

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 1. Mitteilung: G. SCHWARZENBACH & MICHAEL WIDMER, *Helv. 46*, 2613 (1963).
- [2] G. SCHWARZENBACH, *Experientia Suppl. V*, 162 (1956); *Angew. Chem. 70*, 451 (1958); *Advances in Inorg. Chemistry and Radiochemistry 3*, 257 (1961).
- [3] R. G. PEARSON, *J. Amer. chem. Soc. 85*, 3533 (1963).
- [4] K. JELLINEK & J. CZERWINSKI, *Z. physikal. Chem. 102*, 438 (1922); I. M. KOLTHOFF, *J. phys. Chem. 35*, 2711 (1931).
- [5] P. v. RYSELBERGHE & A. H. GROPP, *J. chem. Education 21*, 96 (1944).
- [6] W. D. TREADWELL & H. HEPENSTRICK, *Helv. 32*, 1872 (1949).
- [7] G. SCHWARZENBACH, O. GÜBELI und H. ZÜST, *Chimia 12*, 84 (1958).
- [8] M. WIDMER, ETH-Dissertation, Juris-Verlag, Zürich 1962.
- [9] M. WIDMER & G. SCHWARZENBACH, *Helv. 47*, 266 (1964).
- [10] J. BJERRUM, Symposium on Coordination Chemistry, Tihany 1964.
- [11] P. J. ANTIKAINEN & D. DYRSSEN, *Acta chem. scand. 14*, 86, 95 (1960).
- [12] I. LEDEN, *Svensk Kem. Tidskr. 64*, 249 (1952); *65*, 88 (1953).
- [13] E. BERNE & I. LEDEN, *Z. f. Naturforschung 8a*, 719 (1953).
- [14] I. LEDEN & R. NILSSON, *Z. f. Naturforschung 10a*, 67 (1955).
- [15] L. G. SILLEN & A. E. MARTEL, *Stability Constants of Metal Ion Complexes*, Chem. Soc. Special Publication (1964).
- [16] I. LEDEN, *Acta chem. scand. 10*, 540, 812 (1956).
- [17] S. ÅHRLAND, J. CHATT, N. R. DAVIES & A. A. J. WILLIAMS, *J. chem. Soc. 1958*, 264, 276.

## 18. Über die adrenale Steroidbiosynthese *in vitro*

### II. Bedeutung von Steroiden als Hemmstoffe

von F. W. Kahnt und R. Neher

(I. X. 65)

**1. Einleitung.** – In der ersten Mitteilung dieser Reihe haben wir über die Grundlagen der Bildung von Steroiden aus endogenen und exogenen Vorstufen im Nebennierenrindenhomogenat des Rindes berichtet [1]. Im folgenden untersuchten wir, wie weit Steroide als Regulatoren bzw. Hemmstoffe der adrenalen Biosynthese von Steroiden aus Cholesterin von Bedeutung sind.

Es geht uns in erster Linie um die *direkte* Wirkung auf die Corticosteroidproduktion; eine indirekte Hemmwirkung, wie sie z. B. von Androgenen *in vivo* [2] [3] oder durch Blockierung der Cholesterinbiosynthese oder des Hypothalamus-Hypophysen-Systems (s. z. B. in [4]) hervorgerufen wird, steht hier nicht zur Diskussion. Auch der Einfluss von Steroiden auf Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenasen [5] oder Steroid-Dehydrogenasen und Transdehydrogenasen [6–8] *nicht* adrener Herkunft bleibt hier unberücksichtigt.

Wie wir schon kurz in anderem Zusammenhang zeigten, finden sich einerseits unter den Ausgangs- und Zwischenprodukten Steroide, wie Cholesterin, die in hoher Konzentration die Biosynthese auf bestimmten Stufen im Sinne einer Substrat-Hemmung beeinflussen [9]; andererseits erwiesen sich teils Endprodukte [10–14], teils verschiedenartige synthetische Steroide als Blocker unterschiedlicher Qualität [15] [16].

Über die Methodik, soweit sie nicht bereits ausführlich beschrieben worden ist [1], finden sich Angaben im Experimentellen Teil<sup>1)</sup>.

**2. Hemmung durch Steroidsubstrate (Vor- und Zwischenstufen).** - Als endogene Vorstufe wurde in unserem System Cholesterin identifiziert [1]. Es liegt mit 1800  $\mu\text{g/g}$  Nebennierenrinde (oder 270  $\mu\text{g/ml}$  Ansatz) in einer Menge vor, die unter den gegebenen Bedingungen nur zu etwa 20% in Corticosteroide umgesetzt wird. Eine Zugabe von *exogenem Cholesterin* hat deshalb auch keine vermehrte Steroidbildung zur Folge. Erhöht man die Zugabe so stark, dass die Relation von endogenem und exogenem Cholesterin/Gewebe einen Wert von etwa  $3 \cdot 10^{-3}$  übersteigt, so wird die Umsetzung zunehmend gehemmt, wie aus Tabelle 1 hervorgeht. Diese Hemmung scheint generell zu sein, und zwar betrifft sie Cortisol und Corticosteron in gleichem Ausmass, da das Verhältnis F/B unverändert blieb; analoge Resultate erhielten wir bei gleichzeitiger Zugabe von [ $7\alpha$ - $^3\text{H}$ ]-Cholesterin (Tab. 1). Die Aldosteronbildung reagierte bedeutend empfindlicher auf exogenes Cholesterin und wurde schon mit 60  $\mu\text{g/ml}$  stark gehemmt. Abgesehen davon, setzt die allgemeine Blockierung offenbar unmittelbar nach Cholesterin ein, da sich entsprechend dem Schema 1 keine Anreicherung hydroxylierter

Tabelle 1. Einfluss von exogenem Cholesterin auf die Steroidbildung aus endogenem Cholesterin

Exogenes Cholesterin in $\mu\text{g/ml}$	Verhältnis Substrat <sup>a)</sup> /Gewebe $\times 10^{-3}$	Steroidbildung in % der Kontrolle		F/B	
		Cortisol (F) <sup>b)</sup>	Corticosteron (B) <sup>b)</sup>	aus endogenem Cholesterin	aus [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin
0 (Kontrolle)	1,8	100 (159 $\mu\text{g}$ ) <sup>c)</sup>	100 (129 $\mu\text{g}$ ) <sup>c)</sup>	1,2	1,1
60	2,2	111	110	1,2	
150	2,8	87	96	1,1	1,2
300	3,8	72	62	1,4	1,2
600	5,8	41	41	1,2	1,3

a) Unter Substrat ist die Summe von endogenem und exogenem Cholesterin zu verstehen; der Gehalt an endogenem Cholesterin betrug 270  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 1800  $\text{mg/g}$  Gewebe.

b) Mit den  $11\beta$ -Hydroxysteroiden wurden gleichzeitig die entsprechenden  $11$ -Ketoderivate Cortison bzw.  $11$ -Dehydrocorticosteron gemessen; letztere machten jedoch nur höchstens 10% der ersteren aus. Die Hemmung der Steroidbildung betraf praktisch nur die genuinen  $11\beta$ -Hydroxysteroiden.

c) Mittelwert der absoluten Menge in  $\mu\text{g/g}$  Gewebe (Ansätze zu 5 g Nebennierenrindengewebe; vgl. [1]).

<sup>1)</sup> Die hier verwendeten Trivialnamen bedeuten:

Pregnenolon	Pregn-5-en-3 $\beta$ -ol-20-on
11-Desoxycorticosteron (DOC)	Pregn-4-en-21-ol-3, 20-dion
Corticosteron (B)	Pregn-4-en-11 $\beta$ , 21-diol-3, 20-dion
11-Dehydrocorticosteron (A)	Pregn-4-en-21-ol-3, 11, 20-trion
11-Desoxycortisol (REICHSTEIN's S)	Pregn-4-en-17, 21-diol-3, 20-dion
Cortisol (F)	Pregn-4-en-11 $\beta$ , 17, 21-triol-3, 20-dion
Cortison (E)	Pregn-4-en-17, 21-diol-3, 11, 20-trion
Aldosteron	Pregn-4-en-11 $\beta$ , 21-diol-18-al-3, 20-dion (11 $\beta$ $\rightarrow$ 18 Hemiactal)
Androstendion	Androst-4-en-3, 17-dion
Dehydroepiandrosteron	Androst-5-en-3 $\beta$ -ol-17-on

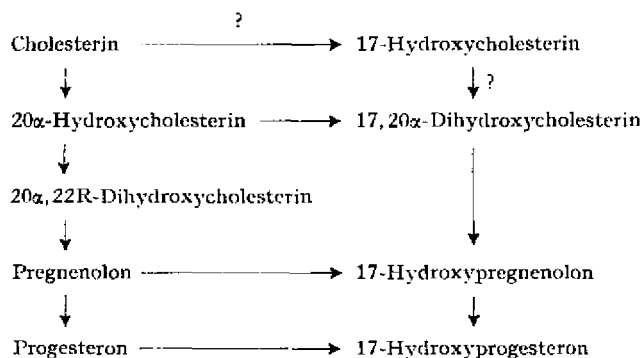
Cholesterin-Derivate oder von Pregnenolon, Progesteron, bzw. deren 17-Hydroxy-Derivate nachweisen liess. Tatsächlich scheint die Stufe Cholesterin  $\rightarrow$  20 $\alpha$ -Hydroxycholesterin den oder einen der geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Biosynthese darzustellen [17].

Das exogene Cholesterin vermochte auch die Bildung von radioaktiven Corticosteroiden aus [ $^3\text{H}$ ]-Pregnenolon oder [ $^{14}\text{C}$ ]-Progesteron unter Anstau besonders von 11 $\beta$ -Hydroxyprogesteron zu hemmen. Dies weist darauf hin, dass in diesem Fall besonders die 21-Hydroxylierung beeinträchtigt wurde.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass *Cholesterinsulfat* eine bedeutend schwächere Hemmwirkung als Cholesterin besass; erst mit 1800  $\mu\text{g}/\text{ml}$  war die Bildung von Cortisol und Aldosteron wesentlich verringert, diejenige von Corticosteron aber immer noch nicht.

Von den im Schema angeführten Verbindungen untersuchten wir ferner die Wirkung von *Pregnenolon* und *Progesteron*, ihrerseits wichtige Zwischenstufen, auf die Biosynthese der Corticosteroide aus endogenem Cholesterin; normalerweise werden diese Zwischenprodukte sehr rasch umgewandelt, da sie sich nie in fassbaren Mengen

*Schema 1. Biosynthesewege von Cholesterin zu Zwischenstufen der Corticosteroide (Lit. vgl. in [1, 39]); zum Weg über 17,20 $\alpha$ -Dihydroxycholesterin vgl. [18–20, 40]. Vermutlich teilt sich der Weg zu 17-Desoxy- und 17-Hydroxysteroiden bereits unmittelbar nach Cholesterin; die Bedeutung des noch unbekanntenen 17-Hydroxycholesterins als Zwischenstufe bleibt deshalb abzuklären.*



anreichern. Durch Zugabe von [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin, dessen Metabolismus mit dem des endogen vorhandenen Cholesterins identisch ist [1], konnte aus dem Verhältnis der Konzentration von neugebildeten radioaktiven und inaktiven Steroiden leicht ermittelt werden, welcher Anteil aus dem endogenen Cholesterin und welcher aus dem exogen zugeführten Pregnenolon oder Progesteron stammte.

Aus den teilweise in Tabelle 2 zusammengestellten Resultaten ergab sich, dass sowohl Pregnenolon wie Progesteron unter unseren Bedingungen eine deutliche allgemeine Hemmwirkung ab einer Konzentration von 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (s. Kolonne I und II) bzw. einem Substrat/Gewebe-Verhältnis ab  $5 \cdot 10^{-4}$  bewirken. Das Verhältnis von F/B aus [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin wurde hierbei nicht wesentlich beeinflusst. Pregnenolon wurde, soweit es sich nicht ganz in Corticosteroide umwandelte, nahezu vollständig zu Progesteron oxydiert (s. Kolonne V und VI). Die in unserem System sehr rasch und gut verlaufende Dehydrierung und Isomerisierung zu Progesteron deutet darauf hin,

Tabelle 2. Einfluss von exogenem Pregnenolon und Progesteron auf die Steroidbildung aus endogenem [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin

Exogenes Steroid $\mu\text{g/ml}$	Verhältnis Substrat/ Gewebe <sup>a)</sup> $\times 10^{-4}$	Neubildung aus [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin in % ipm der Kontrolle		[ $^3\text{H}$ ]-Vor- und Zwischenstufen nach der Inkubation in % ipm des Hexanextraktes <sup>b)</sup>			$\mu\text{g/ml}$ exogene Steroide nach der Inkubation			
		Cortisol (F) <sup>b)</sup> e)	Corticosteron (B) <sup>b)</sup> e)	F/B	[ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin III	[ $^3\text{H}$ ]-Progesteron IV	Pregnenolon <sup>d)</sup>	V	Progesteron <sup>d)</sup>	VI
Kontrolle		100	100	1,2	95	0	-	-	-	-
Pregnenolon	1	116	112	1,3	96	2,4	<6	<6	<6	<6
	2	67	76	1,1	94	4	<6	<6	<6	<6
	5	51	58	1,0	92	5	<6	<6	<6	10
	10	20	27	0,9	86	11	6	6	6	30
Kontrolle		100	100	1,0	95	0	-	-	-	-
Progesteron	1	80	74	1,0			-	-	-	<6
	2	73	70	0,9			-	-	-	<6
	5	62	57	1,0			-	-	-	10
	10	34	26	1,3	86	11	-	-	-	30
17-Hydroxy-pregnenolon	5	90	121	0,9			-	-	-	-
17-Hydroxyprogesteron	5	73	72	1,2			-	-	-	-

a) Exogenes Steroid

b) vgl. Fussnote b) von Tab. 1

c) Die schwach polaren Sterine und Steroide befinden sich überwiegend im Hexanextrakt [1]

d) Bestimmt im Hexanextrakt: [1]

e) Bestimmt im Chloroformextrakt [1]

ipm = Impulse pro Minute

dass die eigentliche Hemmung nicht durch Pregnenolon sondern Progesteron bewirkt wird. Dafür spricht auch die unterschiedliche Wirkung der niedersten Konzentration von 15  $\mu\text{g/ml}$  beider Vorstufen (s. Kolonne I und II); erst ab 30  $\mu\text{g/ml}$  scheint der Effekt identisch zu sein. Die Suche nach schwach polaren radioaktiven Zwischenprodukten in den Hexanextrakten verlief negativ hinsichtlich mono- und di-hydroxylierter Cholesterin-Derivate. In den Kontrollen liess sich nur [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin nachweisen (Kolonne III). Dessen absolute Menge stieg mit zunehmender Konzentration exogener Steroide als Ausdruck seiner geringer werdenden Umsetzung; zudem trat zunehmend [ $^3\text{H}$ ]-Progesteron auf (s. Kolonne III und IV) entsprechend der Anreicherung des inaktiven Progesterons aus exogener Quelle. In unserem System scheint somit eine Hemmung der Stufe Cholesterin  $\rightarrow$   $20\alpha$ -Hydroxycholesterin (s. Schema) durch Progesteron im Sinne einer Rückkoppelungsreaktion [21] erst ab 75  $\mu\text{g/ml}$  wirksam zu werden. Im Vergleich dazu fanden kürzlich KORITZ und HALL [17] mit einer Mitochondrienpräparation, dass diese Stufe ausser durch  $< 1 \mu\text{g/ml}$   $20\alpha$ -Hydroxycholesterin durch Pregnenolon (5  $\mu\text{g/ml}$ ) und nicht Progesteron gehemmt wird; es handelte sich allerdings um eine Endprodukt hemmung, da dieses System Cholesterin nur bis zu Pregnenolon umzuwandeln vermag. Im Gegensatz dazu vermag unser System Pregnenolon noch leicht zu Progesteron und Folgeprodukten umzuwandeln und entspricht damit qualitativ und quantitativ weitgehend der *in vivo*- Kapazität.

Gegenüber Cholesterin selbst (s. weiter oben) erwies sich Progesteron fast um eine Zehnerpotenz wirksamer als Hemmer; vergleichsweise fanden wir eine analoge, aber noch stärkere Substrathemmung von Pregnenolon und besonders Progesteron im Rattentesteshomogenat bei einem Substrat/Gewebe-Verhältnis von  $3 \cdot 10^{-5}$  [22]. Während sich im Testeshomogenat Pregn-4-en- $20\beta$ -ol-3-on als gleich guter Inhibitor wie Progesteron erwies, traf dies im Fall der Corticosteroid-Biosynthese für Pregn-4-en- $20\alpha$ -ol-3-on zu.

*17-Hydroxypregnenolon* oder *17-Hydroxyprogesteron* hemmten die Bildung von Cortisol und Corticosteron aus Cholesterin im Nebennierenhomogenat mit 75  $\mu\text{g/ml}$  noch nicht bzw. nur angedeutet, unter gleichzeitiger, praktisch völliger Umwandlung ihrerseits in Corticosteroide; 17-Hydroxyprogesteron blockierte jedoch die Aldosteronbildung.

Wurde parallel zum Umsatz von endogenem, nicht markiertem Cholesterin derjenige von [ $^3\text{H}$ ]-Pregnenolon verfolgt, so zeigte sich, dass exogenes Progesteron die Steroidgenese ausgehend von Pregnenolon erst bei 150  $\mu\text{g/ml}$  deutlich zu hemmen vermochte und zwar offensichtlich *nach* Progesteron, welches selbst noch gut gebildet wurde.

**3. Hemmung durch adrenale Steroid-Endprodukte und analoge Corticosteroide.** – Auf Grund präliminärer Befunde der Aldosteronblockade schien es uns von einigen Interesse, ob die eigentlichen Corticosteroide als Endprodukte der adrenalen Biosynthese auf ihre Bildung aus Cholesterin in unserem System einen direkten Einfluss ausüben können.

An Ratten-Nebennierenschnitten haben bereits verschiedene Autoren gezeigt, dass Corticosteron, Cortisol, Prednisolon bzw. Dexamethason die Bildung von Corticosteron *in vitro*, teils direkt, teils als Anti-ACTH-Effekt, hemmen können [10–14]; ausserdem liess sich die Aldosteronbildung durch DOC vermindern [36].

Ferner haben BLACK und Mitarbeiter [32] an einem Perfusionsmodell den Hinweis erhalten, dass Cortisol, nicht aber Corticosteron, einen direkten Hemmeffekt auf die Cortisol-Sekretion des Hundes ausüben könnte.

Die auf Grund unserer Analyse der Steroidbiosynthese *in vitro* aus endogenem, tritiummarkiertem Cholesterin erhaltenen Resultate sind aus Tab. 3 ersichtlich. Danach hemmten praktisch alle endogen zugefügten *Endprodukte* die Bildung eines oder mehrerer ihrer Konkurrenten, allerdings erst in relativ hoher Konzentration; dabei entspricht diejenige von 150  $\mu\text{g/ml}$  etwa der 8–10fachen Menge des normalerweise gebildeten Cortisols oder Corticosterons.

Am leichtesten hemmbar scheint die Bildung von Aldosteron, 18- und 19-Hydroxycorticosteron zu sein, die an sich schon wesentlich geringer ist als diejenige der übrigen Corticosteroide. Mit Ausnahme von Cortison hemmten die geprüften Steroide das Aldosteron immer stärker als 19-Hydroxycorticosteron (s. Tab. 3). Auffallenderweise blockierten die Sekundärprodukte mit 11-Ketogruppe wie 11-Dehydrocorticosteron und Cortison total, d.h. alle Steroide. Dieser Unterschied war auch zwischen Prednisolon (11 $\beta$ -ol) und Prednison (11-keto) evident; Dexamethason mit seiner 9 $\alpha$ -Fluor-11 $\beta$ -ol-Gruppierung entsprach hier einem 11-Ketosteroid. Ein Vergleich mit

Tabelle 3. Einfluss adrener Steroid-Endprodukte und einiger Analogier auf die Steroidbiosynthese *in vitro* aus endogenem [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin

Exogenes Steroid (unmarkiert)	Effekt von 150 $\mu\text{g/ml}$ (mindestens 50-proz. Hemmung) auf			Verhältnis Aldosteron/ 19-Hydroxycorticosteron (Kontrolle 2,3)
	Cortisol	Corticosteron	Aldosteron <sup>b)</sup>	
11-Desoxycorticosteron <sup>a)</sup>	0	+	+ <sup>d)</sup>	1,0
Corticosteron <sup>a)</sup>	0	0	+ <sup>d)</sup>	1,2
11-Dehydrocorticosteron	+	+	+	
11-Desoxycortisol <sup>a)</sup> (REICHSTEIN'S S)	0	0	+ <sup>d)</sup>	0,9
Cortisol	0	0	+ <sup>e)</sup>	1,2
Cortison <sup>e)</sup>	+	+	+ <sup>e)</sup>	2,2
Prednisolon <sup>f)</sup>	0	0	+	
Prednison <sup>f)</sup>	+	+	+	
Dexamethason <sup>f)</sup>	+	+	+	
11-Ketoprogesteron <sup>a)</sup> <sup>g)</sup>	+	+	+	
21-Dehydro-corticosteron	0	+	+	
21-Dehydro-11-desoxycortisol	0	+	+	
21-Dehydro-cortison	+	+	+	

<sup>a)</sup> Diese Steroide stellen teils Endprodukte, teils vorletzte Stufen dar

<sup>b)</sup> Ausser Aldosteron wurde auch 19-Hydroxycorticosteron gehemmt

<sup>c)</sup> Verursacht ausserdem Anstau von [ $^3\text{H}$ ]-Pregnenolon

<sup>d)</sup> Aldosteronhemmung auch noch mit 30  $\mu\text{g/ml}$

<sup>e)</sup> Hemmung noch mit 60  $\mu\text{g/ml}$

<sup>f)</sup> Bei diesen 3 Steroiden musste das endogene Cholesterin nicht markiert werden; sie konnten von den endogen gebildeten Corticosteroiden leicht differenziert werden.

<sup>g)</sup> Wurde bei der Inkubation seinerseits zu 23% in 11-Dehydrocorticosteron und zu 10% in Cortison übergeführt

11-Ketoprogesteron zeigte, dass der nämliche Effekt selbst noch bei dieser Verbindung nachweisbar war. Bemerkenswerterweise liess sich 11-Ketoprogesteron auch bedeutend leichter in Stellung 17 und 21 hydroxylieren (total 33%) als z. B. 11 $\beta$ -Hydroxyprogesteron. Die Regel, dass 17- und 21-Hydroxylierungen im allgemeinen *vor* der Einführung der Sauerstofffunktion in 11 zu erfolgen haben, gilt offensichtlich für 11-Keto-Verbindungen nicht mehr so streng.

Im Vergleich zur Substrathemmung durch Pregnenolon bzw. Progesteron scheint nach Tab. 3 eine Endprodukthemmung durch Cortisol oder Corticosteron für die Biosynthesestufen unseres Systems ab Cholesterin keine besondere Rolle zu spielen. Immerhin scheint es möglich, dass zuweilen eine starke Bildung von Cortisol und selbst Corticosteron der Biosynthese von Aldosteron abträglich sein kann (vgl. [1]). Kürzlich erst haben VECSEI und Mitarbeiter [24] gezeigt, dass massive Dosen von Cortisol in Ratten die Aldosteronproduktion im Nebennierenschnittpräparat signifikant zu reduzieren vermögen. Auch klinisch gibt es Hinweise dafür, dass die Hemmung der Hypophysen-Nebennieren-Achse durch exogene Corticosteroide an beiden Organen erfolgen kann [37].

Unter den *Corticosteroidanalogen* haben uns wegen der Möglichkeit einer kompetitiven Hemmung besonders zwei weitere Gruppen interessiert: einerseits A-Nor-B-Homo-Analoga, andererseits solche Steroide, welche statt einer  $\alpha$ -Ketolseitenkette eine Glyoxylseitenkette tragen (21-Dehydro-corticosteroide mit einer Aldehydgruppe in Stellung 21). Von den sogenannten *abeo*-Steroiden, wie A-Nor-B-homo-cholestan-3 $\beta$ -ol oder -3-on, A-Nor-B-homo-pregn-5-en-6 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol-3,20-dion («*abeo*-17-Hydroxyprogesteron») oder A-Nor-homo-pregn-5-en-6 $\beta$ ,21-diol-3,20-dion («*abeo*-11-Desoxycorticosteron») erwiesen sich keine mit 30  $\mu$ g/ml als hemmend; letztere Verbindung verminderte lediglich mit 150  $\mu$ g/ml die Bildung von Aldosteron und 19-Hydroxycorticosteron beträchtlich, unter gleichzeitiger teilweiser Umwandlung in «*abeo*-Corticosteron»; d. h. auch die *abeo*-Struktur diene der 11 $\beta$ -Hydroxylase noch als Substrat.

Von den 21-Aldehyden hemmte 21-Dehydrocortison praktisch gleich wie Cortison selbst (Tab. 3); da dieser Aldehyd bei der Inkubation bis zu 50% zu Cortison reduziert wurde, lässt sich nicht genau unterscheiden, ob diese Hemmung völlig ihm selbst zukommt. Bei den 21-Dehydroverbindungen von 11-Desoxycortisol (REICHSTEIN'S S) und Corticosteron muss dies der Fall gewesen sein, da sie zusätzlich noch die Bildung von Corticosteron stark hemmten (s. Tab. 3), obwohl die Aldehyde gleichzeitig z.T. ebenfalls reduziert wurden; 21-Dehydro-S wurde ausserdem noch 11 $\beta$ -hydroxyliert. Corticosteron, S bzw. Cortisol selbst hemmten die Corticosteron-Bildung nicht.

4. *Östrogene*. – Von Östradiol (17 $\beta$  und 17 $\alpha$ ) ist bekannt, dass es eine direkte Hemmwirkung auf die Corticosteron- bzw. Cortisol-Bildung der Nebennieren verschiedener Species auszuüben vermag [25–28]. Gelegentlich ist dagegen eine geschlechtsspezifische Aktivierung beobachtet worden [29], die aber eher indirekt zustande gekommen sein dürfte.

Auch in unserem System konnten wir noch mit 30  $\mu$ g/ml eine Hemmung herbeiführen, die sich jedoch nicht auf alle Corticosteroide erstreckte; so hemmten Östron und Östradiol (17 $\beta$ ) hauptsächlich nur die Aldosteron-Bildung, 17 $\alpha$ -Äthinylöstradiol (17 $\beta$ ) jedoch auch noch die Corticosteron-Bildung. Andererseits zeigten z. B. 17 $\alpha$ -

Äthynylöstradiol-(17 $\beta$ )-3-methyläther oder die Östriole keinerlei Wirkung. In bezug auf unser System scheinen die Östrogene keine Sonderstellung einzunehmen und lassen sich gewissermassen mit der folgenden Gruppe der C-19-Steroide vergleichen.

**5. Androgene und verschiedene Androstendion-Derivate.** – Im Laufe unserer Untersuchungen einer grösseren Anzahl von C-19-Steroiden haben TSUTSUI et al. [30] nachgewiesen, dass Dehydroepiandrosteron eine Abnahme der NADPH-Bildung in Ratten-Nebennierenhomogenat verursacht, womit ein indirekter Hinweis auf einen möglichen hemmenden Effekt auf die Corticosteroidproduktion gegeben war. POTTS und Mitarbeiter [16] zeigten ebenfalls auf indirekte Weise, dass 2 $\alpha$ -Cyano-4,4,17 $\alpha$ -trimethyl-androst-5-en-17 $\beta$ -ol-3-on und ein Derivat davon einen Block auf die Biosynthese der Corticosteroide ausüben. Inzwischen haben SHARMA und Mitarbeiter sowohl mit Hilfe einer Mitochondrienpräparation [31] wie einer Mikrosomenfraktion [32] aus Rinder-Nebennieren mässig starke, aber eindeutig hemmende Effekte verschiedener Androgene auf die 11 $\beta$ -Hydroxylierung bzw. die 21-Hydroxylierung auffinden können. In Tab. 4 geben wir eine Auswahl der etwa 100 geprüften C-19-Steroid-Derivate in ihrer Wirkung auf die Biosynthese von Cortisol, Corticosteron und Aldosteron aus endogenem Cholesterin. Hierbei liess sich wiederum die Bildung von Aldosteron am leichtesten, diejenigen von Cortisol am schwersten hemmen; Corticosteron lag in der Mitte. Durch Androst-4-en-3,17-dion (No. 1) liessen sich besonders Corticosteron und Aldosteron mit 30  $\mu$ g/ml relativ gut hemmen. Die Einführung einer Sauerstofffunktion in 11 (Nr. 7 und 8) führte eher zu einer Abschwächung. Andere Änderungen am Androstendion-Molekül wie Reduktion der 17-Keto-

Tabelle 4. *Hemmung der Steroidbiosynthese in vitro aus endogenem Cholesterin durch verschiedene Androstendion-Derivate*

	EK <sub>50</sub> in $\mu$ g/ml <sup>a)</sup>		
	Cortisol <sup>b)</sup>	Corticosteron <sup>b)</sup>	Aldosteron
1 Androst-4-en-3,17-dion <sup>c)</sup>	100	30	30
2 Testosteron	> 30	> 30	> 30
3 17-epi-Testosteron	> 30	> 30	> 30
4 5 $\alpha$ -Androstan-3,17-dion	> 30	> 30	30
5 Dehydroepiandrosteron	>150	150	150
6 Androsta-1,4-dien-3,17-dion	> 60	> 60	60
7 11 $\beta$ -Hydroxy-androst-4-en-3,17-dion	150	30	30
8 Androst-4-en-3,11,17-trion	>150	60	60
9 19-Hydroxy-androst-4-en-3,17-dion	> 30	> 30	30
10 19-Hydroxy-testosteron	30	30	6
11 19-Nor-androst-4-en-3,17-dion	> 30	> 30	10
12 19-Nor-androst-5(10)-en-3,17-dion	> 150	150	30
13 19-Nor-testosteron	> 30	> 30	30
14 19-Nor-androst-4-en-17-on	> 30	> 30	2
15 19-Nor-androst-4-en-17 $\beta$ -ol	> 30	> 30	15
16 Testololacton	> 30	> 30	30

a) EK<sub>50</sub>: effektive Konzentration, welche die Steroidbildung gegenüber den Kontrollen um mindestens 50% reduziert

b) Vgl. Fussnote b) in Tab. 1

c) Wurde gleichzeitig zu 80–85% in 11 $\beta$ -Hydroxy-androstendion und einige höher polare Derivate umgesetzt



gruppe, der 4,5-Doppelbindung, ergaben keine Verstärkung der Inhibition. Hingegen sticht 19-Hydroxytestosteron (Nr. 10) als recht beachtlicher Totalblocker hervor, während 19-Nor-androstendion (Nr. 11) und insbesondere 19-Nor-androst-4-en-17-on (No. 14, ohne Sauerstofffunktion an C-3!) präferentiell und stark Aldosteron blockieren. Weitere 3-Desoxo-Steroide wie Nr. 15 und andere scheinen allgemein stärker zu hemmen als die entsprechenden 3-Keto-Analogen.

Die Vorstellung von McKERNS [33], dass solche Stoffe dadurch eine Regulation der adrenalen Funktion bewirken, dass sie die Bindung von NADP an die zugehörigen Dehydrogenasen kompetitiv hemmen, scheint damit höchst unwahrscheinlich bzw. von ganz untergeordneter Bedeutung.

In Ergänzung zu unseren Versuchen prüften wir, ob einige Steroide dieser Gruppe auch *in vivo* eine Hemmung der Corticosteroidgenese bewirken. An der Ratte mit kanulierter Nebennierenvene liess sich die Sekretion von Corticosteron und Aldosteron z. B. durch 19-Hydroxytestosteron (Nr. 10) mit 3 mg/kg i.v. nicht hemmen; dies gelang jedoch insbesondere hinsichtlich Aldosteron mit 19-Nortestosteron (Nr. 13) mit 10 mg/kg i.v. Klinisch liess sich eine direkte Hemmung der Nebennierenrindenfunktion im Fall von 17 $\alpha$ -Methyl-19-nor-testosteron wahrscheinlich machen [38].

YUDAEV & DRUZHININA [34] beobachteten, dass Androsten-3,11,17-trion (Nr. 8 = Adrenosteron) in Nebennierenschnitten des Meerschweinchens eine starke Verschiebung des Gleichgewichts von Cortisol nach Cortison verursacht. Von einem solchen Einfluss von Adrenosteron oder anderen C-19-11-Ketosteroiden auf das 11-ol/on-Gleichgewicht war in unserem System nichts zu merken. Der Anteil an Cortison bzw. 11-Dehydrocorticosteron blieb auch in allen übrigen Fällen praktisch konstant niedrig. Umgekehrt wurden 11-Ketosteroide auch nicht merklich zu 11 $\beta$ -Hydroxyderivaten reduziert.

Im Vergleich zu den weiter oben beschriebenen Hemmungen erwies sich die Androstendion-Gruppe als die bisher weitaus wirksamste unter den Steroiden. Wie wir früher zeigen konnten [22], beträgt die für eine 50-proz. Hemmung nötige Konzentration der höchstwirksamen Verbindungen anderer Stoffklassen etwa 1  $\mu$ g/ml. Wir werden in einer folgenden Arbeit darauf zurückkommen.

Tabelle 5. *Rf*-Werte schwach polarer Vorstufen der Corticosteroid-Biosynthese

	BUSH A <sup>a)</sup>	Decanit <sup>b)</sup>
Cholesterin	0,95	0,93
20 $\alpha$ -Hydroxycholesterin	0,82	0,75
20 $\alpha$ -Hydroxy-22-keto-cholesterin	0,84	0,66
20 $\alpha$ , 22 $\beta$ -Dihydroxycholesterin	0,48	0,25
20 $\alpha$ , 22 $\delta$ -Dihydroxycholesterin	0,0	0,0
17,20 $\alpha$ -Dihydroxycholesterin	0,45	0,27
Pregnenolon	0,55	0,32
Progesteron	0,69	0,41
7 $\beta$ -Hydroxycholesterin	0,62	0,66

<sup>a)</sup> Petroläther-Methanol-Wasser (1:8:2), äquilibriert oder imprägniert, 38°C, absteigender Lauf 28 cm, WHATMAN Papier Nr. 1, in Streifen.

<sup>b)</sup> Decalin-Nitromethan-Methanol (10:5:5), äquilibriert oder imprägniert, 38°C, absteigender Lauf 28 cm, WHATMAN Papier Nr. 1, in Streifen.

### Experimenteller Teil

Material und Methoden wie teilweise früher ausführlich beschrieben [1]. Die Analyse der Hexanextrakte auf Pregnenolon, Progesteron, Cholesterin und Derivate wurde ausser im System «Decanit» [1] im System BUSH A durchgeführt; Rf-Werte s. Tab. 5. Bei Einsatz radioaktiver Verbindungen wurde parallel zu den Chromatogrammen für die kolorimetrisch-fluorometrische Bestimmung der nicht markierten Steroide ein zweites Aliquot zur radiometrischen Bestimmung der markierten Steroide chromatographiert; gleichzeitig wurde ein entsprechendes Aliquot unchromatographiert radiometriert. Die Bestimmung von Aldosteron im Nebennieren-Venenblut der Ratte, welches in 30-Minuten-Perioden gesammelt wurde, erfolgte nach der in [35] angegebenen Doppelisotopentechnik. In einem Aliquot des gleichen Extraktes wurde Corticosteron papierchromatographisch (System F/EBW, vgl. [1]) bestimmt.

Für tatkräftige Mitarbeit danken wir den Herren H. STEFFEN, W. ROSSMANN, A. MILANI und B. LEONARDI bestens. Herrn Dr. K. SCHMID sind wir für die Hilfe bei der Radiometrie, Herrn E. VON ARX, Frl. M. MERKLE und Frl. R. HALG für die zuverlässige Hilfe bei der Chromatographie sehr zu Dank verpflichtet. Den Herren Dres G. ANNER, J. KALVODA, L. EHMANN, C. MEYSTRE, J. SCHMIDLIN, H. UEBERWASSER und P. WIELAND verdanken wir zahlreiche Steroide, Dr. M. GUT und Dr. K. SHIMIZU die Überlassung von  $20\alpha$ -Hydroxycholesterin,  $20\alpha, 22R$ - und  $20\alpha, 22S$ -Dihydroxycholesterin und  $17, 20$ -Dihydroxycholesterin.

Herrn Dr. P. DESAULLES danken wir für die Durchführung der Nebennieren-Venenkanulationen.

### SUMMARY

The direct influence of various steroids on adrenal steroid biosynthesis *in vitro* was investigated. Besides their ability to act as precursors, cholesterol on the one hand, and pregnenolone and progesterone on the other offer examples of substrate or feedback inhibitors, respectively.

Corticosteroids and certain of their analogues seem to produce some relatively weak end-product inhibition.

The inhibitory effect of oestrogens, though not of a particularly high degree, proved to be fairly specific.

Amongst a large number of derivatives of androst-3-ene-4,17-dione, a relatively strong overall inhibition by 19-hydroxy-testosterone has been found; on the other hand, 19-nor-androstenedione showed a very strong inhibitory effect which was confined to aldosterone biosynthesis.

Forschungslaboratorien des Pharma-Departementes der  
CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, BASEL

### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] F. W. KAHNT & R. NEHER, *Helv.* **48**, 1457 (1965).
- [2] S. ROY & V. B. MAHESH, *Endocrinology* **74**, 187 (1964).
- [3] H. SCHRIEBERS, G. SCHAKLAU & F. POHL, *Acta Endocrinologica* **48**, 263 (1965).
- [4] R. GAUNT, J. J. CHART & A. A. RENZI, *Ergebnisse der Physiologie*, Bd. 56, Springer 1965.
- [5] P. A. MARKS & J. BANKS, *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **46**, 447 (1960).
- [6] S. KOIDE, C. CHEN & S. FREEMAN, *Biochim. Biophys. Acta* **63**, 186 (1962).
- [7] R. A. FERRARI & A. ARNOLD, *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 357 (1963).
- [8] F. ROSEN & C. A. NICHOL, *Vitamins and Hormones* **27**, 135 (1963).
- [9] W. ALBRECHT, F. W. KAHNT, R. NEHER & W. SCHULER, *J. Arterioscl. Res.* **5**, 369 (1965).
- [10] M. K. BIRMINGHAM & E. KURLENTS, *Endocrinology* **62**, 47 (1958).
- [11] F. G. PÉRON, F. MONCLOA & R. I. DORFMAN, *Endocrinology* **67**, 379 (1960).
- [12] S. FUKUI, K. TAKEUCHI, F. WATANABE, A. KUMAGAI, S. SANO & K. NISHINO, *Endocrin. Japon.* **8**, 43 (1961).

- [13] G. FEKETE & P. GÖRÖG, *J. Endocrinology* 27, 123 (1963).
- [14] G. FEKETE & Sz. SZEBERÉNYI, *Steroids* 6, 159 (1965).
- [15] R. NEHER & F. W. KAHNT, *Drugs and Enzymes*, Proc. 2nd Intern. Pharmacolog. Meeting, Prag 1963; Pergamon, Oxford 1965, p. 209.
- [16] G. O. POTTS, D. F. BURNHAM & A. L. BEYLER, *Fed. Proc.* 22, 166, 270 (1963).
- [17] S. B. KORITZ & P. F. HALL, *Biochemistry* 3, 1298 (1964); *Biochim. Biophys. Acta* 93, 215, 441 (1964); K. SHIMIZU, M. HAYANO, M. GUT & R. I. DORFMAN, *J. biol. Chemistry* 236, 695 (1961).
- [18] R. I. DORFMAN, *Cancer Research* 17, 535 (1957).
- [19] C. GUAL, A. E. LEMUSS, I. I. KLINE, M. GUT & R. I. DORFMAN, *J. Clin. Endocrinology* 22, 1193 (1962).
- [20] K. SHIMIZU, *J. biol. Chemistry* 240, 1941 (1965).
- [21] J. MONOD, J. P. CHANGEUX & F. JACOB, *J. Mol. Biol.* 6, 306 (1963).
- [22] R. NEHER & F. W. KAHNT, *Experientia* 21, 310 (1965).
- [23] W. C. BLACK, R. S. CRAMPTON, A. S. VERDESCA, R. I. NEDELJKOVIC & J. G. HILTON, *Fed. Proc.* 20, 177 (1961).
- [24] P. VECSEI, K. FARKAS, V. KEMÉNY & M. HARANGOZÓ, *Steroids* 5, 415 (1965).
- [25] K. W. MCKERNS, *Endocrinology* 60, 130 (1957).
- [26] K. W. MCKERNS, *Biochim. Biophys. Acta* 69, 425 (1963).
- [27] R. C. TROOP & G. J. POSANZA, *Arch. Biochem. Biophys.* 98, 444 (1962).
- [28] P. CUSHMAN JR., M. A. PULIDO & J. G. HILTON, *Acta Endocrinologica* 48, 225 (1965).
- [29] J. I. KITAY, *Nature* 192, 358 (1961).
- [30] E. A. TSUTSUI, P. A. MARKS & P. REICH, *J. biol. Chemistry* 237, 3009 (1962).
- [31] D. C. SHARMA, E. FORCHIELLI & R. I. DORFMAN, *J. biol. Chemistry* 238, 572 (1963).
- [32] D. C. SHARMA & R. I. DORFMAN, *Biochemistry* 3, 1093 (1964).
- [33] K. W. MCKERNS, *Biochim. Biophys. Acta* 71, 710 (1963).
- [34] N. A. YUDAEV & K. V. DRUZHININA, *Proc. 5th Intern. Congr. Biochem. Moscow 1961*, 7, 361 (1963).
- [35] R. NEHER, 9. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Mai 1962. Springer, 1963, p. 21.
- [36] E. GLÁZ & A. GÖRGÉNYI, *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 18, 38 (1961).
- [37] T. A. FARMER JR., S. R. HILL JR., J. A. PITTMAN JR., & J. W. HEROD JR., *J. Clin. Endocrinology Metab.* 27, 433 (1961).
- [38] L. G. HUIS IN'T VELD, B. LOUWERENS & P. A. F. VAN DER SPEK, *Acta endocrinologica* 33, 388 (1960).
- [39] R. I. DORFMAN & F. UNGAR, *Metabolism of Steroid Hormones*, Academic Press, New York, 1965.
- [40] K. SHIMIZU, S. SHIMAO & M. TANAKA, *Steroids*, Suppl. I, 85 (1965).
-