

Über die Synthese von 3 α -Hydroxy-5 β -androstanon-(17)-glucuronid in der Rattenleber*

Von WOLFGANG STAIB, GERD ALBAUM und KLAUS DÖNGES

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Düsseldorf**

(Der Schriftleitung zugegangen am 3. November 1966)

Zusammenfassung: In den Gallenflüssigkeiten von lebenden Ratten und von isoliert perfundierten Rattenlebern konnte nach oraler Verabreichung von 3 α -Hydroxy-5 β -androstanon-(17) bzw. nach Infusion von 3 α -Hydroxy-5 β -androstanon-(17)-hemisuccinat

3 α -Hydroxy-5 β -androstanon-(17)-glucuronid in gleicher prozentualer Menge isoliert und identifiziert werden. Dies spricht für einen physiologischen Funktionszustand der isolierten, mit einem halbsynthetischen Blutmedium perfundierten Rattenleber.

Summary: 3 α -Hydroxy-5 β -androstanon-(17) was fed to rats, or its hemisuccinate was infused into isolated, perfused rat liver. In each case, there was the same percentage conversion into 3 α -hydroxy-

5 β -androstanon-(17)-glucuronide, which was isolated from the bile and identified. This indicates that the liver is physiologically functional when perfused with a semi-synthetic blood medium.

Die Ratte scheidet nach Verabreichung von androgenwirksamen Steroiden den größten Teil der Metaboliten mit der Galle in den Darm aus^{1–4}.

Deshalb bietet sich zum Studium des Androgenstoffwechsels in der Rattenleber die Untersuchung der Gallenflüssigkeit als eine geeignete Methode an. Dabei bleibt aber zu berücksichtigen, daß beim lebenden Tier neben Resorptionsvorgängen die Stoffwechselleistungen der Leber unter humoraler und nervaler Beeinflussung stehen. Sollen derartige Einflüsse ausgeschaltet werden, wird man die Untersuchungen an Leberschnitten und -homogenaten oder besser mit Hilfe der künstlichen Durch-

strömung des isolierten Organs durchführen. Die letzte Methode gestattet mehr als die übrigen Versuchsanordnungen, Rückschlüsse auf die Verhältnisse in vivo zu ziehen⁵.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb in vergleichenden Untersuchungen der Stoffwechsel von 3 α -Hydroxy-5 β -androstanon-(17) an der lebenden Ratte und an der isoliert perfundierten Rattenleber untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

1. Untersuchungen an der lebenden Ratte

Nach Verabfolgung hoher Dosen Testosteron fanden wir bei früheren Versuchen in der Gallenflüssigkeit der Ratte mehrere Metaboliten, darunter zwei 17-Oxosteroide, die sich chromatographisch wie Androsteron und 3 α -Hydroxy-5 β -androstanon-(17) verhielten^{3, 4}. Die Exkretionsraten dieser Androgene lagen im Vergleich zum menschlichen Testosteronstoffwechsel recht niedrig. Wir wandten uns deshalb der näheren Untersuchung des 3 α -Hydroxy-5 β -androstanon-(17)-Stoffwechsels in der Rattenleber zu.

⁵ L. L. MILLER, W. T. BURKE u. D. E. HAFT, in *Some Aspects of Amino Acid Supplementation*, p. 44, Rutgers University Press., New Brunswick, N. J. 1956.

* Teilweise vorgetragen auf dem „Symposium on Steroidhormones“ in Ghent (Belgien) 17. bis 19. Juni 1965.

*** Postanschrift: Prof. Dr. W. STAIB, 4 Düsseldorf 1, Witzelstraße 111.

¹ J. J. ASHMORE, W. H. ELLIOTT, E. A. DOISY JR. u. E. A. DOISY, *J. biol. Chemistry* **200**, 661 [1953].

² W. STAIB, W. TELLER u. R. RUENAUVER, *Naturwissenschaften* **46**, 209 [1959].

³ W. STAIB, K. DÖNGES u. W. TELLER, *diese Z.* **324**, 32 [1961].

⁴ W. STAIB, K. DÖNGES u. G. ALBAUM, Vortrag auf der gemeinsamen Tagung der Deutschen, Schweizerischen und Französischen Biochemiker, Straßburg, September 1963.

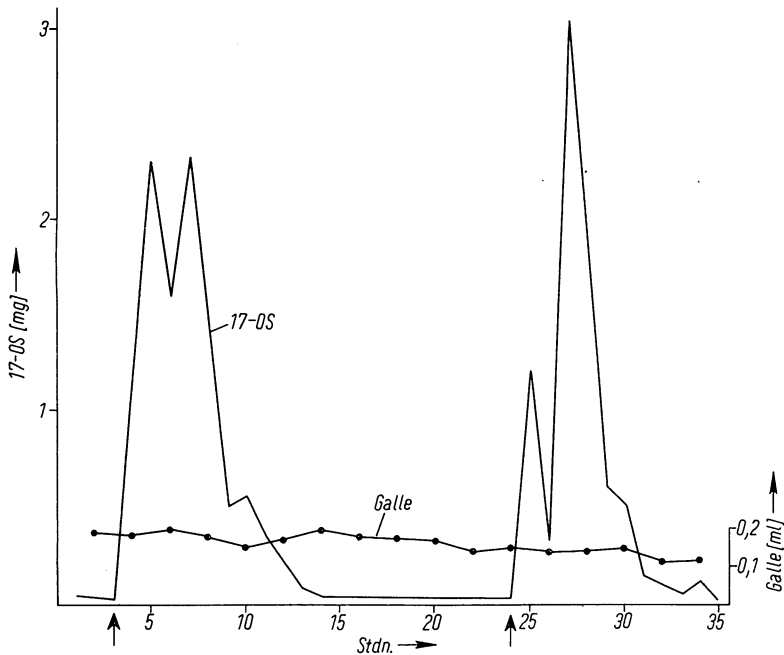


Abb. 1. 17-Oxosteroid-Gehalt in der Rattengalle nach Gabe von 2×20 mg 3α -Hydroxy- 5β -androstanon-(17) per Schlundsonde. Linke Ordinate: Gesamt-17-Oxosteroid-Gehalt (17-OS); rechte Ordinate: in je 2 Stdn. ausgeschiedene Gallenmenge; Abszisse: Versuchsdauer in Stdn.; linker Pfeil: Zeitpunkt der Verabfolgung von 20 mg 3α -Hydroxy- 5β -androstanon-(17); rechter Pfeil: Zeitpunkt der Verabfolgung weiterer 20 mg 3α -Hydroxy- 5β -androstanon-(17) + 4 g Glucose.

Nach oraler Verabreichung einer großen Menge (20 mg) 3α -Hydroxy- 5β -androstanon-(17) wurden über eine Versuchsdauer von 24 Stdn. 50 bis 70% des zugeführten Steroids als ZIMMERMANN-positive Material mit der Gallenflüssigkeit ausgeschieden. Dabei stieg die Exkretion der 17-Oxosteroide unmittelbar nach der 3α -Hydroxy- 5β -androstanon-(17)-Verabfolgung stark an, um im Verlaufe von 20 Stdn. wieder auf Werte zurückzukehren, die der Basalexkretion von 17-Oxosteroiden in der Rattengalle entsprechen. Glucosezufuhr zum Zeitpunkt der Steroid-Applikation zeigte keine Beeinflussung der 17-Oxosteroid-Ausscheidung in der Gallenflüssigkeit (Abb. 1).

Zur näheren Charakterisierung der ausgeschiedenen Metaboliten trennten wir Gallenextrakte in freie und konjugierte 17-Oxosteroide auf und untersuchten insbesondere die Glucuronidfraction.

Die Glucuronidfraction enthielt lediglich eine 17-Oxosteroid-positive Zone, die sich infrarotspektrographisch als 3α -Hydroxy- 5β -androstanon-(17)-glucuronid erwies. Nach β -Glucuronidase-Hydrolyse des Konjugates konnte der Steroidanteil anhand seiner Schwefelsäure-UV-Spektren

(Abb. 2a u. b) und seines Infrarotspektrums als 3α -Hydroxy- 5β -androstanon-(17) identifiziert werden.

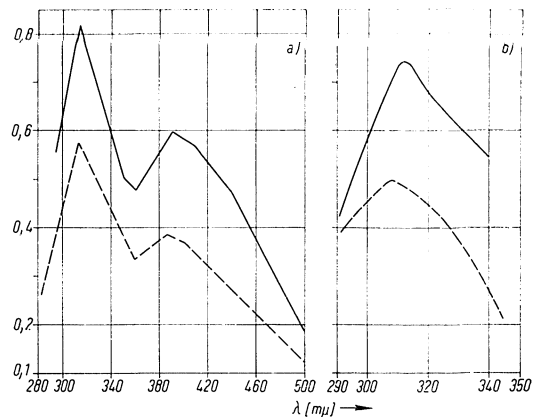


Abb. 2. UV-Spektren. a: in rauchender Schwefelsäure; b: in konz. Schwefelsäure. Ordinate = Extinktion. Ausgezogene Linien = 3α -Hydroxy- 5β -androstanon-(17) als Reinsubstanz; gestrichelte Linien = 3α -Hydroxy- 5β -androstanon-(17) aus dem Glucuronid der Rattengalle gewonnen.

Tab. 1. Quantitative Zusammensetzung der gereinigten Glucuronid-Fraktion aus Sammelgalle.

Versuchsanordnung	Glucuronsäure [mg]	17-Oxosteroide [mg]	Mol-Verhältnis Glucuronsäure : 17-Oxosteroide
In-vivo-Versuch: 2 × 30 mg HA*	3,41	5,03	1:0,98
Perfundiert mit 10 mg HAS** (7,7 mg HA)	0,36	0,59	1:1,09

* HA = 3α-Hydroxy-5β-androstanon-(17). ** HAS = 3α-Hydroxy-5β-androstanon-(17)-succinat.

Quantitative Bestimmungen ergaben ein Molekulargewichtsverhältnis Glucuronsäure zu 3α-Hydroxy-5β-androstanon-(17) von nahezu 1:1 (Tab. 1).

2. Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenleber

Wir führten der mit einem künstlichen Medium⁶ durchströmten, isolierten Rattenleber 3α-Hydroxy-5β-androstanon-(17)-hemisuccinat (10 mg) zu und fingen die Gallenflüssigkeit wie bei den In-vivo-Versuchen über eine Ductus-choledochus-Drainage auf. Zur Überwindung der operationsbedingten, anoxischen Phase wurde das isolierte Organ zunächst 30 Min. lang mit reinem Perfusionsmedium durchströmt, bevor mittels einer Infusionsmaschine das gelöste Steroid über einen Zeitraum von 2 Stdn. der Leber kontinuierlich angeboten wurde. Die Gesamt-Perfusionsdauer betrug 6 Stdn. Nach der Auftrennung des Steroidextraktes aus der aufgefangenen Gallenflüssigkeit in freie und konjugierte Steroide wurden die einzelnen Metaboliten papier- bzw. dünn-schichtchromatographisch isoliert. Dabei fanden sich in der Fraktion der freien Steroide zwei deutliche 17-Oxosteroid-positive Zonen, die sich chromatographisch wie 3α-Hydroxy-5β-androstanon-(17) und 5β-Androstandion-(3.17) verhielten. Die Glucuronidfraktion enthielt Glucuronsäure und 3α-Hydroxy-5β-androstanon-(17) in einem Molekulargewichtsverhältnis von nahezu 1:1 (s. Tab. 1) und bestand lediglich aus 3α-Hydroxy-5β-

⁶ M. SCHIMASSEK, Biochem. Z. 336, 460 [1963].

androstanon-(17)-glucuronid. Nach β-Glucuronidase-Hydrolyse des Konjugates wurde 3α-Hydroxy-5β-androstanon-(17) infrarot-spektrographisch identifiziert. Nach Beendigung des jeweiligen Durchströmungsversuchs wurde auch das Perfusionsmedium auf seinen Steroidgehalt untersucht. Wir isolierten aus der Fraktion der freien Steroide ebenso wie aus der entsprechenden Fraktion der Gallenflüssigkeit zwei 17-Oxosteroide, die sich chromatographisch wie 3α-Hydroxy-5β-androstanon-(17) und 5β-Androstandion-(3.17) verhielten und aus der Fraktion der konjugierten Steroide drei Konjugate, die chromatographisch wie 3α-Hydroxy-5β-androstanon-(17)-glucuronid, 3α-Hydroxy-5β-androstanon-(17)-sulfat sowie nicht verändertes, zugeführtes 3α-Hydroxy-5β-androstanon-(17)-hemisuccinat liefen. Tab. 2 gibt einen Überblick über die quantitativen Ergebnisse eines typischen Perfusionsversuchs. Die Gesamtmenge des in den einzelnen Fraktionen nachgewiesenen 17-Oxosteroid-positiven Materials (s. Tab. 2) betrug, bezogen auf das zugeführte 3α-Hydroxy-5β-androstanon-(17), etwa 50%. Wahrscheinlich sind die restlichen 50% des eingesetzten Steroids in der Leber zurückgeblieben. Die Experimente zeigen, daß die isolierte, mit einem künstlichen Medium perfundierte Rattenleber durchaus in der Lage ist, die Steroidglucuronid-Synthese durchzuführen. In beiden Versuchsreihen (in vivo und Leberperfusion) konnte 3α-Hydroxy-5β-androstanon-(17)-glucuronid nach Zufuhr der freien Verbindung bzw. des Hemisuc-

Tab. 2. Wiedergefundene Steroidmenge in Galle und Perfusionsmedium nach Infusion von 10 mg 3α-Hydroxy-5β-androstanon-(17)-hemisuccinat [= 7,7 mg 3α-Hydroxy-5β-androstanon-(17)].

Perfusionsmedium 17-Oxosteroide [mg]		Galle 17-Oxosteroide [mg]		Gesamt-17-Oxosteroide [mg]
frei	konjugiert	frei	konjugiert	
1,92	1,22	0,065	0,594	3,8

cinats aus der Gallenflüssigkeit extrahiert und identifiziert werden. Bezogen auf die eingesetzte Steroidmenge betrug der 17-Oxosteroid-Anteil, der als 3 α -Hydroxy-5 β -androstanon-(17)-glucuronid identifiziert wurde, jeweils 8% (Tab. 1). Danach verlief die Steroidkopplung an Glucuronsäure in den Perfusionsversuchen in gleichem Umfang wie beim lebenden Tier. Diese quantitative Übereinstimmung spricht für die Brauchbarkeit der isolierten Leberdurchströmung zum Zwecke des Studiums ihrer Steroidstoffwechselleistungen.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT durchgeführt.

Experimenteller Teil

Wir verwendeten männliche Inzuchtratten, Stamm Wistar II (Fa. F. Gierlich, Bochum), von 200 bis 300 g Gewicht. Die Tiere wurden mit einer Standarddiät (Mischfutter der Fa. A. Höveler, Langenfeld/Rhld.) gefüttert und erhielten Wasser ad libitum.

Die Operation erfolgte in Äthernarkose (Äther pro narcosi). Dabei wurde nach medialem Abdominalschnitt der Ductus choledochus frei präpariert, peripher unterbunden und in den proximalen Anteil ein Polyäthylkatheter eingebunden, über den die Gallenflüssigkeit durch die Bauchhaut nach außen in ein Reagenzglas abgeleitet werden konnte. Für die Zeit der Versuchsdauer wurden die Tiere in enge Käfige gebracht, die keine Möglichkeit der Lageveränderung boten, um ein Abknicken der Ductus-choledochus-Drainage zu vermeiden. Während des Versuchs erhielten die Tiere lediglich Wasser ad libitum.

Die Leberpräparation zum Zwecke der künstlichen Durchströmung sowie die Perfusion selbst wurden in der von MILLER^{5,7,8} beschriebenen Weise durchgeführt. Als Perfusionsmedium verwendeten wir eine Suspension aus gewaschenen Rindererythrocyten in einer Albumin-TYRODE-Lösung. Das Medium enthielt pro 100 ml 2,6 g Rinderalbumin reinst (Behring-Werke, Marburg), Erythrocytensuspension entsprechend 10 g Hämoglobin, 1 mg Terramycin und 250 mg Glucose.

Die Extraktion der Gesamt-17-Oxosteroide aus den 2-Stdn.-Gallenfraktionen (s. Abb. 1) erfolgte nach

⁷ L. L. MILLER, C. G. BLY, M. L. WATSON u. W. F. BALE, J. exp. Medicine **94**, 431 [1951]; M. GREEN u. L. L. MILLER, J. biol. Chemistry **235**, 3202 [1960].

⁸ L. L. MILLER, in Free Amino Acid Pools — Distribution, Formation and Function, p. 708, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1961.

Äthanolfällung mit Äther/Äthanol 3:1 (v/v). Der Extrakt wurde eingedampft und zur hydrolytischen Spaltung der Steroidkonjugate mit 2N H₂SO₄ 30 Min. lang im kochenden Wasserbad erhitzt. Im Anschluß daran konnten die mit Äther extrahierten Gesamt-17-Oxosteroide nach ZIMMERMANN⁹ bestimmt werden.

Die Isolierung von 3 α -Hydroxy-5 β -androstanon-(17)-glucuronid aus den Gallenflüssigkeiten wurde nach nebenstehendem Schema vorgenommen:

Die freien und konjugierten 17-Oxosteroide wurden auf den Papierchromatogrammen bzw. Elektrophoresestreifen durch Anfärben eines Rand- bzw. Mittelstreifens mit 17-Oxosteroid-Reagenz sichtbar gemacht und die nicht angefärbte restliche Fraktion eluiert.

In jeweils kleinen, aliquoten Mengen der chromatographisch gereinigten 17-Oxosteroid-positiven Fraktionen wurden die 17-Oxosteroide mit *m*-Dinitro-benzol nach der Methode von ZIMMERMANN⁹ und die Glucuronsäure mittels Naphtoresorcin¹⁰ quantitativ bestimmt.

Die Extraktion der Steroide aus dem Perfusionsmedium erfolgte mit Äthanol und Äther. Das Perfusionsmedium wurde zu diesem Zweck zunächst mit der fünffachen Äthanolmenge versetzt und 15 Min. lang bis zum Sieden erhitzt. An die Äthanolextraktion schloß sich eine Ätherextraktion (fünffaches Volumen) an.

Die vereinigten Extrakte wurden eingedampft und in Wasser aufgenommen. Danach erfolgte die Extraktion der freien und konjugierten Steroide in der schon beschriebenen Weise.

Die Aufnahme der IR-Spektren (bei Wellenlängen von 2 bis 15 μ) wurde mit Hilfe des Infrarotspektrographen IR 8 der Firma Beckman Instruments, München (Steroidmenge etwa 150 μ g; KBr Mikropreßlinge von 1 $\times$ 6 mm, wie früher beschrieben)¹¹ durchgeführt. 3 α -Hydroxy-5 β -androstanon-(17)-glucuronid stellten wir nach einem von uns früher beschriebenen Verfahren dar¹².

3 α -Hydroxy-5 β -androstanon-(17)-hemisuccinat wurde in Anlehnung an die Methode von RUZICKA et al.¹³ aus 3 α -Hydroxy-5 β -androstanon-(17), Bernsteinsäureanhydrid und Pyridin dargestellt.

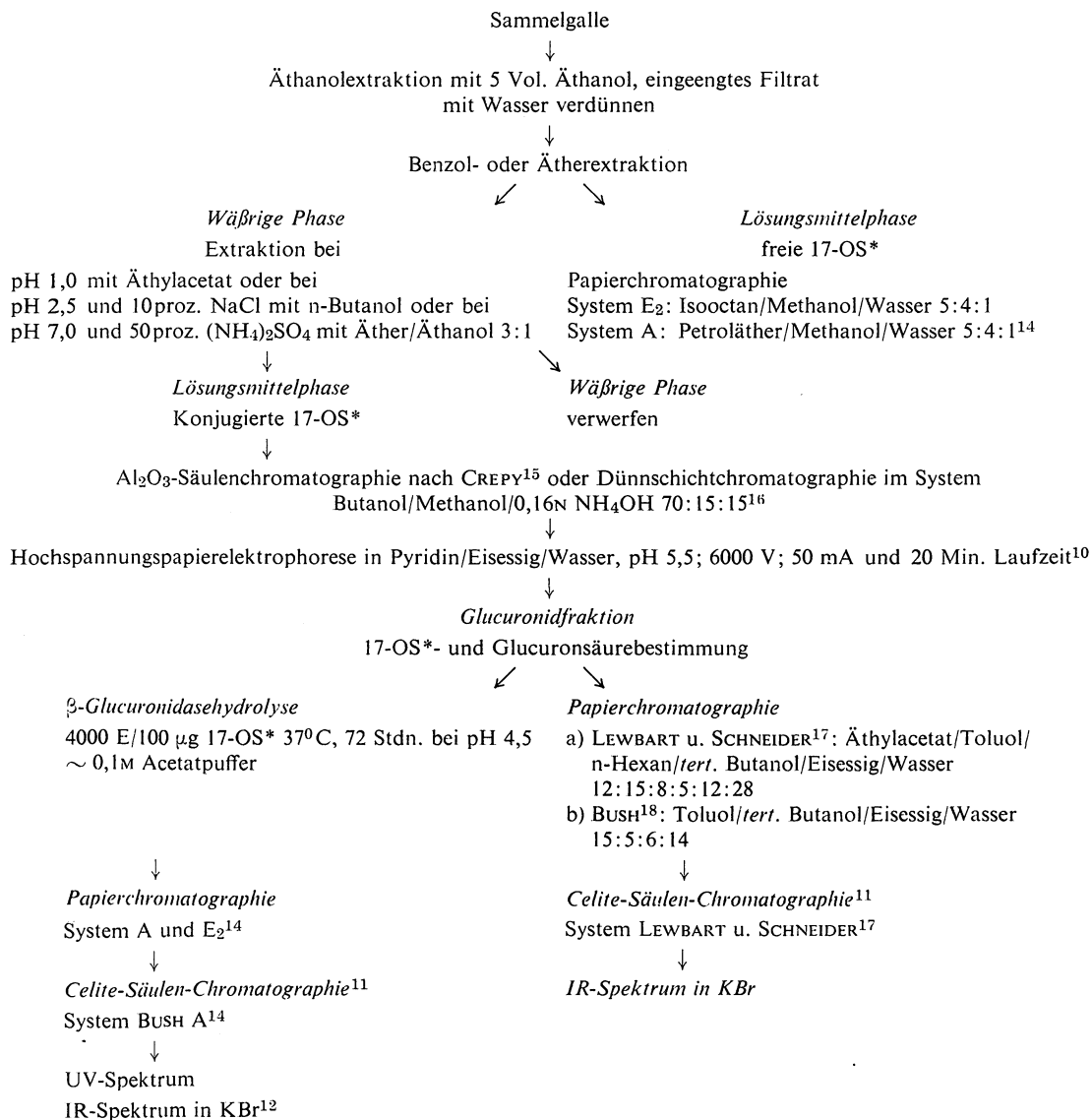
⁹ W. ZIMMERMANN, H. N. ANTON u. D. POUTIUS, diese Z. **289**, 91 [1952].

¹⁰ H. PELZER u. W. STAIB, Clin. chim. Acta [Amsterdam] **2**, 407 [1957]; H. PELZER, W. STAIB u. D. OTT, diese Z. **312**, 15 [1958].

¹¹ K. DÖNGES u. W. STAIB, J. Chromatogr. [Amsterdam] **8**, 25 [1962].

¹² W. STAIB u. K. DÖNGES, diese Z. **319**, 233 [1960].

¹³ L. RUZICKA, M. GOLDBERG u. J. MEYER, Helv. chim. Acta **18**, 210 [1935].



* 17-OS = 17-Oxosteroid.

¹⁴ J. E. BUSH, Biochem. J. **50**, 370 [1952].

¹⁵ O. CREPY, M. F. JAYLE u. F. MESLIN, Acta endocrinol. [Kopenhagen] **24**, 233 [1957].

¹⁶ H. SCHRIEFERS, H. K. KLEY u. M. OTTO, diese Z. **341**, 215 [1965].

¹⁷ J. J. SCHNEIDER u. M. L. LEWBART, Recent Progr. Hormone Res. **15**, 201 [1959].

¹⁸ J. E. BUSH, Biochem. J. **67**, 23 P [1957].