

## 41. Untersuchungen über Organextrakte.

24. Mitteilung<sup>1)</sup>.

### Über das hormonal aktive Prinzip eines feminisierenden Hodentumors

von M. Marti und H. Heusser.

(14. XII. 53.)

Kürzlich wurde von *W. Wenz*<sup>2)</sup> über den Fall eines gutartigen Hodentumors berichtet, der histologisch betrachtet an Nebennierenrindengewebe erinnerte. Auf Grund der histologischen Befunde wurde die Ansicht vertreten, dass die Ursache dieses Tumors in einem „versprengten“ Nebennierenrindenkeim zu suchen ist. Im Zusammenhang mit der vorliegenden chemischen Bearbeitung des Tumors ist der klinische Befund und die Diskussion der hormonalen Wirksamkeit dieser Geschwulst von einigem Interesse.

Mit dem Wachsen des Tumors erfolgte beim Patienten einseitige Gynaekomastie (Wachstum der Mamma) und Hypertonie. Nach operativer Entfernung des Tumors trat vollständige Normalisierung ein, und nach 5 Monaten war noch kein Rezidiv zu beobachten. Was die Feminisierung, d. h. Gynaekomastie bei gutartigen Hodentumoren anbelangt, so werden in der Literatur hauptsächlich zwei verschiedene Möglichkeiten des Zustandekommens der hormonalen Wirksamkeit diskutiert. Nach der einen<sup>3)</sup> wird die Bilanz zwischen dem aus den Spermazellen stammenden, mammahemmenden „Hormon“ und dem stimulierenden Wirkstoff der Zwischenzellen gestört. Diese Theorie stützt sich auf den Befund, dass bei diesen Tumoren mit dem Wachsen der Geschwulst die Zwischenzellen eine Vermehrung, die Spermazellen dagegen eine Atrophie erfahren. *Courvoisier & Labhart*<sup>4)</sup> ziehen andererseits die Möglichkeit in Betracht, dass bei solchen Tumoren eine Stimulierung der Nebennieren und somit eine vermehrte Produktion von Östrogenen stattfindet. Im vorliegenden Falle wurde von *Wenz*<sup>2)</sup> ausdrücklich auf eine weitere Möglichkeit hingewiesen, nämlich, dass der Tumor direkt und nicht lediglich über die Nebenniere Östrogene zu produzieren vermöge. Bei dieser Überlegung spielte der bereits erwähnte histologische Befund der ausserordentlich nahen Verwandtschaft der Tumor- mit Nebennierenrindenzellen eine wesentliche Rolle, denn es ist ja bekannt, dass Nebennieren Östrogene ausschütten (vgl. Tabelle 2). Solche wurden schon vor längerer Zeit in Substanz (Östron) aus Nebennierenrindenextrakten isoliert<sup>5)</sup>. Auch lässt sich im Harn von Patienten mit Nebennierenrindenhyperplasie eine vermehrte Ausscheidung von weiblichen Sexualhormonen nachweisen<sup>6)</sup>. Andererseits wurde Östron<sup>7)</sup> und Östradiol<sup>7)</sup> aus Hengsthoden in Form kristallisierter Derivate isoliert. Ferner wurde nachgewiesen, dass weibliche Sexualhormone auch in Testikeln<sup>8)</sup> und im Urin<sup>8)</sup> normaler Männer vorliegen müssen. Von besonderem

<sup>1)</sup> 23. Mitt. Helv. **35**, 986 (1952).

<sup>2)</sup> *W. Wenz*, Schweiz. med. Wschr. **29**, 677 (1953).

<sup>3)</sup> *H. F. Klinefelter, E. C. Reifenstein & F. Albright*, J. clin. Endocrin. **2**, 615 (1942).

<sup>4)</sup> *B. Courvoisier & A. Labhart*, Helv. med. acta **17**, 480 (1950). Vgl. auch *R. H. Williams*, „Textbook of Endocrinology“, Saunders, London-Philadelphia (1950).

<sup>5)</sup> *D. Beall*, Nature **144**, 76 (1939); J. Endocrin. **2**, 81 (1940).

<sup>6)</sup> Vgl. z. B. *C. J. Migeon & L. I. Gardner*, J. clin. Endocrin. **12**, 1513 (1952).

<sup>7)</sup> *D. Beall*, Biochem. J. **34**, 1293 (1940).

<sup>8)</sup> *E. Laqueur & S. E. De Jongh*, J. Am. Med. Assoc. **91**, 1169 (1928).

<sup>9)</sup> *E. Laqueur, E. Dingemans, P. C. Hart & S. E. De Jongh*, Klin. Wschr. **6**, 1859 (1927); *E. Dingemans, E. Laqueur & O. Mühlbock*, Nature **141**, 927 (1938).

Interesse ist eine kürzlich von *J. W. Goldzieher & J. S. Roberts*<sup>1)</sup> veröffentlichte Arbeit, in welcher Östradiol in Extrakten aus menschlichen Testes mit Hilfe der Papierchromatographie und durch biologische Versuche nachgewiesen werden konnte. Die Konzentration an Östradiol wurde zu 5,7  $\gamma$  pro kg Hodengewebe bestimmt. Alle diese Befunde müssen berücksichtigt werden, wenn eine Antwort auf die Frage gegeben werden soll, ob möglicherweise hormonal aktive Hodentumoren direkt oder lediglich indirekt über die Nebennieren eine vermehrte Produktion von Östrogenen zu erzielen vermögen.

Im vorliegenden Falle haben wir uns mit der chemischen Aufarbeitung des Tumors beschäftigt in der Hoffnung, den Nachweis für das Vorliegen eines einheitlichen Wirkstoffes liefern zu können. Unseres Wissens wurden ähnliche Versuche bis heute nicht durchgeführt. Der Nachweis einer vermehrten Östrogenproduktion bei gewissen Tumorarten stützte sich bisher lediglich auf harnanalytische Untersuchungen<sup>2)</sup>.

Der Tumor wog insgesamt 260 g. Davon wurden uns durch Herrn Prof. Dr. *H. U. Zollinger*<sup>3)</sup> freundlicherweise 180 g für eine chemische Untersuchung zur Verfügung gestellt. Der kleinen Materialmenge wegen waren die Aussichten auf die Isolierung einheitlicher Wirkstoffe recht gering, enthalten doch Pferdetestes, jenes Organ, das die höchste Konzentration an Östrogenen aufweist, nur 0,21 mg Östradiol und 0,36 mg Östron pro kg Gewebe<sup>4)</sup>, während menschliche Testes sogar nur 5,7  $\gamma$  Östradiol pro kg enthalten<sup>5)</sup>. Zur Aufarbeitung verwendeten wir deshalb ein vereinfachtes Verfahren, welches der geringen Materialmenge angepasst wurde. Weiter liess sich die Fraktionierung durch biologische Testierung verfolgen<sup>6)7)</sup>.

Die Aufarbeitung des Tumorgewebes (180 g) erfolgte entsprechend dem nebenstehenden Schema (Tab. 1) und den Angaben im experimentellen Teil. Aus dem Acetonextrakt (B) liessen sich durch Digerieren mit Benzol 760 mg Lipide (C) gewinnen, die im *Allen-Doisy*-Test eine Aktivität von 50–100 Ratteneinheiten pro mg aufwiesen. Daraus errechnet sich ein Gehalt von 15–30 mg Östradiol oder 38–76 mg Östron für den gesamten Extrakt C. Die willkürlich gewählte Arbeitshypothese, dass lediglich diese beiden natürlichen Östrogene vorliegen könnten, bestimmte auch die weitere Verarbeitung des Extraktes C.

<sup>1)</sup> *J. W. Goldzieher & J. S. Roberts*, J. clin. Endocrin. **12**, 143 (1952).

<sup>2)</sup> Vgl. z. B. *S. L. Simpson & C. A. Joll*, Endocrinology **22**, 595 (1938); *F. C. Dohan, E. Rose, J. W. Eiman, E. M. Richardson & H. Zintel*, J. clin. Endocrin. **13**, 415 (1953).

<sup>3)</sup> Pathologisches Institut der Universität, Zürich; jetzt Pathologisches Institut, Kantonsspital St. Gallen.

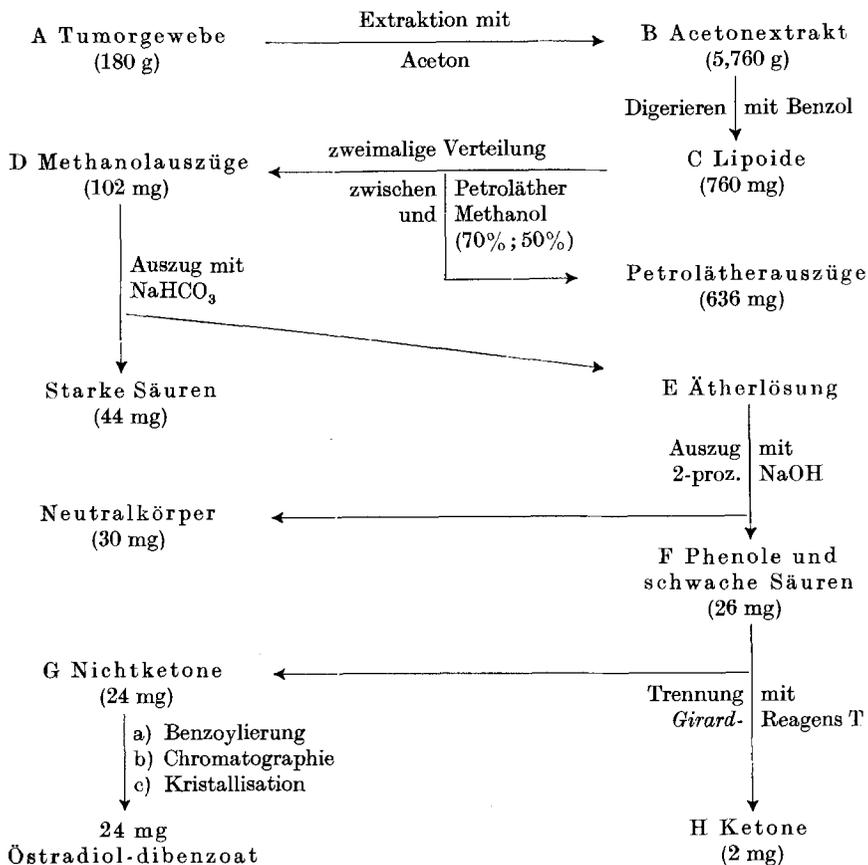
<sup>4)</sup> *D. Beall*, Biochem. J. **34**, 1293 (1940).

<sup>5)</sup> *J. W. Goldzieher & J. S. Roberts*, J. clin. Endocrin. **12**, 143 (1952).

<sup>6)</sup> Die biologischen Prüfungen wurden in der pharmakologischen Abteilung der *CIBA Aktiengesellschaft* in Basel durchgeführt. Herrn Dr. *E. Tschopp* danken wir für die Durchführung dieser Versuche.

<sup>7)</sup> Im vorliegenden Falle wurden beim Patienten ausser einem negativen *Ascheim-Zondek*-Test keine weiteren Untersuchungen auf die hormonale Aktivität des Tumors vorgenommen.

Tabelle 1.



Überraschenderweise gelang es relativ mühelos aus den nichtketonischen Fraktionen (G) 14 mg Östradiol in Form des gut kristallisierenden Dibenzoates (24 mg) zu fassen. Ketonische Anteile (H) wurden nur in Spuren isoliert. Das erhaltene Präparat von Östradiol-dibenzoat wurde durch die Verbrennungswerte, den Smp. und den Misch-Smp., das spezifische Drehungsvermögen und das IR.-Absorptionsspektrum (vgl. Fig. A, Kurven 1 und 2) charakterisiert. Weiter wurde eine vergleichende biologische Testierung mit dem aus dem Tumor isolierten und authentischem Östradiol-dibenzoat vorgenommen<sup>1)</sup>.

Wie aus diesen Versuchen hervorgeht, zeichnet sich der untersuchte Tumor durch eine erstaunlich grosse Konzentration von Östradiol aus. Es lässt sich ein Gehalt von 78 mg Östradiol pro kg Tumorgewebe errechnen, wobei lediglich die in Substanz isolierte Menge an Östradiol-dibenzoat berücksichtigt wird. Eine so hohe Konzentration

<sup>1)</sup> Der Schwellenwert für beide Präparate lag bei 100  $\gamma$ .

an Östrogenen wurde bis heute noch in keinem normalen Gewebe vorgefunden. Im Vergleich zu Stutenovarien liess sich in Hengsthoden die 300–500fache Menge an Östrogenen nachweisen<sup>1)</sup>. Der untersuchte Tumor zeigt nun seinerseits mindestens den 230fachen Gehalt an Östrogenen von Hengsthoden und pro Gewichtseinheit 130 000mal mehr Östradiol als normale menschliche Testes. Die Verhältnisse sind in der folgenden Tabelle (Tab. 2) zusammengefasst.

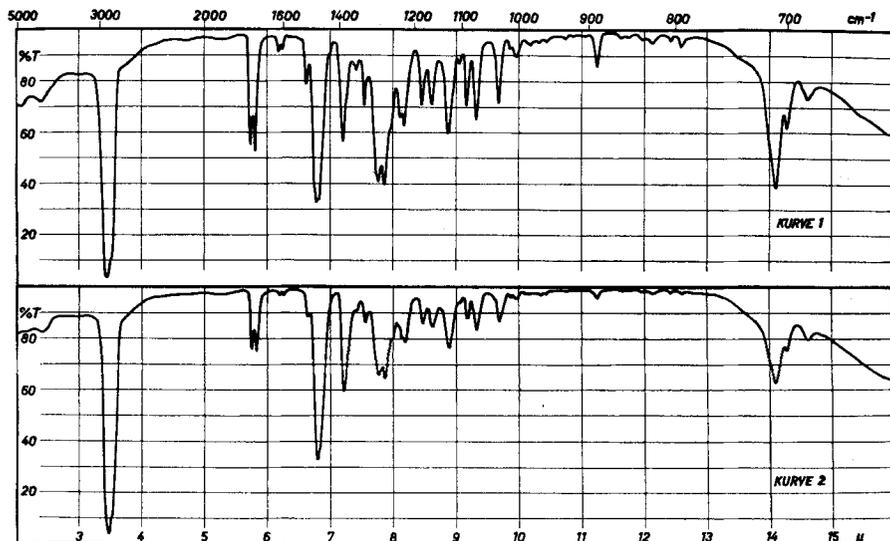


Fig. A<sup>2)</sup>.

Kurve 1: Östradiol-dibenzoat (Vergleichspräparat).

Kurve 2: Östradiol-dibenzoat aus Hodentumor.

Bei einem so hohen Gehalt von Östrogenen im Tumorgewebe selbst und unter Berücksichtigung der Tatsache, dass dieses eine intensive Durchblutung erfuhr<sup>3)</sup>, ist wohl der Schluss zulässig, dass die Zeichen der Feminisierung beim Patienten vorwiegend durch die Ausschüttung von „tumoreigenem“ Östradiol erzeugt worden ist. Damit erfährt die Vermutung von Wenz<sup>4)</sup>, dass der Tumor nicht nur über die Nebenniere, sondern selbst eine vermehrte Östrogenproduktion zu erzielen vermag, eine wesentliche Stütze. Abschliessend möchten wir

<sup>1)</sup> B. Zondek, Nature **133**, 209, 494 (1934); vgl. auch H. Zondek, „Die Krankheit der endokrinen Drüsen“, p. 146, Benno Schwabe & Co., Verlag, Basel 1953.

<sup>2)</sup> Die IR.-Absorptionsspektren wurden in Nujol-Paste auf einem Baird-„double-beam“-Spektrographen von Herrn A. Hübscher aufgenommen. Herrn Prof. Dr. Hs. H. Günthard danken wir für die Diskussion dieser Spektren.

<sup>3)</sup> Vgl. die Photographie des Operationspräparates in der Arbeit von W. Wenz, Schweiz. med. Wschr. **29**, 677 (1953).

<sup>4)</sup> Schweiz. med. Wschr. **29**, 677 (1953).

noch darauf hinweisen, dass die festgestellte Konzentration an Östrogenen in einem bestimmten Organ keine bindenden Rückschlüsse auf die tatsächlich in Umlauf gesetzte Menge dieser Hormone zulässt. Die Erfahrung hat gezeigt, dass oftmals ein Mehrfaches der in einem bestimmten Organ aufgefundenen Mengen an Östrogenen von diesem täglich ausgeschieden werden. Leider fehlten im vorliegenden Falle harnanalytische Untersuchungen vor der operativen Entfernung des Tumors.

Tabelle 2.

Organ	Östradiol in mg/kg	Östron in mg/kg
Schweineovarien . . . . .	0,014 <sup>1)</sup>	0,010 <sup>2)</sup>
Placenta (Mensch) . . . . .	0,038 <sup>2)</sup>	0,035 <sup>1)</sup>
Nebenniere (Rind) . . . . .	—	0,008 <sup>3)</sup>
Hengsthoden . . . . .	0,210 <sup>4)</sup>	0,360 <sup>4)</sup>
Testes (Mensch) . . . . .	0,006 <sup>5)</sup>	—
Hodentumor (Mensch) . . . . .	78,000 <sup>6)</sup>	—

Der *Rockefeller Foundation* in New York und der *CIBA Aktiengesellschaft* in Basel danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

### Experimenteller Teil<sup>7)</sup>.

Extraktion des Tumors. Der Tumor (180 g) wurde vom anhaftenden Hodengewebe abgetrennt, zerkleinert und unter Aceton fein zerrieben. Anschliessend wurde das Gewebepulver unter Aceton 48 Std. aufbewahrt. Nach Filtration wurde der Rückstand fünfmal je 2 Std. mit je 500 cm<sup>3</sup> Aceton am Rückfluss erhitzt. Die vereinigten Acetonauszüge (3 l) lieferten nach dem Eindampfen und Trocknen im Vakuum 5,760 g eines zähflüssigen braunen Öls (Acetonextrakt B). Dieser Extrakt wurde fünfmal mit je 30 cm<sup>3</sup> Benzol bei ca. 70° digeriert, worauf das Gemisch auf Zimmertemperatur gebracht und filtriert wurde. Die vereinigten Benzolauszüge lieferten nach dem Eindampfen im Vakuum 760 mg eines braunen Öls, das teilweise von Kristallen durchsetzt war (Lipoide C).

Verteilung zwischen Petroläther und Methanol. Die Lipoide C (760 mg) wurden in üblicher Weise in 3 Scheidetrichtern zwischen 70-proz. Methanol und Petroläther verteilt. Die vereinigten Methanolauszüge wurden im Vakuum eingedampft und erneut zwischen 50-proz. Methanol und Petroläther verteilt. Nach dem Verdampfen des Methanols verblieb ein Rückstand (102 mg, Methanolauszüge D), der in Äther aufgenommen und in üblicher Weise durch Ausziehen mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung von starken Säuren abgetrennt wurde. Durch Behandeln der ätherischen Lösung mit 2-proz. eisgekühlter Natronlauge liessen sich insgesamt 26 mg Phenole (Fraktion F) isolieren.

<sup>1)</sup> W. W. Westerfeld, S. A. Thayer, D. W. MacCorquodale & E. A. Doisy, J. Biol. Chem. **126**, 181 (1938).

<sup>2)</sup> M. N. H. Huffman, S. A. Thayer & E. A. Doisy, J. Biol. Chem. **133**, 567 (1940).

<sup>3)</sup> D. Beall, J. Endocrin. **2**, 81 (1940).

<sup>4)</sup> D. Beall, Biochem. J. **34**, 1293 (1940).

<sup>5)</sup> J. W. Goldzieher & J. S. Roberts, J. chin. Endocrin. **12**, 143 (1952).

<sup>6)</sup> Vgl. diese Arbeit.

<sup>7)</sup> Die Smp. wurden im evakuierten Röhrchen bestimmt.

Girardierung. Die rohen Phenole (Fraktion F, 26 mg) wurden in 4 cm<sup>3</sup> absolutem Methanol aufgenommen, mit 0,165 g *Girard*-Reagens-T versetzt und 4 Std. unter Feuchtigkeitsausschluss zum Sieden erhitzt. Die Reaktionslösung wurde im Vakuum weitgehend eingengt und anschliessend bei 0° mit 7 cm<sup>3</sup> einer Pufferlösung (pH = 8,2)<sup>1)</sup> aus 1,95 g Phosphorsäure (84-proz.), 0,992 g Borsäure, 0,96 g Eisessig, 160 cm<sup>3</sup> Wasser und 496 cm<sup>3</sup> 0,1-n. Natronlauge versetzt. Das Gemisch wurde mit Äther extrahiert und die ätherische Schicht einmal mit 2 cm<sup>3</sup> Pufferlösung und 3 Portionen Wasser zu 2 cm<sup>3</sup> gewaschen, getrocknet und eingedampft. Zurück blieben 24 mg nichtketonische Anteile (Fraktion G).

Die Pufferlösung und die Waschwässer wurden vereinigt, mit 2-n. Schwefelsäure angesäuert und bei Zimmertemperatur 2 Std. stehengelassen. Die wässrige Lösung wurde mit Äther ausgezogen. Es konnten auf diese Weise nur Spuren von Ketonen (Fraktion H, 2 mg) isoliert werden.

Östradiol-dibenzoat aus den Nichtketonen G. Die nichtketonische Fraktion G (24 mg) wurde in 2 cm<sup>3</sup> Pyridin gelöst und bei 0° mit 2 cm<sup>3</sup> Benzoylchlorid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 3 Std. bei 0° und anschliessend 48 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann wurde die Lösung auf Eis gegossen, die organischen Anteile in Äther aufgenommen, die ätherische Lösung mit 2-n. Salzsäure, Wasser, Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand (32 mg) wurde sorgfältig an 2 g Aluminiumoxyd (Akt. III) chromatographiert. Die mittleren Petroläther-Benzol-(9:1)-Fraktionen lieferten insgesamt 24 mg an kristallisiertem Östradiol-dibenzoat. Durch wiederholtes Umlösen aus Äther-Methanol wurden schliesslich 13 mg eines analysereinen Präparates erhalten, das vor dem Verbrennen 24 Std. im Hochvakuum bei 80° getrocknet wurde. Smp. 169–170°<sup>2)</sup>; Misch-Smp. mit authentischem Material vom Smp. 169,5–170,5° ohne Erniedrigung.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +53^{\circ} \quad (c = 0,623 \text{ in Chloroform})$$

$$3,095 \text{ mg Subst. gaben } 9,023 \text{ mg CO}_2 \text{ und } 1,879 \text{ mg H}_2\text{O}$$

$$\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{O}_4 \quad \text{Ber. C } 79,97 \quad \text{H } 6,71\% \quad \text{Gef. C } 79,56 \quad \text{H } 6,79\%$$

Die Analyse wurde in der mikroanalytischen Abteilung (Leitung *W. Manser*) des Organisch-chemischen Laboratoriums der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich, ausgeführt.

### Zusammenfassung.

Aus einem gutartigen Hodentumor, der histologisch betrachtet an Nebennierenrindengewebe erinnerte und welcher beim Patienten deutliche Zeichen der Feminisierung (Gynaekomastie) erzeugte, wurde Östradiol als Dibenzoat isoliert. Die Konzentration an Östradiol in diesem Tumor ist mindestens 130 000mal grösser als der Gehalt normaler menschlicher Testes an demselben weiblichen Sexualhormon. Die in der Literatur vertretenen Ansichten über die hormonale Wirkungsweise solcher Tumoren werden unter Berücksichtigung dieser neuen experimentellen Befunde diskutiert.

Medizinische Universitätsklinik, Zürich,  
und organisch-chemisches Laboratorium  
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

<sup>1)</sup> Vgl. dazu *V. Prelog & O. Häfliger*, *Helv.* **32**, 2088 (1949).

<sup>2)</sup> Auf dem *Kofler*-Block zeigte das Präparat einen Smp. von 170–173°.