

Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Biochemie, Berlin-Dahlem, jetzt Tübingen.

## Beitrag zur Wirkungsweise von Oestradiol.

Von  
ELSE KNAKE.

(Eingegangen am 16. Oktober 1950.)

Auf Anregung von Prof. BUTENANDT beschäftigten wir uns mit der Frage, auf welche Weise das Follikelhormon sein Erfolgsorgan beeinflußt. Die Frage ist für alle Hormone interessant und bis jetzt wohl für kein Hormon vollständig beantwortet. Vom Follikelhormon weiß man noch nicht, ob es die Zellen direkt angreift oder mittelbar wirkt, z. B. durch Hyperämisierung. Es ist auch nicht sicher, ob seine spezifische Wirkung von der chemisch unveränderten Substanz, wie sie dem Körper beigebracht wird, ausgeht oder von einem Umwandlungsprodukt, das im Körper entsteht.

Falls die Substanz unmittelbar auf die Zellen des Uterus und der Vagina einwirkt, könnte die Gewebekultur unter Umständen ein geeignetes Testobjekt darstellen, dann nämlich, wenn die Zellen *in vitro* differenziert genug bleiben, um auf spezifische Reize anzusprechen.

Zunächst glaubten wir, mit Wachstumsexperimenten an Gewebe- kulturen Erfolg zu haben. Wir hatten den Eindruck, daß das Epithel aus frisch explantierten Uterusfragmenten von Ratten reichlicher aussprießt, wenn man als Nährmedium Plasma von Ratten verwendet, denen 2 Tage vorher Oestradiol in brunsterregender Menge injiziert worden war.

Nach einer Reihe von Experimenten kamen wir aber zu der Überzeugung, daß diese Versuchsanordnung nicht zu zuverlässigen Ergebnissen führen kann. Denn die Kontrollen in Normalplasma bringen schon an sich in sehr vielen, dabei aber wechselnden Fällen reines Epithel hervor. Nur Messungen der Wachstumsgeschwindigkeit von Uterus- epithel-Reinkulturen mit und ohne Zusatz von Oestradiol könnten Aufschluß geben. Sie scheitern vorläufig an der Unmöglichkeit, Uterus- epithel in Dauerkultur zu züchten, weil die entstehenden Epithel- wachstumszonen immer wieder durch Verflüssigung des Plasmagerinnsels in unregelmäßiger Weise reduziert werden. Darum gaben wir bald den Gedanken auf, durch Vergleich der Wachstumszonen von Uterus- explantaten zu einer Entscheidung zu kommen.

VERNE hat mitgeteilt, daß die Proliferation von Uterusepithel aktiviert wird durch Auspflanzung in Plasma oder Serum einer Ratte, die 24 Std vorher eine Injektion von Follikelhormon erhalten hat. Auf Grund unserer eigenen Erfahrungen

stehen wir dieser Behauptung zurückhaltend gegenüber. Es ist möglich, daß ein solches Plasma oder Serum diese Eigenschaft hat. Mit der von VERNE befolgten Versuchsanordnung ist es aber nach unserer Ansicht nicht zu beweisen.

Darauf stellten wir eine Nebenwirkung des weiblichen Sexualhormons in den Mittelpunkt unserer Versuche. Oestradiol ist für Zellen in der Gewebekultur ein Mitosegift<sup>2</sup>. Es verursacht Chromosomenabsperrungen. Diese Wirkung ist zwar unspezifisch; denn sie beschränkt sich nicht auf das spezifische Erfolgsorgan; das gebräuchliche Testobjekt ist vielmehr die Fibroblastenkultur\*. Oestradiol ist auch nicht der einzige Stoff, der Chromosomenabsperrungen hervorruft. Aber die Veränderung ist morphologisch sehr charakteristisch und nach Oestradiol-einwirkung von bestimmter Dosis von hervorragender Regelmäßigkeit. Wenn sie bei einem Tier fehlt, dem man Oestradiol in der entsprechend hohen Dosis verabfolgt hat, so kann man folgern, daß seine Zellen nicht von unverändertem Oestradiol getroffen wurden.

Versuche dieser Art haben wir in verschiedener Ausführung gemacht. Wir applizierten dem Tier Oestradiol auf verschiedene Weise in sehr großer Menge. Die Tiere wurden nach verschieden langer Versuchsdauer getötet und viele Organe auf die Beschaffenheit ihrer Mitosen durchsucht. Wir kamen zu dem klaren Ergebnis, daß die Mitosen qualitativ normal sind. (Quantitative Untersuchungen wurden nicht angestellt.)

Diese Tatsache ist nicht ohne weiteres selbstverständlich. Es gibt eine Reihe von Stoffen, die als Mitosegifte *in vivo* wirken. Die mitoseschädigende Wirkung des Urethans<sup>3</sup>, des Natriumkakodylats<sup>4</sup>, des Trypaflavins<sup>4</sup>, des Colchicins<sup>4</sup>, um nur Beispiele zu nennen, wurde an Zellen *in vivo*, nicht *in vitro* entdeckt.

Wir glauben aus unseren Experimenten schließen zu können, daß Oestradiol, das dem Organismus einverleibt wird, nicht unverändert als solches auf die Zellen einwirkt. Aus dem brunsterregenden und mitoseschädigenden Stoff Oestradiol wird ein anderes Produkt, das weiterhin oestrogen ist, aber selbst in hoher Dosis nicht mehr mitoseschädigend wirkt.

Unsere verschiedenen Versuchsanordnungen geben noch über einige Einzelheiten Aufschluß. Die gekennzeichnete Umwandlung geht *in vitro* in kürzester Zeit vor sich. Nach 1 min ist sie schon ebenso vollständig wie nach Stunden. Blutplasma allein kann die Umwandlung nicht hervorbringen, wenigstens nicht bei einem so ungünstigen Mengenverhältnis zwischen Blutplasma und Oestradiol wie in der Gewebekultur (100—200  $\mu$ /cm<sup>3</sup>). Auch Embryonalextrakt ist, wenigstens bei demselben Zahlenverhältnis, nicht dazu imstande. Da Embryonalextrakt aus dem Brei aller Organe hergestellt wird, ist es nicht wahrscheinlich, daß irgend ein spezieller Gewebsextrakt zu dieser Umwandlung fähig ist. Man wird nach allem daran denken, daß die Umwandlung an Zellstrukturen

\* Wir haben uns überzeugt, daß auch Epithelzellen aus der Uterusschleimhaut und der Iris so reagieren. Vielleicht liegt hier die optimale Dosis etwas höher.

gebunden ist. Aber auch dabei ist die Einschränkung zu machen, daß die Strukturen der als Test dienenden Gewebekultur diese Fähigkeit nicht haben. Vielleicht spielt auch hierbei das sehr ungünstige Zahlenverhältnis eine Rolle (Frischgewicht einer Deckglaskultur ist etwa 100 γ und die sicher erfolgreiche Dosis je Deckglaskultur 7,5—10 γ Oestradioldinatriumphosphat. Diese Menge Oestradioldinatriumphosphat wird auf die Gesamtmediummenge von etwa 0,1 g verteilt, die wiederum auf einen Tropfen von etwa 1 cm Durchmesser ausgestrichen wird. Das Explantat mit einer Kantenlänge von 1—2 mm sitzt in der Mitte dieses Mediumgerinnsels und greift nur seine nahe Umgebung an, wirkt also auch nur auf einen Teil der zugefügten 7,5—10 γ Oestradioldinatriumphosphat ein). Schließlich ist die Möglichkeit zu berücksichtigen, daß die Blutkörper, die bei Versuchen an Gewebekulturen ausgeschaltet sind, Ort und Mittel der Umwandlung im Organismus darstellen.

Das mutmaßliche Umwandlungsprodukt ist oestrogen, aber nicht mehr mitoseschädigend. Für seine Auffindung könnte als Test wiederum die Gewebekultur dienen. An ihr wäre nachzuweisen, daß eine oestrogene Substanz in hoher Konzentration nicht als Mitosegift wirkt. Für die Dosierung könnte man als Anhaltspunkt nehmen, daß von Oestradioldinatriumphosphat 7,5—10 γ je Deckglaskultur, d. h. je 0,1 cm<sup>3</sup> Medium, als Mitosegift wirken.

#### *Versuchsanordnungen.*

1. Wir applizierten Oestradioltabletten in Form von „Schering-Preßlingen“ (zu 25 bzw. 20 mg Oestradiol) infantilen weiblichen Ratten von 40—50 g, in einigen Fällen auch gleich schweren männlichen Ratten subcutan. 2—4 Monate später wurden die Tiere getötet und die Organe lebenswarm fixiert (BOUIN, CARNOY; Färbung nach FEULGEN).

In der Kultur wirken 7,5—10 γ Oestradioldinatriumphosphat\* in der vorstehend beschriebenen Weise auf 0,1 cm<sup>3</sup> Medium verteilt als Mitosegift. 25 mg Oestradiol sind etwa das 10fache der auf das Körpergewicht umgerechneten in vitro mitoseschädigenden Konzentration.

2. Oestradioldinatriumphosphat in wäßriger Lösung wurde weiblichen jungen Ratten subcutan in einer einzigen Dosis von 35 mg injiziert. Nach 9 Std und auf der Höhe des Oestrus nach 55 Std wurden die Tiere getötet und die Organe fixiert. — 9 Std wurden gewählt, weil nach 9stündiger Einwirkung in vitro der Effekt mit Sicherheit eingetreten ist.

3. Das Duodenum wurde bei jungen ausgewachsenen Ratten etwa 1 cm unterhalb des Pylorus durch Umschnürung mit dickem Faden abgebunden. Vom Magen aus wurden mit feiner Kanüle 5—7 cm<sup>3</sup> Oestradioldinatriumphosphatlösung (100 γ/cm<sup>3</sup>) injiziert. Der Magen und das

\* Oestradioldinatriumphosphat wurde uns in dankenswerter Weise von Schering und der Ciba AG. zur Verfügung gestellt.

Duodenum füllten sich gut und blieben bis zur Sektion gefüllt. Fixation des Duodenums nach 1 min, 10 min, 1 Std, 5 Std und 9 Std. — Bei lokaler Einwirkung auf die bespülte Duodenalschleimhaut und ihre Mitosen entspricht diese Konzentration derjenigen, die in vitro mit großer Regelmäßigkeit aberrierende Chromosomen auslöst.

Untersucht wurden fast alle Organe auf ihre Mitosen, vor allem auch das an Mitosen so reiche Duodenum.

Gegen die erste Versuchsanordnung kann man einwenden, daß unklar bleibt, welche Mengen resorbiert wurden. Zwar zeigten die Tiere bei der Sektion fast durchgehend Pyometra und Pyoovar und waren ohne Ausnahme um  $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{4}$  gegenüber ihren Kontrollgeschwistern an Gewicht und entsprechend an Längenwachstum zurückgeblieben. Trotzdem ist nicht bekannt, ob der Oestradiolspiegel in den Körpersäften so hoch wurde, wie für die mitoseschädigende Wirkung in vitro notwendig wäre. Deswegen wurden die Untersuchungen durch die 2. und 3. Versuchsanordnung ergänzt.

Bei der 2. Versuchsanordnung gelangt das Oestradiol auf dem Umweg über den Kreislauf an die verschiedenen Organe. Die ganze Menge, über 20 mg Oestradiol, wird binnen kurzem resorbiert und infolgedessen ein für unsere Versuchsabsichten genügend hoher Oestradiolspiegel im Blut erreicht.

Bei der 3. Versuchsanordnung erwarteten wir eine lokale Einwirkung auf die oberflächlich gelegenen Mitosen der bespülten Duodenalschleimhaut ähnlich den Verhältnissen in der Gewebekultur nach dem von v. MÖLLENDORFF befolgten Verfahren. Dieser füllte den Hohlschliff des Objektträgers mit der Versuchslösung aus.

#### *Zusammenfassung.*

Es wird wahrscheinlich gemacht, daß Oestradiol im Tierkörper nicht als solches wirkt, sondern als ein Umwandlungsprodukt, das der Organismus aus dem applizierten Oestradiol bildet. Es wird ein Test genannt, der, gekoppelt mit dem Nachweis der oestrogenen Wirkung am kastrierten Tier, zur Auffindung des vermuteten Umwandlungsproduktes führen könnte. Dieses muß oestrogen sein, darf aber in einer bestimmten vielfachen Menge davon, für deren Höhe Anhaltspunkte gegeben werden, nicht als Mitosegift in vitro wirken.

#### *Literatur.*

<sup>1</sup> VERNE, JEAN: C. r. Assoc. Anat. 30, Réunion Montpellier 1935, S. 514. — La vie cellulaire hors de l'organisme. Paris 1937. — <sup>2</sup> MÖLLENDORFF, W. v.: Z. Zellforschg A 29, 706 (1939); 32, 35 (1941). — <sup>3</sup> WARBURG, OTTO: Hoppe-Seylers Z. 66, 305 (1910). — <sup>4</sup> Viele Arbeiten von A.-P. DUSTIN, z. B. Rev. méd. de l'est 1929, 1. — Bull. Acad. Méd. Belg. 1933, 585; 1934, 487. — Le Cancer 11, 25 (1934).