



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

OXIDATIVER STRESS UND KONTINUIERLICHE HORMONSUBSTITUTION:  
EINE KRITISCHE BETRACHTUNG AN HAND VON FALLBEISPIELEN

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

|                                     |                                        |
|-------------------------------------|----------------------------------------|
| Verfasserin / Verfasser:            | Gabriele Pakfeifer                     |
| Matrikelnummer:                     | 8900776                                |
| Studienrichtung (lt. Studienblatt): | Pharmazie (A449)                       |
| Betreuerin / Betreuer:              | Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Martin Czejka |

Wien, am 18. Juni 2010



## **Danksagung**

Vom Department für Klinische Pharmazie und Diagnostik (Leiter: Univ.-Prof. Mag. Dr. Walter Jäger) an der Fakultät für Lebenswissenschaften der Universität Wien danke ich im Besonderen Herrn ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Martin Czejka. für die Auswahl des Themas, für die vielen Anregungen und konstruktiven Diskussionen sowie für die wertvolle Hilfe nicht nur beim Klären offener Fragen, sondern auch bei der kontinuierlichen Betreuung der Arbeit.

Meinen Eltern danke ich, dass Sie mir das Studium ermöglicht haben, für die Unterstützung, Hilfsbereitschaft, ihr Vertrauen über viele Jahre hinweg und für die kleinen Aufmunterungen zwischendurch.

Ganz besonderen Dank gilt meiner lieben Mutter für die kritische Durchsicht der Arbeit sowie für die Korrekturhilfe hinsichtlich der sprachlichen und grammatikalischen Gestaltung der Arbeit, für Ihr offenes Ohr bei jeglichen Problemen, für die Gespräche und Diskussionen zu später Stunde.

Inbesondere geht mein Dank an meine liebe Freundin Tina für ihre Freundschaft, für gemeinsame Feiern, Feste, Abendessen, für die Aufmunterungen zwischendurch und für vieles mehr.

Ferner vielen Dank an alle Familienmitglieder und Freunde, die immer an mich geglaubt haben und mich motivierten weiter zu machen.

Abschließend und von ganzem Herzen danke ich meinem lieben Mann, der diese Herausforderung mit mir zusammen gemeistert hat, mit seiner fachlichen Kompetenz zur Seite stand, für die unendliche Geduld und Liebe während der Fertigstellung der Diplomarbeit und dessen Nervenstärke manchmal für uns beide reichen musste.

Vielen Dank an alle, die zur Entstehung dieser Diplomarbeit beigetragen haben!



Diese Diplomarbeit widme ich meiner lieben Familie





## Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildungsverzeichnis .....                                                                          | 9   |
| Tabellenverzeichnis .....                                                                            | 12  |
| Abkürzungsverzeichnis.....                                                                           | 13  |
| Einleitung .....                                                                                     | 21  |
| 1. Hormone .....                                                                                     | 22  |
| 1.1. Steroidhormone .....                                                                            | 23  |
| 1.2. Schilddrüsenhormone .....                                                                       | 31  |
| 1.3. Hormonpräparate.....                                                                            | 34  |
| 2. Metabolismus .....                                                                                | 58  |
| 2.1. Phase-I-Enzymsysteme .....                                                                      | 59  |
| 2.2. Phase-II-Enzymsysteme .....                                                                     | 63  |
| 2.3. Steroidhormon-Metabolismus.....                                                                 | 67  |
| 2.3.1. Mechanismus des Steroidhormon-Stoffwechsels .....                                             | 68  |
| 2.3.2. Estradiol-Metabolismus.....                                                                   | 69  |
| 2.3.3. Testosteron-Metabolismus .....                                                                | 76  |
| 2.3.4. Progesteron-Metabolismus.....                                                                 | 79  |
| 2.4. Schilddrüsenhormon-Metabolismus .....                                                           | 81  |
| 3. Grundlagen und Entstehung von ROS .....                                                           | 85  |
| 3.1. Chemische Grundlagen und Historie .....                                                         | 88  |
| 3.1.1. Wichtige Vertreter reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) .....                                    | 89  |
| 3.1.2. ROS-Reaktionen .....                                                                          | 93  |
| 3.2. Enzymatische Grundlagen .....                                                                   | 97  |
| 3.2.1. Enzymatische Bildung von ROS .....                                                            | 98  |
| 3.3. Antioxidanzien und Radikalfänger .....                                                          | 107 |
| 3.3.1. Inaktivierung von ROS .....                                                                   | 108 |
| 4. Methoden zur Messung von ROS und der antioxidativen Kapazität .....                               | 112 |
| 4.1. FORT - Test zur Messung von ROS.....                                                            | 113 |
| 4.2. FORD - Test zur Messung der antioxidativen Kapazität. ....                                      | 117 |
| 5. Aktuelle Beispiele zur OS-Messung an Hand der regelmäßigen Einnahme von<br>Hormonpräparaten ..... | 121 |
| 5.1. Hormonpräparate zur Kontrazeption und zur HET.....                                              | 124 |
| 5.2. Schilddrüsenhormonpräparate .....                                                               | 131 |
| 6. Conclusio .....                                                                                   | 135 |
| 7. Literaturverzeichnis.....                                                                         | 137 |
| 8. Lebenslauf .....                                                                                  | 153 |



## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1. Mechanism for a hormone,  $H_2$  to effect the secretion (1) , metabolism (2) and/or action (at the receptor (3) or postreceptor (4) level) of another hormone,  $H_1$  [Baulieu et al. 1990].
- Abb. 1.2. Struktur der Estrogene [Forth et al. 2009 / modifiziert].  
(Erstellt mit MDL ISIS Draw 2.5)
- Abb. 1.3. Struktur von Progesteron (Erstellt mit MDL ISIS Draw 2.5)
- Abb. 1.4. Struktur von Testosteron, DHT und Cholesterin  
(Erstellt mit MDL ISIS Draw 2.5)
- Abb. 1.5. Aufbau eines nukleären Steroidhormonrezeptors.: [Gronemeyer 1992 / modifiziert]. (Erstellt mit MDL ISIS Draw 2.5)
- Abb. 1.6. **T<sub>0</sub>**:Struktur von Tyrosin, Thyronin; **T<sub>4</sub>**:L-Thyroxin/3',3'',5',5''-Tetraiodo-thyronin/2-Amino-3-[4-(4-hydroxy-3,5-diiodophenoxy)-3,5-diiodo-phenyl]-propansäure/Sodium(2S)-2-amino-3-[4-(4-hydroxy-3,5-diiodophenoxy)-3,5-diiodo-phenyl]propanoat;**T<sub>3</sub>**:3',3'',5'-Triiod-L-thyronin/O-(4-Hydroxy-3-iodophenyl)-3,5-diiod-L-tyrosin/(S)-2-Amino-3-[4-(4-hydroxy-3-iodophenoxy)-3,5-diiodophenyl]propansäure  
(Erstellt mit MDL ISIS Draw 2.5)
- Abb. 1.7. Es gibt zwei T<sub>3</sub>-Rezeptoren, TR $\alpha$  und TR $\beta$ , die von zwei verschiedenen Genen kodiert werden; durch alternatives Spleißen entstehe jeweils zwei Isoformen. Sie bestehen aus einer DNA-Bindedomäne (DNA) und eine Ligandenbinde-Domäne (Hormon).  
(Bearbeitet mit Corel Photo-Paint®)
- Abb. 1.8. LADME-MODELL [Plötz 2007]. (Erstellt mit SMART ART-Graphik)
- Abb. 2.1. CYP-Enzym-Nomenklatur [Guengerich 1995 / modifiziert].  
(Erstellt mit SMART ART-Graphik)
- Abb. 2.2. Struktur des Cytochrom P450, ein Häm-Eisen-Thiolat-Protein [Bursch 2009].  
(Bearbeitet mit Corel Photo-Paint®)
- Abb. 2.3. Bildung eines  $\beta$ -D-Glucuronid und Uridin-5'-diphosphat (UDP) [Gerstner 2008]. (Bearbeitet mit Corel Photo-Paint®)
- Abb. 2.4. S-COMT- vermittelte O-Methylierung von Catecholamin-Substraten. Die gestrichelten Linien zeigen nicht kovalente Wechselwirkungen [Zhu 2002 / modifiziert]. (Erstellt mit MDL ISIS Draw 2.5)
- Abb. 2.5. Steroidhormon-Stoffwechsel ausgehend vom Cholesterol [Forth et al. 2009 / modifiziert]. (Erstellt mit MDL ISIS Draw 2.5)

- Abb. 2.6. Metabolismus des 17 $\beta$ -Estradiols [Gerstner 2008 / modifiziert].  
(Erstellt mit MDL ISIS Draw 2.5)
- Abb. 2.7. Redoxcycling zwischen den Catecholestrogenen (CEs) und den Estrogenchinonen [Gerstner 2008 / modifiziert].  
(Erstellt mit MDL ISIS Draw 2.5)
- Abb. 2.8. Methylierung der 2-Hydroxy-E2/E1 und 4-Hydroxy-E2/E1 durch COMT [Gerstner 2008 / modifiziert]. (Erstellt mit MDL ISIS Draw 2.5)
- Abb. 2.9. Metabolismus von Testosteron [Forth et al. 2009 / modifiziert].  
(Erstellt mit MDL ISIS Draw 2.5)
- Abb. 2.10. Reaktionsmechanismus des Cytochrom P450-Aromatase-Komplexes [Löffler 2007]. (Bearbeitet mit Corel Photo-Paint®)
- Abb. 2.11. Metabolismus des Progesterons [Genome]. (Erstellt mit MDL ISIS Draw 2.5)
- Abb. 2.12. Deiodination: Reaktionswege von T<sub>4</sub> und T<sub>3</sub> katalysiert durch Dio1, Dio2 und Dio3. Es wurden bis jetzt drei Diiodthyronine T<sub>2</sub>, zwei Monoiodthyronine T<sub>1</sub> sowie das Thyronin T<sub>0</sub> identifiziert [Baulieu et al. 1990/ modifiziert].  
(Bearbeitet mit Corel Photo-Paint®)
- Abb. 2.13. Metabolische Reaktionen von T<sub>4</sub> in vivo [Baulieu et al. 1990/ modifiziert].  
(Erstellt mit MDL ISIS Draw 2.5)
- Abb. 3.1. Dysbalance von ROS-Bildung und ROS-Inaktivierung unter oxidoreduktiven Bedingungen [Pfaar et al. 2006 / modifiziert].  
(Erstellt mit SMART ART-Graphik)
- Abb. 3.2. ROS - Netzwerk: Die Wirkung von pro- und antioxidativen Systemen [Jakobi et al. 2005 / modifiziert]. (Erstellt mit SMART ART-Graphik)
- Abb. 3.3. Entstehung von Lipidperoxiden. Bisallylische Fettsäureradikale entstehen z.B. unter der Einwirkung reaktiver Sauerstoffspezies auf mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Die anschließende Anlagerung von O<sub>2</sub> führt zur Bildung von Peroxyradikalen. Diese werden durch Abstraktion eines H-Radikals aus einer weiteren ungesättigten Fettsäure in die entsprechenden Peroxide umgewandelt, sodass ein zyklischer Prozess entsteht, der große Mengen von Fettsäureperoxiden liefern kann [Löffler 2007].  
(Bearbeitet mit Corel Photo-Paint®)
- Abb. 3.4. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosin [Pfaar et al. 2006].  
(Erstellt mit MDL ISIS Draw 2.5)
- Abb. 3.5. Enzymvermittelte ROS-Bildung [Pfaar et al. 2006].  
(Bearbeitet mit Corel Photo-Paint®)

- Abb. 3.6. ROS-Bildung in den Mitochondrien [Pfaar et al. 2006]  
(Bearbeitet mit Corel Photo-Paint®)
- Abb. 3.7. Schematische Darstellung der ROS-abhängigen Vorgänge, die zur Eliminierung eines Bakteriums durch Granulozyten führen [Pfaar et al. 2006].  
(Bearbeitet mit Corel Photo-Paint®)
- Abb. 3.8. Schematische Darstellung der NADPH-Oxidase und ihre Aktivierung [Pfaar et al. 2006] (Bearbeitet mit Corel Photo-Paint®)
- Abb. 3.9. Bildung von Superoxid-Radikalen durch Cytochrom P<sub>450</sub>. In einer Nebenreaktion der Monooxygenasen können aus Chinonen Semichinonradikale entstehen, die unter Superoxidbildung spontan mit dem molekularen Sauerstoff reagieren [Löffler 2007]. (Bearbeitet mit Corel Photo-Paint®)
- Abb. 3.10. Schematische Darstellung der ROS-Bildung durch den Enzymkomplex Cytochrom P<sub>450</sub>-Reduktase und Monooxygenase. (R= endogene oder exogene Verbindung, wie Wirkstoffe) [Pfaar et al. 2006].  
(Bearbeitet mit Corel Photo-Paint®)
- Abb. 3.11. Reaktionsmechanismus der Hydroxylierung eines Substrates [Löffler (2007)].  
(Bearbeitet mit Corel Photo-Paint®)
- Abb. 3.12. Antioxidative Spezies, die extrazellulär, membranständig und intrazellulär ROS entgegenen. EC: exztrazellulär; SOD: Superoxiddismutase; GPx: Glutathionperoxidase; CytCox: Cytochrom-c-Oxidase [Pfaar et al. 2006].  
(Bearbeitet mit Corel Photo-Paint®)
- Abb. 3.12. Schematische Darstellung der Inaktivierung von ROS [Pfaar et al. 2006].  
(Bearbeitet mit Corel Photo-Paint®)
- Abb. 3.13. Struktur von Glutathion (Bearbeitet mit Corel Photo-Paint®)
- Abb. 3.14. Glutathion-Redoxcyclus und ROS-verursachte Hämolyse [Pfaar et al. 2006].  
(Bearbeitet mit Corel Photo-Paint®)
- Abb. 4.3. Fenton-Reaktion: **A.** Bildung von Alkoxyradikalen **B.** Bildung der Peroxylradikale **C.** Reaktion zur Farbentwicklung: Die Hydroperoxide reagieren mit einem gepufferten Chromogen und bilden einen gefärbten Komplex, der photometrisch bei einer Wellenlänge von 505 nm nach dem Lambert Beer'schen Gesetz erfasst wird.  
  
Die Bezeichnung 2CrNH<sub>2</sub> steht für das Chromogen und der Ausdruck [Cr-NH<sub>2</sub>·]<sup>+</sup> für das kationische Radikal des Chromogens [MICRO-MEDICAL (c)]  
(Erstellt mit MDL ISIS Draw 2.5)
- Abb. 4.4. FORT-Testkit [MICRO-MEDICAL (c)]. (Bearbeitet mit Corel Photo-Paint®)

- Abb. 4.5. Ultraviolettspektrum des FORD-Chromogenradikals [MICRO-MEDICAL (e)].  
(Bearbeitet mit Corel Photo-Paint®)
- Abb. 4.6. FORD-Testkit [MICRO-MEDICAL (d)]. (Bearbeitet mit Corel Photo-Paint®)
- Abb. 5.1. Beispiel eines Fragebogens zur Messung von FORT und FORD (Bearbeitet mit Corel Photo-Paint®)
- Abb. 5.2. Vergleich kombinierte Kontrazeptiva (KK) mit reinen Gestagenpräparaten in Form der extravasalen Applikation [Kafka 2008, Eisl 2008, Luf 2009].  
(Erstellt mit GRAPH. PAD. PRISM®5)
- Abb. 5.3. Vergleich der Schilddrüsenpräparate untereinander sowie in Kombination mit Hormonpräparate zur Kontrazeption und zur HET [Kafka 2008, Eisl 2008, Luf 2009]. (Erstellt mit GRAPH. PAD. PRISM®5)
- Abb. 5.4. Vergleich der Schilddrüsenpräparate mit dem Geschlecht [Kafka 2008, Eisl 2008, Luf 2009]. (Erstellt mit GRAPH. PAD. PRISM®5)

## **Tabellenverzeichnis**

- Tab. 1.1. Proteinbindungen (in %) und freier Anteil (in %) der Steroidhormone  
[Quelle: Forth et al 2009].
- Tab. 1.2. Applikationsformen hormoneller Kontrazeptiva (Diese Präparate wurden während der Messung reaktiver Sauerstoffspezies sowie der Messung der antioxidativen Kapazität von den jeweiligen Frauen verwendet) [AGES Fachinfo].
- Tab. 1.3. Präparateauswahl der gängigen Applikationsformen von Hormonpräparaten zur HET (HRT) für Frauen [AGES Fachinfo].
- Tab. 1.4. Präparateauswahl der gängigen Applikationsformen der Testosteron-Substitution beim alternden Mann mit symptomatischen Androgenmangel [AGES Fachinfo; Jacobi 2005].
- Tab. 1.5. Präparateauswahl der oralen Applikationsform der Schilddrüsenhormon-Substitution [AGES Fachinfo].
- Tab. 2.1. Überblick über die wichtigsten Vertreter der Phase-I-bis-III-Proteine der Biotransformation [Efferth 2006 / modifiziert].
- Tab. 2.2. SULT-Enzyme für Steroidhormone und Schilddrüsenhormone [Javitt et al. 2001/ modifiziert].
- Tab. 2.3. CYP-Familien der Steroide und ihre Funktion [Guengerich, 1995/modifiziert].
- Tab. 2.4. Metabolisierung der Steroidhormone durch Subfamilien [Jäger u. Czejka 2009].

|           |                                                                                                                                                                                       |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tab. 3.1. | Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) mit radikalischen und nicht radikalischen Eigenschaften [Pfaar et al. 2006, Sies (1993), Cui et al. 2004 / modifiziert]. |
| Tab. 3.2. | Beispiele für endogene und exogene Antioxidanzien [Pfaar et al. 2006/ modifiziert].                                                                                                   |
| Tab. 4.1. | Referenzwerte des FORT-Tests [MICRO-MEDICAL (b)].                                                                                                                                     |
| Tab. 5.1. | Messdaten von 84 Personen mit Hormonsubstitution [Luf 2009].                                                                                                                          |

## Abkürzungsverzeichnis

|                    |                                                                                  |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| ADAM               | androgene decline in aging males                                                 |
| AF                 | Transaktivierungsfunktion                                                        |
| AO                 | Antioxidantien, antioxidative Substanzen                                         |
| AOK                | Antioxidative Kapazität                                                          |
| AR                 | Androgenrezeptor                                                                 |
| C                  | Kohlenstoffatome                                                                 |
| C-Radikale         | Kohlenstoff-Radikale                                                             |
| CBG                | Transcortin, (engl: corticosteroid binding globulin)                             |
| CEs                | Catecholestrogene                                                                |
| CH <sub>3</sub>    | Methylgruppe                                                                     |
| COMT               | Catechol-O-Methyl-Transferase                                                    |
| COOH               | Carboxylgruppe                                                                   |
| CPR                | NADPH-Cytochrom-P <sub>450</sub> -Reduktase                                      |
| Cu <sup>2+</sup>   | zweiwertiges Kupfer                                                              |
| Cu(I)              | einwertiges Kupfer                                                               |
| Cu(II)             | zweiwertiges Kupfer                                                              |
| CYP <sub>450</sub> | Cytochrom-P <sub>450</sub> - Monooxygenasen , Cytochrom-P <sub>450</sub> -System |
| CYP11A1            | „side chain cleavage“-Enzym, P <sub>450</sub> scc                                |
| CytCox             | Cytochrom-c-Oxidase                                                              |
| DBD                | C-oder DNA-bindende Dömäne                                                       |
| DES                | Diethylstilbestrol                                                               |

|                   |                                                                                      |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| DHEA              | Dehydroepiandrosteron                                                                |
| DHT               | Dihydrotestosteron                                                                   |
| DFO               | Desferrioxamin                                                                       |
| DIO               | Iodthyronin-Deiodasen                                                                |
| Dio1              | Typ I 5'-Deiodase , Iodthyronin-Deiodasen Typ 1                                      |
| Dio2              | Typ II 5'-Deiodase, Iodthyronin-Deiodasen Typ 2                                      |
| Dio3              | Typ III 5'-Deiodase, Iodthyronin-Deiodasen Typ 3                                     |
| DIT               | Diiodtyrosin                                                                         |
| DNA               | Desoxyribonukleinsäure                                                               |
| DOC               | Deoxycorticosteron                                                                   |
| EE                | Ethinylestradiol                                                                     |
| ELISA             | Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay oder Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (EIA) |
| ER                | Estrogenrezeptor                                                                     |
| ER $\alpha$       | alpha-Estrogenrezeptor                                                               |
| ER $\beta$        | beta-Estrogenrezeptor                                                                |
| ER-Gen            | Estrogerezeptor-Gen                                                                  |
| PR                | Progesteronrezeptor                                                                  |
| eNOS              | endotheliale NO-Synthase                                                             |
| E1                | Estron                                                                               |
| E2                | 17 $\beta$ -Estradiol                                                                |
| E2-17-G           | E2-17-Glucuronid                                                                     |
| E3                | Estriol                                                                              |
| FAD               | Flavin-Adenin-Dinukleotid                                                            |
| FADH <sub>2</sub> | reduzierte Form des Flavin-Adenin-Dinukleotids                                       |
| FMN               | Flavinmononucleotid auch Riboflavin-5'-phosphat                                      |
| FORD              | Free Oxygen Radicals Defence                                                         |
| FORM®             | Free Oxygen Radicals Monitor                                                         |
| FORT              | Free Oxygen Radicals Test                                                            |
| Fe <sup>2+</sup>  | zweiwertiges Eisen                                                                   |

|                               |                                                                                                                          |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FeCl <sub>3</sub>             | Eisenchlorid                                                                                                             |
| Fe(II)                        | zweiwertiges Eisen                                                                                                       |
| Fe-Komplex                    | Eisenkomplex                                                                                                             |
| fT <sub>3</sub>               | freies ungebundenes Triiodthyronin                                                                                       |
| fT <sub>4</sub>               | freies ungebundenes Tetraiodthyronin                                                                                     |
| GnRH                          | Gonadoliberin (engl. gonadotropin- releasing-homone)                                                                     |
| GPx                           | Glutathionperoxidase                                                                                                     |
| GPx-3                         | Glutathion Peroxidase 3                                                                                                  |
| GRd                           | Glutathion-Reduktase                                                                                                     |
| GSH                           | Glutathion                                                                                                               |
| GSH                           | reduziertes Glutathion                                                                                                   |
| GSSG                          | Glutathion-Dimer                                                                                                         |
| GSTs                          | Glutathion-S-Transferasen                                                                                                |
| H <sub>2</sub> O              | Wasser                                                                                                                   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Wasserstoffperoxid                                                                                                       |
| HET                           | Hormonersatztherapie (engl. hormone replacement therapy oder HRT)                                                        |
| HO                            | Hydroxylgruppe                                                                                                           |
| HO·                           | Hydroxylradikale                                                                                                         |
| HOCL                          | hypochlorige Säure                                                                                                       |
| HPLC-MS                       | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography) mit Massenspektrometrie-Kopplung |
| HSDs                          | Hydroxy-Steroid-Dehydrogenasen                                                                                           |
| HSD Typ 2                     | Hydroxy-Steroid-Dehydrogenasen Typ 2                                                                                     |
| HSD Typ 1                     | Hydroxy-Steroid-Dehydrogenasen Typ 1                                                                                     |
| 3α-HSD                        | 3alpha-Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase                                                                                     |
| 3β-HSD                        | 3beta-Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase                                                                                      |
| 20α-HSD                       | 20alpha-Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase                                                                                    |
| HSP90                         | Heat-Shock-Protein 90                                                                                                    |
| i.m.                          | intramuskulär                                                                                                            |
| iNOS                          | induzierte NO-Synthase                                                                                                   |

|                   |                                                              |
|-------------------|--------------------------------------------------------------|
| IUP               | Intrauterinpessar, Hormonspirale                             |
| KAT               | Katalase                                                     |
| KK                | kombinierte Kontrazeptiva (Estrogen- und Gestagenkomponente) |
| KOK               | kombinierte orale Kontrazeptiva                              |
| LADME             | Liberation/Absorbtion/Distribution/Metabolismus/Elimination  |
| LBD               | E-oder Ligandbindende Domäne                                 |
| LH                | luteinisierenden Hormon                                      |
| LO•               | Lipidalkoxyl                                                 |
| LO <sub>2</sub> • | Lipidperoxyradikalen                                         |
| LOOL              | zyklischen Peroxid                                           |
| Mg <sup>2+</sup>  | Magnesium                                                    |
| MCT-8             | Mono-carboxylat-Transporter 8                                |
| MDA               | Malondialdehyd                                               |
| mM                | Millimol                                                     |
| MPO               | Myeloperoxidase                                              |
| MRPs              | multidrug resistance-associated proteins                     |
| MSRB              | Methionin-Sulfoxid-Reduktase B                               |
| mtNOS             | mitochondriale NO-Synthase                                   |
| mU/L              | Milliunits pro Liter                                         |
| N                 | Stickstoffatom                                               |
| NAD               | Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid                               |
| NADH              | reduzierte Form des Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat  |
| NADP              | Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat                      |
| NADPH             | reduzierte Form des Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat  |
| NGMN              | Norelgestromin                                               |
| NH <sub>2</sub>   | Aminogruppe                                                  |
| ng/ml             | Nanogramm pro Milliliter                                     |
| nmol/L            | Nanomol pro Liter                                            |
| nNOS              | neuronale NO-Synthase                                        |

|                              |                                                                  |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| NO <sup>•</sup>              | Stickstoffmonoxidradikal                                         |
| NOS                          | NO-Synthase, Stickstoffmonoxidsynthase                           |
| NQO                          | NADPH-Chinon-Oxidoreduktase                                      |
| OATP-F                       | Organic anion transporter-Familie                                |
| O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> | Superoxidanion                                                   |
| OH                           | Hydroxylgruppe                                                   |
| OK                           | Oxidative Kapazität                                              |
| O-Methylierung               | Sauerstoffmethylierung                                           |
| ONOO <sup>-</sup>            | Peroxynitrit                                                     |
| ONOOH                        | persalpetriger Säure                                             |
| OS                           | Oxidative Stressmessung                                          |
| PADAM                        | partial androgen decline in aging males                          |
| PAPS                         | 3'-Phospho-adenosin-5'-Phosphosulfat                             |
| PBP                          | Progesteron- bindenden Plasmaproteine                            |
| PCO                          | Carbonylierung von Proteinen                                     |
| pg/ml                        | Picogramm pro Milliliter                                         |
| PG E2                        | Prostaglandin E2                                                 |
| PMDD                         | Prämenstruelle Dysphorie (engl. Premenstrual dysphoric disorder) |
| PMS                          | Prämenstruelles Syndrom                                          |
| PR-A                         | Progesteronrezeptors A                                           |
| PR-B                         | Progesteronrezeptors B                                           |
| PrP <sup>c</sup>             | Kupfer bindenden Prionprotein                                    |
| PUFA                         | poly-unsaturated fatty acids                                     |
| RAMEB                        | randomly methylated betacyclodextrin                             |
| RNS                          | reaktive Stickstoffspezies                                       |
| ROO <sup>•</sup>             | Peroxyradikale                                                   |
| ROM                          | Sauerstoffmetaboliten                                            |
| ROS                          | reaktive Sauerstoffspezies                                       |
| rT <sub>3</sub>              | reverses Triiodthyronin                                          |

|                         |                                                                                          |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| R1881                   | Metribolon                                                                               |
| SAH                     | S-Adenosyl-L-Homocystein                                                                 |
| SAM                     | S-Adenosyl-L-Methionin                                                                   |
| SEP15                   | Selenoprotein                                                                            |
| SELM                    | Selenoprotein M                                                                          |
| SELN                    | Selenoprotein N                                                                          |
| SELR                    | Selenoprotein R                                                                          |
| SELS                    | Selenoprotein S                                                                          |
| SHBG                    | Sexualhormon-bindendes Globulin (engl.: sex hormone binding globulin oder SBP)           |
| SH-Gruppe               | Thiol-Gruppe                                                                             |
| SOD                     | Superoxiddismutase                                                                       |
| SO <sup>3</sup> -Gruppe | Sulfonylgruppen                                                                          |
| SULTs                   | Sulfotransferasen                                                                        |
| TAAR                    | trace-amine associated Rezeptoren                                                        |
| TBPA                    | Thyroxin-bindendes Präalbumin                                                            |
| TBG                     | Thyroxin-bindende Globulin                                                               |
| TEBG                    | Testosteron-Estradiol- bindende Globulin (engl. testosterone estradiol binding globulin) |
| TETRAC                  | Tetraiodthyro-Essigsäure                                                                 |
| TPO                     | Thyreoperoxidase                                                                         |
| TRIAC                   | Triiodthyro-Essigsäure                                                                   |
| TROLOX                  | 6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-Carboxylsäure                                     |
| TXNRD                   | Thioredoxin Reduktasen                                                                   |
| T <sub>1</sub>          | Monoiodthyronin                                                                          |
| T <sub>2</sub>          | Diiodthyronin                                                                            |
| T <sub>0</sub>          | Thyronin                                                                                 |
| T <sub>3</sub>          | Triiodthyronin                                                                           |
| T <sub>4</sub>          | Tetraiodthyronin                                                                         |
| TR <sub>α</sub>         | T <sub>3</sub> -Kernrezeptoren alpha ( <i>Thyroidrezeptoren alpha</i> )                  |

|                   |                                                                                    |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| TR <sub>β</sub>   | T <sub>3</sub> -Kernrezeptoren beta ( <i>Thyroidrezeptoren</i> beta)               |
| TSH               | Thyreotropin, Thyroid-Stimulierendes-Hormon (engl. Thyreotropin releasing hormone) |
| TTR               | Transthyretin                                                                      |
| ToAM              | iodfreies Thyronamin                                                               |
| T <sub>1</sub> AM | Monoiodthyronamin                                                                  |
| UDP               | Uridin-5'-diphosphat                                                               |
| UDPs              | Uridin-5'-diphosphoglucuronyltransferasen                                          |
| UDPGA             | Uridin-5'-diphospho-glucuronsäure                                                  |
| UGTs              | UDP-Glucuronyl-Transferasen                                                        |
| WHO               | World Health Organisation                                                          |
| XDH               | Xanthin-Dehydrogenase                                                              |
| XO                | Xanthinoxidase                                                                     |
| XOR               | Xanthinoxidase, Xanthinoxidoreduktasen                                             |
| μM                | mikromol                                                                           |
| 2-HO-CEs          | 2-Hydroxy- Catecholestrogene                                                       |
| 2-HO-E1           | 2-Hydroxy-Estron                                                                   |
| 2-HO-E2           | 2-Hydroxy-Estradiol                                                                |
| 2-MeO-E1          | 2-Methoxy-Estron                                                                   |
| 2-MeO-E2          | 2-Methoxy-Estradiol                                                                |
| 4-HO-CEs          | 4- Hydroxy- Catecholestrogene                                                      |
| 4-HO-E1           | 4-Hydroxy-Estron                                                                   |
| 4-HO-E2           | 4-Hydroxy-Estradiol                                                                |
| 4-HNE             | 4-Hydroxynonenal                                                                   |
| 4-MeO-E1          | 4-Methoxy-Estron                                                                   |
| 4-MeO-E2          | 4-Methoxy-Estradiol                                                                |
| 5αR               | Delta4-Steroid-5α-Reduktase                                                        |
| 5αR1              | 5alpha-Reduktase Typ 1                                                             |
| 5αR2              | 5alpha-Reduktase Typ 2                                                             |
| 6α-OH-DOC         | 6alpha-Hydroxy- Deoxycorticosteron                                                 |

|                            |                                            |
|----------------------------|--------------------------------------------|
| 6 $\alpha$ -OH-Progesteron | 6alpha-Hydroxy-Progesteron                 |
| 8-OhdG                     | 8-Hydroxydeoxyguanosin                     |
| 16 $\alpha$ -HO-E1         | 16 $\alpha$ -Hydroxy-Estron                |
| 17 $\beta$ -HSDs           | 17 $\beta$ -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenasen |
| 20 $\alpha$ -DHP           | 20alpha-Dihydroprogesteron                 |

### **Computerprogramme, die in der Diplomarbeit zur Anwendung kamen:**

#### Excel®

Excel® ist ein Tabellenkalkulationsprogramm; es ermöglicht umfangreiche Berechnungen mit Formeln und Funktionen. Die Ergebnisse können mit Hilfe von Sortier- und Filterfunktionen ausgewertet und in Diagrammen graphisch dargestellt werden.

[Wikipedia: [http://de.wikipedia.org/wiki/Microsoft\\_Excel](http://de.wikipedia.org/wiki/Microsoft_Excel)]. Zur Erfassung von Messdaten wurde dieses Programm eingesetzt.

#### Schnelltabellen unter Microsoft Word®

Mit dieser Funktion wurden alle anderen Tabellen in dieser Diplomarbeit erstellt.

#### GRAPH. PAD. PRISM®5

Prism® ist ein Programm zur Datenverarbeitung. Es zeichnet sich dadurch aus, dass damit Datensätze sehr einfach graphisch dargestellt und statistisch ausgewertet werden können.

#### MDL ISIS/Draw®2.5

Ein Zeichenprogramm zur Erstellung von Strukturformeln und chemischen Gleichungen (inklusive 3D-Darstellung). Mit diesem Programm wurden chemische Strukturen und Metabolismus-Reaktionen gezeichnet.

#### SMART ART-Graphik unter Microsoft Word®

Für einige Abbildungen wurde das Programm SMART ART-Graphik von Microsoft Office 2007 verwendet.

#### Corel PHOTO-PAINT®

Corel Photo-Paint® ist ein Bildbearbeitungsprogramm und ist Bestandteil der CorelDRAW Graphics Suite. Dieses Programm wurde zur Bearbeitung von Bildern und einigen Abbildungen eingesetzt.

Die Diplomarbeit wurde unter Microsoft Office 2007 mittels Microsofft Word® verfasst.

## Einleitung

Wir leben in einem Industriezeitalter, wo Menschen einen hohen Stand an Zivilisation und Technisierung oft zu Lasten des Ökosystems erreicht haben. Neben endogenen Faktoren, wie der Atmungskette, Sauerstoff verarbeitende Enzyme und der zellulären Immunabwehr des Körpers, gibt es auch eine Reihe von exogenen Faktoren, die eine zunehmende Belastung für den Organismus darstellen und so Zellen unter Stress setzen können. Zu diesen exogenen Faktoren zählen: Umweltschadstoffe (wie Schwermetalle, Feinstaub, UV-Belastung, Ozon etc.) ungesunde Lebensweise und einseitige Ernährung (z.B. Fertiggerichte), Genusskonsum (Zigarettenrauch und Alkohol), Xenobiotika und schließlich auch die Medikamenteneinnahme, um nur einige wenige zu nennen. Im Körper lösen diese in einer Kettenreaktion überschießende Oxidationsprozesse durch freie Radikale aus.

Die hauptsächlichen Mechanismen der Radikalerzeugung sind Autoxidationsprozesse, Redoxcycling von Substanzen und der Stoffwechsel durch das Cytochrom P-450 System [Jakobi 2005], auf diese wir später noch genauer eingehen werden. Dieser sogenannte oxidative Stress kann Dank eines körpereigenen Abwehrmechanismus in jungen Jahren noch sehr gut bewältigt werden. Doch mit zunehmendem Alter summieren sich diese Defekte an den Zellen und am Erbgut und bereiten schließlich die Grundlage für die typischen stoffwechselassoziierten Zivilisationserkrankungen, wie die vom Grauen Star, arteriosklerotischen, rheumatischen und neurodegenerativen Veränderungen, die bis hin zur Ausbildung von bösartigen Zellentartungen reichen können.

Lebensenergie, Vitalität und Gesundheit sind heutzutage die drei Eckpfeiler des Begriffes „Anti-Aging“. Neben der täglichen Einnahme von Nahrungsbestandteilen und Nahrungsergänzungstoffen, die radikalfangende und antioxidative Eigenschaften besitzen, ist die regelmäßige Einnahme von Hormonpräparaten selbstverständlich geworden. Einerseits versucht man damit die kontinuierliche Senkung des Hormonspiegels mit zunehmendem Alter zu verlangsamen bzw. sie sogar zu stoppen und dadurch die Lebensqualität möglichst lange auf hohem Niveau zu erhalten. Andererseits werden Hormone für die Kontrazeption bzw. zur Behandlung von PMS/PMDD eingesetzt. Bereits 30-40% aller Frauen sind davon betroffen [Ärzte-magazin10/10].

Die kontinuierliche Zufuhr von diesen Hormonpräparaten, im Speziellen von Steroidhormonen und Schilddrüsenhormonen sowie deren Metaboliten, können mit der Bildung von Radikalen und deren Folgeprodukten verbunden sein.

Ziel dieser Arbeit war festzustellen, inwieweit die reaktiven Metabolite der Steroidhormone und der Schilddrüsenhormone eine Rolle bei der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) spielen.

## 1. Hormone

Der Begriff „Hormon“ stammt aus dem Griechischen und bedeutet übersetzt: „in Bewegung setzen, antreiben“. Es handelt sich um essentielle, physiologisch hochwirksame Botenstoffe, die ubiquitär, also nicht nur im menschlichen sondern auch im pflanzlichen und tierischen Organismus vorkommen. Sie regulieren in minimalen Konzentrationen, in Mengen von Tausendstel Milligramm, nahezu alle Funktionen des Körpers, wie Blutdruckregulation, Energie- und Elektrolythaushalt, Stimmung, Verhalten, Wachstum, Entwicklung und Fortpflanzung; aber auch für die Anpassung an die Umwelt, die Reaktion auf Belastungen und Streß ist das endokrine System unverzichtbar.

Die Steuerung der Produktion und Ausschüttung von Hormonen erfolgt durch das Hypothalamus-Hypophysen-System wobei nicht alle Hormone einem Feedback-Mechanismus unterliegen. Schließlich kann die Sekretion von bestimmten Hormonen weitgehend autonom sein, auch wenn alle erforderlichen Elemente für eine Feedback-Kontrolle vorhanden sind. Zum Beispiel ist die Produktion von Estrogen beim Menschen physiologisch nicht ausreichend, um LH-Sekretion zu hemmen. Bei Frauen bewirken Androgene im Ovar, die auch vom luteinisierenden Hormon (LH) stimuliert werden, normalerweise keine Feedback-Kontrolle, es sei denn, die Werte sind aus pathologischer Hinsicht erhöht. Die unterschiedliche Verteilung eines Hormons ist von großer Bedeutung: Ein Hormon kann die Sekretion eines anderen Hormons kontrollieren und gleichzeitig die Wirkung dieses Hormons negativ oder positiv beeinflussen (Abb. 1.1).

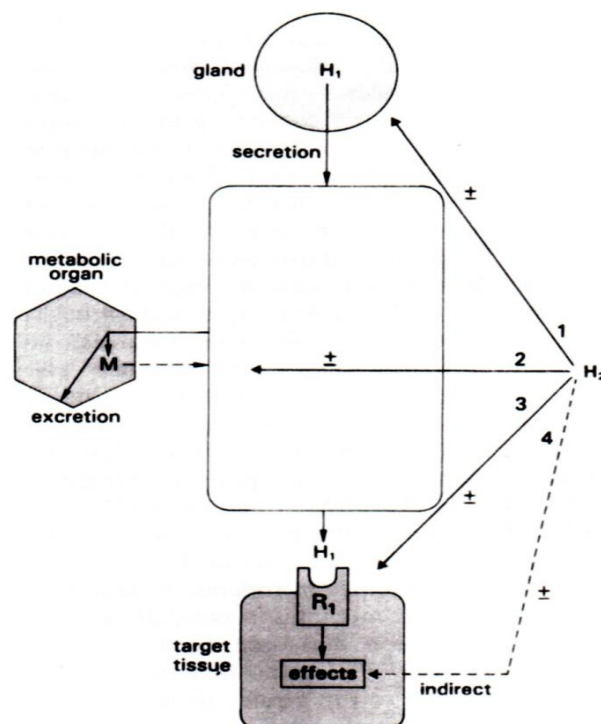


Abb. 1.1.: Mechanism for a hormone,  $H_2$  to effect the secretion (1), metabolism (2) and/or action (at the receptor (3) or postreceptor (4) level) of another hormone,  $H_1$  [Baulieu et al. 1990].

Das Sexualhormon Estradiol kann auf diese Weise die Sekretion von Gonadoliberin (engl. *gonadotropin-releasing-homone*, *GnRH*) ändern. Die Schilddrüsenhormone können qualitativ und quantitativ den Abbau von Steroiden beeinflussen und somit deren Stoffwechsel verändern. Estrogene sind auch in der Lage, den Transport von Transcortin, (engl: *corticosteroid binding globulin* oder *CBG*) und Sexualhormon-bindendes Globulin (SHBG) zu kontrollieren, indem sie ihre Konzentration erhöhen. Schließlich kann ein Hormon die Reagibilität eines Gewebes hinsichtlich eines anderen Hormons so modifizieren, indem es die Rezeptorkonzentration erhöht oder erniedrigt: z.B. kann Estrogen die Progesteronwirkung stimulieren und dadurch den Anstieg der Rezeptorkonzentration im Gewebe induzieren [Baulieu et al. 1990].

Die Ausschüttung der Hormone erfolgt entweder aus endokrinen Drüsen oder aus Nervenzellen, wobei sie über die Blutbahn im Körper verteilt werden und sich an bestimmten Rezeptoren von Zielzellen binden. Durch diese Hormon-Rezeptor-Bindung werden schließlich charakterische Reaktionen und Veränderungen der Zielzelle ausgelöst.

## **1. 1. Steroidhormone**

Zu den Steroidhormonen gehören die Sexualhormone Estrogene, Androgene und Gestagene, die sich strukturellchemisch von den Sterinen ableiten und vielfach partial synthetisiert werden können. Sie besitzen keine Proteinstruktur und werden daher auch als Nichtproteohormone bezeichnet.

### *1.1.1. Estrogene*

Die Estrogene sind die weiblichen Prägehormone und werden prämenopausal hauptsächlich in den Granulosazellen im Ovar, ausgehend von den Androgenen gebildet. In den Granulosazellen des Ovars entsteht aus dem Androstendion (4-Androsten-3,17-dion) das Estron (E1) bzw. durch den Aromatase-Komplex aus dem männlichen Hormon Testosteron: das 17 $\beta$ -Estradiol (E2) (siehe auch Abschn. 2.3.3.). Anschließend werden die Sexualhormone dann an sogenannte Carrierproteine gebunden und auf dem Blutweg zu den Zielgeweben transportiert. Desweiteren werden Estrogene im Gelbkörper (Corpus luteum) sowie während der Schwangerschaft auch in der Placenta produziert. In geringen Mengen werden sie in der Nebennierenrinde, im Gehirn, im Haar, in der Leber und im Hoden des Mannes gebildet. Nach der Menopause erfolgt die Estrogenbildung zum größten Teil in der Nebennierenrinde, hier ebenfalls ausgehend vom Prohormon Androstendion [Schweikert 2003].

Zusammen mit Gestagenen (Progesteron) regulieren sie im weiblichen Organismus die Embryonalentwicklung, die neuroendokrine Steuerung des weiblichen Zyklus, die Vorbereitung des Fortpflanzungstrakts für die Fertilisation und Implantation sowie zentrale metabolische Vorgänge [Forth et al. 2009].

### *1.1.2. Androgene*

Die Androgene sind die männlichen Prägehormone und führen zur Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale wie Behaarungstyp, Körperbau, Kehlkopfgröße, Talgdrüsenaktivität etc.

Der Bildungsort der Androgene, vor allem das Testosteron, wird beim Mann, zu 95% in den Leydig-Zwischenzellen des Hodens und nur zu 5% in der Nebennierenrinde (NNR) gebildet. Desweiteren werden bei der Frau in den Stroma- und Thekazellen des Ovars Androstendion und Dehydroepiandrosteron (DHEA) produziert. Vor der Menopause entsteht das Testosteron größtenteils aus der peripheren Umwandlung von Androstendion und nur zu einem geringen Teil aus anderen Androgenen. Sie regulieren die Spermato- und die Spermiogenese in den Hodenkanälchen sowie Wachstum und Funktion von Genitalien, Prostata und Samenbläschen. Auch die Geschlechtsdifferenzierung wird durch Androgene gesteuert. Nach Festlegung des genetischen Geschlechts bilden sich die geschlechts-spezifischen Gonaden aus. Die weitere somatische Geschlechtsentwicklung und Differenzierung wird durch Androgene gesteuert und verläuft in Abwesenheit von ihnen zum weiblichen Phenotyp. Androgene wirken anabol, was u.a. zu der stärker entwickelten Muskulatur des Mannes führt [Murad u. Haynes 1985].

### *1.1.3. Gestagene*

Die Gestagene sind Schwangerschaftsschutzhormone, die ähnliche Eigenschaften aufweisen, wie das physiologische Gelbkörperhormon Progesteron. Der Bildungsort des Progesterons ist bei der Frau hauptsächlich im Gelbkörper (Corpus luteum) des Ovars. In der Schwangerschaft übernimmt die Plazenta dann die Synthese des Progesterons. Die Gestagene wirken nur in Zusammenhang mit den Estrogenen, wobei dieses Zusammenwirken von folgenden Faktoren abhängig ist:

- 1.) Eine ausreichende Estrogenwirkung induziert Progesteronrezeptoren
- 2.) Das Verhältnis: Estrogen-Gestagen
- 3.) Die zeitliche Sequenz des Zusammenwirkens [Forth et al. 2009].

### *1.1.4. Struktur der Steroidhormone*

**Die natürlichen Estrogene** des Menschen sind 17 $\beta$ -Estradiol, Estron und Estriol.

Sie besitzen einen gemeinsamen Grundkörper, ein Estran-Derivat, ein Steroidmolekül, das aus vier Ringen (A,B,C,D) mit 18 C (Kohlenstoffatomen) aufgebaut ist. Am aromatischen Ring A fehlt einerseits am C-10 Atom die Methylgruppe (CH<sub>3</sub>) und andererseits befindet sich am C-3 Atom eine Hydroxylgruppe (-OH), die phenolisch (= sauer) ist und dadurch eine Salzbildung erst möglich macht (Abb. 1.2.).

Dadurch können Estrogene von den anderen Sexualhormonen chemisch abgetrennt werden. Für die Wirkung ist unbedingt die Sauerstoff-Funktion am C-17 Atom erforderlich. Das  $17\beta$ -Estradiol ist das biologisch aktivste Estrogen, welches peroral auf Grund des First-Pass-Effekts in der Leber kaum wirksam ist und daher nur parenteral angewendet werden kann. Zum Beispiel gelangt man durch Veresterung der Hydroxylgruppe an C-17 mit Valeriansäure zu Estradiolvalerat, das als Depotpräparat intramuskulär (i.m.) injiziert werden kann. Aus dem Depot wird dann durch hydrolytische Spaltung, Estradiol freigesetzt. Oral wirksame Estrogene wären die Ester von Estradiol und Estriol bzw. mikronisierte Estradiolpräparate, die nur in hohen Dosierungen angewendet werden können. Diese Ester werden durch Esterasen im Dickdarm abgespalten und so in die aktive Form übergeführt.

Estron und Estriol sind die Metabolite des Estradiols. Estron besitzt nur etwa  $\frac{1}{3}$  der Estradiol-Wirkung, ist ein Metabolit im Harn und kann wechselseitig in das Estradiol übergeführt werden.

Estriol hat etwa nur 10% der biologischen Aktivität des Estradiols ist parenteral schwächer, oral aber stärker wirksam als Estradiol, da es besser wasserlöslich ist. Diese biologischen Eigenschaften sind auf unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu den Estrogenrezeptoren zurückzuführen. Während die biologische Wirkung des Estrons fast ausschließlich in seiner Konversion zu Estradiol beruht, wirkt Estriol aufgrund seiner hohen Konzentration, z.B. in der Schwangerschaft, als vollwirksames Hormon [Forth et al. 2009].

Schließlich als oral wirksamstes Estrogen entsteht durch Substitution einer Ethinylgruppe in Position  $17\alpha$  das halbsynthetische  $17\alpha$ -Ethinylestradiol, welches als Estrogenkomponente in Oral-Kontrazeptiva zur Anwendung kommt. Durch Substitution eines Methylethers entsteht dann weiters das *Mestranol*, das Prodrug von  $17\alpha$ -Ethinylestradiol (Abb.1.2.).

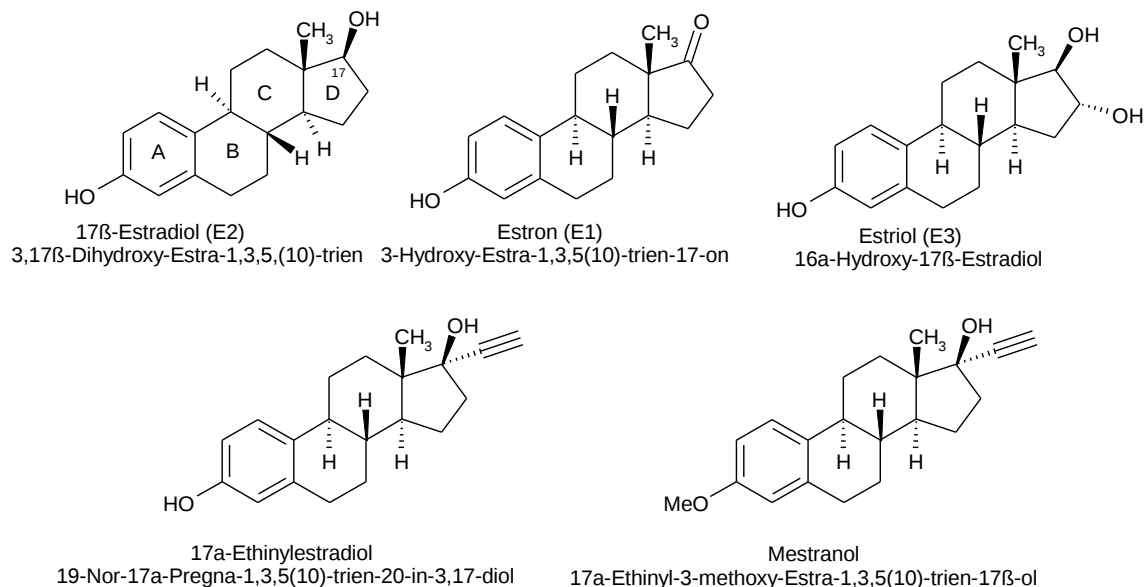


Abb. 1.2.: Struktur der Estrogene [Forth et al. 2009 / modifiziert].

**Das natürliche Progesteron** des Menschen ist strukturell ein Pregnan-Derivat mit 21 C und einer 4-en-3-on-Gruppierung im Ring A. Da es nur schwach oral wirksam ist, wird es intramuskulär (i.m.), eventuell sublingual, angewendet. Das Progesteron ist die Ausgangssubstanz für viele synthetisch hergestellte Gestagene, wobei eine Wirkungssteigerung bzw. -verlängerung der Substanz dadurch erzielt wird, indem man das C-19 Atom entfernt, eine  $\alpha$ -ständige Alkylsubstitution am C-17 sowie Substituenten am C-6 Atom einführt und zusätzliche Doppelbindungen plaziert (Abb. 1.3.).

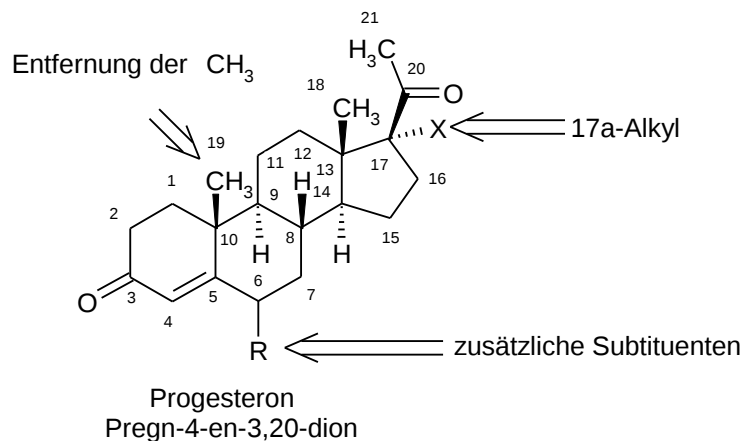


Abb. 1.3.: Struktur von Progesteron

**Die Androgene** bestehen aus einem Androstan-Derivat mit 19 C. Testosteron hat in Position 17 eine  $\beta$ -ständige Hydroxylgruppe und im Ring A eine 4-en-3-on Gruppierung.

Das biologisch wirksamste Androgen ist jedoch die reduzierte Form des Testosterons, das  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT), welches aus dem Testosteron durch das Enzym  $5\alpha$ -Reduktase gebildet wird (Abschn. 2.3.3. Testosteron-Metabolismus). Dieses Enzym ist in vielen Zielorganen zu finden, wie in der Prostata, Haut, Samenblase und in der Leber. Um den First-Pass-Metabolismus in der Leber zu umgehen, wird zur Herstellung von Depot-Präparaten die OH-Gruppe in Position 17 mit langkettigen ungeradzahligen Fettsäuren verestert. Durch diese Veresterung wird Testosteron stark verzögert freigesetzt, da die Esterasen im Körper nur auf geradzahlige Ester spezialisiert sind.

Wie man aus der Struktur erkennen kann, haben die Sexualhormone Estrogene, Gestagene und Androgene eine gemeinsame Vorstufe für deren Steroidbiosynthese, nämlich das Cholesterin, dessen polycyclischer Grundkörper sich in jedem Steroidhormon wieder findet (Abb. 1.4.).

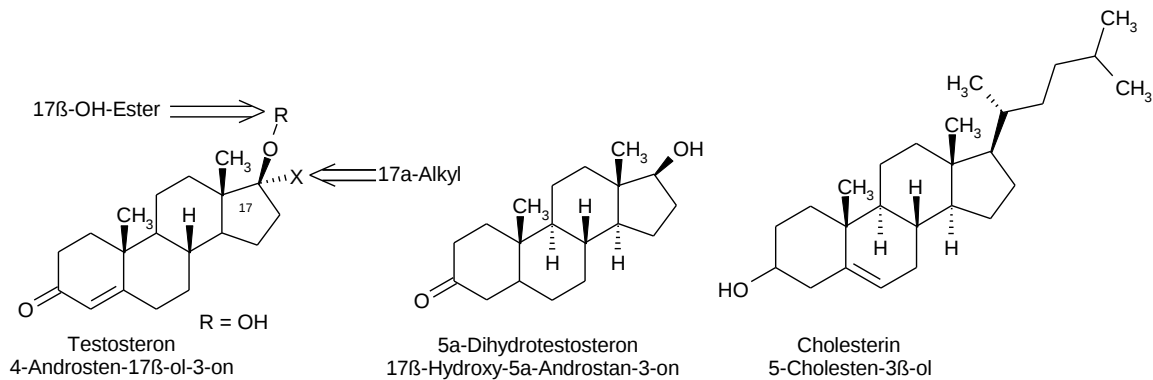


Abb. 1.4.: Struktur von Testosteron, DHT und Cholesterin

#### 1.1.5. Verteilung und Transport der Steroidhormone im Blut

Steroidhormone werden in erster Linie im Plasma transportiert, indem sie zum größten Teil an Proteine gebunden werden. Der freie Anteil an Steroidhormonen, der im ständigen Gleichgewicht mit der gebundenen Fraktion steht, ist die einzige aktive Form, welche eine biologische Wirkung in der Zelle entfalten kann. Zu den sog. Steroid-bindenden Plasmaproteinen gehören zwei spezifische, nämlich das *Transcortin* (engl.: *Corticosteroid binding globulin* oder *CBG*) und das *Sexualhormon-bindende Globulin SHBG* (engl.: *sex hormone binding globulin* oder *SBP*) sowie ein unspezifisches Transportprotein, das sog. *Albumin*.

Spezifische Transportproteine binden nur bestimmte Steroide mit hoher Affinität und geringer Kapazität, während Unspezifische, wie das Albumin, binden alle Steroide mit niedriger Affinität und hoher Kapazität [Westphal 1971; Forest u. Pugeat 1986].

*Albumin* ist ein globuläres Transportprotein mit einer Serumkonzentration von etwa 40g/l, also etwa 1000 bis 10.000 mal größer als die der spezifischen Proteine CBG und SHBG. Es bindet alle Steroide mit einer Dissoziationskonstante zwischen 1μM (Estrogen) und 1mM (Cortisol). Die Affinitäten sind umgekehrt proportional zu der Polarität der Steroide. Transportproteine variieren von Spezies zu Spezies. Als solche existieren Progesteron-bindende Plasmaproteine (PBP) z.B. nur im mütterlichen Blut von Meerschweinchen während der Schwangerschaft, aber nicht im fetalen Blut [Milgrom et al.1973]. Bei Ratten binden Estrogene an einem α-Fetoprotein, aber nicht beim Menschen. Bei Nagetieren, wie Ratten und Mäusen, fehlen die SHBGs. Darüber hinaus ist die Regulation dieser Proteine ebenfalls variabel. Unter dem Einfluss von Schilddrüsenhormonen scheinen mausartige CBGs zu stehen, nicht aber menschliche CBGs [Baulieu et al.1990].

Das *Transcortin* (CBG) ist ein α- Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 52,000 Dalton, und die normale Konzentration im Serum beträgt etwa 30 mg/l. Das CBG bindet Δ<sub>4</sub>-3-Keto-C<sub>21</sub>-Steroide, Cortisol, Corticosteron, 11-Desoxycortisol, Progesteron und 17-Hydroxy-Progesteron mit hoher Affinität.

Ebenso bindet es synthetische Steroide, wie das Prednisolon. Hingegen das Dexametason und Triamcinolon werden nicht gebunden. Jedes Proteinmolekül bindet nur ein Steroidmolekül [Forest u. Pugeat 1986].

Das *Sexualhormon-bindende Globulin (SHBG)* oder *Testosteron- Estradiol- bindende Globulin* (engl.: *testosterone estradiol binding globulin* oder *TEBG*) ist ein  $\beta$ -Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 42.000 Dalton. Dieses Protein bindet C19- oder C18-Steroide ( $\Delta_4$ -,  $5\alpha$ - und Phenol-Derivate) und C-17 $\beta$ -Hydroxyl. Die Testosteron-Metaboliten (DHT und  $3\alpha$ - oder  $3\beta$ - Androstandiole), Testosteron selbst und Estradiol binden mit abnehmender Reihenfolge der Affinität an das Proteinmolekül. Weder Androstendion und Estron werden gebunden, noch bestimmte synthetische estrogene Verbindungen, wie Diethylstilbestrol (DES) oder Androgen-abhängige, wie Metribolon (R1881). Die normale Plasmakonzentration von SHBG ist etwa 3 mg/l. Bei älteren Männern ist die Plasmakonzentration erhöht. Jedoch bei Frauen ist diese in der Regel höher als bei Männern [Mercier-Bodard et al. 1970].

Unter dem Einfluss von Schilddrüsenhormonen und Estrogenen kommt es in der Leber zu einer gesteigerten Bildung dieser Transportproteine. Deshalb sind die SHBG-Konzentrationen im Blut bei Hyperthyreose, in der Schwangerschaft sowie nach Verabreichung exogener Estrogene (Kontrazeptiva) erhöht. Corticosteroide, Androgene, Progesteron sowie Wachstumshormon, Insulin und IGF-I erniedrigen den peripheren SHBG-Spiegel und erhöhen damit den freien Anteil an Sexual-Steroiden in der Zirkulation [Forth et al 2009].

| Steroidhormone | SHBG / TEBG<br>(Proteinbindung in %) | CBG<br>(Proteinbindung in %) | Albumin<br>(Proteinbindung in %) | Freier Anteil<br>in % |
|----------------|--------------------------------------|------------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| Estradiol      | 69%                                  | -                            | 30%                              | 1%                    |
| Testosteron    | 65% Männer /<br>99% Frauen           | -                            | 35% Männer /<br>1% Frauen        | 1-2%                  |
| Progesteron    | <1%                                  | 18%                          | 80%                              | 2%                    |

Tab. 1.1.: Proteinbindungen (in %) und freier Anteil (in %) der Steroidhormone [Quelle: Forth et al 2009].

#### 1.1.6. Steroidhormonrezeptoren

Die Wirkung von Steroidhormonen entsteht durch die Bindung an spezifische intrazelluläre Rezeptoren. Zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren (Abb. 1.5.) gehören neben den klassischen Steroidrezeptoren, wie Estrogen-, Androgen-, Progesteron- und Glucocorticoid-Rezeptoren, die Nicht-Steroidrezeptoren: Retinolsäure-, Vitamin D<sub>3</sub>- und Thyroid-Rezeptoren (Abschn. 1.2. Schilddrüsenhormone). Die Estrogen- und Androgenrezeptoren sind im nicht aktiven Zustand mit Chaperon-Komplexen im Cytoplasma assoziiert.

Erst eine Ligandenbindung führt zu einer Konformationsänderung und der Dissoziation dieser Komplexe. Dadurch folgt eine Dimerisierung des Rezeptors sowie seine Translokation in den Zellkern, wo eine Bindung an die sogenannten 'response' Elemente in der regulatorischen Region der Zielgene stattfindet. In Abwesenheit des Hormons kommt es zu einer Stilllegung, dem sogenannten 'silencing' der entsprechenden Promotorregionen. Die Bindung eines Liganden reduziert die Affinität für die Co-Repressoren und resultiert in einer Dissoziation des Komplexes. Die klassische Wirkung sowohl der Steroid- als auch der Nicht-Steroidrezeptoren, entfaltet sich über den Mechanismus der Transkription und Proteinsynthese [McKenna u. O'Malley 2002].

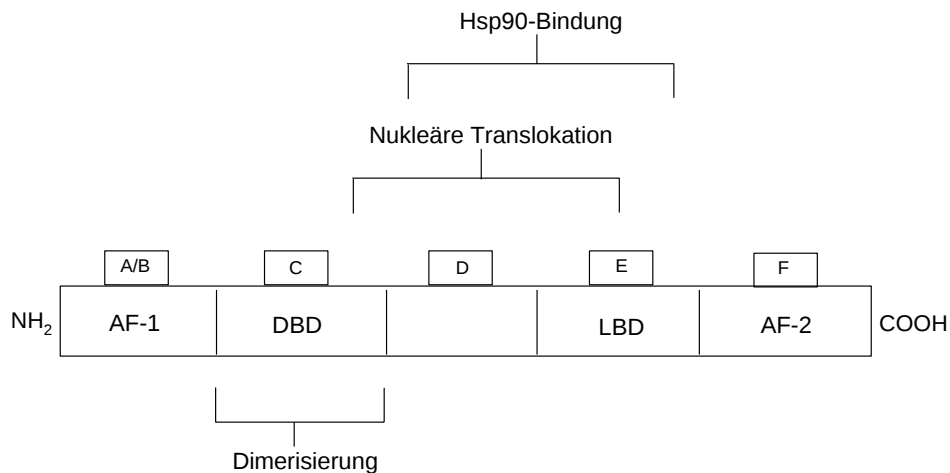


Abb.1.5.: Aufbau eines nukleären Steroidhormonrezeptors.: [Gronemeyer 1992 / modifiziert].

Dieser besteht aus fünf funktionellen Domänen:

- 1.) Die **A/B-oder Modulator-Region** mit der Transaktivierungsfunktion **AF-1**, die durch Wechselwirkung mit Komponenten des Transkriptionsapparates die Aktivierung von Zielgenen vermittelt [Tsai u. O'Malley 1994].
- 2.) Die **C-oder DNA-bindende Domäne (DBD)**, bei welcher teilweise auch die Dimerisierung des Rezeptors stattfindet.
- 3.) Die **D-Region**, welche die Funktion einer Transaktivierung besitzt sowie die Konformation des Rezeptors und der nukleären Translokation kontrolliert.
- 4.) Die **E-oder Ligandbindende Domäne (LBD)** mit einer Transaktivierungsfunktion **AF-2**, welche durch Hormonbindung aktiviert wird. In dieser Region finden auch Dimerisierung, nukleäre Translokation und Wechselwirkungen mit Hilfsproteinen, wie **Heat-Shock-Protein (HSP) 90** statt.
- 5.) Die **F-Region** [Mangelsdorf et al. 1995].

#### *1.1.6.1. Estrogenrezeptoren (ER)*

Die klassischen Estrogenwirkungen werden durch zwei Estrogenrezeptoren (ER $\alpha$  und ER $\beta$ ) vermittelt. Der 1986 klonierte [Green et al. 1986] ER $\alpha$  wird besonders hoch im weiblichen Fortpflanzungstrakt (Uterus, Scheide), in der Brustdrüse, im Knochen, in der glatten Muskulatur peripherer Blutgefäße im Hypothalamus [Forth et al. 2009], Nebenhoden, Testes, Niere und Nebenniere exprimiert [Kuiper et al. 1997]. 1996 wurde ein zweiter Estrogenrezeptor ER $\beta$  [Kuiper et al. 1996] entdeckt. Dieser ist vor allem im Ovar, in der Prostata, im Testes, in der Lunge, im Thymus und Milz, im Herzen sowie in einigen Hirnregionen zu finden [Kuiper et al. 1997; Forth et al. 2009].

#### *1.1.6.2. Androgenrezeptoren (AR)*

Die Wirkung der Androgene ist weitestgehend an das Vorhandensein des Androgenrezeptors (AR) gebunden, der als Transkriptionsfaktor die Genexpression und die Proteinsynthese steuert [Quigley et al. 1995]. Der AR wurde in Testes, in der Prostata, in der Epidermis der Vorhaut, im Brustgewebe, in Schweiß- und anderen apokrinen Drüsen sowie in der Leber nachgewiesen [DeWinter 1991].

#### *1.1.6.3. Progesteronrezeptoren (PR)*

Es gibt zwei Formen von Progesteronrezeptoren, die Progesteronrezeptoren A (PR-A) (MG 94.000) und B (PR-B) (MG 120.000), die miteinander binden können, wodurch die beiden Homodimeren A/A und B/B und ein A/B-Heterodimer entstehen.

Diese Steroid-Rezeptor-Komplexe können unterschiedlich biologische Reaktionen auslösen. Da die Gene der Progesteron-, Androgen-, Glucocorticoid- und Mineralocorticoid-Rezeptoren sehr homolog sind, können die Gestagene, je nach Struktur und meist mit geringer Affinität, sich auch an die Androgen- und Corticoidrezeptoren binden [Kuhl 1999]. Während der Progesteronrezeptor A die Progesteronwirkungen im Uterus und in den Ovarien vermittelt, spielt der Progesteronrezeptor B eine entscheidende Rolle in der Brustdrüse [Forth et al. 2009].

## 1. 2. Schilddrüsenhormone

In fast allen Organen haben die Schilddrüsenhormone Tetraiodthyronin ( $T_4$ ) und Triiodthyronin ( $T_3$ ), die in den Thyrozyten in den Follikelepithelzellen der Schilddrüse gebildet werden, eine wichtige Steuerfunktion. Wachstum, Reifung und Metabolismus stehen unter ihrem Einfluss. Das Thyroxin ( $T_4$ ), ein biologisch schwach wirksames Prohormon der Schilddrüse, wird z.B. in der Niere, der Leber und in den Muskeln in das viel wirksamere Hormon Triiodthyronin ( $T_3$ ) übergeführt. Die Schilddrüse bildet und sezerniert nur einen kleinen Teil des im Serum verfügbaren Triiodthyronins [Forth et al. 2009].

Die Schilddrüsenhormonachse kann sich an veränderte Bedingungen sowie endogene und exogene Anforderungen an den Stoffwechsel anpassen. Dies ist durch ein vielfältiges Netz von *feedback*-Mechanismen möglich.

Für die Schilddrüsenhormonwirkung sind neben den zwei  $T_3$ -Kernrezeptoren ( $TR_\alpha$ ,  $TR_\beta$ ), welche entwicklungs- und gewebespezifische Expressionsmuster aufweisen, auch Transport- und Bindungsproteine, Stoffwechselenzyme beteiligt, so dass Fehlfunktionen oder Ausfälle einzelner Komponenten zum Teil kompensiert und aufgefangen werden können.

Die Aktivierung und Inaktivierung der Schilddrüsenhormone erfolgt vorwiegend durch die drei Iodthyronindeiodasen (Selenoenzyme) sowie durch verschiedene Enzyme, welche die phenolischen Schilddrüsenhormone konjugieren, z.B. Sulfotransferasen und Glucuronyltransferasen [Köhrle 2004].

### 1.2.1. Struktur der Schilddrüsenhormone

Strukturell sind sie aus der Klasse der Iodothyronine, genau genommen handelt es sich um Derivate der Aminosäure L-Tyrosin. Diese nicht proteinogenen  $\alpha$ -Aminosäuren, welche als Grundkörper die Aminosäure Thyronin besitzen, sind abhängig von der Anzahl der Jod-Atome am aromatischen Ring (Abb. 1.6.).

Man unterscheidet zwischen dem Triiodthyronin, das drei Jod-Atome enthält und dem Thyroxin, welches vier Jod-Atome besitzt. Charakteristisch für die Struktur ist die phenolische 4-OH-Gruppe, die Alaninseitenkette und die Diphenyletherstruktur der Schilddrüsenhormone, die nicht nur beim Stoffwechsel sowie auch beim Abbau der Schilddrüsenhormone von großer Bedeutung sind, sondern auch für die thyromimetische Wirkung bei der lokalen und systemischen Bereitstellung eine große Rolle spielen [Köhrle 2004].

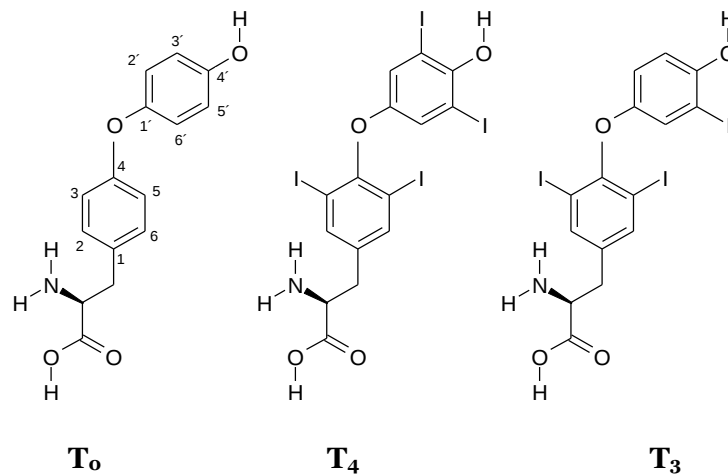


Abb.1.6.:T<sub>0</sub>:Struktur von Tyrosin, Thyronin; T<sub>4</sub>:L-Thyroxin/3',3'',5',5''-Tetraiodo-thyronin/2-Amino-3-[4-(4-hydroxy-3,5-diiodophenoxy)-3,5-diiodo-phenyl]-propansäure/Sodium(2S)-2-amino-3-[4-(4-hydroxy-3,5-diiodophenoxy)-3,5-diiodo-phenyl]propanoat;T<sub>3</sub>:3',3'',5'-Triiod-L-thyronin/O-(4-Hydroxy-3-iodphenyl)-3,5-diiod-L-tyrosin/(S)-2-Amino-3-[4-(4-hydroxy-3-iodophenoxy)-3,5-diiodphenyl]propansäure

### 1.2.2. Biosynthese der Schilddrüsenhormone

Bei der Schilddrüsenhormonsynthese spielt die extrazelluläre Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine wichtige Rolle (Abschn. 3.2.1.1.2. NADPH-Oxidase) Für eine effektive und essentielle Schilddrüsenhormonsynthese ist lebenslänglich eine TSH regulierte, extrazelluläre Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erforderlich. Dabei hat sich auch ein antioxidatives Defensesystem herausgebildet, welches exzessiv gebildetes oder bei Jodmangel nicht adäquat verbrauchtes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> abbaut. Dies erfolgt vermutlich durch eine Glutathion Peroxidase 3 (GPx-3), die in das Schilddrüsenfollikellumen sezerniert wird. Die Expression dieses Schutzsystems für den Thyrozyten ist vermutlich der Grund dafür, dass die Schilddrüse besonders reich an Selen ist [Löffler 2007 (a)]. Dafür verantwortlich ist vermutlich der hohe Gehalt an GPx-3, aber auch zum geringen Teil das Selenocystein der Deiodasen. Durch den Selenmangel kommt es zu einer verringerten GPx-Aktivität, wodurch die während der Schilddrüsenhormonsynthese gebildeten Sauerstoff-Peroxide nicht hinreichend reduziert werden und es zu Zellnekrosen kommt. Durch die Gabe von Selen normalisieren sich die GPx-Aktivität und die Schilddrüsenengröße, durch Iodgabe ebenfalls die Hormonproduktion [Köhrle et al. 2005].

### 1.2.3. Verteilung und Transport der Schilddrüsenhormone im Blut

Aufgrund der Lipophilie als jodierte Aromaten werden die Schilddrüsenhormone an Hormon-Verteilungs- und Transportproteinen des Blutes gebunden.

Drei Transport- und Bindungsproteine sind dafür verantwortlich, dass die stark lipophilen Schilddrüsenhormone nicht in die Lipidmembran eingelagert werden und nicht direkt mit der glomerulären Filtration verloren gehen, sondern an ihre Zielzellen verteilt werden können. Es handelt sich hierbei um das Thyroxin-bindende Globulin (TBG), das Transthyretin (TTR: Thyroxin-bindendes Präalbumin; TBPA) und das Albumin, an dem etwa 20% des  $T_4$  und 10% des  $T_3$  lose gebunden sind. Einerseits kann die Gabe von Estrogenen zu einer erhöhten TBG-Kapazität führen, andererseits kann eine Verminderung der TBG-Konzentration durch die Gabe von Androgenen, Anabolika und Glucocorticoiden erfolgen, wobei die Einflüsse weitgehend durch die Gegenregulation über die Sekretion von Thyreotropin (hypophysäres Steuerhormon, TSH) und Schilddrüsenhormonen ausgeglichen werden kann, so dass sich die freien Konzentrationen an  $T_4$  und  $T_3$  letztlich nicht ändern. Daher ist die Messung des freien  $T_4$  und  $T_3$ , zusammen mit der TSH-Bestimmung, die Grundlage für die Diagnose bei Schilddrüsenerkrankungen [Forth et al. 2009]. Diese Proteinbindung trägt auch für die relativ langen Halbwertszeiten bei. Die Eliminations-Halbwertszeit liegt für  $T_4$  bei sieben Tagen und für  $T_3$  bei etwa einen Tag. Im Serum an Proteine gebunden sind mehr als 99,9% des  $T_4$  und mehr als 99,5% des  $T_3$  [Löffler et al. 2007 (a)]. Die zelluläre Aufnahme der Schilddrüsenhormone erfolgt über einen energie-abhängigen Transport und nicht wie früher angenommen durch Diffusion. Bisher wurden zwei auf Schilddrüsenhormone spezialisierte Transporter entdeckt: OATP1C1 (OATP-F: Organic anion transporter-Familie: bevorzugter Ligand  $T_4$ ) und Mono-Carboxylat-Transporter 8 (MCT-8) (Multiplecationtransporterfamilie: bevorzugter Ligand  $T_3$ ) [Friesema et al. 2005].

#### 1.2.4. Thyroidrezeptoren

Die Rezeptorform  $TR\beta_2$  ist vor allem in der Hypophyse und Teilen des ZNS exprimiert. Während im Herzen vor allem die  $TR\alpha_1$ -Form und in der Leber vorwiegend die  $TR\beta_1$ -Form lokalisiert ist, ist für die Differenzierung des gastrointestinalen Schleimhautsystems die  $TR\alpha_2$ -Form relevant. Im Knochen sind beide Rezeptorformen exprimiert (Abb. 1.7.) [Kaneshige et al. 2000].

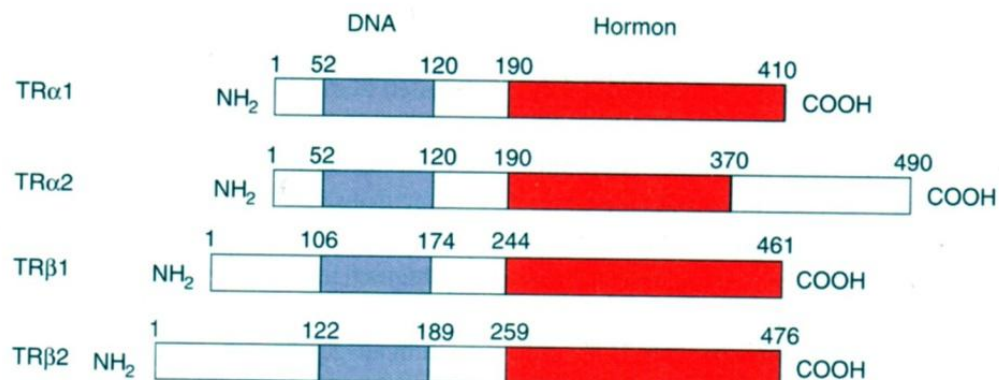


Abb. 1.7.: Es gibt zwei  $T_3$ -Rezeptoren,  $TR\alpha$  und  $TR\beta$ , die von zwei verschiedenen Genen codiert werden: durch alternatives Spleißen entstehen jeweils zwei Isoformen. Sie bestehen aus einer DNA-Bindedomäne (DNA) und einer Liganden-Bindedomäne (Hormon).

Die DNA-Bindedomäne besitzt als Strukturmerkmal zwei sogenannte Zinkfinger: Peptidschleifen, in denen jeweils ein Zinkion gebunden sind. Durch den veränderten C-Terminus kann TR $\alpha$ 2 kein T<sub>3</sub> binden. Die Nummerierung bezieht sich auf die Aminosäuren. „NH<sub>2</sub>“ und „COOH“ bezeichnet das N- und C-terminale Ende des Proteins [Forth et al. 2009].

### **1.3. Hormonpräparate**

Ziel und Zweck der Substitution von Hormonpräparaten ist die Behandlung von hormonellen Störungen, sowie Beschwerden in den Wechseljahren zu lindern bzw. sie sogar zu beseitigen. Durch eine gezielte Dosierung der Medikamente soll der Wachstumsreiz der Hormone gesteuert werden. Dabei werden Steroidhormone wie Estrogene, Gestagene und Androgene sowie Schilddrüsenhormone eingesetzt. Beispielsweise bei einer Unterfunktion der Schilddrüse (Hypothyreose) werden Schilddrüsenhormone verabreicht, um die zu geringe Produktion von Hormonen im Körper zu beheben bzw. auch bei Schilddrüsenvergrößerung (Struma) können Hormonpräparate zur Anwendung kommen, damit eine weitere Stimulation der Schilddrüse unterdrückt wird. Hormonpräparate können auch eingesetzt werden, um bei Frauen die Aussichten einer Schwangerschaft zu erhöhen. Vor allem bei unregelmäßigem Zyklus, einem Überangebot an männlichen Hormonen, Fehlfunktionen der Schilddrüse oder polyzystischen Ovarsyndrom kann dies sinnvoll sein. Darüber hinaus werden sie auch eingesetzt zur hormonellen Kontrazeption und zur Behandlung des Prämenstruellen Syndroms (PMS), um hier nur einige wenige zu nennen. Für die Anwendung der Hormonpräparate gibt es verschiedene Möglichkeiten, welche jetzt im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

#### *1.3.1. Das LADME-Modell:*

Der Einfluß von Pharmaka auf den Körper kann durch ein LADME-Modell dargestellt werden. Dieses Modell zeigt den „Schicksalsverlauf“ eines Medikamentes. Von der Freisetzung des Wirkstoffes aus der Applikationsform bis hin zum Wirken am Zielort im Körper (Abb. 1.8.).

Im Wesentlichen beinhaltet das LADME-Modell zwei Kenngrößen: die Pharmakokinetik und die Pharmakodynamik. Die Pharmakokinetik beschreibt die Gesamtheit der Vorgänge, welche die Aufnahme, Verteilung, Biotransformation und Ausscheidung betreffen.

Die Pharmakodynamik beschäftigt sich mit der Arzneimittel-Rezeptor-Bindung und anschließende Vorgänge auf intrazellulärer Ebene (z.B. Signaltransduktion) bis hin zum eigentlichen pharmakologischen Effekt.

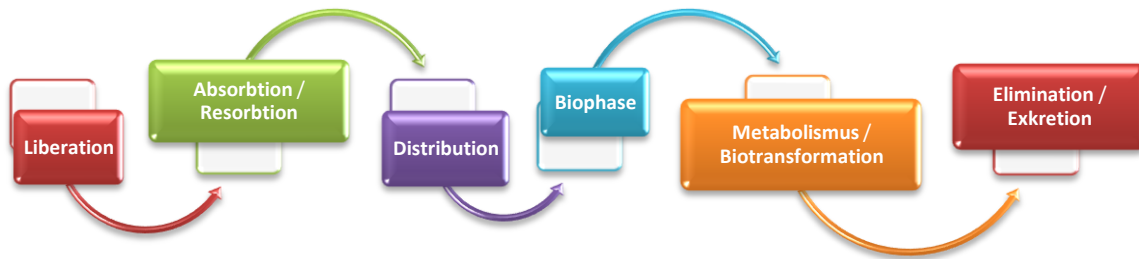


Abb. 1.8.: LADME-MODELL [Plötz 2007]

Definition des LADME-Modells:

### Liberation:

Der Wirkstoff wird aus der Zubereitung freigesetzt. Dabei durchläuft er drei Phasen der Liberation: die Desintegration (der Zerfall in den nächst kleineren Zustand: z.B. von der Tablette in ein Granulat), die Desaggregation (der weitere Zerfall vom Granulat in sehr feine Arzneistoffpartikel) und schließlich die Dissolution (in Lösung gehender Wirkstoff). Diese Wirkstofffreisetzung ist Voraussetzung für die Resorption des Arzneistoffes.

Die Verabreichungsart bzw. die Applikationsform entscheidet maßgeblich über die Geschwindigkeit der Wirkung eines Medikamentes.

### Absorption/Resorption:

Es erfolgt die Aufnahme des Wirkstoffes über biologische Membranen, wobei seine Verteilung im Zentralkompartiment (Blut) erfolgt.

### Distribution:

Danach erfolgt die Verteilung zu anderen Kompartimenten, wie Gewebe und Organe.

### Biophase:

Der Arzneistoff hat den Wirkort erreicht und entfaltet seine Wirkung.

### Metabolismus/Biotransformation:

Lipophile Substanzen werden durch die Niere immer wieder rückresorbiert. Um dies zu verhindern, wurden in der Evolution Enzymsysteme entwickelt, die diese lipophilen Stoffe in hydrophile Substanzen transformieren und somit wasserlöslich machen. Durch die Einführung von funktionellen Gruppen (z.B. -OH) oder Glucuronidierung werden sie wasserlöslich gemacht und können somit ausgeschieden werden.

### Elimination/Exkretion:

Die Ausscheidung findet dann über Niere, Galle, Darm, Lunge Haut und Speichel statt [Plötz 2007].

### 1.3.2. Applikationsformen

Ein Arzneimittel, das aus einem oder mehreren Arzneistoffen besteht, kann entweder auf die Körperoberfläche, d.h. auf die Haut oder die Schleimhaut aufgebracht, innerlich eingenommen oder mit Hilfe perforierender Instrumente (Spritzen, Impfpistolen) ins Körperinnere injiziert werden. Der Applikationsort und die Arzneiform müssen sich nach den physikalischen und chemischen Eigenschaften des Arzneistoffes, dem gewünschten Wirkeintritt, der geforderten Wirkdauer und dem Ort, an dem der Arzneistoff wirken soll, richten. Soll der Wirkeintritt schnell erfolgen, so muss injiziert werden, um eine Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt zu umgehen. Ebenso schnell wirksam ist die nasale oder inhalative Applikation.

Wird dagegen ein verzögerter Wirkeintritt und eine verlängerte Wirkdauer gefordert, so kann das Arzneimittel oral (z.B. als Retardtablette) gegeben werden. Auch ist die intramuskuläre Injektion als ölige Lösung oder Suspension möglich, wobei dadurch ein Depot im Muskel entsteht, aus dem der Arzneistoff langsam freigesetzt wird. Eine topische Applikation, welche direkt am Ort seine Wirkung entfalten kann, ist z.B. für die Behandlung lokaler Wunden als Salbe auf die Haut aufzutragen. Viele Arzneimittel mit Eiweißcharakter werden durch die Magensäure bzw. durch Proteasen (Enzyme des Magen-Darm-Trakts) zerstört.

Durch einen Magensaft-resistenten Überzug solcher Tabletten, lösen sich diese erst im Dünndarm auf, wo sie nicht mehr zerstört werden. Somit ist durch die galenische Beeinflussung der Arzneiform wieder eine orale Applikation möglich [Plötz 2007].

#### 1.3.2.1. Applikationsformen bei der hormonellen Kontrazeption auf Seiten der Frau (siehe auch dazu Tab.1.2.):

- 1.) Orale Kontrazeptiva
- 2.) Parenterale Kontrazeptiva
- 3.) Subcutan zu applizierende Implantate
- 4.) IUP-Applikationsform
- 5.) Topische Applikation in Form eines Pflasters
- 6.) Intravaginale Applikation in Form eines Ringes

#### 1.) Orale Kontrazeptiva:

Bei den oralen Kontrazeptiva gibt es zwei unterschiedliche Arten von Pillen: die „Mikropille“ und die „Minipille“. Der Unterschied liegt sowohl in ihrer Wirkung als auch in ihrer Zusammensetzung.

### Die „Mikropille“: ist heutzutage eine der häufig eingesetzten Kombinationspräparate:

- Als *Estrogenkomponenten* werden Ethinylestradiol oder Mestranol (3-Methylether des Ethinylestradiols) verwendet.
- Die *Gestagenkomponente* der meisten oralen Kontrazeptiva ist entweder ein Norethisteron-Derivat (Norethisteron, Norethinodrel, Dienogest etc.) oder eine dem Norgestrel verwandte Substanz (Norgestrel, Levonorgestrel, Norgestimat, Desogestrel, Gestoden).

Als Hydroxyprogesteron-Derivate werden die antiandrogenwirksamen Gestagene Cyproteronacetat und Chlormadinonacetat angewendet. Die enthaltende Gestagenkomponente entscheidet nicht nur darüber, welchen Zusatznutzen eine Pille bietet, sondern ist auch die Wahl des Gestagens für die Verträglichkeit, neben der Höhe der Estrogendosierung, von Bedeutung.

Definitionsgemäß spricht man dann von einer Mikropille, wenn der Estrogenanteil *unter 0,05 Milligramm (mg), also 50 Mikrogramm (µg), pro Dragee* liegt. Während es in der *1. Generation* noch mehr als 50 µg Ethinylestradiol pro abgeteilter Arzneiform gibt, enthält die *2. Generation* einen Estrogenanteil von etwa 30 µg Ethinylestradiol und die *3. Generation*, der Großteil der heutigen Präparate, wird mit 20-30 µg Ethinylestradiol kombiniert, ohne die kontrazeptive Sicherheit zu beeinträchtigen.

### Unterschiedliche Einnahmemöglichkeiten:

Bei der Einnahme von oralen Kontrazeptiva gibt es einerseits die Möglichkeit nach Beendigung einer Packung (meist sind es 21 Tage bzw. 28 Tage) eine *Pillenpause* (ein einnahmefreies Intervall von 7 Tagen inkl. Hormonentzugsblutung) einzulegen oder andererseits eine *Langzykluskontrazeption* durchzuführen. Bei dieser werden jeweils 21 Tabletten zwei-, drei- oder viermal hintereinander genommen (42, 63, 84 usw. Tabletten). Die Dauer der kontinuierlichen Anwendung beträgt also ein Vielfaches von 21 Tabletten, gefolgt von einem hormonfreien Intervall. Wenn unmittelbar vor und/oder nach der Pillenpause die Einnahme von Tabletten vergessen wird, ist die Gefahr einer unerwünschten Schwangerschaft unter dieser Therapie am größten. Während bei einer Langzyklustherapie eine erhöhte kontrazeptive Sicherheit vorliegt, da weniger einnahmefreie Intervalle auftreten [Forth et al. 2006].

Ein Beispiel für eine Langzykluskontrazeption wäre: die, erst seit kurzem auf dem Markt befindliche, erste ovulationshemmende reine Gestagenpille Cerazette®. Das darin enthaltende Gestagen Desogestrel (75 µg) führt immer zu einer Ovulationshemmung und hat somit dieselbe Sicherheit wie die Kombinationspillen.

Hinzu kommt die größere Freiheit bei der Einnahme: Das Intervall für vergessene Einnahme beträgt bei Cerazette® nicht drei Stunden wie bei der Minipille, sondern 12 Stunden wie bei der Kombinationspille [Linemayr-Wagner 2006]. In allen bisher durchgeführten Studien zur Langzyklustherapie wurden vor allem in den ersten Wochen eine hohe Rate an Durchbruch- und Schmierblutungen beobachtet, die jedoch im Verlauf der Therapie verschwinden [Forth et al. 2006].

Beim Einnahmeschemata mit einer Pillenpause unterscheidet man hier wiederum zwischen:

- *Einstufenpräparate*
- *Zwei- bzw. Dreistufenpräparate (sog. abgestufte Einstufenpräparate)*

*Einstufenpräparate:*

Dies sind die klassischen Kombinationspräparate. Sie enthalten in jedem Dragee die gleiche Dosis von Hormonen, welche über den gesamten Einnahmezyklus hinweg konstant bleibt, d.h. eine Estrogen-Gestagen-Fix-Kombination über 21 Tage. Bei der Ultraleichtpille sind es 24 Tage und 4 Tage Placebo. Ein versehentliches Vertauschen der Reihenfolge der Dragees macht hier nichts aus. Generell wirken die Einstufenpräparate mit einer negativen Rückkopplung auf das Hypothalamus-Hypophysensystem, d.h. die Gonadotropinsekretion wird unterdrückt. Darüber hinaus lässt sich sehr einfach einmal unkompliziert die Blutung verschieben.

*Zwei- bzw. Dreistufenpräparate (sog. abgestufte Einstufenpräparate):*

Die Dosis der Estrogen-Gestagen-Kombination variiert im Verlauf des Einnahmezyklus. Hier ist es erforderlich, dass die Reihenfolge der Dragees immer beibehalten werden muss, was eine höhere Einnahmedisziplin voraussetzt, als bei Einstufenpräparaten. Es wurden mehrstufige Präparate entwickelt, um den hormonellen Schwankungen, wie sie im normalen Zyklus vorkommen, besser zu entsprechen.

Bei den *Zweistufenpräparaten* sind zwei unterschiedliche Estrogen-Gestagen-Verhältnisse. Die Estrogendosis ist konstant, während die Gestagendosis an den ersten 11 Tagen niedriger als an den folgenden Tagen des Einnahmezyklus ist.

In den *Dreistufenpräparaten* wird noch eine bessere Anpassung an die hormonellen Verhältnisse des Normalzyklus angestrebt, indem hier sowohl die Gestagen- als auch die Estrogendosen in weitgehender Übereinstimmung mit Anstieg und Abfall der normalen Hormonsekretion während des Zyklus variieren. Hier erfolgen drei unterschiedliche Estrogen-Gestagen-Verhältnisse.

Die „Minipille“:

Als Pillenbestandteil enthalten sie niedrig dosierte Gestagene, die gerade ausreichen, um den kontrazeptiven Schutz zu gewährleisten. Vielmehr beruht ihre Wirkung auf der Beeinflussung des Cervixsekrets am Gebärmutterhals, um das Eindringen von Spermien in die Gebärmutter zu verhindern bzw. in den Eileiter zu gelangen.

Andere Mechanismen, wie Beeinflussung des Endometriums (und günstige Verhältnisse für eine Implantation) und des Eitransports, werden diskutiert. Bei ca. 30% der Frauen ist aber auch die Ovulation gehemmt. Die Hormonbelastung ist bei diesem Prinzip am geringsten. Dem stehen aber schwerwiegende Nachteile gegenüber, wie geringere kontrazeptive Sicherheit und schlechte Zykluskontrolle. Diese Nachteile haben die Anwendung der „Minipille“ stark eingeschränkt.

Die Anwendung kann nur noch bei Frauen empfohlen werden, bei denen Estrogene kontraindiziert sind [Forth et al. 2007] bzw. bei Frauen in der Stillzeit, da sowohl die Milchmenge und die Milchzusammensetzung nicht beeinträchtigt werden und nur in sehr geringen Mengen das Gestagen mit der Muttermilch auf den Säugling übertragen wird.

## 2.) Parenterale Kontrazeptiva

Parenterale Kontrazeptiva sind Depotpräparate (reine, hoch dosierte Gestagene), die i.m. injiziert werden. Dazu gehört die DEPOCON®-Fertigspritze mit 150 mg Medroxyprogesteronacetat, welche alle drei Monate tief intramuskulär, in den M. gluteus oder M. deltoideus, injiziert wird. Durch die besondere galenische Zubereitung (Kristallsuspension) wird diese Depotwirkung erzielt.

Die Applikationsintervalle dürfen 13 Wochen keinesfalls überschreiten. Unter der DEPOCON®-Fertigspritze fallen die Estradiol- und Estronspiegel auf Werte der frühen follikulären Phase ab. Inwieweit dies bei längerfristiger Anwendung zu einem gesteigerten Osteoporoserisiko führen könnte, ist nicht eindeutig geklärt [AGES FachInfo]. Die Wirkung beruht anfangs auf der Hemmung der Ovulation, später werden das Endometrium und das Cervikalsekret beeinflusst. Dem Schutz vor Einnahmefehlern, als Vorteil, steht aber als wichtiger Nachteil ein unregelmäßiger Zyklusablauf (Schmier- und Durchbruchblutungen) gegenüber.

## 3.) Subcutan zu applizierende Implantate:

Subcutan zu applizierende Implantate bieten eine sichere, lang anhaltende (3 - 5 Jahre) sowie reversible Kontrazeption. Als Beispiel wird hier das Implanon®-Implantat angeführt, welches ein biologisch nicht abbaubares Implantat zur subkutanen Applikation darstellt und 68 mg Etonogestrel enthält. Es handelt sich um ein flexibles Stäbchen, welches 2 mm dünn und 4 cm lang ist und in den Oberarm appliziert wird. Die Substanz ist von einer Ethylenvinylacetat-Membran umhüllt, über die Etonogestrel systemisch abgegeben wird.

Die Freisetzungsrate beträgt ungefähr 60-70 µg/Tag in den Wochen 5-6 und ist am Ende des ersten Jahres auf ungefähr 35-45 µg/Tag, am Ende des zweiten Jahres auf ca. 30-40 µg/Tag und am Ende des dritten Jahres auf ca. 25-30 µg/Tag abgesunken [AGES FachInfo]. Dieses Implantat enthält kein Estrogen und kann daher auch für Frauen angewendet werden, bei denen synthetische Estrogene kontraindiziert sind.

Etonogestrel ist der biologisch aktive Metabolit von Desogestrel, einem in oralen Kontrazeptiva häufig eingesetzten Gestagen. Es ist strukturell von 19-Nortestosteron abgeleitet und weist eine hohe Bindungsaffinität zu den Gestagenrezeptoren der Zielorgane auf [AGES FachInfo]. Da das Nebenwirkungsprofil dem injizierbarer Depotpräparate ähnelt, ist die Akzeptanz eher gering.

#### 4.) IUP-Applikationsform:

Am Beispiel von Mirena® handelt es sich hier um ein Intrauterinpressar (IUP), eine Hormonspirale, die aus einem T-förmigen Kunststoffkörper 52 mg Levonorgestrel freisetzt. Mirena wird in das Cavum uteri eingelegt und kann bis zu 5 Jahren wirksam sein. Die Lage der Spirale muß regelmäßig vom Arzt kontrolliert werden. Die in-vivo Freisetzungsrate von Levonorgestrel ist initial ca. 20 µg/24 Std. und nimmt nach 5 Jahren auf 10 µg/24 Std. ab; durchschnittlich werden im Zeitraum von 5 Jahren 14 µg/24 Std. freigesetzt. Bei Frauen mit einer Hormonersatztherapie (HET) kann Mirena® in Kombination mit oralen oder transdermalen Estrogenpräparaten verwendet werden [AGES FachInfo]. Es werden Serumkonzentrationen erreicht, die  $\frac{1}{5}$  des am niedrigsten dosierten Levonorgestrel-haltigen oralen Kontrazeptivums entsprechen. Das Brustkrebsrisiko liegt möglicherweise in der gleichen Größenordnung wie das bei Anwenderinnen kombinierter oraler Kontrazeptiva [Forth et al. 2007].

Neben der Hormonspirale gibt es die Kupferspirale, welche zu den mechanischen Verhütungsmethoden zählt und keine Hormone abgibt, aber dafür eine Plastikspirale darstellt, welche wie ein Fremdkörper wirkt und dadurch die Einnistung der Eizelle in der Gebärmutter hemmt. Zusätzlich ist sie mit einem Kupferdraht umwickelt und durch die Abgabe von Kupfer-Ionen, schädigen sie die Spermien und wirken so kontrazeptiv. Die Kupferspirale kann für mindestens drei Jahren im Körper bleiben.

Eine neuere flexiblere Spirale, frei von einem Plastikrahmen, ist das sogenannte *Gynefix*®. Eine inkorrekte Insertion, das Entstehen von Scherkräften, welche für viele der unerwünschten Nebenwirkungen und das Ausstoßungs Problem der früheren IUD-Modelle mitverantwortlich sind, wird hiermit vermieden [Journal für Fertilität und Reproduktion 2000].

#### 5.) Topische Applikation in Form eines Pflasters:

Für die hormonelle Kontrazeption gibt es Evra®, ein transdermales Pflaster. Eine Umgehung des hepatischen First-Pass-Effekts erfolgt nicht nur durch die bereits erwähnten extravasalen Applikationsformen, sondern wird auch mit der transdermalen Form, dem Pflaster erreicht. Evra® besteht aus einem dünnen Matrixpflaster, welches aus drei Schichten aufgebaut ist. Jedes Pflaster enthält 6 mg Norelgestromin (NGMN) und 0,6 mg Ethinylestradiol (EE). Die Wirkstoffabgabe pro Pflaster beträgt in 24 h 150µg NGMN und 20 µg EE [AGES FachInfo]. Zum Unterschied zu der täglichen Pilleneinnahme wird das Pflaster wöchentlich gewechselt und nach drei aufeinanderfolgenden Wochen erfolgt eine „pflasterfreie“ Woche, in der es zu einer Entzugsblutung kommt. Das transdermale Pflaster wird abwechselnd auf Bauch, Po, Oberschenkel, oder auf die Außenseite des Oberarms geklebt, wobei man darauf Acht geben sollte, dass es nicht in Kontakt mit Kosmetika oder Ölen kommt, da es sonst die Hafteigenschaften des Pflasters beeinträchtigen würde. Die hormonelle Verhütung inklusive Nebenwirkungen und Risiken entspricht der kombinierter oraler Präparate.

## 6.) Intravaginale Applikation in Form eines Ringes:

Der NuvaRing®, ein Verhütungsring, besteht aus einem biegsamen, weichen, 4 mm dünnen, transparenten Ethylenvinylacetat-Copolymeren Kunststoffring und hat einen Durchmesser von 5,4 cm. Er enthält 11,7 mg Etonogestrel und 2,7 mg Ethinylestradiol und setzt, über einen Zeitraum von 3 Wochen, pro Tag, im Durchschnitt 0,120 mg Etonogestrel und 0,015 mg Ethinylestradiol frei [AGES FachInfo]. Alle 7 Tage wird der Verhütungsring durch die Anwenderin gewechselt, wobei nach drei Wochen ein einwöchiges „ringfreies“ Intervall folgt, um die Abbruchblutung einzuleiten. Neben dem Vorteil, nur noch einmal im Monat an die Verhütung denken zu müssen, ist durch die kontinuierliche lokale Hormonabgabe auch eine ausgezeichnete Zyklusstabilität gewährleistet, während es bei niedrig dosierten Pillenpräparaten zu Zwischenblutungen kommen kann [Verlagdermediziner 2008].

In den folgenden Tabellen 1.2.; 1.3. und 1.4. sind Hormonpräparate mit unterschiedlicher Applikationsform aufgelistet, die zur hormonellen Kontrazeption sowie zur Hormonersatztherapie angewendet werden [AGES Fachinfo].

Der Pearl-Index (PI), der dabei in der Tab. 1.2. der jeweiligen Applikationsform angeführt ist, bezieht sich auf die Anzahl der Schwangerschaften pro 100 Frauenjahre (FJ) [Bartlmä u. Ralph]. Mit dieser Methode kann man die Zuverlässigkeit einer Kontrazeption messen, wobei je niedriger der Pearl-Index ist, desto sicherer ist die Methode:

|                          |                            |
|--------------------------|----------------------------|
| sichere Methode:         | PI < 1                     |
| relativ sichere Methode: | PI < 3                     |
| mittlere Sicherheit:     | PI ≤ 10                    |
| unzuverlässige Methode:  | PI > 15 [Bartlmä u. Ralph] |

Tab. 1.2.: Applikationsformen hormoneller Kontrazeptiva (Diese Präparate wurden während der Messung reaktiver Sauerstoffspezies sowie der Messung der antioxidativen Kapazität von den jeweiligen Frauen verwendet)[AGES Fachinfo].

| ORALE APPLIKATION / HORMONELLE KONTRAZEPTIVA    |                                 |                      |                    | PEARL-INDEX: 0,03-1,0 |                  |
|-------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|------------------|
| EINSTUFENPRÄPARATE:                             |                                 |                      |                    |                       |                  |
| Handelsname                                     | Einheiten<br>per 28 Tage-Zyklus | Gestagengehalt in mg |                    | Estrogengehalt in mg  |                  |
| Balanca®–Filmtabletten<br>Belara®–Filmtabletten | 21                              | 2,0                  | Chlormadinonacetat | 0,030                 | Ethinylestradiol |
| Bellgyn ratiopharm–<br>überzogene Tabletten     | 21                              | 2,0                  | Cyproteronacetat   | 0,035                 | Ethinylestradiol |
| Cerazette®–Filmtabletten                        | 28                              | 0,075                | Desogestrel        | –                     |                  |
| Cileste®–Tabletten                              | 21                              | 0,250                | Norgestimat        | 0,035                 | Ethinylestradiol |

|                                                         |    |         |                  |                           |                  |                  |
|---------------------------------------------------------|----|---------|------------------|---------------------------|------------------|------------------|
| Diane® mite – Dragees                                   | 21 |         | 2,0              | Cyproteronacetat          | 0,035            | Ethinylestradiol |
| HARMONETTE®– Dragees                                    | 21 |         | 0,075            | Gestoden                  | 0,020            | Ethinylestradiol |
| Gynovin®–Dragees                                        | 21 |         | 0,075            | Gestoden                  | 0,030            | Ethinylestradiol |
| Leonore®– überzeugene Tabletten                         | 21 |         | 0,100            | Levonorgestrel            | 0,020            | Ethinylestradiol |
| Loette®– Filmtabletten                                  | 28 | 21<br>7 | 0,100<br>Placebo | Levonorgestrel<br>Placebo | 0,020<br>Placebo | Ethinylestradiol |
| Madonella®– Dragees                                     | 21 |         | 0,150            | Levonorgestrel            | 0,030            | Ethinylestradiol |
| Marvelon®– Tabletten                                    | 21 |         | 0,150            | Desogestrel               | 0,030            | Ethinylestradiol |
| Meliane®– Dragees                                       | 21 |         | 0,075            | Gestoden                  | 0,020            | Ethinylestradiol |
| Mercilon®– Tabletten                                    | 21 |         | 0,150            | Desogestrel               | 0,020            | Ethinylestradiol |
| Micronovum®– Tabletten                                  | 28 |         | 0,350            | Norethisteron             |                  | –                |
| Midane®–Dragees                                         | 21 |         | 2,0              | Cyproteronacetat          | 0,035            | Ethinylestradiol |
| Minulette®–Dragees<br>MINULET®– Dragees                 | 21 |         | 0,075            | Gestoden                  | 0,030            | Ethinylestradiol |
| MINESSE®– Filmtabletten<br>Mirelle®– Filmtabletten      | 28 | 24<br>4 | 0,060<br>Placebo | Gestoden<br>Placebo       | 0,015<br>Placebo | Ethinylestradiol |
| Motion ratiopharm–<br>Filmtabletten<br>Valette®–Dragees | 21 |         | 2,0              | Dienogest                 | 0,030            | Ethinylestradiol |
| Yasmin®– Filmtabletten                                  | 21 |         | 3,0              | Drospirenon               | 0,030            | Ethinylestradiol |
| Yasminelle®– Filmtabletten                              | 21 |         | 3,0              | Drospirenon               | 0,020            | Ethinylestradiol |
|                                                         |    |         |                  |                           |                  |                  |

#### ZWEISTUFENPRÄPARATE:

| Handelsname         | Einheiten<br>per 28 Tage-Zyklus | Gestagengehalt in mg                   | Estrogengehalt in mg                             |
|---------------------|---------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Gracial®– Tabletten | 22      7<br>15                 | 0,025 Desogestrel<br>0,125 Desogestrel | 0,040 Ethinylestradiol<br>0,030 Ethinylestradiol |
|                     |                                 |                                        |                                                  |

#### DREISTUFENPRÄPARATE:

| Handelsname                                  | Einheiten<br>per 28 Tage-Zyklus | Gestagengehalt in mg                                                             | Estrogengehalt in mg                                                       |
|----------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| TriCilest®-Tabletten                         | 21      7<br>7<br>7             | 0,180 Chlormadinonacetat<br>0,215 Chlormadinonacetat<br>0,250 Chlormadinonacetat | 0,035 Ethinylestradiol<br>0,035 Ethinylestradiol<br>0,035 Ethinylestradiol |
| Triodena®– Dragees<br>Tri-Minulet®-Tabletten | 21      6<br>5<br>10            | 0,050 Gestoden<br>0,070 Gestoden<br>0,100 Gestoden                               | 0,030 Ethinylestradiol<br>0,040 Ethinylestradiol<br>0,030 Ethinylestradiol |
| TRINOVUM®-Tabletten                          | 21      7<br>7<br>7             | 0,500 Norethisteron<br>0,750 Norethisteron<br>1,0 Norethisteron                  | 0,035 Ethinylestradiol<br>0,035 Ethinylestradiol<br>0,035 Ethinylestradiol |
| Vivelle®-Tabletten                           | 21      7<br>7<br>7             | 0,180 Norgestimat<br>0,215 Norgestimat<br>0,250 Norgestimat                      | 0,035 Ethinylestradiol<br>0,035 Ethinylestradiol<br>0,035 Ethinylestradiol |
|                                              |                                 |                                                                                  |                                                                            |

| PARENTERALE APPLIKATION / HORMONELLE KONTRAZEPTIVA   |  |                          |  |                      |                                | PEARL-INDEX: 0,03-0,9 |                  |
|------------------------------------------------------|--|--------------------------|--|----------------------|--------------------------------|-----------------------|------------------|
| Handelsname                                          |  | Dauer der Verhütung      |  | Gestagengehalt in mg |                                | Estrogengehalt in mg  |                  |
| DEPOCON® - Fertigspritze                             |  | 3 Monate                 |  | 150,0                | Medroxyprogsteronacetat<br>MPA | –                     |                  |
| SUBKUTANE APPLIKATION / HORMONELLE KONTRAZEPTIVA     |  |                          |  |                      |                                | PEARL-INDEX: 0,00     |                  |
| Handelsname                                          |  | Dauer der Verhütung      |  | Gestagengehalt in mg |                                | Estrogengehalt in mg  |                  |
| Implanon®-Implantat                                  |  | 3 Jahre                  |  | 68,0                 | Etenogestrel                   | –                     |                  |
|                                                      |  | Ersten 5-6 Wo            |  | 0,060-0,070          | Etenogestrel                   |                       |                  |
|                                                      |  | Ende des 1. Jahres tägl. |  | 0,035-0,045          | Etenogestrel                   |                       |                  |
|                                                      |  | Ende des 2. Jahres tägl. |  | 0,030-0,040          | Etenogestrel                   |                       |                  |
|                                                      |  | Ende des 3. Jahres tägl. |  | 0,025-0,030          | Etenogestrel                   |                       |                  |
| IUP - APPLIKATION / HORMONELLE KONTRAZEPTIVA         |  |                          |  |                      |                                | PEARL-INDEX: 0,2-0,7  |                  |
| Handelsname                                          |  | Dauer der Verhütung      |  | Gestagengehalt in mg |                                | Estrogengehalt in mg  |                  |
| Mirena®-IUP-Hormonspirale                            |  | 5 Jahre<br>tägl.         |  | 52,0                 | Levonorgestrel                 | –                     |                  |
|                                                      |  |                          |  | 0,020                | Levonorgestrel                 |                       |                  |
| TOPISCHE APPLIKATION / HORMONELLE KONTRAZEPTIVA      |  |                          |  |                      |                                | PEARL-INDEX: 0,7      |                  |
| Handelsname                                          |  | Dauer der Verhütung      |  | Gestagengehalt in mg |                                | Estrogengehalt in mg  |                  |
| Evra®- Hormonpflaster                                |  | 3 Wo<br>tägl.            |  | 6,0                  | Norelgestromin                 | 0,6                   | Ethinylestradiol |
|                                                      |  |                          |  | 0,150                | Norelgestromin                 | 0,020                 | Ethinylestradiol |
| INTRAVAGINALE APPLIKATION / HORMONELLE KONTRAZEPTIVA |  |                          |  |                      |                                | PEARL-INDEX: 0,03-0,7 |                  |
| Handelsname                                          |  | Dauer der Verhütung      |  | Gestagengehalt in mg |                                | Estrogengehalt in mg  |                  |
| NuvaRing®                                            |  | 3 Wo<br>tägl.            |  | 11,7                 | Etenogestrel                   | 2,7                   | Ethinylestradiol |
|                                                      |  |                          |  | 0,120                | Etenogestrel                   | 0,015                 | Ethinylestradiol |

1.3.2.2. Applikationsformen bei der Hormonersatztherapie (HET) auf Seiten der Frau  
(siehe auch dazu Tab. 1.3.):

Bei der Hormonersatztherapie (HET) (engl. hormone replacement therapy oder HRT) auf Seiten der Frau (Tab. 1.3.) gibt es die gleichen Applikationsformen wie bei der hormonellen Kontrazeption (Tab. 1.2.). Allerdings gibt es zusätzlich bei der transdermalen Applikation neben dem Pflaster die Möglichkeit der Anwendung in Form eines Gels. Die Dosierung ist dabei sehr individuell. Die meisten Gele enthalten nur eine Estrogenkomponente (z.B. Estro®-Gel) und das Gestagen, wenn nötig, kann zusätzlich mittels Tablette eingenommen werden. Dabei gelangt das Estrogen über die Haut direkt ins Blut ohne First-Pass-Effekt.

Für eine Behandlung ohne Abbruchblutungen (= kontinuierliche Estrogen-Gestagen-Therapie) sind Gels weniger geeignet, darüberhinaus sind die Hormonschwankungen etwas grösser als beim Pflaster. Für Brustbeschwerden gibt es auch ein spezielles Progesteron-Gel [Fischl 1998].

Eine neue Applikationsform auf transnasaler Basis ist der Aerodiol®-Nasenspray:

Aerodiol® enthält 17β-Estradiol, das in einem Cyclodextrinderivat namens RAMEB [Jones et al. 1997; Technologie Servier, Orleans-France] (randomly methylated betacyclodextrin) gelöst wird. Damit erreicht man einerseits den Effekt einer wäßrigen Lösbarkeit eines ansonst nur in polaren Lösungsmitteln löslichen Stoffes und andererseits eine hohe Absorptionsrate und gute Verträglichkeit von Aerodiol®.

Durch diese neue Applikationsform werden First-Pass-Effekte in der Leber, allergische Reaktionen auf der Haut oder intestinale Probleme vermieden. Aerodiol® stellt somit eine Alternative zur herkömmlichen Estrogenapplikation dar. Die Wirkweise von Aerodiol® Nasalspray basiert auf einer pulsatilen Estrogentherapie. Nach einem Hub Aerodiol® wird 17β-Estradiol rasch durch die Nasenschleimhaut resorbiert. Binnen 30 Minuten steigen die Serum-Estrogenwerte auf über 1200 pg/ml an (der sogenannte Puls), wodurch Estrogenrezeptoren aktiviert werden. Deren Wirkung hält dann 24 Stunden an, während die Estrogen-Blutspiegel rasch abfallen. Dieses Konzept der pulsatilen Estrogentherapie basiert auf der Hypothese, daß mehr die Anzahl der aktivierten Estrogenrezeptoren als die absolute Plasmakonzentration von Estradiol für die estrogene Wirkung verantwortlich sein dürfte [Stonek et al. 2001].

Tab. 1.3.: Präparateauswahl der gängigen Applikationsformen von Hormonpräparaten zur HET (HRT) für Frauen [AGES Fachinfo]:

| ORALE APPLIKATION / HORMONERSATZTHERAPIE       |                                    |    |                      |                            |                                 |
|------------------------------------------------|------------------------------------|----|----------------------|----------------------------|---------------------------------|
| <i>Estrogen-Mono-und Kombinationspräparate</i> |                                    |    |                      |                            |                                 |
| Handelsname                                    | Einheiten<br>per<br>28 Tage-Zyklus |    | Gestagengehalt in mg |                            | Estrogengehalt in mg            |
| Activelle 0,5 mg/0,1 mg Filmtabletten          | 28                                 |    | 0,1                  | Norethisteronacetat        | 0,5 Estradiolhemihydrat         |
| Activelle 1mg/0,5 mg Filmtabletten             | 28                                 |    | 0,5                  | Norethisteronacetat        | 1,0 Estradiolhemihydrat         |
| Angeliq 1 mg/2 mg Filmtabletten                | 28                                 |    | 2,0                  | Drospirenon                | 1,0 Estradiolhemihydrat         |
| Conjugen                                       | 20                                 |    | 0,8                  | Na-Estron-3-hydrogensulfat | 0,2 Na-Equilin-3 hydrogensulfat |
| Climen®-Dragees                                | 28                                 | 16 | 1,0                  | Cyproteronacetat           | 2,0 Estradiolvaleriat           |
|                                                |                                    | 12 |                      |                            | 2,0 Estradiolvaleriat           |
| Duphaston®- Filmtabletten                      | 21 oder 28                         |    | 10,0                 | Dydrogesteron              | -                               |
| Estrofem®- 1mg Tabletten                       | 28                                 |    | -                    |                            | 1,0 17β- Estradiol              |
| Estrofem®- 2mg Tabletten                       |                                    |    |                      |                            | 2,0 17β- Estradiol              |
| Estrofem®- forte 4mg Tabletten                 |                                    |    |                      |                            | 4,0 17β- Estradiol              |
| Femoston®- 1/10mg Tabletten                    | 28                                 | 14 | 10,0                 | Dydrogesteron              | 1,0 17β- Estradiol              |
|                                                |                                    | 14 |                      |                            | 1,0 17β- Estradiol              |
| Femoston®- 2/10mg Tabletten                    | 28                                 | 14 | 10,0                 | Dydrogesteron              | 2,0 17β- Estradiol              |
|                                                |                                    | 14 |                      |                            | 2,0 17β- Estradiol              |
| Femoston® conti 1/5 mg Filmtabletten           | 28                                 |    | 5,0                  | Dydrogesteron              | 5,0 17β- Estradiol              |

|                               |                                                                              |               |       |                         |                   |                                                                   |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|---------------|-------|-------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Filena®-Tabletten             | 21                                                                           | 11<br>10      | 10,0  | Medroxprogesteronacetat | 2,0<br>2,0        | Estradiolvaleriat<br>Estradiolvaleriat                            |
| Kliogest®N-Filmtabletten      | 28                                                                           |               | 1,0   | Norethisteronacetat     | 2,0               | 17β-Estradiol                                                     |
| Liviel®-Tabletten             | 28                                                                           |               | 2,5   | Tibolon                 |                   | -                                                                 |
| Mericomb®- Filmtabletten      | 28                                                                           | 16<br>12      | 1,0   | Norethisteron           | 2,0<br>2,0        | Estradiolvaleriat<br>Estradiolvaleriat                            |
| Mericomb® mite- Filmtabletten | 28                                                                           | 16<br>12      | 1,0   | Norethisteron           | 1,0<br>1,0        | Estradiolvaleriat<br>Estradiolvaleriat                            |
| Merigest®- Filmtabletten      | 28                                                                           |               | 0,7   | Norethisteron           | 2,0               | Estradiolvaleriat                                                 |
| Progynova® mite- Dragees      | 20                                                                           |               |       | -                       | 1,0               | Estradiolvaleriat                                                 |
| Trisequens®- Filmtabletten    | 28                                                                           | 12<br>10<br>6 | 1,0   | Norethisteronacetat     | 2,0<br>2,0<br>1,0 | Estradiolhemihydrat<br>Estradiolhemihydrat<br>Estradiolhemihydrat |
| Orgametril®-Tabletten         | 10 oder 25                                                                   |               | 5,0   | Lynestrenol             |                   | -                                                                 |
| Ovestin 1 mg - Tabletten      | 1.Wo: 3Tabl. zu 3mg<br>2.Wo: 2Tabl. zu 2mg<br>3.Wo: 1Tabl. zu 1mg<br>täglich |               |       |                         | 1,0/ Tabl.        | Estriol                                                           |
| Primosiston®-Tabletten        | 10                                                                           |               | 2,0   | Norethisteronacetat     | 0,010             | Ethinylestradiol                                                  |
| Prodafem® 5 mg – Tabletten    | 10                                                                           |               | 5,0   | Medroxprogesteronacetat |                   | -                                                                 |
| Prodafem® 10 mg – Tabletten   | 10                                                                           |               | 10,0  | Medroxprogesteronacetat |                   | -                                                                 |
| Utrogestan®-Kapseln           | 12-14                                                                        |               | 100,0 | Progesteron mikron.     |                   | -                                                                 |

#### PARENTERALE APPLIKATION / HORMONERSATZTHERAPIE

| Handelsname                     | Dosierung, Art und Dauer der Anwendung | Gestagengehalt in mg          | Testosteron-Derivatgehalt in mg       | Estrogengehalt in mg     |
|---------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| Gynodian® Depot - Fertigspritze | 1 ml i.m. Injektion alle 4 Wo          |                               | 200,0 Prasteronenantat (DHEA Enantat) | 4,0 Estradiolvalerat     |
| Progynon® Depot-Ampullen        | 1 ml i.m. Injektion alle 3-4 Wo        |                               | -                                     | 100,0 Estradiolundecylat |
| Depo-Provera®-Fertigspritze     | 1 ml i.m. Injektion alle 3-4 Wo        | 150,0 Medroxprogesteronacetat |                                       |                          |

#### TRANSDERMALE APPLIKATION / HORMONERSATZTHERAPIE

| Handelsname                               | Dosierung, Art und Dauer der Anwendung | Gestagengehalt in mg     | Testosteron-Derivatgehalt in mg | Estrogengehalt in mg |
|-------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|----------------------|
| Climara ®50/24h - transdermales Pflaster  | 1 x wöchentlich                        | -                        | -                               | 0,050 Estradiol/Tag  |
| Climara ®100/24 h- transdermales Pflaster | 1 x wöchentlich                        | -                        | -                               | 0,100 Estradiol/Tag  |
| Estracomb®- Depot-Pflaster                | 2 x wöchentlich                        |                          |                                 | 0,050 Estradiol/Tag  |
| Estraderm®- Depot-Pflaster                | 2 x wöchentlich                        | -                        | -                               |                      |
| Estraderm 25-TTS®-Pflaster                | 2 x wöchentlich                        |                          |                                 | 0,025 Estradiol/Tag  |
| Estraderm 50-TTS®-Pflaster                | 2 x wöchentlich                        | -                        | -                               | 0,050 Estradiol/Tag  |
| Estraderm 100-TTS®-Pflaster               | 2 x wöchentlich                        |                          |                                 | 0,100 Estradiol/Tag  |
| Estragest®- Depot-Pflaster                | 2 x wöchentlich                        | 0,25 Norethisteronacetat |                                 | 0,050 Estradiol/Tag  |
| FemSeven ®-Depot-Pflaster                 | 1 x wöchentlich                        | -                        | -                               | 0,050 Estradiol/Tag  |

|                                          |                                 |   |   |        |                         |
|------------------------------------------|---------------------------------|---|---|--------|-------------------------|
| System®-50/24 h Depot - Pflaster         | 1 x wöchentlich                 | - | - | 0,050  | Estradiol/Tag           |
| Menorest®-37,5/24 h Depot - Pflaster     | 1 x wöchentlich                 | - | - | 0,0375 | Estradiol/Tag           |
| Menorest®-50/24 h Depot - Pflaster       | 1 x wöchentlich                 | - | - | 0,050  | Estradiol/Tag           |
| Menorest®-75/24 h Depot - Pflaster       |                                 |   |   | 0,075  | Estradiol/Tag           |
| Estro-Gel                                | 1 x wöchentlich                 | - | - | 0,075  | Estradiol/Dosiereinheit |
| Aerodiol® 150 µg/ Sprühstoß - Nasenspray | Täglich<br>0,150 /<br>Nasenloch | - | - | 0,150  | Estradiol-Hemihydrat    |

#### INTRAVAGINALE APPLIKATION / HORMONERSATZTHERAPIE

| Handelsname                               | Dosierung, Art und Dauer der Anwendung                                                    | Gestagengehalt in mg | Testosteron-Derivatgehalt in mg | Estrogengehalt in mg |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------|----------------------|
| Ortho-Gynest 0,1 mg/g Vaginalcreme        | 1 x wöchentlich                                                                           | -                    | -                               | 0,1/g Estriol        |
| Ortho-Gynest Depot 3,5 mg Vaginalzäpfchen | 2 x wöchentlich                                                                           | -                    | -                               | 3,5/2g Estriol       |
| Ortho-Gynest 0,5 mg Vaginalzäpfchen       | 2 x wöchentlich                                                                           | -                    | -                               | 0,5/2g Estriol       |
| Ovestin - Creme                           | Ersten 2-3-Wo. täglich, dann 2 x wöchentlich<br>Nach 2-3-Wo. eine Wo Pause                | -                    | -                               | 1,0/g Estriol        |
| Ovestin - Ovula                           | Ersten 2-3-Wo. täglich, dann 2 x wöchentlich<br>Nach 2-3-Wo. eine Wo Pause. eine Wo Pause | -                    | -                               | 0,5/2g Estriol       |
| Linoladiol Estradiol -Emulsion            | 1 x wöchentlich                                                                           | -                    | -                               | 0,1/g Estradiol      |

#### 1.3.2.3. Applikationsformen bei der Hormonersatztherapie (HET) auf Seiten des Mannes

( Tab. 1.4.):

- 1.) Orale Applikation
- 2.) Parenterale intramuskuläre Applikation
- 3.) Subcutan zu applizierende Implantate
- 4.) Transdermale Applikation
- 5.) Lokale Applikation

## 1.) Orale Applikation

Die orale Testosteron-Ersatztherapie mittels Testosteron-Undecanoat (z.B. Andriol®) hat sicherlich einen Vorteil in Hinblick auf eine angenehme Darreichungsform. Orales Testosteron wird allerdings sehr rasch im Gastrointestinaltrakt absorbiert und über den portalen Kreislauf zur Leber gebracht. Durch diesen First-Pass-Effekt kann lediglich die Aufnahme von 200 mg Testosteron (das entspricht der 30-fachen Testosteronmenge, welche ein Mann täglich synthetisiert) die Synthese- und Abbauleistung der Leber übertreffen, wodurch auch im peripheren Blut Testosteron nachweisbar wird. Ein Teil dieser lipophilen Substanz wird zwar auch über die Lymphe resorbiert und so an der Leber vorbeigeschleust, letztendlich führt aber der rasche Metabolismus in der Leber zu subphysiologischen Testosteronmengen in der peripheren Blutbahn und zu einer Ansammlung von Testosteron-metaboliten in der Leber.

Orale Testosteronsubstitution erreicht auch bei dreimaliger Gabe weder das zirkadiane Freisetzungsmuster von nativem Testosteron, noch physiologische Spiegel von Dihydrotestosteron oder Estradiol.

Die effektivste orale Substitutionstherapie wird mit den 17-Alpha Testosteronen (z.B. 17-Alpha-Methyltestosteron) erreicht. Diese Androgene können entweder oral oder bukkal appliziert werden. Wegen der relativ hohen Therapiekosten, der schwachen Potenz und dem potenziellen Risiko der Lebertoxizität sollten orale Androgene nicht für die Androgen-substitutionstherapie bei hypogonadalen Männern verwendet werden.

## 2.) Parenterale intramuskuläre Applikation

Die intramuskuläre Testosteronsubstitution ist eine sehr effektive Therapieform, die bislang die beste Form (»Goldstandard«) des Testosteronersatzes darstellte (z.B. Testoviron®). Der größte Nachteil ist der Konzentrationsgipfel unmittelbar nach der intramuskulären Administration und die meist subphysiologischen Testosteron-Werte knapp vor der neuerlichen Injektion. Auch intramuskulär verabreichte Androgene simulieren nicht den zirkadianen Konzentrationsverlauf von Testosteron, und die ölige Suspension führt häufig zu Schmerzen an der Injektionsstelle. Bemerkenswert sind auch die überhöhten Estradiol-Spiegel, die beim Patienten (ähnlich der Testosteronspitze) unmittelbar nach der Injektion gemessen werden.

Testosteron kann auch als wasserlösliches unmodifiziertes Testosteron intramuskulär appliziert werden, dieses wird allerdings schnell absorbiert und abgebaut, somit erfolgt eine ungenügende Substitution. Das 17- $\beta$ -Hydroxy-Testosteron ist die am häufigsten verwendete Depot-Formulierung. Testosteron-Ester werden in einer öligen Suspension, wie z.B. Baumwollpflanzen- oder Sesamöl, gebunden. Diese Testosteron-Ester haben primär keine androgene Aktivität und müssen erst zu Testosteron hydrolysiert werden. Zu den 17- $\beta$ -Hydroxyl-Ester des Testosteron gehören auch Testosteron-Propionat und Testosteron-Enanthat und -Cypionat.

Testosteron-Propionat müsste wegen der kurzen Halbwertszeit jeden 2. Tag injiziert werden und findet somit zur Zeit kaum Verwendung. Testosteron-Enantat und -Cypionat werden zur Zeit als Therapie des hypogonadalen Mannes eingesetzt, da diese Depotformulierung 2 bis 3 wöchentlich appliziert wird. Bei richtiger Indikationsstellung führen diese Testosteron-Ester zu einer Verbesserung der Libido, der Sexualfunktion, der Potenz, des Antriebes und auch der Stimmung, falls diese Veränderungen durch den Androgenmangel bedingt waren. Wie oben erwähnt, muss man allerdings auf die Testosteron-Spitzen am 1. bis 3. Tag nach Injektion hinweisen. Hier werden supraphysiologische Spiegel bis zu 1.400 ng/ml erreicht! Wie aus der Praxis bekannt ist, führen diese Spiegelschwankungen auch bei den Patienten zu Gefühlsschwankungen und signifikanten Unterschieden in ihrem Sexualverhalten. Hinweise gibt es aber auch auf teils pathologisches Sexualverhalten und allgemeine Erhöhung der Aggressivität unter dieser Substitutionstherapie.

### 3.) Subcutan zu applizierende Implantate

Diese Form der Testosteronsubstitution wird seit Beginn der pharmakologischen Testosteronsynthese angewandt. Die subkutanen Implantate haben einerseits den Vorteil, dass man mit dieser Applikationsform natives Testosteron verwenden kann und physiologische Serumtestosteronspiegel für 4 bis 5 Monate erreicht. Seit einigen Monaten steht hierfür ein Testosteron-Implantat der Firma Organon® zur Verfügung. Diese Implantate bestehen aus kristallinem Testosteron und werden rückstandsfrei resorbiert. 6 Stück dieser Implantate à 50 oder à 100mg oder à 200 werden subkutan im Hüftbereich appliziert, dazu ist ein kleiner chirurgischer Eingriff in lokaler Betäubung nötig. Vorteil dieser Substitutionsform ist die gleichmäßige Testosteronfreisetzung ohne supraphysiologische Spitzen nach Applikation. Ein zirkadianer Rhythmus kann allerdings nicht erzielt werden. Interessant sind auch die niedrigen Therapiekosten.

### 4.) Transdermale Applikation

Das transdermale Testosteron, in Form eines Pflaster, stellt die physiologischste Applikationsform für die Androgen-Ersatztherapie dar. In Österreich ist zurzeit nur die skrotale Applikationsform auf dem Markt (Testoderm® 6mg), die dermale Testosteronsubstitution (Androderm®) ist noch nicht registriert. Der Vorteil der transdermalen Applikation ist, dass natives Testosteron verwendet wird. Mit dieser Darreichungsform gelingt es erstmals, physiologische Testosteronwerte mit zirkadianer Rhythmik zu erreichen, falls die Pflaster vor dem Schlafengehen geklebt werden. Die Testosteronspitzen werden dann in den frühen Morgenstunden erreicht, die niedrigsten Werte werden vor der neuerlichen Applikation gemessen. Die Nachteile der skrotalen Pflaster sind sicherlich die wöchentliche Rasur der Skrotalhaut und die Dihydrotestosteron-Werte über dem physiologischen Normalwert.

Die dermalen Testosteronpflaster (Androderm®) erreichen eine zirkadiane Serumkonzentration mit normalen Testosteron-Werten, aber auch normalen Estradiol- und Dihydrotestosteron-Werten. Nachteil von Androderm® ist, dass ein Penetrationsvermittler zur besseren Resorption des Testosterons beigefügt wird und dieses Pflaster deshalb mehr lokale Nebenwirkungen verursacht als Testoderm®. Bemerkenswert ist, dass in Langzeitstudien der PSA-Wert nur bei intramuskulärer Substitution, nicht aber bei der transdermalen Therapie ansteigt. In einer weiteren Studie konnte auch gezeigt werden, dass die Größenzunahme der Prostata bei transdermaler Applikation innerhalb von 10 Jahren im Bereich der natürlichen Wachstumskurve blieb. Nachteil der transdermalen Systeme sind sicherlich die höheren Kosten, und für manche Patienten ist auch die Notwendigkeit, dieses Pflaster täglich zu wechseln bzw. neu zu kleben, ein Problem. Bei sachgerechter Anwendung führt auch die transdermale Testosteron-Substitution zu einer Verbesserung der Sexualfunktion, der Libido, der nächtlichen Tumescenz und hat auch einen anabolen Effekt. Mit den Testosteron-Pflastern steht somit eine gleichmäßigere und den natürlichen Testosteronspiegeln angepasste Therapieform zur Verfügung [Pusch u. Jungwirth 2002].

## 5.) Lokale Applikation

Bekanntlich bestehen alle transdermalen therapeutischen Systeme (TTS) aus einem Wirkstoffreservoir und einer abgabesteuernden Membran oder Matrix, welche den Übertritt in die Haut kontrolliert [ÖAZ Aktuell; Ausgabe 12/2003]. Das Testosteron-Gel benützt nun die Haut selbst zugleich als Reservoir und Kontrollsystem. Das Präparat AndroGel® ist eine Mischung aus Testosteron und Ethanol (zur besseren Resorption) und wird auf die Haut aufgetragen. Dieses von der FDA zugelassene Präparat ist bislang nur in den USA erhältlich [Pusch u. Jungwirth 2002].

Bei uns ist das TESTOGEL® 25/50mg Gel im Beutel erhältlich. Aus dem hydroalkoholischen Gel dringt »Testosteron« rasch in die Haut ein und bildet dort ein Depot, aus dem es konstant über 24 Stunden ins Blut abgegeben wird. Die Höhe der Blutspiegel korreliert direkt mit der zugeführten Menge, aber nur schwach mit der Größe der behandelten Hautfläche. Sexualfunktion und Stimmung besserten sich schon nach 1 Monat, die Muskelkraft nach 3 Monaten, ebenso die fettfreie Körpermasse. Den Inhalt des Beutels sollte man täglich auf Schulter, Arme oder Bauch in dünner Schicht verteilt, 3 bis 5 Min. trocknen lassen und dann erst die Kleidung anlegen, dabei die Hände waschen nicht vergessen [ÖAZ Aktuell; Ausgabe 12/2003]. Die häufigen Hautirritationen (65,8%) von Pflastern waren beim hydroalkoholischen Gel (5,5%) äußerst selten [Wang et al. 2000]. Wegen des Androgeneinflusses auf die Prostata bzw. einer eventuellen Karzinominduktion sind jährliche Kontrolluntersuchungen durchzuführen. Probleme sind einerseits die schlechte Dosierbarkeit und andererseits kann es zu Virilisierungserscheinungen der Partnerin bei intensivem Hautkontakt kommen. Solange das Gel nicht eingetrocknet ist, ist die Übertragungsgefahr am höchsten [ÖAZ Aktuell; Ausgabe 12/2003].

Eine neue Applikationsform wäre *Testosteron-Mikrokapseln*: Diese Art der Depotformulierung ist bereits bei den LH-RH Agonisten in Verwendung. Aus pharmakologischer Sicht gibt es Schwierigkeiten mit der Stabilität und der gleichmäßigen Substanzfreisetzung von Testosteron, sodass es zur Zeit für diese Applikationsform keine Entwicklungen gibt [Pusch u. Jungwirth 2002].

Desweiteren gibt es noch andere Testosteronester wie:

**Testosteron-Buciclat:** Die WHO unterhält ein Steroidsyntheseprogramm, das neue Testosteronester entwickeln soll. Eine dieser Substanzen ist das Testosteron-trans-4-n-butylcyclohexyl-carboxylat, genannt Testosteron-Buciclat. Mit 600 mg dieses Androgens erreicht man physiologische Serumtestosteronwerte für 3 Monate. Die Verabreichung von 1.000 mg Testosteron-Buciclat führte zu einer physiologischen Testosteronsubstitution von 4 bis 5 Monaten, ohne dadurch höhere Serumkonzentrationen als mit 600 mg hervorzurufen. In den klinischen Studien wurden mit Testosteron-Buciclat keine supraphysiologischen Spiegel gemessen.

**Testosteron-Undecanoat** ist ein weiterer Testosteronester, wovon 1.000 mg für eine 6- bis 8-wöchige Androgensubstitution sorgen (Nebido 1000 mg/4 ml Injektionslösung). Auch bei diesem langkettigen Testosteronester wurden keine supraphysiologischen Konzentrationen gemessen ( siehe Tab.1.4.) [Pusch u. Jungwirth 2002].

Tab. 1.4.: Präparateauswahl der gängigen Applikationsformen der Testosteron-Substitution beim alternden Mann mit symptomatischen Androgenmangel [AGES Fachinfo; Jacobi 2005]:

| ORALE APPLIKATION / HORMONERSATZTHERAPIE für den MANN       |                                                                                                                                                                         |                                    |
|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Handelsname                                                 | Dosierung, Art und Dauer der Anwendung                                                                                                                                  | Testosteron-Derivatgehalt in mg    |
| Andriol® Testocaps 40 mg - Kapseln                          | Anfangsdosis: 120 – 160 mg (3 – 4 Kapseln) täglich für 2 – 3 Wochen, dann Erhaltungsdosis: 40 – 120 mg (1 – 3 Kapseln) täglich                                          | 40,0 Testosteron-Undecanoat/Kps    |
| Proviron-Tabletten                                          | Anfangsdosis: 1 Tablette Proviron 3mal täglich;<br>Weiterbehandlung: 1 Tablette Proviron 2 – 1mal täglich<br><i>Hypogonadismus: 1-2 Tabl. 3x täglich mehrere Monate</i> | 25,0 Mesterolone                   |
|                                                             |                                                                                                                                                                         |                                    |
| PARENTERALE APPLIKATION / HORMONERSATZTHERAPIE für den MANN |                                                                                                                                                                         |                                    |
| Handelsname                                                 | Dosierung, Art und Dauer der Anwendung                                                                                                                                  | Testosteron-Derivatgehalt in mg    |
| Testoviron Depot® 250 mg                                    | I.m. Injektion: 100,0 alle 2 Wo. / 250,0 alle 3-4-Wo.                                                                                                                   | 250,0 Testosteron-Enantat          |
| Nebido 1000 mg/4 ml Injektionslösung                        | I.m. Injektion: 1000,0 alle 3 Monate                                                                                                                                    | 250,0 Testosteron-Undecanoat       |
|                                                             |                                                                                                                                                                         |                                    |
| SUBKUTANE APPLIKATION / HORMONERSATZTHERAPIE für den MANN   |                                                                                                                                                                         |                                    |
| Handelsname                                                 | Dosierung, Art und Dauer der Anwendung                                                                                                                                  | Testosteron-Gehalt in mg           |
| Testosteron Implant. 50/100/200 mg                          | 6 Stück dieser Implantate à 50mg oder à 100mg oder à 200mg werden subkutan im Hüftbereich appliziert für je 6 Monate                                                    | kristallines Testosteron/Implantat |
|                                                             |                                                                                                                                                                         |                                    |

| TRANSDERMALE APPLIKATION / HORMONERSATZTHERAPIE für den MANN |                                                                                                                                                                      |                                    |                            |
|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| Handelsname                                                  | Dosierung, Art und Dauer der Anwendung                                                                                                                               | Testosteron-Gehalt in mg           |                            |
| ANDRODERM® 2,5 mg<br>Transdermales Pflaster                  | 2 Pflaster mit je 2,5 mg pro Tag (24h)                                                                                                                               | 12,2                               | Testosteron                |
| Testoderm® 4 mg/24 h-<br>transdermales Pflaster              | 1mal täglich auf die gereinigte, trockene und rasierte Skrotalhaut aufkleben für 22 – 24 Std. Täglich entweder Testoderm 6 mg/24 h Pflaster oder 4 mg/24h verwenden. | 10,0<br>6,0 / 24h oder<br>4,0 / 24 | Testosteron / Pflaster     |
|                                                              |                                                                                                                                                                      |                                    |                            |
| LOKALE APPLIKATION / HORMONERSATZTHERAPIE für den MANN       |                                                                                                                                                                      |                                    |                            |
| Handelsname                                                  | Dosierung, Art und Dauer der Anwendung                                                                                                                               | Testosteron-Gehalt in mg           |                            |
| TESTOGEL® 25 mg Gel im Beutel                                | 25 -50mg täglich morgens                                                                                                                                             | 25,0                               | Testosteron / 2,5 g Beutel |
|                                                              |                                                                                                                                                                      |                                    |                            |

### 1.3.3. Hormonelle Kontrazeption und Hormonersatztherapie

#### 1.3.3.1. Hormonelle Kontrazeption auf Seiten der Frau

Die sogenannte „Hormonelle Kontrazeption“ auf Seiten der Frau bewirkt eine Schwangerschaftsverhütung für einen bestimmten Zeitraum. Die Funktionsweise einer hormonellen Verhütung liegt darin, die Eireifung und die Ovulation zu unterdrücken sowie die Gebärmutter gegenüber Spermien zu verschließen. Die Anwendung erfolgt individuell unter Berücksichtigung folgender Kriterien (Nutzen-Risiko-Abwägung): Sicherheit und geringes Nebenwirkungspotential sowie Zykluskontrolle (Vermeidung von Schmier- und Durchbruch-blutungen) und Praktikabilität. Neben der hormonellen Verhütungsmethode gibt es noch eine Vielzahl anderer Verhütungsmitteln mit unterschiedlichen Wirkprinzipien, wie die Sterilisation, die chemische und die mechanische Verhütung .

Wie bereits vorher schon beschrieben, ist die Liberation des LADME-Modells die Wirkstoff-Freisetzung aus einer Applikationsform.

Bei den *hormonellen Kontrazeptiva* unterscheidet man zwischen Präparaten, die eine *Estrogen-Gestagen-Kombination* enthalten oder nur aus einer *Gestagenkomponente* bestehen (Tab. 1.2.).

Die *Gestagenkomponente* ist für die Unterdrückung der LH-Ausschüttung verantwortlich. Möglicherweise beeinflusst sie auch den Eitransport und das Tuben-und Uterussekret. Eine Ovulationsunterdrückung könnte jedoch auch allein durch das verabreichte Gestagen erreicht werden (siehe „Minipille“).

Die *Estrogenkomponente* stabilisiert das Endometrium und verhindert Durchbruchblutungen sowie induziert die Expression von Progesteronrezeptoren als Voraussetzung für die Effektivität des Gestagens. Desweiteren beeinflusst es das Endometrium und das Zervikalsekret sowie die FSH-Sekretion und die Selektion eines dominanten Follikels.

Bei der Verordnung von Präparaten sollte darauf Acht gegeben werden, dass nur Mikropillen (die weniger als 50 µg Ethinylestradiol enthalten) verschrieben werden. Nur in Einzelfällen sollten auf höher dosierte Präparate ausgewichen werden, z.B. bei einer schlechten Zykluskontrolle [Forth et al. 2006].

#### 1.3.3.2. Hormonelle Kontrazeption auf Seiten des Mannes

Das Prinzip der hormonellen Kontrazeption des Mannes beruht auf der möglichst kompletten Suppression der Gonadotropine, um ein Erliegen der Spermatogenese und eine Azoospermie zu erreichen. Gleichzeitig wird das ebenfalls supprimierte Testosteron ersetzt. Das gelingt mit exogen verabreichtem Testosteron alleine bei Ostasiaten, jedoch bei Europäern nur in zwei Dritteln der Fälle. Europäern muss ein anderes Agens hinzugegeben werden. Testosteron in Kombination mit Gestagenen wird als Injektion oder Implantat derzeit mit dem Ziel der Zulassung klinisch geprüft. Da die Hemmung der Gonadotropine durch Steroide sehr gleichmäßige Serumspiegel verlangt, waren bisherige Versuche mit oralen oder transdermalen Präparaten nicht erfolgreich, und die männliche Kontrazeption wird zunächst nicht in Form einer Pille bestehen. Ein inhärenter Nachteil von hormonellen Methoden, die auf der Suppression der Spermatogenese beruhen, erscheint der relativ lange Wirkungseintritt zu sein. Die Erforschung anderer pharmakologischer Verfahren mit schnellerem Wirkungseintritt und schnellerer Reversibilität wird gegenwärtig von der Molekularbiologie und -genetik inspiriert. Ob und wann derartige Verfahren jedoch in die klinische Testung gehen, ist noch offen [Nieschlag 2005].

#### 1.3.3.3. Hormonersatztherapie (HET) auf Seiten der Frau

Die heutigen Kenntnisse über den Nutzen einer Hormonersatztherapie (HET) beginnend in der Prä-, Peri- oder Postmenopause zur Vermeidung von psychovegetativen, vasomotorischen und organischen Beschwerden, lassen eine möglichst breite Anwendung dieser Therapie in diesem Lebensabschnitt der Frau als sinnvoll und wünschenswert erscheinen. Dabei steht neben der Behandlung der klimakterischen Beschwerden die Prävention und Behandlung der Osteoporose [Draper u. Roland 1990], des kardiovaskulären Risikos, wie Atherosklerose und Herzinfarkt [Chen et al. 1998; Van Der Mooren et al. 1997; Fischl 1998 (a)] und der Leistungsminderung des Zentralnervensystems (inkl. des M. Alzheimer) [Paganini-Hill u. Henderson 1994] im Vordergrund.

Das natürliche Progesteron und seine Metaboliten haben neben den Estrogenen eine wesentliche Bedeutung für die physiologische Entwicklung und Funktion des Körpers und des Geistes der Frau.

Reproduktion ist ohne das natürliche Gestagen Progesteron nicht möglich. Mangel oder Fehlen führt zu einer Störung des Gleichgewichtes an den Estrogen- stimulierten Geweben, was letztendlich bis zur Karzinomentwicklung führen kann. Noch sind nicht alle Wirkungsbereiche des Progesterons und seiner Metaboliten bekannt, aber das Progesteron gewinnt in der HET, neben seinem protektiven Effekt auf das Endometrium immer mehr an Bedeutung in bezug auf andere Organe. In dieser Phase besteht die Substitutionsbehandlung aus der Gabe eines natürlichen Progesterons, entweder in der zweiten Zyklushälfte vom 16.–25. Zyklustag oder bei Bedarf auch schon etwas früher. Hinzu kommt noch die Verfügbarkeit von synthetischen Substanzgruppen, die von Retroprogesteron über 17 $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron-derivaten bis hin zu den 19-Nor-Progesteron und 10-Nor-Testosteron-Derivaten reichen. Diese synthetischen Gestagene haben neben ihrer progestativen Wirkung verschiedene Effekte auf Zielgewebe und auf Stoffwechselvorgänge.

*Es sollen hier kurz die wichtigsten neuen Erkenntnisse dargelegt werden:*

**Neurotrope Wirkung des Progesterons:** Bestimmte neurologische Erkrankungen kommen bei der Frau perimenopausal gehäuft vor oder zeigen einen geschlechtsspezifischen Verlauf. Eine Interaktion der Sexual-Steroide mit dem GABA-Rezeptor konnte nachgewiesen werden.

**Gestagene und Mamma:** Einfluß auf Mammakarzinom derzeit kontroversiell – Studien weisen sowohl stimulierenden, wie auch inhibierenden Effekt des Progesterons auf Mammatumoren (Proliferation) auf.

**Gestagene, Endometrium und Endometriose:** Führen am Endometrium zur Mitosehemmung, Verminderung der Estrogen- und Progesteronrezeptoren, wie auch zu Deindustrialisierung des Endometriums.

**Gestagene und Knochen:** Keine antagonistischen Effekte, positiv gegen Knochenabbau. Genauer Mechanismus wird noch diskutiert.

**Gestagene und Immunologie:** Progesteron führt abhängig von der Konzentration an der fetomaternalen Berührungsfläche zur direkten und indirekten Suppression der T-Zellreaktion. Progesteron wirkt synergistisch mit PG E2 immunsuppressiv. Die Interleukin 2-gesteigerte zelluläre Zytotoxizität wird unterdrückt. Progesteron unterdrückt eine Reihe von Proteinen z. B. PP14, das die Aktivität der T-Zellen und der natürlichen Killerzellen unterdrückt. Eine milde Estrogentherapie kann in diesem Abschnitt schon zusätzlich vonnöten sein. Durch die noch vorhandene Eigenproduktion kann es jedoch leicht zu erhöhten Estradiol (E2)-Werten kommen. Durch Kontrollen des Estradiol (E2)-Wertes unter der Substitution, etwa 4–6 Wochen nach Therapiebeginn, kann dies vermieden werden [Fischl 1998].

## *Therapiemöglichkeiten*

Als Therapie sowohl für die klimakterischen Beschwerden, wie auch als Osteoporoseprophylaxe und Therapie empfiehlt sich eine kombinierte HET mit konjugierten, oder mit veresterten oder mikronisierten 17 $\beta$ -Estradiolen, wobei die Osteoporoseprophylaxe spätestens drei Jahre nach der Menopause begonnen werden soll. Ebenso sollte die Therapie unbedingt über einen längeren Zeitraum (zu empfehlen sind etwa zwischen 5 und 10 Jahre) durchgeführt werden. Gerade hierbei ist eine differenzierte HET von äußerster Wichtigkeit, d. h. die Therapie muß der einzelnen Frau angepaßt werden, die Estradiol-Werte müssen unter der Therapie anfänglich kontrolliert werden, ob sie sich im therapeutischen Bereich bewegen. Als therapeutischen Bereich sehen wir heute Werte zwischen 60 und 150 pg/ml Estradiol (E2) an.

Die subjektive Bewertung der Besserung der Beschwerden, wie heute noch vielfach als alleiniges Kriterium genommen, ist zu wenig. Eine Unterdosierung ist besonders für die Osteoporoseprophylaxe sinnlos, eine Überdosierung kann paradoxe Beschwerden auslösen, die ohne Hormonkontrollen zu einer falschen Korrektur der Therapie führen kann [Fischl 1998]. Bei einer Überdosierung bzw. Langzeitbehandlung steht außerdem ein geringfügig erhöhtes Mammakarzinomrisiko in Diskussion [Tavani et al. 1997] desweiteren erhöhtes Risiko für Endometriumkarzinom (3-5fache) [Smith DC et al. 1975] und Venenthrombose sowie Lungenembolie (3-3,5fache) [Jick et al. 1996].

## *Präparatewahl*

Bei der Präparatewahl ist zu berücksichtigen, in welchem Abschnitt des Klimakteriums sich die Frau befindet, ob sie noch blutet oder nicht, wie weit sie eine wieder auftretende Blutung akzeptiert oder nicht, wobei gesagt werden muß, daß eine Langzeit-HET ohne mögliches Auftreten von Blutungen noch immer nicht befriedigend gelöst ist. Dies ist auch eine der Hauptursachen, warum oftmals ohne Rücksprache mit dem betreuenden Arzt die HET von den Frauen selbst abgebrochen wird.

Die Hormonsubstitution kann oral, transdermal (Pflaster, Gel), vaginal durch örtliche Anwendung (Scheidenovula, Salben), parenteral (intramuskulär) oder als Kristall (Depotpräparate) verabreicht werden (siehe dazu Tab.1.3.).

Grundsätzlich muß jede Estrogensubstitution bei vorhandenem Uterus mit einem Gestagen kombiniert werden. Estrogene wirken proliferativ am Endometrium. Die Gestagengabe folgt den natürlichen Gegebenheiten im normalen Zyklus, vermeidet die Hyperplasie und beugt somit dem Endometriumkarzinom vor. Dies gilt nicht für hysterektomierte Frauen und für die Gabe von Estriolpräparaten, die im wesentlichen nur lokale Wirkung haben [Fischl 1998].

#### 1.3.3.4. Hormonersatztherapie (HET) auf Seiten des Mannes

Hormonelle Veränderungen in Abhängigkeit vom Alter treten nicht nur bei Frauen, insbesondere während der Menopause, auf, sondern auch bei Männern. Aufgrund des langsam stattfindenden Rückgangs der Androgenproduktion beim alternden Mann ist es viel schwieriger, hormonell bedingte Veränderungen festzustellen und gezielt zu therapieren. Bei Frauen ist eine Androgentherapie nicht immer mit unerheblichen Nebenwirkungen (Virilisierung, Proliferationshemmung des Endometriums etc.) verbunden. Daher wird diese derzeit kontrovers beurteilt [Fischl 2001].

Die partielle Testosteronreduktion wurde mit verschiedenen Begriffen, wie PADAM (partial androgen decline in aging males) oder ADAM (androgene decline in aging males), ausgestattet. Allen Begriffen gemeinsam ist die Differenzierung zwischen dem symptomatischen „andropausalen Syndrom“ und dem asymptomatischen biochemischen und physiologischen Zustand des verminderten Testosteronspiegels. Ein lang anhaltender Androgenmangel kann, muß aber nicht beeinträchtigend auf Muskel, Knochen, ZNS und Lipidstoffwechsel wirken [Tan u. Culbertson 2003]. Der Testosteronabfall verläuft nämlich beim Mann sukzessiv. Da genaue Kenntnisse über altersgemäße Grenzwerte fehlen, ist eine Hormonsubstitution von Unsicherheit geprägt.

Der Normalbereich für das Gesamt-Testosteron bei gesunden erwachsenen Männern reicht von 12 bis 35 nmol/L und ist nach dem 50. Lebensjahr einem jährlichen Abfall von ca. 1% unterworfen. Nur wenn die Werte unter 12 nmol/L absinken und gleichzeitig klinische Symptome des Hypogonadismus wie Rückbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale, Veränderung der Körperzusammensetzung, Schwächegefühl, Kraftlosigkeit, Libido-Abnahme, erektile Dysfunktion etc. auftreten, ist die Testosteronanwendung indiziert. Von der 7 mg Testosteron-Tagesproduktion liegen nur 0,25 mg in freier, biologisch aktiver Form vor. Diese Menge reicht aus, um androgene Effekte an den Rezeptorstellen zu vermitteln, während sich der Hauptteil mit Albumin und Sexual-Hormon-bindendem Globulin zu einem Reservepool verbindet [ÖAZ Aktuell; Ausgabe 12/2003].

#### 1.3.4. Substitution von Schilddrüsenpräparaten

Die Therapie der Hypothyreose besteht in der lebenslangen Substitution mit Schilddrüsenpräparaten wie L-Thyroxin (ca. 1,5 – 2,0 µg pro kg KG/d) [Herold 2004]. Die Hypothyreose wird üblicherweise als verminderte Schilddrüsenhormonwirkung definiert. Dem hormonellen Defizit können ätiologisch unterschiedliche Krankheitsbilder zugrunde liegen. Nach dem klinischen Ausmaß der Unterfunktion werden folgende Stadien unterschieden: latente oder subklinische Hypothyreose (TSH↑, fT3 + fT4 noch normal), manifeste Hypothyreose (TSH↑, fT3↓, fT4↓) und die hypothyreote Krise (Myxödem, klinische Beurteilung) [Steinbeck u. Paumgartner 2005]. Von der erwachsenen europäischen Bevölkerung leidet ca. 1-2% an einer Schilddrüsenunterfunktion, wobei das Geschlechterverhältnis von Frauen zu Männern 4:1 beträgt.

Eine subklinische Hypothyreose haben ca. 7,5% der Frauen und 2,8% der Männer [Berdel et al. 2004]. Die Beschwerden bei der Hypothyreose werden durch den Mangel an Schilddrüsenhormonen an den verschiedenen Organen des Körpers hervorgerufen. Es kommt zu einer Verlangsamung des Stoffwechsels mit Antriebsarmut, Müdigkeit, Kälteempfindlichkeit, teigiger Haut und brüchigem Haar, Obstipation, rauher heiserer Stimme, Bradykardie, Hypotonie, Anämie sowie zur Einschränkung der Fruchtbarkeit, Libido und Potenz [Herold 2004].

Die Zahl der Schilddrüsenmalignome steigt mit dem Alter an. Die Symptome, die mit den Schilddrüsenenerkrankungen einhergehen, können denen des Klimakteriums ähnlich sein, und deshalb ist es klinisch schwierig, zwischen den Schilddrüsen- und den klimakterischen Symptomen zu unterscheiden. Es ist wichtig zu betonen, daß sogar leichte Schilddrüsenveränderungen bereits mit erheblichen Problemen, wie depressive Verstimmung, Störung der geistigen Leistungsfähigkeit und Gedächtnisschwund, verbunden sein können. Die Myokardfunktion kann eingeschränkt sein, es besteht in diesen Fällen ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko. Diese ungünstigen Effekte können durch eine Hormontherapie entsprechend verbessert oder korrigiert werden [Schindler 2003].

Einerseits sind Schilddrüsenhormone (z. B. L-Thyroxin) essentiell für das normale Knochenwachstum und die normale Knochenstruktur, andererseits wirken sich erhöhte Schilddrüsenhormone ungünstig auf den Knochen aus. Der ungünstige Effekt erhöhter Schilddrüsenwerte wirkt sich besonders negativ aus, wenn die TSH-Werte stark supprimiert sind [Avioli 1993]. Bei sehr stark TSH-supprimierender Schilddrüsenhormonsubstitution ist mit einem Knochendichteverlust zu rechnen. Bei Untersuchungen hatten Schilddrüsenhormonanwenderinnen eine signifikant verringerte Knochendichte am Radius, der gesamten Hüfte und im Lendenwirbelsäulenbereich. Die Differenz zu Frauen ohne Hormoneinnahme betrug entsprechend 3,8 %, 3,3 % und 3,2 %. Ethnische Unterschiede scheinen nicht zu bestehen [Schneider et al 1994]. Bei Langzeittherapie bzw. nicht TSH-supprimierender L-Thyroxin-Behandlung bei Struma und Hypothyreose war nur mit einer geringen Verminderung der Knochendichte zu rechnen [Hadji et al. 2000]. Grad und Umfang der Knochendichte bei Hyperthyreose übertrifft jedoch den Effekt der Menopause. Die Ursache der Hyperthyreose spielt dabei für den Grad der Osteoporose keine Rolle [Jodar et al. 1997]. Einige Studien haben bestätigt, daß eine L-Thyroxin-Behandlung mit stark herabgesetzten TSH-Werten den postmenopausalen Knochenverlust steigert [Williams 1997].

Die Hypothyreoseinzidenz nimmt im Alter generell zu: Die Colorado Thyroid Disease Prevalence Study zeigte für etwa 15% von total 25.862 untersuchten Frauen in der Peri- oder Postmenopause deutlich erhöhte Werte des Schilddrüsensteuerhormons TSH [Canaris et al. 2000] und damit Anzeichen einer beginnenden Schilddrüsenunterfunktion.

Die Indikation zu einer LT<sub>4</sub>-Substitution bei Patientinnen mit subklinischer Hypothyreose wird kontrovers diskutiert. TSH-Werte von über 10 mU/L gelten bereits als Schwellenwert für eine Supplementierung mit Schilddrüsenhormonen. Bei TSH-Messwerten zwischen 5 und 10 mU/L ist eine zweite Labormessung zur Bestätigung der Dysfunktion neben einer Abklärung der Hypothyreosenursache angezeigt. Eine Substitutionsbehandlung ist trotz leicht-gradiger TSH-Erhöhung bei Frauen mit einer vergrößerten Schilddrüse, bei bekannter koronarer Herzkrankheit oder bei symptomatischem Verlauf gegeben [Meier 2007]. Weiterhin ist zu beachten, daß Frauen mit einer Hypothyreose, die mit L-Thyroxin behandelt werden, eine Änderung von freiem Thyroxin und TSH mit einer Estrogenbehandlung erfahren.

Dies ist durch eine Steigerung des Thyreotropin-Bindungsglobulins (TBG) bedingt. Erhöhte Bindung von Thyroxin und TBG führt über Feedback zur Erhöhung von TSH [Schindler 2003]. Die Adaptation ist ungenügend, so daß mehr Thyroxin notwendig wird. Deshalb sollte bei Frauen mit Hypothyreose, die eine Hormonersatztherapie anwenden, eine TSH-Kontrolle 12 Wochen nach Therapiebeginn durchgeführt werden [Arafah 2001]. Es kann festgestellt werden, daß eine Langzeitbehandlung mit Hormonen im Klimakterium bei euthyreoten Frauen zu keiner Änderung der Schilddrüsenfunktion führt [Foth u. Roemer 1999].

Eine Kontrolle der Schilddrüsenhormone im Sinne eines case-findings im 5-jährlichen Abstand ist bei Frauen mit Verdacht auf subklinische Störungen angezeigt, und in jedem Fall bei Frauen, die zuvor Schilddrüsenhormone einnahmen und neue mit oraler HET starten. Eine Substitutionsbehandlung mit Schilddrüsenhormonen sollte auch bei nur leichtgradiger TSH-Erhöhung bei Frauen und Männer mit einer vergrößerten Schilddrüse, bei bekannter koronarer Herzkrankheit oder bei symptomatischem Verlauf erfolgen [Meier 2007].

Tab.1.5.: Präparateauswahl der oralen Applikationsform der Schilddrüsenhormon-Substitution [AGES Fachinfo]:

| ORALE APPLIKATION / SCHILDDRÜSENHORMONPRÄPARATE |                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                 |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Handelsname                                     | Dosierung, Art und Dauer der Anwendung                                                                                                                                                                                                                                 | Arzneistoff-Gehalt in mg                                                                                        |
| Combithyrex mite – Tabletten                    | Dosis individuell, Primäre und sekundäre Hypothyreosen: Beginn: 1/2 bis 1 Tablette; Erhaltungsdosis: 2 - 4 Tabletten<br>Euthyreote Strumen: 2x1 Tabl. täglich, nach 2 Wo. bis zu 4 Tabl. täglich                                                                       | 0,050 Levothyroxin-Natrium (T4)<br>0,125 Liothyronin-Natrium (T3)<br>(zusammen 62,5 Mikrogramm)                 |
| Combithyrex forte – Tabletten                   | Dosis individuell, Primäre und sekundäre Hypothyreosen: Beginn: 1/4 - 1/2 Tablette; Erhaltungsdosis: 1 - 2 Tabletten<br>Euthyreote Strumen: 1x1 Tabl. täglich, nach 2 Wo. bis zu 2 Tabl. täglich                                                                       | 0,100 Levothyroxin-Natrium (T4)<br>0,250 Liothyronin-Natrium (T3)<br>(zusammen 125 Mikrogramm)                  |
| Euthyrox® 25 µg- 200 µg - Tabletten             | Hypothyreose: Beginn: 25-50 µg, Erhaltungsdosis: 100-200 µg<br>Euthyreote Strumen: 75-200 µg                                                                                                                                                                           | 0,025 – 0,200 Levothyroxin-Natrium (T4) / Tablette                                                              |
| Iodthyrox - Tabletten                           | Struma und Jodmangel<br>Beginn: 1/2 Tablette täglich. Erhaltungsdosis: 1x1 Tabl.                                                                                                                                                                                       | 0,100 Levothyroxin-Natrium<br>0,131 Kaliumiodid (0,100 Jod)                                                     |
| Lymphomyosot- Tabletten (Homöopathische Arznei) | 3x täglich 3 Tabletten                                                                                                                                                                                                                                                 | 0,015 D12 Levothyroxin zusammen mit anderen Bestandteilen                                                       |
| Lymphomyosot- Tropfen (Homöopathische Arznei)   | 3x täglich 15-20 Tropfen                                                                                                                                                                                                                                               | 5,0 D12 Levothyroxin zusammen mit anderen Bestandteilen                                                         |
| L-Thyroxin „Henning“ 50 µg Tabletten            | Hypothyreose: Beginn: 25-50 µg, Langzeittherapie: 100-200 µg<br>Prophylaxe einer Rezidivstruma: Beginn: 50-75 µg, Langzeittherapie: 75-200 µg<br>Euthyreote Strumen: 75-200 µg                                                                                         | 0,050 Levothyroxin-Natrium.                                                                                     |
| Novothyral- Tabletten                           | Hypothyreose: Beginn: 1/2 Tablette täglich, 14 Tage lang. Steigerung in 2-wöchigen Intervallen um jeweils 1/2 Tablette bis zum Erreichen der Erhaltungsdosis.<br>Erhaltungsdosis: 1/2 - 2 Tabletten täglich; Lebenslang<br>Euthyreote Struma: 1/2 - 1 Tablette täglich | 0,100 Levothyroxin-Natrium (T4, L-Thyroxin-Natrium)<br>0,020 Liothyronin-Natrium (T3, L-Triiodthyronin-Natrium) |
| Thyrex 25 -160 µg -Tabletten                    | Hypothyreose: Beginn: 25-50 µg, Erhaltungsdosis: 100-300 µg<br>Euthyreote Strumen: 100 µg, nach 2 Wo. auf 200 µg täglich                                                                                                                                               | 0,025 – 0,200 Levothyroxin-Natrium (T4) / Tablette                                                              |

## 2. Metabolismus

Lipophile Substanzen können aus dem Körper nur schlecht ausgeschieden werden, da sie in der Niere immer wieder rückresorbiert werden. In der Evolution wurden daher Enzymsysteme entwickelt, welche lipophile Fremdstoffe in hydrophile Substanzen transformieren. Die Generierung leicht ausscheidbarer Stoffe wird als Biotransformation bzw. als Metabolismus bezeichnet. Sie findet überwiegend in der Leber statt und in geringem Maße auch in anderen Organen. Die an der Biotransformation beteiligten Enzyme sind in der Lage, ein großes Spektrum unterschiedlicher Substrate umzusetzen. Man unterscheidet drei Phasen der Biotransformation [Efferth 2006]:

Phase-1-Reaktionen sind Funktionalisierungsreaktionen. Sie führen funktionelle Gruppen (zum Beispiel eine Hydroxylgruppe) in das unpolare Molekül ein oder legen entsprechende funktionelle Gruppen frei. Wichtige Phase-1-Reaktionen sind Oxidation, Reduktion, Hydrolyse und Hydratisierung [Schwab et al. 2002]. Phase-II-Enzyme binden Phase-I-Produkte an Trägersubstanzen, um sie zu detoxifizieren [Efferth 2006]. Phase-2-Reaktionen sind Konjugationsreaktionen, bei denen funktionelle Gruppen mit sehr polaren, negativ geladenen endogenen Molekülen (zum Beispiel Glucuronsäure) gekoppelt werden. Wichtige Phase-2-Reaktionen sind die Glukuronidierung, Sulfatierung, Methylierung, Acetylierung sowie die Konjugation mit Aminosäuren und Glutathion [Schwab et al. 2002]. Phase-III-Proteine transportieren dann diese Konjugate [Efferth 2006].

| PHASE I                                                                                                                                                                                                                                     | PHASE II                                                                                                                                                        | PHASE III                                                                                                                                        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Oxidasen:</b><br><br>Cytochrom-P450-Monooxygenasen<br>Peroxidasen etc....<br><br><b>Reduktasen:</b><br><br>NADPH-Cytochrom-P450-Reduktasen<br>Aldo-Ketoreduktasen<br><br><b>Hydrolasen:</b><br><br>Esterasen<br>Epoxidhydrolasen etc.... | <b>Glutathion-S-Transferasen</b><br><br><b>UDP-Glucuronyltransferasen</b><br><br><b>Sulfotransferasen</b><br><br><b>Catechol-O-Methyltransferase</b><br>etc.... | <b>ABC-Transporter</b><br><br><b>Organische Anionentransporter</b><br><br><b>Organische Kationentransporter</b><br><br><b>Andere Transporter</b> |

Tab. 2.1.: Überblick über die wichtigsten Vertreter der Phase-I-bis-III-Proteine der Biotransformation [Efferth 2006 / modifiziert].

## 2.1. Phase-I- Enzymsysteme

### 2.1.1. Das Cytochrom-P<sub>450</sub>-Enzymsystem (CYPs)

Phase-I-Enzyme (Tab. 2.1.) konvertieren die zellulär aufgenommenen Substanzen zu nukleophilen (z.B. Phenole und Polyphenole) oder elektrophilen Verbindungen (Chinone, Epoxide).

Eines der wichtigsten Phase-I-Enzymsysteme sind die Cytochrom-P<sub>450</sub>-Monooxygenasen (siehe auch Abschn. 3.2.1.1.6. CYP<sub>450</sub>- Monooxygenasen). Sie oxidieren Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefelatome in Molekülen zu hydroxylierten Metaboliten. Typische Reaktionsprodukte sind die instabilen Epoxide, welche leicht mit der DNA reagieren oder stabile hydroxylierte Verbindungen, welche durch Transferasen weiter konjugiert werden. Hydroxylgruppen entstehen auch infolge Katalyse durch Flavin-abhängige Monooxygenasen, Aldehyd- und Aminoxidasen sowie Esterasen.

Die NADPH-Cytochrom-P<sub>450</sub>-Reduktase (CPR) bzw. NADPH-Chinon-Oxidoreduktase (NQO) (Abschn. 3.2.1.1.5.) und verschiedene Peroxidasen wandeln nukleophile in elektrophile Verbindungen um und umgekehrt. Zum Beispiel die im Metabolismus so gebildeten Chinone von Steroiden wie Estrogenen können enzymatisch zu ihren entsprechenden Catecholen reduziert werden und durch anschließender Autoxidation mit O<sub>2</sub> oder ebenfalls enzymatisch (CYPs, Peroxidasen) wiederum zu Chinonen entstehen [Liehr 1990]. Nukleophile Stoffe werden von UDP-Glucuronyl-Transferasen (UGTs) und Sulfotransferasen (SULTs) konvertiert, elektrophile Substanzen hingegen durch Glutathion-S-Transferasen (GSTs) [Efferth 2006].

Die Leber ist das Organ mit dem höchsten P<sub>450</sub>-Enzymgehalt des Organismus. Sie enthält 90 bis 95 % der P<sub>450</sub>-Enzyme. 60 bis 65 % des P<sub>450</sub>-Gehalts der Leber entfallen auf die Enzyme, die den Arzneimittelmetabolismus katalysieren. Mit durchschnittlich 30 % des P<sub>450</sub>-Gehalts ist die CYP3A-Subfamilie das wichtigste Cytochrom P<sub>450</sub>. Mindestens 50 bis 60 % aller therapeutisch eingesetzten Arzneistoffe sind CYP3A-Substrate. Die Isoform CYP1A2 macht etwa 10 %, die CYP2C-Familie etwa 30 %, CYP2A6, CYP2B6 und CYP2D6 zusammen etwa 10 bis 15 % und CYP2E1 ungefähr 5 % des P<sub>450</sub>-Gehalts aus [Lang et al. 2001]. Für alle P<sub>450</sub>-Enzyme gilt, dass deren hepatische Expression individuell sehr variabel ist. Ursächlich können diese Unterschiede aber bisher nur für einige CYP-Enzyme durch Mutationen in den kodierenden Gensequenzen beziehungsweise in der Promotorregion erklärt werden [Ingelman-Sundberg et al. 1999]. Die enzymatischen Aktivitäten verschiedener Zellen können aber sehr unterschiedlich sein [Guengerich, 1995].

Bei den Cytochrom-P<sub>450</sub>-Enzymen handelt es sich um ubiquitäre Enzyme, die in Bakterien, Pflanzen und Tieren vorkommen. Die bisher nahezu 500 bekannten Cytochrom-P<sub>450</sub>-Gene haben sich in der Evolution aus einem gemeinsamen Vorläufergen entwickelt, das vor 3 bis 3,5 Milliarden Jahren entstanden sein dürfte. Von den 14 bei Säugetieren vorkommenden CYP-Genfamilien sind beim Menschen 20 Subfamilien nachgewiesen worden. Insgesamt sind zurzeit 39 funktionelle menschliche CYP-Enzyme bekannt. Die für den Arzneimittelstoffwechsel relevanten zwölf Isoformen gehören sieben Subfamilien der Genfamilien 1, 2 und 3 an [Schwab et al. 2002].

Für den oxidativen Phase-1-Metabolismus sind die CYP-Enzyme, die in der Membran des endoplasmatischen Retikulums der Zelle verankert sind, von zentraler Bedeutung.

Der Name Cytochrom-P450 leitet sich davon ab, dass das Cytochrom im reduzierten Zustand ein Kohlenmonoxid-Differenzspektrum mit einem Absorptions-Maximum bei 450 nm zeigt [Schwab et al. 2002]. Die Einteilung der Gene in Genfamilien, Subfamilien und innerhalb einer Subfamilie in die entsprechenden Isoformen erfolgt aufgrund der Sequenzhomologie. Als Abkürzung für Cytochrom P<sub>450</sub> wird dabei CYP verwendet [Rendic u. Di Carlo 1997] (Abb. 2.1.).

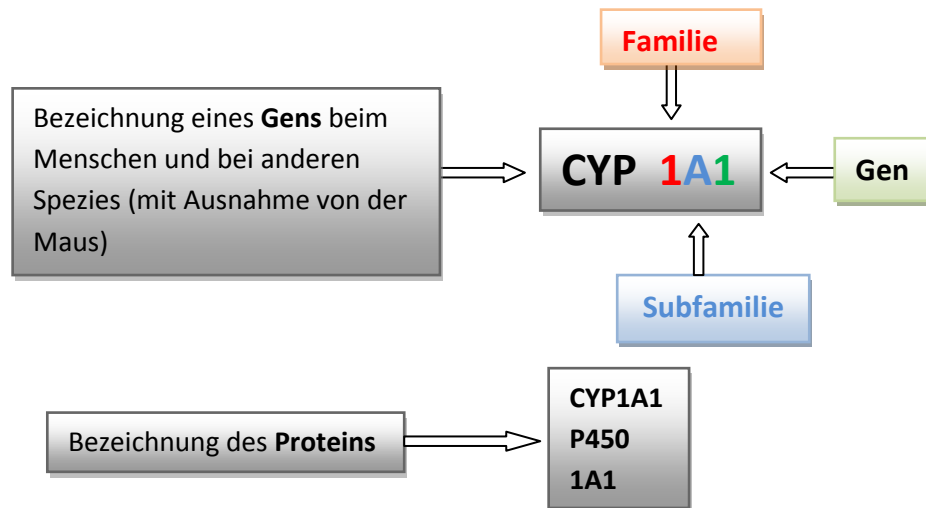


Abb. 2.1.: CYP-Enzym-Nomenklatur [Guengerich 1995 / modifiziert]

Charakteristisch für die am Arzneimittelmetabolismus beteiligten CYP-Enzyme ist ihre breite Substratspezifität, so dass Arzneistoffe mit sehr unterschiedlicher chemischer Struktur durch ein Enzym verstoffwechselt werden können. Häufig ist ein Arzneistoff Substrat für mehrere P<sub>450</sub>-Enzyme. Dabei entstehen aus dem Arzneistoff dann unterschiedliche Metabolite oder der gleiche Metabolit wird durch mehrere P<sub>450</sub>-Enzyme gebildet [Schwab et al. 2002].

Diese reaktiven Metaboliten reagieren dann mit Proteinen (DNA und RNA) und können auf diese Weise Radikale bilden, die ihrerseits wieder Kettenreaktion initiieren (Abschn. 3. Grundlagen und Entstehung von ROS). Durch diesen sog. „Primärschäden“ entstehen DNA-Addukte, welche zu Mutationen bzw. Proteinaddukten und zu vielfältigen Funktionsschäden mit Cytochrom P<sub>450</sub> (Suizidreaktion) führen [Bursch 2009].

Die Struktur der CYP-Isoenzyme ist charakterisiert durch ein Häm B, als prosthetische Gruppe, dessen Stickstoffatome die vier äquatorialen Koordinationsstellen des oktaedrischen Eisen-Komplexes besetzen (Abb. 2.2.). Während die fünfte axiale Position durch die SH-Gruppe eines Cystein belegt ist, wird die sechste Koordinationsstelle variabel besetzt. Im substratgebundenen Zustand ist an dieser Stelle der für die Monooxygenierung benötigte Sauerstoff gebunden [Höll 2002].

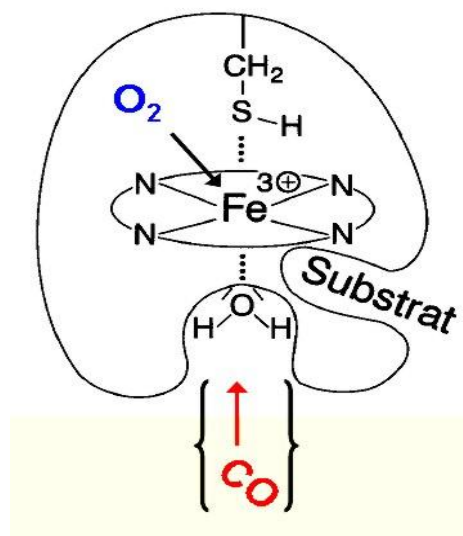


Abb.2.2.: Struktur des Cytochrom P450, ein Häm-Eisen-Thiolat-Protein [Bursch 2009].

### 2.1.2. Polymorphismen und unterschiedliche Metabolisierung

Bei der Metabolisierung von Pharmaka können in einigen Fällen Reaktionsprodukte mit erhöhter Toxizität oder Mutagenität entstehen. Man schätzt, dass polymorphe Formen der CYP-Gene für etwa die Hälfte der schweren Nebenwirkungen verantwortlich sind. Andererseits sprechen viele Patienten auf Grund solcher CYP-Polymorphismen auf Medikamente, die durch Cytochrom-P450-Enzyme metabolisiert werden, ungenügend oder gar nicht an [Efferth, 2006]. Die Ausstattung an Cytochrom P450-Enzymen differiert von Mensch zu Mensch. Zum einen sind es die abweichenden Konzentrationen, mit denen die einzelnen Enzyme in unserem Körper vorliegen. Zum anderen sind es die Polymorphismen, die abweichendes metabolisches Verhalten zwischen einzelnen Individuen zeigen. Intensiv wurden diese Differenzierungen für die Isoformen CYP2D6, CYP2C9 und CYP2C19 untersucht. In 1-3% der kaukasischen Bevölkerung („Menschen mit weißer Hautfarbe“) fehlt z.B. CYP2C9. Diese Menschen haben Probleme bei der Verstoffwechselung von S-Warfarin und Codein, Tramadol und Losartan werden nicht aktiviert [Klebe 2009].

Die Zunahme der Enzymmenge wird als Auto-Induktion bezeichnet und ist dafür verantwortlich, dass die Dosis gesteigert wird, um eine therapeutische Wirkung zu erzielen. Dabei ist festzuhalten, dass die Gabe eines Arzneistoffes, der zur Auto-Induktion von CYP<sub>450</sub>-Enzymen führt, nicht alle CYPs in gleicher Weise induziert und zudem das Ausmaß der Induktion individuell sehr unterschiedlich ist. Die Entdeckung pharmakogenetischer Faktoren, die an der Regulation und Expression der CYP450-Enzyme beteiligt sind, erklärt, warum Wirkungen und Nebenwirkungen von Medikamenten ausgeprägte individuelle Unterschiede zeigen [Schwab et al. 2002].

Eine Korrelation zwischen genetischer Variabilität und Wirkstoffmetabolismus zeigt sich anhand eines am besten untersuchten Beispiels: „Der Abbau des Antihypertensivums Debrisochin zu 4-Hydroxydebrisochin“. Die kaukasische Bevölkerung metabolisiert diesen Arzneistoff über CYP2D6 und teilt sich in langsame, extensive und ultraschnelle Metabolisierer. Bei der Verordnung dieses Präparates kommen extensive Metabolisierer gut mit einer Standarddosis zurecht. Dagegen wird sich unter dieser Dosis für die langsamen Metabolisierer ein zu hoher Plasmaspiegel einstellen, was zu Nebenwirkungen führen kann. Ultraschnelle Metabolisierer erreichen kaum den für eine Therapie erforderlichen Spiegel, die gewünschte Wirkung des Präparates bleibt aus.

Entscheidend für die metabolische Effizienz ist nicht der Genotyp, d.h. die individuelle genetische Ausstattung an codierten Proteinen, sondern die tatsächlich exprimierte Menge eines Proteins. Sie bestimmt das Erscheinungsbild, d.h. den Phänotyp. Zusätzlich kann dieser Phänotyp mit den Lebensgewohnheiten und dem gesundheitlichen Zustand eines Menschen schwanken [Klebe 2009]. So können neben den diskutierten genetischen Faktoren Umwelt, Nahrung, Genussmittel und Medikamente die Aktivität und Menge der CYP<sub>450</sub>-Enzyme beeinflussen [Bock et al. 1994].

Die Enzymfamilie CYP 17 und CYP 19 sind bei der Estradiolbiosynthese Schlüsselenzyme, bei denen Polymorphismen beider Gene in der Population nachgewiesen worden sind; Frauen, die für einen bestimmten CYP17-Polymorphismus hetero- oder homozygot sind, weisen hohe Estradiol-Spiegel auf [Forth et al. 2009]. Durch zwei gemeinsame Polymorphismen (T3801C und A2455G) im CYP1A1-Gen kommt es durch eine Erhöhung der Enzymaktivität zu einer schnellen Anhäufung von Metaboliten, wie Catecholestrogen. Diese Metaboliten scheinen krebserregende Wirkung zu haben. Ein Zusammenhang zwischen CYP1A1-Varianten und einem erhöhten Brustkrebsrisiko konnte weder eine Metaanalyse von 17 Studien [Justenhoven et al. 2007, Breast Can Res Treat Epub] noch andere neuere Studien [Masson et al. 2005, Am J Epidem 161:901, Cheng et al. 2007, J Hum Genet 52: 423] aufzeigen. Eine weitere Studie [Rebbeck et al. 2007, Can Epid Biom Prev 16:1318] zeigte keinen Zusammenhang zwischen den CYP1A1-Varianten und einem erhöhten Brustkrebsrisiko unter Hormonersatztherapie [Busse 2009]. Des Weiteren ist die abweichende Ausstattung mit CYP1A2 dafür verantwortlich, dass auf Coffein individuell sehr unterschiedlich reagiert wird. Auch für die Enzymfamilie CYP3A4 sind mehrere polymorphe Formen beschrieben worden [Klebe 2009]. Diese am häufigsten beim Menschen vorkommende CYP<sub>450</sub>-Enzymfamilie schließt die vier Isoformen CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 und CYP3A43 ein [Eichelbaum u. Burk 2001]. Zumindest 50 % aller eingesetzten Arzneistoffe werden über CYP3A4/A5 verstoffwechselt. Diese Enzymfamilie spielt auch eine wesentliche Rolle beim oxidativen, peroxidativen und reduktiven Metabolismus endogener Steroide (zum Beispiel Estrogene).

Für die CYP3A4-Expression in der Leber findet sich eine über 50-fache Variabilität, woraus eine bis zu 20-fache unterschiedliche Arzneimittel-Clearance für CYP3A4/5-Substrate resultiert [Ozdemir et al. 2000]. Die bisher gefundenen Mutationen sind selten und haben keine dramatischen Änderungen der Enzymfunktion zur Folge. Allerdings weisen Untersuchungen an eineiigen Zwillingen darauf hin, dass 60 bis 80 % der Variabilität im CYP3A4-Metabolismus auf genetische Faktoren zurückzuführen sind [Ozdemir et al. 2000]. Diese Daten lassen sich dahingehend interpretieren, dass an der Regulation der CYP3A-Expression mehrere Gene beteiligt sind [Eichelbaum u. Burk 2001].

## 2.2. Phase-II- Enzymsysteme

### 2.2.1. Glutathion-S-Transferasen (GSTs)

Glutathion-S-Transferasen gehören zur Familie von Phase-II-Detoxifikationsenzymen, welche zelluläre Makromoleküle (DNA, Proteine, Lipide) vor reaktiven elektrophilen Molekülen schützen. Solche reaktiven Sauerstoff-Moleküle ROS (reactive oxygen species: siehe Abschn. 3.2.2. „Wichtigste Vertreter reaktiver Sauerstoffspezies“) können endogen, während des mitochondrialen Elektronentransportes und Entzündungsvorgängen, oder exogen, bei UV-Bestrahlung und Fremdstoff-Metabolismus entstehen. Die GSTs sind zusammen mit Glutathion in der Evolution entstanden und sie werden zu drei unterschiedlichen Superfamilien zugeordnet. GSTs katalysieren die Reaktion von Glutathion mit Elektrophilen, welche zur Bildung entsprechender Glutathionkonjugate führt.

Dabei wird reduziertes Glutathion (GSH) deprotoniert. Diese Glutathion-Konjugate werden mittels MRPs (multidrug resistance-associated proteins) aus der Zelle transportiert.

Die zelluläre Kapazität zur Detoxification von Elektrophilen hängt daher maßgeblich auch von den Glutathion-generierenden Enzymen Glutamat-Cystein-Ligase und Glutathion-Synthase ab. Glutathion-S-Transferasen metabolisieren nicht nur Nebenprodukte des oxidativen Stresses, sondern auch Antitumor-Medikamente, Insektizide und Herbizide. Die verschiedenen Isoenzyme sind resistent gegenüber Karzinogene und Umweltgiften. Andere Stoffe werden durch Cytochrom-P<sub>450</sub>-Monooxygenasen metabolisiert und dienen anschließend als GST-Substrate. Die GST-Induktion stellt eine Antwort auf chemischen Stress durch Elektrophile und ROS dar [Efferth 2006].

### 2.2.2. Uridin-5'-diphosphoglucuronyltransferasen (UDPs)

Die Uridin-5'-diphosphoglucuronyltransferasen (UDPs) bzw. UDP-Glucuronyltransferasen (UGTs) sind im endoplasmatischen Reticulum lokalisiert und katalysieren den Transfer der Glucuronsäure von UDP-A-D-Glucuronsäure auf eine Vielzahl strukturell verschiedener Moleküle mit Hydroxyl-, Carboxyl-, Amin- oder Thiolgruppen [Efferth 2006].

Die Glucuronidierung ist ein essentieller Mechanismus zur Inaktivierung und Eliminierung von endogenen Substanzen (z.B. Bilirubin, Gallensäuren, Retinoide oder Steroide), aber auch von vielen exogen zugeführten Stoffen wie Umweltschadstoffe, sekundäre Pflanzenstoffe (Flavonoide, Sapogenine) oder Arzneimittel (Opioide, Antihistaminika, Antidepressiva oder nicht-steroidale antiinflammatorische Arzneimittel) [King et al. 2000]. Diese Konjugationsreaktion benötigt als Cosubstrat Uridin-5'-diphosphoglucuronsäure (UDPGA) und wird durch Uridin-5'-diphosphoglucuronyltransferasen (UGTs) katalysiert. Dabei wird die Glucuronylgruppe des UDPGA im Rahmen einer nukleophilen Substitution (SN<sub>2</sub>) auf nukleophile Gruppen wie Sauerstoff (Hydroxylgruppen, Carbonsäuren), Stickstoff (Amine), Schwefel (Thiole) oder Kohlenstoff übertragen. Die Reaktionsprodukte sind dabei das  $\beta$ -D-Glucuronid und Uridin-5'-diphosphat (UDP) (Abb. 2.3.).

Da die Glucuronsäure die Struktur der Substrate ändert, wird auch ihre biologische Aktivität beeinflusst, in dem z.B. das Binden an einen Rezeptor verhindert wird [Guillemette et al. 2004]. Auf Grund der Bildung von polaren Metaboliten führt die Glucuronidierung zur Ausschleusung von Substanzen in Galle oder Urin. Die meisten humanen UGTs werden in der Leber exprimiert, sie kommen aber auch an allen Eintrittsstellen von Xenobiotika, wie z.B. im Darm, in der Haut, der Lunge oder im Epithel der Nasenmucosa vor. Darunter gibt es Isoformen, die ausschließlich in extrahepatischen Geweben exprimiert werden und nicht in der Leber, z.B. UGT2A1 im Nasenepithel oder UGT1A7, UGT1A8 bzw. UGT1A10 im Gastrointestinaltrakt [Uchaipichat et al. 2004]. Aber auch in Zielgeweben der Estrogenwirkung, wie z.B. in der Brust oder im Uterus, wurden UGTs nachgewiesen [Lepine et al. 2004].

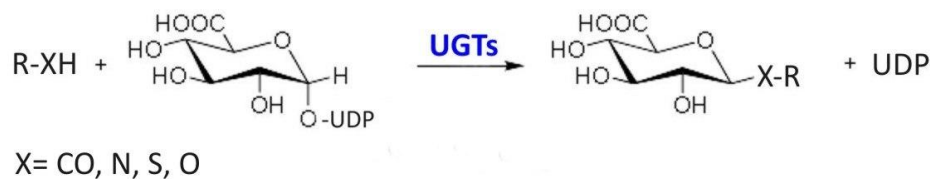


Abb. 2.3.: Bildung eines  $\beta$ -D-Glucuronid und Uridin-5'-diphosphat (UDP) [Gerstner 2008].

### 2.2.3. Sulfotransferasen (SULTs)

Sulfotransferasen (SULTs) übertragen Sulfonylgruppen ( $\text{SO}_3^-$ ) von dem Kofaktor 3'-Phospho-adenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS) auf Hydroxyl-, Amino-, Sulfhydryl- und N-Oxid-Gruppen ihrer Substrate [Glatt 1997]. Makromolekulare Substrate werden durch membrangebundene Sulfotransferasen metabolisiert, während niedermolekulare exogene und endogene Substanzen durch Sulfotransferasen im Cytoplasma metabolisiert werden. Zu den endogenen Substraten zählen Catecholamine, Cholesterin, Estrogene, Androgene, Neurosteroiden etc. Membranassoziierte SULTs sind überwiegend im Golgi-Apparat lokalisiert. Sie katalysieren die Sulfonierung von Glykoproteinen und Tyrosinen sowie Proteine und Peptiden, welche vom Golgi-Apparat abgeschieden werden, während die cytosolischen Sulfotransferasen für Arzneimittel und Giftwirkungen interessant sind. Alle cytosolischen Sulfotransferasen gehören zu einer großen Genfamilie, wobei die Steroidhormone und Schilddrüsenhormone durch eine große Anzahl dieser wasserlöslich gemacht werden (Tab.2.2.). Die Übertragung einer Sulfo-Gruppe auf andere Moleküle erhöht in der Regel deren Wasserlöslichkeit und erniedrigt die passive Diffusion durch Zellmembranen. Eine erhöhte Wasserlöslichkeit erleichtert die Ausscheidung durch Urin und Gallenflüssigkeit. Die biologische Funktion der Sulfonierung ist daher die Inaktivierung und Detoxifikation von Substanzen. Gerade der Dualismus zwischen Inaktivierung und Toxifizierung stellt die evolutionäre Basis für genetische Polymorphismen der SULT-Gene dar. Polymorphismen in SULT-Genen, verändern die Enzymaktivität (50-fache Schwankungen) und kommen in der Bevölkerung relativ häufig vor (30-40%) [Efferth 2006].

Wahrscheinlich gibt es dreizehn oder mehr cytosolische humane SULT-Enzyme, elf davon wurden enzymatisch aufgereinigt und charakterisiert. Diese Enzyme scheinen als Dimere aktiv zu sein. Sie scheinen in der Regel eine breite Substratspezifität zu besitzen [Blanchard et al. 2004].

| Substrate         | SULT-Enzyme |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |
|-------------------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|
|                   | 1A1         | 1A2 | 1A3 | 1B1 | 1C1 | 1C2 | 1E1 | 2A1 | 2B1a | 1B1b | 4A1 |
| T <sub>3</sub>    | x           |     | x   | x   | x   |     | x   | x   |      |      | x   |
| T <sub>4</sub>    | x           |     | x   | x   | x   |     | x   | x   |      |      |     |
| 17β-Estradiol     |             |     |     |     |     |     | x   |     |      |      |     |
| Estrone           |             |     |     |     |     |     | x   | x   |      |      |     |
| DHEA              |             |     |     |     |     |     | x   | x   | x    | x    |     |
| 27 OH-Cholesterol |             |     |     |     |     |     |     |     | x    | x    |     |

Tab. 2.2.: SULT-Enzyme für Steroidhormone und Schilddrüsenhormone [Javitt et al. 2001/modifiziert]

#### 2.2.4. Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT)

Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT) katalysiert in Anwesenheit von Magnesium ( $Mg^{2+}$ ) als Cofaktor, die Übertragung einer Methylgruppe des Donors S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) auf eine der beiden Hydroxylgruppen eines Catechols. Das SAM wird dabei zu S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) umgewandelt. SAH stellt einen kompetitiven Inhibitor der COMT dar, welcher mit SAM um die gleiche Bindungstasche konkurriert. Hat SAH an das Enzym gebunden, kann keine Methylierung stattfinden, da SAH die dafür notwendige Methylgruppe nicht zur Verfügung stellen kann, was einer nicht-kompetitiven Hemmung der COMT entspricht. Auf Grund dessen ist SAH der wichtigste endogene Inhibitor der COMT. Erhöhte intrazelluläre SAH-Konzentrationen können so zu einer verringerten Methylierung verschiedener Catechole führen (Abb. 2.4.) SAH wird enzymatisch, über Homocystein, wieder zu SAM umgewandelt [Zhu 2002].

Neben den Catecholaminen (Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin) zählen unter anderem die Catecholestrogene zu den COMT-Substraten. Die physiologische Hauptfunktion des COMT-Metabolismus ist die Deaktivierung biologischer aktiver und chemisch reaktiver endogener und exogener Catechole (Catecholamine, Catecholestrogene und Catechol-Metaboliten einschließlich Aryl-Kohlenwasserstoffe). Catecholestrogene entstehen als Folge von Estrogen-Hydroxylisation und stehen unter Verdacht, teils für die Bildung von Estrogen-Induzierten Tumoren verantwortlich zu sein (siehe auch Abschn. 2.3.4.7.). Eine Variante im Codon 108 der COMT-Gene ersetzt die Aminosäure Valin gegen Methionin (COMT-V108/158M), welches somit zu einer eingeschränkten niedrigen Enzymaktivität führt („Low Activity Allele“) und schließlich zu einer Verringerung der Rate im Catechol-Stoffwechsel [Busse 2009]. Obwohl es lösliche (S-COMT) und membrangebundene Formen des Enzyms gibt (MB-COMT), existiert nur ein COMT-Gen, welches auf Chromosom 22 Locus 11.2 lokalisiert ist [Efferth 2006].

Die löslichen Form ist im Cytosol aber auch im Nukleus lokalisiert und die membran-gebundene Isoform sitzt hauptsächlich in der Membran des rauen endoplasmatischen Retikulums und ist der cytoplasmatischen Seite zugewandt [Zhu 2002]. Die lösliche COMT wird nahezu in allen Geweben exprimiert, vor allem jedoch in der Leber und in der Niere [Zhu und Conney 1998(a)].

Außerdem stellen viele Arzneimittel aber auch Flavonoide (wie z.B. das Flavonol Quercetin) bzw. ihre Metaboliten Substrate der COMT dar, wobei exogene Substanzen deutlich bessere Substrate als die endogenen Catechole sind [Zhu 2002]. Die Aktivität wird sowohl durch endogene (z.B. genetische Polymorphismen) oder exogene Faktoren (wie die Induktion oder Hemmung durch Stoffe aus der Umwelt) beeinflusst [Lu et al. 2007].

Es wurde gezeigt, dass das Flavonol Quercetin, ein gutes Substrat der COMT, ein starker exogener Inhibitor der COMT ist und dadurch in vivo zu einer Hemmung der Methylierung von 2-Hydroxy-Estradiol bzw. 4-Hydroxy-Estradiol führte. Diese Hemmung wurde zum einen auf die direkte kompetitive Hemmung des Quercetins zurückgeführt, zum anderen auf die nicht-kompetitive Hemmung des gebildeten SAH und die verminderte Verfügbarkeit von SAM [Zhu und Liehr 1996].

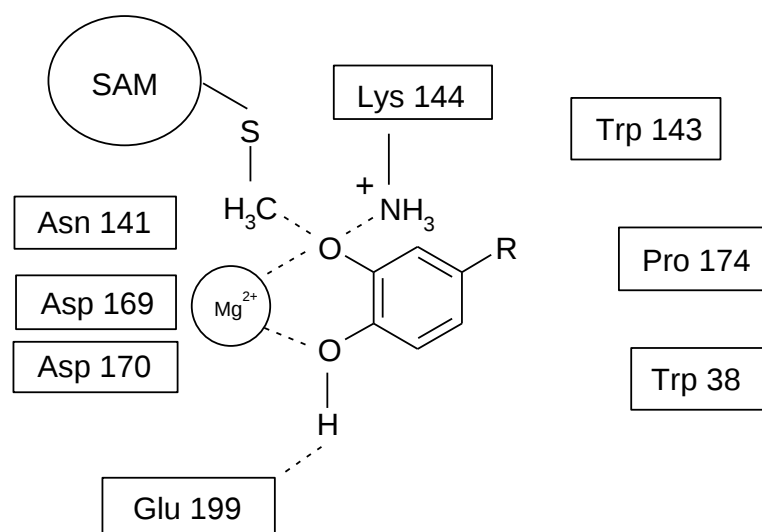


Abb. 2.4.: S-COMT- vermittelte O-Methylierung von Catecholamin-Substraten. Die gestrichelten Linien zeigen nicht kovalente Wechselwirkungen [Zhu 2002 / modifiziert].

## 2.3. Steroidhormon-Metabolismus

Wie bereits schon vorher unter Punkt 2.1.2. erwähnt, spielt die CYP<sub>450</sub>-Enzymfamilie CYP3A4 beim Steroidhormon-Metabolismus eine große Rolle. Sie ist die wichtigste Gruppe der Phase-I-Enzyme. CYP Monooxygenasen sind in der Lage, molekularen Sauerstoff so zu aktivieren, dass ein Sauerstoffatom in den Fremdstoff eingebaut, das andere zu Wasser reduziert wird (Abschn. 3.3.1.1.6. CYP<sub>450</sub>- Monooxygenasen: „Reaktionsmechanismus“). Für die Steroidhormone sind die wichtigsten CYP-Familien und Subfamilien in den Tabellen 2.3. und 2.4. ersichtlich.

| CYP-Familie    | Funktion                                                    |
|----------------|-------------------------------------------------------------|
| CYP 1-Familie  | Hydroxylierung von Estrogen                                 |
| CYP 2-Familie  | Hydroxylierung von Progesteron und Testosteron <sup>1</sup> |
| CYP 3-Familie  | Steroidhydroxylierung an C2, C6, C15, C16                   |
| CYP 7-Familie  | Steroidhydroxylierung am C7                                 |
| CYP 11-Familie | Steroidhydroxylierung am C20, C22, C11, C18                 |
| CYP 17-Familie | Steroidhydroxylierung am C17, C17, 20 Lyasespaltung         |
| CYP 19-Familie | Aromatisierung von Androgenen zu Estrogenen                 |
| CYP 21-Familie | Steroidhydroxylierung am C21                                |
| CYP 27-Familie | Steroidhydroxylierung am C27                                |

<sup>1</sup>Progesteron - und Testosteron-Hydroxylierung von CYP 2C19, CYP 2C9 [Yamazaki u. Shimada T 1999]

Tab. 2.3.: CYP-Familien der Steroide und ihre Funktion [Guengerich, 1995 / modifiziert].

| CYP <sub>450</sub> 1A1 | CYP <sub>450</sub> 1A2 | CYP <sub>450</sub> 1B1 | CYP <sub>450</sub> 2B6 | CYP <sub>450</sub> 2C8 | Steroidhormone |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|----------------|
| x                      | x                      | x                      |                        |                        | 17β-Estradiol  |
|                        |                        |                        | x                      | x                      | Testosteron    |
|                        |                        |                        |                        | x                      | Progesteron    |

Tab. 2.4.: Metabolisierung der Steroidhormone durch Subfamilien [Quelle: Jäger u. Czejka 2009]

### 2.3.1. Mechanismus des Steroidhormon-Stoffwechsels

Die Cytochrom-P<sub>450</sub>-Enzyme sowie die Dehydrogenasen spielen beim Steroidhormon-stoffwechsel, ausgehend vom Cholesterol, der gemeinsamen Vorstufe der Sexualhormone, ebenfalls eine entscheidende Rolle (Abb. 2.5.).

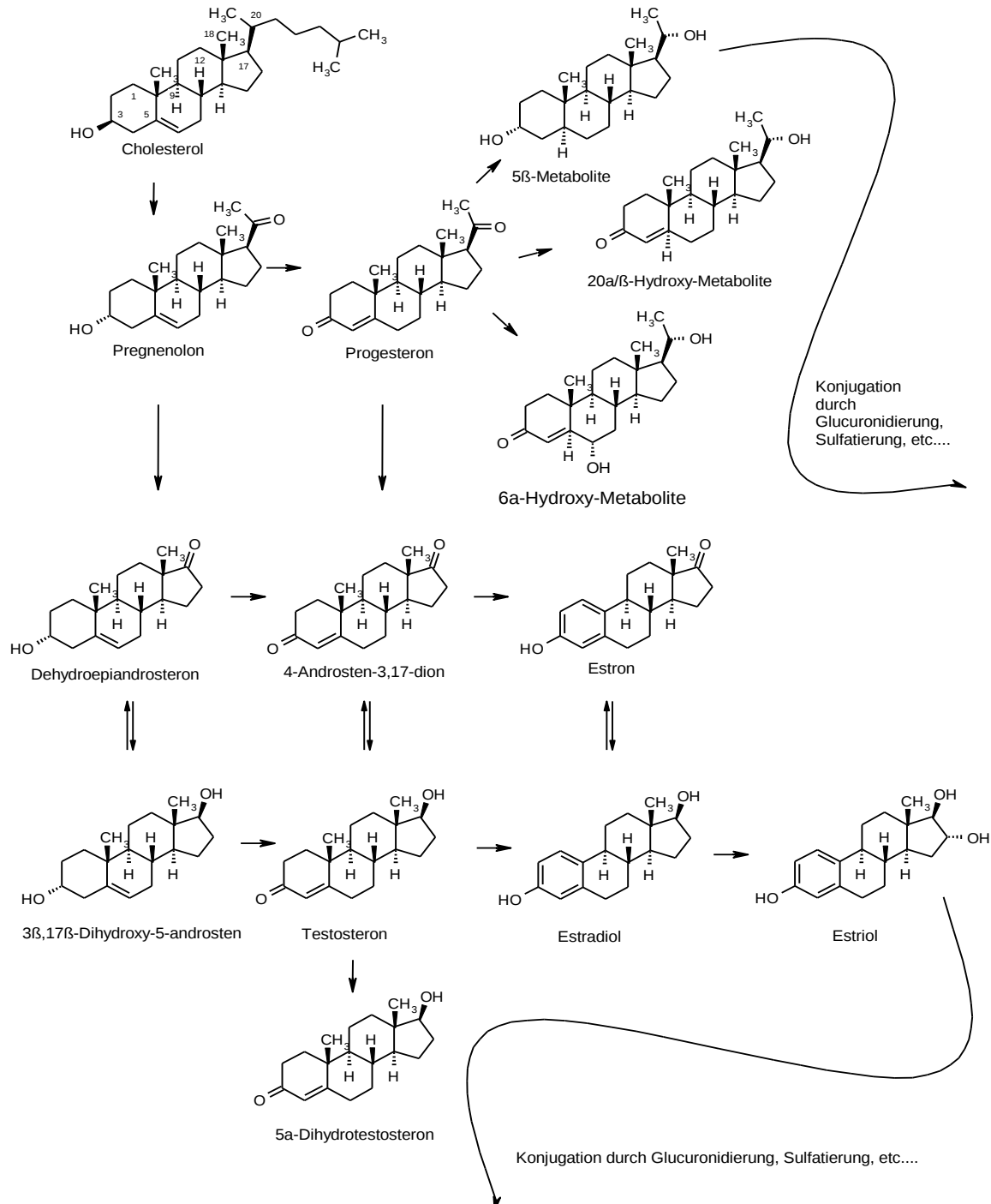


Abb. 2.5.: Steroidhormon-Stoffwechsel ausgehend vom Cholesterol [Forth et al. 2009/modifiziert]

Im ersten Schritt wird im Cholesterol die Seitenkette zwischen den Kohlenstoffatomen 20 und 22 durch das Enzym CYP11A1 („side chain cleavage“-Enzym, P<sub>450</sub> scc) abgespaltet und es entsteht daraus das Pregnenolon.

Aus diesem wiederum wird entweder durch das Enzym 3 $\beta$ -HSD II das Progesteron oder durch das Enzym CYP17A1 das Dehydroepi-Androsteron (DHEA) gebildet, welches durch das Enzym 3 $\beta$ -HSD II zum 4-Androsten-3,17-dion übergeführt wird und somit von dort mittels Aromatase CYP19 zum Estron und anschließend durch das Enzym 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zum Estradiol wird. Schließlich wird aus dem Estradiol durch die P<sub>450</sub>-abhängige Hydroxylierung in der Leber das Estriol gebildet. Andererseits gibt es auch die Möglichkeit vom 4-Androsten-3,17-dion durch das Enzym 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zum Testosteron zu gelangen [Forth et al. 2009].

### *2.3.2. Estradiol-Metabolismus*

17 $\beta$ -Estradiol (E2) bzw. Estron (E1) können an verschiedenen Positionen oxidiert werden. Hauptsächlich finden dabei Hydroxylierungen und die Ausbildung von Ketogruppen statt [Lee et al. 2003]. Katalysiert werden diese Reaktionen in der Regel durch verschiedene CYP-Isoformen (siehe auch 2.1.1. Das Cytochrom-P<sub>450</sub>-Enzymsystem und 3.3.1.1.6. CYP<sub>450</sub>-Monooxygenasen) oder durch Peroxidasen [Roy et al. 2007].

**Beim Phase I-Metabolismus** von 17 $\beta$ -Estradiol (E2) bzw. Estron (E1) werden vorrangig die Catecholestrogene (CEs) 2-Hydroxy-Estradiol (2-HO-E2), 2-Hydroxy-Estron (2-HO-E1), 4-Hydroxy-Estradiol (4-HO-E2) sowie 4-Hydroxy-Estron (4-HO-E1) gebildet (Abb. 2.6.) [Mueck u. Seeger 2007].

#### *2.3.2.1. Bildung der Catecholestrogene (CEs):*

Während in der Leber hauptsächlich die 2-Hydroxy-Catecholestrogene (2-HO-CEs) entstehen, stellen extrahepatisch die 4-Hydroxy-Catecholestrogene (4-HO-CEs) den größeren Anteil dar [Hiraku et al. 2001]. Die Bildung der 2-Hydroxy-Catecholestrogene (2-HO-CEs) wird in der humanen Leber durch CYP3A-Isoenzyme (vor allem CYP3A4) und CYP1A2 katalysiert, in extrahepatischen Geweben spielt bei der Oxidation dieser beiden Catecholestrogene (CEs) die CYP1A-Familie (vor allem CYP1A1, aber auch CYP1A2) die vorherrschende Rolle (Abb. 2.6. Mitte). Diese Isoenzyme konvertieren 17 $\beta$ -Estradiol (E2) zu ca. 80 - 85% zu 2-Hydroxy-Estradiol (2-HO-E2) und, aufgrund mangelnder Substratspezifität zu 15 - 20% zu 4-Hydroxy-Estradiol (4-HO-E2). Die Metabolisierung zu den 4-Hydroxy-Catecholestrogene (4-HO-CEs) findet in der Leber auch durch CYPs der 3A-Familie statt. In humanem extrahepatischem Gewebe katalysiert CYP1B1 die Bildung von 4-Hydroxy-Estradiol (4-HO-E2) sowie 4-Hydroxy-Estron (4-HO-E1) [Zhu u. Conney 1998 (a)].

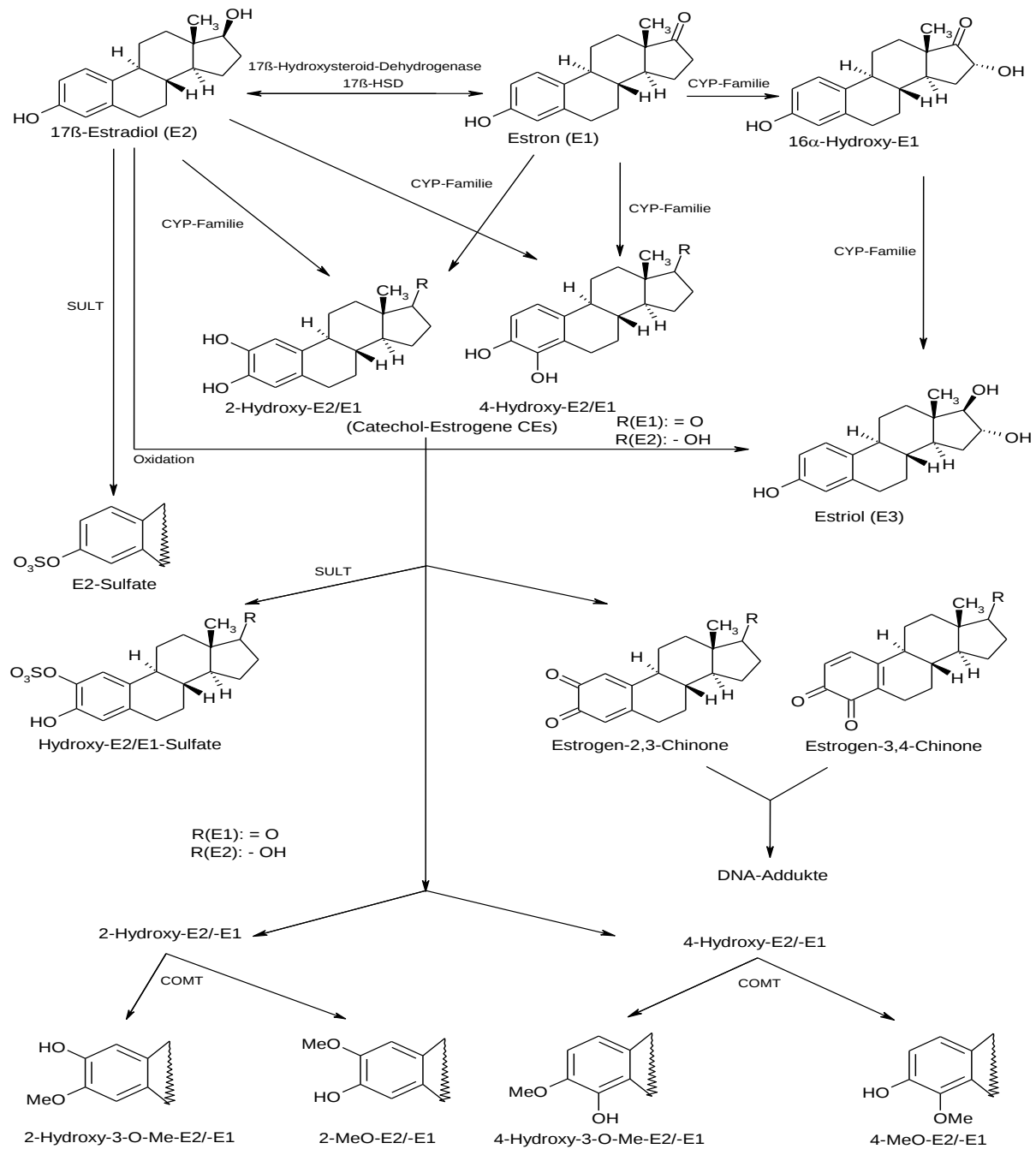


Abb. 2.6. Metabolismus des 17β-Estradiols [Gerstner 2008 / modifiziert]

### 2.3.2.2. Bildung von Estriol (E3):

Neben der Entstehung von 2-Hydroxy-Catechol-Estrogene (2-HO-CEs) bzw. 4-Hydroxy-Catechol-Estrogene (4-HO-CEs) gibt es noch einen zweiten Stoffwechselweg, der jedoch im Estrogen-Metabolismus eine geringere Rolle spielt [Cavalieri et al. 2002].

Durch die Oxidation von Estron (E1) zu  $16\alpha$ -Hydroxy-Estron ( $16\alpha$ -HO-E1) (Abb. 2.6. rechts oben), katalysiert durch CYP3A4, entsteht ein zusätzlicher Metabolit, der über die kovalente Modifikation des ER und die daraus resultierende Stimulierung der Zellproliferation mit der Entstehung hormonabhängiger Tumoren in Verbindung gebracht wird [Zhu u. Conney 1998 (a)]. Wird  $16\alpha$ -Hydroxy-Estron ( $16\alpha$ -HO-E1) an Position 17 reduziert bzw.  $17\beta$ -Estradiol (E2) an Position 16 oxidiert, entsteht dabei Estriol (E3). Während es früher ausschließlich als Antiestrogen angesehen wurde, da es u.a. im Urin von Schwangeren in sehr hohen Konzentrationen vorliegt, wird es heutzutage auch als Estrogen mit kurzer Wirkdauer beschrieben [Longcope 1984]. Der Anteil von  $16\alpha$ -Hydroxy-Estron ( $16\alpha$ -HO-E1) bzw. Estriol (E3) an der Entstehung hormonabhängiger Tumoren ist jedoch noch unklar [Liehr 2000; Zhu u. Conney 1998 (a)].

#### *2.3.2.3. $17\beta$ -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenasen ( $17\beta$ -HSDs):*

Die  $17\beta$ -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenasen (HSDs) gehören zu einer Gruppe von Isoenzymen, welche die gegenseitige Umwandlung zwischen  $17\beta$ -Hydroxysteroiden und 17-Ketosteroiden katalysieren, wobei die Oxidation von  $17\beta$ -Estradiol (E2) zu Estron (E1) auch durch Cytochrom-P<sub>450</sub>-Enzymsystem (CYPs) katalysiert werden kann (Abb. 2.6. Mitte oben) [Zhu u. Conney 1998 (a)]. Außerdem wird die Bildung von Estriol (E3) aus  $16\alpha$ -Hydroxy-Estron ( $16\alpha$ -HO-E1) durch Hydroxy-Steroid-Dehydrogenasen (HSDs) ermöglicht [Tsutsui et al. 2000]. Diese Enzyme werden in vielen verschiedenen humanen Geweben exprimiert (z.B. Leber, Plazenta, Ovar, Brust, Endometrium oder Fettgewebe), aber auch in kultivierten Zellen [Vihko et al. 2004].

Die Hydroxy-Steroid-Dehydrogenasen (HSDs) haben verschiedene Substrat- und Cofaktorspezifitäten (vor allem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) bzw. seine reduzierte Form (NADH), weniger NADP(H)), Gewebeverteilung, subzelluläre Lokalisation und katalysieren verschiedene Reaktionen in vivo. So überwiegt beispielsweise im Uterus die Umwandlung von  $17\beta$ -Estradiol (E2) zu Estron (E1) durch HSD Typ 2 (mit NAD als Cofaktor), im Brustgewebe dominiert jedoch die umgekehrte Richtung, katalysiert durch HSD Typ 1 (mit NADPH als Cofaktor). Die Umwandlung von  $17\beta$ -Estradiol (E2) in das weniger aktive Hormon Estron (E1) im Zielgewebe wird als ein wichtiger Regulationsmechanismus der E2-Wirkung betrachtet [Zhu u. Conney 1998 (a)].

#### *2.3.2.4. Bildung von Estrogenchinonen und Redoxcycling:*

Die Catecholestrogene (CEs) sind redoxaktiv, werden sie weiter oxidiert, entstehen ihre entsprechenden Estrogen-2,3-Chinone bzw. Estrogen-3,4-Chinone (Abb. 2.6. rechts Mitte). Diese ortho-Chinone (Chinone) können entweder enzymatisch (katalysiert durch die CYP-Isoenzyme, welche auch für die Bildung der Catecholestrogene (CEs) zuständig sind) oder nicht enzymatisch (in Anwesenheit von Übergangsmetallionen wie z.B. Cu<sup>2+</sup>) gebildet werden [Zhang et al. 2007].

Im Zuge dieser Reaktion kommt es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (siehe auch Abschn. 3. Grundlagen und Entstehung von ROS). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen wurden durch reaktive Sauerstoffspezies verursachte Einzelstrangbrüche oder auch oxidierte DNA-Basen wie z.B. 8-Oxoguanin nachgewiesen [Liehr 2001].

Darüber hinaus sind beide Chinon-Estrogene in der Lage, an die DNA zu binden [Yagi et al. 2001]. Untersuchungen zeigten, dass das Estrogen-3,4-Chinon instabile DNA-Addukte bildet, wodurch es zu potentiell mutagenen apurinischen Stellen kommt. Die durch das Estrogen-2,3-Chinon gebildeten DNA-Addukte sind stabiler und können durch die Reparatursysteme der Zelle eliminiert werden. Die Beobachtung einer stärkeren kanzerogenen Wirkung von 4-Hydroxy-Estradiol (4-Hydroxy-E2) im Vergleich zu 2-Hydroxy-Estradiol (2-Hydroxy-E2) in Hamster und Mäusemodellen stimmt damit überein. Darüber hinaus gehört 2-Hydroxy-Estradiol (2-Hydroxy-E2) zu den potentesten endogenen Antiangiogenesefaktoren [Zhu u. Conney 1998 (a)].

#### Redoxcycling-Prozesse:

Die im Estrogen-Metabolismus gebildeten Chinone können durch die NADPH-Cytochrom-P<sub>450</sub>-Reduktase (CPR) bzw. NADPH-Chinon-Oxidoreduktase (NQO) (siehe auch Abschn. 3.3.1.1.5.) oder andere im Körper vorhandene Reduktasen, zu ihren entsprechenden Catecholen wieder reduziert werden, wobei durch eine angeschlossene Autoxidation mit O<sub>2</sub> oder ebenfalls enzymatisch (CYPs, Peroxidasen) wiederum die Chinone entstehen (Abb. 2.7.) [Liehr 1990].

Das Radikal des Semichinons stellt ein Intermediat bei den Ein-Elektron-Übergängen sowohl der Chinon-Reduktion als auch der Catecholestrogen-Oxidation dar. Wird die Reduktion der Chinone jedoch durch die NADPH-Chinon-Oxidoreduktase (NQO) katalysiert, findet ein Zwei-Elektronen-Transfer statt, was die Bildung der Semichinonradikale umgeht [Liehr u. Roy 1990]. Sowohl bei der Oxidation der CEs zu den Semichinonradikalen als auch bei der Oxidation dieser Radikale zu den entsprechenden Chinonen können Superoxidradikale entstehen. Das Superoxidradikal kann, katalysiert durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) (Abschn. 3.2.3.1.1.) oder auch spontan, dismutieren zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, das in Anwesenheit von Metallionen (z.B. Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>+</sup>) zu den sehr reaktiven Hydroxylradikalen reagiert (Fenton-Reaktion, Abschn. 3.2. Chemische Grundlagen).

Das Redoxcycling ist deshalb ein Mechanismus der metabolischen Aktivierung, in dem fortlaufend neue ROS gebildet werden. Konsequenzen der Redoxcycling-Prozesse sind u.a. die Lipidperoxidation, Proteinoxidationen oder DNA-Schäden (Abschn. 3.2.3. ROS Reaktionen) [Liehr 1997]. Die bei der Lipidperoxidation gebildeten Lipidhydroperoxide werden, im Gegensatz zu NADPH, als unregulierte Cofaktoren für die Oxidation der Estrogene zu den Catecholestrogenen (CEs) und weiter zu den entsprechenden Chinonen diskutiert [Liehr 1994], was zu einer abnormalen Steigerung der Catecholestrogen- bzw. Chinon-Bildung führen kann [Cavalieri u. Rogan 2006].

Es gibt enzymatische und nichtenzymatische Prozesse die Chinone bzw. die beim Redoxcycling entstandenen ROS zu inaktivieren. Z.B. können die Chinone durch Konjugation mit Glutathion (GSH), katalysiert durch die Glutathion-S-Transferasen (GSTs) (Abschn. 2.2.1.) inaktiviert werden [Dawling et al. 2004].

Enzyme, die den Anteil an ROS im Körper reduzieren, sind z.B. die Superoxiddismutase, Katalase oder Glutathionperoxidase, die im Abschn. 3.2.3.1. Inaktivierung von ROS noch genauer beschrieben werden.

Dennoch müssen DNA-Schäden in Folge von oxidativem Stress nicht unbedingt zur Tumorentstehung führen, da eine geringe Anzahl von Schäden sehr effizient repariert werden kann bzw. hohe ROS-Konzentrationen Apoptose induzieren können, damit die geschädigten Zellen nicht im Organismus verbleiben [Halliwell u. Aruoma 1991].

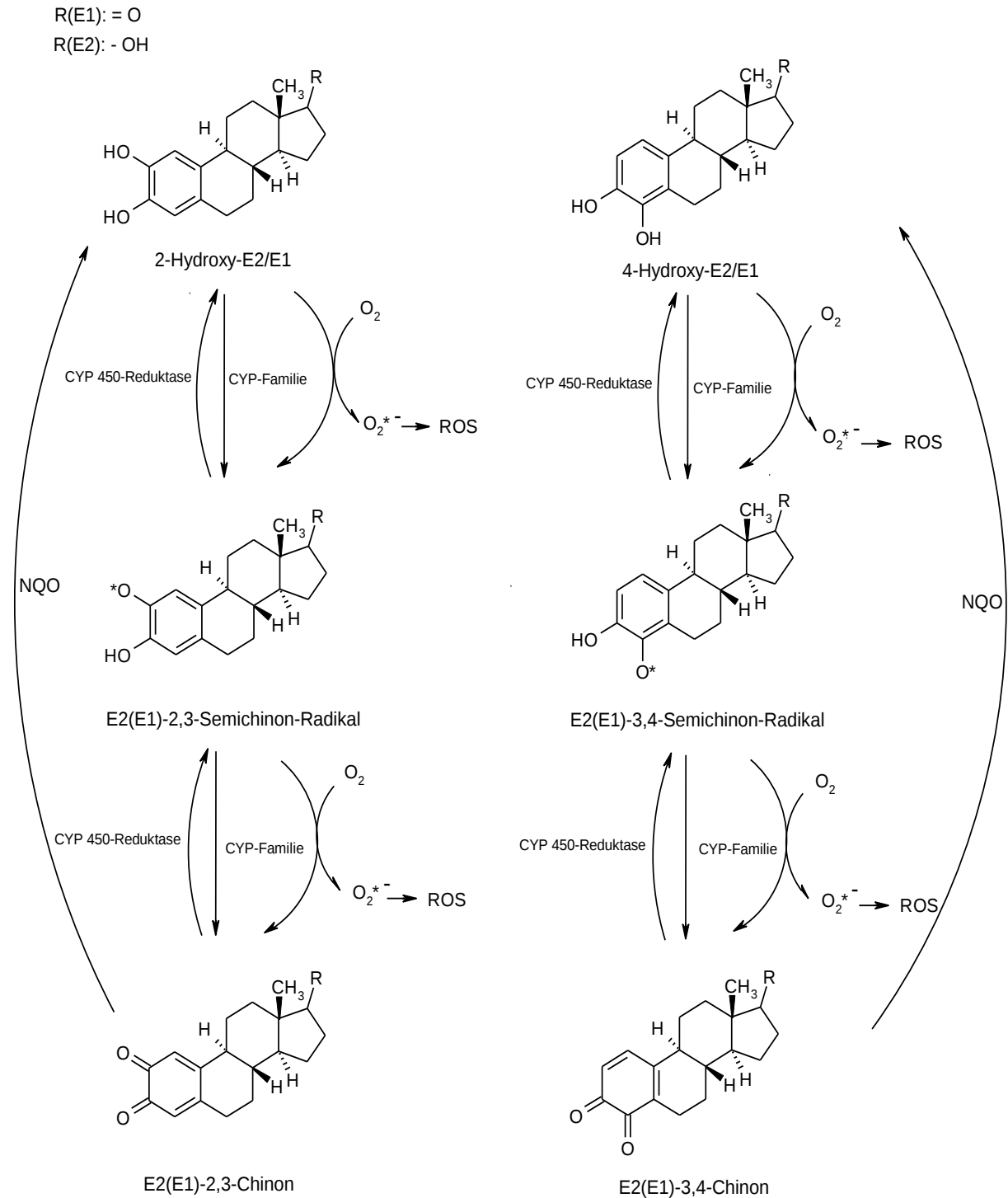


Abb. 2.7.: Redoxcycling zwischen den Catecholestrogenen (CEs) und den Estrogenchinonen [Gerstner 2008 / modifiziert].

**Beim Phase II-Metabolismus** erfolgen verschiedene Konjugationsreaktionen wie Methylierung, Glucuronidierung und Sulfatierung der Estrogene.

#### *2.3.2.5. Estrogen-Glucuronidierung durch die Uridin-5'-diphosphoglucuronyltransferasen (UDPs)*

Bezogen auf die Estrogene, stellt die Glucuronidierung die einzige Konjugationsreaktion dar, die nicht nur zur Inaktivierung, sondern auch zur Ausschleusung der polaren Produkte aus den Zellen führt [Lepine et al. 2004]. Für die Glucuronidierung der Estrogene spielen hauptsächlich Mitglieder der UGT1-Familie eine Rolle (UGT1A1, 1A3, 1A8, 1A9, 1A10). Nur ein Isoenzym der UGT2-Familie, UGT2B7, ist auch an der Glucuronidierung der Estrogene beteiligt [Guillemette et al. 2004]. UGT2B7 katalysiert die Glucuronidierung des E2 an Position 17. Aber auch andere UGTs (z.B. UGT1A3) haben einen geringen Anteil an der E2-17-Glucuronidierung [Lepine et al. 2004]. Für die Glucuronidierung von E2 an Position 3 ist in der humanen Leber UGT1A1 spezifisch, außerdem spielt extrahepatisch UGT1A8 eine Rolle [Guillemette et al. 2004]. Während das E2-3-Glucuronid (E2-3-G) biologisch inaktiv ist, kann das E2-17-Glucuronid (E2-17-G) zur Cholestase führen [Vore et al. 1997].

E1 kann auf Grund seiner Struktur nur an Position 3 glucuronidiert werden und wird, im Vergleich zu E2, nicht so effizient umgesetzt. Vor allem UGT1A8, aber auch UGT1A1, glucuronidiert E1 [Lepine et al. 2004].

Die CEs sind deutlich bessere Substrate als E2 bzw. E1 [Ball und Knuppen 1990]. Die Glucuronidierung der CEs ist an den Positionen 3, 17 und 2 bzw. 4 möglich. In der Regel wird die Hydroxylgruppe an Position 3 der 2-HO-CEs glucuronidiert und die Hydroxylgruppe an Position 4 der 4-HO-CEs. Eine Glucuronidierung an Position 17 der CEs konnte nicht nachgewiesen werden [Lepine et al. 2004]. Die 4-HO-CEs werden vorwiegend durch UGT2B7 umgesetzt (bei 4-HO-E2 spielt zusätzlich UGT1A8 eine Rolle), während die 2-HO-CEs vor allem durch UGT1A1 (2-HO-E2) und UGT1A8 (2-HO-E1) glucuronidiert werden [Guillemette et al. 2004]. Zusätzlich sind die Methylierungsprodukte der CEs Substrate für die UGTs. Auch hier wurde die Position 17 im Molekül nicht glucuronidiert. Bei allen Methoxy-Derivaten wurde die höchste Aktivität für UGT1A8 nachgewiesen. Des Weiteren war UGT1A1 für die Glucuronidierung dieser Metaboliten zuständig [Lepine et al. 2004].

#### *2.3.2.6. Estrogen-Sulfatierung durch die Sulfotransferasen (SULTs)*

Sowohl die Catecholestrogene (CEs) und ihre Methylierungsprodukte als auch 17 $\beta$ -Estradiol (E2) bzw. Estron (E1) werden durch SULTs inaktiviert. E1-Sulfate stellen neben den Glucuroniden die wichtigsten zirkulierenden Konjugate der Estrogene dar. Sie haben eine niedrige metabolische Clearance bzw. eine lange Halbwertszeit (ca. 9 h) und werden deshalb als Estrogenspeicher bzw. E2-Vorstufen angesehen [Guillemette et al. 2004; Zhu und Conney 1998(a)]. Wie bei der Glucuronidierung erhöht die Konjugation der Estrogene mit Sulfat ihre Wasserlöslichkeit und vermindert ihre Bindungsfähigkeit an den ER.

Durch Sulfatasen können die gebildeten Sulfate in der Leber, aber auch in extrahepatischen Geweben wieder zu den entsprechenden Ausgangssubstanzen umgewandelt werden [Zhu u. Conney 1998(a)]. Bei allen am Estrogenmetabolismus beteiligten Enzymen gibt es interindividuelle Unterschiede in ihrer Expression, die durch genetische Faktoren, aber auch durch Umwelteinflüsse (Arzneimittel, Rauchen, Alkohol oder Nahrungskomponenten) verursacht werden [Zhu und Conney 1998(a)]. So wurde z.B. in verschiedenen Untersuchungen eine Verbindung zwischen Polymorphismen in Genen metabolisch aktiver Enzyme und einem erhöhten Risiko für estrogenabhängige Tumoren diskutiert [Roy et al. 2007]. Beispiele hierfür sind Polymorphismen im *SULT1A1*-, *COMT*- oder *UGT2B7/-1A1*-Gen [Guillemette et al. 2004]. Es gibt jedoch auch einige Untersuchungen, bei denen kein Zusammenhang zwischen polymorphen Genen metabolisch aktiver Enzyme und einem erhöhten Risiko der Entwicklung estrogenabhängiger Tumoren bestand [Sellers et al. 2005].

*SULT1A1* und im geringeren Ausmaß *SULT2A1* scheinen die Isoformen zu sein, die für Estrogen Sulfatierung in Brusttumoren verantwortlich sind. Weiters katalysiert *SULT1A1* die Sulfation des 2-Methoxy-Estradiol, eines endogenen, potenten Antiestrogens. Deshalb nimmt man an, dass *SULT1A1* wichtig für die Sulfation der Estrogene in Brusttumoren ist [Shatalova et al. 2005].

Polymorphismus im Exon 7 (*SULT1A1* \* 2 Arg213His) bewirkt eine langsamere Umsetzung von aktivem Enzym und Substrat. Dies wirkt sich auf den Estrogen-Stoffwechsel in zweierlei Hinsicht aus: Auf der einen Seite, wenn die „Low Activity Allele“ vorhanden sind, werden weniger toxische Estrogensulfate hergestellt, aber auf der anderen Seite ist die Entgiftung von Catecholestrogene über diesen katabolischen Weg begrenzt. Die Bedeutung der *SULT1A1* Variante Arg213His wäre auch hier zu diskutieren. Neuere Studien weisen darauf hin, dass der *SULT1A1* R213H Polymorphismus offenbar keinen Einfluss auf die Anfälligkeit für Brustkrebs hat [Busse 2009].

#### 2.3.2.7. Estrogen-Methylierung durch die Catechol-O-Methyltransferasen (COMTs)

Ein Vergleich der vier Catecholestrogene (CEs) miteinander zeigt, dass die 2-Hydroxy-Catecholestrogene (2-HO-CEs) besser methyliert werden als die 4-Hydroxy-Catecholestrogene (4-HO-CEs) [Zhu u. Liehr 1996]. Die aus den Catecholestrogenen (CEs) gebildeten Methoxyestrogene (Abb. 2.8.) haben keine oder nur eine geringe ER-Bindungsaffinität [Zhu 2002].

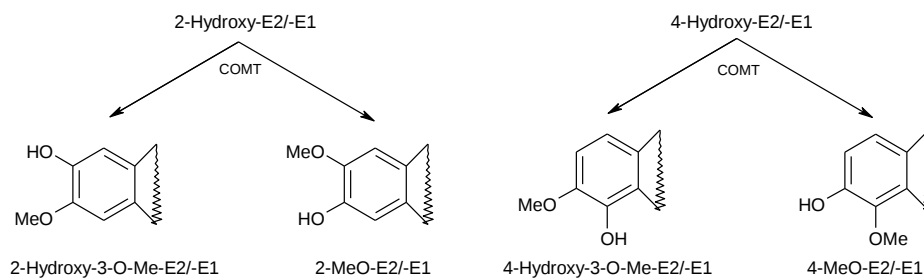


Abb. 2.8.: Methylierung der 2-Hydroxy-E2/E1 und 4-Hydroxy-E2/E1 durch COMT [Gerstner 2008 / modifiziert].

Neben der Detoxifizierung der Catecholestrogene (CEs) durch die Methylierung hat das dabei gebildete 2-Methoxy-Estradiol (2-MeO-E2) zusätzlich biologische Effekte [Zhu u. Conney 1998 (a)]. Es wurde gezeigt, dass 2-Methoxy-Estradiol (2-MeO-E2), in hohen, nicht physiologischen Dosen (200 – 10000-fach höher), die Proliferation von Brustkrebszellen in vitro und in vivo hemmt. Als zugrunde liegende Mechanismen dafür werden eine Hemmung der Tubulin-Polymerisation [D'Amato et al. 1994], Induktion der p53-vermittelten Apoptose oder Hemmung der Angiogenese diskutiert [Zhu u. Conney 1998 (a); Zhu 2002]. Auch die Möglichkeit, dass es einen noch unidentifizierten intrazellulären Rezeptor spezifisch für 2-Methoxy-Estradiol (2-MeO-E2) bzw. einen anderen Effektor (einen Transkriptionsfaktor oder ein Enzym) gibt, wird diskutiert [Zhu u. Conney 1998 (a)]. 2-Methoxy-Estradiol (2-MeO-E2), hemmte auch das Wachstum anderer humaner Krebszellen, jedoch scheinen humane Brustkrebszellen sensibler dafür zu sein.

Diese Effekte des 2-Methoxy-Estradiol (2-MeO-E2) wurden bei 2-Methoxy-Estron (2-MeO-E1) nicht nachgewiesen, obwohl es strukturell dem 2-Methoxy-Estradiol (2-MeO-E2) sehr ähnlich ist (Abb. 2.8.) [Zhu 2002]. Auf Grund dieser Untersuchungen scheinen die beschriebenen Eigenschaften des 2-Methoxy-Estradiols (2-MeO-E2) sehr spezifisch zu sein, und es wird daher von einem protektiven endogenen Estrogenmetaboliten gesprochen [Zhu u. Conney 1998 (a)]. In vitro wurden jedoch auch nachteilige Effekte des 2-Methoxy-Estradiols (2-MeO-E2) nachgewiesen. 2-Methoxy-Estradiol (2-MeO-E2) sowie auch 2-Hydroxy-Estradiol (2-HO-E2) sind nicht in der Lage, die Methylierung von 4-Hydroxy-Estradiol (4-HO-E2) in vitro zu hemmen, so dass es dadurch zu einer Akkumulation von 4-Hydroxy-Estradiol (4-HO-E2) kommen könnte. Umgekehrt war 4-Hydroxy-Estradiol (4-HO-E2) nicht in der Lage die Methylierung von 2-Hydroxy-Estradiol (2-HO-E2) zu vermindern [Zhu 2002]. Zusätzlich wurde festgestellt, dass die Methoxyestrogene die CYP-vermittelte Oxidation von Estrogenen hemmten [Dawling et al. 2004]. Die Methylierungsprodukte konnten durch CYPs demethyliert werden, was wiederum zu den Catecholestrogenen (CEs) führen würde [Cavalieri et al. 2001].

### *2.3.3. Testosteron-Metabolismus*

Die Metabolisierung von Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT) erfolgt vorwiegend zu 90% in der Leber. Dies geschieht weitgehend durch Oxidationen bzw. Reduktionen an den Positionen 3 bzw. 17 zu Androsteron, Androstan-3,17-dion oder Androstan-3,17-diol, die nicht mehr bzw. nur noch gering androgen aktiv sind (Abb. 2.9.). Diese reversiblen Reaktionen werden von C3- und C17-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSDs) katalysiert. Bei dem Enzym 5-Reduktase gibt es zwei Isoformen, die 5 $\alpha$ - und 5 $\beta$ -Reduktase, je nachdem welche Reduktase aktiv ist, erfolgt die Reaktion entweder in Richtung eines 5 $\alpha$ - und/oder 5 $\beta$ -Steroidgerüsts. In der Prostata ist besonders die 5 $\alpha$ -Reduktase aktiv und bildet die 5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone. In der Leber sind beide Isoformen wirksam und katalysieren die Umwandlung von Testosteron sowie von anderen Steroiden, zu 5 $\alpha$ - und 5 $\beta$ -Steroide, die in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander vorliegen, wobei meistens die 5 $\beta$ -Reduktion stattfindet [Schanzer 1996; Van Eenoo u. Delbeeke 2006]. Testosteron kann nicht nur zu DHT sondern auch zum physiologisch inaktiven 5 $\beta$ -Dihydro-Testosteron reduziert werden, aus dem dann nach 3-Ketoreduktion und 17-Oxidation Etiocholanolon entsteht, das ebenfalls in 3-Position glucuronidiert und ausgeschieden wird [Murad u. Haynes 1985].

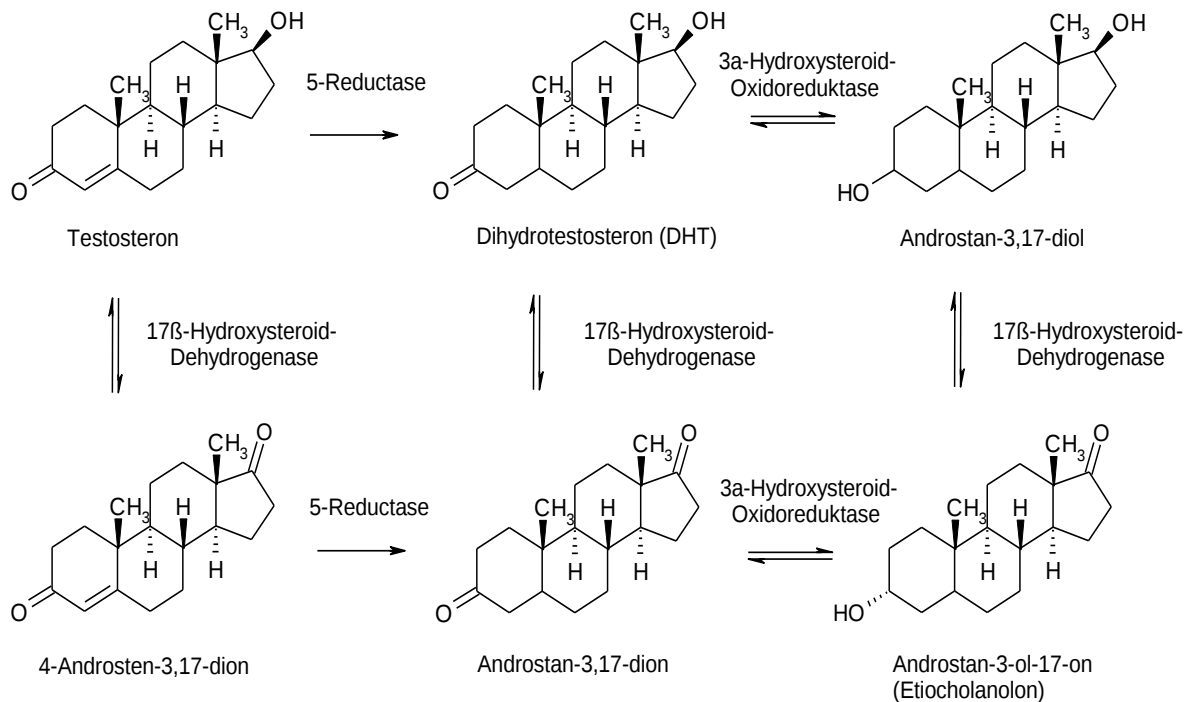


Abb. 2.9.: Metabolismus von Testosteron [Forth et al. 2009 / modifiziert]

Einerseits wird ein Molekül aktivierter Glucuronsäure an den Hydroxylgruppen, in Position C3 und/oder Position C17 dieser Moleküle, durch eine Uridin-5'-diphospho-glucuronyltransferasen (UDP) bzw. UDP-Glucuronyltransferasen (UGTs) konjugiert [Belanger et al. 2003] andererseits werden 10% aller Hydroxylgruppen von Sulfotransferasen in Sulfate umgewandelt. Somit verbessern beide Gruppen die Polarität des gesamten Moleküls erheblich. Auf diese Weise werden apolare Steroide zu wasserlösliche Produkte übergeführt und mit dem Urin ausgeschieden [Schanzer 1996].

Testosteron selbst wird als Glucuronid ausgeschieden. Es kann aber auch durch die Aromatase zu 17β-Estradiol (E2), dem physiologisch aktivsten Estrogen umgesetzt werden. Die Vorstufe des Testosterons, Androst-4-en-3,17-dion, wird durch die Aromatase zu Estron (E1) umgesetzt, aus dem seinerseits 17β-Estradiol (E2) gebildet werden kann [Stryer 1996].

Vom Testosteron kann mittels Aromatase CYP19, durch Aromatisierung des Ringes A und eine Abspaltung des C-19 Estradiol entstehen (Abb. 2.10.). Bei diesem Vorgang entsteht als Zwischenprodukt ein Peroxy-Enzym-Intermediat.

Der Komplex besteht aus dem Hämprotein Cytochrom P<sub>450</sub>19A1 (Aromatase) und der NADPH Cytochrom P<sub>450</sub>-Reduktase. Die Reaktion beginnt mit einer zweimaligen Hydroxylierung der Methylgruppe am C-Atom 19, wobei aus dem Testosteron das 19,19-Dihydroxy-Testosteron entsteht.

Durch Wasserabspaltung gebildete 19 Oxo-Testosteron wird ein drittes Mal mit  $O_2$  und NADPH/ $H^+$  umgesetzt, wobei unter Bildung eines hypothetischen Peroxy-Enzym-Intermediates das C-Atom 19 als Ameisensäure abgespalten und der Ring A aromatisiert wird [Löffler 2007].

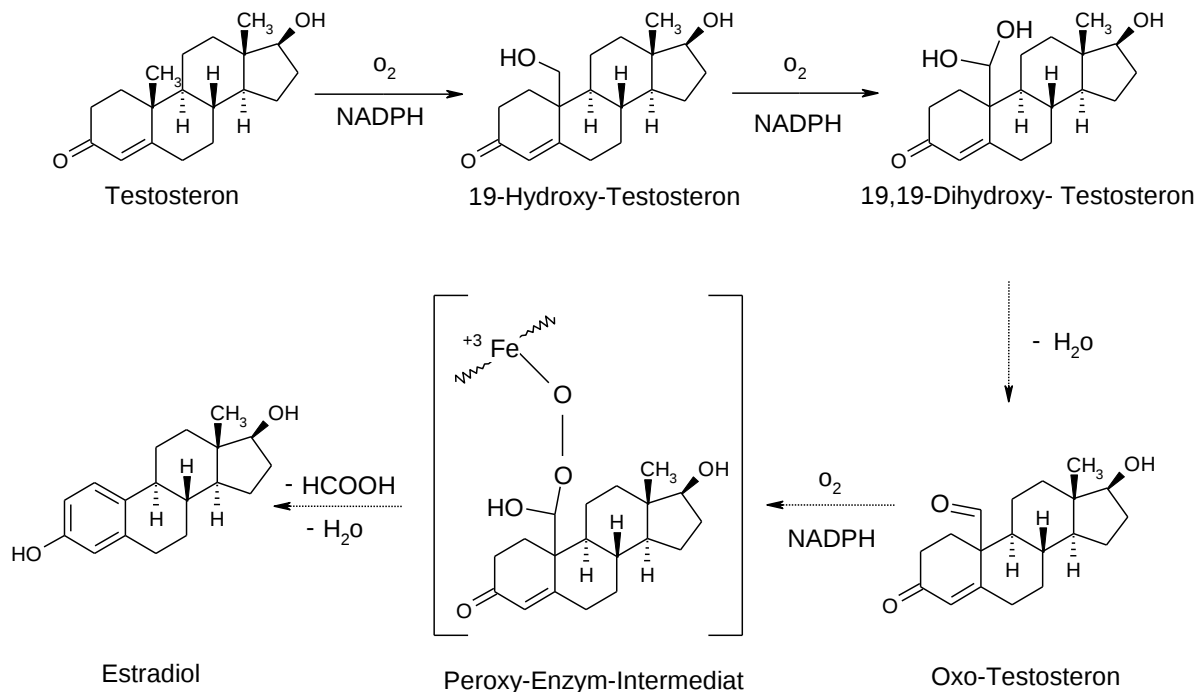


Abb. 2.10.: Reaktionsmechanismus des Cytochrom P450-Aromatase-Komplexes [Löffler 2007].

Die Aromatisierung aus der Vorstufe Testosteron in den aktiven Metaboliten Estradiol kann man von zwei Seiten betrachten. Zum einem haben wir die Testosteronwirkung auf Seiten des Mannes, die ein Zusammenspiel aus Testosteron, DHT und Estradiol darstellt. Unter anderem wird Testosteron durch die  $5\alpha$ -Reduktase in die 2,5-fach biologisch aktivere Form Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt (Abb. 2.9.). Testosteron oder DHT binden dann intrazellulär an einen cytoplasmatischen Rezeptor und induzieren die Synthese androgen-abhängiger Gene.

Zum anderen zeigt sich auf Seiten der Frau, dass durch die Aromatase CYP19 (Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase) einerseits die Umwandlung von 4-Androsten-3,17-dion in Estron erfolgt, andererseits auch aus der Vorstufe Testosteron der aktive Metabolit Estradiol in den Granulosazellen des Ovars gebildet wird (Abb. 2.5.). Inwiefern dies eine Rolle bei der Entstehung von ROS spielen könnte, wurde noch nicht ausreichend untersucht.

### 2.3.4. Progesteron-Metabolismus

Ein stufenweiser Abbau des Progesterons erfolgt in der Leber, über die Reduktion der Doppelbindungen und der beiden Ketogruppen an den C-Atomen 3 und 20. Es entstehen Pregnandiole, das wichtigste Ausscheidungsprodukt ist das  $3\alpha,20\alpha$ -Pregnandiol [Forth et al. 2009] (Abb. 2.11.).

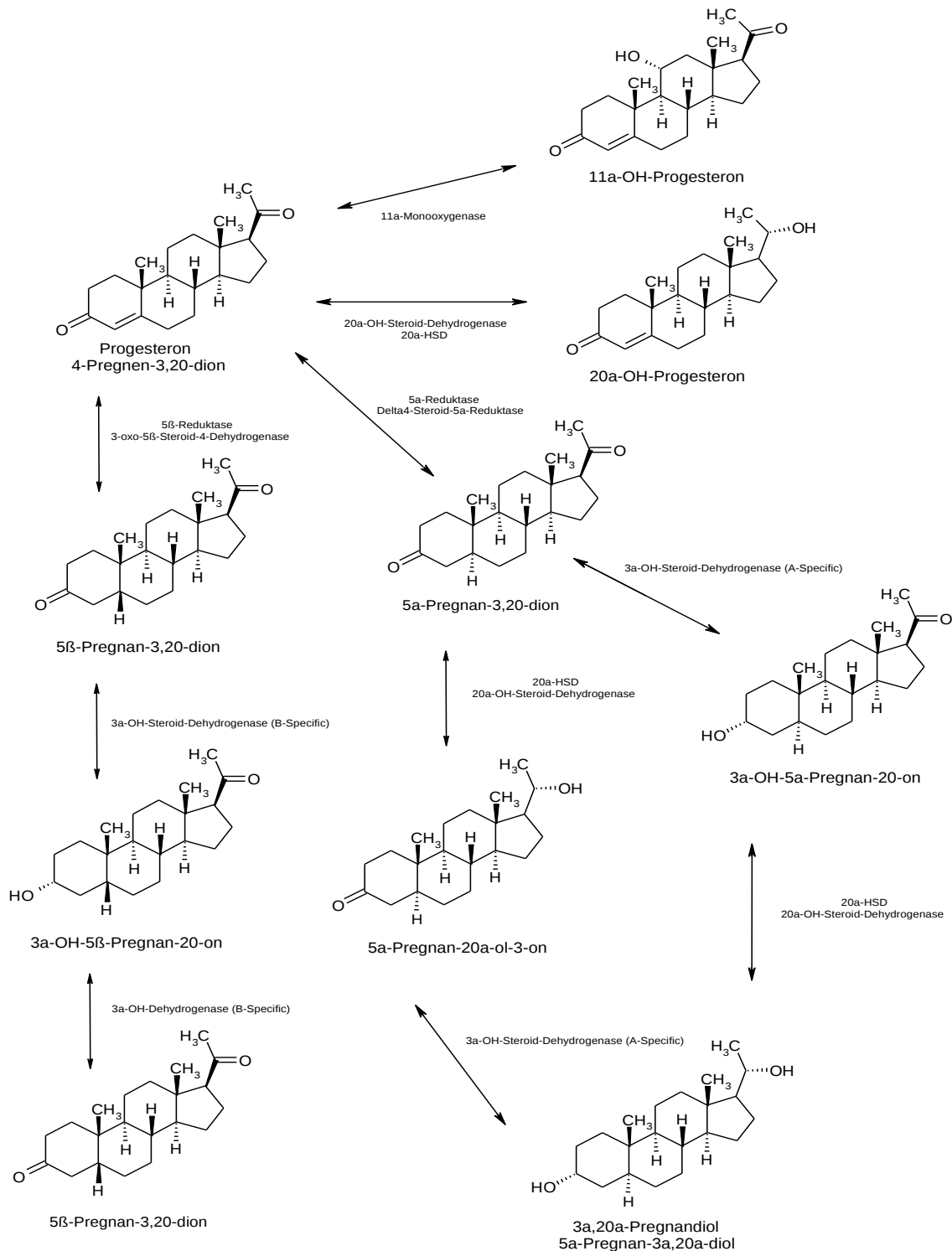


Abb. 2.11.: Metabolismus des Progesterons [Genome]

Die wichtigsten Metabolite des Progesterons sind neben  $5\beta$ -Metabolite, die  $20\alpha/\beta$ -OH-Metabolite. Auch  $6\alpha$ -OH-Metabolite (Abb. 2.5.) sind neben Deoxycorticosteron (DOC) bereits in der Leber von Kaninchen identifiziert worden. Dabei konnte zum ersten Mal eine C21 Hydroxylierung von Progesteron in Mitochondrien und Mikrosomen nachgewiesen werden. Deoxycorticosteron (DOC) konnte als Metabolit beider Stoffwechselvorgänge, des mitochondrialen als auch des mikrosomalen, charakterisiert werden, während  $6\alpha$ -OH-DOC und  $6\alpha$ -OH-Progesteron nur als mikrosomale Metaboliten identifiziert wurden. Ebenfalls konnten  $6\beta$ -OH-Metabolite entdeckt werden, die aber quantitativ nur von geringer Bedeutung waren [Dey u. Senciall 1977]. Die Metabolite des Progesterons werden dann als Glucuronide bzw. Sulfate vorwiegend renal eliminiert [Forth et al. 2009].

#### *2.3.4.1. Delta4-Steroid- $5\alpha$ -Reduktase ( $5\alpha$ R)*

Die Delta4-Steroid- $5\alpha$ -Reduktase ( $5\alpha$ R) bzw.  $5\alpha$ -Reduktase katalysiert die Umwandlung von 4-en Steroide zu  $5\alpha$ -reduzierte Steroide [Russel u. Wilson 1994]. Wie bereits schon beim Testosteron-Metabolismus (2.3.3.) erwähnt, gibt es zwei bekannte Isoformen der humanen  $5\alpha$ -Reduktase, nämlich vom Typ 1 ( $5\alpha$ R1) und Typ 2 ( $5\alpha$ R2) [Andersson et al. 1991].  $5\alpha$ R1 wurde in verschiedenen Androgen-unabhängigen Organen, wie in der Leber und im Gehirn nachgewiesen.  $5\alpha$ R2 wurde überwiegend im Androgen-abhängigen Organen, wie in den Nebenhoden und in der Prostata gefunden [Thigpen et al. 1993] und dessen Rolle bei Prostatakrebs wurde ausgiebig untersucht.

Es zeigte sich eine höhere Wahrscheinlichkeit der Bildung von  $5\alpha$ - reduzierten Metaboliten aus Progesteron in tumorbildenden Brustgeweben als in nicht kanzerogenen Geweben [Wiebe et al. 2000; Mori u. Tamaoki 1980]. Frühere Studien [Wiebe et al. 2000] haben gezeigt, dass im Brustgewebe die Umwandlung von Progesteron auf zwei Arten von 21-C-Steroiden erfolgen kann. Auf der einen Seite entstehen 4-Pregnene mit einer C4-5-Doppelbindung, auf der anderen Seite werden  $5\alpha$ -Pregnane gebildet, die  $5\alpha$ -reduziert sind. Es zeigte sich, dass in tumorbildenden humanen Brustgewebe die Bildung von  $5\alpha$ -Pregnanen durch die  $5\alpha$ -Reduktase ( $5\alpha$ R) signifikant höher war als in nicht tumorbildendem humanem Brustgewebe [Wiebe et al. 2000].

#### *2.3.4.2. $20\alpha$ - and $3\alpha$ -( $3\beta$ )-Hydroxy-Steroid-Dehydrogenasen (HSDs)*

Die Enzyme  $20\alpha$ -HSD,  $3\alpha$ -HSD und  $3\beta$ -HSD katalysieren die Bildung von folgenden Progesteron-Metaboliten im Brustgewebe:  $20\alpha$ -OH-4-Pregnen-3-on ( $20\alpha$ -HSD),  $20\alpha$ -OH- $5\alpha$ -Pregnan-3-on,  $3\alpha$ -OH-4-Pregnen-20-on ( $3\alpha$ -HSD),  $3\alpha$ -OH- $5\alpha$ -Pregnan-20-on,  $3\beta$ -OH- $5\alpha$ -Pregnan-20-on, 4-Pregnen- $3\alpha,20\alpha$ -diol, und  $5\alpha$ -Pregnan- $3\alpha(\beta),20\alpha$ -diol. Die  $20\alpha$ -HSD ist verantwortlich für eine reduktive/oxidative Umwandlung von Progesteron und  $20\alpha$ -OH-Progesteron,  $3\alpha$ -OH- $5\alpha$ -Pregnan-20-on und  $3\alpha,20\alpha$ -Pregnandiol,  $5\alpha$ -Pregnan-3,20-dion und  $5\alpha$ -Pregnan- $20\alpha$ -ol-3-on (Abb. 2.11.), sowie  $5\alpha$ -Pregnan- $3\alpha(\beta)$ -ol-20-on und  $5\alpha$ -Pregnan- $3\alpha(\beta),20\alpha$ -diol.

In Brustdrüsengewebe vom Menschen [Wiebe et al. 2000] und Ratten [Mori et al. 1978] wurden höhere Aktivitäten der  $20\alpha$ -HSD festgestellt als in Tumorgewebe. Die humane  $20\alpha$ -HSD gehört zur Aldo-Keto-Reduktase (AKR)- Gen-Superfamilie [Penning et al. 2000]. Die Expression der  $20\alpha$ -HSD-mRNA wurde in einer Reihe von Geweben, darunter auch im Brustdrüsengewebe, nachgewiesen [Zhang et al. 2000].

Diese Aldo-Keto-Reduktasen sind monomere 37 kDa Proteine und NAD(P)(H) abhängig [Jez et al. 1997]. Die Isoform AKR1C1 ist hauptsächlich eine  $20\alpha$ -HSD [Dufort et al. 1996] trotzdem sind die Isoformen AKR1C2-AKR1C4 fähig, Progesteron zu  $20\alpha$ -Dihydroprogesteron ( $20\alpha$ -DHP) zu reduzieren, welches wiederum zu Progesteron oxidiert werden kann.

Die humane  $3\alpha$ -HSD ist verantwortlich für die Umwandlung von 3-Oxo- und  $3\alpha$ -Hydroxy-Steroiden und im Falle des Progesteron-Metabolismus ergeben sich Umwandlungen zwischen Progesteron und  $3\alpha$ -OH-Progesteron,  $5\alpha$ -Pregnan- $20\alpha$ -ol-3-on und  $3\alpha,20\alpha$ -Pregnan- $20\alpha$ -ol-3-on und  $3\alpha$ -OH- $5\alpha$ -Pregnan- $20\alpha$ -ol-3-on (Abb. 2.8.),  $20\alpha$ -OH- $5\alpha$ -Pregnan-3-on und  $5\alpha$ -Pregnan- $3\alpha,20\alpha$ -diol. Im Menschen sind alle drei Isoformen AKR1C1–AKR1C3 aktive NAD(P)(H) abhängige  $3\alpha$ -Oxido-Reduktasen, von denen AKR1C2 und AKR1C3 eine überwiegende  $3\alpha$ -HSD-Aktivität in Prostata und Brustdrüsen zeigen [Penning et al. 2000].

$3\beta$ -HSD-Aktivitäten wurden sowohl im menschlichen Brustgewebe [Wiebe et al. 2000] als auch in menschlichen Brustzell-Linien wie MCF-7 [Raju et al. 1978], T-47Dco [Fennessey et al. 1986] und ZR-75-1 [Theriault u. Labrie 1991] gefunden.

## **2.4. Schilddrüsenhormon-Metabolismus**

Viele der Selenoproteine sind Bestandteile der zellulären Verteidigung gegen exogenen oder endogenen oxidativen Stress bzw. Teil der Redox-Regulation (Abschn. 3.2.3.1. Inaktivierung von ROS: „Glutathionperoxidase“). Zu diesen Selenoproteinen gehören auch die Iodthyronin-Deiodasen (DIO). Sie sind verantwortlich für die Aktivierung sowie die Inaktivierung und den partiellen Abbau der Schilddrüsenhormone [Köhrle, Jakob et al. 2005].

Der wichtigste Reaktionsweg für das Prohormon  $T_4$  ist die Umsetzung in seine aktive Form  $T_3$ . Dies geschieht durch 5'-Monodeiodierung des „äußeren“, weiter von der Amid-Gruppe entfernten, Phenol-Ringes. Diese Reaktion wird durch die Iodthyronin-Deiodasen vom Typ 1 und Typ 2 (Dio1, Dio2) katalysiert (Abb. 2.12.). Die Deiodierung des „inneren“ Phenol-Ringes geschieht hauptsächlich durch die Deiodase Typ 3 (Dio3).

Durch letztere Reaktion werden  $T_4$  und  $T_3$  inaktiviert [Bianco et al. 2002] und auf diesem Wege kann die Schilddrüsenhormonkonzentration zellspezifisch reguliert werden. Dies bedeutet, dass die freien ungebundenen Schilddrüsenhormone ( $fT_3$ ,  $fT_4$ ) dem Stoffwechsel zur Verfügung stehen und die an Bindungsproteinen gebundenen Mengen an  $T_3$  und  $T_4$  ein Reservoir für Schilddrüsenhormone darstellen und dadurch für gleichmäßige Plasma-Hormonspiegel sorgen.

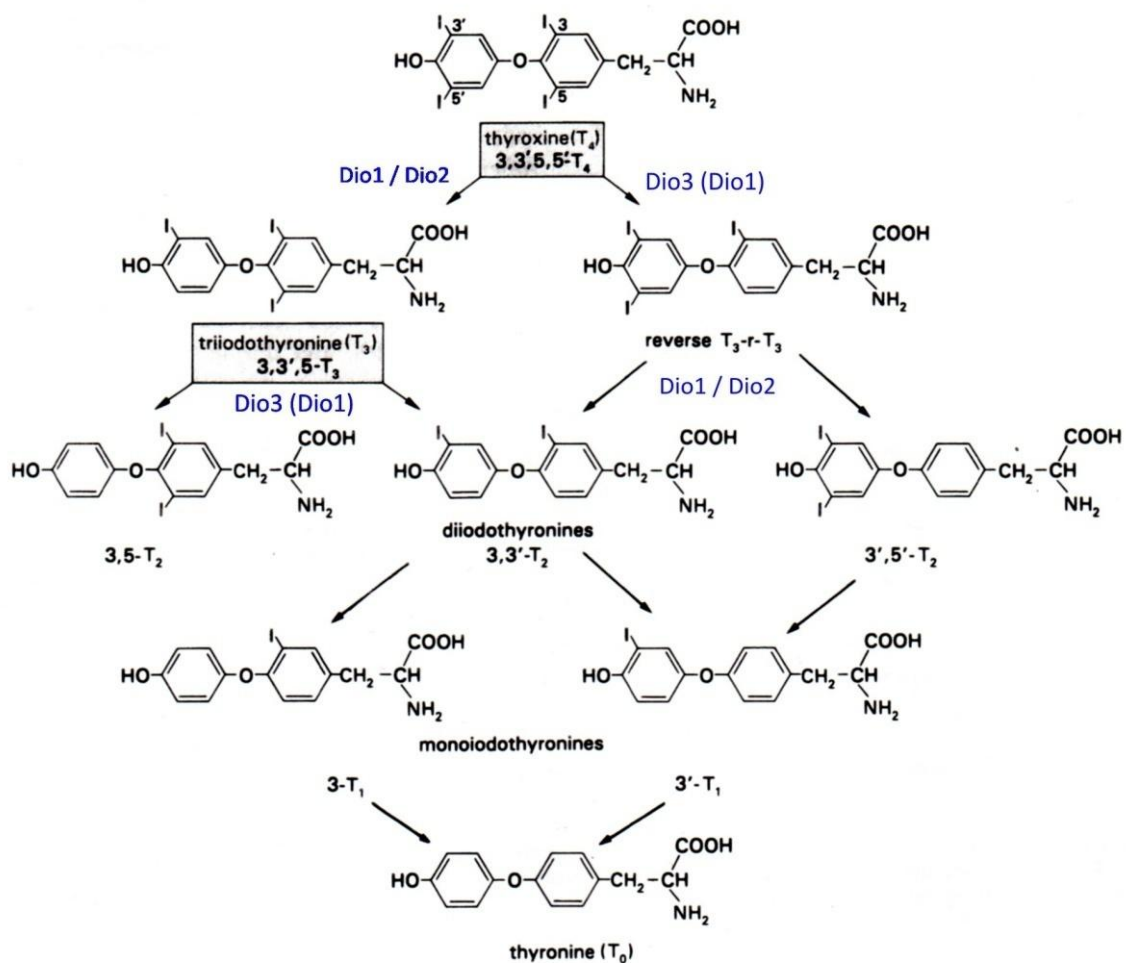


Abb. 2.12.: Deiodination: Reaktionswege von T<sub>4</sub> und T<sub>3</sub> katalysiert durch Dio1, Dio2 und Dio3. Es wurden bis jetzt drei Diiodthyronine T<sub>2</sub>, zwei Monoiodthyronine T<sub>1</sub> sowie das Thyronin T<sub>0</sub> identifiziert [Baulieu et al.1990/ modifiziert].

Die Typ I 5'-Deiodase (Dio1) aktiviert das von der Schilddrüse sezernierte Prohormon T<sub>4</sub> zum biologisch thyromimetisch aktiven 3,3',5-Triiodthyronin T<sub>3</sub>. Die vorwiegende Expression dieses Enzyms ist für Leber, Niere, Schilddrüse und euthyreote Hypophyse sowie mehrere andere Organe und Zellen in niedrigerer Konzentration beschrieben [Leonard u. Köhrle J 2000]. Die Dio1 liefert einen Großteil des im Serum zirkulierenden T<sub>3</sub> unter normalen Stoffwechselbedingungen. Ihre Expression wird jedoch unter verschiedenen pathophysiologischen Konstellationen, die als Nieder-T<sub>3</sub>-Syndrom oder *euthyroid sickness* zusammen gefasst werden, vor allem in der Leber, teils auch in der Schilddrüse eingeschränkt, wodurch es zu erniedrigten zirkulierenden T<sub>3</sub>-Konzentrationen im Serum kommt [Jakobs et al. 2002]. Des weiteren tragen Polymorphismen im Dio1-Gen zu einer unterschiedlichen Basalaktivität dieses Enzyms und damit zu einer unterschiedlichen basalen T<sub>3</sub>-Produktion im Menschen bei [Peeters et al. 2003].

Ein zweites Enzym, die Typ II 5'-Deiodase (Dio2), produziert ebenfalls  $T_3$ . Dieses Enzym zeigt jedoch ein anderes entwicklungs- und gewebespezifisches Expressionsmuster und ist von einem unabhängigen Gen kodiert. Dio2 trägt vorwiegend zur lokalen  $T_3$ -Bildung aus  $T_4$  in verschiedenen Geweben und Zellen bei und ist somit in der Lage, unabhängig von zirkulierenden, vorwiegend durch die Typ 1-Deiodase bereitgestellten  $T_3$  während der Entwicklung, aber auch im erwachsenen Organismus, Zellen lokal mit dem essentiellen Schilddrüsenhormon  $T_3$  zu versorgen [Leonard u. Köhrle J 2000].

Die dritte Selenoproteindeiodase, das Typ III 5'-Deiodaseenzym (Dio3) inaktiviert das Prohormon Thyroxin durch Bildung von 3,3',5'- $T_3$  (reverse  $rT_3$ ) und ist auch am Abbau von  $T_3$  beteiligt. Auch dieses Enzym, von einem weiteren, verschiedenen Gen kodiert, zeigt ein verglichen mit Dio1 und Dio2 unterschiedliches entwicklungs- und gewebespezifisches Expressionsmuster.

Hohe Konzentrationen werden vor allem im adulten ZNS und in solchen Geweben beschrieben, die wenig auf Schilddrüsenhormone in ihrem entsprechenden Differenzierungszustand reagieren [Köhrle 2000]. Somit trägt dieses Enzym unter bestimmten Konstellationen des Nieder- $T_3$ -Syndroms zur Senkung der zirkulierenden  $T_3$ -Spiegel und zur Inaktivierung des  $T_4$  ebenfalls bei.

Berücksichtigt werden muss noch, dass das Dio1 in der Lage ist,  $T_4$  sowie  $T_3$ -Sulfat durch Deiodierung am Tyrosylring, also in 5-Position zu inaktivieren und damit ebenfalls zur Inaktivierung der Schilddrüsenhormone beizutragen [Köhrle 2004].

#### *2.4.1. Konjugation der Schilddrüsenhormone mit Schwefelsäure und Glucuronsäure*

Die vom Tyrosin abgeleiteten Iodthyronine tragen wegen der Iodsubstitution am phenolischen Ring in 3'- und/oder 5'-Position eine stark azide phenolische 4'-OH-Gruppe. Diese phenolischen, aromatischen Substanzen sind somit effektive Substrate für Sulfotransferasen und Glucuronyltransferasen in der Leber (Abb. 2.13.). Die Ausscheidung der Glucuronide erfolgt mit der Galle, im Darm kommt es zur bakteriellen Aufspaltung und z.T. zur Reabsorption. Ein kleiner Teil des Thyroxins wird mit dem Stuhl ausgeschieden [Forth et al. 2009].

Für die Sulfotransferaseaktivität von  $T_4$  und  $T_3$  wurden unterschiedliche Enzyme bereits identifiziert, die eine gewisse Spezifität für  $T_3$  oder  $T_4$  aufweisen [Visser u. Kester 2002]. Bemerkenswert ist jedoch hierbei, dass diese  $T_3$ - oder  $T_4$ -Sulfotransferasen als Substrate ebenfalls Steroidhormone umsetzen, die zum Teil in wesentlich höheren Konzentrationen vorliegen.

Dies bedeutet jedoch auch, dass es wahrscheinlich Wechselwirkungen zwischen Sulfotransferasereaktionen im Schilddrüsenhormon-, Steroidhormon- und Pharmakon-Stoffwechsel geben wird, wofür viele Befunde sprechen. Jedoch sind genaue Mechanismen dieser kompetitiven Vorgänge nicht analysiert.

Die Sulfotransferase-Aktivität für Schilddrüsenhormone ist jedoch daran beteiligt, dass es zu einem enterohepatischen Kreislauf für Schilddrüsenhormone kommt, unter Einbeziehung mikrobieller Enzymaktivitäten der gastrointestinalen Darmflora, welche Sulfatase und Glucuronyltransferaseaktivitäten ebenso katalysieren wie entsprechende Konjugationsreaktionen [Visser u. Kester 2002].

Sulfotransferase- und Sulfatase-Aktivität ist nicht nur im Gastrointestinaltrakt, sondern auch in verschiedenen Organen und Körperzellen beschrieben, z. B. Plazenta, Hypophyse und anderen Organen [Visser 1996; Visser u. Kester 2002]. Es muss davon ausgegangen werden, dass auch diese Konjugations- und Freisetzungsreaktionen an der entwicklungs- und gewebespezifischen Bereitstellung lokaler und systemisch zirkulierender Schilddrüsenhormone sowie ihrer Vorstufen und inaktiven Metaboliten mitwirken [Wu et al.1999].

Mit Störungen dieser Reaktionen und damit des aktivierenden und inaktivierenden Schilddrüsenhormonstoffwechsels muss insbesondere bei Anwendung verschiedener Pharmaka gerechnet werden [Köhrle 2004].

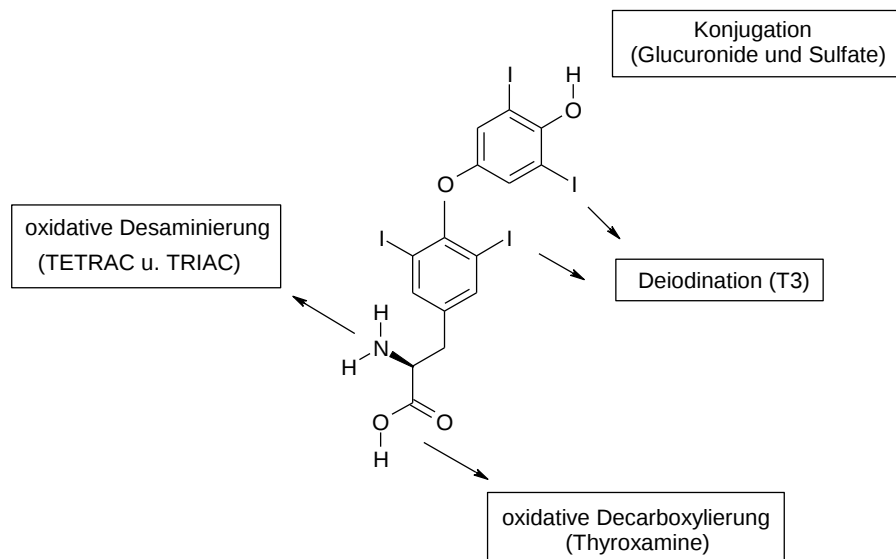


Abb. 2.13.: Metabolische Reaktionen von  $T_4$  in vivo [Baulieu et al.1990/ modifiziert].

#### 2.4.2. Nicht deiodierender Schilddrüsenhormonstoffwechsel

Nach jetzigem Wissensstand spielen Stoffwechselreaktionen, welche die Alaninseitenkette der Schilddrüsenhormone verändern und als Zielpunkt nehmen (oxidative Decarboxylierung oder Desaminierung) eine untergeordnete Rolle im Schilddrüsenhormonstoffwechsel [Köhrle u. Schmutzler 2003]. Vorwiegend in der Niere, aber auch in der Leber, Muskel und Gehirn entstehen aus  $T_4$  und  $T_3$  [Forth et al. 2009] durch oxidative Decarboxylierung die auch im Serum nachweisbaren Schilddrüsenhormonderivate der Tetraiodthyro-Essigsäure (TETRAC) und Triiodthyro-Essigsäure (TRIAC) ( Abb. 2.3.) [Löffler et al. 2007 (a)].

Die letzteren Metabolite sind sehr kurzlebig und werden durch die Deiodaseenzyme vor ihrer Ausscheidung weiter deiodiert. Vor kurzem wurde auch beschrieben, dass durch kombinierte Decarboxylierung und Deiodierung Monoiodthyronamin (T<sub>1</sub>AM) und das jodfreie Thyronamin (ToAM) gebildet werden und spezifische Wirkungen über so genannte *trace-amine associated Rezeptoren* (TAAR) entfalten können [Löffler et al. 2007 (a)].

Von größerer Bedeutung ist jedoch die Diphenyletherspaltung der Iodthyronine, welche unter oxidativer Dehalogenierung des phenolischen Rings der Iodthyronine verläuft, der hierbei zerstört wird [Köhrle u. Schmutzler 2003].

Ein Reaktionsprodukt dieser oxidativen Spaltung des Diphenyläthersystems ist das Diiodtyrosin (DIT), welches mit erhöhter Konzentration im Serum und in Körperflüssigkeiten bei der Sepsis und unter Konstellationen gemessen werden, wo aktivierte Makrophagen- und Phagocytoseaktivität auftritt. DIT könnte als ein diagnostischer Parameter für solche Stoffwechselkonstellationen genutzt werden [Meinhold et al. 1991].

### **3. Grundlagen und Entstehung von ROS**

Der molekulare Sauerstoff ist für aerob lebende Organismen essentiell und ohne dessen oxidierenden Einfluss, hinsichtlich umfängliche Energiebereitstellung, wäre ein multi-zelluläres Leben nicht möglich. Für Lebenwesen ist er reaktionsträge und unschädlich, jedoch bei einer physikalischen oder chemischen Aktivierung entstehen daraus angeregte Sauerstoffmoleküle, sogenannte reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS), die auch als Prooxidantien bezeichnet werden. Zu diesen gehören freie Radikale wie Hydroxylradikale, Superoxidanionen, Hydroperoxylradikale, um hier nur die Wichtigsten zu nennen. Alle ROS sind in normal funktionierenden Zellen vorhanden, wenn auch oft in äußerst geringen Konzentrationen. Etwa 1 - 5% des vom Menschen konsumierten Sauerstoffs enden in einer der unter ROS zusammengefassten Verbindungen [Jakobi et al. 2005].

Zellen produzieren fortwährend als Teil oxidativer und metabolischer Prozesse Radikale und reaktive Sauerstoffspezies. Die hohe Reaktivität und Instabilität dieser Spezies, die in aeroben Organismen zum größten Teil in den Mitochondrien gebildet werden, stellen für Zellen eine beträchtliche Belastung dar [Pfaar et al. 2006]. Diese Substanzen sind in der Lage, Lipide, Nukleinsäuren und Kohlenhydrate zu schädigen [Berlett u. Stadtman 1997].

Die ROS sind nicht nur an schädigenden Prozessen im Organismus beteiligt, sondern sie wirken als Signalmoleküle und Mediatoren von zellulären Vorgängen, wie der Steuerung des Zellzyklus, der Zellproliferation und der Apoptose [Pfaar et al. 2006]. Desweiteren stimulieren oder hemmen ROS das Wachstum von Zellen und können den Zelltod im Sinne einer Nekrose oder eines organisierten programmierten Zelltodes (Apoptose) auslösen [Guo et al. 2004].

Die Rolle der Mitochondrien als wichtigste Quelle von ROS erhält über die Bereitstellung von Energie hinaus eine zusätzliche Bedeutung [Cadenas 2004].

ROS sind an der zellulären Abwehr gegen Bakterien und anderen Mikroorganismen beteiligt und somit können sie durchaus als Teil eines Netzwerks zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase betrachtet werden [Hensley u. Floyd 2002]. Stressauslösende Faktoren für die Zellen wären neben hohen Konzentrationen von Metaboliten und Xenobiotika, auch Entzündungen, Verletzungen, Hitze, Bestrahlung, Sauerstoffmangel und übermäßige Muskularbeit, die zum Stress beitragen [Bakonyi u. Rada 2004].

Als Antwort auf den Stress bildet die Zelle reaktive Sauerstoffspezies. Diese entstehen durch Autooxidation z.B. von Catecholaminen, Flavinen und Ferredoxinen [Del Maestro 1980] sowie durch eine Vielzahl von pro- und antioxidativen Prozessen (Abb. 3.2.).

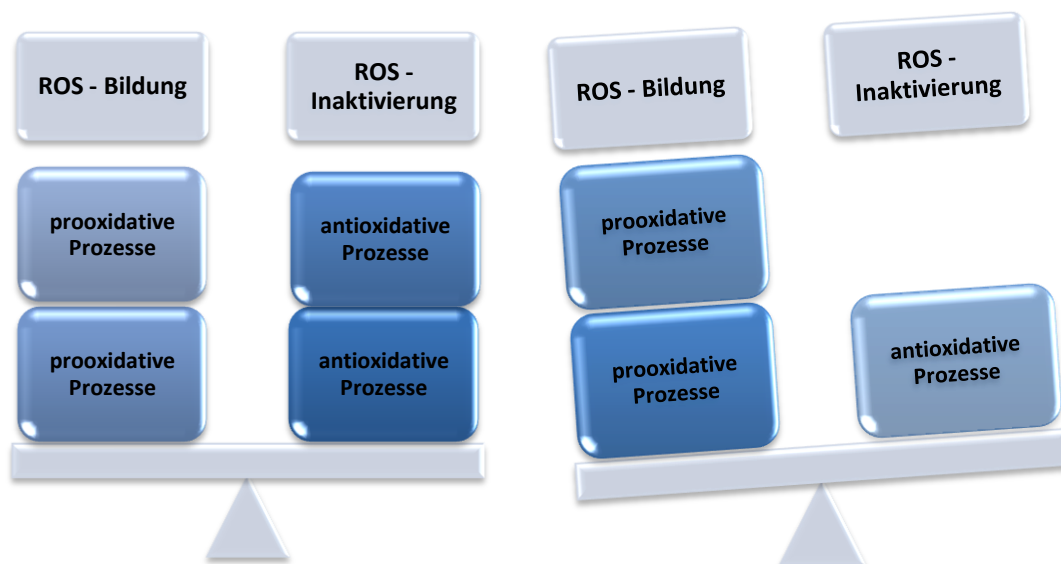


Abb. 3.1. Dysbalance von ROS-Bildung und ROS-Inaktivierung unter oxidoreduktiven Bedingungen [Pfaar et al. 2006 / modifiziert].

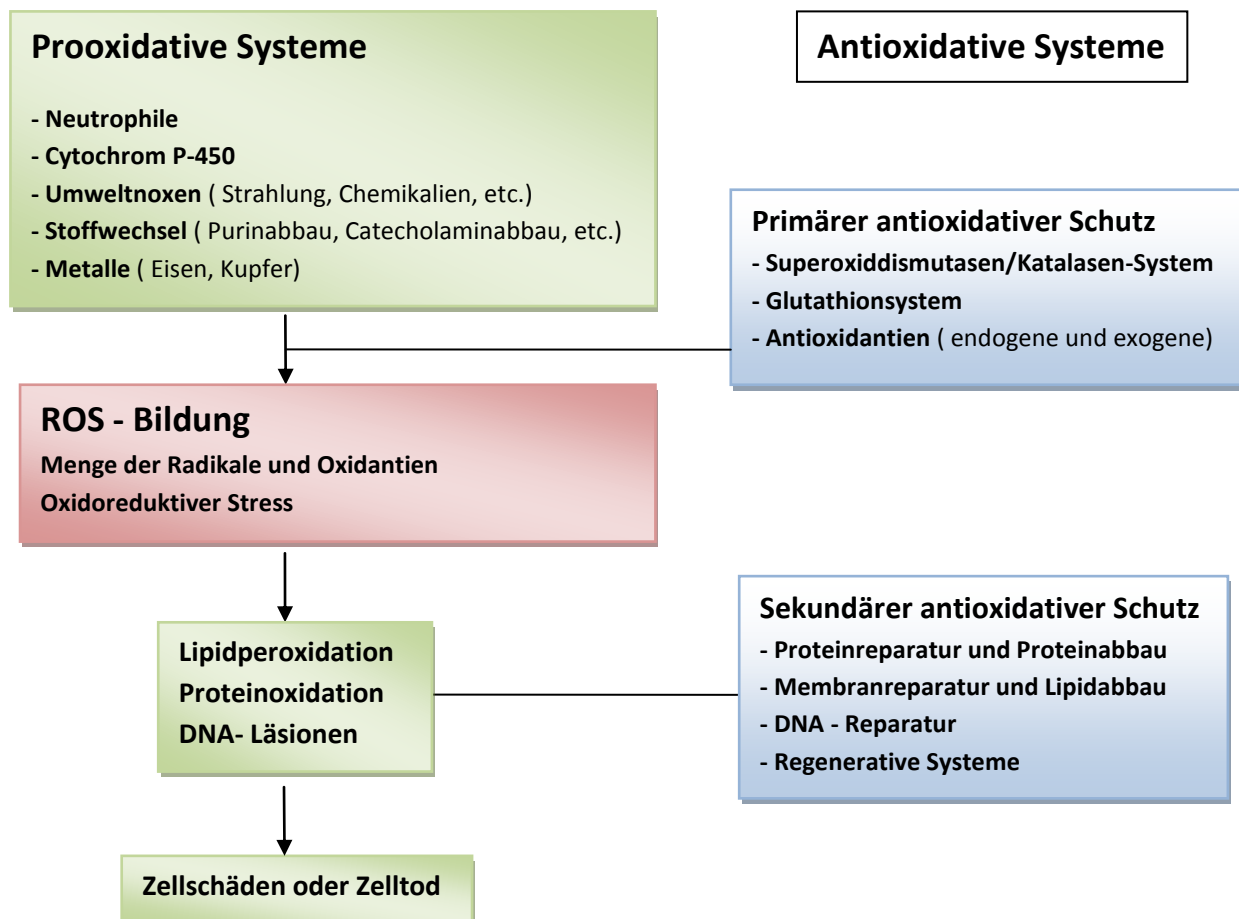


Abb. 3.2. ROS - Netzwerk: Die Wirkung von pro- und antioxidativen Systemen [Jakobi et al. 2005 / modifiziert].

Unter physiologischen Bedingungen ist es der Zelle möglich, der übermäßigen Produktion von ROS mit Hilfe eines antioxidativen Schutzsystems entgegenzuwirken. Dieses System ist aufgebaut aus primär schützenden und reparierenden Mechanismen (Abb. 3.2.).

Die primär schützenden Mechanismen verhindern die schädigende Wirkung von Oxidantien, d.h. bereits gebildete Oxidantien werden beseitigt, bevor es zu einer Oxidation von zellulären Makromolekülen kommt [Jakobi et al. 2005]. Dagegen beseitigen die reparierenden Mechanismen einmal oxidierte, funktionslose Bestandteile der Zelle entweder indem sie den Ausgangszustand wiederherstellen oder neu synthetisierte Bestandteile abbauen und ersetzen. Dazu gehören, die z.B. in der Abb. 3.2. angeführten sekundären Schutzsysteme.

Die primär antioxidativen Schutzsysteme, zu denen sowohl endogene enzymatische Systeme, wie das Superoxiddismutasen/Katalasen-System und das Glutathion-System gehören, als auch exogene nicht enzymatische Antioxidantien, wie z.B. Vitamin A, E und C oder auch Polyphenole, greifen oft auch an anderen Stellen des Stoffwechsels ein und können reaktive Sauerstoffspezies in weniger aggressive Substanzen umwandeln.

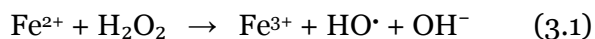
Antioxidative Prozesse können sowohl Abfangreaktionen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS-Scavenging) als auch präventive Reaktionen, die die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies verhindern, oder auch Reparaturmechanismen schon geschädigter Systeme darstellen.

Der oxidative bzw. oxidoreduktive Stress [Boelsterli 2003], die Akkumulation von ROS, ist daher eine Dysbalance (Ungleichgewicht) zwischen den ROS-bildenden (prooxidativen) und den ROS-inaktivierenden (antioxidativen) Prozessen (Abb. 3.1.). Es sind die Bildungsgeschwindigkeiten und stationäre Konzentrationen der Sauerstoffspezies, die den Übergang von der physiologischen Redoxregulation zur pathophysiologischen Situation des oxidoreduktiven Stresses bestimmen [Daiber u. Ulrich 2002].

### **3.1. Chemische Grundlagen und Historie**

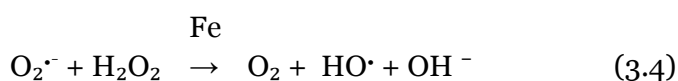
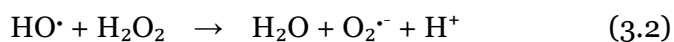
Im Jahre 1876 veröffentlichte Henry John Fenton (1854-1929) seine Beobachtung, dass eine Lösung von Eisen(II)sulfat in Gegenwart von geringen Mengen Weinsäure durch wenige Tropfen Wasserstoffperoxid einen violetten Farbumschlag erfährt [Fenton 1896].

Bei dieser Reaktion reduziert Eisen(II) Wasserstoffperoxid und es bildet sich ein hochreaktives Hydroxylradikal [Halliwell u. Gutteridge 1990]:

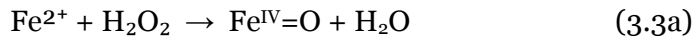


Diese sogenannte Fenton-Reaktion, die als Hauptquelle zur Entstehung von ROS in der Zelle angesehen werden kann, ist Bestandteil der FORT-Test-Messung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (ROM) [4. Methoden zur Messung von ROS und der antioxidativen Kapazität].

Wenige Jahre nach Fentons Tod publizierte Fritz Haber seine Arbeiten mit Willstätter und Weiss [Haber u. Willstätter 1931; Haber u. Weiss 1934]. Der wesentliche Beitrag von Haber und Weiss war die Erkenntnis, dass das hochreaktive Hydroxylradikal durch Reaktion von Superoxidanion und Wasserstoffperoxid gebildet wird.



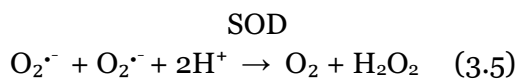
Die beiden Reaktionen (2) und (3) ergeben in Verbindungen mit der Fenton-Reaktion (1) die Haber-Weiss-Reaktion. Später wurde durch verschiedene Arbeitsgruppen in In-vitro-Experimenten bestätigt, dass Eisen die Haber-Weiss-Reaktion katalysiert und zur Bildung hochreaktiver Hydroxylradikale führt [Halliwell 1978]. Seit kurzem wird diskutiert, ob chelatisierbare Eisenionen die Bildung reaktiver Eisen-Sauerstoff-Komplexe (Ferryl-Spezies) initiieren können (Gleichung 3a; [Qian u. Buettner 1999]).



Hydroxylradikale und Eisen-Sauerstoff-Komplexe sind hochreaktive Spezies und können in Abhängigkeit von den Konzentrationsverhältnissen der Reaktanten  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2$ , entweder aus molekularem Sauerstoff oder aus  $\text{H}_2\text{O}_2$  hervorgehen [Qian u. Buettner 1999]. Generell fehlt es jedoch noch an einer genaueren Charakterisierung der Ferryl-Spezies.

Im Jahre 1954 formulierten Rebecca Gershman und Daniel Gilbert die Hypothese, dass die meisten schädigenden Wirkungen des Sauerstoffs durch freie Sauerstoffradikale erklärt werden können. Historisch betrachtet ist die Veröffentlichung ihrer Arbeit die Geburtsstunde der ROS in der Biochemie [Gershman et al. 1954].

Viele Jahre vergingen, bis es schließlich zur Entdeckung der Superoxiddismutase (SOD) durch McCord und Fridovich kam [McCord u. Fridovich 1969a; McCord u. Fridovich 1969b; Fridovich 1983]. Ein Meilenstein des Entgiftungsprozesses radikalischer Sauerstoffspezies:



### 3.1.1. Wichtige Vertreter reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Wie bereits im Kapitel 3.1. erwähnt erfolgt, im Körper die Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, „reactive oxygen species“) fortlaufend und durch antioxidative Abwehrmechanismen werden sie gleichermaßen wieder entfernt. Oxidativer Stress entsteht in biologischen Systemen entweder durch eine erhöhte Exposition gegenüber Oxidanzien oder durch eine erniedrigte antioxidative Kapazität. Dieses Ungleichgewicht (Abb. 3.1.) zeigt sich in einer erhöhten Konzentration an ROS. Neben den reaktiven Sauerstoffspezies gibt es auch reaktive Stickstoffspezies (RNS) [Dalle-Donne et al. 2005].

ROS können Radikale oder nichtradikalische Sauerstoffspezies sein [Pfaar et al. 2006], die imstande sind zelluläre Komponenten wie Lipide, Proteine, Kohlenhydrate und DNA anzugreifen und funktionell schwer zu beeinträchtigen (Tabelle 3.1.).

| Radikalische ROS (RNS)  |                       |               | Nichtradikalische ROS (RNS) |                    |               |
|-------------------------|-----------------------|---------------|-----------------------------|--------------------|---------------|
| Spezies                 | Name                  | Halbwertszeit | Spezies                     | Name               | Halbwertszeit |
| $\text{HOO}^\bullet$    | Hydroxyperoxylradikal | -             | $\text{H}_2\text{O}_2$      | Wasserstoffperoxid | enzymat.Abbau |
| $\text{HO}^\bullet$     | Hydroxylradikal       | $10^{-9}$ s   | $^1\text{O}_2$              | Singuletsauerstoff | $10^{-5}$ s   |
| $\text{O}_2^{\bullet-}$ | Superoxidanionradikal | enzymat.Abbau | $\text{HOCl}$               | Hypochlorsäure     | -             |
| $\text{RO}^\bullet$     | Alkoxyradikal         | $10^{-6}$ s   | $\text{O}_3$                | Ozon               | -             |
| $\text{ROO}^\bullet$    | Peroxyradikal         | 7 s           | $\text{ONOO}^-$             | Peroxynitrit       | 1 s           |
| $\text{NO}^\bullet$     | Stickstoffmonoxid     | $1^{-10}$ s   |                             |                    |               |

Tab. 3.1. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) mit radikalischen und nicht radikalischen Eigenschaften [Pfaar et al. 2006, Sies (1993), Cui et al. 2004/modifiziert].

#### 3.1.1.1. Freie Radikale

Normalerweise werden Orbitale durch gepaarte Elektronen besetzt, deren Spins entgegengesetzt gerichtet sind. Ein freies Radikal ist eine Spezies (Molekül oder Ion), die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzt, wobei das ungepaarte oder auch „einsame“ Elektron ( $\bullet$ ) ein Orbital allein belegt. Diese freien Elektronen bewirken, dass Radikale paramagnetisch sind und so von einem Magnetfeld angezogen werden können. Das einfachste freie Radikal ist der atomare Wasserstoff  $\text{H}^\bullet$ ; er besitzt nur ein Elektron. Radikale sind sehr reaktionsfreudig und kurzlebig, da sie auf Grund des einzelnen Elektrons eine starke Tendenz haben, ein zweites Elektron von einem potenziellen Reaktionspartner zu entziehen, um eine höhere chemische Stabilität zu erreichen [Oberdanner 2003].

Auch molekularer Sauerstoff  $\text{O}_2$  ist ein Biradikal, da dieser über zwei ungepaarte Elektronen verfügt. Der von den humanen Zellen aufgenommene Sauerstoff wird unter Beteiligung des Cytochromoxidase-Komplexes in den Mitochondrien stufenweise zu Wasser reduziert (Abschn. 3.3.1.1. ROS-Bildung in den Mitochondrien). Berechnungen zufolge werden ungefähr 5% des aufgenommenen molekularen Sauerstoff in ROS umgewandelt [Cui et al. 2004].

Folgende Reaktionen von Radikalen sind möglich:

1.) Dimerisierung:  $A\cdot + B\cdot \rightarrow A - B$

2.) Addition an Doppelbindungen:  $A\cdot + \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ C = C \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} \rightarrow \begin{array}{c} A \\ | \\ -C - C\cdot - \\ | \end{array}$

3.) Wasserstofftransfer:  $A\cdot + R - H \rightarrow A - H + R\cdot$

4.) Elektronentransfer:  $A + B \rightarrow A^{\cdot+} + B^{\cdot-}$

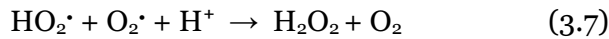
#### *3.1.1.2. Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ )*

Wasserstoffperoxid wird durch Oxidaseenzyme gebildet ( Abschn. 3.3.1.1. NADPH-Oxidase u. Xanthinoxidase). Es ist ein relativ unreaktives, stabiles Zwischenprodukt und kann auf Grund seiner Membranpermeabilität von seinem Entstehungsort wegdiffundieren [Oberdanner 2003]. Sehr toxische organische Peroxide können durch zweifachen Elektronentransfer in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff bei Verbindungen, die Doppelbindungen besitzen (z.B. ungesättigte Fettsäuren), entstehen (Abschn. 3.2.2.1. Reaktionen von ROS mit Lipiden).

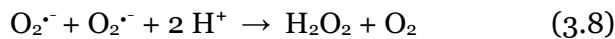
#### *3.1.1.3. Superoxidanion ( $O_2^{\cdot-}$ )*

Das Superoxidanion ist ein wichtiges second messenger Molekül, von welchem das sog. „leaky mitochondrial electron transfer“ (Abschn. 3.3.1.1. ROS-Bildung in den Mitochondrien) von großer Bedeutung ist. Es wird freigesetzt von Leukozyten und durch super-oxid-dismutase-katalysierte Dismutation zu  $H_2O_2$  und  $O_2$  abgebaut. In wässrigem Milieu ist das Superoxidanion wenig reaktiv und reagiert als Reduktionsmittel z.B. mit Cytochrom c oder Nitro-Tetrazolium Blau.

Unter langsamer Dismutation, welche in zwei Schritten unter Bildung eines Hydroperoxylradikals verläuft, werden Superoxidanionen in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff übergeführt:



total



Durch die geringen  $\text{H}^+$ -Ionen-Konzentrationen bei physiologischen pH-Wert ist die Geschwindigkeit der Dismutation des Superoxidanions erniedrigt. Trotz der relativ geringen Reaktivität des Superoxidanions im wässrigen Milieu kann dieses Radikal recht große Schäden verursachen, so z.B. in vitro DNA und Polysaccharide fragmentieren, Bakterien und tierische Zellen abtöten und in vivo Entzündungen und Ödeme hervorrufen sowie den Zelltod auslösen [Pfaar et al. 2006].

#### 3.1.1.4. Peroxylradikale ( $\text{ROO}^{\cdot}$ )

Peroxylradikale werden vor allem durch Lipidperoxidation erzeugt, aber auch durch die Reaktion von Thiylradikalen mit molekularem Sauerstoff [Cui et al. 2004] (Abschn. 3.2.2.1. Reaktionen von ROS mit Lipiden).

#### 3.1.1.5. Hydroxylradikale ( $\text{HO}^{\cdot}$ )

Hydroxylradikale ( $\text{HO}^{\cdot}$ ) werden durch metallkatalysierte Reaktionen von Superoxid und Wasserstoffperoxid gebildet, aber auch durch Strahlung oder Zerfall von Peroxynitrit [Pfaar et al. 2006]. Diese äußerst reaktive, aber ungeladene Spezies kann in freie Radikalkettenreaktionen involviert werden. Die sehr niedrige Halbwertszeit von  $10^{-9}$  s (Tab. 3.1.) bei  $37^\circ\text{C}$  [Cui et al. 2004] erklärt die überaus kurze Reichweite von Hydroxylradikale von nur 15 Å ausgehend von seinem Bildungsort bis zur Weiterreaktion mit einem anderen Molekül. Hydroxylradikale gehören zu den aggressivsten ROS-Vertretern und lösen extensive Schädigungen an Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden aus. Die Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA: „poly-unsaturated fatty acids“) wurde als einer der schwersten Angriffe auf die zelluläre Integrität beschrieben [Cui et al. 2004].

### 3.1.2. ROS Reaktionen

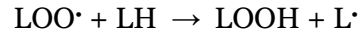
#### 3.1.2.1. Reaktion von ROS mit Lipiden (Lipidschäden / Lipidperoxidation)

Die Auswirkung radikaler Sauerstoffspezies auf Membranlipide ist besonders gut untersucht [Löffler 2007]. In Studien zahlreicher Arbeitsgruppen [Hochstein u. Ernster 1963; Recknagel u. Gosphal 1966] wurden die Zusammenhänge zwischen der Bildung freier Radikale in Zellen und Geweben, die Lipidperoxidation als Basis für Toxizität und die damit verbundenen Schädigungen durch Reaktionen mit Nukleinsäuren, Nukleotiden, Proteinen und Polysacchariden belegt. Die Reaktionen von ROS mit Lipiden führt u.a. zu einem oxidativen Abbau von Phospholipiden und Cholesterol und wird als Lipidperoxidation bezeichnet [Pfaar et al. 2006].

Die Lipidperoxidation verläuft nach dem Prinzip der radikalischen Kettenreaktion in drei Phasen [Gutteridge u. Halliwell 2000]:

Kettenstart:  $\text{LH} + \text{X}^\bullet \rightarrow \text{L}^\bullet + \text{LH}$

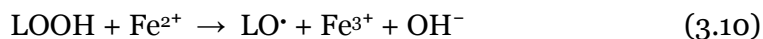
Kettenverlängerung:  $\text{L}^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{LOO}^\bullet$



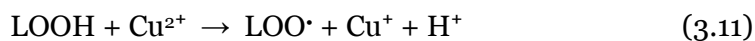
Kettenabbruch:  $2\text{LOO}^\bullet \rightarrow$  nicht-  
 $\text{LOO}^\bullet + \text{L}^\bullet \rightarrow$  radikalische  
 $\text{L}^\bullet + \text{L}^\bullet \rightarrow$  Substanzen

(3.9)

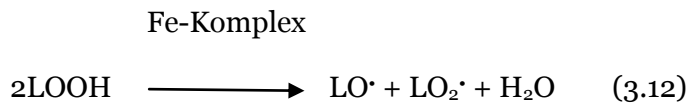
Die Reaktion von Lipidperoxidation mit Fe(II) oder Cu(I) führt zu Lipidalkoxyradikalen:



Bei der Reaktion von Lipidperoxiden mit Cu(II) entstehen Lipidperoxyradikale (Burkitt 2001):



Sowohl Alkoxy- als auch Peroxylradikale stimulieren die Kettenreaktion der Lipidperoxidation unter Abstraktion eines Wasserstoffatoms. Ungesättigte Fettsäuren besitzen immer Spuren von peroxidierten Fettsäuren. Katalytische Mengen von Eisenkomplexen stimulieren die Peroxidation durch Peroxidzerfall unter Bildung von Lipidalkoxy- ( $\text{LO}\cdot$ ) und Lipidperoxylradikalen ( $\text{LO}_2\cdot$ ):

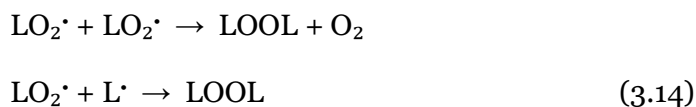


Sowohl die selenabhängigen Glutathionperoxidasen als auch die selenunabhängigen Glutathion-S-Transferasen der  $\alpha$ -Klasse reduzieren die Bildung von LOOH, und damit verringern sie den oxidativen Stress in der Lipidmembran und die Lipidperoxidation [Pfaar et al. 2006].

Aber auch Hydroxylradikale, welche durch die eisenkatalysierte Fenton-Reaktion gebildet werden, können die Lipidperoxidation durch H-Abstraktion auslösen:



Die Freie-Radikal-Kettenreaktion der Lipidperoxidation schreitet fort, bis zwei Lipidperoxylradikale aufeinandertreffen oder ein Lipidradikal mit einem Lipidperoxylradikal zu einem zyklischen Peroxid reagiert (LOOL):



Wenn ROS, wie z.B. das Superoxidanion oder das Hydroxylradikal, in der Nähe der Zellmembran freigesetzt werden, so sind die Membranphospholipide ihre Targets, wenn die antioxidativen Abwehrmechanismen unzureichend sind (Abschn. 3.3 Antioxidanzien und Radikalfänger). Fettsäuren, die mehrere Doppelbindungen besitzen (PUFA), sind besonders anfällig für Peroxidationen, d.h. die Abstraktion von Wasserstoff (Abb. 3.3.) [Pfaar et al. 2006].

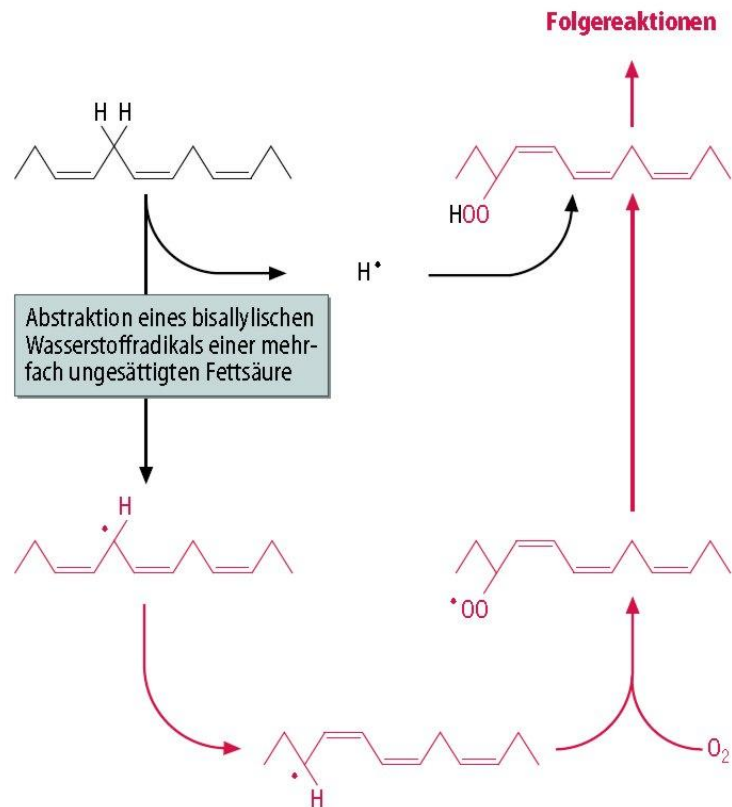


Abb. 3.3.: Entstehung von Lipidperoxiden. Bisallylische Fettsäureradikale entstehen z.B. unter der Einwirkung reaktiver Sauerstoffspezies auf mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Die anschließende Anlagerung von  $O_2$  führt zur Bildung von Peroxyradikalen. Diese werden durch Abstraktion eines H-Radikals aus einer weiteren ungesättigten Fettsäure in die entsprechenden Peroxide umgewandelt, sodass ein zyklischer Prozess entsteht, der große Mengen von Fettsäureperoxiden liefern kann [Löffler 2007].

### 3.1.2.2. Reaktion von ROS mit DNA (DNA-Schäden)

Reaktionen von Hydroxylradikalen mit DNA (H-Abstraktion, Addition und Elektronentransfer) verlaufen über den Angriff an allen vier Basen oder an Desoxyribose unter der Bildung von C-Radikalen. Hydroxylradikale addieren z.B. an C5-C6-Doppelbindung von Pyrimidinen, abstrahieren Wasserstoff von Methylgruppen aus Thymin und addieren an Purinbasen in Position C4, C5 und C8 [Aust u. Eveleigh 1999].

Die oxidative Hydroxylierung von Guanin in Position C8 ist die am häufigsten vorkommende und die am meisten mutagene Läsion in der nukleären und in der mitochondrialen DNA [Wu et al. 2004], die zur Mutagenese und Karzinogenese führen kann. Aufgrund der 8-Hydroxylierung des Guanins kann die Basenpaarung gestört werden oder auch ein Fehllesen der modifizierten Base auftreten. Das 8-Hydroxydeoxyguanosin (8-OhdG), welches renal ausgeschieden wird, ist ein Biomarker des oxidativen Stresses und kann direkt durch HPLC-MS oder ELISA quantitativ gemessen werden (Abb. 3.4.) [Pfaar et al. 2006].

Im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen wurden erhöhte Spiegel des 8-OhdG gefunden z.B. Diabetes, diabetischer Nephropathie, Retinopathie und artherosklerotischen Plaques, ebenso wie bei Arbeitern, die beruflich zu Benzol, Asbest, Gummi oder Azofarbstoffen exponiert waren [Kim et al. 2004]. Oxidative DNA-Schädigung wird u. a. durch hochreaktive Hydroxylradikale, welche aus der eisenkatalysierten Fenton-Reaktion freigesetzt werden, ausgelöst. In akut-lymphoblastischen T-Zellen 1301, wurde gezeigt, dass die durch  $H_2O_2$  induzierte DNA-Schädigung durch Chelatisierung von Eisen (DFO: Desferrioxamin) verhindert wird. Wahrscheinlich verfügen Lysosomen über eine Quelle von redox-aktivem Eisen, so dass unter oxidativem Stress vermehrt Eisen vom Zellkern aufgenommen werden kann und folglich eine DNA-Schädigung induziert wird [Kurz et al. 2004].

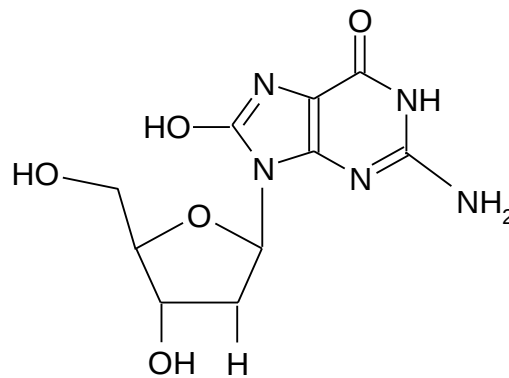


Abb. 3.4: 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosin [Pfaar et al. 2006]

### 3.1.2.3. Reaktion von ROS mit Polysacchariden

Die Hyaluronsäure ist ein lineares saures Polysaccharid, das wesentlicher Bestandteil des Bindegewebes und der Synovialflüssigkeit der Gelenke ist. In Anwesenheit von ROS können Hyaluronsäuren zerstört werden. Versuche mit kultivierter menschlicher Haut weisen jedoch darauf hin, dass Metallionen diese Polysaccharide vor einem ROS-induzierten Abbau schützen können [Balogh et al. 2003].

#### *3.1.2.4. Reaktion von ROS mit Proteinen (Proteinschäden / Proteinperoxidation)*

Proteine können sowohl direkt durch reaktive Sauerstoffspezies als auch indirekt, z.B. durch Lipidperoxidationsprodukte, modifiziert werden. Thiole z.B. von Cystein reagieren mit Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) oder auch persalpetriger Säure ( $\text{ONOOH}$ ) zu Disulfiden, Sulfen-, Sulfin- und Sulfonsäuren. Während des oxidativen Stresses können sowohl reversible als auch irreversible Modifikationen an Proteinen eintreten. Auf Grund sterischer Hinderungen reagieren Protein-SH-Gruppen bevorzugt mit GSH, dessen Zellkonzentrationen von 0,5-10 mM recht hoch sind. Durch die Ausbildung von Disulfidbrücken, können Proteine vernetzt werden („cross-linking“), und es entstehen Proteinaggregate.

Die Carbonylierung von Proteinen (PCO) wird u.a. durch die Reaktion von Aldehyden und Ketonen (z.B. durch Reaktion mit 4-Hydroxynonenal (4-HNE), Acrolein (2-Propenal) oder Malondialdehyd (MDA), welche durch Lipidperoxidation gebildet wurden, initiiert. Der direkte oxidative Angriff von ROS auf Lysin, Arginin, Prolin oder Threonin sowie die sekundäre Reaktionen, z.B. von Lipidperoxidationsprodukten mit Cystein, Histidin oder Lysin führt zur PCO-Bildung, d.h. zur Entstehung von Aldehyden und Ketonen [Pfaar et al. 2006]. Die PCO sind nicht nur ein Zeichen oxidativen Stresses, sondern auch ein Hinweis für Proteindysfunktionen [Dalle-Donne et al. 2003]. Hydroxylradikale reagieren mit Phenylalanin zu ortho-Tyrosin, einer nicht natürlichen Aminosäure, welche mit dem Urin ausgeschieden wird und [Biondi et al. 2001] durch Peroxidasen können Tyrosylradikale zu o,o'-Dityrosin dimerisiert werden.

In Ratten, die Schwimmtests unterzogen wurden, konnte eine 50%ige Zunahme von o-Tyrosin, m-Tyrosin und o,o'-Dityrosin in mitochondrialen Proteinen des Herzmuskels mittels GC-MS gefunden werden, während die zytosolischen Proteine des Herzmuskels keine Zunahme der Oxidation zeigten. Nach einer Erholungsphase der Versuchstiere wurden wieder die Normalwerte oxidativer Tyrosinderivate in den mitochondrialen Proteinen und auch die der renal eliminierten o,o'-Tyrosin-Werte erreicht. Daraus ergibt sich, dass die o,o'-Tyrosin-Ausscheidung im Urin zur nichtinvasiven Bestimmung des oxidativen Stresses dienen kann [Leeuwenburg et al. 1999].

### **3.2. Enzymatische Grundlagen**

Der molekulare Sauerstoff, als zentrales Substrat der Atmungskette, ist zwar ein starkes Oxidationsmittel, besitzt aber eine geringe Reaktivität. Die Umsetzung von molekularem Sauerstoff wird daher durch Enzyme unterstützt. Die Cytochromoxidase der Atmungskette verbraucht etwa 90% des gesamten von aeroben Organismen aufgenommenen Sauerstoff. Die restlichen 10% werden von den Enzymen wie der NADPH-Oxidase, der NADPH-Cytochrom-P<sub>450</sub>-Reduktase CYP<sub>450</sub>-Monooxygenasen und anderen verbraucht [Pfaar et al. 2006].

### 3.2.1. Enzymatische Bildung von ROS

Reaktive Sauerstoffspezies entstehen aus unvollständigen Reduktionen von  $O_2$  des zellulären Metabolismus, wenn ein Sauerstoffmolekül weniger als 4 Elektronen aufnimmt [Christen u. Jaussi 2004]. Sie entstehen durch Autooxidation z.B. von Catecholaminen, Flavinen und Ferredoxinen [Del Maestro 1980] oder unter Beteiligung der unterschiedlichsten Enzymsysteme (Abb. 3.5.), Xenobiotika und phagozytierten Zellen [Pfaar et al. 2006].

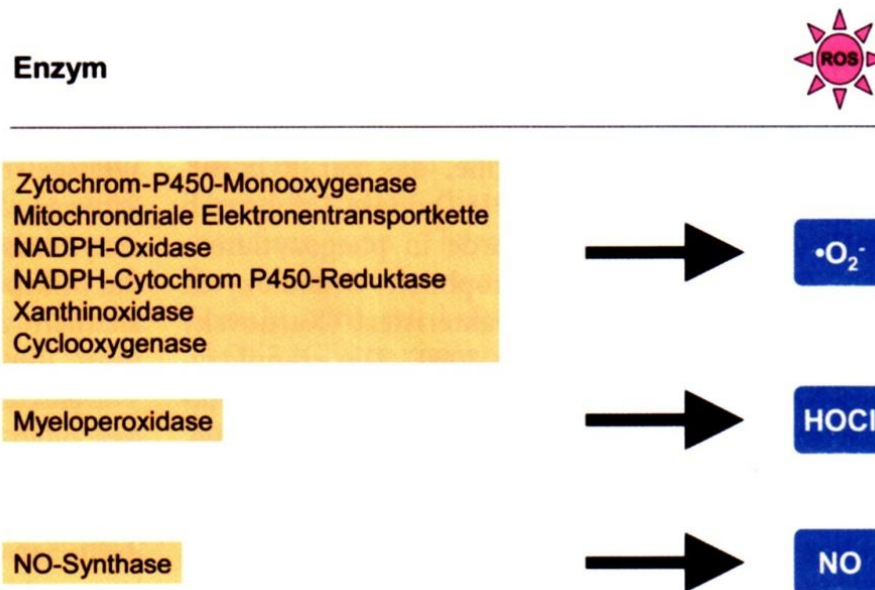


Abb. 3.5.: Enzymvermittelte ROS-Bildung [Pfaar et al. 2006].

#### 3.2.1.1. Einige wichtige Vertreter zur enzymvermittelten ROS-Bildung

##### 3.2.1.1.1. ROS-Bildung in den Mitochondrien

Der größte Teil der metabolischen Energie wird durch enzymkatalysierte Redoxreaktionen in den Mitochondrien bereitgestellt. Die Kapazität des aeroben Energiestoffwechsels ist abhängig von der oxidativen Phosphorylierung, die Teil der Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran ist (Abb. 3.6.).

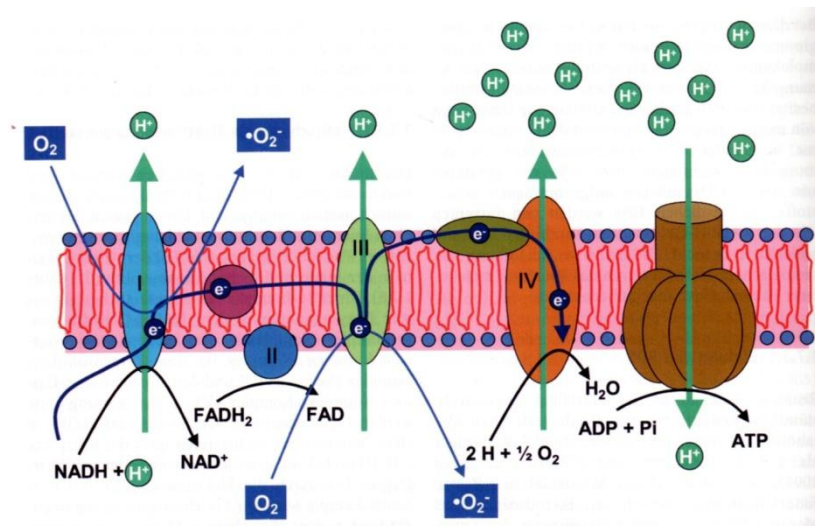


Abb. 3.6.: ROS-Bildung in den Mitochondrien [Pfaar et al. 2006].

Die mitochondriale Atmungskette besteht aus vier Enzymkomplexen, dem NADH-Dehydrogenase-Komplex (Komplex I), dem Succinat-Dehydrogenase-Komplex (Komplex II), dem Cytochrom-bc<sub>1</sub>-Komplex (Komplex III) und dem Cytochrom-c-Oxidase-Komplex (Komplex IV). In der Atmungskette werden Elektronenpaare von NADH und FADH<sub>2</sub> in einer Sequenz von Redoxstufen über die Komplexe I, II, III und IV auf den molekularen Sauerstoff übertragen.

Die durch die Elektronenabgabe frei werdende Energie wird zur Errichtung eines Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran benötigt und der Abbau dieses Gradienten zur ATP-Erzeugung verwendet (ATP- Synthase) [Pfaar et al. 2006].

Während der Elektronenübertragung an den vier Komplexen kann es durch unvollständige Reduktion von Sauerstoff (ca. 1-3% des in den Mitochondrien umgesetzten Sauerstoffs) zur Entstehung von ROS kommen [Thannickal u. Fanburg 2000]. Die mitochondriale Produktion der ROS erfolgt an zwei Stellen, nämlich am Komplex I (NADH-Dehydrogenase) und am Komplex III (Cytochrom-bc<sub>1</sub>-Komplex). Bis zu 1% des mitochondrialen Elektronenflusses führt vorwiegend zur Bildung von Superoxidanionen [Dalle-Donne et al. 2005].

Die auf beiden Seiten der inneren Mitochondrienmembran gebildeten Superoxidanionen werden sehr effektiv über die Superoxiddismutase (SOD) und die Glutathionperoxidase (GPx) zu Wasserstoffperoxid und Wasser umgewandelt. In den Mitochondrien werden ungefähr 2 nmol Superoxidanionen pro Minute und mg Protein gebildet, was die Wichtigkeit als physiologische Quelle von ROS dokumentiert [Inoue et al. 2003].

### 3.2.1.1.2. NADPH-Oxidase

Eines der wichtigsten Enzyme, das zur ROS-Bildung beiträgt, ist die NADPH-Oxidase [Mohazzab et al. 1994]. Das Enzym wurde in phagozytierten Zellen, wie den Granulozyten und den Makrophagen charakterisiert [Jones u. Hancock 2000]. Die *granulozytäre NADPH-Oxidase* dient der Abwehr von Mikroorganismen, Tumorzellen und anderen Zellen, die der menschliche Organismus beseitigen muss. Die zelluläre Antwort auf infektiöse Agenzien und andere Stimuli bewirkt einen raschen Verbrauch von Sauerstoff. Dieser Vorgang wird als „respiratory burst“ bezeichnet und stellt die wichtigste Quelle für die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies dar (Abb. 3.7.) [Pfaar et al. 2006].

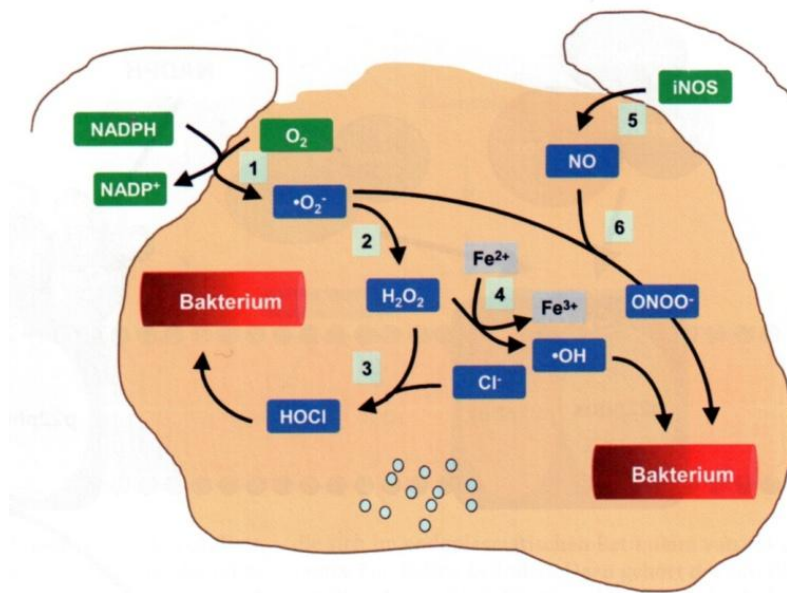


Abb. 3.7.: Schematische Darstellung der ROS-abhängigen Vorgänge, die zur Eliminierung eines Bakteriums durch Granulozyten führen [Pfaar et al. 2006].

- (1) Aktivierung der NADPH-Oxidase an der äußeren Seite der Plasmamembran initiiert den „respiratory burst“ mit der Bildung des Superoxidanions. Während der Phagozytose wird die Plasmamembran eingestülpt, so dass das Superoxidanion in die Vakuole freigesetzt wird.
- (2) Die Superoxiddismutase katalysiert die Bildung von Wasserstoffperoxid.
- (3) Granula, die die Myeloperoxidase enthalten, werden ins Phagosom sekretiert, und das Enzym unterstützt die Freisetzung von  $\text{HOCl}$ .
- (4) Das Hydroxylradikal kann über die Fenton-Reaktion aus Wasserstoffperoxid gebildet werden.
- (5) Die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase kann Stickstoffmonoxid generieren.
- (6) Zusammen mit dem Superoxidanion kann das  $\text{NO}$  Peroxynitrit erzeugen. Das Resultat ist die Lyse des Bakteriums [Marks et al. 2005, adaptiert].

Für die Bildung verantwortlich ist die Aktivierung der NADPH-Oxidase, die aus einem Ruhezustand in den aktivierten Zustand übergeführt wird (Abb. 3.8) [Pfaar et al. 2006]. Dieses Enzym ist ein großer Multienzymkomplex, der aus sechs verschiedenen Untereinheiten besteht [Groemping u. Rittinger 2005].

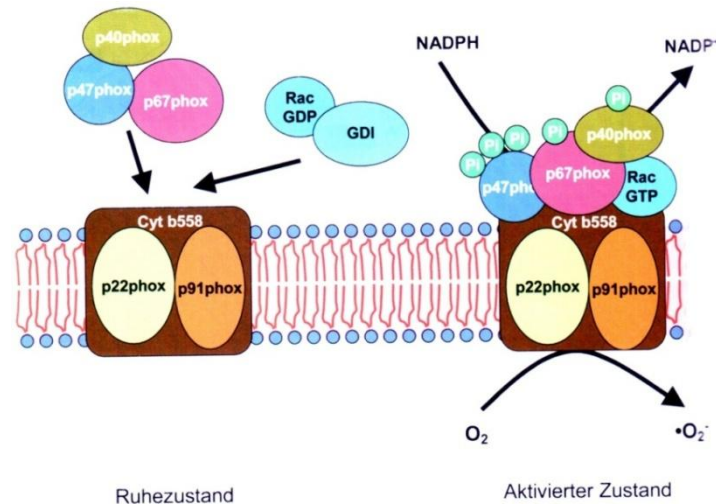


Abb. 3.8: Schematische Darstellung der NADPH-Oxidase und ihre Aktivierung [Pfaar et al. 2006].

Zwei NADPH-Oxidase-Untereinheiten p91phox und p22phox bilden das Flavozytochrom b558. Während des Aktivierungsprozesses werden verschiedene zytosolische Proteinfaktoren zum aktiven NADPH-Oxidase-Komplex zusammengefügt. Die Phosphorylierung zum aktiven Komplex erfolgt durch die GTPase Rac und das Regulatorprotein GDI [Pfaar et al. 2006].

In einer konzentrierten Aktion von enzymatischen und chemischen Reaktionen werden die Mikroorganismen im Phagosom attackiert, was schließlich zur Lyse des invaginierten Organismus führt. Der ganze Prozess dauert nur etwa 30-60 min [Pfaar et al. 2006].

Die Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches zur Biosynthese der Schilddrüsenhormone T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> erforderlich ist, wird durch eine *Ca<sup>2+</sup>/NADPH-abhängige Oxidase* katalysiert. Die Schilddrüsenhormone T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> regulieren den Metabolismus, die Gewebedifferenzierung und die Entwicklung des Menschen (siehe Abschn. 1.2.2. Biosynthese der Schilddrüsenhormone). Das Thyroidea stimulierende Hormon (TSH) gelangt über das Blut zu der Schilddrüse und stimuliert die Aufnahme von Jod und die Synthese von T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub>. Der Einbau von Jod in T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> und deren Kopplung an das Thyreoglobulin wird durch die Thyreoperoxidase (TPO), die sich in der apikalen Plasmamembran von Thyrozyten befindet, katalysiert [Pfaar et al. 2006].

Das Wasserstoffperoxid, das für die Jodierung gebraucht wird, wird durch Katalase von ThOX1 und ThOX2 (Glykoproteine, die zur Familie der NADPH-Oxidasen gehören) gebildet [Fortemaion et al. 2005]. Diese sind Teil des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- generierenden Systems und befinden sich ebenfalls in der apikalen Plasmamembran der Thyrozyten.

Das  $\text{H}_2\text{O}_2$ - generierende System der Thyrozyten und das Superoxidanion produzierende System von Makrophagen und Leukozyten weist zahlreiche funktionale Analogien auf. Im Falle der Thyrozyten sind es die ThOX1 und ThOX2, und im Falle der Leukozyten sind es die Proteine gp67phox, gp47phox, gp91phox und rac. In beiden Zelltypen wird die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung durch  $\text{Ca}^{2+}$  und Diacylglycerin aktiviert [Pfaar et al. 2006].

#### *3.2.1.1.3. Myeloperoxidase (MPO)*

Die Myeloperoxidase (MPO) bildet hypochlorige Säure (HOCL), ist in den Granulozyten Teil der konzentrierten Abwehr von Bakterien und gehört zur Peroxidase-Superfamilie [Arnhold 2004]. Nach der Aktivierung neutrophiler Granulozyten (Abb. 3.8.) wird eine Signal-Übertragungskaskade angeschaltet, deren Ziel die Bildung von ROS ist. Die NADPH-Oxidase reduziert den molekularen Sauerstoff zu Superoxidanionradikalen. Gleichzeitig wird bei Aktivierung der Granulozyten aus den Granula die MPO sezerniert, die die Bildung von HOCL katalysiert. Das Hypochlorit weist eine stark antiseptische Wirkung auf [Pfaar et al. 2006].

#### *3.2.1.1.4. Xanthinoxidase (XOR)*

Die Xanthinoxidoreduktasen (XOR) gehören zur Familie der Molybdopterin-Enzyme. Sie sind Teil des Purinabbauweges und metabolisieren Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure. Die Genexpression der XOR wird durch den Sauerstoffpartialdruck, Zytokine und Glucocorticoide reguliert. Das Enzym existiert in zwei Formen, der Xanthinoxidase (XO) und der Xanthindehydrogenase (XDH), die ihre Elektronen entweder auf den Sauerstoff oder auf  $\text{NAD}^+$  übertragen, wobei es eine hohe Affinität für  $\text{NAD}^+$  aufweist und nur eine geringe für den Sauerstoff [Stirpe u. Della Corte 1969].

Die wichtigste Funktion von XOR, die in den Membransystemen von Leberzellen der Ratte nachgewiesen wurde, ist nicht die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, sondern die Bereitstellung von Harnsäure als Antioxidans [Frederiks u. Vreeling-Sindelarova 2002].

#### *3.2.1.1.5. NADPH-Cytochrom- $P_{450}$ -Reduktase (CPR)*

In Nebenreaktionen vieler enzymatischer Umsetzungen entstehen eine signifikante Menge an Superoxid-Radikale. Bedeutend sind in diesem Zusammenhang die Nebenreaktionen des Cytochrom  $P_{450}$ , bei denen direkt oder über die Bildung und Freisetzung spontan autoxidabler Semichinone freies Superoxid entstehen kann. (Abb. 3.9.) [Löffler 2007].

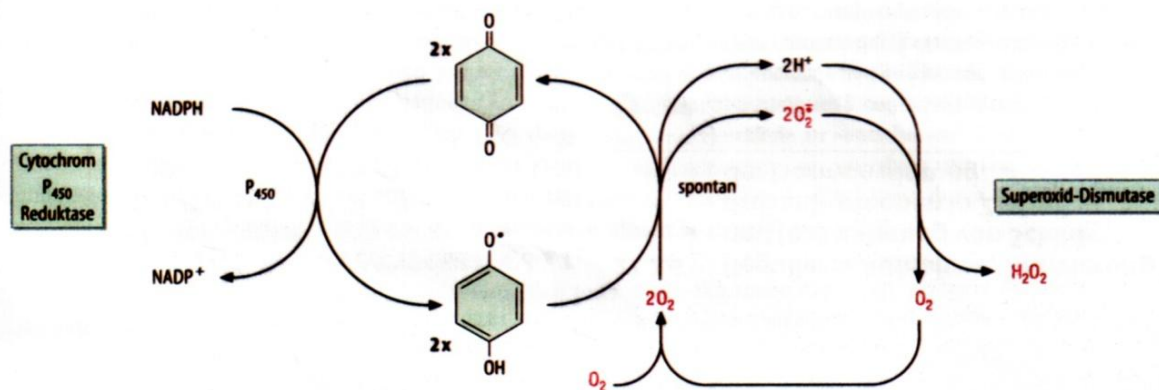


Abb. 3.9.: Bildung von Superoxid-Radikalen durch Cytochrom P<sub>450</sub>. In einer Nebenreaktion der Monooxygenasen können aus Chinonen Semichinonradikale entstehen, die unter Superoxidbildung spontan mit dem molekularen Sauerstoff reagieren [Löffler 2007].

Entsprechend kann in der Atmungskette Superoxid durch Oxidation von Ubisemichinon entstehen. Zwei Superoxidradikale können mit Hilfe der Superoxid-Dismutase zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Sauerstoff disproportionieren [Löffler 2007].

Die NADPH-Cytochrom-P<sub>450</sub>-Reduktase (CPR) bzw. NADPH-Chinon-Oxidoreduktase (NQO) ist ein Elektronendonator für eine Reihe von Oxygenasen, die sich im endoplasmatischen Retikulum von eukaryotischen Zellen befinden. Dazu gehört die Familie der Cytochrom-P<sub>450</sub>-Enzyme, die in den Metabolismus von Xenobiotika und endogenen Steroid-Verbindungen involviert sind [Pfaar et al. 2006]. Im mikrosomalen Cytochrom-P<sub>450</sub>-Metabolismus (Abb. 3.10.) ist CPR oft das Geschwindigkeits bestimmende Enzym [Cawley et al. 1995].

CPR ist ein Flavoprotein, das die beiden Kofaktoren FAD und FMN enthält und zu dem auch die Untereinheit der NO-Synthase gehört. CPR trägt zur Bildung von ROS bei, z.B. durch die Oxidation von ungesättigten Fettsäuren und durch die Bioaktivierung von Xenobiotika wie Thalidomid und Phenytoin [Sauer et al. 2001].

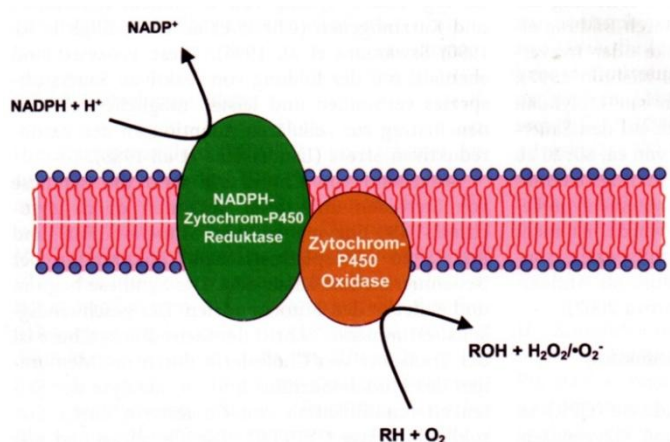


Abb. 3.10.: Schematische Darstellung der ROS-Bildung durch den Enzymkomplex Cytochrom P<sub>450</sub>-Reduktase und Monooxygenase. (R= endogene oder exogene Verbindung, wie Wirkstoffe) [Pfaar et al. 2006].

CPR spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in metabolischen Prozessen, die P450-unabhängig sind, im sog. Redoxcycling von Chinonen, Catecholen und Carzinogenen [Sawamura et al. 1996]. Diese Prozesse sind ebenfalls mit der Bildung von ROS verbunden und leisten möglicherweise einen Beitrag zur zellulären Adaption an den oxidoreduktiven Stress [Landriscina et al. 1988] (siehe auch Abschn. 2.3.2. Estradiol-Metabolismus: 2.3.2.4. Bildung von Estrogenchinonen und Redoxcycling).

Ausgehend vom Cholesterin wird die Synthese von Steroiden und ihren Vorstufen durch Cytochrom-P<sub>450</sub>-Enzyme in den Mitochondrien und im glatten endoplasmatischen Retikulum in der Nebennierenrinde katalysiert (Abschn. 2.3. Steroidhormon-Metabolismus: 2.3.1. Mechanismus des Steroidhormon-Stoffwechsels). Die Synthese beginnt und endet in den Mitochondrien. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Steroidbiosynthese ist der Transport von Cholesterin durch die Membran des Mitochondriums und die Katalyse der Seitenkettenmodifikation von Cholesterin durch die Steroidhydroxylase CYP11A1. Die für diese und alle weiteren Steroidhydroxylierungen notwendigen Elektronen werden von NADPH mit der Adrenodoxinreduktase und Adrenodoxin auf die Cytochrom-P<sub>450</sub>-Enzyme übertragen, wo in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff die Hydroxylierung erfolgt. Bei der Steroidhydroxylierung werden zwei Elektronen von NADPH auf den molekularen Sauerstoff übertragen. Elektronentransfer und Steroidhydroxylierung sind gekoppelt. Wird aber nur ein Elektron auf den Sauerstoff übertragen, so werden der Elektronentransfer und die Steroidhydroxylierung entkoppelt und es entsteht das Superoxidanion [Pfaar et al. 2006].

#### *3.2.1.1.6. CYP<sub>450</sub>- Monooxygenasen und deren Reaktionsmechanismus*

Die Cytochrom-P<sub>450</sub>- Monooxygenasen (CYP<sub>450</sub>) der Säugetiere gehören zu einer großen Familie von Enzymen, deren Komponenten aus einem Cytochrom P<sub>450</sub> (Hämprotein) und einer NADPH-Cytochrom P450-Reduktase bestehen, welche in die Membranen vor allem des endoplasmatischen Retikulums, des Zellkerns und der Mitochondrien eingebettet sind [Eisenbrand u. Metzler 2002]. (Die Struktur dieses Cytochrom-P<sub>450</sub>-Enzyms wird im Abschn. 2.1. Phase-I- Enzymsysteme: 2.1.1. Das Cytochrom-P450-Enzymsystem (CYPs) beschrieben).

Diese Enzyme sind Teil des oxidativen Metabolismus, einer Reihe von endogenen und exogenen lipophilen Verbindungen und lokalisiert in vielen Organen, wie Leber, Niere, Lunge, Hirn und Lymphozyten [Pfaar et al. 2006]. Wobei die höchste Konzentration der meisten CYPs in der Leber vorliegt (CYP1A2, CYP2A6, CYP2C, CYP2E1 bzw. CYP3A), während niedrigere Konzentrationen im extrahepatischen Gewebe vorhanden sind. Eine Ausnahme stellt dabei z.B. CYP1B1 dar. Dieses Isoenzym kommt ausschließlich in extrahepatischem Gewebe vor [Williams u. Phillips 2000].

Die Hauptfunktion dieser Monooxygenasen ist die Entgiftung von Arzneistoffen, Karzinogenen, Xenobiotika und körpereigenen Verbindungen durch Hydroxylierung (Abschn. 2. Metabolismus).

Diese Enzyme kommen als Isoenzyme vor und zeichnen sich durch eine breite Substratspezifität aus [Pfaar et al. 2006]. Durch CYPs wird ein Sauerstoffatom von molekularem Sauerstoff als Hydroxylgruppe in das entsprechende Substrat eingebaut, das andere wird gleichzeitig durch NADPH zu Wasser reduziert [Löffler 2007].

### Reaktionsmechanismus der Hydroxylierung eines Substrates:

Bei der sog. Monooxygenierung werden zwei Elektronen von der NADPH-P<sub>450</sub>-Reduktase auf das CYP<sub>450</sub> transferiert (Abb. 3.11.) [Pfaar et al. 2006].

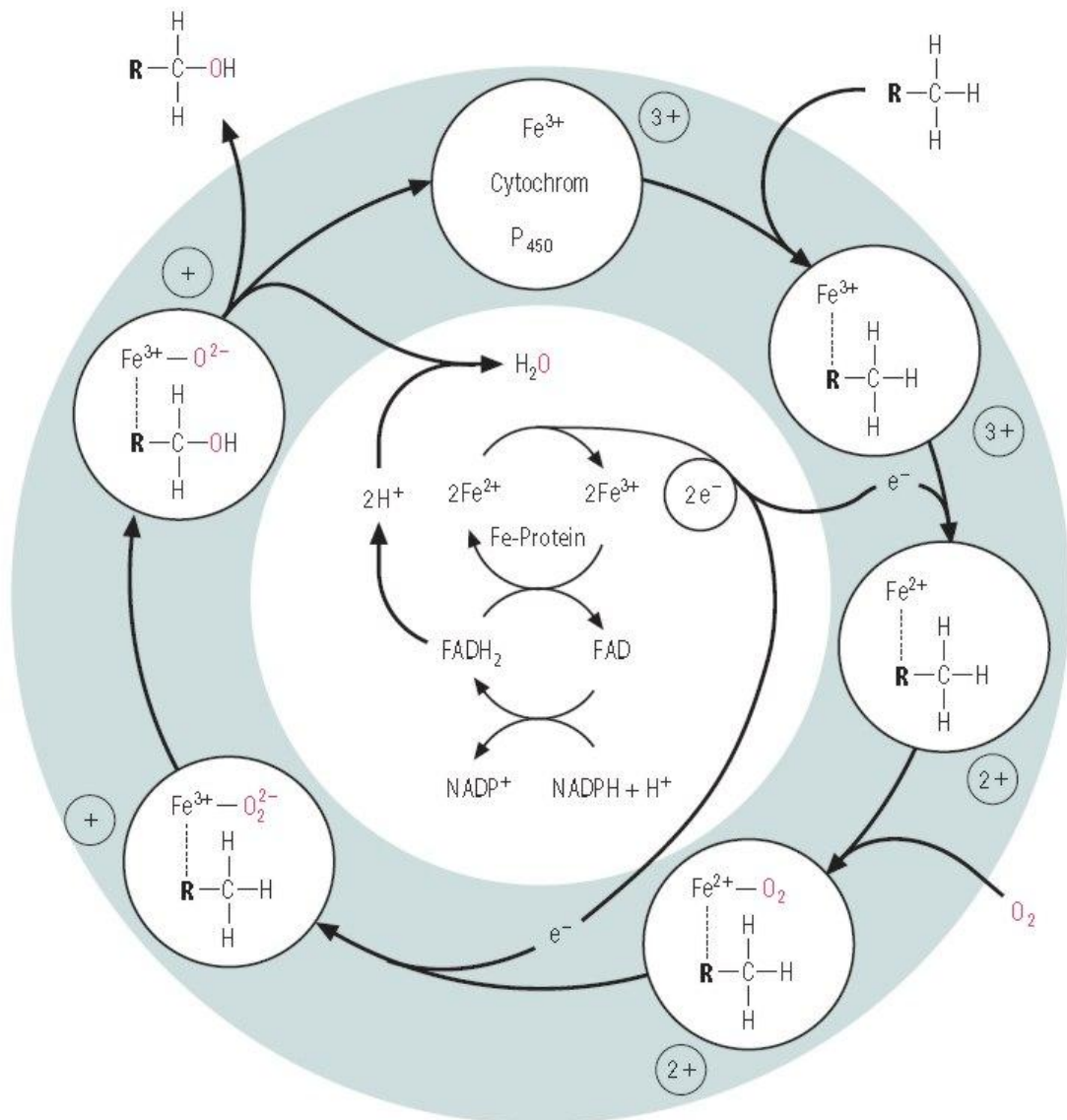


Abb. 3.11.: Reaktionsmechanismus der Hydroxylierung eines Substrates [Löffler 2007].

Zuerst lagert sich der Wirkstoff (Substrat) an das Cytochrom P<sub>450</sub> an, dessen Häm-Eisen sich in der Oxidationsstufe 3<sup>+</sup> befindet. Von der NADPH-Cytochrom-P<sub>450</sub>-Reduktase wird das erste Elektron übertragen und das zentrale Fe<sup>3+</sup> zu Fe<sup>2+</sup> reduziert.

An diesem Häm-Eisen ( $2^+$ ) bindet der molekulare Sauerstoff, wobei dieses sofort wieder oxidiert wird und schließlich der Sauerstoff als Superoxidradikal am Häm-Eisen gebunden wird. Das übertragene Elektron stammt fast immer vom NADPH, das von einem Flavoprotein oxidiert wird. Das Flavin-Nukleotid des Flavoproteins trennt die beiden Elektronen und überträgt sie einzeln auf das Cytochrom. Durch das zweite Elektron wird das gebundene Superoxid zur Peroxy-Form reduziert. Anschließend spaltet sich die O-O-Bindung und es wird  $H_2O$  freigesetzt. Das am Häm-Zentrum verbleibende Sauerstoffatom liegt nun als sog. Oxoferfyl-Gruppe vor.

Um die Bindung des neutralen Sauerstoffatoms in diesem Zustand korrekt darzustellen, muss die Oxidationsstufe des Häm-Eisens formal auf  $5^+$  erhöht werden. Schließlich wird das Sauerstoffatom, vermutlich über einen radikalischen Mechanismus, in die C-H-Bindung des zu hydroxylierten Substrates eingebaut (Abb. 3.12.) [Löffler 2007]. Nach Abdissoziation des oxidierten Substrats steht das freie Cytochrom  $P_{450}$ -Enzym, in der  $Fe^{3+}$ -Form, für einen neuen Zyklus zur Verfügung [Guengerich 1995]. Das im endoplasmatischen Retikulum enthaltene Cytochrom  $P_{450}$  ist ebenfalls in der Lage ROS zu bilden. Cytochrom  $P_{450}$  reduziert molekularen Sauerstoff und bildet Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid [Thannikal u. Fanburg 2000].

#### *3.2.1.1.7. NO-Synthase (NOS)*

Die NO-Synthasen (NOS) sind Katalysatoren der zellulären NO-Produktion. Die Stickstoffmonoxidsynthase kommt in verschiedenen Isoformen und unterschiedlichen Geweben und Organen vor. Die Enzyme unterscheiden sich bezüglich ihrer zellulären Expression und der molekularen Regulation. Beschrieben sind die endotheliale (eNOS), die neuronale (nNOS), die induzierte (iNOS) und die mitochondriale (mtNOS) NO-Synthase. Die katalytische Effizienz der konstitutiven NOS ist viel geringer als diejenige der iNOS, die eine sog. „High-output-Kinetik“ aufweist [Nathan u. Hibbs 1991].

Nitrosativer Stress liegt vor, wenn bei einer Entzündungsreaktion die induzierbare NOS lokal große Mengen des Stickstoffmonoxidradikals synthetisiert. Das Stickstoffmonoxidradikal  $NO^{\bullet}$  ist relativ langlebig und nicht sehr reaktionsfreudig (Abb. 3.5.: Enzymvermittelte ROS-Bildung) [Pfaar et al. 2006].

NO-Synthasen katalysieren die Synthese von L-Citrullin und dem Stickstoffmonoxidradikal  $NO^{\bullet}$  aus L-Arginin und molekularem Sauerstoff. Das  $O_2$ -Molekül wird in dieser Reaktion am Häm-Eisen des Enzyms durch zwei Elektronen, die vom NADPH stammen, zum Eisen (IV)-Komplex aktiviert. Als Kofaktoren sind an dieser Reaktion neben dem NADPH auch FMN/FAD und Tetrahydropterin ( $BH_4$ ) beteiligt [Daiber u. Ullrich 2002].

### 3.3. Antioxidanzien und Radikalfänger

Antioxidantien sind Substanzen, die trotz niedriger Konzentrationen im Vergleich zu oxidierenden Substraten (z.B. Lipiden, mehrfach ungesättigte Fettsäuren, Kohlenhydraten, Proteinen oder auch DNA) entweder die oxidativen Prozesse verzögern oder sogar verhindern [Pfaar et al. 2006]. Sie können endogen sein (Tabelle 3.2.), d.h. sie werden vom Organismus gebildet, oder exogen, z.B. durch Nahrungsaufnahme [National Academy of Sciences 2000] von außen dem Organismus zugeführt werden.

| Endogene Antioxidanzien                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Exogene Antioxidanzien                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>BILIRUBIN</b></li> <li>- <b>THIOLE:</b><br/>z.B. Glutathion, Liponsäuresäure, N-Acetylcystein</li> <li>- <b>NADPH und NADH</b></li> <li>- <b>UBICHINON (Coenzym Q10)</b></li> <li>- <b>HARNSÄURE</b></li> <li>- <b>ENZYME:</b><br/>MnSOD-, CuSOD-, FeSOD-Superoxiddismutasen<br/>Fe-abhängige Katalase<br/>Se-abhängige Glutathionperoxidasen</li> <li>- <b>METALLBINDENE PROTEINE:</b><br/>Albumin (Kupfer)<br/>Ceruloplasmin (Kupfer)<br/>Metallothionein (Kupfer)<br/>Ferritin (Eisen)<br/>Myoglobin (Eisen)<br/>Transferrin (Eisen)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>VITAMIN C</b></li> <li>- <b>VITAMIN E</b></li> <li>- <b>β-CAROTIN UND OXYCAROTINOIDE</b></li> <li>- <b>LYCOPEN UND LUTEIN</b></li> <li>- <b>POLYPHENOLE:</b><br/>z.B. Flavonoide (Flavone, Flavonole), Isoflavonoide und Proanthocyanidine</li> <li>- <b>SPURENELEMENTE:</b><br/>Zink und Selen</li> </ul> |

Tab. 3.2.: Beispiele für endogene und exogene Antioxidanzien [Pfaar et al. 2006/modifiziert].

Zur Abwehr oxidativer Angriffe verfügt der Organismus über zahlreiche antioxidative Systeme [Gutteridge 1995]. Diese Abwehrmechanismen sind unterschiedlicher Natur, mit abfangenden oder reparierenden Eigenschaften, und sind sowohl intrazellulär als auch extrazellulär vorhanden [Halliwell u. Gutteridge 1990]. Auch Zellmembranen können aufgrund ihres speziellen Lipidaufbaus antioxidative Substanzen einlagern. Plasma besitzt ebenfalls ein antioxidatives Potential (Abb. 3.12) [Yeum et al. 2004].



Abb. 3.12.: Antioxidative Spezies, die extrazellulär, membranständig und intrazellulär ROS entgegenen. EC: exztrazellulär; SOD: Superoxiddismutase; GPx: Glutathionperoxidase; CytCox: Cytochrom-c-Oxidase [Pfaar et al. 2006].

### 3.3.1. Inaktivierung von ROS

Zur Inaktivierung der reaktiven Sauerstoffspezies besitzen Säugetierzellen eine Reihe von ausgeklügelten Abwehrmechanismen. Der metabolische Schlüsselschritt ist die enzymkatalysierte Umsetzung des Superoxidanions zu Wasserstoffperoxid durch die Superoxiddismutase (Abb. 3.13.):

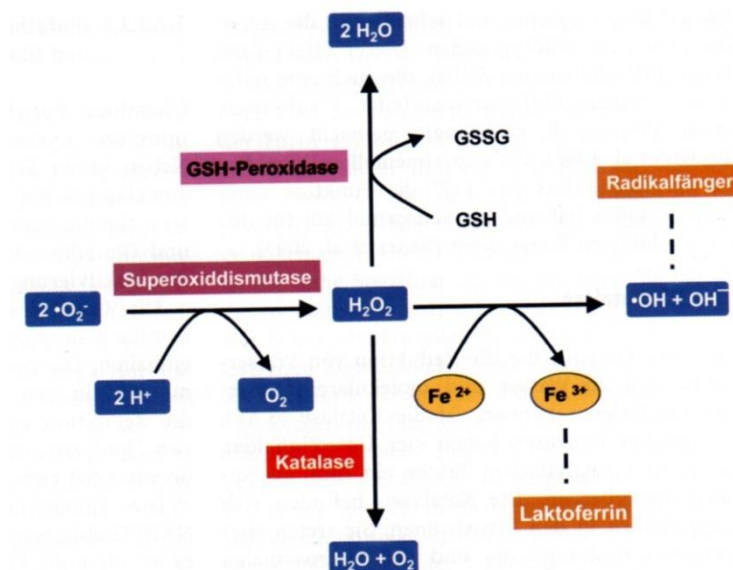
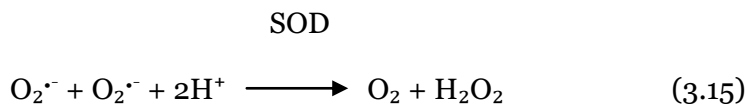


Abb. 3.13.: Schematische Darstellung der Inaktivierung von ROS [Pfaar et al. 2006].

Wasserstoffperoxid kann auf drei verschiedenen Wegen metabolisiert werden. Die Glutathionperoxidasen unterstützen die Umsetzung von Wasserstoffperoxid zu Wasser. Diese Reaktion benötigt Glutathion als Kosubstrat. Das molare Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Glutathion sagt etwas über den Redoxzustand der Zelle aus. In ruhenden Zellen ist die Glutathionkonzentration im millimolaren Bereich und damit in einem etwa 100-fachen Überschuss zum oxidierten Glutathiondisulfid [Pfaar et al. 2006]. Transiente Verschiebungen des Verhältnisses zu Gunsten des Disulfid korrelieren mit der Bildung von gemischten Disulfiden [Klatt u. Lamas 2000]. Die Konzentration von Glutathion in den unterschiedlichen Geweben liegt im millimolaren Bereich, während die extrazelluläre Konzentration des Glutathions, das vorwiegend in der oxidierten Form vorliegt, wesentlich niedriger ist, nämlich im mikromolaren Bereich [Pfaar et al. 2006].

#### 3.3.1.1. Superoxiddismutase (SOD)

Die Superoxiddismutase (SOD) katalysiert die erste Reaktion im Metabolismus der Inaktivierung von ROS. Das Enzym erleichtert die Disproportionierung von zwei Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff:



Es existieren drei Isoenzyme. Die im Zytoplasma lokalisierte und die extrazelluläre Isoform enthalten je ein Kupfer- und Zinkion, während das in den Mitochondrien lokalisierte Isoenzym ein Manganion enthält [Pfaar et al. 2006].

Das Superoxidanion ist in Abwesenheit der SOD relativ stabil, daher ist es wichtig, dass SOD dort lokalisiert ist, wo Superoxidanionen generiert werden [Inoue et al. 2003]. Eine Superoxiddismutase ähnliche Aktivität wird dem Kupfer bindenden Prionprotein (PrP<sup>C</sup>) zugeschrieben [Pfaar et al. 2006]. Die experimentellen Daten lassen vermuten, dass das PrP<sup>C</sup> die Funktion eines Radikalfängers hat und als Sensormolekül für den oxidoreduktiven Stress dient [Sauer et al. 2003].

#### 3.3.1.2. Katalase (KAT)

Die Katalase (KAT) gehört zu den Hydroperoxidasen, die Wasserstoffperoxid auch als Elektronendonator verwendet, so dass zwei Moleküle Wasserstoffperoxid zu zwei Molekülen Wasser und einem Molekül Sauerstoff disproportionieren [Löffler 2007]:

KAT



Die meisten Katalasen haben vier Untereinheiten, die in ihrer katalytischen Tasche ein Häm als Kofaktor beherbergen. Die Katalasen befinden sich hauptsächlich in den Peroxisomen. Sie treten aber ebenfalls im Zytoplasma und der mikrosomalen Fraktion der Zellen auf. Die höchsten Aktivitäten werden in den Zellen der Leber und der Niere gefunden, Geweben also mit einem hohen Anteil an Peroxisomen. In den Zellen des Immunsystems schützt die Katalase die Immunzelle gegen den „respiratory burst“ [Pfaar et al. 2006].

### 3.3.1.3. Glutathion-Peroxidase (GPx) und Glutathion-Reduktase (GRd)

Glutathion besteht aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin (Abb. 3.13.). Neben seiner Fähigkeit als Antioxidans Radikale einzufangen, hat es eine große Bedeutung als Substrat für die beiden Enzyme Glutathion-Peroxidase und Glutathion-Reduktase.

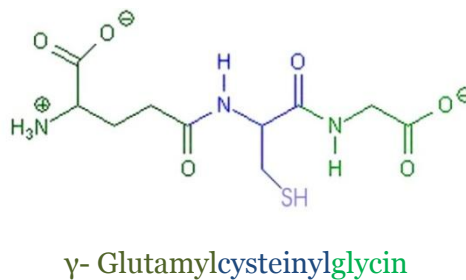
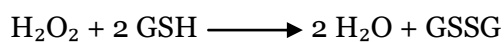


Abb. 3.13.: Struktur von Glutathion

Beide Enzyme sind an der Inaktivierung von Wasserstoffperoxid beteiligt. Die Enzyme befinden sich im Zytoplasma und in den Mitochondrien und katalysieren die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser, von Lipidperoxiden zu Alkoholen und die Oxidation von GSH zum GSSG (Abb. 3.9.):

GPx



GPx



Die Glutathionperoxidasen enthalten das Halbmetall Selen und gehören zu einer großen Gruppe von Selenoproteinen, von denen heute schon über 25 im menschlichen Genom identifizierte Selenoprotein-Gene bestimmt sind [Kryukov u. Castellano et al. 2003]. Zu dieser Gruppe zählen vier Glutathion-Peroxidasen, drei Thioredoxin-Reduktasen und die Methioninsulfoxidreduktase B (MsrB, SelR). Alle diese drei Enzymgruppen scheinen eine antioxidative Funktion zu besitzen, indem sie teilweise direkt (Glutathionperoxidasen, GPx) oder indirekt (Thioredoxin-Reduktasen, TXNRD) für den Abbau reaktiver Sauerstoffspezies verantwortlich sind. Sie helfen bei der Reparatur oxidierter Metaboliten (Selenoprotein R/SELR bzw. Methionin-Sulfoxid-Reduktase B/MSRB), bei der Faltung im endoplasmatischen Retikulum (15 kDa Selenoprotein/SEP15; Selenoprotein N/SELN; Selenoprotein M/SELM) oder sind am Abbau von falsch gefalteten Proteinen im ER beteiligt (Selenoprotein S/SELS). Für einige der weniger gut erforschten Selenoproteine sind solche Rollen im Metabolismus postuliert, jedoch noch nicht bewiesen worden [Renko 2009].

Die Glutathion-Reduktase ist eine  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ -abhängige Oxidoreduktase, deren Aufgabe es ist, die hohe Konzentration an reduziertem Glutathion in der Zelle aufrecht zu erhalten. Mit der Glutathion-Reduktase wird das oxidierte Glutathion wieder regeneriert. Beide Enzyme zusammen, Glutathion-Peroxidase (GPx) und Glutathion-Reduktase (GRd), bilden den sog. Glutathion-Redoxzyklus.  $\text{NADPH}$ , das die Reduktionsäquivalente zur Inaktivierung von Wasserstoffperoxid liefert, stammt aus dem Pentosephosphat-Metabolismus [Pfaar et al. 2006]. Die glutathionvermittelte Inaktivierung von ROS ist ein universelles Prinzip, das in allen Zelltypen, auch in den roten Blutkörperchen (Abb. 3.14.), abläuft und möglicherweise eine Erklärung für die weite Verbreitung des Pentosephosphat-Stoffwechselweges in vielen Zelltypen ist [Marks et al. 2005].

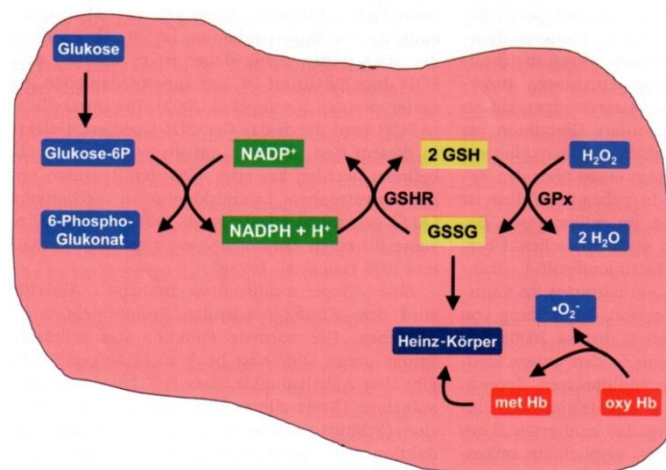


Abb. 3.14.: Glutathion-Redoxzyklus und ROS-verursachte Hämolyse [Pfaar et al. 2006].

Die roten Blutzellen brauchen den molekularen Sauerstoff weder für den Stoffwechsel noch für Phagozytose, sondern nur für den  $\text{O}_2$ -Transport. Der hohe Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut und die hohe Konzentration an Hämoglobin, welches das Eisenion enthält, bewirkt, dass ROS kontinuierlich gebildet wird.

Die Reduktion von Sauerstoff zu Superoxidanionen erfolgt bei der Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin (Ferrihämoglobin), einem rostbraunen Hämoglobin, das den Sauerstoff weder binden noch transportieren kann. Denaturiertes Methämoglobin bildet die Heinz-Innenkörper [Pfaar et al. 2006]. In einer Haber-Weiss-Reaktion, katalysiert durch das Häm des Methämoglobin, werden aus dem Superoxidanion und Wasserstoffperoxid Hydroxylradikale gebildet [Baynes u. Dominiczak 2005].

#### **4. Methoden zur Messung von ROS und der antioxidativen Kapazität**

Der Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies wird zum einen durch die relativ geringen Konzentrationen und zum anderen durch die biologische Matrix erschwert. Aber auch die sehr große Reaktivität und/oder die zum Teil recht kurze Lebensdauer sind weitere Eigenschaften, welche bei der direkten Messung reaktiver Sauerstoffspezies zu beachten sind. Da jedoch ROS mit endogenen Molekülen zu stabileren Reaktionsprodukten reagieren, können diese Biomoleküle als Biomarker für die oxidativen Prozesse dienen. Diese Biomarker, Indikatoren des oxidativen Stresses (OS), sollen frühzeitig Zusammenhänge zwischen pathologischen Veränderungen und dem Einfluss von ROS-initiierten Prozessen erklären. So können freie Radikale entweder durch indirekte Nachweisverfahren, wie die Bestimmung von Stoffwechselprodukten (z. B. 8-Hydroxydesoxyguanosin/8-OHdG, Malondialdehyd/MDA) bzw. an der antioxidativen Kapazität beteiligten Verbindungen (Enzyme, Vitamine, Spurenelemente) erfasst werden, oder durch direkte Nachweisverfahren quantifiziert werden. Eine solche direkte Messmethode war die sog. EPR-Messtechnik (Elektronenspinresonanz-Spektrometrie), welche bis vor wenigen Jahren noch zur Messung der ROS eingesetzt wurde, jedoch sehr arbeitsaufwendig und teuer ist. Mit Hilfe dieser Spin-trapping-Technik können kurzlebige Radikale durch Reaktion mit Spintraps in längerlebige Radikale, sog. Spin-Addukte, übergeführt werden und dabei direkt im lebenden Versuchstier gemessen werden [Liu et al. 1999]. Deshalb suchten in den letzten Jahren zahlreiche Arbeitsgruppen nach Techniken und Messmethoden, um den OS und die AOK effizienter messen zu können. Dabei sollten diese Messmethoden, bei leichter Gewinnung des Probenmaterials, ohne großen Arbeitsaufwand und analytische Kenntnisse, schnelle und sichere Ergebnisse liefern. So sind schon seit einiger Zeit spezielle Geräte am Markt, die nach Angaben des Herstellers in der Lage sind, in wenigen Minuten direkt am Patienten eine Vielzahl von Parametern im Blut photometrisch erfassen und messen zu können.

So hat die Firma Callegari S.p.A. das FORMplus-Photometer entwickelt. Vertrieben wird das Gerät von der Firma Incomat Medizinische Geräte GmbH. Es handelt sich hier um ein Diagnosesystem, das es ermöglicht, neben der Messung des oxidativen Stresses und der antioxidativen Kapazität auch Parameter wie Harnsäure, Hämoglobin und Hämatokrit zu messen.

Die folgenden Abschnitte befassen sich nun näher mit der direkten Messung von OS und der antioxidativen Kapazität, die mit Hilfe des FORMplus-Photometers gemessen werden können.

#### 4.1. FORT-Test (*Free Oxygen Radicals Test*) zur Messung von ROS

##### Testprinzip

Der FORT-Test wird als kolorimetrische Messung durchgeführt. Mit Hilfe des FORT-Tests kann man die Hydroperoxidspiegel (ROOH) - eine Gruppe reaktiver Sauerstoffmetabolite (ROMs), in biologischen Proben (z.B. Blut) ermitteln [MICRO-MEDICAL(a)]. Das Testprinzip basiert, gemäß der Fenton- Reaktion, auf der Fähigkeit von Übergangsmetallen (wie Eisen) Hydroperoxide in freie Radikale zu überführen.

Im Plasma vorhandenes, an Protein gebundenes Eisen wird freigesetzt und dient als Katalysator für die genannte Reaktion. Sind diese in der Zelle entstanden, dann bilden ROOH in Folge ihrer chemischen Reaktivität und oxidativen Kapazität proportionale Mengen an Alkoxy(RO<sup>•</sup>)- und Peroxy(ROO<sup>•</sup>)-Radikale (Abbildung: Reaktion A und B). Diese Radikalderivate werden dann in einer gepufferten Chromogenlösung (ein Aminderivat: N,N-diethyl-para-Phenylendiamin, Reagens R1, für den FORT-Kit, CrNH<sub>2</sub>) erfasst und entwickeln im Rahmen einer linearen Reaktion bei 37°C ein stabiles, gefärbtes Kation, welches photometrisch bei 505 nm Wellenlänge bestimmt wird (Abbildung: Reaktion C).

Die Intensität der Färbung korreliert gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz mit der Menge an Radikalspezies und ermöglicht einen direkten Rückschluss auf den oxidativen Status der Probe [MICRO-MEDICAL (b)].

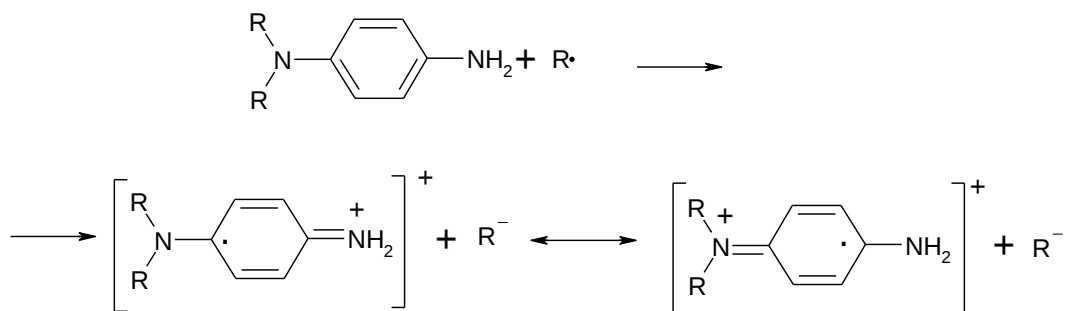
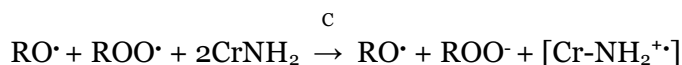
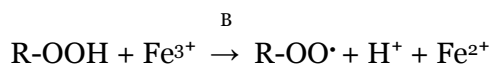
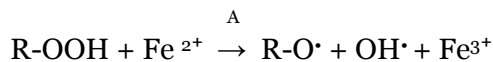


Abb. 4.3.: Fenton-Reaktion: **A.** Bildung von Alkoxyradikalen **B.** Bildung der Peroxyradikale **C.** Reaktion zur Farbentwicklung: Die Hydroperoxide reagieren mit einem gepufferten Chromogen und bilden einen gefärbten Komplex, der photometrisch bei einer Wellenlänge von 505 nm nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz erfasst wird.

Die Bezeichnung  $2\text{CrNH}_2$  steht für das Chromogen und der Ausdruck  $[\text{Cr-NH}_2\cdot]^+$  für das kationische Radikal des Chromogens [MICRO-MEDICAL (b)].

#### *Interpretation der FORT-Testergebnisse*

Im Zuge der FORT-Testdurchführung werden die chemisch heterogenen sekundären Radikalspezies ( $\text{RO}\cdot$  und  $\text{ROO}\cdot$ ), die aus der Eisen-katalysierten Degradation der ROOH stammen, über die Messung der Absorption in Einheiten, sogenannte FORT-EINHEITEN, überführt. Diese Überführung wird automatisch vom Testgerät vorgenommen, was die Ergebnisse transparenter und die Interpretation leichter macht. Für eine absolute Evaluierung, ist, mit Bezug auf die Hydroperoxide, auch der Erhalt der Werte in  $\text{H}_2\text{O}_2$  möglich. Eine FORT-Einheit entspricht  $7,6 \mu\text{mol/l}$ , was gleich zu setzen ist mit  $0,26 \text{ mg/l H}_2\text{O}_2$ . Je höher der erhaltene Wert ist, umso höher ist der Level für den oxidativen Stress. Für eine bessere Interpretation und zur Erfassung signifikanter Unterschiede ist es sinnvoll, die erhaltenen Werte gegen den *jeweils ermittelten individuellen Basiswert* zu beurteilen [MICRO-MEDICAL (b)].

|                          |                                                                                                                       |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Testbedingungen:</b>  | Wellenlänge: 505 nm / Strahlengang: 1 cm / Arbeitstemperatur : $37^\circ\text{C}$ / Reaktionstyp: kinetische Reaktion |
| <b>Linearität:</b>       | 160 – 600 Fort U.                                                                                                     |
| <b>Wiederholbarkeit:</b> | CV < 5 %                                                                                                              |
| <b>Genauigkeit:</b>      | CV < 5 %                                                                                                              |

**Normwerte:** bis 310 FORT-Einheiten (1 FORT =  $0,26 \text{ mg/l H}_2\text{O}_2$ )

| Beurteilung               | Messeinheit FORT U. (1 FORT = $0,26 \text{ mg/l H}_2\text{O}_2$ ) |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Gut                       | bis 230                                                           |
| Grenzbereich              | 230 - 310                                                         |
| Oxidativer Stress         | 310 - 400                                                         |
| Starker Oxidativer Stress | über 400                                                          |

Tab. 4.1.: Referenzwerte des FORT-Tests [MICRO-MEDICAL (a)]

### *Zusammensetzung des Testkits*

Alle Reagenzien sind *gebrauchsfertig* und können bei *Raumtemperatur gelagert* werden.  
[Packungsbeilage FORT Reagenz für FORMplus vom 01.04.06]

Der Kit enthält 30 Tests

- *R1 Reagenz* (FORT R1), eine quadratische Messküvette mit einem lyophilisierten, vorbereiteten Chromogen.
- *R2 Reagenz* (FORT R2), ein Eppendorf-Gefäß mit sauren Puffer (pH-Wert 4,8)

Die Mikrovetten enthalten Konservierungsmittel und Stabilisatoren und sind bereits fertig vorbereitet.

- *20 µl Kapillaren mit Kapillarhalteklammer*



Abb. 4.4.: FORT-Testkit [MICRO-MEDICAL (c)]

**Stabilität:** Die Reagenzien sind bei Raumtemperatur (15-30°C) an einem trockenen Ort und nicht in der Nähe direkter Sonnenstrahlung aufzubewahren. Die Stabilität ist bis zum Verfalldatum gewährleistet, welche auf dem außen an der Verpackung angebrachten Etikett angegeben ist. Nach dem Öffnen muss die Aluminiumverpackung immer sorgfältig wieder verschlossen werden [MICRO-MEDICAL (c)].

**Blutentnahme:** Man säubert die Fingerbeere mit einem mit Desinfektionsmittel getränkten Purzellintupfer (bzw. nimmt sterile Alkoholtupfer!) und lässt anschließend das Desinfektionsmittel abdampfen. Während dessen dreht man eine Einweg-Stechlanzette in die Stechhilfe hinein und zieht die Schutzkappe ab, punktiert dann den Finger, verwirft dabei den ersten Blutropfen, da dieser noch Zellflüssigkeit des umliegenden Gewebes enthält und somit das Messergebnis verfälschen würde. Mit Hilfe einer Kapillarhalteklammer befüllt man dann eine 20 µl Kapillare mit Blut, wobei man diese schräg hält, um eine gute Kapillarwirkung zu ermöglichen.

### *Durchführung der oxidativen Stressmessung*

- Inbetriebnahme des FORMplus-Testgerätes. Nach einigen Minuten (etwa 5 Minuten) ist die Betriebstemperatur von 37°C erreicht. In dieser Zeit erfolgt auch eine Selbstkalibrierung des Gerätes.
- Einschalten der Mini-Zentrifuge (Modell 6000) und Vorbereitung der Materialien zur Blutentnahme
- Nach o. a. Blutentnahme gibt man die Kapillare mit der Blutprobe in das *R2 Reagenz* (Mikrovette mit saurem Puffer).
- Das *R2 Reagenz* wird vorsichtig hin und her geschwenkt, bis der Inhalt und die Kapillare dieselbe Farbe zeigen. (Die Blutprobe in der Kapillare vermischt sich mit dem sauren Puffer in der Mikrovette.)
- Der Inhalt der Mikrovette wird - ohne Kapillare - in das *R1 Reagenz* (quadratische Messküvette mit Chromogen) gefüllt, verschlossen und einige Sekunden geschwenkt.  
(Die Probe löst sich nun im Chromogen.)
- Die Küvette wird mit Hilfe einer gegenüberliegenden Ausgleichs-Küvette eine Minute zentrifugiert.
- Nach Ende der Zentrifugation wird die Küvette vorsichtig, ohne zu schütteln, in den Küvettenschacht des Gerätes mit dem Barcode-Etikett nach vorne eingesetzt.
- Die Messung startet automatisch und dauert sechs Minuten. Das Ergebnis der Messung kann man nun am Display ablesen.

#### 4.2. FORD-Test (**F**ree **O**xxygen **R**adicals **D**efence) zur Messung der antioxidativen Kapazität

##### Testprinzip

Der FORD-Test ist ein kolorimetrischer Test. Dieser beruht auf der Fähigkeit, die im Plasma vorkommenden Antioxidanzien zu messen, um sodann die Bildung eines radikalischen Kations zu hemmen. Der FORD-Test verwendet eine vorbereitete stabile, farbige Radikalsubstanz und bestimmt die Abnahme der Absorption, die proportional zu der antioxidativen Konzentration der Blutprobe, entsprechend dem Lambert-Beer'schen Gesetz, abläuft.

In saurer Umgebung (pH=5,2) reagiert eine Oxidationssubstanz ( $\text{FeCl}_3$ ) mit einem farblosen Chromogen (das 4-Amino-N,N-Diäthylanilinsulfate enthält) und bildet eine entsprechende stabile und farbige Radikalkation, die photometrisch bei 505nm (Reaktion 1) auswertbar ist. Antioxidative Substanzen (AO), die in der zu analysierenden Probe vorhanden sind, reduzieren das Radikalkation des Chromogens, das mit einer Entfärbung der Lösung einhergeht. Das Maß der Entfärbung ist proportional zur Menge der vorhandenen Antioxidanzien in der Probe (Reaktion 2).

Reaktion 1:      Chromogen (farblos) + Oxidans ( $\text{Fe}^{3+}$ ) +  $\text{H}^+$  → Chromogen $^{\bullet+}$  (rot)

Reaktion 2:      Chromogen $^{\bullet+}$  (rot) + AOH → Chromogen (farblos) + AO

Das sichtbare UV-Spektrum des FORD-chromogenen radikalischen Kations, welches in der Abbildung aufgeführt ist, zeigt bei 505 nm ein Absorptionsmaximum.

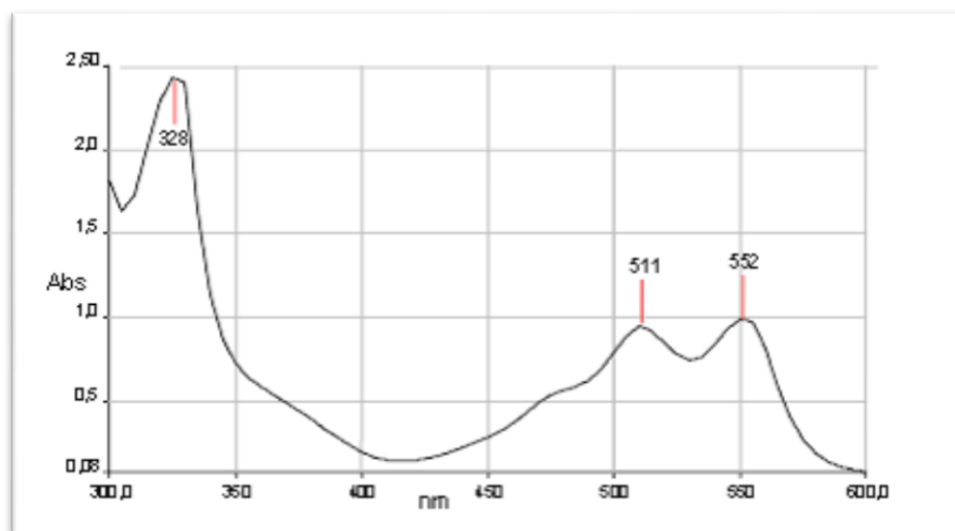


Abb. 4.5.: Ultraviolett-Spektrum des FORD-Chromogenradikals [MICRO-MEDICAL (d)].

Die Absorptionswerte der Probe werden mit einer entsprechenden Standardkurve in Einheiten TROLOX (6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-Carboxylsäure) verglichen, ein permeables Zellderivat des Vitamins E, welches üblicherweise zur Antioxidanzien-Bewertung herangezogen wird.

In der Abbildung ist der zeitliche Verlauf der FORD-chromogenen Radikalbildung ersichtlich, der durch eine Lösung des Oxidanz  $\text{FeCl}_3$  entstanden ist. Nach 3-4 Minuten liegt die Absorption, unter der Bildung einer stabilen, gefärbten Lösung zwischen 0,80 und 1,00 vor. Dieser Test zeigt das Maß der Radikalreduktion innerhalb einer festgelegten Zeit (vier Minuten) und nicht die Reduktionsrate als solche.

Die Entfärbung erfolgt hauptsächlich über Antioxidanzien wie Proteine, z. B. Albumin, reduziertes Glutathion, Vitamin C, TROLOX (wasserlösliches Analogon zum Vitamin E). Diese Antioxidanzien gehören (zusammen mit der Harnsäure, die durch den FORD-Test nicht erfasst wird) zu den wichtigsten antioxidativ wirksamen Schutzsystemen im Plasma.

Die FORD-Ergebnisse resultieren aus der antioxidativen Kapazität des Plasmas, der Bildung des Chromogen-Radikals, im Vergleich zu TROLOX.

Wie bei vielen anderen Methoden werden die Ergebnisse in TROLOX-Äquivalenten (mmol/l) ausgedrückt. Die Kalibrierungskurve wird unter der Verwendung eines TROLOX-Standards, der im Gerät verankert ist, bestimmt [MICRO-MEDICAL (d)].

*Normwerte:* Eine vorangegangene Studie<sup>1</sup> ergab, dass die normalen Werte zwischen 0,90 und 1,30 mmol/l TROLOX liegen.

|                                                    |                                            |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| <b>Referenzwerte:</b>                              | 1.07 – 1.53 mmol/l TROLOX-Äquivalente.     |
| <b>Testbedingungen:</b><br>Arbeitstemperatur: 37°C | Wellenlänge: 505 nm / Strahlengang: 1 cm / |
| <b>Linearität:</b>                                 | 0.25 - 3.0 mmol/l Trolox.                  |
| <b>Wiederholbarkeit:</b>                           | CV < 5 %                                   |
| <b>Genauigkeit:</b>                                | CV < 8,5 %                                 |

<sup>1</sup> FORD-Test: eine validierte Methode zur Erfassung der antioxidativen Kapazität im Blut [MICRO-MEDICAL (d)].

### *Zusammensetzung des Testkits*

Alle Reagenzien sind gebrauchsfertig und können bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

#### Der Kit enthält 30 Tests:

Küvetten C1

Eppendorf-Mikrovetten (weiß) S1

Eppendorf-Mikrovetten (farbig) S2

- 1 Phiole mit S3
- 1 Tüte Einweg-Pipettenspitzen
- 1 Tube mit Einwegkapillaren
- *S1 Reagenz* – Hyperosmolarpuffer
- *S2 Reagenz* – Acetatpuffer pH 5,2
- *S3 Reagenz* – Eisenlösung
- *C1 Reagenz* – Chromogen (4-Amino-N,N-Diethylanilinsulfat)



Abb. 4.6.: FORD-Testkit [MICRO-MEDICAL (d)]

### *Stabilität*

Die Reagenzien sind bei Raumtemperatur (15-30°C) an einem trockenen Ort und nicht in der Nähe direkter Sonnenbestrahlung aufzubewahren.

Die Stabilität ist bis zum Verfalldatum gewährleistet, welche auf dem, außen an der Verpackung angebrachten Etikett, angegeben ist. Nach dem Öffnen muss die Aluminiumverpackung immer sorgfältig wieder verschlossen werden. Das Reagens C1 könnte eine braune Färbung aufweisen, was seine Wirksamkeit und Reaktionsfähigkeit jedoch nicht beeinträchtigt [MICRO-MEDICAL (d)].

#### *Durchführung der Messung der antioxidativen Kapazität*

Die Blutentnahme ( siehe 1.3.1.) entspricht derselben, wie bei der oxidativen Stressmessung. Einziger Unterschied besteht in der Größe der Kapillare, die man für die Entnahme der Blutprobe einsetzt: anstelle einer 20 µl-Kapillare verwendet man hier eine 50 µl-Kapillare!

#### Für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität werden 2 Messungen durchgeführt:

*Bei der ersten Messung wird die Absorption des radikalischen Kations gemessen:*

- Der Inhalt des farbigen *S2 Reagenz* (Eppendorf-Mikrovette) wird in das C1 Reagenz (Küvette) übergeführt und dann fügt man 50 µl von *S3 Reagenz* (Phiole) mit Hilfe der beigegeführten Pipette hinzu.
- Die C1 Küvette wird nun vorsichtig hin und her geschwenkt und dann in den Küvetenschacht des FORMplus-Testgerätes eingesetzt. (1. Messung dauert vier Minuten)
- Während dessen wird die Blutprobe nach der Entnahme (siehe 1.3.1.) in das *S1 Reagenz* (weiße Eppendorf-Mikrovette) übergeführt, vorsichtig hin und her geschwenkt und in die Mini-Zentrifuge gesetzt.
- Mit Hilfe einer gegenüberliegenden Ausgleichs-Küvette zentrifugiert man das Ganze eine Minute lang und nimmt die aktivierte C1 Küvette heraus.

*Danach startet man die zweite Messung (Probenabsorption):*

- Aus dem *S1-Reagenz* (weiße Eppendorf-Mikrovette) werden dann 100 µl vom Überstande der Blutprobe (die klare Flüssigkeit über dem Sediment nach der Zentrifugation) mit Hilfe der Pipette in die aktivierte C1 Küvette übergeführt.
- Die C1 Küvette wird verschlossen, vorsichtig mehrfach hin und her bewegt und sofort in die Lesezelle des FORMplus-Testgerätes platziert.
- Die Messung wird durchgeführt, das Ergebnis ist automatisch nach zwei Minuten auf dem Display ersichtlich.

## **5. Aktuelle Beispiele zur OS-Messung an Hand der regelmäßigen Einnahme von Hormonpräparaten**

Wie in den vorigen Abschnitten ausführlich beschrieben, kann man mit dem FORMplus-Photometer (FORM®-Gerät) schnell und effizient Messungen durchführen. So wurden in den letzten Jahren schon eine Reihe von Studien durchgeführt, um diese Methode weiter zu validieren. Es gab seit 2002 bis 2006 alleine 16 validierte Studien und Berichte, 5 Studien im Bereich der Onkologie, 4 Studien in den Bereichen Neonatology und Kinderheilkunde, 5 Studien über Atemwegserkrankungen und 2 Studien über kardiovaskuläre Erkrankungen sowie einige Studien über neurogenerative und metabolische Erkrankungen, um nur einige wenige zu nennen [Callegari S.P.A. 1930 / Catellani group company, I-43100 Parma 2006].

Ein großer Nachteil dieses Diagnosesystems sind die hohen Kosten für die FORT- und FORD-Test-Kits. Derzeit muß man für eine FORT-Messung 10 € pro Person, für eine anschließende FORD-Messung 30 € pro Person, also insgesamt 40 € pro Person bezahlen (inkludiert sind somit eine oxidative Stressmessung und die antioxidative Kapazität). Dies scheint mitunter ein Grund zu sein für die geringere Anzahl von Personen eines Kollektivs (Durchschnittliche Anzahl pro Kollektiv liegt in etwa bei  $\pm 60$  Personen).

### Klinische Bedeutung und Beobachtungen zur Dateninterpretation

Wie bereits erwähnt, handelt es sich beim oxidativen Stress (OS) nicht um eine direkte Erkrankung, sondern um eine Einflussgröße, die Krankheiten begünstigen kann. Problematischerweise gibt es keine Symptome, die auf einen erhöhten oxidativen Stress schließen lassen. Die Langzeiteffekte eines erhöhten, oxidativen Stresses kommen durch eine erniedrigte antioxidative Kapazität oder durch eine vermehrte Radikalproduktion zum Tragen. Wird dieser Zustand nicht erkannt, kann es zu Begleiterscheinungen in Form von leichten Beschwerden bis hin zu ernsthaften Erkrankungen kommen.

Um Messergebnisse zum oxidativen Stress (OS) vergleichen zu können, sollten die Messungen immer unter den gleichen Bedingungen durchgeführt werden. Bei der Erstellung von Vergleichswerten, bei ein und demselben Patienten, sollte darauf geachtet werden, die Messung nicht nach der Einnahme üppiger Mahlzeiten, während der Einnahme von Medikamenten oder nach extremer sportlicher Aktivität etc. durchzuführen.

Mit Hilfe von Fragebögen (siehe Abb. 5.1.), die von den Patienten mit ja oder nein beantwortet werden, können unter anderem Daten über persönliche Konstitution, Familienanamnese, Lebensstilfaktoren, Ernährungsgewohnheiten inkl. Antioxidanzien-Supplementierungen sowie Medikamenteneinnahme des Patienten erfasst werden. So wird die Gefahr, andere wichtige Risikofaktoren zu übersehen, gemindert. Somit hat man eine solide Basis für die Interpretation der Messdaten. Desweiteren sollten die Patienten darüber informiert werden, dass sie sich, trotz der Normalwerte, weiterhin um eine gesunde Lebensführung bemühen sollten, um zu gewährleisten, dass der Wert auch dauerhaft in der Norm bleibt (Beratung zu einer gesunden Kost, moderater sportlicher Aktivität und sonstiger not-wendiger Änderungen von relevanten Lebensstilfaktoren).



universität  
 wien  
 Department für Klinische Pharmazie & Diagnostik  
 Fakultät für Lebenswissenschaften  
 Universität Wien.

## Fragebogen zur Messung OXIDATIVER STRESS® Uni Wien

Ansprechpartner: A. o. Univ. Prof. Mag. Dr. Martin Czejka, 01 / 4277 55677  
 Gabriele Schüld

Datum: \_\_\_\_\_

männlich ( )    weiblich ( )    Alter \_\_\_\_\_    Körpergröße \_\_\_\_\_ (cm)    Körpergewicht \_\_\_\_\_ (kg)  
 Zutreffendes bitte ankreuzen (x)

**1.) Fragen zur eigenen körperlichen Befindlichkeit:**

- Fühlen Sie sich müde und abgeschlagen?    ja ( )    nein ( )
- Wie oft sind Sie im Jahr erkältet?    weniger als 1x ( )    2-3x ( )    öfter ( )
- Sind sie jetzt gerade erkältet bzw. nehmen Sie gerade Antibiotika?    ja ( )    nein ( )

**2.) Fragen zu den persönlichen Lebensgewohnheiten:**

- Sind Sie Raucher?    ja ( )    nein ( )
- Sind Sie dem Passivrauchen ausgesetzt?    ja ( )    nein ( )
- Trinken Sie regelmäßig Alkohol?    ja ( )    nein ( )
- Gehen Sie regelmäßig ins Solarium    ja ( )    nein ( )
- Fliegen Sie regelmäßig? (mind. 1x/Monat)    ja ( )    nein ( )

**3.) Fragen zu Ihrer Arbeit/Ihrem Arbeitsplatz:**

- Verbringen Sie viel Zeit vor dem Computer? (mind. 4h/Tag)    ja ( )    nein ( )
- Telefonieren Sie oft mit dem Mobiltelefon? (mind. 1h/Tag)    ja ( )    nein ( )
- Liegt Ihre Wohnung in einer schadstoffreichen Umgebung? (Autoabgase, Industrieabgase)?    ja ( )    nein ( )

Bitte blättern Sie um



universität  
 wien  
 Department für Klinische Pharmazie & Diagnostik  
 Fakultät für Lebenswissenschaften  
 Universität Wien.

**4.) Fragen zur Medikamenteneinnahme: bei Bedarf bitte Präparatenamen angeben!**

- Leiden Sie an einer akuten/chronischen Entzündung?    ja ( )    nein ( )
- Wenn ja, welche Medikamente nehmen Sie ein und wie lange schon? \_\_\_\_\_
- Nehmen Sie Hormonpräparate ein? (z.B. Antibabypille, Schilddrüsenpräparate) \_\_\_\_\_
- Wenn ja, welche und wie lange schon? \_\_\_\_\_
- Nehmen Sie diese Pharmakagruppen ein?
- Herz/Gefäß    ja ( )    nein ( )
- Blutdruck    ja ( )    nein ( )
- Antidiabetika (Cholesterinsenker)    ja ( )    nein ( )
- Wenn ja, welche und wie lange schon? \_\_\_\_\_
- Wurden Sie in den letzten Wochen geimpft?    ja ( )    nein ( )

**5.) Fragen zur körperlichen Verfassung und zur Ernährung:**

- Betreiben Sie Sport? (mehr als 2x/Woche)    ja ( )    nein ( )
- Essen Sie täglich Obst oder Gemüse?    ja ( )    nein ( )
- Trinken Sie Vitaminsäfte?    ja ( )    nein ( )
- Nehmen Sie regelmäßig „Antioxidantien“ (Vitamin C und Vitamine E etc.) ein?    ja ( )    nein ( )
- Trinken Sie täglich grünen Tee?    ja ( )    nein ( )
- Trinken Sie Rotwein?    ja ( )    nein ( )

Gesamtanzahl der mit „ja“ beantworteten Fragen: \_\_\_\_\_  
 Gesamtanzahl der mit „nein“ beantworteten Fragen: \_\_\_\_\_

**Ihr Messergebnis/Messwert:** \_\_\_\_\_ **FORT**  
 \_\_\_\_\_ **mmol/l TROLOX**

Abb. 5.1.: Beispiel eines Fragebogens zur Messung von FORT und FORD

### *Normalwerte*

Ist der Messwert des Patienten „normal“, so sollte dieser individuelle Wert als Basismesswert für weitere Messungen festgehalten werden. Die Normbereiche zum oxidativen Stress (OS) basieren auf detaillierten Populationsuntersuchungen und fußen auf einer etwa 10-jährigen Erfahrung im Bereich der Erfassung des oxidativen Messwertes. Normale Messwerte schließen eine Befindlichkeitsstörung oder Erkrankung jedoch nicht aus.

**Normalwerte:** FORT-WERTE < 310 FORT-Einheiten (2,3 mmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

FORD-WERTE zw. 1.07 – 1.53 mmol/l Trolox

Es kann auch vorkommen, dass bei Personen mit erhöhtem Risiko normale Werte gemessen werden. Dies betrifft beispielsweise Personen, die in Ballungsräumen leben, mit Chemikalien oder Umweltgiften in Kontakt kommen bzw. Personen, die ungünstigen Ernährungsgewohnheiten und Lebensstilfaktoren unterliegen, Hormonpräparate (wie z.B. orale Kontrazeptiva) einnehmen, Raucher etc. In diesen Fällen sollten beide Testsysteme FORT (oxidativer Stress) und FORD (antioxidatives Schutzsystem) zum Einsatz kommen um zu gewährleisten, dass der oxidative Stress unter Kontrolle bleibt.

Nach dem Erhalt der Testergebnisse stellt sich oft die Frage was man tun sollte, wenn die Werte für den oxidativen Stress erhöht sind. Für den Fall, dass die Werte moderat erhöht sind bzw. weit außerhalb der Norm liegen, sollten die üblichen medizinischen Untersuchungen mit Familienanamnese und der Erfragung der Lebensstilfaktoren erfolgen. Anschließend sollte man die allgemeinen Risikoprofile des Patienten untersuchen. Diese Untersuchung beinhaltet Blutdruckmessungen, eine Erstellung des Lipidprofils, Blutzuckermessung, Erfassung des Körpergewichtes, BMI und die Abklärung eventuell vorhandener Erkrankungen wie Asthma, Allergien oder Entzündungen.

### *Leicht erhöhte Messwerte*

Leicht erhöhte Messwerte können auch bei Personen, die Sport betreiben, nachgewiesen werden. Das gilt besonders für Menschen, die in der Vergangenheit eher weniger sportlich aktiv waren und sich jetzt einem strengen Trainingsplan unterziehen. Das Gleiche gilt für Sportler, die sich bei ihren Trainingseinheiten übernehmen. In diesem Fall sollte die Erstellung des oxidativen Stressprofils unter Einbezug des Trainers erfolgen.

### *Erhöhte Messwerte*

Weiterhin kann die Ursache für erhöhte Messwerte durch vorhandene Entzündungen (z. B. Gelenkentzündungen, Schleimbeutelentzündungen) verursacht sein. Manchmal sind die erhöhten Messdaten auch mit einer Erhöhung von Entzündungsmarkern (CRP) korreliert.

### *Messwerte außerhalb der Norm*

Liegen die Messwerte zum oxidativen Stress außerhalb der Norm, dann sollte der FORD-Test durchgeführt werden, um ein vollständiges Bild der oxidativen / antioxidativen Balance zu erhalten. Ergibt die Messung Hinweise auf eine Depletion an Antioxidanzien, so sollten, in Abhängigkeit vom Ausmaß der Depletion, entsprechende Ernährungsempfehlungen bzw. eine Empfehlung zur Supplementierung mit Antioxidanzien gegeben werden [MICRO-MEDICAL (e)].

### *Deutlich erhöhte Messwerte*

Die Erfahrungen und wissenschaftlichen Bestätigungen von Forschungsgruppen zeigen, dass einige Bedingungen hohe Messergebnisse hervorrufen können:

- Schwangerschaft
- Hormonersatztherapie
- Anwendung oraler Kontrazeptiva
- exzessives Ausdauertraining

Unter diesen Bedingungen ist es ratsam, Antioxidanzien in moderater Menge zu substituieren, obgleich häufig nur geringfügige Messwerterhöhungen festzustellen sind. Es wurde beobachtet, dass sich die Werte nach einer Schwangerschaft bzw. nach dem Absetzen der Pille wieder normalisieren [MICRO-MEDICAL (e)].

Beispiele für Messungen von OS und der antioxidativen Kapazität wurden am Department für Klinische Pharmazie und Diagnostik an der Fakultät für Lebenswissenschaften der Universität Wien unter der Anleitung von Herrn ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Martin Czejka durchgeführt. Es handelt sich hier um Messungen, die im Zuge von Diplomarbeiten durchgeführt wurden. Diplomanden betreuten bei ihren Messungen Personen, die bis zu dieser Zeit Hormonpräparate kontinuierlich verwendeten. Im Nachfolgenden wird auf die Messergebnisse der ProbandenInnen näher eingegangen. Die daraus resultierenden Daten stammen aus den Diplomarbeiten von: Kafka 2008, Eisl 2008 und Luf 2009.

### **5.1. Hormonpräparate zur Kontrazeption und zur HET**

In einem Zeitraum vom März 2009 bis September 2009 wurden Messdaten von 84 Personen mit Hormonsubstitution erhoben. Das Kollektiv bestand aus 18 Männern und 66 Frauen im Alter von 19 bis 88 Jahren (Tab. 5.1.). Neben der OS-Messung mittels FORT-Test, wurde auch die antioxidative Kapazität mit Hilfe des FORD-Tests durchgeführt. Dazu wurde das FORM®plus-Gerät mit sämtlichen Utensilien, jeweils in einem separaten Raum aufgestellt, um mögliche Fehlerquellen (Durchzug, Sonneneinstrahlung etc.) zu vermeiden. Nach der 1. Messung (FORT-Test-Messung), erfolgte eine Beratung der jeweiligen Person, und dabei wurde ein Fragebogen ausgefüllt, in dem neben Fragen zur körperlichen Befindlichkeit, zu den persönlichen Lebensgewohnheiten und zur Arbeit/Arbeitsplatz, es unter anderem auch Fragen zur Medikamenteneinnahme und zur körperlichen Verfassung sowie zur Ernährung gegeben hat (siehe dazu auch Abb. 5.1.). Mit Hilfe des Fragebogens ist man bestrebt, mögliche Ursachen für erhöhte OS-Werte zu finden. Interessanterweise hatten alle zu vermessenden Personen den Fragebogen sehr gewissenhaft ausgefüllt und selbst bei Unklarheiten nachgefragt, wodurch eine erhöhte Validierung der jeweiligen Werte zum Tragen käme. Da die Daten dem Datenschutz unterliegen, wurden die Fragebögen anonym und vertraulich behandelt. Bei Messungen über einem Wert von 350 FORT-Einheiten erfolgte eine 2. Messung (FORD-Test-Messung), bei dieser die antioxidative Kapazität der jeweiligen Person bestimmt wurde (siehe Abschn. 5. Klinische Bedeutung und Beobachtungen zur Dateninterpretation).

Tab. 5.1.: Messdaten von 84 Personen mit Hormonsubstitution [Luf 2009]

| Region | Geschlecht | Alter | Körpergröße (cm) | Gewicht (kg) | BMI | Hormonpräparate                                                  | andere Präparate                                                                 | Fort | Ford (mmol/l TROLOX) |
|--------|------------|-------|------------------|--------------|-----|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|------|----------------------|
| 1 w    |            | 42    | 176              | 58           | 19  | Marvelon                                                         | nein                                                                             | >600 | 1,12                 |
| 2 w    |            | 36    | 170              | 63           | 22  | H-Spirale                                                        | nein                                                                             | 318  |                      |
| 13 w   |            | 57    | 164              | 75           | 28  | Euthyrox 75                                                      | nein                                                                             | 373  |                      |
| 18 w   |            | 40    | 158              | 67           | 27  | Evra                                                             | Ass 2-3x/ Woche                                                                  | >600 | 0,98                 |
| 2 w    |            | 41    | 168              | 68           | 24  | Triodena25J.                                                     | nein                                                                             | 492  |                      |
| 3 w    |            | 40    | 169              | 77           | 27  | Euthyrox + Mirena                                                | nein                                                                             | 326  |                      |
| 10 w   |            | 55    | 173              | 78           | 26  | Euthyrox 75                                                      | nein                                                                             | 452  | 1,14                 |
| 13 w   |            | 41    | 170              | 73           | 25  | Euthyrox                                                         | nein                                                                             | 278  |                      |
| 15 w   |            | 29    | 162              | 60           | 23  | Implanon                                                         | Mefenaminsäure                                                                   | 300  |                      |
| 17 w   |            | 38    | 170              | 85           | 29  | H-Spritze                                                        | Nexium Präm                                                                      | 472  |                      |
| 3 w    |            | 35    | 173              | 100          | 21  | Mercilon                                                         | nein                                                                             | 599  |                      |
| 5 w    |            | 40    | 162              | 62           | 24  | Euthyrox 50                                                      | nein                                                                             | 237  |                      |
| 7 w    |            | 31    | 177              | 74           | 24  | Triodena 12J.                                                    | nein                                                                             | >600 |                      |
| 8 w    |            | 30    | 176              | 105          | 34  | Euthyrox                                                         | nein                                                                             | 427  |                      |
| 10 w   |            | 44    | 161              | 61           | 24  | Thyrex                                                           | Simvastatin                                                                      | 418  |                      |
| 11 w   |            | 51    | 160              | 75           | 29  | Thyrex + Spirale                                                 | nein                                                                             | 431  |                      |
| 12 w   |            | 34    | 156              | 54           | 22  | Thyrex                                                           | nein                                                                             | 339  |                      |
| 21 w   |            | 27    | 174              | 70           |     | Diane mite                                                       | nein                                                                             | 555  |                      |
| 27 w   |            | 30    | 168              | 64           |     | Triminulet                                                       | Aerius                                                                           | 462  |                      |
| 40 w   |            | 23    | 169              | 85           |     | Diane mite                                                       | nein                                                                             | >600 |                      |
| 46 w   |            | 44    | 170              | 91           |     | H-Spirale                                                        | nein                                                                             | 458  |                      |
| 52 w   |            | 43    | 167              | 82           |     | 3 Monats- Spritze                                                | Carvediol                                                                        | 427  | 1,33                 |
| 59 w   |            | 47    | 172              | 60           |     | H-Spirale                                                        | nein                                                                             | 294  |                      |
| 62 w   |            | 26    | 165              | 55           |     | Mirelle 9J.                                                      | nein                                                                             | 598  |                      |
| 63 w   |            | 49    | 170              | 85           |     | Thyrex                                                           | Lisinopril                                                                       | 294  |                      |
| 66 w   |            | 47    | 164              | 64           |     | Thyrex                                                           | nein                                                                             | 383  |                      |
| 70 w   |            | 41    | 173              | 85           |     | Evra                                                             | nein                                                                             | >600 | 1,42                 |
| 72 w   |            | 48    | 165              | 83           |     | Mercilon                                                         | nein                                                                             | 555  |                      |
| 75 w   |            | 31    | 172              | 60           |     | Thyrex + Pille                                                   | nein                                                                             | >600 |                      |
| 76 w   |            | 32    | 165              | 54           |     | Euthyrox 75                                                      | nein                                                                             | 400  |                      |
| 77 w   |            | 19    | 172              | 55           |     | Mercilon                                                         | nein                                                                             | >600 |                      |
| 84 w   |            | 32    | 172              | 69           |     | H-Spirale                                                        | nein                                                                             | 290  |                      |
| 97 w   |            | 42    | 156              | 76           |     | H-Spritze                                                        | nein                                                                             | 325  |                      |
| 14 w   |            | 36    | 159              | 72           |     | Meliane                                                          | nein                                                                             | >600 |                      |
| 4 m    |            | 29    | 160              | 57           |     | Testogel                                                         | nein                                                                             | 263  |                      |
| 7 w    |            | 26    | 165              | 59           |     | Yasmin                                                           | nein                                                                             | >600 |                      |
| 11 w   |            | 30    | 163              | 49           |     | H-Spritze                                                        | nein                                                                             | 246  |                      |
| 14 w   |            | 38    | 160              | 59           |     | H-Spirale                                                        | nein                                                                             | 422  | 0,98                 |
| 24 w   |            | 25    | 168              | 55           |     | Yasmin 7J.                                                       | nein                                                                             | >600 |                      |
| 25 m   |            | 58    | 187              | 95           |     | Euthyrox 50 5J.                                                  | Diamicron, Co-Renitec                                                            | 341  |                      |
| 26 w   |            | 35    | 180              | 87           |     | Euthyrox 75                                                      | nein                                                                             | 339  |                      |
| 5 w    |            | 32    | 172              | 50           |     | Marvelon                                                         | nein                                                                             | 520  |                      |
| 11 w   |            | 32    | 169              | 59           |     | Mercilon                                                         | nein                                                                             | 436  |                      |
| 13 w   |            | 41    | 165              | 92           |     | H-Spritze (3M.)                                                  | nein                                                                             | 386  |                      |
| 17 w   |            | 25    | 166              | 55           |     | Cileste                                                          | nein                                                                             | 400  |                      |
| 18 w   |            | 40    | 160              | 61           |     | Euthyrox                                                         | nein                                                                             | 409  |                      |
| 24 w   |            | 23    | 162              | 48           |     | Midane                                                           | nein                                                                             | >600 |                      |
| 5 w    |            | 22    | 164              | 64           |     | Evra                                                             | nein                                                                             | >600 |                      |
| 22 w   |            | 44    | 175              | 63           |     | Minulette                                                        | nein                                                                             | 586  |                      |
| 31 w   |            | 33    | 170              | 63           |     | H-Spirale 3 J vorher Pille                                       | nein                                                                             | 290  |                      |
| 2 w    |            | 44    | 177              | 58           |     | Thyrex 7J. + Tri-Minulet                                         | Bisoprolol                                                                       | >600 | 2,36                 |
| 5 w    |            | 45    | 163              | 94           |     | Euthyrox 5J. + H-Spirale 4J.                                     | nein                                                                             | 427  |                      |
| 1a w   |            | 47    | 178              | 90           |     | L-Thyrex 5J.                                                     | Bisoprolol                                                                       | 363  | 1,53                 |
| 2a w   |            | 36    | 158              | 56           |     | NuvaRing seit 2 Wo.                                              | nein                                                                             | 454  | 0,81                 |
| 3a w   |            | 57    | 168              | 60           |     | Euthyrox 50 seit 2 Mo.                                           | nein                                                                             | 270  | 1,15                 |
| 4a m   |            | 58    | 186              | 84           |     | Thyrex 1J.                                                       | nein                                                                             | 215  | 1,03                 |
| 5a w   |            | 33    | 176              | 63           |     | Euthyrox 50 seit 1 Mo.                                           | Augmentin 1G + Neo Citran                                                        | 413  | 1,14                 |
| 6a w   |            | 38    | 170              | 68           |     | NuvaRing seit 3 Mo.                                              | nein                                                                             | 409  | 1,19                 |
| 7a m   |            | 40    | 180              | 90           |     | Testogel 50                                                      | Singulair 10                                                                     | 274  | 1,3                  |
| 8a w   |            | 30    | 150              | 44           |     | NuvaRing vor 2 Mo.abgesetzt                                      | 1x Monuril 1G                                                                    | 410  | 1,47                 |
| 9a w   |            | 39    | 170              | 60           |     | NuvaRing 1J. + Thyrex 1J.                                        | nein                                                                             | 422  | 1,45                 |
| 10a w  |            | 67    | 156              | 57           |     | Activelle + Euthyrox 10J.                                        | Lisinopril 10 seit 3/4 J.                                                        | 422  | 1,18                 |
| 27a m  |            | 41    | 180              | 65           |     | Euthyrox seit 1 Mo.                                              | nein                                                                             | 242  | 1,2                  |
| 11a m  |            | 40    | 174              | 76           |     | Testogel 50 seit 3 Mo.                                           | nein                                                                             | 306  | 1                    |
| 12a w  |            | 65    | 158              | 95           |     | Euthyrox 150 1J.                                                 | Lisinocomp + Amlodipin 4J.                                                       | 359  | 1,22                 |
| 13a m  |            | 67    | 180              | 82           |     | Euthyrox 5J.                                                     | Plavix 75, Biopress 5, Sortis 80 Inspira, Thrombo Ass 100                        | 285  | 1,44                 |
| 14a w  |            | 88    | 167              | 100          |     | Thyrex 20J.                                                      | Marcoeur, Amlodipin, Lasix 40                                                    | 287  | 1,17                 |
| 15a m  |            | 67    | 180              | 104          |     | Euthyrox 100 2J.                                                 | Renistad 20 + Co-Renistad 12 5/20                                                | 269  | 1,31                 |
| 16a w  |            | 64    | 160              | 54           |     | Thyrex 1J.                                                       | Amlodipin + Pantoloc 2 Mo / Coldimin derzeit                                     | 341  | 1,08                 |
| 17a m  |            | 33    | 185              | 75           |     | Trijodthyronin San 25 seit 1 Wo.                                 | Reipax 40 1x/Mo seit 6J.                                                         | 206  | 1,56                 |
| 18a w  |            | 32    | 170              | 70           |     | NuvaRing seit 1 Mo.                                              | Marcoeur, Voltaren 50 Rapid, Lasilacton                                          | 301  | 1,44                 |
| 19a w  |            | 67    | 165              | 90           |     | Euthyrox                                                         | Ass 100/Tritace 5/Tritacide 5/12,5/Pantoloc 20/Concor 1,25/Plavix 75/Inegy 10/40 | 398  | 1,31                 |
| 20a m  |            | 62    | 182              | 105          |     | Nebido 6 Mo. + Testogel vor 2 Mo.                                | nein                                                                             | 224  | 1,82                 |
| 21a m  |            | 40    | 186              | 87           |     | Testogel 6 Mo. + L-Thyroxin 1J.                                  | nein                                                                             | 233  | 1,25                 |
| 22a m  |            | 43    | 180              | 78           |     | L-Thyroxin 1J.                                                   | nein                                                                             | 388  | 1,18                 |
| 23a m  |            | 39    | 173              | 67           |     | Prednisolon 20 20J. + Cipraleth 40 4J./beide abgesetzt vor 4 Mo. | TCM + Homopathie                                                                 | 265  | 1,08                 |
| 24a w  |            | 35    | 173              | 50           |     | Triclist                                                         | Thomapyrin 10J.regelmäßig                                                        | 553  | 1,31                 |
| 25a w  |            | 62    | 164              | 58           |     | Euthyrox 4J.                                                     | nein                                                                             | 373  | 1,13                 |
| 26a m  |            | 66    | 178              | 85           |     | L-Thyroxin 3J.                                                   | nein                                                                             | 318  | 1,82                 |
| 29a w  |            | 36    | 163              | 47           |     | H-Spritze 2J.                                                    | nein                                                                             | 287  | 1,15                 |
| 30a w  |            | 56    | 167              | 54           |     | Duoklimen 5J.                                                    | Ibuprofen 400 2x1 (am Tag der Messung), Atenolol Comp., Renistad 20 seit 10J.    | 535  | 1,09                 |
| 31a m  |            | 35    | 174              | 76           |     | Thyrex 1J.                                                       | nein                                                                             | 256  | 0,96                 |
| 32a m  |            | 51    | 169              | 80           |     | Euthyrox 100 4J.                                                 | nein                                                                             | 350  |                      |
| 33a m  |            | 43    | 178              | 81           |     | Euthyrox 50 1J.                                                  | nein                                                                             | 278  | 0,89                 |

| Wie oft erkrankt/ Jahr | Raucher | regelm. Alkohol | >4h Computer/ Tag | >1h Mobiltelefon/ Tag | Schadstoffbelast. Leben | >2x Sport/ Woche | Obst oder Gemüse tagl. | Vitaminsäfte | Antioxidantien | Grüner Tee | Rotwein | Sonstiges                                    |
|------------------------|---------|-----------------|-------------------|-----------------------|-------------------------|------------------|------------------------|--------------|----------------|------------|---------|----------------------------------------------|
| 0 ja                   | nein    | ja              | nein              | nein                  | ja                      | ja               | ja                     | ja           | ja             | ja         |         |                                              |
| 2-3x                   | nein    | ja              | ja                | nein                  | nein                    | ja               | nein                   | nein         | nein           | ja         |         |                                              |
| 0                      | nein    | ja              | ja                | nein                  | ja                      | ja               | ja                     | nein         | nein           | ja         |         |                                              |
| 2-3x                   | nein    | nein            | ja                | ja                    | nein                    | ja               | nein                   | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 0                      | nein    | nein            | ja                | nein                  | ja                      | ja               | ja                     | ja           | ja             | ja         |         |                                              |
| 0                      | nein    | nein            | ja                | ja                    | nein                    | ja               | nein                   | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | nein    | nein            | ja                | ja                    | nein                    | ja               | nein                   | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | ja      | nein            | nein              | ja                    | ja                      | nein             | ja                     | nein         | nein           | nein       |         | Gelbfieber- Impfung                          |
| 2-3x                   | nein    | nein            | ja                | ja                    | ja                      | ja               | nein                   | ja           | nein           | ja         |         |                                              |
| 0                      | ja      | nein            | nein              | ja                    | ja                      | nein             | nein                   | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | nein    | nein            | ja                | nein                  | ja                      | nein             | ja                     | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | nein    | nein            | ja                | ja                    | nein                    | ja               | nein                   | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | nein    | nein            | ja                | nein                  | nein                    | ja               | ja                     | ja           | nein           | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | ja      | nein            | ja                | nein                  | nein                    | ja               | ja                     | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 0                      | nein    | nein            | ja                | nein                  | nein                    | ja               | ja                     | ja           | ja             | ja         |         |                                              |
| 2-3x                   | nein    | nein            | ja                | ja                    | nein                    | ja               | nein                   | ja           | nein           | nein       |         | Hepatitis Impfung 3.                         |
| öfter                  | nein    | nein            | ja                | nein                  | ja                      | ja               | ja                     | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | nein    | nein            | ja                | nein                  | nein                    | nein             | ja                     | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 0                      | ja      | nein            | ja                | ja                    | ja                      | ja               | ja                     | nein         | nein           | ja         |         |                                              |
| 2-3x                   | nein    | nein            | ja                | ja                    | ja                      | nein             | nein                   | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | nein    | ja              | ja                | nein                  | nein                    | ja               | nein                   | nein         | nein           | ja         |         |                                              |
| 2-3x                   | nein    | ja              | ja                | nein                  | nein                    | nein             | nein                   | nein         | nein           | ja         |         |                                              |
| 2-3x                   | ja      | nein            | ja                | ja                    | nein                    | ja               | nein                   | nein         | nein           | ja         |         | regelm. Solarium                             |
| 2-3x                   | nein    | nein            | ja                | ja                    | nein                    | ja               | nein                   | nein         | nein           | nein       |         | regelm. Solarium                             |
| 0                      | nein    | nein            | ja                | ja                    | nein                    | ja               | ja                     | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 0                      | nein    | nein            | nein              | ja                    | nein                    | nein             | ja                     | nein         | ja             | nein       |         |                                              |
| 0                      | nein    | nein            | ja                | ja                    | nein                    | nein             | ja                     | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 0                      | nein    | nein            | ja                | nein                  | nein                    | nein             | ja                     | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 0                      | nein    | nein            | ja                | nein                  | ja                      | ja               | nein                   | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 0                      | nein    | ja              | ja                | nein                  | ja                      | nein             | ja                     | ja           | ja             | nein       |         |                                              |
| öfter                  | ja      | nein            | ja                | ja                    | nein                    | nein             | nein                   | nein         | nein           | nein       |         | regelm. Solarium                             |
| öfter                  | nein    | ja              | ja                | ja                    | nein                    | nein             | ja                     | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| öfter                  | nein    | nein            | nein              | ja                    | ja                      | nein             | ja                     | ja           | ja             | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | nein    | nein            | nein              | ja                    | nein                    | ja               | ja                     | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | ja      | ja              | nein              | ja                    | nein                    | ja               | ja                     | ja           | nein           | ja         |         | FSME + regelm. Solarium                      |
| 2-3x                   | nein    | nein            | ja                | nein                  | ja                      | nein             | ja                     | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | ja      | nein            | nein              | ja                    | nein                    | nein             | ja                     | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 0                      | nein    | nein            | ja                | ja                    | nein                    | ja               | ja                     | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | ja      | ja              | ja                | ja                    | nein                    | nein             | nein                   | nein         | nein           | nein       |         | regelm. Solarium                             |
| 0                      | nein    | nein            | nein              | ja                    | nein                    | ja               | ja                     | ja           | ja             | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | ja      | nein            | ja                | ja                    | nein                    | ja               | ja                     | nein         | nein           | nein       |         | FSME + Allergiker                            |
| 0                      | ja      | ja              | ja                | ja                    | nein                    | nein             | ja                     | ja           | nein           | nein       |         | regelm. Solarium                             |
| 2-3x                   | ja      | ja              | ja                | ja                    | nein                    | nein             | nein                   | ja           | nein           | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | nein    | nein            | ja                | nein                  | ja                      | nein             | ja                     | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| öfter                  | nein    | ja              | ja                | ja                    | ja                      | ja               | nein                   | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | nein    | nein            | ja                | ja                    | nein                    | ja               | ja                     | nein         | nein           | nein       |         | fliegt regelm.                               |
| 2-3x                   | nein    | nein            | ja                | nein                  | nein                    | ja               | ja                     | nein         | nein           | ja         |         |                                              |
| 2-3x                   | ja      | nein            | nein              | ja                    | nein                    | nein             | ja                     | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | nein    | nein            | nein              | ja                    | nein                    | ja               | ja                     | nein         | ja             | nein       |         | regelm. Solarium                             |
| 2-3x                   | ja      | nein            | ja                | nein                  | nein                    | ja               | ja                     | nein         | nein           | ja         |         | regelm. Solarium                             |
| 0                      | nein    | nein            | ja                | ja                    | nein                    | ja               | ja                     | nein         | ja             | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | ja      | nein            | nein              | ja                    | nein                    | nein             | nein                   | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 0                      | nein    | nein            | ja                | nein                  | nein                    | nein             | ja                     | ja           | nein           | ja         |         | regelm. Solarium                             |
| 0                      | ja      | ja              | ja                | ja                    | nein                    | nein             | ja                     | ja           | nein           | ja         |         |                                              |
| 2-3x                   | nein    | ja              | ja                | ja                    | ja                      | nein             | ja                     | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | nein    | ja              | ja                | ja                    | ja                      | nein             | nein                   | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | nein    | ja              | ja                | ja                    | ja                      | nein             | nein                   | nein         | nein           | nein       |         | Erkältung                                    |
| 0                      | nein    | nein            | ja                | ja                    | nein                    | nein             | ja                     | nein         | nein           | nein       |         | Thyphus Impfung seit 2 Wo                    |
| 0                      | nein    | nein            | ja                | nein                  | ja                      | ja               | nein                   | ja           | ja             | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | ja      | nein            | ja                | ja                    | ja                      | nein             | ja                     | ja           | ja             | nein       |         | Harnwegsinfekt/rezidiv.PAPIII, seit 1J.PAPII |
| 0                      | nein    | nein            | ja                | nein                  | nein                    | ja               | ja                     | ja           | ja             | ja         |         |                                              |
| 0                      | nein    | nein            | nein              | nein                  | nein                    | nein             | ja                     | ja           | ja             | nein       |         | Harnwegsinfekt                               |
| 0                      | ja      | nein            | ja                | nein                  | nein                    | nein             | ja                     | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | nein    | nein            | ja                | ja                    | ja                      | nein             | ja                     | nein         | nein           | ja         |         |                                              |
| 0                      | nein    | nein            | nein              | ja                    | ja                      | nein             | nein                   | nein         | nein           | nein       |         | Twinrix Auffrischung                         |
| 2-3x                   | nein    | nein            | ja                | nein                  | nein                    | ja               | ja                     | ja           | ja             | ja         |         | Stent OP vor 1J.                             |
| 0                      | nein    | nein            | nein              | nein                  | nein                    | ja               | nein                   | nein         | nein           | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | ja      | nein            | ja                | ja                    | nein                    | nein             | ja                     | nein         | nein           | nein       |         | derzeit Gastritis + Colitis                  |
| 2-3x                   | nein    | nein            | nein              | nein                  | nein                    | ja               | nein                   | nein         | nein           | nein       |         | regelm. Solarium                             |
| 0                      | ja      | ja              | ja                | nein                  | nein                    | ja               | nein                   | nein         | nein           | nein       |         | regelm. Solarium + Migränepatient            |
| 0                      | nein    | nein            | nein              | ja                    | nein                    | nein             | nein                   | ja           | nein           | nein       |         |                                              |
| 0                      | nein    | nein            | ja                | ja                    | nein                    | ja               | ja                     | nein         | ja             | nein       |         | 4 Stents + 2 Bypässe / Thyphus Impfung       |
| 0                      | nein    | nein            | ja                | ja                    | nein                    | ja               | ja                     | ja           | ja             | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | nein    | nein            | ja                | nein                  | nein                    | ja               | ja                     | ja           | nein           | nein       |         | Morbus Crohn im Abheilen                     |
| 2-3x                   | nein    | nein            | nein              | nein                  | nein                    | nein             | ja                     | ja           | nein           | nein       |         | Migränetherapie                              |
| 0                      | nein    | nein            | nein              | nein                  | nein                    | ja               | ja                     | ja           | nein           | nein       |         | regelm. UV-Belastung durch Golfspielen       |
| 0                      | nein    | ja              | ja                | nein                  | nein                    | ja               | nein                   | nein         | nein           | ja         |         | regelm. UV-Belastung durch Golfspielen       |
| 2-3x                   | ja      | nein            | ja                | ja                    | nein                    | nein             | ja                     | nein         | nein           | ja         |         | regelm. Solarium                             |
| 2-3x                   | ja      | nein            | ja                | nein                  | nein                    | nein             | ja                     | ja           | nein           | nein       |         |                                              |
| 2-3x                   | ja      | nein            | ja                | ja                    | nein                    | ja               | nein                   | nein         | nein           | nein       |         | Augmentin vor 2 Wo.(Zahn)                    |
| 0                      | ja      | nein            | ja                | nein                  | ja                      | ja               | nein                   | nein         | nein           | ja         |         |                                              |
| 2-3x                   | ja      | nein            | nein              | ja                    | ja                      | nein             | ja                     | nein         | nein           | nein       |         |                                              |

W. Neustadt  
Graz  
Wien 1170  
Salzburg  
Innsbruck  
OO  
NO  
Kärnten  
w Frauen  
m Männer

Wien 1020  
Wien 1030  
Wien 1120  
Wien 1160  
Wien 1190  
Wien 1200  
Wien 1210  
Wien 1220

Orale Kontrazeptiva, Hormonersatztherapie  
Schilddrüsenhormone  
Kombination von 2 Hormonpräparaten  
Testosteronsubstitution  
Hormonpräparate abgesetzt  
andere Präparate  
FORT-Wert <300  
FORT-Wert 300 - 600  
FORT-Wert (mmol/l TROLOX)  
Maximum - Wert  
Minimum - Wert

Die Fragebögen mit den gesammelten Daten wurden dann in eine entsprechende Tabelle übertragen (siehe Tab. 5.1.). Zu erwähnen ist, dass Werte, die über 600 FORT und somit über dem messbaren Bereich des Testgerätes (Anzeige: >600) lagen, in die Tabelle aufgenommen wurden, indem ihnen der Wert > 600 FORT zugewiesen wurde. Diese Messwerte stammen zu etwa 60% aus Luf 2009.

#### *Unterschiedlicher Wohnort bzw. Arbeitsplatz*

Wie man aus der Tab. 5.1. aus der Legende erkennen kann, stammen die ProbandenInnen aus unterschiedlichen Gegenden: Bundesweit waren 4 Frauen aus Wiener Neustadt, 6 Frauen aus Graz, 1 Frau aus Salzburg, 5 Frauen und 2 Männer aus Innsbruck, 6 Frauen aus Oberösterreich, 7 Frauen und 5 Männer aus Niederösterreich und 2 Frauen aus Kärnten. Aus Wien stammten folgende ProbandenInnen: 23 Frauen aus dem 17. Wiener Gemeindebezirk, 2 Frauen und 2 Männer aus dem 2. Wiener Gemeindebezirk, 1 Frau aus dem 3. Wiener Gemeindebezirk, 1 Frau aus dem 12. Wiener Gemeindebezirk, 1 Mann aus dem 16. Wiener Gemeindebezirk, 1 Frau und 1 Mann aus dem 19. Wiener Gemeindebezirk, 1 Frau und 2 Männer aus dem 20. Wiener Gemeindebezirk, 4 Frauen und 4 Männer aus dem 22. Wiener Gemeindebezirk und schließlich 1 Mann aus dem 21. Wiener Gemeindebezirk.

Aufgrund des unterschiedlichen Wohnortes bzw. Arbeitsplatzes der Personen kann es mitunter zu signifikanten Unterschieden in den Messdaten kommen, da es sich sowohl um schadstoffarme (z.B. Kärnten, Salzburg, Innsbruck etc.), also auch um schadstoffreiche (z.B. Wien und Umgebung, Graz etc.) Regionen handelt. Bei der Datenerfassung betreffend ein Kollektiv „Männer aus Wiener Neustadt“ und ein Kollektiv „Männer aus Graz“ zeigte sich, dass das Kollektiv aus Wiener Neustadt im Mittel einen geringeren OS-Wert hatte, als jenes aus Graz. Ursache hierfür könnte ein ortsspezifischer Faktor sein (Graz hat eine höhere Feinstaubbelastung und ist häufiger von Smog betroffen als Wiener Neustadt). Schließlich waren die Werte der Wiener Neustädter um rund 20% niedriger als die der Grazer Probanden [Eisl 2008].

Andererseits zeigte sich dies bei einer Messung von einem Kollektiv aus Bad Tatzmannsdorf, welches hauptsächlich aus Frauen bestand, die nach einer Chemotherapie, im Therapiezentrum Rosalienhof, onkologisch nachbetreut wurden. Dieses Kollektiv reiste aus allen Bundesländern Österreichs an und es stellte sich nun die Frage, ob es einen direkten Zusammenhang zwischen der näheren Umwelt der Patienten (schadstoffarm, schadstoffreich) mit einer erhöhten Radikaldichte gäbe?

Bei der Auswertung zeigte sich, dass die Messergebnisse für die Patienten aus der Stadt bzw. für jene mit einem Arbeitsplatz in einer schadstoffreichen Umgebung zwar im Bereich des Mittelwertes und der Standardabweichung in unterschiedlicher Streuung lagen [Wouschek 2007], dies aber keinen signifikanten Unterschied nach deren Rehabilitation machte. Desweiteren zeigte sich, dass bei jenen Patienten, die in ländlichen Regionen wohnen oder arbeiten, es sich um eine schadstoffarme Region handelt und dass sowohl vor als auch nach der Therapie kein signifikanter Unterschied zu erkennen war, da die Mittelwerte alle im leicht erhöhten oxidativen Stress lagen. Eine Aussage über ein Kollektiv aus Mattersburg (wo Messungen in einer Apotheke stattfanden) brachte aufgrund unzureichender Daten keine nennenswerten Ergebnisse [Wouschek 2007].

### *Hormonpräparate zur HET*

In der Tab. 5.1. sind folgende Daten erfasst worden: 2 Frauen, die Hormonpräparate zur HET einnahmen, waren im Alter von 56 (Duokliman®, seit 5 Jahren, türkis) und 67 (Activelle® und Euthyrox® seit 10 Jahren, rosa). Bei der Messung der 1. Frau ergibt sich ein Wert von 535 FORT und ein FORD-Wert von 1.09 mmol/l Trolox. Die 2. Frau nahm noch zusätzlich ein Schilddrüsenhormonpräparat ein und erreichte einen Wert von 422 FORT mit einem FORD-Wert von 1.18 mmol/l Trolox. Der relativ hohe Wert von 535 FORT, der ersten Anwenderin, läßt sich vermutlich daraus erklären, dass sie am Tage der Messung noch zusätzlich 2 Tabletten Ibuprofen 400 mg einnahm, ein NSAID (Nicht Steroidales Anti-phlogisticum) um bestehende Entzündungsprozesse zu beseitigen. Ebenfalls zu dieser Gruppe der Hormonersatztherapie (HET) fällt ein einziger 62 jähriger Mann, dessen Messwert bei 224 FORT und bei einer antioxidativen Kapazität von 1.02 mmol/l Trolox liegt. Dieser Mann hatte bereits schon eine 2 malige i.m. Injektion von Nebido 1000 mg/4 ml (1 Injektion alle 3 Monate!) bekommen und zusätzlich, seit 2 Monaten, schmierte er TESTOGEL® 25 mg Gel. Darüberhinaus nahm er aufgrund bereits vorhandener 4 Stents und 2 Bypässen, regelmäßig 7 verschiedene Medikamente ein. Wie man aus den beiden Messwerten erkennen kann, zeigt sich einerseits ein sehr niedriger FORT-Wert, vermutlich dadurch, dass dieser möglicherweise durch eine Medikamenteninteraktion beeinflusst wird. Durch die chronische Einnahme von solchen Medikamenten kann es zur Abnahme der physiologischen Radikalproduktion kommen. Andererseits zeigt sich ein guter FORD-Wert von 1.02 mmol/l Trolox, der eine mögliche Ursache für den regelmäßigen Sport und der regelmäßigen Einnahme von Obst und Gemüse sein kann. Die Verwendung von TESTOGEL® 25 mg Gel wurde auch von 3 anderen Männern appliziert, deren Durchschnittswert etwa 270 FORT und 1.0 mmol/l Trolox zeigt. Mit 4 Probanden kann jedoch noch keine zuverlässige Aussage getroffen werden, es kann hier nur eine Vermutung aufgestellt werden, die mit weiteren Studien verifiziert werden sollte.

### *Vergleich unterschiedliche Applikationsformen*

Bei der Anwendung von Hormonpräparaten kann man aus der Tab. 5.1. erkennen, dass hier unterschiedliche Applikationsformen hinsichtlich der Kontrazeption bzw. der HET vorliegen. So gibt es auf der einen Seite ein Kollektiv „der oralen Applikation“, bestehend aus 20 Frauen, von denen 18 Frauen orale Kontrazeptiva, sowie 2 Frauen Hormonpräparate zur HET einnahmen und auf der anderen Seite ein Kollektiv „der extravasalen Applikation“, welches aus 19 Frauen besteht, die parenteral, subcutan, transdermal, in Form eines IUPs bzw. intravaginal Hormonpräparate applizierten.

Im ersten Kollektiv „der oralen Applikation“ sind kombinierte orale Kontrazeptiva (KOK: bestehend aus einer Estrogen- und Gestagenkomponente) angeführt wie Marvelon®, Mercilon®, Diane mite®, Mirelle®, Yasmin®, Cileste®, Midane®, Minulette® und 4 Dreistufen-Präparate (Triodena®, Tri-Minulet®, Tricilest®) sowie 2 kombinierte Präparate zur HET (Duokliman®, Activelle®).

Im zweiten Kollektiv „der extravasalen Applikation“ verwendeten 5 Frauen, als IUP-Applikationsform, die Hormonspirale (es handelt sich hier wahrscheinlich um das Intrauterinpessar Mirena®, die zur Zeit in Österreich vertrieben wird). Weiters sind 3 Frauen von diesem Kollektiv Evra®-Anwenderinnen, also hier erfolgte eine transdermale Applikation in Form eines Pflasters.

Eine parenterale Applikation in Form einer Hormonspritze (DEPOCON®-Fertigspritze) gab es bei 5 Frauen. 3 Frauen hatten in Verwendung den NuvaRing® als intravaginale Applikation.

Vergleicht man nun das erste Kollektiv „der oralen Applikation“ mit dem zweiten Kollektiv „der extravasalen Applikation“, so ergeben sich Werte  $> 600$  FORT bei 10 Frauen des ersten Kollektivs, wobei 2 Frauen zusätzlich Schilddrüsenpräparate einnahmen. Bei der Anwenderin, die Marvelon® oral eingenommen hatte, wurde leider nur ein einziger FORD-Wert von 1.12 mmol/l Trolox ermittelt.

Das zweite Kollektiv zeigt ebenfalls sehr hohe Werte von  $> 600$  FORT ausschließlich bei 3 Anwenderinnen, die das transdermale Pflaster Evra® verwendeten. Auch hier zeigt sich, dass bei Verwendung von kombinierten Kontrazeptiva (Estrogen- und Gestagenkomponente) sehr hohe FORT-Werte erreicht werden können. Von diesen Frauen gibt es 2 FORD-Werte von 0.98 und 1.42 mmol/l Trolox. Ebenfalls zeigt sich, dass bei der Evra®-Anwenderin, die einen FORD-WERT von 0,98 mmol/l Trolox (Normal-Werte sind zw. 1.07 – 1.53 mmol/l Trolox) besitzt, regelmäßig 2-3 mal pro Woche ein NSAID (ASS: Aspirin; Acetylsalizylsäure) einnimmt, um vermutlich bestehende Entzündungen, Kopfschmerzen, Gliederschmerzen und Erkältungen zu lindern. Interessanterweise sind bei den 3 NuvaRing® - Anwenderinnen, Werte von 301, 409 und 454 FORT sowie FORD-Werte von 1.44, 1.19 und 0.81 mmol/l Trolox erreicht worden. Einerseits sind diese FORT-Werte nur mäßig erhöht, was dafür spricht, dass die intravaginale Applikationsform, trotz Kombinationspräparat (Estrogen- und Gestagenkomponente) vermutlich besser vertragen wird, als die transdermale Form mit dem Evra®-Pflaster. Andererseits ist bei einer NuvaRing®-Anwenderin die antioxidative Kapazität nur 0.81 mmol/l Trolox bei einem erhöhten Wert von 454 FORT, was daraus schließen läßt, dass im Körper eine übermäßige Radikalbildung entweder eine Antioxidanziendepletion verursacht hat oder umgekehrt. Eine solche Konstellation kann sich einerseits durch die Anwendung eines kombinierten Kontrazeptivums und andererseits durch den regelmäßigen Nikotingenuß zeigen, welches beides, in diesem Fall, bei dieser Probandin zutreffen würde.

Errechnet man sich nun den FORT-Durchschnittswert beider Kollektive beträgt er beim ersten Kollektiv „der oralen Applikation“ durchschnittlich 500 FORT-Einheiten und beim zweiten Kollektiv „der extravasalen Applikation“ durchschnittlich 394 FORT-Einheiten. Daraus läßt sich vermuten, dass beim zweiten Kollektiv eine wesentlich geringere OS-Belastung vorliegt als beim ersten Kollektiv.

Diese Vermutung wird dadurch bestätigt, dass bei der oralen Applikation von KOK (kombinierte orale Kontrazeptiva) ein First-Pass-Effekt in der Leber stattfindet und somit sowohl die Estrogene als auch die Gestagene durch das Cytochrom-P<sub>450</sub>-System verstoffwechselt werden. Bei den Estrogenen entstehen im Laufe des Estrogen-Metabolismus aus Catechol-Estrogene, ortho-Chinone, aus denen anschließend enzymatisch durch Redoxcyclingprozessen vermehrt Radikale gebildet werden (siehe dazu Abschn. 2.3.2.4. Bildung von Estrogenchinonen und Redoxcycling). Dies bewirkt weiters eine Verschiebung der Mineralstoffinteraktionen mit einer zusätzlichen vermehrten Freisetzung von Zink, welches ein wichtiger Cofaktor der Superoxiddismutase (SOD) darstellt. Durch den bestehenden Zinkmangel kann nun das Enzym Superoxiddismutase (SOD) nicht mehr ausreichend die entstandenen Radikale eliminieren und folglich führt dies zu einem signifikant erhöhten OS bei Anwenderinnen der KOK [Döll 2002].

Ein weiterer Grund für die niedrigeren FORT-Werte des zweiten Kollektivs ist die Wirkstoffzusammensetzung einiger, darin befindlicher, Präparate. Es scheint auch hier die Höhe des Oxidativen Stresses vom Wirkstoff des hormonellen Kontrazeptivums abhängig zu sein. Reine Gestagenpräparate, die in der Tabelle aufgelistet sind, wären Implanon®-Implantat, DEPOCON®-Fertigspritze und die Hormonspirale Mirena®. Da diese Messwerte niedriger sind als die der Pillenanwenderinnen, lässt sich vermuten, dass reine Gestagen-Präparate den Oxidativen Stress kaum beeinflussen. Interessant wäre auch, ob mit oralen Kontrazeptiva, die reine Gestagenpräparate sind (Cerazette®, Micronovum®), dieselben niedrigen Werte erzielt werden können.

Um sich einen besseren Überblick über das zweite Kollektiv zu verschaffen wurden zusätzlich Messdaten (etwa 40%) von anderen Diplomarbeiten in einer Graphik (Abb. 5.2.) zur Auswertung ergänzt. Dabei handelt es sich ausschließlich um Messwerte von Frauen, die extravasal Präparate verwendeten [Kafka 2008, Eisl 2008, Luf 2009].

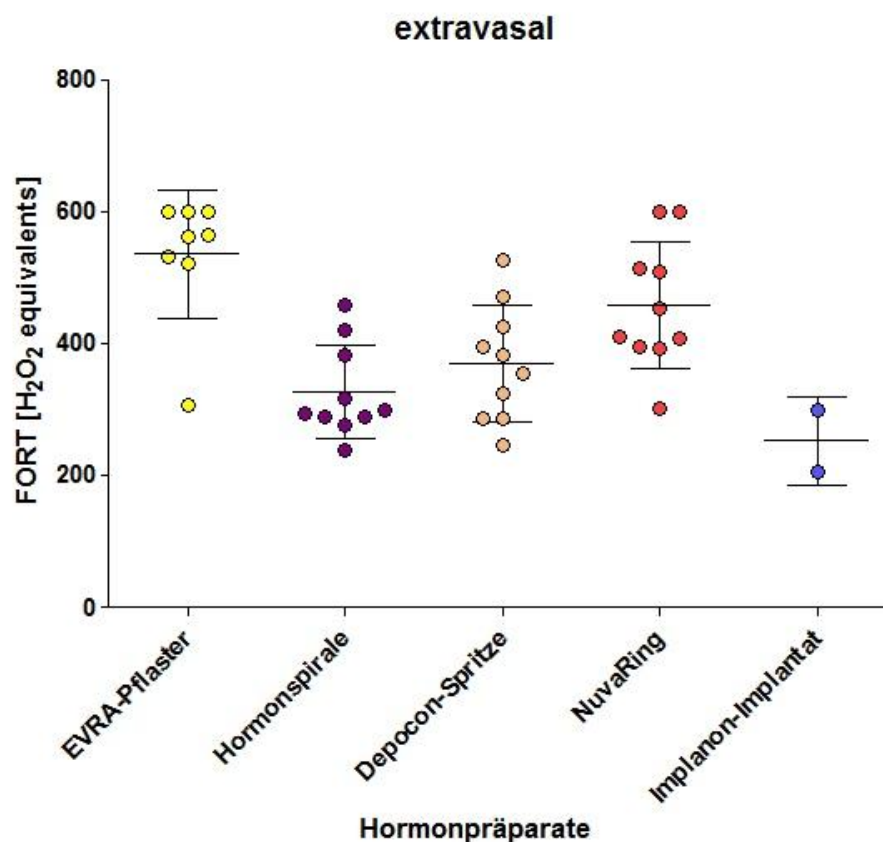


Abb. 5.2.: Vergleich kombinierte Kontrazeptiva (KK) mit reinen Gestagenpräparaten in Form der extravasalen Applikation [Kafka 2008, Eisl 2008, Luf 2009].

In Abb. 5.2. zeigt sich eine deutliche Belastung durch Evra. 7 von 8 Probandinnen liegen hier in einem Bereich von 600 FORT. Ebenso signifikant lässt Implanon eine sehr geringe Belastung von 200 bis 300 FORT erkennen. Die anderen Anwendungsformen liegen in einem Bereich zwischen 200 und 600 FORT, wobei die Probandinnen der Applikationsform NuvaRing bei höheren FORT-Werten liegen als die Anwenderinnen der Spirale und der Spritze.

## **5.2. Schilddrüsenhormonpräparate**

Von den 84 Personen, bei denen die OS und die antioxidative Kapazität, in einem Zeitraum von März 2009 bis September 2009, gemessen wurde, nahmen 31 zu dieser Zeit Schilddrüsenpräparate ein und 8 davon eine Kombination aus Schilddrüsenpräparaten und Kontrazeptiva (siehe Tab. 5.1.). Berechnet man den Mittelwert der FORT- und FORD-Messungen von den 31 AnwenderInnen so erhält man einen durchschnittlichen Messwert von etwa 330 FORT und etwa 1.06 mmol/l Trolox (bei 22 AnwenderInnen!). Vergleicht man nun diese Durchschnittswerte mit den Durchschnittswerten von den ProbandenInnen, die nur Hormonpräparate zur Kontrazeption und zur HET einnahmen, also Durchschnittswerte bei etwa 443 FORT-Einheiten und einen FORD-Wert von etwa 1.31 mmol/l Trolox im Mittel, resultiert daraus, dass die FORT-Durchschnittswerte der Schilddrüsenpräparat-AnwenderInnen um 113 FORT-Einheiten somit niedriger sind, als die der Hormonpräparat-AnwenderInnen zur Kontrazeption und zur HET. Bei den sogenannten 8 Kombi-AnwenderInnen (Kombination aus Schilddrüsenpräparaten und Kontrazeptiva) beträgt der Mittelwert der FORT-Messung etwa 432 FORT-Einheiten, während der der antioxidativen Kapazität einen Messwert von etwa 1.3 mmol/l Trolox ergibt (dieser Mittelwert wurde nur von 3 AnwenderInnen errechnet). Hier zeigt sich nur ein geringer Unterschied von 11 FORD-Einheiten, während bei der Messung der antioxidativen Kapazität beide Durchschnittswerte praktisch ident sind. Es ist hier zu beachten, daß bei einer Schilddrüsenhormonsubstitution in Kombination mit einem Estrogen-hältigen Präparat, es zu einer Änderung von freiem Thyroxin und TSH kommen kann. Dies ist durch eine Steigerung des Thyreotropin-Bindungsglobulins (TBG) bedingt. Erhöhte Bindung von Thyroxin und TBG führt über Feedback zur Erhöhung von TSH [Schindler 2003]. Andererseits kann durch die Gabe von Androgenen, Anabolika und Glucocorticoiden eine Verminderung der TBG-Konzentration erfolgen, wobei die Einflüsse weitgehend durch die Gegenregulation über die Sekretion von Thyreotropin (hypophysäres Steuerhormon, TSH) und Schilddrüsenhormonen ausgeglichen werden kann, so dass sich die freien Konzentrationen an  $T_4$  und  $T_3$  letztlich nicht ändern [Forth et al. 2009]. Dies kann mitunter auch ein Grund sein, warum die Durchschnittswerte der Kombi-AnwenderInnen mit den der Hormonpräparat-AnwenderInnen zur Kontrazeption und zur HET, nur einen minimalen Unterschied von 11 FORT-Einheiten zeigen.

In den folgenden Abb. 5.3., 5.4. und 5.5. wurden wieder die Messwerte von anderen Diplomarbeiten in die graphische Auswertung miteinbezogen [Kafka 2008, Eisl 2008, Luf 2009].

### *Vergleich der Schilddrüsenpräparate untereinander sowie in Kombination mit Hormonpräparate zur Kontrazeption und zur HET*

Aus der Graphik ist ersichtlich, dass es zwischen den Präparaten Thyrex und Euthyrox sowie zwischen den anderen eingesetzten Schilddrüsenpräparaten (L-Thyroxin®-Tabl. und Trijodthyronin San 25 Tabl.) keine signifikanten Unterschiede in den OS-Messungen gibt. Die FORT-Werte sind von 215 FORT bis maximal 413 FORT. Wobei der Messwert 413 FORT sich nur auf eine einzelne Probandin bezieht, die zur Zeit der Messung stark erkältet war und unmittelbar vor der Messung ein Breitbandantibiotikum (Augmentin®1G -Tbl.) sowie ein Mischpräparat NeoCitran® (NSAID + Vitamin C) eingenommen hatte (siehe Tab. 5.1.).

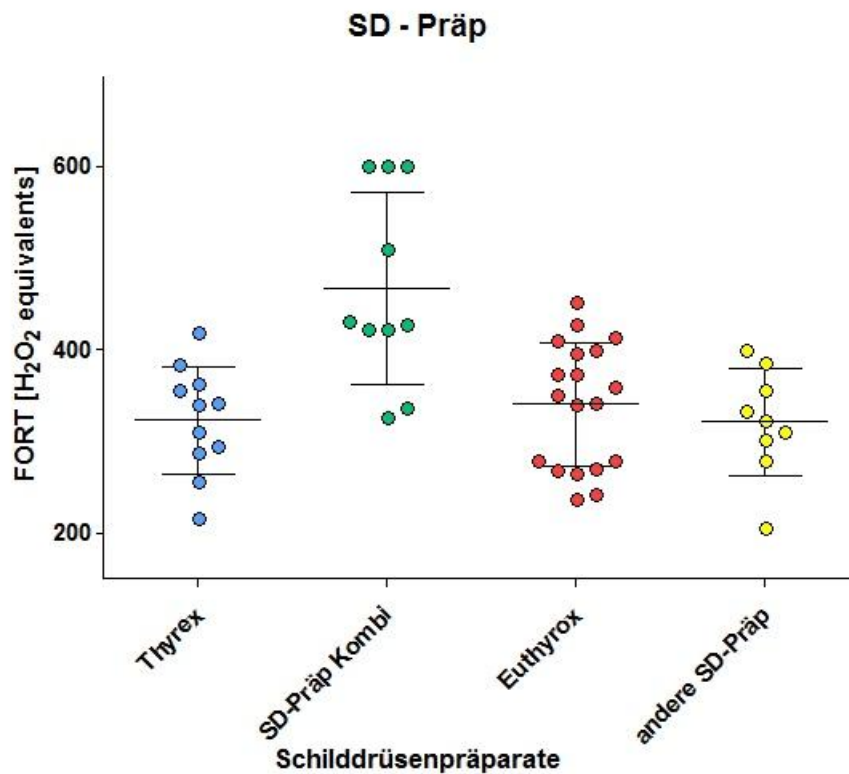


Abb. 5.3.: Vergleich der Schilddrüsenpräparate untereinander sowie in Kombination mit Hormonpräparate zur Kontrazeption und zur HET [Kafka 2008, Eisl 2008, Luf 2009].

Da beide Medikamente (Antibiotikum und NSAID) wiederum in der Leber über das Cytochromoxidasystem metabolisiert werden, könnte es hiermit zu einer verstärkten Radikalbildung kommen und so der erhöhte Messwert erklärt werden. Auch muß hier noch erwähnt werden, dass die am Arzneimittelmetabolismus beteiligten CYP-Enzyme eine breite Substratspezifität besitzen, sodass Arzneistoffe mit sehr unterschiedlicher chemischer Struktur durch ein Enzym verstoffwechselt werden können. Häufig ist ein Arzneistoff Substrat für mehrere P<sub>450</sub>-Enzyme.

Dabei entstehen aus dem Arzneistoff dann unterschiedliche Metabolite oder der gleiche Metabolit wird durch mehrere P<sub>450</sub>-Enzyme gebildet [Schwab et al. 2002]. Diese reaktiven Metaboliten reagieren dann mit Proteinen, DNA und RNA und können auf diese Weise Radikale bilden, die ihrerseits wieder Kettenreaktion initiieren. Durch diesen sog. „Primärschaden“ entstehen DNA-Addukte, die zu Mutationen, bzw. Proteinaddukte, die zu vielfältigen Funktionsschäden mit Cytochrom P<sub>450</sub> (Suizidreaktion), führen [Bursch 2009].

Von den 10 ProbandenInnen, die Schilddrüsenpräparate in Kombination mit Hormonpräparaten zur Kontrazeption bzw. zur HET verwendeten, sind die FORT-Werte signifikant erhöht. Besonders 3 FORT-Werte sind > 600, von denen 2 Probandinnen, aus der Tab. 5.1., jeweils ein Schilddrüsenpräparat mit einem KOK einnahmen, während bei den übrigen Probandinnen statt einem KOK ein reines Gestagen verwendet wurde (z.B. Hormonspirale Mirena®).

Desweiteren zeigten sich die gleichen FORT-Werte (422 FORT) bei 2 Anwender-innen, von denen die eine bereits 1 Jahr lang einen NuvarRing® mit einem Thyrex® substituierte, während die andere seit 10 Jahren Activelle® (HET-Substitution) mit einem Euthyrox® in Verwendung hatte. Inwiefern eine Langzeiteinnahme von Hormonpräparaten, wie Schilddrüsenhormonpräparate, KOK oder KK, einen Einfluß auf die OS-Messung haben könnte, müßte noch in Zukunft weiters erforscht werden. In einigen Publikationen wurde berichtet, dass ein geringfügig erhöhtes Mammakarzinomrisiko bei einer Langzeitbehandlung bzw. bei Überdosierung in Diskussion steht [Tavani et al. 1997] desweiteren erhöhtes Risiko für Endometriumkarzinom (3-5fache) [Smith DC et al. 1975] und Venenthrombose sowie Lungenembolie (3-3,5fache) diskutiert wird [Jick et al. 1996].

#### *Schilddrüsenpräparate vs. Geschlecht*

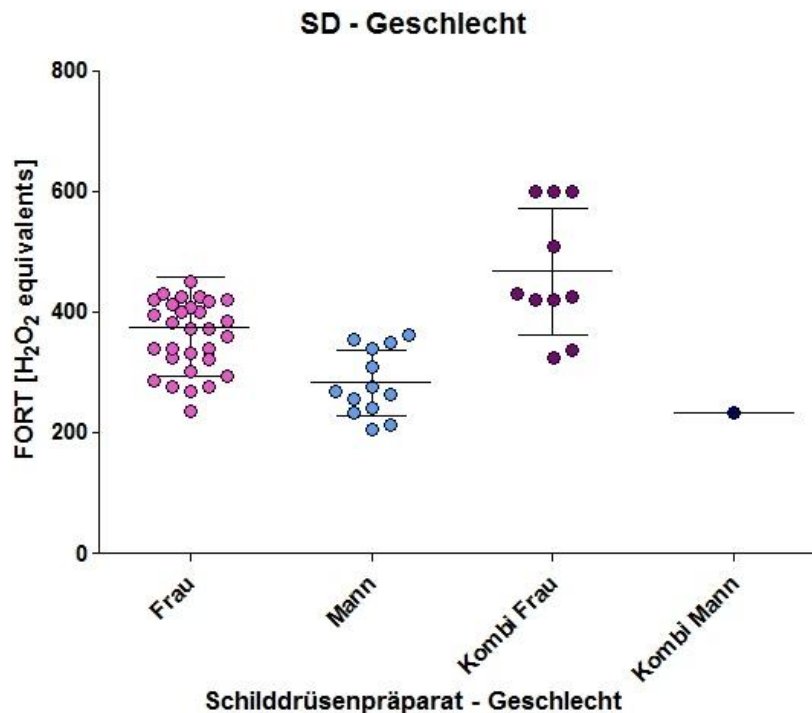


Abb. 5.4.: Vergleich der Schilddrüsenpräparate mit dem Geschlecht [Kafka 2008, Eisl 2008, Luf 2009].

Aus dieser Graphik kann man deutlich erkennen, dass Männer einen signifikanten geringeren FORT-Wert besitzen, als Frauen. Die FORT-Werte der 31 Frauen erstrecken sich in einem Bereich von 237 bis 452 FORT Einheiten (Werte stammen aus der Tab. 5.1.). Der Maximalwert stammt von einer 55 jährigen Frau, die beim Ausfüllen des Fragebogen angab, dass sie mehr als 4 Stunden vor dem Computer arbeitet, über eine Stunde mit dem Handy telefoniert und 2 bis 3 mal im Jahr erkältet ist. Dies könnte auf die Exposition mit Elektromog (Computer, Handy) und die sitzende Tätigkeit zurückzuführen sein.

Während bei den 13 Männern ein FORT-Bereich von 206 bis 363 FORT-Einheiten in der Graphik zu erkennen ist (Werte stammen aus der Tab.5.1.) zeigt sich hier ein Durchschnittswert von etwa 265 FORT. Im Vergleich dazu beträgt der Durchschnittswert bei den Frauen 302 FORT, also ein Unterschied von 37 FORT zwischen den Mittelwerten.

Bei der antioxidativen Kapazität ist der FORD-Durchschnittswert etwa 1,3 mmol/l Trolox bei den Männern (gemessen wurden 11 Männer und deren Mittelwert errechnet) und der FORD-Durchschnittswert bei den Frauen liegt bei etwa 1,2 mmol/l Trolox ( gemessen wurden 8 Frauen und dann der Mittelwert genommen). Der FORD-Wert Unterschied beträgt hier 0,1 mmol/l Trolox zwischen den Durchschnittswerten. Bemerkenswert sind diesmals bei den Frauen die FORD-Werte geringer als bei den Männern.

Die Ursache für solche Messergebnisse bei Frauen könnten negative Lebensfaktoren sein, wie Rauchen, Übergewicht und Bewegungsmangel, sowie Elektrosmog und UV-Strahlung (Solarium). Ein Großteil dieser Probandinnen geht regelmäßig ins Solarium und ist einem Elektrosmog (Computer, Handy) ausgesetzt.

Eine kombinierte Substitution (Schilddrüsenpräparate mit Hormonpräparate zur Kontrazeption bzw. HET) lässt die Vermutung zu, dass bei Frauen höhere FORT-Werte als bei Männern zu finden sind. Ein niedriger FORT-Wert (Kombi-Mann) ist im Bereich von 200 ersichtlich. Es zeigt sich jedoch, dass mehrere solcher Probanden wünschenswert wären, um validere Aussagen erhalten zu können.

Abschließend finden sich in Tab. 5.1. bei einigen AnwenderInnen noch andere Medikamente aufgelistet. 25 ProbandenInnen nehmen kontinuierlich Medikamente zu den Hormonpräparaten ein, wobei man davon ausgehen kann, dass im Mittel etwa 1,2 Medikamente als Langzeittherapie eingesetzt werden. Diese Medikamente (Antidiabetika,  $\beta$ -Blocker, Antikoagulantien, Blutdrucksenker etc.) werden dem Körper oral zugeführt. Folglich ergeben sich signifikant höhere Werte (über 400 FORT) bei jenen ProbandenInnen, die Kontrazeptiva bzw. Hormonpräparate zur HET zusätzlich einsetzten, während orale Applikation bei AnwenderInnen mit Schilddrüsenhormonsubstitution zuzüglich der Medikamenteneinnahme FORT-Werte unter 400 FORT bewirkten. Auch hier zeigt sich, dass eine Hormonsubstitution Ursache für die erhöhten Messwerte sein kann.

Nun stellt sich die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen den FORT- und FORD-Werten gibt? In einer wissenschaftlichen Arbeit, die OS-Messung betreffend, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt, mit folgendem Ergebnis: eine Zunahme der Antioxidativen Kapazität (AOK) durch tägliches Trinken von grünem Tee sowie der tägliche Verzehr von Obst und Gemüse als auch regelmäßige sportliche Aktivitäten von mehr als 2 mal pro Woche, führt zu einer Senkung der FORT-Werte [Eisl 2008]. Dies kann auch hier zutreffen, da laut Tab. 5.1. diese Angaben ebenfalls aufscheinen.

## 6. Conclusio

Im Wesentlichen kann ausgesagt werden, dass sowohl die Messung der antioxidativen Kapazität als auch die des oxidativen Stresses eine zusätzliche Charakterisierung des Patienten ermöglicht. In den behandelten Diplomarbeiten zur Messung des FORT- und FORD-Wertes ist jedenfalls eine signifikante Belastung bei Hormonpräparaten mit Estrogenen erkennbar, während die Substitution mit Schilddrüsenhormonen und Gestagenen keine wesentlichen Änderungen der gemessenen Parameter zeigen.

In Bezug auf den derzeitigen Wissensstand (Oxidativer Stress und kontinuierliche Hormonsubstitution) ist davon auszugehen, dass bei zunehmenden FORT- und niederen FORD-Werten das Risiko von zusätzlichen Erkrankungen für den Patienten erhöht ist. Ebenso deutlich ist eine Korrelation dieser Messwerte im Zusammenhang mit den Umweltparametern erkennbar. Vor allem sind die Unterschiede bezüglich Applikationsformen in der Hormontherapie hinsichtlich der FORT-Parameter interessant.

Die bis dato vorliegenden Messergebnisse zeigen, dass die Messung des OS bzw. AOK zunehmende Bedeutung gewinnen wird, insbesondere unter Berücksichtigung einer kontinuierlichen Arzneimittelaufnahme.



## 7. Literaturverzeichnis

**Ages Fachinformation** [http://pharmaweb.ages.at/pharma\\_web/index.jsf](http://pharmaweb.ages.at/pharma_web/index.jsf)

**Andersson S, Berman DM, Jenkins EP, Russell DW (1991)** Deletion of steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature* 1991, 354:159-161.

**Arafah BM. (2001)** Increased need from thyroxine in women with hypothyroidism during estrogen therapy. *N Engl J Med* 2001; 344: 1743–9.

**Arnhold J (2004)** Free radicals- friends or foes? Properties, functions and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry (Moscow)* 69: 4-9

**Ashok BT und Ali R (2003)** Aging research in India. *Exp Gerontol* 38: 597-603

**Ärztemagazin10/10:**

<http://www.aerztemagazin.at/dynasite.cfm?dsmid=103510&dspaid=850386>

**Aust AE und Eveleigh JF (1999)** Mechanismus of DNA oxidation. *Soc Exp Biol Med* 222: 246-252

**Ball P und Knuppen R (1990)** Formation, metabolism, and physiologic importance of catecholestrogens. *Am J Obstet Gynecol*, 163(6 Pt 2), 2163-2170.

**Bakonyi T und Rada Z (2004)** High altitude and free radicals. *J Sports Sci Med* 3: 64-69

**Balogh GT, Illes J, Szekely Z, Forai E, Gere A (2203)** Effect of different metal ions on the oxidativ damage and antioxidant capacity of hyaluronic acid. *Arch Biochem Biophys* 410: 76-82

**Bartlmä R und Ralph G** Hormonersatztherapie: PowerPoint-Präsentation, LKH-Bruck/ Gyn.- Geb. Abtlg.

**Baulieu EE, Bach JF, Meites J et al. (1990)** Hormones: from molecules to disease; Paris [u.a.]: Hermann [u.a.].- ISBN: 0-412-02791-7: 39-41

**Baynes JW und Dominiczak MH (2005)** Medical biochemistry. Elsevier Mosby, Philadelphia

**Belanger A, Pelletier G, Labrie F, Barbier O and Chouinard S (2003)** Trends in Endocrin. and Metab. 14, 473-479.

**Berdel WE, Böhm M, Classen M, et al. (2004)** Innere Medizin. 5th ed. München, Jena: Urban & Fischer Verlag, 2004:1-2147.

**Berlett BS und Stadtman ER (1997)** Protein oxidation, disease and oxidative stress. *J Biol Chem* 272: 20313-20316

**Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, et al. (2002)** Biochemistry, cellular and molecularbiology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev*;23(1):38-89.

**Biondi R, Xia Y, Rossi R, Paolocci N, Ambrosio G, Zweier JL (2001)** Detection of hydroxyl radicals by D-phenylalanine hydroxylation: A specific assay for hydroxyl radical generation in biological systems. *Anal Biochem* 290: 138-145

**Blanchard RL, Freimuth RR, Buck J, Weinshilboum RM, Coughtrie MW (2004)** A proposed nomenclature system for the cytosolic sulfotransferase (SULT) superfamily. Department of Pharmacology, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, Pennsylvania, USA. *Pharmacogenetics*. 2004 Mar;14(3):199-211.

**Bock KW, Schrenk D, Forster A et al. (1994)** The influence of environmental and genetic factors on CYP2D6, CYP1A2 and UDP-glucuronosyltransferases in man using sparteine, caffeine, and paracetamol as probes. *Pharmacogenetics* 1994; 4: 209–218.

**Boelsterli UA (2003)** Mechanistic toxicology. Taylor & Francis, London New York, pp93-147

**Bursch W (2009)** Fremdstoffmetabolismus / Medizinische Universität Wien Klinik für Innere Medizin I Abtl. Institut für Krebsforschung FE Sicherheit von Chemikalien und Krebsprävention; (VO SS009)

**Busse B (2009)** Estrogen metabolism/ OMIM-Nummer: 116790, 108330, 171150/ [www.medical-genetics.de](http://www.medical-genetics.de)

**Cadenas E (2004)** Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol Aspects Med* 1-2: 17-26

**Canaris et al. (2000)** *Arch Intern Med* 2000; 160: 526

**Callegari S.P.A. 1930 / Catellani group company, I-43100 Parma (2006)** FORT-TEST-STUDIES; Downloads: <http://www.catellani1930.com/callegari1930/Default.aspx>

**Cavalieri EL, Kumar S, Todorovic R, Higginbotham SM, Badawi AF und Rogan EG (2001)** Imbalance of estrogen homeostasis in kidney and liver of hamsters treated with estradiol: implications for estrogen-induced initiation of renal tumors. *Chem Res Toxicol*, 14(8) 1041-1050.

**Cavalieri EL, Devanesan PD, Bosland MC, Badawi AF und Rogan EG (2002)** Catechol estrogen metabolites and conjugates in different regions of the prostate of Noble rats treated with 4-hydroxyestradiol: implications for estrogen-induced initiation of prostate cancer. *Carcinogenesis*, 23(2) 329-333.

**Cavalieri EL und Rogan EG (2006)** Catechol quinones of estrogens in the initiation of breast, prostate, and other human cancers. Keynote lecture. *Ann N Y Acad Sci*, 1089 (Estrogens and human diseases) 286-301.

**Cawley GF, Batie CJ, Backes WL (1995)** Substrate-dependent competition of different P450 isoenzymes for limiting NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochem* 34(4): 1244-1247

**Chen FP, Lee N, Wang C-H, Cherng W-J, Soong Y-K (1998)** Effects of hormone replacement therapy on cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *Fertil Steril* 1998; 69 (2): 267–73.

**Christen P und Jaussi P (2004)** Biochemie. Springer, Berlin, S 472-475

**Cui K, Luo X, Xu , Ven Murthy MR (2004)** Role of oxidative stress in neurodegeneration: Recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progr Neuro Psychopharmacol Biol Psychiatry* 28: 771-799

**D'Amato RJ, Lin CM, Flynn E Folkman J und Hamel E (1994)** 2-Methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(9) 3964-3968.

**Daiber A und Ullrich V (2002)** Stickstoffmonoxid, Superoxid und Peroxynitrit. *Chemie Zeit* 6: 366-375

**Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A (2003)** Protein carbonylation in human diseases. *Trend Mol Med* 9: 169-176

**Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D et al. (2005)** Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redoxproteomics. *Mass Spectrom Rev* 24: 55-99

**Dawling S, Hachey DL, Roodi N und Parl FF (2004)** In vitro model of mammary estrogen metabolism: structural and kinetic differences between catechol estrogens 2- and 4-hydroxyestradiol. *Chem Res Toxicol*, 17(9) 1258-1264.

**Del Maestro RF (1980)** An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl* 492: 153-168

**Dey AC und Senciall IR (1977)** C-21- and 6-hydroxylation of progesterone by rabbit liver subcellular fractions. *Can J Biochem.* 1977 Jun;55(6):602-8. PMID: 880507 [PubMed - indexed for MEDLINE]

**DeWinter R (1991)** Androgen receptor expression in human tissues: an immuno histochemical study, *J Histochem Cytochem* 39: 927-936.

**Döll M (2002)** Effekte oraler Kontrazeptiva auf den Oxidativen Stress; Firma Incomat Medizinische Geräte GmbH, 2002: S.50

**Draper J, und Roland M. (1990)** Perimenopausal women's view on taking hormone replacement therapy to prevent osteoporosis. *BMJ* 1990; 300: 786-8.

**Dufort I, Soucy P, Labrie F, Luu-The V (1996)** Molecular cloning of human type 3  $3\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase that differs from  $20\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase by seven amino acids. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 228:474-479.

**Eckhardt K, Li S, Ammon S, Schanzle G, Mikus G, Eichelbaum M (1998)** Same incidence of adverse drug events after codeine administration irrespective of the genetically determined differences in morphine formation. *Pain* 1998; 76: 27-33.

**Eichelbaum M und Burk O (2001)** CYP3A genetics in drug metabolism. *Nat Med* 2001; 7: 285-287.

**Eisl M (2008)** Oxidative Stressmessung und Antioxidative Kapazität: Untersuchungen an speziellen Kollektiven: Diplomarbeit 2008; Department für Klinische Pharmazie und Diagnostik an der Fakultät für Lebenswissenschaften der Universität Wien

**Eisenbrand G und Metzler M (2001)** Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner, Korrigierter, Nachdruck, Georg Thieme Verlag

**Efferth T (2006)** Molekulare Pharmakologie und Toxikologie: biologische Grundlagen von Arzneimitteln und Giften / Berlin: Springer (Springer-Lehrbuch); ISBN: 978-3-540-21223-2

**Fennessey PV, Pike AW, Gonzalez-Aller C, Horwitz KB (1986)** Progesterone metabolism in T47Dco human breast cancer cells – I. 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol-20-one is the secreted product. *J Steroid Biochem* 1986, 25:641-648.

**Fenton HJH (1896)** Constitution of a new dibasic acid, resulting from the oxidation of tartaric acid. *J Chem Soc Trans* 69: 546-562

**Fischl F (1998)** Die Bedeutung der Gestagene in der modernen Hormon-Substitution (HRT); *Journal für Menopause* 1998; 5 (Sonderheft 1) (Ausgabe für Österreich), 16-21

**Fischl F. (1998)(a)** Hormonsubstitution – ein Thema für den Internisten? *Jatros Kardiologie* 1998; 10–11.

**Fischl F (2001)** Androgene und Androgentherapie bei der Frau. *J Urol Sonderheft Urogynäkol* 1: 16-20.

**Forest MG und Pugeat M eds (1986)** Binding Proteins of Steroid Hormones. Vol 149, INSERM/John Libbey Eurotext, J. Libbey and Son, London

**Fortemaison N, Miot F, Dumont JE, Dremier S (2005)** Regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in thyroid cells does not involve Rac1 activation. *Eur J Endocrin* 152: 127-133

**Forth W, Henschler D, Rummel W, Allgaier C, Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K et al. (2009)** Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: 10. Auflage/ Urban & Fischer München

**Foth D, und Roemer T (1999)** Einfluß einer Langzeithormonsubstitutionstherapie auf die TSH-Serumspiegel von postmenopausalen Frauen. *Zbl Gynäkol* 1999; 121: 495–8.

**Frederiks WM und Vreeling-Sindelarova H (2003)** Ultrastructural localization of xanthine oxidoreductase activity in isolated rat liver cells. *Acta Histochem* 104: 29-37

**Fridovich I (1983)** Superoxide radical, an endogeneous toxicant. *Ann Rev Pharmacol toxicol* 23: 239-2

**Friesema EC, Jansen J, Milici C, et al. (2005)** Thyroid hormone transporters. *VitamHorm*;70:137-67.

**Genome** Steroid metabolism [www.genome.jp](http://www.genome.jp).

**Gerstner S (2008)** 17 $\beta$ -Estradiol:Phase-II-Metabolismus und Genotoxizität oxidativer Metaboliten; Diss. Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der Universität Karlsruhe: 3-17

**Gershman R, Gilbert DL, Nye SW, Dywer P, Fenn WO (1954)** Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* 119: 623-626

**Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Colombo R, Dalle-Donne I (2004)** S-Glutathionylation: From redox regulation of protein functions to human diseases. *J Cell Mol Med* 8: 201-212

**Glatt H (1997)** Sulfation and sulfotransferases 4: bioactivation of mutagens via sulfation. *Faseb J*, 11(5), 314-321.

**Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornet JM, Agros P, Chambon P (1986)** Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb A, *Nature* 320: 134-139.

**Groemping Y und Rittinger K (2005)** Activation and assembly of NADPH oxidase: A structural perspective. *Biochem J* 386: 401-416

**Gronemeyer H (1992)** Control of transcription activation by steroid hormone receptors, *FASEB J* 6: 2524-2529.

**Guillemette C, Belanger A und Lepine J (2004)** Metabolic inactivation of estrogens in breast tissue by UDP- glucuronosyltransferase enzymes: an overview. *Breast Cancer Res*, 6(6), 246-254.

**Guengerich FP (1995)** Human cytochrome P450 enzymes, In: *Cytochrome P450-Structure, Mechanism and Biochemistry*, Ortiz de Montellano (ed.): 2nd edition, PlenumPress, New York, 473-535.

**Gutteridge JMC(1995)** Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 41: 1819-1828

**Gutteridge JMC und Halliwell B (2000)** Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. In: Chiueh CC (ed) *Reactive oxygen species: From radiation to molecular biology. A festschrift in honor of Daniel L Gilbert*. Symposium proceedings. Bethesda, Maryland, USA 1998. *Ann NY Acad Sci* 899: S 1-14

**Guo W-X, Pye QN, Williamson KS et al. (2004)** Reactive oxygen species in choline deficiency-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Free Radic Biol Med* 37: 1081-1089

**Haber F und Weiss J (1934)** The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc Lond [A]* 147: 332-351

**Haber F und Willstätter R (1931)** Unpaarigkeit und Radikalketten im Reaktionsmechanismus organischer und enzymatischer Vorgänge. *Ber Deutsch Chem Ges* 64: 2844-2856

**Halliwell B (1978)** Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates: is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems? *FEBS Lett* 92: 321-326

**Halliwell B und Gutteridge JMC (1990)** The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280: 1-8

**Halliwell B und Aruoma OI (1991)** DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*, 281(1-2) 9-19.

**Hensley K und Floyd RA (2002)** Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: A look back, a look ahead. Arch Biochem Biophys 397: 377-383

**Herold G.(2004)** Innere Medizin. 2004 ed. Köln: Gerd Herold, 2004:1-812.

**Hochstein P und Ernster (1963)** ADP-activated lipid peroxidation coupled to the TPNH oxidase system of microsomes. Biochem Biophys 379: 377-383

**Höll A (2002)** Einfluss des Metabolismus auf die hormonelle bzw. antihormonelle Aktivität von endokrinen Disruptoren an ausgewählten Beispielen / Diss. Chemie der Universität Kaiserslautern

**Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA (1999)** Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment.Trends Pharmacol Sci 20: 342–349

**Inoue M, Sato EE, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I und Utsumi K (2003)** Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. Curr Medic Chem 10: 2495-2505

**Jacobi Günther (2005)** Beiträge von N. Baake: Kursbuch Anti-Aging / (2005) Stuttgart:Thieme:Oxidativer Stress und Altern

**Jäger W und Czejka M (2009)** Klinische Chemie und chemische Diagnostik VO-Unterlagen SS 2009

**Jakobs TC, Mentrup B, Schmutzler C, et al. (2002)** Proinflammatory cytokines inhibit the expression and function of human type I 5'-deiodinase in HepG2 hepatocarcinoma cells. Eur J Endocrinol 146: 559–566

**Javitt NB, Lee YC, Shimizu C, Fuda H, Strott CA (2001)** Cholesterol and hydroxycholesterol sulfotransferases: identification, distinction from dehydroepiandrosterone sulfotransferase, and differential tissue expression 2001 Endocrinology PubMed

**Jez JM, Bennett MJ, Schlegel BP, Lewis M, Penning TM (1997)** Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem J* 1997, 326:625-636.

**Jick H, Derby LE, Myers MW, Vasilakis C, Newton KM (1996)** Risk of hospital admission for idiopathic venous thromboembolism among users of postmenopausal oestrogens. Lancet 348: 981-983.

**Jones N, Quraishi S, Mason J. (1997)** The nasal delivery of systemic drugs. Int J Clin Pract 1997; 51: 308–11.

**Jones OTG und Hancock JT (2000)** NADPH oxidase of neutrophils and other cells. In: Winyard PG, Blake DR, Evt CH (eds) Free radicals in inflammation. Birkhäuser, Basel, pp 21-46

**Journal für Fertilität und Reproduktion (2000)** 10 Jahrgang/Sonderheft 1/2000, Ausgabe für Schweiz, 4-19

**Kafka K (2008)** Vermessung oxidativer Stress und antioxidative Kapazität unter Berücksichtigung der Einnahme von Hormonpräparaten: Diplomarbeit 2008; Department für Klinische Pharmazie und Diagnostik an der Fakultät für Lebenswissenschaften der Universität Wien

**Kaneshige M, Kaneshige K, Zhu X, et al. (2000)** Mice with a targeted mutation in the thyroid hormone beta receptor gene exhibit impaired growth and resistance to thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13209–13214

**King CD, Rios GR, Green MD und Tephly TR (2000)** UDP-glucuronosyltransferases. *Curr Drug Metab*, 1(2), 143-161.

**Kim JY, Mukherjee S, Ngo L, Christiani DC (2004)** Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in workers exposed to fine particulates. *Environ Health Perspect* 112: 666-670

**Klatt P und Lamas S (2000)** Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* 267: 4928-4944

**Klebe G (2009)** Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen: „Was schnelle und langsame Metabolisierer unterscheidet“. 2. Auflage 2009, © Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2009; Springer Verlag

**Köhrle J (2000)** The deiodinase family – selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cellular Mol Life Sciences* 57: 1853–1863

**Köhrle J und Schmutzler C (2003)** Function Relationships of Deiodinases. Hennemann G, Visser TJ: *Hot Thyroidology*, Nov. 2003 [1]. European Thyroid Association. Electronic Citation

**Köhrle J (2004)** Schilddrüsenhormone: Metabolismus und Wirkungen / Elsevier – Urban & Fischer *Z. ärztl. Fortbild. Qual. Gesundh.wes.* (2004) 98 Suppl. V : 17–24 <http://www.elsevier.de/zaefq>

**Köhrle J, F. Jakob, B. Contempre und J. E. Dumont (2005).** "Selenium, the thyroid, and the endocrine system." *Endocr Rev* 26(7): 944-84.

**Kryukov, G V, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R und Gladyshev VN (2003)** "Characterization of mammalian selenoproteomes." *Science* 300(5624): 1439-43.

**Kuhl H (1999)** Pharmakologie der Gestagene, Hormonsubstitution: *GynoPanorama* 1/99; Novartis Pharma GmbH (Herausg.); Springer Verlag

**Kuiper G, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996)** Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary, *Proc Natl Acad Sci* 93:5925-5930.

**Kuiper G, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Hägglblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997)** Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , *Endocrinology* 138: 863-870.

**Kurz T, Leake A, Zgliniki T von, Brunk UT (2004)** Lysosomal redox-active iron is important for oxidative stress-induced DNA damage. *Ann NY Acad Sci* 1019: 285-288

**Lang L, Klein K, Fischer J et al. (2001):** Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 399–415.

**Landriscina C, Petragallo V, Morini P, Marcotrigiano GO (1988)** Lipid peroxidation in rat liver microsomes. I. Stimulation of the NADPH-cytochrome P-450 reductase-dependent process in hyperthyroid state. *Biochem Int* 17: 385-393

**Lee A J, Cai MX, Thomas PE., Conney AH und Zhu BT (2003)** Characterization of the oxidative metabolites of 17 $\beta$ -estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome p450 isoforms. *Endocrinology*, 144(8) 3382-3398.

**Lepine J, Bernard O, Plante M, Tetu B, Pelletier G, Labrie F, Belanger A und Guillemette C (2004)** Specificity and regioselectivity of the conjugation of estradiol, estrone, and their catecholestrogen and methoxyestrogen metabolites by human uridine diphospho-glucuronosyltransferases expressed in endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(10), 5222-5232.

**Leonard JL und Köhrle J (2000)** Intracellular pathways of thyroid hormone metabolism. In Braverman LE, Utiger RD (eds) *Werner and Ing-bar's The Thyroid – A Fundamental and Clinical Text*, pp. 136–173. J.B. Lippincott Company, Philadelphia

**Leuwenburgh C, Hansen PA, Holloszy JO, Heinecke JW (1999)** Hydroxyl radical generation during exercise increase mitochondrial protein oxidation and levels of urinary dityrosine. *Free Radic Biol Med* 27: 186-192.

**Liehr JG (1990)** Genotoxic effects of estrogens. *Mutat Res, Reviews in Genetic Toxicology*, 238(3), 269-276.

**Liehr JG (1994)** Mechanisms of metabolic activation and inactivation of catechol estrogens: a basis of genotoxicity. *Polycycl Aromat Compd*, 6(1-4) 229-239.

**Liehr JG (1997)** Dual role of estrogens as hormones and pro-carcinogens: tumour initiation by metabolic activation of oestrogens. *Eur J Cancer Prev*, 6(1) 3-10.

**Liehr JG (2000)** Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr Rev*, 21(1), 40-54.

**Liehr JG (2001)** Genotoxicity of the steroidal oestrogens estrone and estradiol: possible mechanism of uterine and mammary cancer development, *Hum Reprod Update* 7(3) 273-281.

**Liehr JG und Roy D (1990)** Free radical generation by redox cycling of estrogens. *Free Radic Biol Med*, 8(4) 415-423.

**Linemayr-Wagner C (2006)** Neue estrogenfreie Pille: „Viele Vorteile, kaum Nebenwirkungen“ *Universimed*:29.05.2006:Interview/ <http://universimed.com/>

**Liu KJ, Kotake Y, Lee M, Miyake M, Sugden k, Yu Z, Swartz HM (1999)** High-performance liquid chromatography study of the pharmacokinetics of various spin traps for application to in vivo spin trapping. *Free radic Biol Med* 27: 82-89

**Longcope C (1984)** Estriol production and metabolism in normal women. *J Steroid Biochem*, 20(4B), 959-962.

**Löffler G (2007)** Redoxreaktionen, Sauerstoff und oxidative Phosphorylierung: Biochemie und Pathobiochemie, Berlin [u.a.]: Springer.- (Springer-Lehrbuch): 500-511

**Löffler G (2007) (a)** Hypothalamisch-hypophysäres System und Zielgewebe: Biochemie und Pathobiochemie, Berlin [u.a.]: Springer.- (Springer-Lehrbuch)

**Lu F, Zahid M, Saeed M, Cavalieri EL und Rogan EG (2007)** Estrogen metabolism and formation of estrogen-DNA adducts in estradiol-treated MCF-10F cells. The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induction and catechol-O-methyltransferase inhibition. J Steroid Biochem Mol Biol, 105(1-5), 150-158.

**Luf M (2009)** Messung des oxidativen Stresses und der antioxidativen Kapazität in der betrieblichen Gesundheitsvorsorge: Diplomarbeit 2009; Department für Klinische Pharmazie und Diagnostik an der Fakultät für Lebenswissenschaften der Universität Wien

**Mangelsdorf D, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans R (1995)** The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade, Cell 83: 835-839.

**Marks A, Smith C, Liebrman M (2005)** Basic medical biochemistry, 2<sup>nd</sup> edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia

**McCord JM und Fridovich I (1969a)** Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein. J Biol Chem 244: 6049-6055

**McCord JM und Fridovich I (1969b)** The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide and oxygen. J Biol Chem 244: 6056-6063

**McKenna NJ und O'Malley BW (2002)** Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators: Cell: 108, 465-474

**Meier C (2007)** 4. Women's Health Congress der Schweizerischen Menopausegesellschaft und der Schweizerischen Vereinigung gegen Osteoporose vom 30 November 2007 in Bern, Schweiz fcho80134

**Meinhold H, Gramm H-J, Meissner W, et al. (1991)** Elevated serum diiodotyrosine (DIT) in severe infections and sepsis: DIT, a possible new marker of leukocyte activity. J Clin Endocrinol Metab 72: 945-953

**Mercier-Bodard C, Alfsen A und Baulieu EE (1970)** Sex steroid binding plasma protein (SBP). Acta Endocrinol. Suppl. 147: 204-224

**MICRO-MEDICAL** Instrumente GmbH/ (Hers) Callegari S.p.A. Catellani Group Company, I-43100 Parma/ Downloads über Allgemeine Information, Bedienungsanleitungen und Packungsbeilagen, Hintergrundinformation: [http://micromedical.de/de/products/data/FOR\\_Mplus.php?productPage=6](http://micromedical.de/de/products/data/FOR_Mplus.php?productPage=6)

**MICRO-MEDICAL (a)** Instrumente GmbH, D-61462 Königstein: „Wie funktioniert der FORT-Test“ S.5 / Stand Juli 2006/

**MICRO-MEDICAL (b)** Instrumente GmbH, D-61462 Königstein: „Professionelle Möglichkeit der Sofortdiagnostik, Stand: 02.03.2006“ S.13-17

**MICRO-MEDICAL (c)** Instrumente GmbH, D-61462 Königstein: „Packungsbeilage FORT Reagenz für FORMplus vom 01.04.06“

**MICRO-MEDICAL (d)** Instrumente GmbH, D-61462 Königstein: „Packungsbeilage FORD Reagenz für FORMplus vom 01.04.06“

**MICRO-MEDICAL (e)** Download: Klinische Bedeutung und Datenauswertung; <http://micromedical.de/de/products/data/FORMplus.php?productPage=6>

**Milgrom E, Allouch P, Atger M und Baulieu EE (1973)** Progesterone-binding plasma protein of pregnant guinea pig. Purification and characterization. *J.Biol. Chem.* 248: 1106-1114

**Mohazzab KM, Kaminski PM, Wolin Ms (1994)** NADH Oxidoreduktase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol* 266: H2568-H2572

**Mori M, Tominaga T, Tamaoki BI (1978)** Steroid metabolism in normal mammary gland and in the dimethylbenzanthracene-induced mammary tumor of rats. *Endocrinology* 1978, 102:1387-1397

**Mori M und Tamaoki BI (1980)** In vitro metabolism of progesterone in the mammary tumor and the normal mammary gland of GRS/A strain of mice and dependency of some steroid-metabolizing enzyme activities upon ovarian function. *Eur J Cancer* 1980, 16:185-193.

**Mueck AO und Seeger H (2007)** Breast cancer: Are estrogen metabolites carcinogenic? *Maturitas*, 57(1), 42-46.

**Murad F und Haynes D Jr. (1985)** Androgens In: Goodman and Gilman's (Hrsg.) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, p 1440 – 1448, 7<sup>th</sup> edition, Macmillan Publishing Company; New York.

**Nathan CF und Hibbs JB (1991)** Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3: 65-70

**National Academy of Sciences, Institute of Medicine (2000)** Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids: A report of the Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds, Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients and on Interpretation and Use of Dietary Reference Intakes, and the Standing Committee on Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. National Academy Press, Washington, DC, p17

**Nieschlag E (2005)** Entwicklungsstand der hormonellen männlichen Kontrazeption; *Dtsch Arztebl* 2005; 102: A 3506–3511 [Heft 50]

**ÖAZ Aktuell (Ausgabe 12/2003)** Die Haut als Pflaster (Serien 12/2003)

**Ozdemir V, Kalow W, Tang BK et al. (2000):** Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method. *Pharmacogenetics* 2000; 10: 373–388.

**Oberdanner C (2003)** ROS in biol. Systemen und ihre Rolle in der Apoptose / Institute of Physics and Biophysics Ue: Ws 2003 / 2004 [www.pdt.sbg.ac.at](http://www.pdt.sbg.ac.at)

- Paganini-Hill A und Henderson W (1994)** Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. *Am J Epidemiol* 1994.
- Peeters RP, van Toor H, Klootwijk W, et al. (2003)** Polymorphisms in Thyroid Hormone Pathway Genes Are Associated with Plasma TSH and Iodothyronine Levels in Healthy Subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 2880–2888
- Penning TM, Burczynski ME, Jez JM, Hung CF, Lin HK, Ma H, Moore M, Palackal N, Ratnam K (2000)** Human 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (*AKR1C1-AKR1C4*) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochem J* 2000, 351:67-77.
- Pfaar U, Kübler E und Gyga D (2006)** Molekulare Regulation der Bildung und Inaktivierung reaktiver Sauerstoffspezies / Ganten u. Ruckpaul (Hrsg.): Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen / Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2006
- Plötz H (2007)** Kleine Arzneimittellehre für Fachberufe im Gesundheitswesen, 5. Auflage / Springer Medizin Verlag Heidelberg 1993, 1996, 1999, 2003 und 2007 / ISBN -13 978-3-540-72300-4
- Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, El-Awady MK, Wilson EM, French FF (1995)** Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives. *Endocr Rev* 16: 271-321.
- Raju U, Sklarew RJ, Post J, Levitz M (1978)** Steroid metabolism in human breast cancer cell lines. *Steroids* 1978, 32:669-680.
- Recknagel RO und Ghoshal AK (1966)** Quantitative estimation of peroxidative degeneration of liver microsomal and mitochondrial lipids after carbon tetrachloride poisoning. *Exp Mol Pathol* 5: 413-426
- Rendic S und Di Carlo FJ (1997)** Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev* 1997; 29: 413–580.
- Renko K (2009)** Bedeutung und Regulation der Biosynthese von Selenoproteinen beim Wachstum und der Akut-Phase-Reaktion der Maus; Diss von Fakultät III – Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin 2009
- Roy D, Cai Q, Felty Q und Narayan S (2007)** Estrogen induced generation of reactive oxygen and nitrogen species, gene damage, and estrogen dependent cancers. *J Toxicology Environ Health, Part B: Critical Reviews*, 10(4), 235-257.
- Russell Dw und Wilson JD (1994)** Steroid 5 $\alpha$ -reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem* 1994, 63:25-61.
- Qian SY und Buettner GR (1999)** Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological free radical oxidations: an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1447-1456

**Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J (2001)** Reactive oxygen species and intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 11: 173-186

**Sawamura AO, Aoyama T, Tamakoshi K, Mizuno K, Suganuma N, Kikkawa F, Tomoda Y (1996)** Transfection of human cytochrome P-450 reductase cDNA and its effect on the sensitivity to toxins. *Oncology* 53: 406-411

**Schanzer W (1996)** *Clinical Chemistry* 42, 1101-1020.

**Schindler AE (2003)** Schilddrüse, Klimakterium und Hormontherapie; *Journal für Menopause* 2003; 10 (4) (Ausgabe für Österreich) 27-31 *Journal für Menopause* 2003; 10 (4) (Ausgabe für Schweiz), 29-32 *Journal für Menopause* 2003; 10 (4) (Ausgabe für Deutschland) 28-31

**Schweikert HU (2003)** Estrogen in the male: nature, sources and biological effects. *Encyclopedia of Hormones*. Elsevier Science (USA): 584-591.

**Schwab Matthias, Marx Claudia, Zanger Ulrich M, Eichelbaum Michel, Fischer-Bosch Margarete (2002)** Pharmakogenetik der Zytochrom-P-450-Enzyme: Bedeutung für Wirkungen und Nebenwirkungen von Medikamenten/*Dtsch Arztebl* 2002; 99(8): A-497 / B-400 / C-377 MEDIZIN / Verfasser: Eichelbaum E / Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für Klinische Pharmakologie

**Sellers TA, Schildkraut JM, Pankratz VS, Vierkant RA, Fredericksen ZS, Olso JE, Cunningham J, Taylor W, Liebow M, McPherson C, Hartmann LC, Pal T und Adjei AA (2005)** Estrogen bioactivation, genetic polymorphisms, and ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14(11), 2536-2543.

**Shatalova EG, Walther SE, Favorova OO, Rebbeck TR, Blanchard RL (2005)** Genetic polymorphisms in human SULT1A1 and UGT1A1 genes associate with breast tumor characteristics: a case-series study; *Breast Cancer Res*. 2005; 7: R909-21

**Sies H (1993)** Strategies of antioxidant defense, *Eur.J.Biochem.* (Band 215), Nr. 2, Seite 213-219. URL: PM:7688300

**Smith DC, Prentic R, Thompson DJ, Herrmann WL (1975)** Association of exogenous estrogen and endometrial carcinoma. *N Engl J Med* 293: 1164-1167.

**Steinbeck G und Paumgartner G (2005)** Therapie innerer Krankheiten. 11th: Springer Verlag, 2005:1-1825.

**Stonek F, Huber JC, Wenzel R (2001)** Aerodiol: Ein 17-beta-Estradiol-Nasenspray für die Behandlung postmenopausaler Frauen; *Journal für Menopause* 2001; 8 (3) (Ausgabe für Österreich) 30-33

**Stirpe F und Della Corte E (1969)** The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzym activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 244: 3855-3863

**Stryer L (1996)** Biochemie, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag.

**Tan RS und Culberson JW (2003)** An integrative review on current evidence of testosterone replacement therapy for the andropause ; *Maturitas* (2003) 45: 15-27.

**Tavani A, Braga C, La Vecchia C et al. (1997)** Hormone Replacement Treatment and Breast Cancer Risk: An Age-Specific Analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6: 11–14.

**Technologie Servier, Orleans-France** The in vitro metabolism of [14C]-RAMEB and [14C9-17 $\beta$ -estradiol by nasal epithelium of rat, dog, monkey and man. Internal Report. PB-93-21400-028. NP6447

**Thannickal VJ und Fanburg BL (2000)** Reactive oxygen species in cell signalling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: **Theriault C, Labrie F (1991)** Multiple steroid metabolic pathways in ZR-75-1 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991, 38:155-164.

**Thigpen AE, Silver RI, Guileyardo JM, Casey ML, McConnell JD, Russell DW (1993)** Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 $\alpha$ -reductase isozyme expression. *J Clin Invest* 1993, 92:903-910.

**Tsai M und O'Malley BW (1994)** Molecular Mechanisms of action of Steroid/Thyroid receptor superfamily members, *Annu Rev Biochem* 63: 451-486.

**Tsutsui T, Tamura Y, Yagi E und Barrett JC (2000)** Involvement of genotoxic effects in the initiation of estrogen-induced cellular transformation: studies using Syrian hamster embryo cells treated with 17 $\beta$ -estradiol and eight of its metabolites. *Int J Cancer*, 86(1), 8-14.

**Uchaipichat V, Mackenzie PI, Guo XH, Gardner-Stephen D, Galetin A, Houston JB und Miners JO (2004)** Human udp-glucuronosyltransferases: isoform selectivity and kinetics of 4-methylumbelliferone and 1-naphthol glucuronidation, effects of organic solvents, and inhibition by diclofenac and probenecid. *Drug Metab Dispos*, 32(4), 413-423.

**Van Der Mooren MJ, Demacker PNM, Blom HJ et al. (1997)** The Effect of Sequential Three-Monthly Hormone Replacement Therapy on Several Cardiovascular Risk Estimators in Postmenopausal Women. *Fertil Steril* 1997; 67: 67–73.

**Van Eenoo P und Delbeeke FT (2006)** *J. of Steroid Biochem. and Mol. Biochem.* 101,161-178.

**Vihko P, Harkonen P, Soronen P, Torn S, Herrala, Kurkela R, Pulkka A, Oduwale O und Isomaa V (2004)** 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases their role in pathophysiology. *Mol Cell Endocrinol*, 215(1-2) 83-88.

**Verlagdermediziner (2008)** *FachJournal der Gynäkologie/Urologie Verlagdermediziner* Ausgabe 4/2008: <http://www.mediziner.at>.

**Visser TJ (1996)** Pathways of thyroid hormone metabolism. *Acta Med Austriaca* 23: 10–16

**Visser TJ und Kester MH (2002)** Thyroid Hormone Sulfation. Hennemann G, Visser TJ: *Hot Thyroidology* ([www.hotthyroidology.com](http://www.hotthyroidology.com)) 2002 [November, No 1]. 2002. ETA European Thyroid Association. Electronic Citation

**Vore M, Liu Y und Huang L (1997)** Cholestatic properties and hepatic transport of steroid glucuronides. *Drug Metab Rev*, 29(1-2), 183-203.

**Wachouschek M (2007)** Oxidative Stressmessung im ländlichen Raum: Diplomarbeit 2007; Department für Klinische Pharmazie und Diagnostik an der Fakultät für Lebenswissenschaften der Universität Wien

**Wang C, Berman N, Longstreth JA, Chuapoco B, Hull L, Steiner B, Faulkner S, Dudley RE and Swerdloff RS (2000)** Pharmacokinetics of transdermal testosterone gel in hypogonadal men: application of gel at one site versus four sites: a general clinical research center study; *J of Clin Endocrinol & Metabolism* Vol 85, No 3 : 964–969 (2000)

**Westphal U (1971)** Steroid-Protein Interactions. Springer Verlag, Berlin

**Wiebe JP und Lewis MJ (2003)** Activity and expression of progesterone metabolizing  $5\alpha$ -reductase,  $20\alpha$  hydroxysteroid oxidoreductase and  $3\alpha(\beta)$ -hydroxysteroid oxidoreductases in tumorigenic (MCF-7, MDA-MB-231, T-47D) and nontumorigenic (MCF-10A) human breast cancer cells; Hormonal Regulatory Mechanisms Laboratory, Department of Biology, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada N6A 5B7; *BMC Cancer* 2003, 3:9doi:10.1186/1471-2407-3-9

**Wiebe JP, Muzia D, Hu J, Szwajcer D, Hill SA, Seachrist JL (2000)** The 4-pregnene and  $5\alpha$ -pregnane progesterone metabolites formed in nontumorous and tumorous breast tissue have opposite effects on breast cell proliferation and adhesion. *Cancer Res* 2000, 60:936-943.

**Williams JA und Phillips DH (2000)** Mammary expression of xenobiotic metabolizing enzymes and their potential role in breast cancer. *Cancer Res*, 60(17), 4667-4677.

**Wu SY, Polk DH, Huang WS, Fisher DA (1999)** Fetal-to-maternal transfer of 3,3',5'-triiodothyronine sulfate and its metabolite in sheep. *Am J Physiol* 277: E915–E919

**Wu LL, Chiou C-C, Chang P-Y, Wu JT (2004)** Urinary 8-OHdG: A marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis an diabetics. *Clin Chim Acta* 339: 1-9

**Yagi E, Barrett JC und Tsutsui T (2001)** The ability of four catechol estrogens of 17 $\beta$ -estradiol and estrone to induce DNA adducts in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Carcinogenesis*, 22(9) 1505-1510.

**Yamazaki H und Shimada T (1997)** Progesterone and testosterone hydroxylation by CYP 2C19, 2C9 and 3A4 in human liver microsomes. Osaka Prefectural Institute of Public Health, Nakamichi, Japan. *Arch Biochem Biophys* 1997;346(1): 161-169.

**Yeum KJ, Russel RM, Krinsky NI, Aldinic G (2004)** Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophobic and lipophilic compartments of human plasma. *Arch Biochem Biophys* 430: 97-103

**Zhang Y, Dufort I, Rheault P, Luu-The V (2000)** Characterization of a human  $20\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Mol Endocrinol* 2000, 25:221-228.

**Zhang Y, Gaikwad NW, Olson K, Zahid M, Cavalieri EL und Rogan EG (2007)** Cytochrome P450 isoforms catalyze formation of catechol estrogen quinones that react with DNA. *Metabolism*, 56(7) 887-894.

**Zhu BT und Conney AH (1998a)** Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. *Carcinogenesis*, 19(1), 1-27.

**Zhu BT und Liehr JG (1996)** Inhibition of catechol O-methyltransferase-catalyzed Omethylation of 2- and 4-hydroxyestradiol by quercetin. Possible role in estradiol-induced tumorigenesis. *J Biol Chem*, 271(3), 1357-1363.

**Zhu BT (2002)** Catechol-O-methyltransferase (COMT)-mediated methylation metabolism of endogenous bioactive catechols and modulation by endobiotics and xenobiotics: importance in pathophysiology and pathogenesis. *Curr Drug Metab*, 3(3), 321-349.



## 8. Lebenslauf

### Persönliche Angaben

|                                            |                                       |
|--------------------------------------------|---------------------------------------|
| <i>Name:</i>                               | Gabriele Pakfeifer                    |
| <i>Familienname vor der Eheschließung:</i> | Schild                                |
| <i>Geburtsdatum:</i>                       | 7. Oktober 1970                       |
| <i>Geburtsort:</i>                         | Wien                                  |
| <i>Eltern:</i>                             | Gerlinde und Dipl.Ing. Herbert Schild |
| <i>Geschwister:</i>                        | Herbert (1969)                        |
| <i>Staatsangehörigkeit:</i>                | Österreich                            |

### Schulbildung

|                       |                                                                      |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------|
| 1977 - 1981           | Öffentliche Volksschule 1220 Wien                                    |
| 1981 – 1989           | Bundesrealgymnasium u. Bundes -<br>oberstufenrealgymnasium 1220 Wien |
| Reifeprüfungszeugnis: | 1. Juni 1989                                                         |
| Seit 1. Oktober 1989  | Studium der Pharmazie an der<br>Universität Wien                     |

### Studienbegeitende Tätigkeiten

|                             |                                                                         |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Sommer 1987 und Sommer 1988 | Ferialpraxis im AGM-Abholgroßmarkt in<br>Wien                           |
| Sommer 1989                 | Ferialpraxis in Napoli-Casali in Wien                                   |
| Seit Juli 1996              | Trainee für Flash und Webdesign bei<br>Pakfeifer Tuning Austria in Wien |

**Apothekenrelevante Tätigkeiten:**

|             |                                                        |
|-------------|--------------------------------------------------------|
| Sommer 1991 | Ferialpraxis in der Marien-Apotheke, in Langenzersdorf |
| Sommer 1992 | EF-Betreuerin in Malta bei EF-International Education  |
| Sommer 1993 | Ferialpraxis in der Apotheke zur Madonna, 1220 Wien    |
| 1992-1997   | 2/10 Dienst in der Raphael-Donner-Apotheke, in Eßling  |
| 1996 - 2009 | 2/10 Dienst in der Apotheke Zum Schutzengel, 1120 Wien |