73 $\pm$ 0,15	9,32 $\pm$ 0,18	< 0,01
5 $\alpha$ -Dihydroprogesteron	4	101 $\pm$ 3,2	104 $\pm$ 3,2	111 $\pm$ 2,6	112 $\pm$ 3,2	9,82 $\pm$ 0,18	9,78 $\pm$ 0,16	
3 $\alpha$ -OH,5 $\beta$ -Tetrahydro- progesteron	4	66 $\pm$ 2,2	58 $\pm$ 3,4	61 $\pm$ 1,7	71 $\pm$ 1,5	11,26 $\pm$ 0,14	9,83 $\pm$ 0,08	< 0,01
3 $\beta$ -OH,5 $\beta$ -Tetrahydro- progesteron	4	90 $\pm$ 1,5	85 $\pm$ 2,7	85 $\pm$ 2,9	88 $\pm$ 2,2	11,32 $\pm$ 0,11	10,91 $\pm$ 0,18	
3 $\alpha$ -OH,5 $\alpha$ -Tetrahydro- progesteron	4	89 $\pm$ 3,9	90 $\pm$ 3,9	91 $\pm$ 6,1	94 $\pm$ 5,1	11,15 $\pm$ 0,34	10,86 $\pm$ 0,34	
3 $\beta$ -OH,5 $\alpha$ -Tetrahydro- progesteron	4	97 $\pm$ 1,0	98 $\pm$ 1,2	101 $\pm$ 1,7	98 $\pm$ 3,2	11,90 $\pm$ 0,17	12,20 $\pm$ 0,17	
20 $\beta$ -OH-Dihydroprogesteron	4	63 $\pm$ 3,4	54 $\pm$ 3,9	60 $\pm$ 4,3	68 $\pm$ 4,3	10,87 $\pm$ 0,17	9,73 $\pm$ 0,13	< 0,01
20 $\alpha$ -OH-Dihydroprogesteron	4	84 $\pm$ 1,0	83 $\pm$ 2,1	79 $\pm$ 1,7	77 $\pm$ 2,4	10,88 $\pm$ 0,15	11,04 $\pm$ 0,10	
11 $\beta$ -Hydroxyprogesteron	6	84 $\pm$ 0,8	79 $\pm$ 2,4	102 $\pm$ 3,4	108 $\pm$ 3,4	9,04 $\pm$ 0,21	8,51 $\pm$ 0,11	
17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron	4	95 $\pm$ 1,2	94 $\pm$ 1,9	96 $\pm$ 2,9	98 $\pm$ 3,1	11,41 $\pm$ 0,08	11,13 $\pm$ 0,16	
11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihydroxyprogesteron	4	81 $\pm$ 1,4	67 $\pm$ 1,7	90 $\pm$ 2,2	92 $\pm$ 1,2	9,04 $\pm$ 0,20	8,91 $\pm$ 0,20	

<sup>a</sup> Mittelwerte aus n-Versuchen  $\pm$  Standard-Abweichung des Mittelwertes. Die einzelnen Werte sind Prozentzahlen der entsprechenden Kontrolle. <sup>b</sup> Irrtumswahrscheinlichkeit beim Vergleich Versuch-Kontrolle.

herangezogen. Zum pharmakologischen Versuch dienten die Femur- und Tibia-Knorpel der einen Extremität, als Kontrolle die Knorpel der andern Extremität des gleichen Embryos.

**Resultate.** Wie aus der Tabelle hervorgeht, hemmt Progesteron das Knorpelwachstum, wobei das Gesamt-trockengewicht stärker herabgesetzt wird als der Stickstoffanteil; das Organ zeigt unter Progesteroneinfluss ein bindegewebeartiges, gelbliches Aussehen. Eine ähnliche Herabsetzung des Verhältnisses von Trockengewicht zu Stickstoffgehalt bewirken auch die Progesteronmetaboliten 5 $\beta$ -Dihydroprogesteron, 3 $\alpha$ -OH,5 $\beta$ -Tetrahydroprogesteron und das 20 $\beta$ -OH-Dihydroprogesteron.

11 $\beta$ -Hydroxyprogesteron bewirkt keine Verminderung des Trockengewichtes; eine leichte Vermehrung des Stickstoffgehalts ist vorhanden (Unterschied mit einem *P* von 0,04 gesichert). Bei Anwesenheit einer zusätzlichen Hydroxylgruppe in 17 $\alpha$ -Stellung kann auch diese geringe Vermehrung des Stickstoffgehalts nicht mehr beobachtet werden. Alle anderen erwähnten Progesteronderivate hemmen, wenn überhaupt, das Wachstum nur geringgradig, ohne den stickstoffhaltigen Anteil im Knorpel zu erhöhen.

**Diskussion.** Nach MUROTA et al.<sup>4</sup> bilden sich aus Cortisol, Progesteron und Testosteron im Knorpel Metaboliten, die in den Ringen A/B für alle 3 Beispiele gleichartig stereospezifisch reduziert sind. Sowohl die aus Cortisol entstehende 5 $\beta$ -Dihydro- als auch die 3 $\alpha$ -OH,5 $\beta$ -Tetrahydro-Verbindung erwiesen sich als nicht mehr cortisolartig wirksam. Entsprechende Progesteronmetaboliten verhalten sich somit verschieden: Sie sind an Knorpel in vitro progesteronähnlich, wogegen die in 5-Stellung und in 3- und 5-Stellung konfigurativ abweichenden Isomeren wirkungslos sind. Von den beiden in der Seitenkette reduzierten Verbindungen ist es nur das 20 $\beta$ -Hydroxy-Progesteron, welches eine signifikante relative Vermehrung des Stickstoffgehaltes bewirkt und damit proge-

steronartig ist. 11 $\beta$ -Hydroxylierung schwächt die progesteronartige Wirkung ab, 17 $\alpha$ -Hydroxylierung bringt sie ganz zum Verschwinden.

MUROTA et al. nehmen auf Grund ihrer Versuche an, dass der Knorpel in vitro zunächst die 5 $\beta$ -Dihydroverbindungen, daraus die 3 $\alpha$ -OH,5 $\beta$ -Tetrahydroverbindungen reduziert, worauf aus letzterem im Falle von Progesteron durch Seitenkettenreduktion das 5 $\beta$ -Pregnane-3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -diol entsteht<sup>4</sup>. Dieses Präparat stand uns nicht zur Verfügung.

Worin auch immer die direkte Wirkung von Steroidhormonen auf das Knorpelwachstum bestehen mag, so erscheint es uns bedeutsam, dass im Falle von Cortisol bereits die erste Reduktionsstufe zum unwirksamen oder in seiner Wirkung nicht mehr erfassbaren Steroid führt. Im Falle von Progesteron sind die ersten zwei am Knorpel fermentbedingt entstehenden, reduzierten Metaboliten, nicht aber ihre Stereoisomeren noch durchaus progesteronartig wirksam. Ob Progesteron erst nach vollständig durchgeführter Reduktion zu einem an Knorpel unwirksamen Steroid wird, müssen weitere Versuche abklären.

**Summary.** Embryonic chick bones were cultured in vitro in the presence of progesterone and of a series of progesterone metabolites. It was found that only 5 $\beta$ -pregnane-3,20-dione, 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -pregnane-20-one, and 4 $\alpha$ -pregnene-20 $\beta$ -ol-3-one influence the growth of bones in vitro in a manner similar to progesterone. All other investigated progesterone metabolites exert either a different or no demonstrable action on bone growth.

B. SCHÄR