

Zusammenfassung

Hormonersatztherapie zur Behandlung postmenopausaler Beschwerden sowie zur Steigerung der Lebensqualität der Frau im höheren Alter war lange Zeit ein allgemein anerkanntes Verfahren. Hormone wurden auch zur Osteoporoseprophylaxe und -therapie sowie zur Reduktion des Risikos koronarer Herzerkrankungen verabreicht. Erst kürzlich wurde eine verbesserte Wundheilung unter Hormongabe beschrieben. Die eher negativen Resultate der Herz Estrogen/Progestin Ersatz- (HERS) sowie der „womens health initiative“ (WHI) Studien bezüglich des Risikos Brustkrebs oder Endometriumkarzinome unter der Hormontherapie zu entwickeln, fordern jedoch den streng indikationsgebundenen und zeitlich kontrollierten Einsatz der Hormone. Der „first-pass“ Metabolismus des oral verabreichten Estrogens wird wahrscheinlich Ursache für die beobachteten nachteiligen Effekte am Herz-Kreislaufsystem sein. Die transdermale Therapie stellt daher eine Alternative dar, diese beobachteten nachteiligen Effekte der Hormonersatztherapie zu minimieren. Darüber hinaus wurde die adjuvante Gabe von Testosteron als Precursor des lokal gebildeten Estrogens empfohlen, um so die Dosis des Estrogens reduzieren zu können.

In dieser Arbeit wurden Hautpenetrations- und Metabolisierungsmodelle getestet und verglichen, um das in vitro Modell zu ermitteln, dass die in vivo Situation der transdermalen Hormongabe am besten reflektiert. Ein aussagekräftiges in vitro Modell könnte der Entwicklung der transdermalen Hormonersatztherapie deutlichen Vorschub leisten. Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit das Penetrations- und Metabolisierungsverhalten von den Steroidhormonen Estradiol und Testosteron am isolierten perfundierten Schweinebein, an Spalthaut von Schwein und Mensch, an humaner isolierter Epidermis sowie an rekonstruierten Epidermismodellen und Lungenepithelmodellen getestet.

Zuerst musste im Labor eine sensitive Hormonanalytik etabliert werden, um Estradiol und Metaboliten sowie Testosteron in den Perfusaten und Rezeptormedien sowie im Hautmaterial analysieren zu können. Da die kutanen Absorptionsraten für beide Hormone recht gering sind, wurden Radiodetektionmethoden gewählt. Für Testosteron als auch für die Referenzsubstanz Hydrocortison in einigen ausgewählten Experimenten, wurde die direkte Detektion der radiomarkierten Substanzen gewählt, weil zum einen die kutanen Absorptionsraten recht gering waren und zum anderen keine kutane Metabolisierung festzustellen war. Beobachtete medien-abhängige Quencheffekte bei den Messungen wurden berücksichtigt, indem die Kalibrierkurven in identischen Medien hergestellt wurden.

Die Methode des direkten Verfolgens des Weges radioaktiv markierter Substanz in der Haut war für die Estradiol-Penetrationsexperimente nicht geeignet. Estradiol wurde in Humanhaut, in den humanen Hautmodellen und in tierischen Häuten zu einem hohen Prozentsatz metabolisiert. Es wurde deshalb ein kommerziell verfügbarer Estradiol-Radioimmunoassay an die Fragestellung der Hautpenetration- und permeation adaptiert. Dieser Testkit gestattete die Bestimmung von Estradiol und seinem Hauptmetaboliten Estron sowie deren konjugierte Metaboliten. Der Messbereich befand sich für Estradiol und Estron in einer Größenordnung zwischen 3,75 und 10 pg / Messröhrchen. Die Verlässlichkeit und Güte des Testkits wurde unter Zuhilfenahme gespikter Medienproben ermittelt.

Obwohl eine Ethylacetatextraktion der Medien und Hautproben in einer hohen Wiederfindung mündeten, wurde aus Gründen der analytischen Sicherheit der schlechter extrahierende Ether zur Extraktion herangezogen. Die wasserslöslichen Konjugate wurden vor der radioimmunologischen Bestimmung mittels hydrolytischer Enzyme in die Ausgangsverbindungen Estrogen und Estradiol zurückverwandelt. Rechnerisch konnten dann die einzelnen Fraktionen an Substanz und Metabolit ermittelt werden. Für diese Bestimmungen waren eine Reihe an Vorversuchen erforderlich, die der Optimierung der Enzymaktivitäten, der Inkubationszeiten und -temperaturen dienten. Die totalen Estrogen Wiederfindungsraten betragen bei den Franzzellexperimenten 88,3 bis 100,5 %.

Außer der Etablierung der Hormonanalytik wurden vor den eigentlichen Experimenten auch die experimentellen Penetrations- und Permeationsbedingungen optimiert. Es wurde das statische gegen das dynamische Franzzell-system verglichen, die jedoch in ihrer Aussage keine statistisch signifikanten Unterschiede erkennen ließen. Die Schlauchmaterialien beim dynamischen Franzzell-system wurden hinsichtlich ihrer Eigenschaft Substanz zu absorbieren untersucht und geeignetes Schlauchmaterial wurde ausgewählt.

Der Einfluss des Zusatzes von BSA in den Rezeptormedien wurde getestet. Ein Zusatz von 4-5 % BSA in den Rezeptormedien wird im Allgemeinen bei Experimenten mit stark lipophilen Substanzen empfohlen, um deren geringe Löslichkeit in diesen Medien nicht zum limitierenden Faktor werden zu lassen. Der Zusatz von BSA im Rezeptormedium führte tatsächlich zu einer Verdopplung der permeierten Testosteronkonzentration, während die permeierten Estrogenkonzentrationen nicht beeinflusst waren.

Die Löslichkeit der Substanzen ist nicht nur für das Rezeptormedium essentiell und unter Umständen limitierend, sondern auch für die Applikation der Substanzen auf der Hautoberfläche von Bedeutung. Die Löslichkeit der Substanzen in den Donormedien wird

durch Lösungsvermittler beeinflusst, die aber ihrerseits in den Prozess der Hautpenetration in mehrfacher Weise eingreifen. Das schwer wasserlösliche Testosteron musste für entsprechende Hautabsorptionsexperimente in ethanolischen Lösungen appliziert werden. Testosteron war für die Experimente in Ethanol-Wasser-Mischungen mit einem Ethanolgehalt von $\geq 60\%$ ausreichend löslich. Da sich diese Ethanolkonzentration jedoch als toxisch für die Haut und insbesondere die humanen Kunsthäute erwies, wurden auch andere Donorlösungen wie z.B. Öle (Miglyol) getestet.

Rein ölsche Testosteronlösungen verhinderten jedoch dessen Penetration vollständig. Es wurde deshalb auf Miglyol/Ethanol Mischungen zurückgegriffen, wobei der Ethanolgehalt sorgfältig unter Berücksichtigung steigender Penetrationsfördernder aber auch steigender toxischer Effekte ausgewählt wurde. Kompromisse mussten auf beiden Seiten eingegangen werden. Das Verhältnis von 10/90 (v/v) Ethanol/Miglyol wurde als das Optimale ermittelt. Die Testosteronpenetration aus 10/90 Ethanol/Miglyol Mischungen hat die aus 100 % und 60 % reinen Ethanols als Donormedium bei weitem überschritten, bei deutlich abgeschwächter nachweisbarer Toxizität (MTT-Test). Zur Beurteilung der Toxizität der Donor- und Rezeptormedien wurden außer dem MTT-Test weitere Verfahren, wie z.B. die Messung der freigesetzten LDH-Aktivitäten in den Rezeptormedien sowie der Laktatkonzentrationen herangezogen. Die Ergebnisse der Bestimmungen korrelierten mit den Daten der MTT-Tests. Histologische Beurteilungen nach den Experimenten, insbesondere der humanen Kunsthaut, zeigten die größere Bedeutung der Rezeptormedien gegenüber den Donormedien hinsichtlich der Hautintegrität, wenn PBS bzw. PBS + 5 % BSA als Rezeptormedium zum Einsatz kamen. Es wurden die Testosteronpenetrationen verglichen zwischen frisch exzidiert und kryokonservierter Schweinespalthaut, zwischen Schweinerücken- und Schweinebauchhaut, und auch zwischen humaner kryokonservierter Haut und humaner hitzeseparierter Epidermis. Bei allen Vergleichen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die Testosteronpermeation durch unterschiedliche Chargen humaner Kunsthaut variierte deutlich geringer im Vergleich zur Permeationsvarianz unterschiedlicher Spender humanen oder tierischen Ursprungs. Aufgrund der deutlich geringeren Barriere zeigte Testosteron an humanen Kunsthautpräparaten die größten prozentualen Permeationen und damit die größten Fluxwerte sowie die kürzesten lag-Zeiten. Die Fluxdaten der Spalthäute humanen oder tierischen Ursprungs lagen in vergleichbaren Größenordnungen, allerdings wurden bei Schweinehaut lag-Zeiten von bis zu einer Stunde beobachtet.

Die Ergebnisse der oben aufgeführten Vorexperimente resultierten in einem experimentellen Permeationsprotokoll, dass anhand der Permeation einer weiteren, jedoch hydrophileren

Substanz, Hydrocortison, evaluiert wurde. Verglichen wurden die Permeationsdaten von Testosteron und Hydrocortison, die als O/W und W/O Emulsionen sowie als 10/90 Ethanol/Miglyol-Lösungen auf die humanen Kunsthäute aufgetragen wurden. Die Permeation von Hydrocortison übertraf die des Testosteron. Die Testosteronpermeation aus 10/90 Ethanol/Miglyol Lösungen war im Vergleich zu den oben genannten Emulsionen niedriger, jedoch wurde bei Hydrocortison ein gegenteiliges Verhalten beobachtet. Hydrocortison zeigte die stärkste Permeation aus 10/90 Ethanol/Miglyol, während das Einarbeiten in die entsprechenden Emulsionen zur deutlichen Reduktion der Permeation führte. Die beobachteten Unterschiede im Permeationsverhalten aus den Emulsionen und der 10/90 Ethanol/Miglyol Lösung waren signifikant. Gleiche Verhältnisse konnten unter Verwendung von Schweinehaut beobachtet werden, allerdings auf niedrigerem Niveau. Die Permeation insgesamt war deutlich geringer, verglichen zur Permeation an humaner Kunsthaut. Die Permeationsraten am Alveolarmodell (EpiAirway) übertrafen die Raten der Schweinespalthaut fünffach, die der humanen Kunsthaut zweifach (für Testosteron) bzw. dreifach (für Hydrocortison), wobei Hydrocortison im Vergleich zu Testosteron doppelte Werte zeigte.

Die Bestimmung der Estrogenpenetration- und Permeation an humaner Kunsthaut zeigte deutlich den Einfluss des Applikationsvehikels, nicht nur auf die Permeationsraten, sondern auch auf den Estrogenmetabolismus. Die Estrogenaufnahme durch humane Kunsthaut betrug 41,7 % wenn Estrogen als Gel appliziert, und im Gegensatz dazu nur 15,25 %, wenn die gleiche Menge als 0,1 %ige ethanolische Lösung aufgetragen wurde. Die permeierte Estrogenmenge aus den Gelproben wurden zu 42,6 % durch die humane Kunsthaut metabolisiert, E1 zeigte dabei den größten Anteil. Das E2/E1 Verhältnis betrug 0,96 beim Gel, während bei der ethanolischen Lösung das Verhältnis sich zugunsten von E2 verschob. Weniger als 0,2 % permeierte in das Rezeptormedium bei der ethanolischen Lösung, während bei den Gelproben 28,78 % permeierten.

Im Vergleich dazu stellte, wie bereits beim der Testosteronpermeation beobachtet, Schweinehaut die größere Barriere dar. Auf das Gel bezogen war der Unterschied zur humanen Kunsthaut jedoch deutlicher ausgeprägt als bei der ethanolischen Lösung. Der Einfluss von Ethanol auf den E2 Metabolismus, der bei der humanen Kunsthaut in einer Reduktion des Metabolismus endete, war bei Schweinehaut weniger deutlich ausgeprägt. Die

E2 Gewebskonzentrationen waren niedriger wenn als Gel appliziert im Vergleich zur ethanolischen Lösung.

Applikation eines E2-TTS am isoliert perfundierten Schweinebein für sechs Stunden resultierte in einer Aufnahme von 42,85 % der im TTS inkorporierten Dosis an E2. Während E2 bereits in der ersten Stunde nach Applikation im Perfusat detektierbar war, wurden der E2-Metabolit E1 verzögert, ab der zweiten Stunde nach Inkubationsbeginn, im Perfusat nachgewiesen. Diese lag-Zeit dauerte für die entsprechenden Konjugate noch länger. Drei Stunden nach Inkubationsbeginn waren die E2- und E1-Konjugate im Perfusat zum erstenmal detektierbar. Haut- und Muskelgewebe der Applikationsstelle zeigten E2 und Metabolitenkonzentrationen, die 1000fach die des Kontrollgewebes überstiegen. 30 % des ins Gewebe penetrierten Estrogens unterlag einer Metabolisierung, wovon 11 % konjugiertes E2, 19 % E1 und nur 0,5 % konjugiertes E1 darstellten.