

Methodik der Steroidtoxikologie

für Forschung und klinische Anwendung
der Steroide

Arbeitstagung in Bonn 1970

Herausgegeben von

Ernst Jürgen Plotz

und

Jürgen Haller

Mit Beiträgen von

H. Breuer

R. Dorfman

W. Elger

P. Günzel

P. W. Jungblut

R. Kaiser

K.-H. Kolb

F. Neumann

M. Rüsse



Georg Thieme Verlag Stuttgart

Methodik der Steroidtoxikologie

für Forschung und klinische Anwendung
der Steroide

Arbeitstagung in Bonn 1970

Herausgegeben von

Ernst Jürgen Plotz

und

Jürgen Haller

Mit Beiträgen von

H. Breuer

R. Dorfman

W. Elger

P. Günzel

P. W. Jungblut

R. Kaiser

K. H. Kolb

F. Neumann

M. Rüsse

48 zum Teil farbige Abbildungen, 21 Tabellen

1971



Georg Thieme Verlag Stuttgart

Herausgeber

Prof. Dr.med. E. J. PLOTZ, Universitäts-Frauenklinik
Bonn-Venusberg

Prof. Dr.med. J. HALLER, Universitäts-Frauenklinik und Hebammenlehranstalt
Göttingen

Diejenigen Bezeichnungen, die zugleich eingetragene Warenzeichen sind, wurden *nicht* besonders kenntlich gemacht. Es kann also aus der Bezeichnung einer Ware mit dem für diese eingetragenen Warenzeichen nicht geschlossen werden, daß die Bezeichnung ein freier Warename ist. Ebenso wenig ist zu entnehmen, ob Patente oder Gebrauchsmuster vorliegen.

Alle Rechte, insbesondere das Recht der Vervielfältigung und Verbreitung sowie der Übersetzung, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (durch Photokopie, Mikrofilm oder ein anderes Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

© Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1971 – Printed in Germany – Druck: Dörr KG, Ludwigsburg

ISBN 3 13 484701 9

Vorwort

Die Arbeitstagung befaßt sich mit der Frage, ob die zur Zeit geübte Methodik der Steroidtoxikologie für Forschung und klinische Anwendung der Steroide noch vertretbar ist und bindende Aussagen über zu erwartende Nebenwirkungen beim Menschen zuläßt.

So wird unter anderem geprüft, inwieweit Langzeittoxizitätsstudien mit Sexualhormonen beim Beagle-Hund auf die Beeinflussung des Geschwulstwachstums beim Menschen übertragen werden können. Es bestehen unterschiedliche neuro-endokrinologische Reglermechanismen zwischen Tier und Mensch. Bisherige toxikologische Methoden haben auch die unterschiedliche Empfindlichkeit der Zielorgane bei Mensch und Tier, die differenten Wirkungsspektren, Pharmakokinetik und Verstoffwechslung der Steroide nur ungenügend berücksichtigt. Die endgültige Wirkung der Hormone hängt auch nicht nur von den angewandten absoluten Mengen ab, sondern wird maßgeblich mit von den Relationen der Steroide zueinander und der zeitlichen Sequenz ihrer Anwendung modifiziert.

Unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte versucht die Arbeitstagung, Ansatzpunkte für neue Richtlinien zu geben, nach denen die Durchführung und die Interpretation von sog. Toxizitätsstudien mit Sexualhormonen künftig ausgerichtet werden kann.

ERNST JÜRGEN PLOTZ

JÜRGEN HALLER

Teilnehmer an der Arbeitstagung

- BETTENDORF, G., Prof. Dr., Endokrinologische Abteilung der Universitäts-Frauenklinik Hamburg-Eppendorf, 2000 Hamburg 20, Martinistr. 52
- BREUER, H., Prof. Dr., Institut für Klinische Biochemie der Universität Bonn, 5300 Bonn-Venusberg
- DÄMMRICH, D., Prof. Dr., Institut für Veterinär-Pathologie FU Berlin, 1000 Berlin 33, Drosselweg 1-3
- DORFMAN, R., Prof. Dr., Syntex Research Laboratory, Department of Pharmacology Stanford University, Palo, Alto, California 94304, USA
- ELGER, W., Dr., Schering AG, Department Endokrinpharmakologie, 1000 Berlin 65, Müllerstr. 170/72
- ETREBY, M.F., Dr., Schering AG, Dept. Exp. Toxikologie, 4619 Bergkamen
- FISCHER, F.W., Dr., Deutsche Forschungs-Gemeinschaft, 5320 Bad Godesberg, Kennedy-Allee 40
- GERHARDS, E., Priv.Doiz., Dr.Dr., Schering AG, Forschungsleitung, 1000 Berlin 65, Müllerstr. 170/72
- GIBIAN, H., Prof. Dr., Schering AG, Forschungsleitung, 1000 Berlin 65, Müllerstr. 170/72
- GÜNZEL, P., Dr., Schering AG, Dept. Exp. Toxikologie, 4619 Bergkamen
- HAHN, J.D., Dr., Schering AG, Forschungsleitung, 1000 Berlin 65, Müllerstr. 170/72
- HALLER, J., Prof. Dr., Universitäts-Frauenklinik und Hebammenlehranstalt, 3400 Göttingen, Humboldtallee 3
- HAMMERSTEIN, J., Prof. Dr., Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie im Klinikum Steglitz, 1000 Berlin 45, Hindenburgdamm 30
- HECHT-LUCARI, G., Prof. Dr., E. Merck AG, 6100 Darmstadt, Frankfurter Straße 250
- HOLZMANN, K., Priv.-Doiz.Dr., I. Frauenklinik und Hebammenschule der Universität München, 8000 München 15, Maistr. 11
- JUNGBLUT, P.W., Prof. Dr., Max-Planck-Institut für Zellbiologie, 2940 Wilhelmshaven, Anton-Dohrn-Weg
- KAISER, R., Prof. Dr., Universitätsfrauenklinik, 5000 Köln 41, Kerpener Str. 34
- KARG, H., Prof. Dr., Südd. Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft Weihenstephan, 8050 Freising-Weihenstephan
- KEPP, R., Prof. Dr., Universitäts-Frauenklinik, 6300 Gießen, Klinikstraße 28
- KNUPPEN, R., Priv.-Doiz. Dr., Institut für Klinische Biochemie der Rhein. Friedrich-Wilhelms-Universität, 5300 Bonn-Venusberg
- KOESTER, H., Priv.-Doiz. Dr., Universitäts-Frauenklinik, 6300 Gießen, Klinikstraße 32
- KOLB, K.H., Dr., Schering AG, Department Biodynamik, 1000 Berlin 65, Müllerstraße 170/72
- KOPP, R., Dr. Dr., Schering AG, Forschungsleitung, 1000 Berlin 65, Müllerstraße 170/72
- KRAFT, H.G., Dr., E. Merck AG, 6100 Darmstadt, Frankfurter Straße 250
- LACHNIT, U., Dr., Schering AG, Fachbereich Forschung, Sektion Endokrinologie II, 1000 Berlin 65, Müllerstraße 170/72
- LAUDAHN, G., Prof. Dr., Schering AG, Forschungsleitung, 1000 Berlin 65, Müllerstraße 170/72

- LAURITZEN, Ch., Prof. Dr., Universitäts-Frauenklinik der Universität Ulm, 7900 Ulm/Donau, Prittwitzstraße 3
- LEIS, D., Dr., Organon GmbH, Abteilung Klinische Forschung, 8000 München 60, Perlschneider Straße 1
- LISBOA, B.P., Priv.-Doz. Dr., Univ.-Frauenklinik und -Poliklinik, Univ.-Krankenhaus Eppendorf, 2000 Hamburg 20/-3-, Martinistraße 52
- NEUMANN, F., Priv.-Doz. Dr., Schering AG, Department Endokrinpharmakologie, 1000 Berlin 65, Müllerstraße 170/72
- NEVINNY-STICKEL, J., Prof. Dr., Universitäts-Frauenklinik der FU Berlin, 1000 Berlin 19, Pulsstraße 4-14
- NOCKE, W., Priv.Do. Dr., Universitäts-Frauenklinik, 5300 Bonn-Venusberg
- PLOTZ, E.J., Prof. Dr., Universitäts-Frauenklinik, 5300 Bonn-Venusberg
- RICHTER, K.-D., Dr., Schering AG, Dept. Exp. Toxikologie, 4619 Bergkamen
- RÜSSE, M., Prof. Dr., Gynäkologische und Ambulatorische Tierklinik der Universität München, 8000 München 22, Königinstraße 12
- SCHARFF, H.-J., Dr., Schering AG, Fachbereich Klin. Forschung, Sektion Endokrinologie III, 1000 Berlin 65, Müllerstraße 170/72
- SCHMÄHL, D., Prof. Dr., Institut für Exp. Toxikologie und Chemotherapie, Deutsches Krebsforschungszentrum, 6900 Heidelberg, Berliner Straße 27
- TAMM, J., Prof. Dr., II. Med. Universitäts-Klinik, Univ.-Krankenhaus Eppendorf, 2000 Hamburg 20, Martinistraße 52
- TAUBERT, H.-D., Prof. Dr., Abteilung f. gynäkologische Endokrinologie, Universitäts-Frauenklinik, 6000 Frankfurt 70, Ludwig-Rehn-Straße 14
- UFER, J., Dr., Schering AG, Fachbereich Klin. Forschung, Sektion Endokrinologie I, 1000 Berlin 65, Müllerstraße 170/72
- VOIGT, K.-D., Prof. Dr., Klin. Chem. Abteilung der II. Med. Universitäts-Klinik und -Poliklinik, Univ.-Krankenhaus Eppendorf, 2000 Hamburg 20, Martinistraße 52
- WEISS, E., Prof. Dr., Direktor des Veterinär-Pathologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen, 63 Gießen, Frankfurter Straße 94

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	VII
P. GÜNZEL	
Methode der tierexperimentellen Verträglichkeitsprüfung von hormonalen Kontrazeptiva	1
F. NEUMANN u. W. ELGER	
Kritische Überlegungen zu den biologischen Grundlagen von Toxizitätsstudien mit Steroid-(Sexual-)hormonen	6
P.W. JUNGBLUT	
Allgemeine Diskussion	49
K.H. KOLB	
Zur unterschiedlichen Pharmakokinetik der Sexualsteroid- bei Labor- tieren	55
Allgemeine Diskussion	59
H. BREUER	
Vergleichende Untersuchungen über den Stoffwechsel von Steroid- hormonen bei Mensch und Tier	61
R. DORFMAN, Diskussionsbeitrag	71
M. RÜSSE, Diskussionsbeitrag	75
Allgemeine Diskussion	77
E.J. PLOTZ, Zusammenfassung der Diskussionsbeiträge und Schlußfolgerungen	81
J. HALLER	
Der Einfluß hormonaler Kontrazeptiva auf das Geschwulstwachstum	83
Allgemeine Diskussion	93
R. KAISER, Diskussionsbeitrag	94

Methode der tiexperimentellen Verträglichkeitsprüfung von hormonalen Kontrazeptiva

Von P. GÜNZEL

Tierexperimentelle Verträglichkeitsprüfungen sollen dazu beitragen, das Risiko, das immer bei Anwendung eines neuen potentiellen Arzneimittels für den Menschen besteht, weitgehend einzuschränken. Die Art und der Umfang dieser Prüfungen werden an den bisher bekanntesten pharmakologischen Eigenschaften, an der vorgesehenen klinischen Indikation, Anwendungsdauer, Formulierung und Applikationsart der zu untersuchenden Substanz orientiert.

Um die Art und den Umfang dieser Prüfungen verschiedener Präparate und -gruppen zu vereinheitlichen und zu gewährleisten, daß bestimmte Mindestanforderungen, die an solche Verträglichkeitsprüfungen zu stellen sind, nicht unterschritten werden, wurden von einer Reihe von wissenschaftlichen Gesellschaften, von Verbänden und von den Gesundheitsbehörden verschiedener Länder Empfehlungen für die Prüfungen ausgearbeitet oder liegen im Entwurf vor. Besonders hinsichtlich der tiexperimentellen Prüfung von Sexualsteroiden für langfristige Anwendung, zu denen die hormonalen Kontrazeptiva zu rechnen sind, sind die Empfehlungen der Gesundheitsbehörden der USA (FDA)* und Großbritanniens (CSD)* richtungweisend geworden. Aus der Kombination der Empfehlungen dieser beiden Behörden ergibt sich der heute übliche Rahmen für die tiexperimentellen Verträglichkeitsprüfungen der Sexualsteroiden für diese Indikation.

Zunächst werden systemische Verträglichkeitsprüfungen bei einmaliger Verabreichung, d.h. DL_{50} -Bestimmungen durchgeführt. Die DL_{50} ist die Dosis, nach deren Verabreichung ca. 50% der Tiere aus einem Kollektiv sterben. Diese Prüfung wird in der Regel an 3 Tierarten ausgeführt, dabei soll eine Tierart ein Nichtnager sein. In diesen Prüfungen werden die Substanzen gewöhnlich an Gruppen zu jeweils 10 Tieren in abgestuften Dosierungen verabreicht. Das Vergiftungsbild wird beschrieben. Die Beobachtungszeit erstreckt sich bei der Prüfung von Steroiden gewöhnlich auf mehrere (3-4) Wochen, da bei dieser Substanzklasse sehr häufig mit Spätwirkungen zu rechnen ist. Alle während der Beobachtungszeit gestorbenen Tiere und alle nach Abschluß der Beobachtungszeit getöteten Tiere werden seziiert. Aus der Anzahl der beobachteten tödlichen Wirkungen pro Dosis wird mit Hilfe statistischer Auswertungsverfahren, z.B. dem Verfahren nach LITCHFIELD u. WILCOXON oder der Probit-Analyse, die DL_{50} berechnet. Die Bestimmung der DL_{50} -Werte dient im allgemeinen dazu, Substanzen in bestimmte Giftklassen einzuordnen. Wie aus den in der Tabelle 1 angeführten Beispielen hervorgeht, liegen diese Werte bei Sexualsteroiden sehr hoch, d.h. diese Substanzen sind sehr ungiftig.

In Kenntnis der starken pharmakologischen Wirkungen dieser Substanzen bei sehr niedriger Dosierung ist den DL_{50} -Bestimmungen für die Bewertung von Steroidhormonen dieser Wirkungskategorie deshalb keine wesentliche Bedeutung beizumessen. Aus diesem Grunde habe ich auf die Zusammenstellung der Ergebnisse verschiedener Kombinationen der Östrogene und Gestagene bewußt verzichtet, da die Werte bei p.o. und

* FDA - Food and Drug Administration

CSD - Committee on Safety of Drugs

Tabelle 1. Ergebnisse systemischer Verträglichkeitsprüfungen bei einmaliger Verabreichung (DL50)

Tierart	Geschlecht	p.o. (g/kg)	i.p. (g/kg)	s.c. (g/kg)
Östradiolvalerianat				
Ratte	M + F	> 5,0	> 4,0	> 2,0
Maus	M	> 4,0	> 4,0	1,4 - 2,0
	F	> 4,0	ca. 4,0	> 2,0
Aethinyloestradiol				
Ratte	M + F	> 5,0	—	—
Maus	M	> 2,5	—	—
	F	ca. 2,5	—	—
	M + F	—	0,69 (0,45 - 1,05)	> 2,6
Norethisteronacetat				
Ratte	M + F	4,0	—	—
Maus	M + F	1,4 (1,2 - 1,7)	0,62 (0,48 - 0,79)	> 2,5
d,l-Norgestrel				
Maus	M	> 2,5	> 2,5	> 2,5
	F	> 2,5	> 2,5	> 2,5

und s.c. Verabreichung ebenfalls in dem Bereich g/kg, bei i.p. Verabreichung zwischen 320 mg und 4 g/kg liegen. Exakte Untersuchungen über eine gegenseitige Beeinflussung der Substanzen bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen wurden aber bisher nicht ausgeführt und erscheinen nicht sinnvoll.

Lokale Verträglichkeitsprüfungen bestimmter Formulierungen von Sexualsteroiden können für Depotpräparate zur intramuskulären Applikation eine Rolle spielen. Dabei werden geringe Volumina (ca. 0.5 ml) der zu prüfenden Formulierungen in den M. sacrospinalis des Kaninchens injiziert. 3 und 5 Tage nach der Applikation werden Muskelproben entnommen, makroskopisch beurteilt und histologisch untersucht. Die Bewertung der Verträglichkeit der geprüften Formulierung erfolgt anhand der Messung der Größe des veränderten Muskelbezirkes und der speziellen histopathologischen Veränderungen am Applikationsort.

Prüfungen auf teratogene und embryotoxische Wirkung werden z.Zt. gewöhnlich an Mäusen, Ratten und Kaninchen ausgeführt. Die Verwendung des Affen auf diesem Untersuchungsgebiet zeichnet sich ab. In diesen Versuchsanordnungen werden die Substanzen z.Zt. der organogenetischen Phase verabreicht, die Feten vor der Geburt durch Kaiserschnitt entnommen und mit Hilfe besonderer Techniken auf äußere, skelettale und innere Mißbildungen untersucht. Da diesen Prüfungen im Fall der Kontrazeptiva nur eine untergeordnete Bedeutung zukommt, soll an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen werden.

Einen wesentlichen Umfang haben die systemischen Verträglichkeitsprüfungen bei mehrmaliger langfristiger Verabreichung, die sogenannten subakuten und chronischen Toxizitätsprüfungen. Sinn dieser Untersuchungen ist es, herauszufinden, welche Dosierungen einer Substanz ohne Unverträglichkeitserscheinungen vertragen werden, in welchem Dosisbereich die Verträglichkeitsgrenze liegt und welche Organe oder Organsysteme bei Überschreitung dieses Dosisbereiches am ehesten gefährdet oder geschädigt werden. Diese Versuche werden an Ratten, Hunden und Affen durchgeführt.

Für die in der Tabelle 2 enthaltenen Tierzahlen liegen keine exakten Angaben vor, sie entsprechen den üblicherweise in Versuchen eingesetzten. In dieser Tabelle sind nur die Maximalzahlen für die Untersuchungsdauer angegeben. Es existieren darüber hinaus Empfehlungen für kürzer dauernde Versuche bei Einschränkung der vorgesehenen Anwendungsdauer am Menschen, insbesondere im Hinblick auf die unterschiedlichen Phasen der klinischen Prüfung. Auf diese Relationen möchte ich jedoch nicht näher eingehen, da sie für unser Thema keine zusätzlichen Informationen liefern.

Tabelle 2. Tierart, -zahl und Versuchsdauer für systemische Verträglichkeitsprüfungen bei langfristiger Verabreichung

Tierart	Geschlecht	Tierzahl pro Gruppe	Versuchsdauer in Wochen
Ratte	M + F F	40 - 60	104
Hund	M + F F	6 - 14	104
Affe	M + F F	(ca. 8)	104

Die niedrigste Dosis wird bei diesen Versuchen gewöhnlich im Bereich der zwei- bis zehnfachen vorgesehenen therapeutischen Dosis gewählt. Die anderen Dosierungen betragen etwa das zwei-, fünf-, zehn- oder bis zu hundertfache der niedrigen Dosis. In der Regel werden in diesen Versuchen mindestens 3 Dosierungen geprüft. Sehr wichtig erscheint mir an dieser Stelle der Hinweis, daß die Dosierung im Tierexperiment an der für den Menschen vorgesehenen therapeutischen Dosis auf mg/kg-Basis orientiert wird. Im Rahmen dieser langfristigen Verträglichkeitsprüfungen werden eine Vielzahl verschiedener Untersuchungen in Abständen von mehreren Wochen durchgeführt, für die in der folgenden Tabelle einige Beispiele enthalten sind (Tab. 3).

Der Umfang dieser Untersuchungen ist bei den einzelnen Versuchen und Spezies unterschiedlich. Er wird insbesondere bei Ratten durch die Größe der Tiere und die maximal entnehmbaren Blutmengen eingeschränkt.

Alle gestorbenen, zwischenzeitlich oder bei Versuchsende getöteten Tiere werden sezziert, ca. 10 Organe werden gewogen und ca. 25-40 Organe pro Tier histologisch, z.T. nach Anwendung besonderer Spezialfärbungen, untersucht.

Als Ergänzung zu diesen langfristigen systemischen Verträglichkeitsprüfungen sind die Prüfungen auf kanzerogene Wirkung anzusehen, die sich von den vorhergehend geschilderten im wesentlichen dadurch unterscheiden, daß die Versuchsdauer z.T. länger und der Umfang der zwischenzeitlich auszuführenden Untersuchungen geringer ist (Tab. 4).

Tabelle 3. Untersuchungen im Rahmen systemischer Verträglichkeitsprüfungen bei mehrmaliger langfristiger Verabreichung

Klinische Untersuchungen		
Körpergewicht		Blutdruck
Futterverzehr		Herzfrequenz
Ophthalmoskopische Untersuchungen		EKG
Hämatologische und gerinnungsphysiologische Untersuchungen		
Erythrozyten		Blutungszeit
Leukozyten		Thrombinzeit
Differentialblutbild		Thromboplastinzeit
Retikulozyten		Partielle Thromboplastinzeit
Thrombozyten		Fibrinogen
Hämoglobin		
Hämatokrit		
BKS		
Harnuntersuchungen		
Glucose	pH	Gallenfarbstoff
Protein	spezifisches	Blut
Sediment	Gewicht	Aceton
Klinisch-chemische Untersuchungen in Blut oder Bestandteilen des Blutes		
GOT	Gesamtprotein	Natrium
GPT	Elektrophorese	Kalium
AP	Harnstoff-Stickstoff	Calcium
	Blutglucose	
	Cholesterin	
	UFS	
	Gesamtlipide	
Organfunktionsprüfungen		
Bromthaleinbelastung		Glucosebelastung
Insulinbelastung		Clearancebestimmung (Inulin und PAH)

Tabelle 4. Tierart, -zahl und Versuchsdauer für Kanzerogenitätsstudien

Tierart, -zahl und Geschlecht/Gruppe	Versuchsdauer	zwischenzeitliche Tötung
Maus ca. 50	ca. 80 Wochen	—
Ratte ca. 50	ca. 104 Wochen	—
Hund 16 F	7 Jahre	je 4 Tiere nach 2 und 4 Jahren
Affe 16 F	10 Jahre (oder unbegrenzt)	je 4 Tiere nach 2 und 5 Jahren

Für Versuche an Ratten und Mäusen wurden die Tierzahlen und das Geschlecht pro Gruppe nicht festgelegt. Empfohlen wird lediglich, die Tierzahlen so groß zu wählen, daß bei Versuchsende genügend Tiere für eine statistische Bearbeitung der Un-

tersuchungsbefunde überleben. In der Regel werden 40 männliche und 40 weibliche, insgesamt also 80 Tiere eingesetzt. Bei Ratten und Mäusen werden Substanzen gewöhnlich mit dem Futter verabreicht. In den Kanzerogenitätsstudien mit diesen beiden Tierarten werden die Tiere regelmäßig beobachtet, das Körpergewicht wird bestimmt, die Tiere werden in regelmäßigen Zeitabständen palpirt, um das Auftreten von Tumoren so früh wie möglich zu diagnostizieren. Bei Versuchsende erfolgt eine ausführliche Sektion, die Wägung von Organen und die histologische Untersuchung in dem bereits vorher geschilderten Rahmen.

Bei Hunden und Affen werden neben den oben für Mäuse und Ratten geschilderten Untersuchungen zusätzlich die Bestimmung von 17-Hydroxy- und 17-Ketosteroiden, eine regelmäßige Zykluskontrolle und besondere Untersuchungen der Gefäße bei Versuchsabschluß vorgenommen.

Bei Affen werden zusätzlich die Untersuchung der Vaginalzytologie und Bestimmung der Blutglucose an nüchternen Tieren in halbjährlichen Abständen vorgeschrieben. Gerinnungsphysiologische Untersuchungen, die die Bestimmung der Prothrombinzeit, Thrombozytenzahl, Russell's viper venom time, reguläre und aktivierte partielle Thromboplastinzeit sowie die Fibrinogenbestimmung umfassen, werden zusätzlich empfohlen.

Für die Auswahl der Dosierungen wird bei Mäusen und Ratten vorgeschlagen, als niedrigste Dosis die zwei- bis dreifache Humandosis, berechnet auf mg/kg Körpergewicht-Basis, als höchste eine solche, die die Überlebenszeit nicht verkürzt, und eine dritte, zwischen diesen beiden liegende, auszuwählen.

Bei Hunden und Affen wird ebenfalls vorgeschlagen, sich auf die für den Menschen vorgesehene Dosis zu beziehen und bei Hunden etwa das zwei-, zehn- und fünfundzwanzigfache, bei Affen das zwei-, zehn- und fünfzigfache dieser Dosis an die Tiere zu verabreichen. Dabei wird bei beiden Tierarten eine zyklische Behandlung (3 Wochen Medikation und 1 Woche Behandlungspause) empfohlen, obwohl nur Affen einen vierwöchigen Zyklus haben, während Hunde normalerweise nur zweimal jährlich einen Östrus zeigen.

Abschließend möchte ich Ihnen in tabellarischer Form einige Beispiele dafür geben, in welchen Dosierungen einige Substanzen, von denen später sicher noch gesprochen werden wird, in langfristigen Kanzerogenitätsstudien geprüft werden. Dabei geben die in der letzten Spalte genannten Faktoren das Verhältnis der therapeutischen zu den experimentell geprüften Dosierungen an. Ich möchte hinzufügen, daß nur ein Teil dieser Prüfungen bereits abgeschlossen ist (Tab. 5).

Bewußt habe ich darauf verzichtet, zusätzlich auch noch die Verhältnisse für einzelne Kombinationen anzuführen, da sie m.E. nicht geeignet wären, das Bild übersichtlicher zu machen. Die tierexperimentell in den langfristigen systemischen Verträglichkeitsprüfungen untersuchten Kombinationen haben für Norethisteronacetat + Aethinyloestradiol die Relationen 50 + 1 oder 20 + 1, für d,l-Norgestrel und Aethinyloestradiol 10 + 1. Die aus diesen Kombinationen zu errechnenden Dosierungen der Einzelkomponenten liegen ausnahmslos innerhalb der in der Tabelle angegebenen Bereiche. Eindeutige Hinweise für eine gegenseitige Beeinflussung der geprüften Substanzen in den o.a. Kombinationsverhältnissen sind jedoch aus den Versuchsergebnissen nicht zu erkennen.

Tabelle 5. Dosierungen von Östrogenen und Gestagenen in langfristigen Verträglichkeitsprüfungen einschließlich Kanzerogenitätsstudien (z.T. Annäherungswerte)

Substanz	Tierart	Behandlungsdauer (Wochen)	Dosierung (mg/kg)	therapeutische Dosis (mg/kg)*	Faktor
Aethinyl- oestradiol	Maus	80	0,001 - 0,9	0,001	1 - 900
	Ratte	99-105	0,0006-- 0,3		0,5 - 300
	Hund	102-132	0,001 - 0,1		1 - 100
	Affe	132	0,002 - 0,05		2 - 50
Norethisteron- acetat	Maus	80	0,25 - 10,0	0,08	3 - 100
	Ratte	104	0,4 - 4,0		5 - 50
d,l-Norgestrel	Maus	80	0,01 - 4,2	0,01	1 - 400
	Ratte	80-105	0,007 - 146		1 - 15000
	Hund	102-364	0,01 - 1,0		1 - 100
	Affe	520	0,02 - 0,5		1 - 50

* Ø Körpergewicht des Menschen 50 kg
 Aethinyl-oestradiol 0,05 mg pro Mensch
 Norethisteronacetat 4,0 mg pro Mensch
 d,l-Norgestrel 0,5 mg pro Mensch

Kritische Überlegungen zu den biologischen Grundlagen von Toxizitätsstudien mit Steroid-(Sexual-)hormonen

Von F. NEUMANN und W. ELGER

Kritik ist die Kunst,
verbessern zu wollen (Lessing)

Steroidhormone (Sexualhormone) nehmen insofern eine zentrale Stellung im Leben überhaupt ein, als sie das Fortpflanzungsgeschehen regulieren. Sie sind für die Erhaltung der Art erforderlich.

Es ist die Funktion von Hormonen, ein „geordnetes“ synchrones Ablesen von an sich vorhandenen Geninformationen zu gewährleisten, d.h. Hormone induzieren spezifische Vorgänge zu ganz bestimmten – den richtigen – Zeitpunkten (KARLSON 1965).

Wenn man bedenkt, wie tief Sexualhormone in das organische Geschehen eingreifen, dann wird verständlich, wie wichtig Toxizitätsstudien gerade mit Sexualhormonen sind, bevor sie als Pharmaka angewandt werden.

Unsere Überlegungen aus der Sicht der Reproduktions-Endokrinologie und Pharmakologie sollen ein Beitrag sein, die Praxis der toxikologischen Forschung im Sinne Lessings zu kritisieren.

Wesentlich erscheint uns, daß in Toxizitätsstudien an Tieren mit Sexualhormonen beobachtete Veränderungen richtig interpretiert werden. Geschieht dies nicht oder ist dies nicht möglich, so kann zur Übertragbarkeit der tierexperimentellen Befunde auf die Verhältnisse beim Menschen kaum etwas ausgesagt werden. Damit ist dann natürlich auch der Sinn einer solchen Studie in Frage gestellt.

Gerade bei Verträglichkeitsstudien mit Sexualhormonen ist die Frage der Übertragbarkeit experimenteller Befunde deshalb so erschwert, weil die gleichen Hormone bei verschiedenen Spezies unterschiedliche physiologische Funktionen haben oder haben können. Wenn man das bei der Wertung von Toxizitätsstudien nicht berücksichtigt, können Gefahren vorgetäuscht werden, wo tatsächlich keine sind – noch schlimmer wäre das Umgekehrte. Die Analyse ausgewählter Beispiele von Hormonwirkungen soll dem Verständnis des Kernproblems, der richtigen Interpretation experimenteller Befunde, dienen. Hierzu war es kaum nötig, auf neue Erkenntnisse zurückzugreifen.

Nicht alle Fragen sind heute geklärt, so daß es sich oft nicht vermeiden ließ, aufgrund von „Indizien“ Hypothesen aufzustellen. Angaben in der Literatur sind oft uneinheitlich oder sogar widersprüchlich. In solchen Fällen haben wir bei der Diskussion noch nicht völlig geklärter Vorgänge immer versucht, die Auffassung wiederzugeben, die am wahrscheinlichsten ist (etwa bei der Diskussion des luteotropen Hormonkomplexes). So sind die in diesem Aufsatz vertretenen und mehr oder weniger gut belegten Ansichten keine Dogmen, sondern eher Impulse für eine experimentelle Toxikologie, denn man kann sicher sein, daß in wenigen Jahren vieles hier Gesagte nicht mehr aufrechterhalten werden kann.

An dieser Stelle seien einige phylogenetische Überlegungen erlaubt, die zum Verständnis der dann folgenden Details beitragen könnten. Es kann als allgemeine Regel gelten, daß ein biologisches Merkmal oder ein biologischer Vorgang umso konstanter bei höheren Lebewesen ist, je früher dieses Merkmal oder dieser Vorgang in der Phylogenese aufgetreten ist.

Beispiel: Die Weitergabe genetischer Informationen ist bei Bakterien und Pflanzen nicht grundsätzlich anders als bei höheren Lebewesen. Wenn man bedenkt, wie lange es überhaupt Leben auf der Erde gibt, dann ist das Zeitalter der Säugetiere vergleichsweise kurz.

Die Mammalia unterscheiden sich von ihren Vorfahren vor allem durch eine Evolution der Fortpflanzungsvorgänge; hier sind zwei neuartige Phänomene zu nennen:

1. die Laktation (daher der Name) und
2. – in jüngerer Zeit – die Verlegung der Embryonalentwicklung in den mütterlichen Organismus; eine verhältnismäßig neue Errungenschaft.

Wenn man davon ausgeht, daß der Mensch der Endpunkt der Entwicklung ist, was die Vorgänge der Reproduktion betrifft, dann stellt jede andere Spezies entweder eine niedrigere Entwicklungsstufe bzw. einen Nebenast der Entwicklung dar. Beispiel von primitiven Entwicklungsstufen sind die Monotremata – z.B. die Schnabeltiere, die bekanntlich Eier legen. Ein weiteres Beispiel sind die Beuteltiere, mit nur sehr kurzer intrauteriner Embryonalentwicklung und der Wanderung der noch völlig unreifen Embryonen in den Beutel.

Einige Vorgänge sind bei allen Spezies der Säugetiere vermutlich gleich und unterliegen daher wahrscheinlich auch den gleichen Regulationsmechanismen. So kann man mit ziemlicher Sicherheit annehmen, daß etwa die die Ovulation auslösenden Faktoren beim Schnabeltier jenen sehr ähnlich sind, die diesen Vorgang bei der Frau steuern. Nach allem, was wir heute wissen, kann auch angenommen werden, daß Gonadotropine und Sexualhormone ebenfalls bei allen Spezies der Säugetierklasse auftreten; allerdings üben sie teilweise völlig unterschiedliche Funktionen aus, wovon noch näher einzugehen sein wird.

Die Tendenz zur Verlängerung der intrauterinen Periode bei höher entwickelten Säugern hat Anpassungen sowohl von seiten des mütterlichen als auch des embryonalen Organismus nötig gemacht. Abgesehen von einigen nicht sicher geklärten Phänomenen können wir davon ausgehen, daß zur Aufrechterhaltung der Schwangerschaft Progesteron erforderlich ist, aber der Entstehungsort des Progesterons und die Regulation der Progesteronsynthese sind bei nahezu allen Spezies unterschiedlich (Tab. 1).

Tabelle 1. „Luteotroper Hormonkomplex“ bei verschiedenen Spezies

Spezies	Hormone
Ratte*, Maus	LTH
Hamster*	FSH + LTH
Kaninchen	LH bzw. Östrogene
Rind	LH + LTH (?)
Schwein	LH
Affe	LH + MCG
Mensch	LH + HCG
Hund	?

LTH = Luteotropes Hormon
 FSH = Follikelstimulierendes Hormon
 LH = Luteinisierungshormon
 MCG = Monkey chorionic gonadotropine
 HCG = Human chorionic gonadotropine

* Bei Ratte und Hamster konnte die Schwangerschaft durch LH-Antikörper unterbrochen werden (LOEWIT 1970, RAJ und MOUDGAL 1970, RAJ u.Mitarb. 1968, RAO u.Mitarb. 1970). Man könnte deshalb vermuten, daß auch LH für die Gelbkörperfunktion von Bedeutung ist. Andererseits war LH bei diesen Spezies nicht luteotrop (MACDONALD u. GREEP 1970)

Selbst bei ein und derselben Spezies ändert sich die Situation noch im Verlaufe der Schwangerschaft. Da Progesteron in viele Prozesse verwickelt ist, wollen wir uns kurz mit den Faktoren befassen, die seine Sekretion aus dem Corpus luteum steuern.

Bei Tieren mit raschen Zyklen (Ratte, Maus, Hamster) wird die Lutealphase durch den Reiz des Coitus reflektorisch verlängert. Nach einem infertilen Deckakt oder einer adequaten mechanischen Reizung resultiert der Zustand der „Pseudogravidität“ (LONG und EVANS 1921). In dieser Phase ist das Corpus luteum von Gonadotropinen der Hypophyse abhängig.

Beim graviden Tier ist in der reflektorischen Lutealphase eine Hypophysektomie abortiv. Bei der Ratte (Abb. 1 und Tab. 1) erreichen die Corpora lutea erst mit dem 12. Tag der Gravidität durch eine Gonadotropinsekretion des Trophoblasten

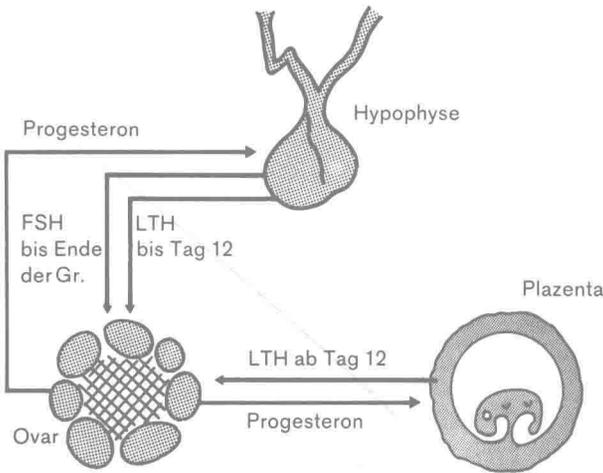


Abb. 1. Luteotroper Komplex bei Ratte und Maus

eine Unabhängigkeit von der Hypophyse (TUROLLA u. Mitarb. 1970).

Beim Hamster (Abb. 2 und Tab. 1) bestehen gonadotrope Aktivitäten der Plazenta vom 8. Tag (GREENWALD 1967; KLEIN 1928), beim Kaninchen (Abb. 3) vom 16. Tag der Gravidität an (GREEP 1941; MAYER u. CANIVENC 1953), wie sie durch die Luteolyse nach einer Ausräumung oder Entfernung des Uterus deutlich werden.

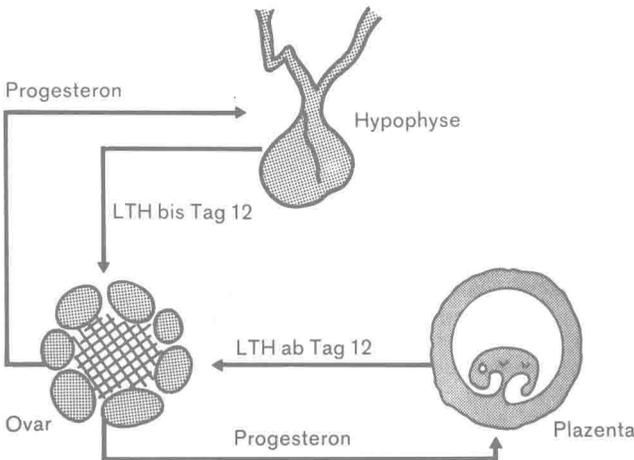


Abb. 2. Luteotroper Komplex beim Hamster

Die frühe Intervention des Trophoblasten durch die Bildung gonadotroper Hormone scheint ein Charakteristikum aller Primaten zu sein (HOBSON 1970) (Abb. 4). So steigt beim Menschen schon wenige Tage nach der Konzeption das Progesteron im Plasma über die Werte des normalen Zyklus an (JOHANSSON 1969). Etwas später steigt das Progesteron beim graviden Rhesusaffen am 11. Tag nach der Ovulation zu einem zweiten Gipfel an (DUNCAN u. PHARRISS 1970). Obwohl kein Zweifel daran bestehen kann, daß die Choriongonadotropine auch bei dieser Spezies luteotrope Wirkungen besitzen, wirkt eine Hypophysektomie bei Rhesusaffen noch bis

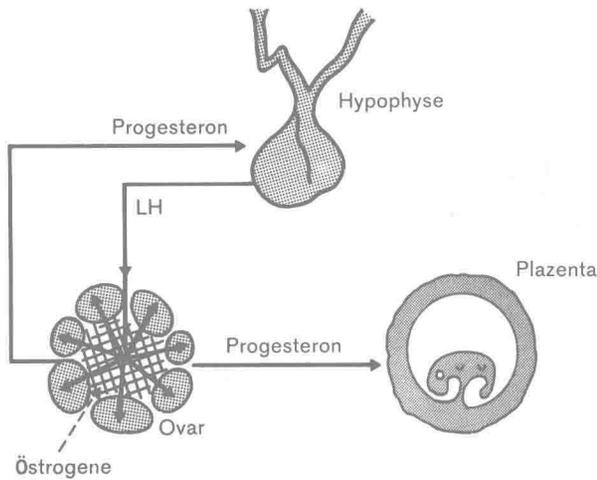


Abb. 3. Luteotroper Komplex beim Kaninchen

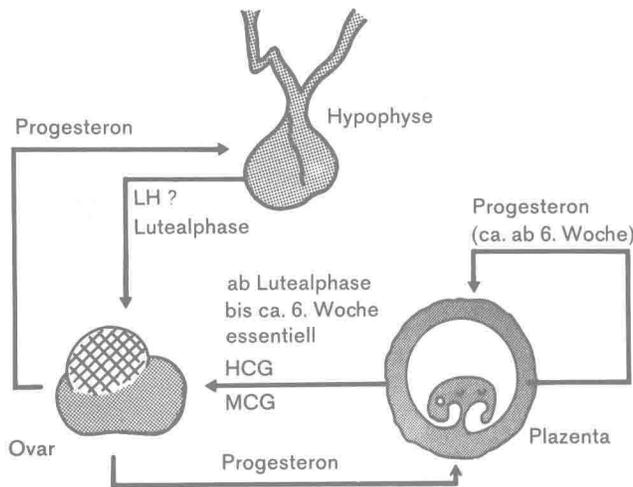


Abb. 4. Luteotroper Komplex bei Mensch und Affe

zum Ende der 3. Schwangerschaftswoche über eine Luteolyse abortiv (ARSLAN 1970). Zu diesem Zeitpunkt strebt beim Rhesusaffen die Choriongonadotropinproduktion einem Maximum zu (HOBSON 1970). Tage später ist der Zeitpunkt erreicht, wo das Corpus luteum bei dieser Spezies für die Erhaltung der Gravidität überhaupt entbehrlich ist (HARTMAN 1941; HARTMAN u. CORNER 1947).

Bei der Ratte wurde schon in früheren Arbeiten (ASTWOOD 1941, DESCLIN 1949) festgestellt, daß Prolaktin das luteotrope Hormon (LTH) ist und bei intakten Tieren den Diöstrus verlängert. Werden Hypophysen der Sella entnommen und an andere Körperstellen implantiert, so bleiben die Corpora lutea unter der dann erfolgenden Prolaktinausschüttung bis zur vielfachen Dauer einer Gravidität aktiv (EVERETT 1956, QUILLIGAN u. ROTHCHILD 1960).

Der bestehende Diöstrus ist durch Östrogene nicht zu durchbrechen (QUILLIGAN u. ROTHCHILD 1960, ROTHCHILD 1965). Es hat sich herausgestellt, daß Prolaktin