

## 2-Br- $\alpha$ -Ergokryptin: Beeinflussung von Fertilität und Laktation bei der Ratte

Gewisse Mutterkornalkaloide wirken bei Rattenweibchen fertilitätshemmend, wenn sie in der Zeit zwischen Ovulation und Implantation parenteral appliziert werden<sup>1</sup>. Für Ergocornin bzw. Ergotoxin wurde qualitativ nachgewiesen, dass diese implantationshemmende Wirkung durch exogenes Progesteron<sup>2</sup> bzw. exogenes Prolactin (LTH)<sup>3</sup> aufgehoben werden kann. Dies führte zur Vorstellung, dass die antifertile Wirkung dieser Alkaloide auf einer Hemmung der LTH-Inkretion beruhe<sup>4</sup>. Überprüfung dieser Hypothese an laktierenden Ratten zeigte, dass Ergocornin auch vorübergehend die Laktation hemmt und dass diese Wirkung durch exogenes LTH aufgehoben werden kann<sup>4</sup>. Wir haben die quantitativen Verhältnisse von Implantations- und Laktationshemmung bei einem natürlichen Mutterkornalkaloid, dem  $\alpha$ -Ergokryptin, sowie bei einem in 2-Stellung halogenierten Derivat, dem 2-Br- $\alpha$ -Ergokryptin untersucht und verglichen.

Die Versuche wurden an einem hauseigenen Rattenstamm durchgeführt. Die Tiere wurden in Räumen gehalten, deren Temperatur ca. 22°C und die Tageslänge 14 h betrug; sie erhielten Wasser und Nafag-Futter ad libitum.

Zur Bestimmung der antifertilen Wirkung wurde folgende Methode verwendet:

Für die Dauer von 19 Tagen wurden 2 fertile Rattenweibchen (Kontroll- und Versuchstier) mit je einem erfahrenen Rattenbock in einem Käfig zusammengesetzt. Am 5., 10. und 15. Versuchstag erhielten die Weibchen das Prüfpräparat bzw. dessen Lösungsmittel s.c. injiziert. Bei der Autopsie am 19. Tag wurden die Uterushörner bei Lupenbetrachtung auf Implantationen und Resorptionen kontrolliert. Jede Dosisgruppe bestand aus 11 Versuchstieren und ebenso vielen Kontrollen. Für die Auswertung des Versuches wurde die Fertilität der Kontrolltiere gleich 100% gesetzt und die Abnahme der Fertilität der Versuchstiere in Prozent ausgedrückt. Diese Versuche wurden mit verschiedenen Dosen wiederholt, um die Dosiswirkungsbeziehung zu sichern und eine ED<sub>50</sub> nach der Probit-Methode<sup>5</sup> zu bestimmen.

Für die Messung der Laktationshemmung wurde folgendermaßen vorgegangen:

Trächtige Ratten von ca. 200 g Gewicht wurden verwendet. Nach dem Werfen wurden ihnen jeweils 8 Junge belassen. Die Würfe wurden vom 1. Tag an, jeweils vormittags, auf 1 g genau gewogen. Bei der täglichen Wägung notierte man auch die Anzahl der Jungtiere mit deutlichen Milchflecken, d.h. mit weiss durchschimmerndem Magen- und Darminhalt.

Am 6., 7. oder 8. Tag nach dem Werfen wurde dem laktierenden Muttertier die Testsubstanz abends s.c. appliziert. Am nächsten Tag wurden die Würfe morgens gewogen bzw. auf Milchflecken kontrolliert. Der Gewichtszuwachs der Jungen von Versuchstieren wurde mit dem von Jungen der Kontrolltiere verglichen und als % Laktationshemmung ausgedrückt. Ebenso wurde mit der Zahl der beobachteten Milchflecken verfahren.

Die Substanzen wurden als Methansulfonatsalze s.c. verabreicht; Mengenangaben sind jedoch auf die Base berechnet.

**Resultate.** Die Prüfung auf antifertile Wirkung ergab für  $\alpha$ -Ergokryptin eine ED<sub>50</sub> von 1,15 (0,85–1,55) mg/kg s.c.<sup>6</sup> und für 2-Br- $\alpha$ -Ergokryptin 0,75 (0,64–0,88) mg/kg s.c. Die ED<sub>50</sub> für 2-Br- $\alpha$ -Ergokryptin ist statistisch signifikant kleiner als die ED<sub>50</sub> des nicht halogenierten, natürlichen Alkaloids.

Die Versuche über Laktationshemmung ergaben für  $\alpha$ -Ergokryptin eine ED<sub>50</sub> von 0,7 mg/kg s.c. (Kriterium:

Gewichtszuwachs) bzw. 1,2 mg/kg s.c. (Kriterium: Milchleckzahl). Für 2-Br- $\alpha$ -Ergokryptin beträgt die ED<sub>50</sub> ca. 3,5 mg/kg s.c. (Kriterium: Gewichtszuwachs) bzw. > 4 mg/kg s.c. (Kriterium: Milchleckzahl). In Figur 1 und 2 sind die Dosiswirkungsbeziehungen der 3 verwendeten Kriterien dargestellt. Deutlicher als bei alleiniger Betrachtung der ED<sub>50</sub> wird durch die Figuren gezeigt, dass  $\alpha$ -Ergokryptin und 2-Br- $\alpha$ -Ergokryptin nicht gleichartig wirken:

Für  $\alpha$ -Ergokryptin (Figur 1) verlaufen die 3 Dosiswirkungsbeziehungen konvergent auf eine Dosis hin, welche Laktation und Fertilität völlig hemmt. Dies entspricht den Verhältnissen, wie wir sie für das Ergocornin gefunden haben<sup>7</sup>, für welches ZEILMAKER und CARLSEN<sup>4</sup>

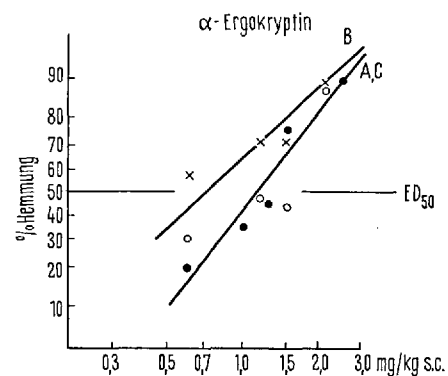


Fig. 1. ● Implantationshemmung (A), × Laktationshemmung (Gewicht) (B), ○ Laktationshemmung (Milchflecken) (C).

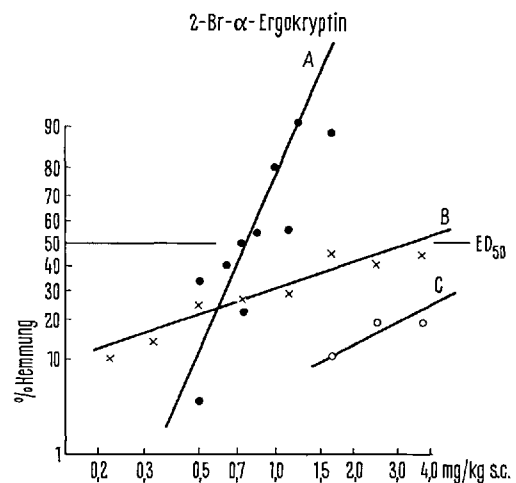


Fig. 2. ● Implantationshemmung (A), × Laktationshemmung (Gewicht) (B), ○ Laktationshemmung (Milchflecken) (C).

<sup>1</sup> M. C. SHELESNYAK, Am. J. Physiol. 180, 47 (1955).

<sup>2</sup> M. C. SHELESNYAK, Acta Endocrinol. 23, 151 (1956).

<sup>3</sup> M. C. SHELESNYAK, Acta Endocrinol. 27, 99 (1958).

<sup>4</sup> G. H. ZEILMAKER und R. A. CARLSEN, Acta Endocrinol. 41, 321 (1962).

<sup>5</sup> J. T. LITCHFIELD und F. WILCOXON, J. Pharmacol. 96, 99 (1949).

<sup>6</sup> Mittelwert und in Klammern, 95% Vertrauensgrenzen.

<sup>7</sup> Unpublizierte Resultate.

wahrscheinlich gemacht haben, dass Implantationshemmung und Laktationshemmung auf der primären Hemmung der Prolactininkretion beruht. Die Befunde mit  $\alpha$ -Ergokryptin sind mit der Annahme einer solchen gemeinsamen Primärwirkung in Einklang.

Für 2-Br- $\alpha$ -Ergokryptin (Figur 2) verlaufen nur die beiden Dosiswirkungsbeziehungen für die beiden Kriterien der Laktationshemmung wie zu erwarten konvergent auf eine maximal wirksame Dosis hin: Die Dosiswirkungsbeziehung für Fertilitätshemmung hat hingegen einen viel steileren Verlauf; es werden 90 (und 100) % Fertilitätshemmung mit Dosen erreicht, die weniger als 50% Gewichtszuwachs- bzw. weniger als 20% Milchfleckhemmung im Laktationstest bewirken. Diese Dosiswirkungsverhältnisse können nicht mit der Vorstellung einer für Fertilitäts- und Laktationshemmung gemeinsamen Primärwirkung in Einklang gebracht werden. Es muss postuliert werden, dass 2-Br- $\alpha$ -Ergokryptin bei Ratten eine spezifisch fertilitätshemmende Wirkung entfaltet.

Die Bromierung von  $\alpha$ -Ergokryptin in Stellung 2 des Moleküls bewirkt somit eine Steigerung der antifertilen Aktivität und eine Dissoziation dieser Eigenschaft von der laktationshemmenden Wirkung.

**Summary.** The inhibitory actions of  $\alpha$ -ergocryptin on fertility and lactation in the rat are altered differentially in the 2-bromo derivative of this ergot alkaloid. It is therefore unlikely that the fertility inhibiting and the lactation inhibiting effects of 2-bromo- $\alpha$ -ergocryptin are governed by a single mechanism of action.

E. FLÜCKIGER und H. R. WAGNER

*Medizinisch-Biologische Forschung, Sandoz AG, 4002 Basel (Schweiz), 3. September 1968.*

## Desmosterol as a Common Intermediate in the Conversion of a Number of C<sub>28</sub> and C<sub>29</sub> Plant Sterols to Cholesterol by the Tobacco Hornworm

Although the accumulated data from nutritional studies suggest that a number of C<sub>28</sub> and C<sub>29</sub> phytosterols are converted to cholesterol by insects, only the conversion of ergosterol to 22-dehydrocholesterol<sup>1</sup> and the dealkylation of  $\beta$ -sitosterol to cholesterol<sup>2-5</sup> have been conclusively demonstrated. In the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) the transformation of  $\beta$ -sitosterol to cholesterol proceeds through the intermediate desmosterol (24-dehydrocholesterol)<sup>6</sup> and certain vertebrate hypocholesterolemic agents (diazasterols and triparanol) block this conversion in the hornworm at the terminal step – the reduction of desmosterol to cholesterol<sup>6</sup>. The present paper reports on the conversion of a number of C<sub>28</sub> and C<sub>29</sub> phytosterols to cholesterol by the tobacco hornworm larva and presents evidence that desmosterol is a common intermediate in all these transformations.

The hornworms (6 larvae/test) were reared as previously described<sup>5</sup>. The sterols<sup>7</sup> were added to the artificial diet at a concentration of 0.026% (wet weight) either alone or in combination with an equal concentration of 20,25-diazacholesterol dihydrochloride. Insects reared on diets containing  $\beta$ -sitosterol as the sole added sterol served as controls for both growth and sterol metabolism studies. The total sterols were isolated from either prepupae (normal growth) or 20-day-old larvae (retarded growth) reared on each of the test diets and analyzed by 3 gas-liquid chromatography (GLC) systems as previously reported<sup>5</sup>.

The hornworms fed diets containing each of the sterols shown in the Figure underwent normal growth and metamorphosis. However, insects reared on diets containing either brassicasterol or dihydrobrassicasterol developed more slowly than those on campesterol, stigmasterol, 24-methylencholesterol or fucosterol. The growth rate of insects fed these last 4 sterols was equivalent to that of the controls.

Analyses of the sterol content of the insects indicated that cholesterol was the major sterol (> 70%) in all cases, demonstrating that each of the sterols tested was efficiently dealkylated and converted to cholesterol (Table). These results show that the hornworm larva is capable of dealkylating  $\alpha$ - or  $\beta$ -methyl,  $\alpha$ -ethyl, methylene and

ethylidene groups from the C-24 position of the sterol side chain and can also saturate the  $\Delta^{22}$ -double bond.

When 20,25-diazacholesterol was fed in the diets in combination with each of the test sterols, severe retardation of growth and development occurred. The effect on growth rate was most severe in insects fed diets containing brassicasterol or dihydrobrassicasterol plus the diazasterol. In addition to growth inhibition, the diazasterol brought about abnormalities in development such as formation of prepupae an instar earlier than normal and the production of prepupal-pupal intermediates. These results suggest that the azasterol may in part be effecting its inhibitory action by interfering with certain endocrine-mediated processes in the hornworm.

In all cases, GLC analyses of the sterols isolated from insects fed a phytosterol plus diazasterol showed an accumulation of desmosterol and a concurrent decrease in cholesterol content (Table). Apparently, desmosterol is an intermediate in the formation of cholesterol from all these sterols, indicating a similarity in the terminal step

<sup>1</sup> A. J. CLARK and K. BLOCH, J. biol. Chem. 234, 2589 (1959).

<sup>2</sup> W. E. ROBBINS, R. C. DUTKY, R. E. MONROE and J. N. KAPLANIS, Ann. ent. Soc. Am. 55, 102 (1962).

<sup>3</sup> C. H. SCHAEFER, J. N. KAPLANIS and W. E. ROBBINS, J. Insect Physiol. 11, 1013 (1965).

<sup>4</sup> N. IKEKAWA, M. SUZUKI, M. KOBAYASHI and K. TSUDA, Chem. pharm. Bull., Tokyo 14, 834 (1966).

<sup>5</sup> J. A. SVOBODA, M. J. THOMPSON and W. E. ROBBINS, Life Sci. 6, 395 (1967).

<sup>6</sup> J. A. SVOBODA and W. E. ROBBINS, Science 156, 1637 (1967).

<sup>7</sup> All sterols used in this study except fucosterol were either obtained from commercial sources or prepared by reported methods. A generous gift of fucosterol from Dr. G. W. PATTERSON, Department of Botany, University of Maryland, is gratefully acknowledged. The compounds were purified by recrystallization and/or adsorption chromatography, except for campesterol, which was purified by preparative gas-liquid chromatography (GLC). The physical constants of the purified sterols agreed well with those reported in the literature, and the purity was determined by melting point, spectroscopic analyses and GLC. All the compounds were shown to be > 99% pure by these methods except campesterol which was > 96% pure and contained about 3%  $\beta$ -sitosterol.