

Acta Medica Okayama

Volume 6, Issue 3

1938

Article 10

MÄRZ 1940

Über die oestrogene Substanz im Reiseumbrryo

Hidezo Asikari*

*Okayama University,

Copyright ©1999 OKAYAMA UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL. All rights reserved.

Aus dem Biochemischen Institut Okayama
(Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu).

Über die östrogene Substanz im Reisembryo

Von

Hidezo Asikari.

Eingegangen am 1. September 1939.

Seitdem die Vaginalschmiermethode bei Nagetieren (*Allen-Doisy-Test*¹⁾) als biologischer Test zum Nachweis und zur quantitativen Auswertung des weiblichen Sexualhormons weithin verwertet wird, hat die Chemie der Sexualhormone, insbesondere des weiblichen, einen großen Fortschritt gemacht.

Überraschend ist, daß die östrogene Substanz sowohl im weiblichen als auch im männlichen Organismus vorgefunden wurde²⁾. Dies scheint darauf hinzudeuten, daß die männlichen und weiblichen Sexualhormone von einer oder einigen gemeinsamen Muttersubstanzen (Cholesterin³⁾, Gallensäure⁴⁾, Kortikosteron⁵⁾ u. a.) herkommen könnten.

In diesem Sinne ist auch die Tatsache hochinteressant, daß im Pflanzenreich, insbesondere in den Blüten, ein brunsterzeugender Stoff nachgewiesen wurde. Zwar wurde dieser Thelikinin genannte Stoff erst im Jahre 1927 von *S. Löwe*, *F. Lange* u. *E. Spohr*⁶⁾ beschrieben und fast gleichzeitig gelang es auch *M. Dohrn*, *Faure*, *Poll* u. *Blotvogel*⁷⁾, aus den Samen und Fruchtanlagen vieler Pflanzen einen Extrakt (Tokokinin genannt) zu bereiten, der in seiner physiologischen Wirkung durchaus den damals bekannten, Follikelhormon enthaltenden Auszügen tierischen Ursprunges entsprach. Danach wurde von anderen Autoren mehrfach berichtet, daß die östrogenen Substanzen nicht nur im Pflanzenreich sondern auch im Erdöl und Bitumen u. a.⁸⁾ vorkommen.

Im Jahre 1933 endlich gelang es *A. Butenandt* u. *H. Jacobi*⁹⁾, aus dem Verseifungsrückstand von Palmkernöl eine kristallisierende östrogene Substanz zu isolieren, die mit dem Ostron aus Schwangerenharn ganz identisch ist. Gleichzeitig wurde von *B. Skażynski*¹⁰⁾ aus weiblichen Weidenkätzchen ein Ostriol erhalten, das von *G. F. Marrian*¹¹⁾ zuerst aus Schwangerenharn gewonnen wurde. So-

mit könnte die Identität der als Ostron bzw. Ostriol zu bezeichnenden östrogenen Substanzen im Pflanzenreich überhaupt angenommen, aber noch nicht verallgemeinert werden.

In diesem Zusammenhang wurde hier das Öl aus Reisembryonen untersucht, um die kristallisierende östrogene Substanz zu isolieren. Im Reisembryo wurden von *Tanaka*¹²⁾ verschiedene Sterine vorgefunden, von denen, wenn auch in kleiner Menge, Ergosterin nachgewiesen wurde, welches eine östrogene Wirkung auszuüben vermag¹³⁾.

150 kg Reisembryonen wurden mit 90 %igem Alkohol extrahiert; der Extrakt (15 kg) wurde verseift. Der unverseifbare Anteil zeigte jedoch bei kastrierten sowie bei infantilen Mäusen keine Brunstreaktion. Der Seifenanteil wurde, wie unten genau beschrieben wird, in drei Fraktionen zerlegt: Petroläther-, Benzol- und Alkoholfraktion. Die Petroläther- sowie die Alkoholfraktion lösten bei kastrierten sowie bei jungen Mäusen keine Brunstreaktion aus, während die Benzolfraktion sowohl bei kastrierten als auch bei infantilen Mäusen wohl positive *Allen-Doisy*-Probe zeigte. Aus dieser Fraktion wurde aber keine kristallisierende Substanz erhalten, doch dürfte diese Fraktion der das Ostron enthaltenden Fraktion des Schwangerenharns entsprechen. So könnte man wohl annehmen, daß im Reisembryo auch eine dem Ostron ähnliche Substanz enthalten ist.

Methodisches und Versuchsmaterial.

A. Fraktionierung des Reisembryoöls.

150 kg Reisembryonen wurden mit 90 %igem warmem Alkohol erschöpfend extrahiert, wobei ca. 15 kg Extrakt erhalten wurden. Je 1 kg des Extraktes wurde mit je gleicher Menge einer 20 %igen alkoholischen Kalilauge 6 Stunden lang hydrolysiert und unter Verdünnung mit Wasser mehrmals ausgeäthert. Auf diese Weise wurden eine unverseifbare und eine Seifenfraktion erhalten.

1. Unverseifbare Fraktion.

Der Ätherextrakt wurde vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand (900 g) nach dem Digerieren mit kaltem Methanol aus Äthanol einige Male umkristallisiert. Das so erhaltene Steringemisch, das überwiegend aus Sitosterinen bestand, schmolz bei 138° und zeigte keine Brunstreaktion (Sterinfraktion).

2. Seifenfraktion.

Diese Fraktion wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure erschöpfend ausgeäthert. Der Extrakt wurde in 80 %igem Alkohol

gelöst und mit Petroläther geschüttelt. Aus der Petrolätherfraktion wurden 90 g salbige Substanz erhalten und als Petrolätherfraktion wurde mit ihr die *Allen-Doisy*-Probe ausgeführt (Petrolätherfraktion).

Dann wurde die Alkoholschicht einige Male mit Benzol geschüttelt, wodurch Benzol (120 g) und Alkoholfraktion (3 g) erhalten wurden; jede Fraktion wurde als Olivenöllösung den kastrierten sowie den infantilen Mäusen subkutan injiziert.

B. Brunstreaktion.

Als Brunstreaktion wurde eine *Allen-Doisy*-Probe nach *Zondeck*¹⁴⁾ an kastrierten (ca. 20 g Körpergewicht) sowie infantilen Mäusen (nicht mehr als 6 g Körpergewicht) verwendet und gleichzeitig klinische Befunde in der Vaginalgegend beobachtet.

Die auszuwertende Fraktion wurde meistens in Olivenöllösung subkutan zweimal innerhalb von 2 Tagen, die Benzolfraktion aber einmal täglich in der Zeit von 1 bis 2 Tagen oder vier- bis sechsmal innerhalb von 2 Tagen injiziert und die Vollbrunst nach *Butenandt*¹⁴⁾ bei 75 - 80 % der Versuchstiere geprüft.

Die Kastration¹⁴⁾: Die weiblichen Mäuse (ca. 20 g Körpergewicht) wurden vom Rücken aus kastriert und nach 6 Wochen wurden die als vollständig kastriert erwiesenen Mäuse zum Versuche verwendet und mit nichtgeschabtem Weizen, Brot und mit einer kleinen Menge gebratenen Fleisches gefüttert. Die Färbung der Abstriche wurde nach *Romanowsky-Giemsa* ausgeführt.

Ergebnisse.

1. Kontrolle.

Den kastrierten Mäusen wurden 0.1 - 0.5 cc Olivenöl innerhalb von 2 Tagen subkutan injiziert.

Tabelle 1. (Kontrolle.)

Injizierte Dosis (cc)	Anzahl der Tiere pro Dosis	Anzahl der Tiere mit Vollbrunst	% der Tiere mit Vollbrunst	Dauer des Ostrus in Tagen
0.1 × 2	6	—	—	—
0.5 × 2	6	1	16.4	1½
0.1 × 2	5	—	—	—
0.5 × 2	5	—	—	—

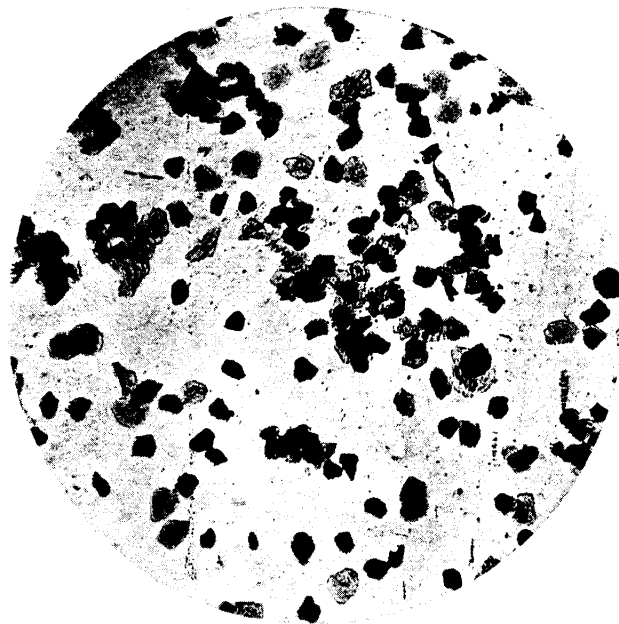
Aus der Tabelle 1 ersieht man, daß keine Maus bei Zufuhr von Olivenöl allein Vollbrunst gezeigt hat,

2. Benzolfraktion.

1) bei einmaliger Injektion. 0.045–0.225 cc einer 10%igen Olivenöllösung wurden einmal den kastrierten Mäusen subkutan verabreicht. Das Ergebnis ist in der Tabelle 2 kurz zusammengefaßt.

Diese Auswertungsreihe zeigt, daß die Grenzdosis bei 111 ME. pro Gramm liegt und zwar daß 0.009 g Benzolfraktion in Öllösung bei einmaliger Injektion bei 80% der Versuchstiere die Vollbrunstreaktion auslösen. Dabei wurde Rötung und Öffnung der Vaginalmündung der Tiere beobachtet.

Fig. 1. Östrus nach zweimaliger Injektion mit der Benzolfraktion.



2) bei protrahierter Injektion. 0.002–0.5 cc einer 10–20%igen Olivenöllösung wurden 2 bis 6 mal innerhalb von 2 Tagen subkutan einverleibt. Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich ist, wurde die Wirksamkeitszahl bei der 4- und 6-maligen Injektion viel höher als die bei einmaliger und zwar liegt die Grenzdosis je bei 125 und 278 ME. pro Gramm, was gut mit dem Befund von *Butenandt*¹⁵⁾ übereinstimmt (Fig. 1–3).

Fig. 2. Ostrus nach viermaliger Injektion mit Benzolfraktion.

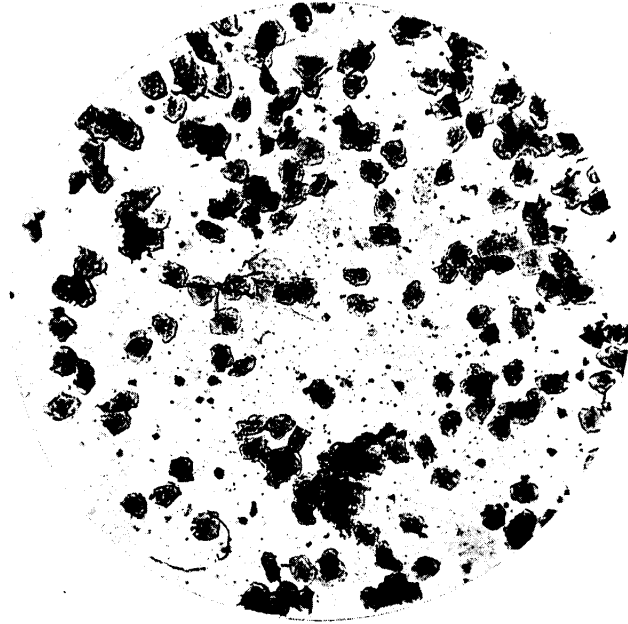
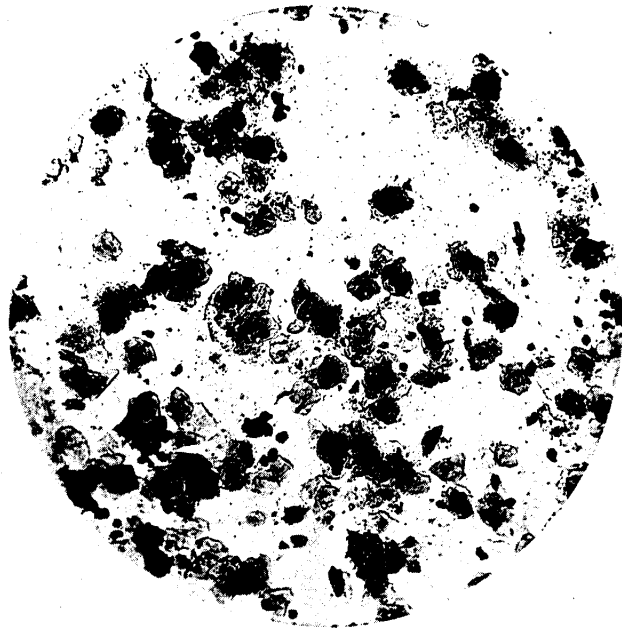


Fig. 3. Ostrus nach sechsmaliger Injektion mit Benzollösung.



3) bei infantilen Mäusen. Den infantilen Mäusen, die nicht über 6 g Körpergewicht hatten, wurden 0.5-1.0 cc einer 10%igen Olivenöllösung zweimal innerhalb von 2 Tagen subkutan injiziert und die Gegenwart der östrogenen Substanz in der Benzolfraction auch bei diesem Fall konstatiert, wie in Tabelle 2 gezeigt wird.

Tabelle 2.

Injizierte Dosis (g)	Anzahl der Tiere pro Dosis	Anzahl der Tiere mit Vollbrunst	% der Tiere mit Vollbrunst	Dauer des Ostrus in Tagen	ME. pro g	Bemerkungen
0.045	5	5	100	} ½-1	22	einmalige Injektion
0.03	5	5	100		33	"
0.009	6	5	83		111	"
0.009	6	4	66		—	"
2×0.1	3	3	100	} ½	5	"
2×0.03	5	4	100		16.5	"
2×0.02	5	5	80		25	"
2×0.01	5	4	60	1	50	"
2×0.008	5	2	40	½	—	"
2×0.005	3	—	—	—	—	"
2×0.004	5	—	—	—	—	"
2×0.002	5	—	—	—	—	"
4×0.004	6	6	100	} ½-1	62.5	viermalige Injektion
4×0.002	6	6	100		125	"
4×0.0017	6	4	66		—	"
4×0.0015	5	2	44	1	—	"
6×0.002	6	6	100	} ½-1	83	sechsmalige Injektion
6×0.001	6	6	100		164	"
6×0.0006	5	4	80		278	"
6×0.0004	5	3	60		—	"
2×0.1	3	3	100	} ½	5	infantile Mäuse
2×0.05	3	1	33.3		—	"

Wenn man die östrogene Substanz in der betreffenden Benzolfraktion als Östron annehmen könnte, so kann man nach dem Versuch 1) schätzen, daß ca. 1 mg oder mehr Östron in der gesamten Benzolfraktion (120 g) bzw. in 150 kg Reisembryonen enthalten ist, da die Grenzdosis des Östrons nach *Butenandt*¹⁴⁾ bei 8–9 Millionen ME. pro Gramm liegt. Dies zeigt, daß eine Reindarstellung des Östrons aus den gebrauchten Reisembryonen fast unmöglich ist.

3. Petrolätherfraktion.

0,1–0,5 cc einer 20%igen Olivenöllösung der Petrolätherfraktion wurden den kastrierten sowie den infantilen Mäusen mittels zweimaliger Injektion innerhalb von 2 Tagen subkutan verabreicht. Das Ergebnis zeigte, daß diese Fraktion keine östrogene Substanz enthält (Tabelle 3).

Tabelle 3.

Injizierte Dosis (g)	Anzahl der Tiere pro Dosis	Anzahl der Tiere mit Vollbrunst	% der Tiere mit Vollbrunst	Dauer des Östrus in Tagen	Bemerkungen
2 × 0,1	5	1	20	1	kastrierte Mäuse
2 × 0,02	5	1	25	½	„
2 × 0,1	10	—	—	—	infantile Mäuse
1 × 0,02	5	—	—	—	„

4. Sterinfraktion.

Diese Fraktion wurde genau wie bei der Petrolätherfraktion, den kastrierten sowie den jungen Mäusen einverleibt. Da diese Fraktion Ergosterin enthalten soll, so wurde eine positive *Allen-Doisy*-Probe erwartet, aber dies war nicht der Fall, wie aus Tabelle 4 ersichtlich ist. Diese Tatsache könnte dadurch erklärt werden, daß der Gehalt der Sterinfraktion an Ergosterin nicht ausreichend gewesen ist um Brunstreaktion auszulösen.

5. Alkoholfraktion.

Diese Fraktion wurde ebenfalls wie vorher den kastrierten sowie den infantilen Mäusen verabreicht und das Ergebnis in Tabelle 5 kurz zusammengestellt. Östrogene Substanz ist darin nicht nachweisbar gewesen.

Tabelle 4.

Injizierte Dosis (g)	Anzahl der Tiere pro Dosis	Anzahl der Tiere mit Vollbrunst	% der Tiere mit Vollbrunst	Dauer des Ostrus in Tagen	Bemerkungen
2 × 0.1	5	1	20	} ½	kastrierte Mäuse
2 × 0.02	5	1	20		„
2 × 0.1	5	—	—	—	infantile Mäuse
2 × 0.02	5	—	—	—	„

Tabelle 5.

Injizierte Dosis (g)	Anzahl der Tiere pro Dosis	Anzahl der Tiere mit Vollbrunst	% der Tiere mit Vollbrunst	Dauer des Ostrus in Tagen	Bemerkungen
2 × 0.1	5	1	20	} ½	kastrierte Mäuse
2 × 0.02	5	1	20		„
2 × 0.1	5	—	—	—	infantile Mäuse
2 × 0.02	5	—	—	—	„

Literatur.

- ¹ Allen, E. u. Doisy, E. A., J. Amer. med. Assoc. 81, 819, 1923. — ² Zondeck, B., Nature 133, 209 u. 494, 1934; Deulofeu, V. u. Ferrari, T., Z. Physiol. Chem. 226, 192, 1937. — ³ Butenandt, A., Deutsch. med. Wschr. 61, 1, 823, 1935. — ⁴ Ishihara, T., J. of Bioch. 27, 265, 1938; Kimura, T. u. Sugiyama, G., J. of Bioch. 29, 409, 1939. — ⁵ Marker, R. E., J. Amer. Chem. Soc. 60, 1725, 1938; 61, 1289, 1939. — ⁶ Löwe, S., Lange, F. u. Spohr, E., Bioch. Z. 180, 1, 1927. — ⁷ Dohrn, M., Faure, W., Poll, H. u. Blotevogel, W., Med. Klin. Nr. 37, S. 1417, 1926. — ⁸ Fellner, O. O., Med. Klin. Nr. 49, S. 1886, 1926; Walker, B. S. u. Janny, T. C., Endocrinology 14, 389, 1930; Much, H., Münch. Med. Wschr. S. 1992, 1931; Aschheim, S. u. Hohlweg, W., Deutsch. Med. Wschr. S. 32, 1933. — ⁹ Butenandt, A. u. Jacobi, H., Z. Physiol. Chem. 218, 104, 1933. — ¹⁰ Skarżynski, B., Nature 131, 766, 1933. — ¹¹ Marrian, G. F., Bioch. J. 24, 435, 1930. — ¹² Tanaoka, K., J. of Bioch. 17, 483, 1933; 18, 1, 1933. — ¹³ Cook, J. W.,

456 H. Asikari: Über die östrogene Substanz im Reiseumryo.

Dodds, E. C. u. Hewett, C. L., Naturw. 21, 222, 1933. — ¹⁴ *Zondek, B.*, Die Hormone des Ovariums u. des Hypophysenvorderlappens. S. 23 - 34, 1931. — ¹⁵ *Butenandt, A.*, Z. Physiol. Chem. 188, 1, 1930.
