

## 121. Über die Wirkung von weiblichen Sexualhormonen auf die Meerschweinchenzitze.

A. Zur quantitativen Auswertung des lokalen *Nipple-Test*.

B. Hyperpigmentierung nach lokaler Applikation von weiblichem Sexualhormon,

von F. Fierz.

(22. VI. 39.)

### A. Zur quantitativen Auswertung des lokalen *Nipple-Test*.

„Um die relative Wirksamkeit von brunstauslösenden Hormonpräparaten festzustellen, gibt es zwei Methoden, nämlich die vaginalabstrichmethode und die Methode der Feststellung des Uterusgewichtes. Bei der ersten Methode ist die Reaktion auf das Hormon qualitativ, und die Wirkung wird an dem Prozentsatz der Tiere, bei denen die Reaktion eintritt, gemessen. Bei der zweiten Methode ist die Reaktion quantitativ. Die erste Methode wird noch allgemein gebraucht, die zweite ist aber zuverlässiger, da Fehler auf Grund verschiedener Auslegung nicht vorkommen können.“ (*Burn*)<sup>1</sup>).

Diesen zwei Methoden möchten wir eine dritte an die Seite stellen, die wir als „Lokalen *Nipple-Test*“ bezeichnen. Seine Vor- und Nachteile gegenüber den beiden oben genannten Tests sollen im Rahmen dieser Arbeit später noch diskutiert werden.

In früheren Arbeiten<sup>2</sup>) wurde unter anderem folgendes festgestellt:

1. Es gelingt mit einem einfachen Verfahren, die Länge der Meerschweinchenzitze zu bestimmen.

2. Die Vergrößerung der Meerschweinchenzitze durch Applikation von weiblichem Sexualhormon konnte messend verfolgt werden.

3. Durch Auftropfen einer Lösung, die weibliches Sexualhormon enthält, auf eine Zitze kann eine Vergrößerung beider Zitzen erzielt werden.

4. Bei Verwendung genügend verdünnter Lösungen bleibt der Effekt auf die behandelte Zitze beschränkt.

Unter „Lokaler *Nipple-Test*“ (L.N.T.) verstehen wir nun ein Verfahren, bei dem der Längenzuwachs der Zitze eines männlichen Meerschweinchens bestimmt wird, nachdem während einer bestimmten Zeit eine Hormonlösung auf die Zitze aufgetropft wurde; dabei wird die Konzentration so gewählt, dass ein hämatogener Effekt (Vergrößerung der andern Zitze) nicht auftritt.

<sup>1</sup>) *Burn*, Biologische Auswertungsmethoden. *Springer*, Berlin (1937).

<sup>2</sup>) *W. Jadassohn, E. Uehlinger* und *A. Margot*, Verh. Schweiz. Naturf. Ges. **1937**, 186; *J. Invest. Dermat.* **1**, 31 (1938); *Revue Path. comp. Hyg. gén.* **38**, 570 (1938); *W. Jadassohn, E. Uehlinger* und *W. Zürcher*, *Helv. med. acta* **4**, 199 (1937); *Klin. Wschr.* **16**, 313 (1937).

Mit diesem L.N.T. wurde bereits eine grössere Anzahl von Versuchen durchgeführt. Diese beschäftigten sich u. a. mit der Wirkung von verschiedenen weiblichen und männlichen Sexualhormonen, mit der Wirkung von Anol und Anolderivaten und mit dem Effekt von menschlichen und tierischen Urinen. Aus diesen Untersuchungen geht vor allem hervor, dass Lösungen, die nur sehr wenig Hormon enthalten, bereits einen deutlichen Effekt im L.N.T. zeigen können. So wurde festgestellt, dass „Lösungen, die Bruchteile eines  $\gamma$  Equilin oder Oestron im  $\text{cm}^3$  enthalten, im *Nipple-Test* lokal appliziert starke, wenn auch nicht maximale Vergrößerung der behandelten Zitze bewirkten“<sup>(1)</sup>.

Obschon in diesen früheren Untersuchungen der L.N.T. meist nur an einer Zitze mit je einer der verschiedenen Lösungen durchgeführt wurde, ergaben sich Unterschiede, die auf eine quantitative Verwertbarkeit des Tests hinwiesen. Als Beispiel bringen wir die Resultate eines schon früher publizierten Oestronversuches<sup>2)</sup>. (Bei diesem Versuch wurden noch keine Vorkehrungen getroffen, um eine Abnahme der Wirksamkeit des Oestrone zu verhindern; siehe später.)

**Tabelle I.**  
Zuwachswerte:

$\gamma/\text{cm}^3$	Oestron				Equilin			
	14 T.	21 T.	30 T.	36 T.	14 T.	21 T.	30 T.	36 T.
0,0003	0,0	0,0	0,0	0,0	—	—	—	—
0,003	0,0	1,0	1,0	1,0	—	—	—	—
0,005	0,0	1,0	1,5	1,5	1,5	2,5	3,0	3,5
0,01	2,0	2,0	2,0	1,5	1,5	2,5	3,5	4,5
0,02	2,5	3,0	3,0	3,5	3,5	4,5	6,5	5,5
0,03	2,2	3,0	4,0	4,0	3,1	4,0	5,0	5,0
	2,0	2,0	3,0	2,5	2,0	3,5	5,0	6,0
0,05	2,0	3,0	3,5	3,0	3,0	4,0	—	—
0,1	3,0	5,0	5,5	5,0	3,5	4,5	6,5	7,5
1	2,0	4,0	6,5	6,0	3,5	4,5	6,0	7,0
5	4,0	5,5	7,0	7,5	3,5	4,5	—	—
62	5,0	6,8	—	—	5,4	6,5	7,8	8,0
	4,4	6,0	—	—	5,4	6,6	6,6	7,0
	4,5	6,7	—	—				

Als weiteres Beispiel führen wir die früheren Urinversuche an<sup>3)</sup>. Bei diesen ergab der L.N.T., an einer oder wenigen Zitzen durchge-

<sup>1)</sup> W. Jadassohn, E. Uehlinger und A. Margot, *Revue Path. comp. Hyg. gén.* **38**, 570 (1938).

<sup>2)</sup> W. Jadassohn, E. Uehlinger und A. Margot, *Revue Path. comp. Hyg. gén.* **38**, 570 1938.

<sup>3)</sup> Jadassohn, Uehlinger und Margot, *Revue Path. comp. Hyg. gén.* **38**, 570 (1938); Fierz, Jadassohn und Uehlinger, *Schweiz. med. Wschr.* **37**, 1056 (1938).

führt, Resultate, die denen des *Allen-Doisy-Tests* (A.D.T.) völlig entsprechen. Im Prinzip ist mit diesen Versuchen die quantitative Verwertbarkeit des L.N.T. bereits erwiesen. Es stellt sich nun die Frage nach dem Bereich und nach der Genauigkeit des Tests.

### Versuchstechnik.

Was die Messung der Zitzenlänge betrifft, so wurde das gleiche Verfahren benützt, wie es in den früheren Arbeiten mit dem L.N.T. beschrieben wurde. Es handelt sich dabei um die Ausmessung von Zitzenschattenbildern auf photographischem Papier. Wir reproduzieren hier die bereits früher publizierte Abbildung der für die Herstellung der Schattenbilder verwendeten Apparatur (Figur 1).

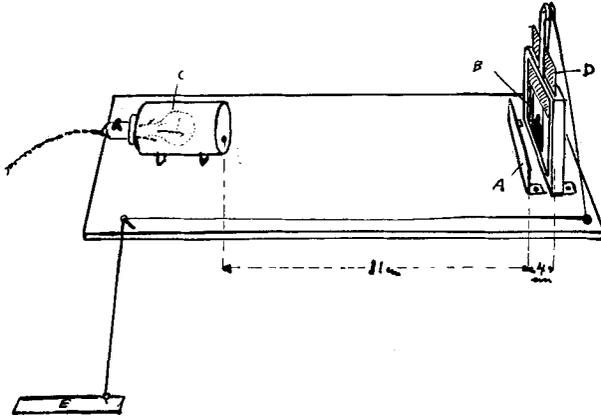


Fig. 1.

*A* = Metallbrettchen, an das das Meerschweinchen so angedrückt wird, dass die Zitze den oberen Rand des Brettchens überragt. *B* = Fixiervorrichtung für Photographpapier. *C* = Glühlampe. *D* = Schieber. *E* = Fußbedienung des Schiebers. Für die Aufnahme wird der Schieber gehoben. Expositionszeit 2 Sekunden. Die Aufnahme kann von einer Person durchgeführt werden.

Die Bildchen sind sehr viel besser geworden, seitdem wir als photographisches Papier „Agfa, Brovira Brillant, Hart, Papier BH 1“ verwenden. Die Messung der Zitzenlänge erfolgt unter dem Mikroskop mit Okularmikrometer; dabei entspricht ein Teilstrich des Okularmikrometers 0,0513 mm auf dem Schattenbild. Es ist selbstverständlich, dass sämtliche Bedingungen konstant gehalten werden müssen. Besondere Sorgfalt musste auf die Herstellung und Konservierung der Lösungen verwendet werden. Für alle hier mitgeteilten Versuche benützten wir dasselbe, von der Firma *F. Hoffmann-La Roche* bezogene Oestronpräparat, das unter Stickstoff eingeschmolzen aufbewahrt wurde. Das Präparat wurde unter Zuhilfenahme von Aceton und Igepon in Wasser gelöst. (Auf je 0,005  $\gamma$

Oestron kamen 4,0  $\gamma$  Aceton und 0,5  $\gamma$  Igepon). Die Herstellung der Lösung erfolgte so, dass das Oestron zuerst im Aceton gelöst wurde; diese Lösung wurde dann dem Igepon-haltigen Wasser zugesetzt. Alle Lösungen wurden während der ganzen Versuchsdauer unter Stickstoff gehalten (Figur 2).

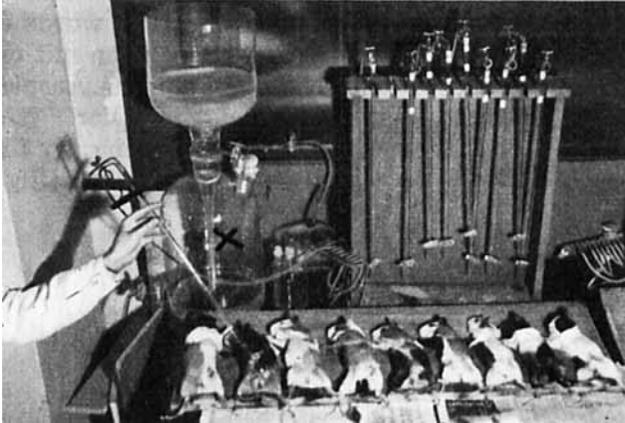


Fig. 2.

× Gasometer mit  $N_2$ .

Auf jede Zitze wurde täglich ein Tropfen Lösung appliziert und eintrocknen gelassen. Die Messung der Zitzen erfolgte vor Beginn des Versuchs, dann am 10., am 20. und am 30. Versuchstage. Verwendet wurden männliche Meerschweinchen von 3—400 g Gewicht.

Folgende Lösungen kamen zur Untersuchung:

- |   |   |
|---|---|
| 1) 0,005 $\gamma$ Oestron/cm <sup>3</sup> | 5) 0,2 $\gamma$ Oestron/cm <sup>3</sup> |
| 2) 0,01 $\gamma$ „                        | 6) 0,5 $\gamma$ „                       |
| 3) 0,02 $\gamma$ „                        | 7) 2 $\gamma$ „                         |
| 4) 0,05 $\gamma$ „                        |   |

Durchführung der Untersuchungen:

November—Dezember 1938: Lösungen 4), 6).

Januar—Februar 1939: Lösungen 1), 2).

März—April 1939: Lösungen 3), 5), 7).

### Resultate.

Die Figuren 3—8 geben eine Zusammenstellung der Resultate in Kurvenform, Figur 3 und 6 für den 10., Figur 4 und 7 für den 20. und Figur 5 und 8 für den 30. Versuchstag. Der Übersichtlichkeit halber mussten die Lösungen in 2 Gruppen getrennt werden. Figuren 3—5: Lösungen 2) 0,01  $\gamma$ , 3) 0,02  $\gamma$ , 5) 0,2  $\gamma$ , 7) 2  $\gamma$ . Figuren 6—8: 1) 0,005  $\gamma$ , 4) 0,05  $\gamma$ , 6) 0,5  $\gamma$ /cm<sup>3</sup>.

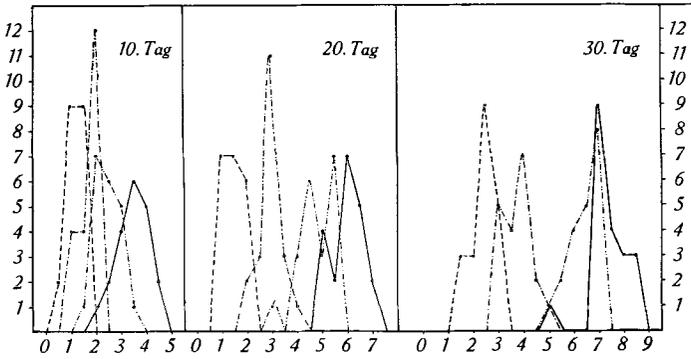


Fig. 3.

Fig. 4.

Fig. 5.

- - - - - 0,01  $\gamma$  }  
 - - - - - 0,02  $\gamma$  } Oestron im  $\text{cm}^3$   
 - · - · - 0,2  $\gamma$  }  
 ———— 2  $\gamma$  }

Abszisse: Zuwachs  
 Ordinate: Häufigkeit

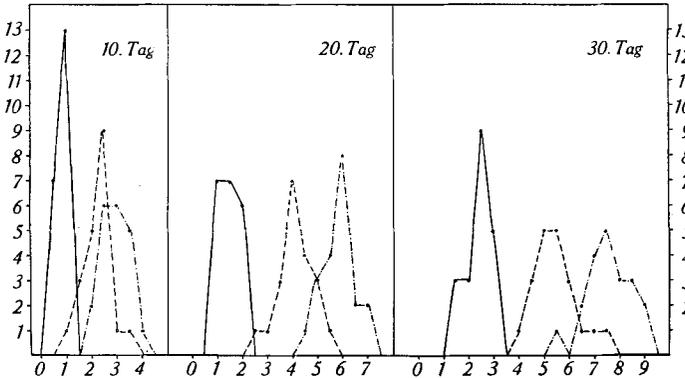


Fig. 6.

Fig. 7.

Fig. 8.

———— 0,005  $\gamma$  }  
 - - - - - 0,05  $\gamma$  } Oestron im  $\text{cm}^3$   
 - - - - - 0,5  $\gamma$  }

Abszisse: Zuwachs  
 Ordinate: Häufigkeit

Jede einzelne Kurve gibt die Resultate von 20 mit der gleichen Dosis behandelten Zitzen wieder. Die Abszisse gibt den Zuwachs in unseren Messeinheiten, die Ordinate zeigt, wie oft ein bestimmter Zuwachs beobachtet wurde. Aus diesen Abbildungen lässt sich folgendes ablesen:

Je grösser die Dosis ist, umso grösser ist der am häufigsten gefundene Zuwachswert (Reihenfolge der Kurvenmaxima entspricht der Reihenfolge der Dosen). Die Kurvenmaxima liegen am 10. Versuchstag noch recht nahe beisammen und rücken mit der Zeit erheblich weiter auseinander. Dementsprechend überschneiden sich die Kurven am 30. Tag am wenigsten.

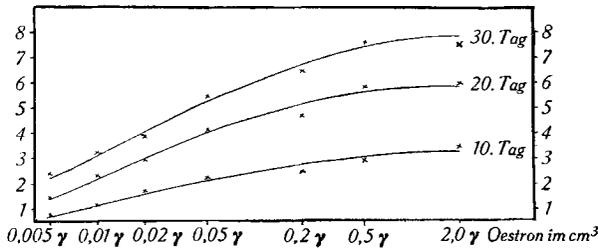


Fig. 9.

Abszisse:  $\log^{10}$  der Dosis.

Ordinate: Durchschn. Zuwachs bei 20 Zitzen.

In Figur 9 wurden die gleichen Resultate in anderer Weise graphisch dargestellt. Die Abszisse gibt den Logarithmus der Dosis, die Ordinate den durchschnittlichen Zuwachs (arithmetisches Mittel der Einzelresultate). Alle drei Kurven zeigen einen stetigen Anstieg. Von 0,005—0,02  $\gamma$   $\text{cm}^3$  ist der Verlauf annähernd gerade; bei höheren Dosen flachen sich die Kurven ab.

Aus diesen Resultaten ergibt sich prinzipiell die Möglichkeit, den L.N.T. quantitativ zu verwenden. Es erhebt sich nun die Frage nach der praktischen Verwertbarkeit. Darüber werden die folgenden beiden Abschnitte Aufschluss geben.

#### Fehler.

Aus den Figuren 3—8 ergibt sich, dass die Zitzen z. T. deutliche individuelle Unterschiede zeigen. Die Form der Kurven aber, mit einem Maximum in der Mitte und einem mehr oder weniger symmetrischen Abfall nach beiden Seiten, berechtigte uns zur Anwendung statistischer Methoden. Wir haben im folgenden die von *Burn* angeführten Verfahren verwendet.

Die mittlere Abweichung ( $\sigma$ ) der Einzelbeobachtung errechnet sich nach der Formel  $\sigma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}}$ , wobei  $\sum d^2$  die Summe der Quadrate der Abweichungen jeder Einzelbeobachtung vom Mittelwert (arithmetisches Mittel) darstellt und  $n$  die Anzahl der Einzelbeobachtungen. Der „mittlere Fehler“, d. h. die mittlere Abweichung des Mittelwertes ist  $\sigma \cdot \frac{1}{\sqrt{n}}$ .

Nimmt man die einfache mittlere Abweichung, so ist „der Anteil der Versuche, bei denen ein grösserer Unterschied zwischen gefundenem und wahren Mittelwert beobachtet wird, ca. 1 von 3“. Multipliziert man aber  $\sigma$  mit 2,576, so wird ein grösserer Unterschied nur in einem von 100 Fällen beobachtet. Dasselbe gilt sinngemäss für den mittleren Fehler  $\left(\sigma \cdot \frac{1}{\sqrt{n}}\right)$ .

Auswertung: Der nach  $\frac{\sigma}{\sqrt{n}} \cdot 2,6$  errechnete Fehler wird auf der

Kurve aufgetragen und ergibt ein Streuungsband. Mit diesem kann man nun die Streuung auf die Abszisse übertragen und direkt ablesen. Da der Zuwachs vom Logarithmus der Dosis abhängig ist, lässt sich die Streuung auch durch einen Faktor ausdrücken, mit dem der gefundene mittlere Wert zu multiplizieren, bzw. zu dividieren ist. Dadurch erhält man die möglichen Höchst- und Tiefwerte für eine aus der Kurve abgelesene Dosis. Die Abweichung des Faktors von 1 gibt einen Anhaltspunkt für die Genauigkeit der Ablesung. (Ein Faktor 1,2 kann noch einem Fehler von  $\pm 20\%$  gleichgesetzt werden). Tabelle II gibt eine Zusammenstellung der nach obigem Verfahren aus unseren Kurven abgelesenen Werte. Aus dieser Tabelle ergibt sich, dass bei der Verwendung von 20 Zitzen im L.N.T. nach 20 oder 30 Tagen, bei einer geeigneten Verdünnung, die Konzentration einer Oestronlösung mit einem Fehler von höchstens  $\pm 20\%$  bestimmt werden kann. Dieses Resultat unterliegt nun noch gewissen Einschränkungen:

Tabelle II.

Lösung	Oestron/cm <sup>3</sup>						
	0,005 $\gamma$	0,01 $\gamma$	0,02 $\gamma$	0,05 $\gamma$	0,2 $\gamma$	0,5 $\gamma$	2 $\gamma$
10. Tag							
<i>M</i>	0,82	1,17	1,70	2,22	2,45	2,92	3,45
$\frac{\sigma}{\sqrt{n}} \cdot 2,6$	0,13	0,20	0,24	0,34	0,29	0,31	0,38
<i>K</i>	1,2	1,3	1,4	1,7	2,75	4,2	6,0
20. Tag							
<i>M</i>	1,47	2,30	2,92	4,12	4,65	5,82	5,95
$\frac{\sigma}{\sqrt{n}} \cdot 2,6$	0,23	0,20	0,28	0,42	0,32	0,36	0,40
<i>K</i>	1,2	1,2	1,3	1,5	1,7	2,0	6,0
30. Tag							
<i>M</i>	2,40	3,17	3,8	5,54	6,38	7,62	7,40
$\frac{\sigma}{\sqrt{n}} \cdot 2,6$	0,29	0,29	0,37	0,49	0,34	0,52	0,39
<i>K</i>	1,2	1,2	1,4	1,6	1,5	2,0	4,0

Legende: *M* = Arithmetisches Mittel aus 20 Zitzen.

$\frac{\sigma}{\sqrt{n}} \cdot 2,6$  = siehe Text.

*K* = Korrekturfaktor. Die auf der Kurve abgelesene Oestronmenge ist mit diesem Faktor zu multiplizieren, bzw. durch ihn zu dividieren; dadurch erhält man die Grenzwerte nach oben und nach unten. (Die Faktoren 1,2 entsprechen ungefähr einem Fehler von 20%<sup>1)</sup>).

<sup>1)</sup> Die Kontrolle der Fehlerberechnung hat in freundlicher Weise Priv.-Doz. Dr. phil. *M. Fierz* besorgt.

Es muss eine Eichkurve vorliegen, deren Fehler gegenüber dem der Messungen vernachlässigt werden kann. Die vorliegende Eichkurve muss noch durch weitere Messungen ergänzt werden; ferner muss sie durch Verwendung von internationalem Oestronstandard kontrolliert werden. Sie muss weiterhin auf Saisonschwankungen hin geprüft werden. (Wir weisen darauf hin, dass unsere Punkte zu verschiedenen Zeiten bestimmt wurden, allerdings alle zur Zeit der Winterfütterung). Ferner müssen die Einflüsse von Gewicht, Rasse und Futter untersucht werden. (Unsere Tiere waren, wie früher erwähnt, 3—400 g schwer, alle stammten aus der gleichen Zucht; die Fütterung (ortsübliches Winterfutter) erfolgte ohne besondere Kautelen). Schliesslich wird zu untersuchen sein, wie weit Messungen in anderen Laboratorien mit unseren Messungen übereinstimmen, da in der Literatur gerade bei Sexualhormonbestimmungen auf „Milieu-Unterschiede“ als Fehlerquellen besonderes Gewicht gelegt wird.

### Vorteile.

Über die Vorteile des L.N.T. gegenüber anderen Methoden kann abschliessend erst geurteilt werden, wenn die oben angeführten Fehlerquellen genügend abgeklärt sind. Immerhin kann jetzt schon folgendes ausgeführt werden:

Der L.N.T. soll in Konkurrenz treten a) mit der Vaginalabstrichmethode (A.D.T.) und b) mit der von *Bulbring* und *Burn* angegebenen Methode „die auf dem Uterusgewicht beruht“ (B.B.T.). Für den A.D.T. geben *Jongh* und *Laqueur*<sup>1)</sup> an, dass er „in der Praxis mit einem Fehler von höchstens 25 % arbeitet“. In dieser Beziehung dürfte der quantitative L.N.T. ebenbürtig sein. Nach *Burn*<sup>2)</sup> dauert die vollständige Auswertung des A.D.T. 3—6 Wochen, so dass der L.N.T. auch in dieser Beziehung konkurrenzfähig ist. Was die Technik betrifft, so scheint uns die Durchführung des L.N.T. wesentlich einfacher zu sein als die des A.D.T. Die Verwendung männlicher Tiere erübrigt die Kastration. Der ganze Versuch kann von einer Laborantin ohne besondere Vorbildung und ohne längeres Einarbeiten durchgeführt werden, denn die Beurteilung mikroskopischer Präparate ist nicht notwendig und zahlreiche andere Schwierigkeiten, wie sie von *Jongh* und *Laqueur* sehr anschaulich geschildert werden, bestehen nicht. Ausser dem Futter erwachsen keine Kosten für die Tiere, da sie nachher ohne weiteres für andere Versuche verwendet werden können. (Wir verwendeten dasselbe Tier nur für einen Versuch, da sich die Zitzen innert nützlicher Frist nicht genügend zurückbilden.)

<sup>1)</sup> *Jongh* und *Laqueur*, Handb. der biolog. Arbeitsmethoden, S. 1639. Abt. V, *Urban* und *Schwarzenberg*, Berlin (1938).

<sup>2)</sup> *Burn*, Biol. Auswertungsmethoden, *Springer*, Berlin (1937).

Auch der B.B.T. arbeitet im Gegensatz zum L.N.T. mit kastrierten Tieren. Allerdings führt diese Methode schon nach 2 Wochen zum gleichen Resultat wie der A.D.T. nach 3—6 Wochen. Sie scheint aber ziemlich heikel zu sein, da das Präparieren der Uteri von ein und derselben Person durchgeführt werden soll, um eine einheitliche Behandlung zu gewährleisten. Sie dürfte komplizierter sein als der L.N.T.; überdies müssen die Tiere getötet werden.

Der L.N.T. hat gegenüber den erwähnten beiden Methoden noch weitere Vorteile. Es können sehr verdünnte Lösungen untersucht werden. So z. B. zeigen unsere Resultate, dass solche verwendbar sind, die nur  $\frac{1}{20}$  M.E. = 0,005  $\gamma$  im  $\text{cm}^3$  enthalten. Es können auch Präparate untersucht werden, die sich nicht zur Injektion eignen, wie z. B. alkoholische Lösungen. Dies ist deshalb von Bedeutung, da heute die percutane Applikation weiblicher Sexualhormone vielfach empfohlen und angewendet wird. Es wurde auch schon früher darauf hingewiesen, dass es richtig scheint, solche Präparate, die zur percutanen Anwendung bestimmt sind, auch percutan zu prüfen, ganz abgesehen davon, ob sie sich zur Injektion eignen oder nicht. Ebenso wurde schon früher betont, dass der L.N.T. ein extragenitaler Test ist, im Gegensatz zu A.D.T. und B.B.T. Bei den männlichen Sexualhormonen, bei denen wir über genitale und extragenitale Tests verfügen, haben sich zwischen den beiden Verfahren prinzipielle Unterschiede ergeben. Bei der Behandlung von Dermatosen mit weiblichen Sexualhormonen will man eine Wirkung an der Haut, einem extragenitalen Organ, erzielen. Gerade mit Bezug auf solche Behandlungsversuche erscheint es uns wertvoll, dass der L.N.T. an einem extragenitalen, einem Hautorgan angreift.

Abschliessend möchten wir nun noch auf folgendes hinweisen:

1. In früheren Arbeiten findet sich der Satz:

„Es ist angezeigt, Hautbehandlungsversuche mit sehr verdünnten Hormonlösungen durchzuführen, da bewiesen ist, dass solche Lösungen auf ein Hautorgan, wenn auch nicht einen maximalen, so doch einen erheblichen Einfluss ausüben können<sup>1)</sup>.“

Das kann nun auf Grund der quantitativen Untersuchungen präzisiert werden. Bei Auftragen der Logarithmen der Dosen auf die Abszisse ergibt unsere Wirkungskurve im Bereich von 0,005  $\gamma$  bis etwa 0,2  $\gamma/\text{cm}^3$  annähernd eine Gerade. In diesem Bereich gilt also das *Weber-Fechner'sche* Gesetz. Dasselbe ergibt sich übrigens nach den Kurven von *Bulbring* und *Burn* für die Wirkung von Oestron auf den Uterus der Ratte. Ferner zeigt Figur 9, dass bei Dosen über 0,5  $\gamma/\text{cm}^3$  eine wesentliche Steigerung des Effektes nicht

<sup>1)</sup> W. Jadassohn, E. Uehlinger und A. Margot, *Revue Path. comp. Hyg. gén.* **38**, 570 (1938).

mehr auftritt (Abflachung der Kurven! Man beachte, dass die Abszisse den Logarithmus der Dosis angibt). Dies muss bei der Dosierung von Präparaten, die weibliches Sexualhormon enthalten, unbedingt berücksichtigt werden. Besonders gilt das für solche Präparate, die zur percutanen Anwendung bestimmt sind. Wir möchten nur an die ausserordentlich hohe Dosierung der Handelspräparate im Vergleich mit den hier verwendeten Lösungen erinnern.

## 2. *Jongh* und *Laqueur*<sup>1)</sup> schreiben:

„Dass eine Eichung der oestrogenen Stoffe in der Zeit der unreinen Präparate notwendig war, bedarf kaum einer besonderen Begründung. Jedoch auch jetzt, wo die Handelspräparate krystallin sind, ist eine Eichung unumgänglich notwendig, da verschiedene Isomere und Derivate ein Krystallgemisch formen können, in dem die einzelnen Bestandteile zumindest quantitativ nicht die gleiche biologische Wirkung besitzen.“

Die Untersuchungen mit dem L.N.T. zeigen, dass noch eine weitere Anzeige zur Eichung solcher Präparate besteht. Die in Tabelle 1 angegebenen Zuwachswerte sind im Vergleich mit den jetzt gewonnenen zu gering. Auch die durch Auftropfen von Urinen erzielten Resultate, abgelesen an unserer jetzigen Wirkungskurve, bleiben hinter denen zurück, die der A.D.T. ergibt. Das dürfte darauf zurückzuführen sein, dass die damals verwendeten Präparate während des Versuches an Wirksamkeit einbüssten; sie wurden nicht unter Stickstoff aufbewahrt, im Gegensatz zu den jetzt verwendeten. Es erscheint deshalb notwendig, die Haltbarkeit der Handelspräparate durch eine wiederholte Eichung zu prüfen. Aus äusseren Gründen gilt das besonders für Präparate, die zur percutanen Anwendung bestimmt sind. Ferner müssen die Ausführungen von *Jongh* und *Laqueur* noch weiter ergänzt werden. Es ist auch notwendig, Material prüfen zu können, das einen völlig unbekanntem Gehalt an oestrogenen Substanzen hat. Als Beispiel wäre die Untersuchung von Urinen anzuführen. Für solche Bestimmungen, wie auch für die Kontrolle der Haltbarkeit von Präparaten, scheint uns der L.N.T. geeignet zu sein.

## Zusammenfassung:

Unter „Lokaler Nipple-Test“ verstehen wir ein Verfahren, bei dem der Längenzuwachs der Zitze eines männlichen Meerschweinchens bestimmt wird, nachdem während einer bestimmten Zeit eine Hormonlösung auf diese Zitze aufgetropft wurde. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass dieses Verfahren zur Eichung von Präparaten geeignet ist, die Oestron enthalten.

---

<sup>1)</sup> *Jongh* und *Laqueur*, Handb. der biol. Arbeitsmethoden, S. 1639. Abt. V. *Urban* und *Schwarzenberg*, Berlin (1938).

## B. Hyperpigmentierung nach lokaler Applikation von weiblichem Sexualhormon<sup>1)</sup>.

„Lipschütz<sup>2)</sup> hat gefunden, dass durch die Implantation von Ovarien in die Niere kastrierter männlicher Meerschweinchen nicht nur die von anderen, so besonders *Laqueur*, *Steinach* usw., beschriebenen Wachstumsvorgänge in der Brustdrüse („Präparation der Mamma“) eintreten, sondern dass sich nach diesem Eingriff auch Brustwarze und Warzenhof in ähnlicher Weise wie bei graviden weiblichen Meerschweinchen dunkler färben. *Bloch* und *Schrafl*<sup>3)</sup> haben diese Versuche bestätigen können und weiterhin gezeigt, dass die Implantation des Ovariums ersetzt werden kann durch Injektionen käuflicher Präparate des weiblichen Sexualhormons.“ (Cit. nach *Bloch* und *Guldberg*<sup>4)</sup>).

*Bloch* und *Guldberg* haben beschrieben, dass diese Hyperpigmentierung „auch durch reines krystallisiertes weibliches Sexualhormon“ erzeugt werden kann, das *Butenandt* diesen Autoren zur Verfügung gestellt hatte.

Diese Feststellungen sind für die Genese der Schwangerschaftspigmentierungen (Warzenhöfe, Linea alba, Chloasma uterinum) von grossem Interesse. Es besteht jetzt kein Zweifel mehr, dass diese Pigmentierungen durch das während der Gravidität in recht grosser Menge im Blut zirkulierende weibliche Sexualhormon bedingt werden.

Nach *Bloch* und *Guldberg*<sup>5)</sup> muss man annehmen, „dass sich die Wirkung des Follikulins auf das pigmentbildende Ferment erstreckt, dasselbe aktiviert“. „Ob das aber direkt geschieht durch den Eintritt des Hormons in die pigmentbildende Epidermiszelle oder indirekt vermittelt wird, sei es auf dem Wege des Sympathicus oder über ein anderes Hormon (als welches wohl in erster Linie auf Grund der Untersuchungen von *Zondek* das in den Zwischenteilen der Hypophyse produzierte „Intermedin“ in Betracht käme), das zu entscheiden muss (nach *Bloch* und *Guldberg*) weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.“

*Clauberg*<sup>6)</sup> scheint sich für die zweite Möglichkeit entschieden zu haben, wenn er 1937 schreibt:

„In experimentellen Untersuchungen wollen *Bloch*, *Schrafl* und *Guldberg*, sowie *Nitzescu* und *Munteanu* einen Einfluss des Follikelhormons auf die Schwangerschaftspigmentierung festgestellt haben, was ebenfalls auf eine Beeinflussung der Nebenniere oder den Zwischenlappen der Hypophyse durch ein Hormon des Ovariums hinweist.“

Durch die im folgenden beschriebenen Versuche glauben wir die Annahme widerlegen zu können, dass die Schwangerschaftspigmentierungen indirekt, d. h. auf dem Wege über den Sympathicus, die Nebenniere oder die Hypophyse zustande kommen müssen.

In früheren Arbeiten (s. o.) wurde nachgewiesen, dass man eine Vergrösserung der Meerschweinchenzitze durch lokale Applikation von weiblichem Sexualhormon erzielen kann. Appliziert man täg-

<sup>1)</sup> Für Anleitung bei der Beurteilung der histologischen Schnitte bin ich Hrn. Prof. *Uehlinger* zu grossem Dank verpflichtet. Ferner verdanke ich Hrn. cand. med. *Müller* die Herstellung der Zeichnungen.

<sup>2)</sup> *Lipschütz*, *Virchow's Archiv* **276**, 676 (1930).

<sup>3)</sup> *Bloch* und *Schrafl*, *Arch. Dermat.* **165**, 268 (1932).

<sup>4)</sup> *Bloch* und *Guldberg*, *Klin. Wschr.* **12**, 734 (1933).

<sup>5)</sup> *Bloch* und *Guldberg*, *Klin. Wschr.* **12**, 734 (1933).

<sup>6)</sup> *Clauberg*, *Zwangslose Abhandlungen aus dem Gebiet der Innern Sekretion* **2**, 57 (1937).

lich einen Tropfen einer relativ stark verdünnten Sexualhormonlösung auf eine Zitze, so vergrößert sich nur diese, nicht aber die unbehandelte. Wir haben einen lokalen, aber keinen hämatogenen Effekt.

Wir haben jetzt folgende Versuche durchgeführt: Verwendet wurden 6 gelbbraune Meerschweinchen, bei denen die Zitzenegend gerade andeutungsweise pigmentiert war. Bei 3 Tieren wurde auf je eine Zitze täglich ein Tropfen Oestronlösung gebracht. Die Lösung enthielt pro 1 cm<sup>3</sup> 1  $\gamma$  Oestron und um es in „Lösung“ zu halten 800  $\gamma$  Aceton und 100  $\gamma$  Igepon. Die andere Zitze dieser 3 Meerschweinchen blieb unbehandelt. Drei weitere Tiere erhielten auf je eine Zitze zur Kontrolle eine Lösung, die 800  $\gamma$  Aceton und 100  $\gamma$  Igepon, aber kein Oestron enthielt.

Figur 11, Tafel I, zeigt das Resultat so deutlich, dass sich eine ausführliche Besprechung erübrigt.

Die Applikation von einem Tropfen Oestronlösung pro Tag auf die Zitze und ihre Umgebung führt zu einer intensiven Pigmentierung, die der Pigmentierung in der Gravidität, nach Ovarienimplantation und nach Injektion von weiblichem Sexualhormon durchaus entspricht. Es handelt sich um einen lokalen und nicht um einen hämatogenen Effekt, denn die andere Zitze und ihre Umgebung zeigen keine deutliche Verstärkung der Pigmentierung. Pigmentierungen, die den Schwangerschaftspigmentierungen entsprechen, können also durch Oestron hervorgerufen werden, ohne dass Sympathicus, Nebenniere oder Hypophyse mitspielen. Wäre dies der Fall, dann hätten wir keinen lokalen Oestroneffekt auf das Pigment zu registrieren; beide Zitzen und ihre Umgebung wären dann gleich intensiv pigmentiert.

Durch diesen Versuch wird die folgende Frage nicht berührt, die bereits *Lipschütz*<sup>1)</sup> und *Bloch, Schrafl* und *Guldberg*<sup>2)3)</sup> diskutiert haben. Unser Versuch beweist, dass der Effekt des weiblichen Sexualhormons ein lokaler ist, d. h. dass er ohne Mitwirkung der oben erwähnten Organe zustande kommt. Greift nun „das Eierstockhormon unmittelbar an den pigmentbildenden Zellen an“ oder „sind es die starken Wachstumsvorgänge, die sich in der Brustdrüse abspielen, die den Faktor abgeben oder entstehen lassen, der für die Pigmentierung verantwortlich ist?“ *Lipschütz*<sup>1)</sup> spricht sich für die zweite, *Bloch, Schrafl* und *Guldberg*<sup>2)3)</sup> für die erste Möglichkeit aus. Für das „unmittelbar an den Zellen Angreifen des Oestroneffekts“ spricht das Auftreten von Schwangerschaftspigmentierungen an Stellen ohne „Wachstumsvorgänge“; dagegen, wie *Lipschütz*

1) *Lipschütz*, Virchow's Archiv **276**, 676 (1930).

2) *Bloch* und *Schrafl*, Arch. Dermat. **165**, 268 (1932).

3) *Bloch* und *Guldberg*, Klin. Wschr. **12**, 734 (1933).

Tafel I.

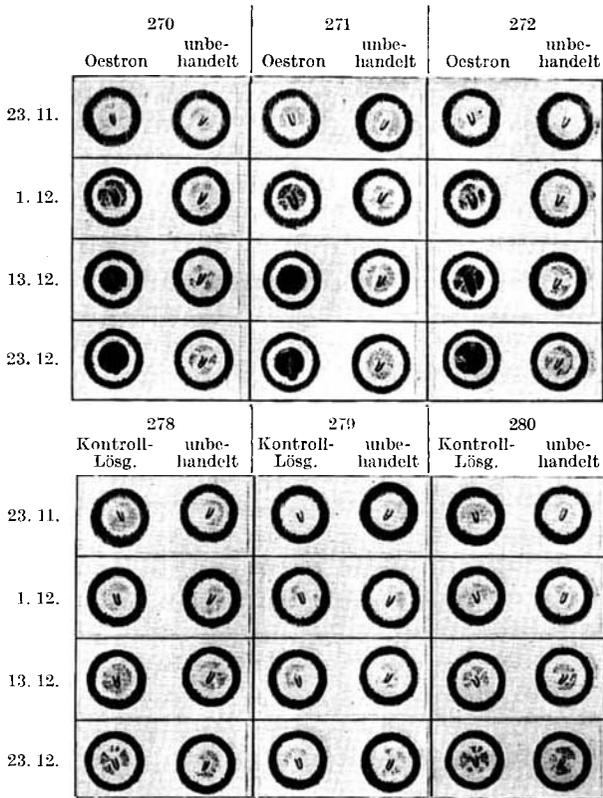


Fig. 11.

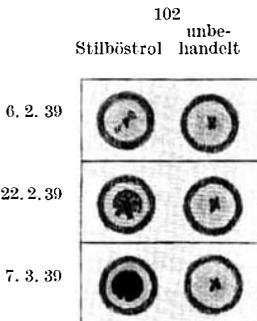


Fig. 12.

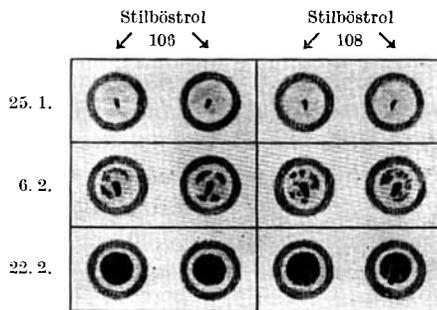


Fig. 13.



Fig. 14.

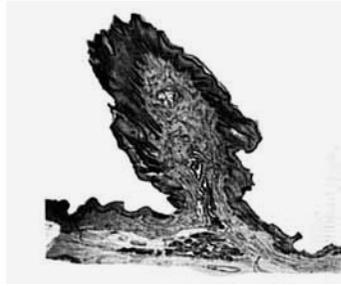


Fig. 15.



Fig. 16.



Fig. 17.



Fig. 18.

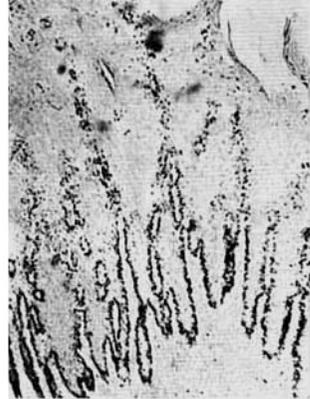


Fig. 19.

Figg. 14—19. Zitzen von Meerschweinchen 270.

li. Zitze (Figg. 14, 16, 18) unbehandelt.

re. Zitze (Figg. 15, 17, 19) während 30 Tagen täglich ein Tropfen einer Lösung mit  $1 \gamma$  Oestron/cm<sup>3</sup> appliziert.

Figg. 14 und 15 Hac.-E. Vergrößerung 8:1.

Figg. 16 und 17 „ „ 50:1.

Figg. 18 und 19, ungefärbt, „ 50:1.

betont, der Parallelismus zwischen Pigmentierung und Zitzenwachstum. In diesem Zusammenhang hat uns die Frage interessiert, ob eine Substanz, die chemisch mit Oestron nicht nahe verwandt ist, die aber ebenfalls Zitzenvergrößerung verursacht, eine Hyperpigmentierung erzeugen kann.

Wir haben zeigen können, dass Stilboestrol (Diäthyl-di-p-oxystilben, von der Firma *F. Hoffmann-La Roche* in freundlicher Weise uns zur Verfügung gestellt) sich nicht nur, wie *Dodds, Lawson* und *Noble*<sup>1)</sup> gefunden haben, im *Allen-Doisy-Test* bezüglich Paarungsreaktion und in Bezug auf den Rattenuterus wie Oestron verhält, sondern auch im *Nipple-Test* (Vergrößerung der Zitze bei Auftropfen der Lösung). Wie Figur 12 und 13 (Tafel I) zeigen, bewirkt das Auftropfen einer Lösung, die 1  $\gamma$  Stilboestrol + 800  $\gamma$  Aceton + 100  $\gamma$  Igepon pro 1 cm<sup>3</sup> enthält, nicht nur Vergrößerung der Zitze, sondern starke Hyperpigmentierung der Zitze und des Zitzenhofes. Damit ist durch eine neue Versuchsanordnung der von *Lipschütz*<sup>2)</sup> betonte Parallelismus zwischen Pigmentierung und „Zitzenwachstum“ bestätigt. Hätten wir mit Stilboestrol nur Zitzenvergrößerung, aber keine Pigmentierung festgestellt, so wäre dies ein sicherer Beweis dafür gewesen, dass „das Eierstockhormon unmittelbar an den pigmentbildenden Zellen“ angreift. Der gegenteilige Befund schliesst unserer Ansicht nach diese Möglichkeit nicht aus. Wir müssen uns damit begnügen folgendes festzustellen: Stilboestrol verhält sich nicht nur im *Allen-Doisy-Test* und im *Nipple-Test* wie ein weibliches Sexualhormon, sondern es vermag auch „Schwangerschaftspigmentierung“ hervorzurufen, obschon es chemisch den Sexualhormonen, die Sterine sind, nicht nahe verwandt ist.

Das von *Lipschütz*<sup>2)</sup> einerseits und von *Bloch* und *Schrafl*<sup>3)</sup> und *Bloch* und *Guldberg*<sup>4)</sup> andererseits diskutierte Problem des Angriffspunktes des Sexualhormons bei der Erzeugung von Hyperpigmentierung, wird nun unserer Ansicht nach durch folgende histologische Untersuchungen in ein neues Licht gerückt:

*Bloch* und *Schrafl*<sup>3)</sup> haben bereits sehr eingehende histologische Studien über das Pigment von Zitze und Hof von Tieren durchgeführt, die mit weiblichem Sexualhormon gespritzt und gefüttert wurden. In ihren Untersuchungen fehlt aber der Vergleich mit unbehandelten Tieren. Auch *W. Jadassohn*, *Uehlinger* und *Zürcher*<sup>5)</sup> haben seinerzeit

„eine grössere Anzahl Brustwarzen (normale, solche von mit Follikulin subcutan behandelten Tieren und solche von mit Follikulin percutan behandelten Tieren) histologisch

<sup>1)</sup> *Dodds, Lawson* und *Noble*, *Lancet* (London) **142**, 292 (1938).

<sup>2)</sup> *Lipschütz*, *Virchow's Archiv*, **276**, 676 (1930).

<sup>3)</sup> *Bloch* und *Schrafl*, *Arch. Dermat.* **165**, 268 (1932).

<sup>4)</sup> *Bloch* und *Guldberg*, *Klin. Wschr.* **12**, 734 (1933).

<sup>5)</sup> *Jadassohn*, *Uehlinger* und *Zürcher*, *Helv. med. acta* **4**, 199 (1937).

untersucht. Die Untersuchung zeigte, dass die Vergrößerung der Brustwarzen auf Hyperämie, Quellung und Oedem, nicht aber auf Zellvermehrung beruht.“

Dieser Satz muss nach unseren neuen Untersuchungen mit percutan erzeugter, viel stärkerer Zitzenvergrößerung erheblich eingeschränkt werden.

Wir konnten folgende histologischen Befunde erheben: Untersucht wurden die mit Oestron behandelten und die unbehandelten Zitzen der Meerschweinchen 270, 271, 272, 278, 279 und 280.

1. Nicht behandelte Zitzen: Figuren 14, 16, 18, Tafel II. Das Epithel ist im Bereich des Hofes ausserordentlich schmal, besteht aus 2—3 Zellagen, die das Stratum basale und das Stratum spinosum umfassen. Das Stratum granulosum besteht nur aus einer einzigen Zelle, während das Stratum corneum ziemlich breit ist. Im Bereich der Zitze selber, besonders im Kuppengebiet, ist das Epithel bedeutend breiter, ungefähr 3—4 mal so breit wie im Gebiet des Warzenhofes. Es lassen sich wenigstens 7—8 hintereinander geschaltete Kernreihen bis zum Stratum granulosum erkennen. Im Stratum basale findet sich ein feinkörniges braunes Pigment, vorwiegend innerhalb von Dendriten-Zellen. Das Pigment ist unregelmässig verteilt; neben Strecken intensiver Pigmentierung finden sich fast amelanotische Abschnitte. Das Zitzenstroma wird von einem lockeren, ziemlich gefässreichen fibrillären Bindegewebe gebildet, das nur von wenigen Milchgängen durchzogen wird. An der Basis teilen sich diese Milchgänge; eigentliche Drüsenläppchen lassen sich nirgends feststellen.

2. Die Vergrößerung der behandelten Zitzen (Figuren 15, 17, 19) beruht sowohl auf einer Verbreiterung des Epithels wie auf einer Zunahme des Stromas. Die Epithelverbreiterung beginnt schon im Zitzenhof, ungefähr 5 mm von der Zitze entfernt und ist am stärksten im Bereich der Zitzenkuppe. Mit der Verbreiterung des Epithels geht eine Ausziehung der interpapillären Epithelzapfen, bzw. eine starke Erhöhung der Papillen einher. Die Verbreiterung beruht in erster Linie auf einer Zunahme des Stratum spinosum, aber auch das Stratum granulosum zeigt mindestens 3 Schichten, gegenüber einer einzigen bei der nicht behandelten Zitze. Das Stratum basale weist eine intensive, feinkörnige braune Pigmentierung auf. Das Pigment sitzt grösstenteils in Dendritenzellen. Nur selten bildet es Kappen über der Kern-Aussenseite. An zahlreichen Stellen sind auch Zellgruppen im Stratum spinosum pigmentiert, und zwar fast ausschliesslich in Form der Kappenpigmentierung. Im Gegensatz zum Epithel lässt das Stroma keine auffällige Strukturveränderung erkennen, weder Oedem noch Hyperaemie. Dagegen hat man deutlich den Eindruck einer Vermehrung der adventitiellen Zellen der Übergangsgefässe, doch lässt sich nicht sicher entscheiden, ob es sich dabei um eine wirkliche Zellvermehrung

oder nur um eine Schwellung der schon vorhandenen Zellen mit Basophilie des Protoplasmas handelt. Die Milchgänge unterhalb der Warze sind nicht vermehrt. Um ihre Endstücke findet man gelegentlich Andeutung von Drüsenläppchen.

Die Nebennieren der behandelten Tiere scheinen gegenüber den Nebennieren der nicht behandelten Tiere vergrößert zu sein (Verbreiterung der Rindenschicht).

Die histologischen Untersuchungen zeigen, dass nur ein Teil der Zitzenvergrößerung auf Vermehrung des Stroma zurückzuführen ist. Dabei scheinen Hyperaemie, Quellung und Oedem keine wesentliche Rolle zu spielen. Ein wesentlicher Teil der Zitzenvergrößerung ist durch Epithelwucherung bedingt; eine erhebliche Akanthose findet sich auch in der Gegend des Zitzenhofes.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, dass es sich bei der Oestronpigmentierung der Zitze und ihres Hofes nicht einfach um eine Hyperpigmentierung handelt. Es bildet sich eine reichlich Pigment enthaltende Akanthose aus. Die makroskopisch feststellbare Pigmentierung von Meerschweinchenzitzen und ihren Höfen, die mit Oestron percutan behandelt wurden, beruht also nicht einfach auf einer Steigerung der Pigmentbildung epithelialer Zellen, sondern auf einer Wucherung dieser Zellen. Eine pigmentierte Akanthose zeigen auch die nicht percutan behandelten Zitzen, wie sich z. B. aus der Abbildung von *Bloch* und *Schrafl*<sup>1)</sup> im Vergleich mit unseren unbehandelten Zitzen ergibt.

Diese Feststellungen sind nicht nur für den Mechanismus der Pigmentierung der mit Oestron behandelten Meerschweinchenzitze von Interesse. Es ist wichtig festzuhalten, dass Oestron percutan schon in sehr geringen Dosen zu einer Epithelwucherung führen kann.

#### Zusammenfassung.

A. Durch Auftropfen einer Lösung, die 1  $\gamma$  Oestron, resp. Stilboestrol pro 1 cm<sup>3</sup> enthält, gelingt es, starke Pigmentierung der Zitze und des Zitzenhofes zu erzeugen. Die starke Pigmentierung tritt nur an der behandelten, nicht aber an der unbehandelten Zitze auf.

Diese Feststellungen sind aus verschiedenen Gründen von Interesse:

1. Heutzutage werden häufig weibliche Sexualhormone auf die Haut appliziert.

2. Sie zeigen, dass weibliches Sexualhormon Hyperpigmentierung erzeugen kann, ohne dass der Effekt auf dem Umweg über Hypophyse, Sympathicus oder Nebenniere zustande kommt.

3. Es ist nicht von vornherein klar, dass Substanzen, die chemisch mit Oestron nicht nahe verwandt sind, aber auch weibliche Sexual-

---

<sup>1)</sup> *Bloch* und *Schrafl*, Arch. Dermat. **165**, 268 (1932).

hormon-Wirkungen besitzen, Hyperpigmentierung der Zitze und ihres Hofes erzeugen.

B. Die histologische Untersuchung von mit Oestron percutan behandelten Zitzen zeigt neben Vermehrung des Stroma epitheliale Veränderungen in Form einer starken Verbreiterung der Epidermis mit zahlreichen pigmentbildenden Zellen.

Biochemisches Laboratorium (Dr. *W. Jadassohn*) des Technisch-chemischen Institutes der E. T. H. (Prof. *H. E. Fierz*) und Pathologisch-anatomisches Institut der Universität Zürich (Prof. *H. v. Meyenburg*).

## 122. Ein physikalisch-chemisches Tontrennungsverfahren für die bildmässige Photographie

von *Hans Zickendraht jun.*

(29. VI. 39.)

Das Problem der Tontrennung ist fast so alt wie die Photographie selbst. Es musste schon den ersten Photographen auffallen, dass sich in der Kopie — im Aufsichtsbild — nur ein Bruchteil des Helligkeitsumfanges wiedergeben lässt, den ein kontrastreiches Negativ — ein Durchsichtsbild — festhalten kann.

Im kombinierten Gummidruck fand 1896 *Heinrich Kühn*<sup>1)</sup> erstmals eine Methode, um durch Auszüge (Lichterdruck, Schattendruck) die Kontraste in den Lichtern und in den Schatten einigermaßen beizubehalten, während die unwichtigen Mittelöne verflacht wurden. Diese getrennte Behandlung der Lichter- und der Schattentöne, die zu dem Namen „Tontrennung“ geführt hat, erwies sich vorerst als das einzig brauchbare Mittel, um im Aufsichtsbild eine physiologisch und bildmässig richtige Wiedergabe grosser Kontraste zu ermöglichen. *Heinrich Kühn* machte später vom selben Motiv zwei Aufnahmen verschiedener Belichtungsdauer, so dass die eine die Schatten und die andere die Lichter richtig wiedergab (Syngraphie)<sup>2)</sup>. Von beiden Platten angefertigte Diapositive ergaben übereinandergelegt die richtige Bildwirkung. *Alfred Person*<sup>3)</sup> erreichte auf etwas modifiziertem Wege denselben Tontrennungseffekt; er fertigte nach einem knapp belichteten und hart entwickelten Negativ über ein Diapositiv Negativauszüge von Lichtern und Schatten an und vergrösserte sie zusammen auf Bromsilberpapier. Das „Isohelie“-Verfahren von *Witold Romer*<sup>4)</sup> machte es möglich, auf ähnliche Weise bis zu plakatartig wirkenden, in mehrere Graustufen flächig zerlegten Bildern zu gelangen. So bringen all diese Methoden dadurch, dass sie auf Kosten der Details in den Mittelönen die Kontraste in den Lichtern und Schatten möglichst gross halten, die Gradationskurve der im Bilde vorhandenen Helligkeitsverteilung in eine Z-Form, ähnlich, wie sie sich *G. Cordonnier* in einem Aufsatz über „Die künstlerischen Anforderungen an

1) *Heinrich Kühn*, Phot. Korr. 71, 4 (1935).

2) *Heinrich Kühn*, „Zur phot. Technik“, Halle 1926.

3) *Alfred Person*, „Bildmässige Leica-Photos durch Tontrennung“ (1935), Frankfurt a. M.

4) *Witold Romer*, „Isohelie“, Camera 11, 291 (1932).