

Der Einfluss einiger C₂₁-Steroide auf die Wassereinlagerung in wachsenden embryonalen Knorpeln in vitro

Embryonaler Knorpel in einem synthetischen Nährmedium nimmt nach BIGGERS et al.¹ bei gutem Wachstum progredient Wasser auf. SCHRYVER² und REYNOLDS³ konnten diese Hydratisierung durch Zufügen geringer Konzentrationen von Cortisol zum Nährmedium hemmen. Die in der Arbeit von SCHRYVER abgebildeten, in vitro mit 0,01 µg/ml Cortisol behandelten Knorpel zeigten regelmässige, kleine Chondroblasten, durch eine uniforme Matrix voneinander getrennt. Die entsprechenden unbehandelten Chondroblasten lagen in grösseren Aussparungen und waren von einer unregelmässig breiteren Matrix umgeben. Das Trockengewicht der Organe und die Affinität für Toluidinblau waren bei Versuchs- und Kontrollkulturen gleich. SCHRYVER nahm deshalb an, dass die hauptsächliche Wirkung von Cortisol die Hemmung der Wassereinlagerung ist und dass wahrscheinlich nur eine geringgradige oder gar keine Hemmung der Chondrogenese vorliegt. REYNOLDS fand, dass das Knorpelgewebe Hydroxyprolin ins Medium abgibt und dass hydratisierungshemmende Cortisolkonzentrationen diese Hydroxyprolinabgabe vermindern, ein Befund, der auch von DINGL et al.⁴ erhoben worden ist. Wo auch immer der Angriff von Cortisol zu suchen ist, am Tropokollagenaufbau, an der Aggregation oder, wie WEISSMANN und FELL⁵ annehmen, in der Abdichtung der Lysosomen und damit in der Hemmung von Hydrolasen, es bleibt das in vitro und in vivo beobachtete Phänomen der Hydratisierungshemmung und damit der Festigung des kollagenen Gewebes durch Cortisol.

Bei der Chondrogenese im synthetischen Nährmedium gelangen die Steroide ohne Interaktion von Trägerproteinen und ohne eine eventuell vorausgehende Metabolisierung durch andere Organe an den Wirkort. Die für das Auftreten der Wirkung erforderlichen Steroidstrukturmerkmale lassen sich daher mit dieser Anordnung untersuchen.

Methode. Siehe B. SCHÄR⁶.

Resultate und Diskussion. Von einer Hemmung der Wassereinlagerung kann gesprochen werden, wenn das behandelte Organ bei gleichem Trockengewicht in der Projektion eine kleinere Fläche aufweist als seine ent-

sprechende Kontrolle. Tabelle I zeigt, dass dies bei allen untersuchten Δ^4 -3-Keto-11 β -hydroxy-C₂₁-Steroiden der Fall ist, während die entsprechenden 11 β -Desoxyderivate wirkungslos sind. Aus Tabelle II geht hervor, dass zudem die aufgeführten 11 β -Hydroxysteroiden in etwa dem gleichen Konzentrationsbereich wirksam sind. Die C₁₇-Seitenkette muss vorhanden sein, da z. B. 11 β -Hydroxyandrostendion, ein von MURATA und TAMAOKI⁷ in der Knorpelkultur nachgewiesener Cortisolmetabolit, wirkungslos ist. Die Anwesenheit der 17 α - und 21-Sauerstofffunktion scheint für die Wirkung bedeutungslos zu sein, sofern eine Δ^4 -3-Ketogruppierung im Ring A vorhanden ist. Bei den entsprechenden, im Ring A gesättigten 3-Ketoverbindungen jedoch gewinnt die 17 α -Substitution an Bedeutung: 5 α -Dihydrocortisol hemmt die Hydratisierung, 5 β -Dihydrocortisol ist unwirksam, dagegen sind 5 α - und 5 β -Dihydrocorticosteron nur in hohen Konzentrationen wirksam⁸.

Soweit sich dies aufgrund der hier erhobenen Befunde beurteilen lässt, ist die Hydratisierungshemmung, hervorgerufen durch bestimmte Pregnenverbindungen, an Strukturmerkmale des Ringes A, an die Anwesenheit einer 11 β -Hydroxygruppe und einer 20-Ketogruppe gebunden. Die Fähigkeit der Knorpelzelle, die Steroidstruktur enzymatisch zu verändern, scheint beschränkt zu sein. Die 20-Ketogruppe dürfte bei Anwesenheit von Hydroxygruppen in 11 β - und 17 α -Stellung schlecht oder

¹ J. D. BIGGERS, R. B. L. GWATKIN und S. HEYNER, *Expl Cell Res.* 25, 41 (1961).

² H. F. SCHRYVER, *Expl Cell Res.* 37, 327 (1965).

³ J. J. REYNOLDS, *Expl Cell Res.* 41, 174 (1966).

⁴ J. T. DINGL, H. B. FELL und J. A. LUCY, *Biochem. J.* 98, 173 (1966).

⁵ G. WEISSMANN und L. THOMAS, *J. exp. Med.* 176, 433 (1962). – H. B. FELL und L. WEISS, *J. exp. Med.* 121, 551 (1965).

⁶ B. SCHÄR, *Experientia* 23, 716 (1967).

⁷ S.-I. MURATA und B.-I. TAMAOKI, *Biochim. biophys. Acta* 137, 347 (1967).

⁸ In Vorbereitung.

Tabelle I. Wirkung verschiedener Δ^4 -3-Keto-C₂₁-Steroide auf das Wachstum von embryonalem Hühnerknorpel in vitro

| | n | Länge ^a | Fläche ^a | Trockengewicht ^a | Stickstoffgewicht ^a | Quotient Trockengewicht/ Stickstoffgewicht | Kontrolle | Versuch |
|---|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------------------|---|--------------|---------|
| Progesteron | 5 | 99 ± 1,7 | 98 ± 0,8 | 100 ± 1,9 | 98 ± 1,9 | 9,83 ± 0,27 | 10,10 ± 0,21 | |
| 11 β -Hydroxyprogesteron | 4 | 87 ± 2,4 ^b | 79 ± 3,2 ^b | 105 ± 5,1 | 106 ± 4,4 | 9,87 ± 0,22 | 9,83 ± 0,12 | |
| 17 α -Hydroxyprogesteron | 4 | 95 ± 1,2 | 94 ± 1,9 | 96 ± 2,9 | 98 ± 3,1 | 11,13 ± 0,16 | 11,41 ± 0,08 | |
| 11 β ,17 α -Dihydroxyprogesteron | 4 | 80 ± 1,0 ^c | 68 ± 2,2 ^b | 89 ± 1,9 | 93 ± 3,4 | 9,65 ± 0,33 | 9,21 ± 0,41 | |
| Desoxycorticosteron | 8 | 100 ± 1,7 | 101 ± 3,1 | 99 ± 4,6 | 98 ± 2,1 | 11,27 ± 0,16 | 11,51 ± 0,59 | |
| Corticosteron | 6 | 85 ± 1,6 ^b | 77 ± 2,1 ^c | 109 ± 3,1 | 111 ± 2,7 | 9,48 ± 0,09 | 9,06 ± 0,26 | |
| Reichsteins Substanz S | 4 | 104 ± 4,4 | 108 ± 2,9 | 107 ± 3,2 | 107 ± 2,2 | 11,25 ± 0,38 | 11,21 ± 0,43 | |
| Cortisol | 6 | 82 ± 3,2 ^c | 76 ± 2,9 ^c | 99 ± 2,7 | 101 ± 5,2 | 9,15 ± 0,60 | 8,92 ± 0,18 | |
| 21-Dehydro-Reichsteins Substanz S | 4 | 101 ± 1,5 | 97 ± 4,4 | 99 ± 2,4 | 97 ± 3,6 | 11,29 ± 0,38 | 11,54 ± 0,14 | |
| 21-Dehydrocortisol | 4 | 80 ± 1,9 ^c | 70 ± 2,5 ^c | 99 ± 3,7 | 104 ± 4,0 | 10,62 ± 0,30 | 10,10 ± 0,24 | |

^a Mittelwerte aus n Versuchen ± Standardabweichung des Mittelwertes. Die einzelnen Werte sind Prozentzahlen der entsprechenden Kontrollen. Irrtumswahrscheinlichkeit beim Vergleich Versuch-Kontrolle für ^b < 0,01, ^c < 0,001.

gar nicht reduziert werden⁹. Für Cortisol fanden MUROTA und TAMAOKI keine Veränderung des Substituenten am C-Atom. Der Hauptmetabolit des Cortisols im Knorpelgewebe wurde als 3 α , 11 β , 17 α , 21-Tetrahydroxy-5 β -pregnan-20-on identifiziert⁷. Er hat keine Wirkung auf den Wassergehalt der Knorpel in vitro.

Tabelle II. Wirkung verschiedener Δ^4 -3-Keto-11 β -hydroxy-C₂₁-Steroide auf den Hydratationsgrad in Abhängigkeit von der Konzentration

| | 0.001 $\mu\text{g/ml}$ | 0.01 $\mu\text{g/ml}$ | 0.1 $\mu\text{g/ml}$ | 1.0 $\mu\text{g/ml}$ |
|--|---------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 11 β -Hydroxyprogesteron | 96 \pm 3.1 | 77 \pm 2.3 | 79 \pm 3.2 | 79 \pm 2.4 |
| P | – | < 0.001 | < 0.01 | < 0.001 |
| 11 β , 17 α -Dihydroxyprogesteron | 88 \pm 2.4 | 66 \pm 4.6 | 68 \pm 2.2 | 67 \pm 1.7 |
| P | < 0.05 | < 0.01 | < 0.001 | < 0.001 |
| Corticosteron | | 86 \pm 3.2 | 77 \pm 2.1 | 71 \pm 1.5 |
| P | | < 0.02 | < 0.001 | < 0.001 |
| Cortisol | | 81 \pm 2.9 | 76 \pm 2.9 | 71 \pm 2.0 |
| P | | < 0.05 | < 0.001 | < 0.001 |
| 21-Dehydrocortisol | 99 \pm 2.0 | 79 \pm 1.9 | 70 \pm 2.5 | 65 \pm 4.1 |
| P | | < 0.02 | < 0.001 | < 0.001 |

Ausmass der Projektionsbilder in Prozentzahlen der entsprechenden Kontrollen. Mittelwerte aus mindestens 4 Versuchen \pm Standardabweichung des Mittelwerts. P, Irrtumswahrscheinlichkeit beim Vergleich Versuch–Kontrolle.

Aufgrund der vorliegenden Versuche ist die Annahme naheliegend, dass die Knorpelzelle an Steroiden, welche in die Wasserregulation eingreifen, lediglich das im Ring A lokalisierte Strukturmerkmal verändert. So wird beispielsweise das hydratisierungshemmende Cortisol in seinen diesbezüglich inaktiven Metaboliten umgewandelt. Ob die mit dem Eintritt des Wasserstoffs in 5 β -Stellung verbundene konfigurate Änderung der gegenseitigen Lage der A- und B-Ringe auch bei den 21-Desoxy- und 21-Dehydroverbindungen zu inaktiven Metaboliten führt, müssten weitere Untersuchungen ergeben.

Summary. Embryonic chick cartilages were cultivated in a synthetic nutrient medium. In this experimental procedure cortisol is known to reduce the water uptake of the cartilages. It was found that some C₂₁-steroids exert a similar activity. Those of the steroids investigated, which inhibit water uptake, have in common a Δ^4 -3-keto group, an 11 β -hydroxy group, and a keto group in position 20; oxygen functions in positions 21 and 17 α seem to be of minor importance for this activity. The possibility of these steroids being inactivated by cellular enzymes is discussed.

B. SCHÄR

Pharmazeutische Abteilung,
Biologische Laboratorien der CIBA Aktiengesellschaft,
Basel (Schweiz), 7. Dezember 1968.

⁹ E. GERHARDS, G. RASPÉ und R. WIECHERT, Arzneimittel-Forsch. 17, 431 (1967).

Morphological Artefacts in Biopsy Specimens of the Testis

The present study was undertaken in order to describe the histological and ultrastructural changes produced by biopsy technique in the testis tubules of the rat.

Material and methods. Ten adult albino rats weighing 200 g were used for this study. Following ether anaesthesia, a longitudinal incision of the tunica was made, the small portion of hernial parenchyma was removed and fixed in Bouin's solution. The testis on the other side was entirely removed and fixed. 3 μ thick sections were stained with haematoxylin-eosin, Hopa and Hotchkiss-McManus. Some biopsy fragments were fixed in cold 2% osmium tetroxide buffered according to MILLONIG¹ and, after dehydration, were embedded in Araldite (Durcupan ACH). Thin sections were mounted on Formvar coated grids and examined in a Siemens Elmiskop I electron microscope, after staining with lead hydroxide according to KARNOVSKY².

Results. Light microscopy: The tubules of the biopsy specimens show desquamated spermatocytes and spermatids in the lumen (Figure 2). Fissures are visible in the epithelium of the seminiferous tubules and they are perpendicular (Figure 2) or parallel (Figure 3) to the basement membrane. The interstitium may be edematous and sometimes filled by seminal cells (Figure 3).

Electron microscopy: In the electron microscope desquamated cells in the seminiferous lumen of the tubules observed in the light microscope appear to be sperma-

tocytes and spermatids (Figure 4). Large clumps of the apical portions of Sertoli cells, fragments of plasma membrane, mitochondria with partly disorganized cristae and several swollen vesicles of the smooth endoplasmic reticulum are present in the tubular lumen (Figure 4). The basal portion of the Sertoli cells, the spermatogonia of type A and B nearly always maintain their normal position near the basement membrane (Figures 5 and 6). The cellular components of the spermatogonia are well preserved; however the plasma membrane often appears to be interrupted.

The appearance of the cellular (smooth muscle cells, fibroblasts) and acellular components of the boundary tissue (tunica propria) is normal.

Discussion. These findings show that the biopsy technique of testis produces morphological artefacts in the seminiferous tubules. The most evident artefact is the presence of desquamated cells in the tubular lumen.

Electron microscopic studies³ have shown that intercellular connections are present in the basal portion of

¹ G. MILLONIG, J. appl. Physiol. 32, 1637 (1961).

² M. J. KARNOVSKY, Biophys. biochem. Cytol. 11, 729 (1961).

³ L. NICANDER, Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 83, 375 (1967).