

Geppert (1975) - Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Östradiol-17 β , Östradiol-Benzooat, Östradiol-Valerianat und Östradiol-Undezylat bei der Frau: Der Verlauf der Konzentrationen von Östradiol-17 β , Östron, LH und FSH im Serum [Studies on the Pharmacokinetics of Estradiol-17 β , Estradiol Benzoate, Estradiol Valerate, and Estradiol Undecylate in Women: The Course of the Relationships Between Estradiol-17 β , Estrone, LH, and FSH in Serum]

Citation

- Geppert, G. (1975). *Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Östradiol-17 β , Östradiol-Benzooat, Östradiol-Valerianat und Östradiol-Undezylat bei der Frau: Der Verlauf der Konzentrationen von Östradiol-17 β , Östron, LH und FSH im Serum. [Studies on the Pharmacokinetics of Estradiol-17 β , Estradiol Benzoate, Estradiol Valerate, and Estradiol Undecylate in Women: The Course of the Relationships Between Estradiol-17 β , Estrone, LH, and FSH in Serum.]* Bonn: Universität Bonn. [Doctoral dissertation] [34 pages] [[Google Scholar](#)] [[Google Books](#)] [[WorldCat](#)] [[PDF](#)]

English Translated

INVESTIGATIONS ON THE PHARMACOKINETICS OF ESTRADIOL-17 β , ESTRADIOL-BENZOATE, ESTRADIOL-VALERATE, AND ESTRADIOL-UNDECYLATE IN WOMEN: THE COURSE OF THE CONCENTRATIONS OF ESTRADIOL-17 β , LH, AND FSH

Inaugural — Dissertation
for
Obtaining a doctorate
of the
High Medical Faculty
of the
Rhenish Friedrich Wilhelms University
of
BONN

presented by
Gerhard Geppert
from
Klostermoor, Krs. Leer/Ostfr.

BONN 1975

Made with the permission of
Medical Faculty of the University of Bonn

1st reviewer: Prof. Dr. W. cam
2nd reviewer: Priv. Dr. J. Breuer

From the University Women's Clinic, Bonn-Venusberg
Director: Prof. Dr. E. J. Plotz,
Department of Gynecological Endocrinology.
Head: Prof. Dr. W. cam

Printing: V + V Sofortdruck GmbH & Co. KG - 5300 BONN

My dear parents
My dear Cordula

Contents

Introduction

Materials and Methods

A. Materials

B. Methods

I. Gonadotropin Determination in Plasma

a) Gonadotropin Preparations and Antisera

b) FSH Preparations and Antisera

c) LH Preparations and Antisera

d) Standard preparations

e) Radioactive Labeling with Iodine¹²⁵ and Iodine¹³¹, Purification of the Iodinated Hormone

II. Determination of Steroids in Plasma

a) Principle of the Method

b) Extraction

c) Partition Chromatography on Kieselguhr Columns

d) Antisera

e) End-point Determination

Results

Discussion

Summary

Tables

Figures

INTRODUCTION

The use of steroid esters has made it possible to prolong the effect of therapeutically administered steroid hormones. The duration of action of depot estrogens has been determined in earlier studies indirectly by vaginal cytology (WIED, 1954) and directly by measuring the estrogen excretion in the urine (KAISER, 1961) and additionally by measuring the estrogen concentration in the blood (ITTRICH and POTS, 1965).

The introduction of radioimmunological measuring methods for gonadotropins and steroids in serum now enables serial determinations of these hormones in the blood over a longer period of time without major annoyance for the patient.

In view of the widespread therapeutic use of estradiol esters, a study of their pharmacokinetics using these methods appeared to us to be desirable. The aim of the work was therefore to follow the course of the concentrations of estradiol-17 β and estrone in the serum after administration of different estradiol esters. The simultaneous measurement of serum gonadotropins was seen as another valuable parameter for assessing and comparing the various depot estrogens.

MATERIALS and METHODS

A. Materials

12 women aged 42-61 made themselves available as test subjects. Vaginal or abdominal hysterectomies with or without ovariectomy had been performed 8-14 days before the start of the experiment. Non-ovariectomized women were in postmenopause for at least two years,

All 12 women were in inpatient treatment. Steroid hormones and centrally sedating drugs were not administered during the ongoing examinations or the week prior to the examinations. (Tables 1a - 1d)

Three women each received equimolar doses of estradiol-17 β , estradiol benzoate, estradiol valerate, and estradiol undecylate in parenteral application form: estradiol-17 β (20.0 mg) was dissolved in 4 mL propylene glycol and 50 mL 20% human albumin and was administered intravenously in the form of a short infusion. Estradiol benzoate (27.6 mg), estradiol valerate (26.2 mg), and estradiol undecylate (32.2 mg) were injected intragluteally in 4 mL of an oily solution.

Blood samples were taken daily at 9 a.m., in the case of the administration of estradiol-17 β and estradiol benzoate also at 6 p.m. on the day of the injection and on the following day. The injection of estradiol-17 β and its esters took place on the fourth day following the blood sample at 9 o'clock. After shedding, the samples were stored at -20 °C until processing.

B. Methods

I. Gonadotropin Determination in Plasma

Until a few years ago, gonadotropins could only be determined using biological methods, but today it is possible to use radioimmunological methods to determine the concentrations, by presenting them in pure

form from the human pituitary gland and from the urine of postmenopausal women, as well as by obtaining specific antisera these hormones can be determined in the plasma.

The radioimmunological gonadotropin determination is based on the competitive displacement of a radioactively labeled hormone from a specific antibody by a non-radioactively labeled hormone in the form of a standard preparation or a hormone to be determined in the serum sample.

The radioactively labeled hormone is incubated together with an antiserum directed against this hormone. Both react with each other and form hormone-antibody complexes. By diluting the antiserum it can be achieved that only a certain percentage of the labeled hormone is bound. By adding unlabelled hormone, part of the labeled hormone is displaced from its antibody binding and replaced by unlabelled hormone. This results in a decrease in the bound activity.

A standard curve can be made from a series of incubations. It is obtained by plotting the concentration of the sample on the abscissa against the bound activity on the ordinate. The hormone concentration in an unknown plasma sample results from the standard value (abscissa), which corresponds to the bound activity found.

a) Gonadotropin Preparations and Antisera

Gonadotropin preparations and antisera were made available or purchased (Istituto Serono, Rome) by the National Institute of Health (Bethesda, Md., USA) and the Medical Research Council (London).

b) FSH Preparations and Antisera

Used for radiolabelling: LER 1366 (NIH; 3014 IU FSH and 213 IU LH mg: biologically determined). The FSH antisera batch 1 and batch 3, NIH, were used in a working dilution of 1:3000.

c) LH Preparations and Antisera

LER 960 (NIH; 923 IU and 1.9 IU FSH mg, biologically determined) was radioactively labeled. Working dilution of Anti-LH 1 (NIH): 1:10000 to 1:20000.

d) Standard Preparations

LER 907 (NIH), a coarse pituitary extract and 2nd IRP-HMG, a gonadotropin preparation made from postmenopausal urine. LER 907 contains 40 IU LH and 20 IU FSH/mg based on 2nd IRP-HMG. The biological activity of the 2nd IRP-HMG has been set at 40 IU FSH and LH per ampoule.

e) Radioactive Labeling with Iodine¹²⁵ and Iodine¹³¹, Purification of the Iodinated Hormone

Two mg of the highly purified gonadotropin preparation are dissolved in 20 μ L of a solution of MPO_4 and 0.1 M NaCl. 20 μ L of phosphate buffer (0.5 M, pH 7.5) and 2 mCi J^{131} or J^{125} are added by pipette. To oxidize the hormone, 20 μ L of a chloramine T solution (3.5 mg/mL) are added to the iodination vessel. After 20 seconds, the reaction is terminated by adding 100 μ L of sodium metabisulfite solution (2.4 mg/mL). Sodium metabisulfite reduces iodine to iodite and thus prevents the reaction from proceeding.

With the help of adsorption chromatography on cellulose columns, the iodinated hormone is separated from the fragments of the hormone damaged by iodination and from the free iodine. The iodinated

hormone is eluted from the cellulose column by 5% bovine serum albumin (w/v) and 20% acetone (v/v) in 0.05 M phosphate buffer (LEYENDECKER et al., 1971b).

To determine the activity, the radioactivity is measured in 50 μ L of the reaction mixture before the chromatography. After adding 50 μ L of bovine plasma, the total protein is precipitated by adding 2 mL of 100% dioxane and the radioactivity of the precipitate is measured. Subtracting the total radioactivity gives the percentage of the proportion of radioiodine that has passed into the hormone. This allows the specific activity in mCi radioiodine/ μ g hormone to be calculated. The radioactively labeled hormone is diluted with albumin buffer (0.01% albumin in 0.05 M phosphate buffer) to such an extent that 200 μ L contains about 10,000 decay products per minute.

Incubation takes place for 72 hours at 4 °C. After incubation, 2.4 mL of a 66% freshly prepared dioxane solution are added to each tube to precipitate the hormone-antibody complex (LEYENDECKER et al., 1971b, THOMAS and FERIN, 1968).

After centrifugation at 4000 rpm for 30 minutes, the supernatant is pipetted off and the activity of the precipitates is determined in the autogamma spectrometer.

The amount of hormone corresponding to the activity is read from the standard curve.

II. Determination of Steroids in Plasma

a) Principle of the Method

The principle corresponds to the gonadotropin determination method, the measurement of the steroid concentration in the plasma is also carried out by radioimmunological measurements. Antisera against the steroid hormones are obtained from sheep and rabbits (LEYENDECKER et al., 1975).

However, in contrast to the LH and FSH determination, the determination of the steroids cannot be carried out directly in the plasma. Cross-reacting steroids require extraction of the plasma and chromatographic separation of the steroids from one another.

b) Extraction

The plasma samples (1-3 mL) are shaken twice with 3 mL diethyl ether each for one minute after adding an internal standard (known amount of a radioactively labeled steroid for calculating methodological losses during work-up). The combined ether extracts are evaporated to dryness under nitrogen.

c) Partition Chromatography on Kieselguhr Columns

Chromosorb W/AW (Merck, Darmstadt) is mixed with ethylene glycol as the stationary phase (4 + 3; weight and volume). In each case 2 g of the mixture are stuffed into chromatography columns (pipettes 320 \times 7.5 mm, inner diameter 6 mm) with a glass rod, so that a column height of about 12 cm results. The columns are washed once with 10 mL of 40% ethyl acetate in iso-octane and twice with 4 mL of iso-octane. The dry residues of the combined ether extracts are brought onto the column in succession with twice 0.5 mL of 5% ethyl acetate in iso-octane. The running off solvent is discarded.

The columns are eluted as follows:

1. 4 mL iso-octane (progesterone fraction, contains cholesterol)
2. 1 mL iso-octane (contains small amounts of progesterone and androstenedione)
3. 5 mL iso-octane (androstenedione fraction, contains pregnenolone)
4. 10 mL of 5% ethyl acetate in iso-octane, (20- α -di-hydroprogesterone fraction, contains 5- α -dihydrotestosterone)
5. 10 mL of 15% ethyl acetate in iso-octane (17- α -OHP fraction, contains testosterone, estrone, and 11-deoxycorticosterone)
6. 10 mL of 40% ethyl acetate in iso-octane, (estradiol fraction, contains 17 α -hydroxypregnenolone, corticosterone, and 11-deoxycortisol)

Fractions 1 - 4 are discarded, since only estrone and estradiol are to be determined.

d) Antisera

The following antisera were used for radioimmunological endpoint determination:

Anti-E was obtained by immunizing sheep with estradiol-17 β -hemisuccinate-albumin conjugate and used in a working dilution of 1:50,000.

Anti-E was obtained by immunizing sheep and used at a working dilution of 1:100,000. (S-52/8, 1:100,000).

e) End-Point Determination

The dry residue of the corresponding steroid fraction is collected in extraction tubes and brought to dryness in a water bath at 40 °C. under a stream of nitrogen. The dry residue is dissolved in 1 mL of ethanol. 0.2 mL portions of this are pipetted as duplicates into incubation tubes and evaporated. The remaining 0.6 mL are also evaporated and are used to calculate methodological losses. 0.5 mL of gamma globulin protection (LEYENDECKER et al., 1972), 30-120 pg of the H3-labeled steroid, and 0.1 mL of the corresponding antiserum dilution are pipetted into each tube. The tubes are shaken for about 15 seconds on a vortex mixer and incubated at 4 °C. overnight. A standard curve is made using the same procedure (LEYENDECKER et al., 1975).

The separation of free hormone and hormone bound to antibodies is carried out with dextran-coated activated charcoal. 20 mL of a suspension of activated charcoal in phosphate buffer (Merck, Darmstadt, 5 g/100 mL) with the addition of 1 g/100 mL Dextran T 70 (Pharmacia Uppsala) are pipetted into each tube. After brief shaking, the tubes are placed in an ice bath for 15 min, then centrifuged for 10 min at 3000 rpm in a refrigerated centrifuge. 0.5 mL of the supernatant are pipetted into Tri-Carb vessels. The radioactivity is measured after adding 10 mL of scintillation solution in a liquid scintillation spectrometer.

RESULTS

Estradiol:

The mean concentration of estradiol-17 β in the serum before the hormone administration was 45.1 pg/mL with a range of 7-104 pg/mL. Nine hours after i.v. administration of 20 mg estradiol increased the serum concentration to almost 3.0 ng/mL. Twenty-four hours later, the values had fallen back into the range of physiological concentrations and had returned to the initial values 48 hours after the administration. (Fig. 1)

The rise in serum estradiol-17 β was also rapid after i.m. administration of 27.6 mg estradiol benzoate in an oily solution. Nine hours after the injection, more than 2.0 ng/mL was measured. A maximum value of 2.1 ng/mL was reached 24 hours after administration. The subsequent gradual decline extended over more than nine days.

The increase in serum concentrations of estradiol-17 β was slower after administration of 26.2 mg of estradiol valerate. A maximum of 1.6 ng/mL was reached within 48 hours after the injection. The subsequent decrease in the estradiol concentration in the serum was largely parallel to that after the injection of estradiol benzoate.

After i.m. injection of 32.2 mg of estradiol undecylate, concentrations of estradiol-17 β in serum were achieved which did not exceed the range of physiological concentrations during the menstrual cycle.

Estrone:

The serum concentration of estrone before the hormone administration was on average 56.6 pg/mL with a range of 8-248 pg/mL. The concentration profiles of estrone in the serum after administration of estradiol-17 β and its esters were similar to those of estradiol-17 β but flatter and appeared shifted by hours or position. The maximum of the estrone concentration in the serum was reached 72 hours after administration of estradiol benzoate and 96 hours after administration of estradiol valerate. The behavior of the estrone concentration shows more clearly the stronger "depot effect" of estradiol valerate compared to estradiol benzoate than the course of the estradiol values in the serum.

Gonadotropins (Fig. 2):

The mean serum concentration of LH was 53.7 mIE/mL with a range of 9-128 mIE/mL and the FSH was 80.2 mIE/mL with a range of 28-190 mIE/mL before administration of estradiol-17 β and its esters. During the brief increase in estradiol-17 β in serum after i.v. administration of free estradiol, a significant decrease in the LH and FSH values resulted, which, however, did not drop to the level during the menstrual cycle. After application of the esters, the increased serum concentration of the gonadotropins fell into the range of values during the menstrual cycle. This decrease occurred more slowly after administration of estradiol undecylate, corresponding to the protracted rise in estradiol-17 β in the serum. After an initially almost parallel decrease in LH and FSH, in the later course of the concentrations in the serum after administration of estradiol-17 β there was an earlier increase in LH than FSH and after administration of the ester only an increase in LH during the observation period. This can be seen in the graphic representation (Fig. 2) by crossing the concentration curves of LH and FSH.

DISCUSSION

The course of the concentration of estradiol-17 β in the serum after administration of estradiol esters in an oily solution is the result of various processes, the significance of which is difficult to assess in detail. The following factors need to be discussed:

- a) The fine distribution of the depot and its length of stay within the muscles.
- b) The lipid solubility of the ester in the oily depot.
- c) The solubility in a secondary depot (adipose tissue).
- d) The rate of ester cleavage.
- e) The metabolism and excretion of the free steroid.

With a comparable primary depot (4 mL oily solution; in the application) and comparable metabolism and excretion of the free steroid, the differences in the concentration curves of estradiol-17 β in the serum can be attributed to different affinities of the esters to the primary and possibly secondary depot and to different rapid ester cleavage rates.

In studies by SCHENK and JUNKMANN (1955), the rate of ester cleavage during chemical hydrolysis decreased with increasing chain length of the carboxylic acid.

DIRSCHERL et al. (1954) believed they could show that the enzymatic ester cleavage in the above-mentioned sense was also influenced by the chain length of the carboxylic acid. These in vitro findings seem to explain the observation in humans, according to which long-chain estradiol esters have a longer biological effect than short-chain ones (WIED, 1954).

BELLMANN et al. (1973, 1974), on the other hand, showed that long-chain steroid esters are broken down more quickly in adipose tissue than short-chain esters, and that long-chain and short-chain steroid esters are split in liver tissue at the same rate. DIRSCHERL et al. (1954) carried out their investigations with crystal suspensions, while BELLMANN et al. (1973, 1974) worked with real solutions of radioactively labeled esters. It is therefore very likely that solubility factors caused the discrepancy in the results. In the case of rapid ester cleavage in both adipose and liver tissue in vitro, BELLMANN et al. (1975, 1974) see the cause of the depot effect of long-chain steroid esters in vivo in the fact that the lipophilic ester within the fat droplets of the primary and secondary depot is less accessible for cleavage to lipases and unspecific esterases.

The course of the concentrations of FSH and LH in the serum shows that even a short-term but very significant increase in plasma estrogens after i.v. administration of estradiol-17 β leads to negative feedback on the pituitary gonadotropin secretion. The immediate effect on the gonadotropin concentration with a rapid increase in estradiol-17 β in the serum and the slow decrease in gonadotropins with a flat increase in estradiol-17 β (after administration of estradiol undecylate) illustrate the dose-response relationships within the negative feedback mechanism between estradiol and serum gonadotropin concentration. In agreement with the results of VANDE WIELE et al. (1970), the negative feedback above a certain estradiol concentration in the serum cannot be increased by a further increase. Based on the results of the investigations with estradiol undecylate, the maximum negative feedback of estrogens on gonadotropin secretion is likely to be in the range of physiological estradiol concentrations.

After ovariectomy at a sexually mature age, CZYGAN and MARUHN (1972) found a faster increase in FSH than in LH. The faster increase in LH observed in our own series of studies after loosening the negative feedback due to falling estrogens (especially after administration of estradiol-17 β i.v.) can be attributed to positive feedback effects of the administration of estradiol on the pituitary LH secretion. The

course of the LH concentrations in the serum is therefore the result of a superposition of negative and positive feedbacks on the LH secretion.

Summary

Estradiol-17 β , estradiol benzoate, estradiol valerate, and estradiol undecylate were injected parenterally into postmenopausal women and castrated women in an equimolar dose based on 20 mg estradiol-17 β .

With the present study, the concentrations of estradiol-17 β and estrone in the serum after administration of estradiol-17 β and estradiol esters were measured radioimmunologically and compared with one another for the first time.

The findings confirm earlier results on the different "depot effect" of the esters examined.

The results presented allow a more differentiated therapeutic application of the esters in terms of choice and dosage.

[Tabellen]

Table 1a: Administration of estradiol i.v.

Patient	B. K.	B. G.	M. E.
Alter (Geb.Dat.)	15.3.22	11. 3. 12	5.8.22
Menopause	11.1.73	1964	30.1.73
Tag der Operation	2.2.73	8. 2, 73	12.2.73
Art der Operation	vaginale Hys- terektomie, Adnexektomie	vaginale Hys- terektomie	Lap-TE Adnexektomie
Beginn der Blutentnahme	13.2.73 09.00 Uhr	20. 2. 73 09.00 Uhr	20. 2. 73 09.00 Uhr
Tag der Injektion	16. 2. 73 09.00 Uhr	23. 2. 73 09.00 Uhr	23. 2. 73 09.00 Uhr
Injektion	20 mg Östradiol i.v.	20 mg Östradiol i.v.	20 mg Östradiol i.v.
Letzter Tag der Blutent- nahme	23.2.73 09.00 Uhr	2. 3. 73 09.00 Uhr	2. 3. 73 09.00 Uhr

Table 1b: Administration of estradiol benzoate i.m.

Patient	B. E.	S. A.	W. A.
Alter (Geb.Dat.)	7. 4.13	15. 9.26	3. 4.17
Menopause	1960	8. 2.73	Jan. 71
Tag der Operation	15. 2.73	16. 2.73	26.2.73
Art der Operation	vaginale TE	Lap-TE Adnexektomie	Lap-TE Adnexektomie
Beginn der Blutentnahme	25. 2.73 09.00 Uhr	24. 2.73 09.00 Uhr	6. 3.73 09.00 Uhr
Tag der Injektion	28. 2.73 09.00 Uhr	27.2.73 09.00 Uhr	9.3.73 09.00 Uhr
Injektion	27,6 mg Östradiol- Benzoat i. m.	27,6 mg Östradiol- Benzoat i.m.	27,6 mg Östradiol- Benzoat i.m.
Letzter Tag der Blut- entnahme	9. 3.73 09.00 Uhr	6. 3. 73 09.00 Uhr	23. 3. 73 09.00 Uhr

Table 1c: Administration of estradiol valerate i.m.

Patient	D. I.	S. K.	S. G.
Alter (Geb.Dat.)	16. 2.15	17. 3.15	23. 7.14
Menopause	1963		1971
Tag der Operation	12. 3.73	2. 3.73	6. 3.73
Art der Operation	Lap-TE Adnexektomie	vaginale Hys- terektomie Adnexektomie	vaginale Hys- terektomie Adnexektomie
Beginn der Blutentnahme	6. 3.73 09.00 Uhr	10. 3. 73 09.00 Uhr	16. 3. 73 09.00 Uhr
Tag der Injektion	23. 3.73 09.00 Uhr	13. 3.73 09.00 Uhr	18. 3. 73 09.00 Uhr
Injektion	26,2 mg Östradiol- Valerianat i.m.	26,2 mg Östradiol-Va- lerianat	26,2 mg Östradiol-Va- lerianat
Letzter Tag der Blut- entnahme	14. 4.73 09.00 Uhr	23. 3. 73 09.00 Uhr	7. 4. 73 09.00 Uhr

Table 1d: Administration of estradiol undecylate i.m.

Patient	Sch. M.	P. G.	Sch. G.
Alter (Geb.Dat.)	10. 7. 20	28. 1. 20	10.11.31
Menopause	12. 3. 73	7/71	27. 2.73
Tag der Operation	22. 3. 73	26. 3. 73	2. 4.73
Art der Operation	abdominale Hysterektomie, Adnexektomie	vaginale Hysterektomie	Lap-TE Adnexektomie
Beginn der Blutentnahme	8. 3.73 09.00 Uhr	3. 4. 73 09.00 Uhr	10. 4. 73 09.00 Uhr
Tag der Injektion	1. 4. 73 09.00 Uhr	5. 4. 73 09.00 Uhr	13. 4. 73 09.00 Uhr
Injektion	32,3 mg Östradiol- Undecylat i.m.	32,3 mg Östradiol- Undecylat i.m.	32,3 mg Östradiol- Undecylat i.m.
Letzter Tag der Blutent- nahme	28. 4. 73 09.00 Uhr	17. 4. 73 09.00 Uhr	28. 4. 73 09.00 Uhr

	Tag	Kontrolle				20 mg E ₂ i.v. (Tag 4, 0900 Uhr)							
		1	2	3	4	4	5	6	7	8	9	10	11
B.K.	E ₂ (pg/ml)	77	56	30	36	2378	311	64	57	34	81	21	41
	E ₁ (pg/ml)	46		27	41	3879	711	67	100	30	49	17	5
	LH(mIU/ml)	89	111	128	160	71	74	114	160	113	119	135	135
	FSH(mIU/ml)	102	89	120	82	61	49	60	62	68	77	86	113
B.G.	E ₂ (pg/ml)	47	35	30	7	2258	504	141	90	58	39	41	42
	E ₁ (pg/ml)	15	11	22	16	2655	2208	409	152	54	39	69	61
	LH(mIU/ml)	64	63	78	63	31	43	49	38	74	75	90	53
	FSH(mIU/ml)	130	84	110	89	81	80	46	46	85	79	165	89
M.E.	E ₂ (pg/ml)	14	104	32	28	4212	451	54	36	29	33	26	20
	E ₁ (pg/ml)	41	106	29	9	1480	291	131	47	19	18	5	
	LH(mIU/ml)	25	27	24	53	32	30	38	55	34	53	70	59
	FSH(mIU/ml)	34	44	46	108	53	34	28	20	28	50	87	92
Mittel- werte	E ₂ (pg/ml)	46	65	33	24	2949	422	86	61	40	51	29	34
	E ₁ (pg/ml)	34	39	26	22	2671	1090	202	100	34	34	30	22
	LH(mIU/ml)	59	67	77	92	45	49	67	84	74	82	98	82
	FSH(mIU/ml)	88	71	92	93	65	54	45	43	60	69	113	98

Table 2: Individual values and mean values after parenteral administration of estradiol-17 β i.v. The serum concentrations of E₁ and E₂ (pg/mL) and LH and FSH (mIU/mL).

		Kontrolle				27,6 mg E ₂ -Benzoat i.m. (Tag 4, 09.00 Uhr)									
	Tag	1	2	3	4	4	5	5	6	7	8	9	10	11	12
S.A.	E ₂	100	44	128	60	1873		1280	609	560	401	354	349		
	E ₁	27	40	248	8			372	699	338	208	181			
	LH	31	40	46	63	20	18	15		17	31	48	29	39	
	FSH	73	115	123	190	86	40	32		20	20	21	20	20	
B.E.	E ₂	89	65	46	88	2156	2201	2007	2350	1495	1183	1156	837	657	458
	E ₁	116	83	83	107	965	986	1321	1235	964	1020	814	628	397	243
	LH	52	55	45	43	24	22	16	15	16	19	16		23	40
	FSH	88	100	91	88	85	56	38	30	21	19	16		11	12
W.H.	E ₂	25	29	43	28		2092		2020	2004	1673	1645	1319	1055	644
	E ₁	52	60	142	49		368		629	777	713	763	604	657	456
	LH	13	13	9	20		10		7	9	5	11	8	60	20
	FSH	35	28	42	65		27		21	16	12	15	16	34	21
Mittelwerte	E ₂	71	46	72	58	2015	2147	1679	1659	1353	1105	1051	835	856	551
	E ₁	65	49	157	54				745	813	690	595	471		
	LH	32	36	33	42	22	17	16	11	14	18	21	19	41	30
	FSH	65	81	85	114	86	41	35	26	19	17	17	18	22	17

Table 3: Individual values and mean values after parenteral administration of estradiol benzoate i.m. The serum concentrations of E1 and E2 (pg/mL) and LH and FSH (mIU/mL).

		Kontrolle				26,2 mg E ₂ -Valerianat i.m. (Tag 4, 09.00 Uhr)										
	Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
S.G.	E ₂	21	16	16	20	764	1163	1003	721	1176	639	753	632	485	884	
	E ₁	46	40	39	62	302	514	894	724	992	1132	992	518	459	371	
	LH	40	39	37	37	23	25	25	28	32	33	39	44	40	18	
	FSH	46	53	52	52	31	24	18	19	18	21	13	15	12	13	
S.K.	E ₂	40	7	24	11	1323	2456	1729	1681	1477	1512	1271	698	629	509	
	E ₁	69	92	66	20	340	760	1006	1155	523	862	558	508	347		
	LH	67	75	74	84	26	30	38	45	50	42	55	24	19	46	
	FSH	90		112	110	41	33	24	18	22	20	19	14	15	15	
D.I.	E ₂	138	34	42	48	882	1180	1202	1616	905	942	495	343	483	586	431
	E ₁		38	33	84	152	369	384	589	349	248	443	491	367	351	322
	LH	43	28	40	44	12	10	14	12	51	41	9	40	65	31	26
	FSH	78	60	73	84	27	17	21	10	15	18	12	15	12	14	6
Mittelwerte	E ₂	31	19	27	26	989	1599	1311	1339	1186	1031	839	557	532	659	
	E ₁	58	56	46	55	204	547	761	822	621	747	664	522	444	356	
	LH	50	47	50	55	20	22	25	28	44	38	34	36	41	31	
	FSH	71	68	79	82	33	24	21	15	18	19	14	15	13	14	

Table 4: Individual values and mean values after parenteral administration of estradiol valerate i.m. The serum concentrations of E1 and E2 (pg/mL) and LH and FSH (mIU/mL).

		Kontrolle				32,3 mg E ₂ -Undecylat i.m. (Tag 4, 09.00 Uhr)											
		Tag 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
F.G.	E ₂	64	69	78	44	173	210	108	149	94	132	120	166	179			115
	E ₁	80	101	74	72	210	282	145	178	177	161	186	68	167			183
	LH	49	56	55	47	73	40	22	38	21	21	28	42	45	33	44	30
	FSH	72	62	67	82	88	69	44	42	35	29	26	21	25	19	20	18
Sch.G.	E ₂	53	45	42	30	126	170	247	253	283	206						273
	E ₁	74	104	43	66	120	116	148	211	129	177						35
	LH	43	38	49	55	50	35	24	20	16	13						19
	FSH	63	71	80	89	64	48	30	21	19	15						38
Sch.M.	E ₂	39	68	56	28	67	131	793	244	124	58	172	69	146	138		
	E ₁	66	16	42	8	18	263	297	109	91	132	154	165	133	116		
	LH	64	64	64	65	78	82	52	56	45	51	31	40	30	40		
	FSH	88	64	69	80	106	67	61	52	40	29	30	28	23	25		
Mittelwerte	E ₂	52	60	58	34	122	170	382	215	167	132	146	118	163			194
	E ₁	70	73	53	48	116	220	196	166	132	156	170	117	150			109
	LH	52	53	59	55	67	52	32	38	27	28	30	41	38	37		25
	FSH	74	65	72	83	86	61	45	38	31	24	28	25	24	22		28

Table 5: Individual values and mean values after parenteral administration of estradiol undecylate i.m. The serum concentrations of E1 and E2 (pg/mL) and LH and FSH (mIU/mL).

[Abbildungen]

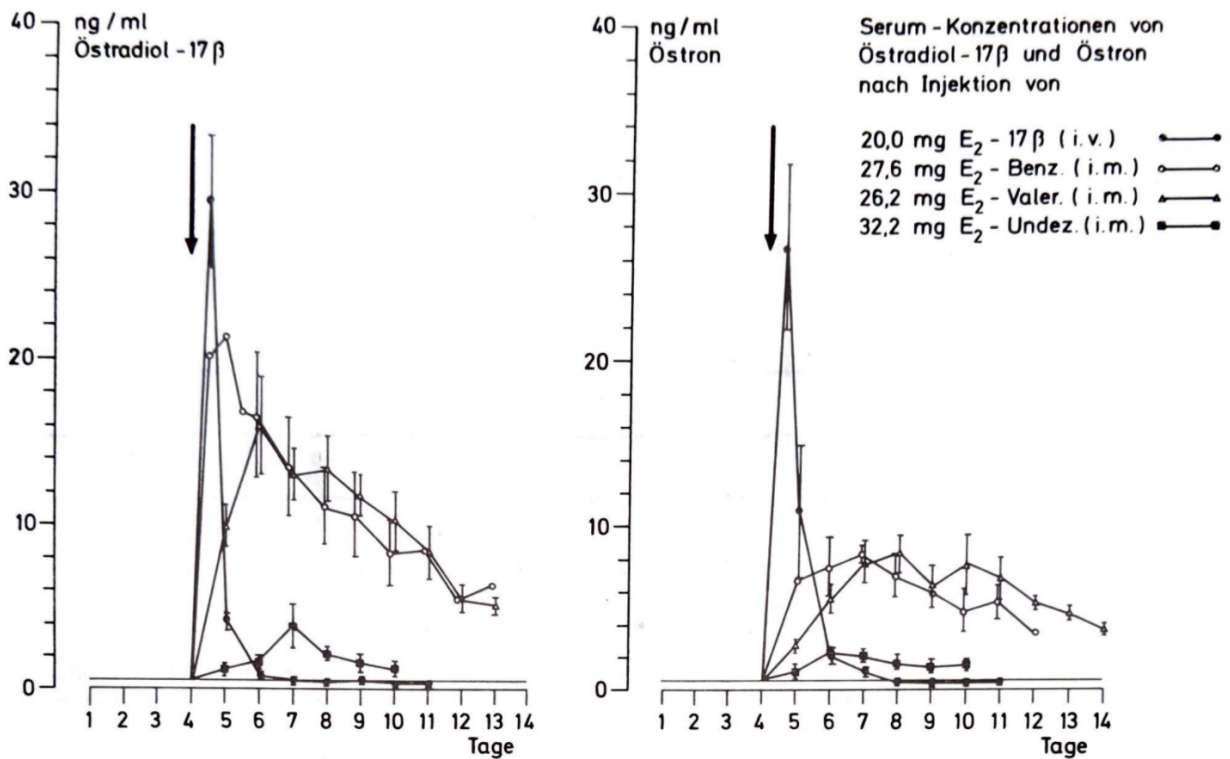


Fig. 1: The serum concentrations of estradiol-17β and estrone after parenteral administration of estradiol-17β, estradiol benzoate, estradiol valerate, and estradiol undecylate. Mean values ± SEM. The line parallel to the abscissa marks the initial concentrations.

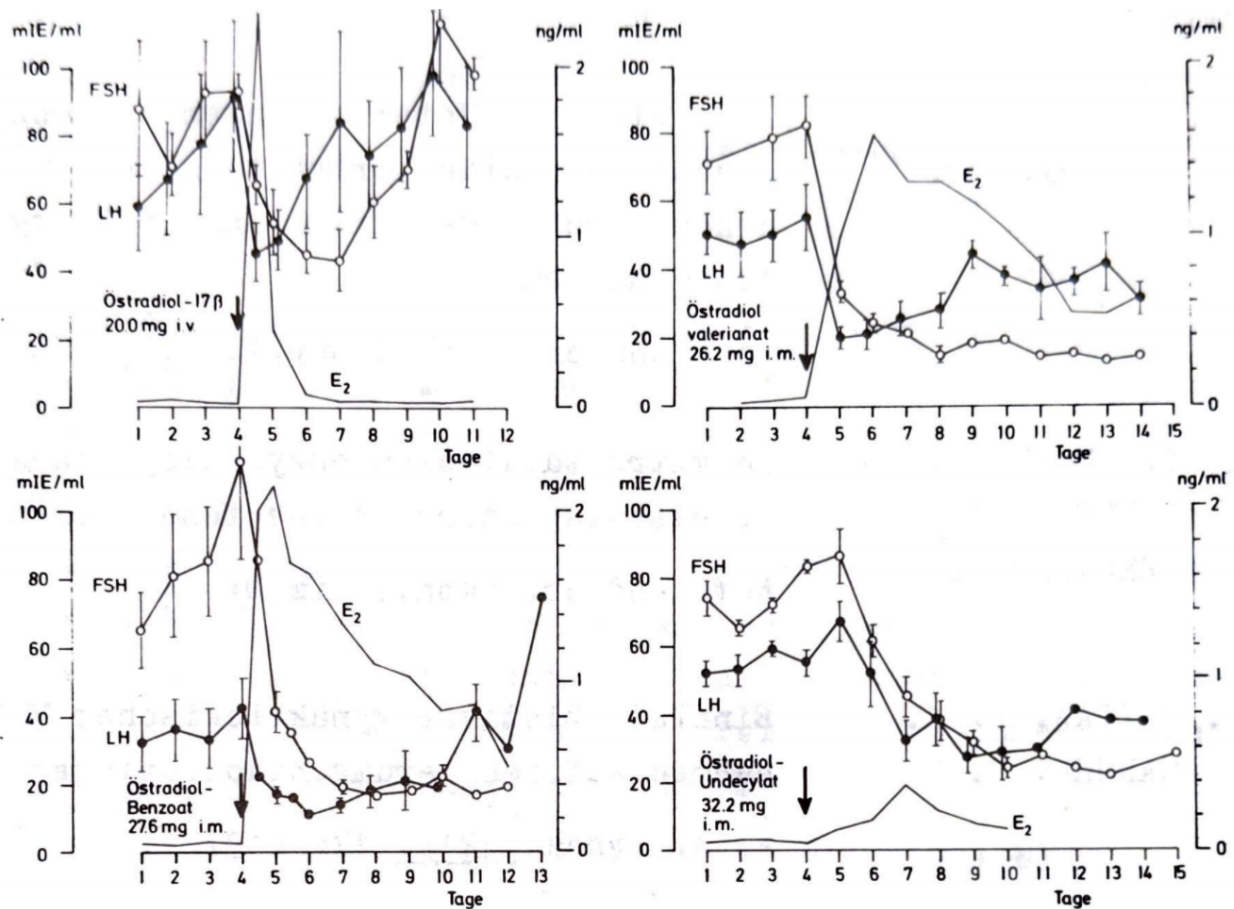


Fig. 2: The concentration profiles of LH and FSH as well as estradiol-17 β before and after parenteral administration of estradiol-17 β , estradiol benzoate, estradiol valerate, and estradiol undecylate. Mean + SEM.

LITERATURE:

1. BELLMANN, O., GERHARDS, E. Vergleichende Untersuchungen zur enzymatischen Steroidesterspaltung in verschiedenen Geweben der Ratte und im Fettgewebe des Menschen. Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 173, 138 (1973).
2. BELLMANN, O., DUHME, H. J., GERHARDS, E. In vitro studies on enzymatic cleavage of steroid esters in the female organ. Acta endocr. (Kbh.) im Druck.
3. CZYGAN, P. J., MARUHN, G. Einfluß ablativer gynäkologischer Maßnahmen auf den Serumgonadotropingehalt. Arch. Gynak. 212, 176 (1972).
4. DIRSCHERL, W., DARDENNE, U. Spaltung von Steroidhormonestern durch menschliche und tierische Organe. Biochem. Z. 325, 195 (1954).
5. ITTRICH, G., POTS, P. Östrogenbestimmungen in Blut und Urin nach Verabreichung von Östrogenen. Abhandlungen der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Klasse für Medizin 1, 53 (1965).

6. KAISER, R. Die Östrogenausscheidung im Cyclus und nach Injektion von Ostradiolestern. Geburtsh. u. Frauenhk. 21, 868 (1961).
7. KORENMAN, S. G., TULCHINSKY, D., EATON, L. W. Radioligand procedures for estrogen assay in normal und pregnancy plasma. Acta endocr. (Kbh) Suppl. 147, 291 (1970).
8. LEYENDECKER, G., SAUNDERS, D. M., Saxena, B. B. Further improvements in the radioimmunoassay of human pituitary follicle stimulating hormone (FSH). Klin. Wschr. 49, 658 (1971 a).
9. LEYENDECKER, G., SCHNEIDER, K., NOCKE, W. FSH und LH im Plasma während des menschlichen Cyclus. Radioimmunologische Bestimmungen unter Anwendung der Dioxantrennung von freien und gebundenem markierten Antigen. Arch. Gynäk. 211, 213 (1971 b).
10. LEYENDECKER, G., WARDLAW, S., NOCKE, W. Gamma globulin protection of radioimmunoassay and competitive protein binding saturation analysis of steroids. J. clin. Endocrin. Metab. 34, 430 (1972).
11. LEYENDECKER, G., WARDLAW, S., NOCKE, W. Radioimmunologische Bestimmung von 17-Hydroxyprogesteron im Serum, in: BREUER, H., HAMEL, D., KRÜSKEMPER, H.L. (Hrsg.): Methoden der Hormonbestimmung S. 230, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1975.
12. SCHENK, M., JUNKMANN, K. Über protrahiert wirksame Androgene. Arch. exper. Path. Pharmacol. 227, 210 (1955).
13. STROTT, C. A., LIPSETT, M. B. Measurement of 17-hydroxyprogesterone in human plasma. J. clin. Endocr. 28, 1426 (1968).
14. THOMAS, K., FERIN, J. A new rapid radioimmunoassay for HCG (LH, ICSH) in plasma using dioxan. J. clin. Endocrin. Metab. 28, 1667 (1968).
15. WIED, G. L. Östradiol-valerianat und Östradiol-undecylat, zwei neue protrahiert wirkende Östrogene. Wirkungsvergleich mit Östradiol-benzoat. Geburtsh. u. Frauenk. 14, 45 (1954).
16. VANDE WIELE, R., BOGUMIL, J., DYRENFURTH, I., FERIN, M., JEWELLEWICZ, R., WARREN, M., RIZKALLAH, T., MIKHAIL, G. Mechanisms regulating the menstrual cycle in women. Rec. Progr. Hormone Res. 26, 63 (1970).

Curriculum vitae

On September 8, 1948, I was born as the eldest son of the farmer Reinhold Geppert and his wife Hildegard, née Repsch, in Burlage, Leer/Ostfriesland.

After four years of primary school, two years of secondary school and seven years of high school

The most important rights that I had two years in the Federal Armed Forces of the BRG and the rank of lieutenant in the reserve.

In the winter semester 1969/70 I began studying dentistry at the University of Bonn, where I took my preliminary scientific examination in the 1970 summer semester and my dental exam in the 1971/72 winter semester.

In February 1975 I passed the state examination in dentistry in Bonn and obtained my license to practice medicine.

Since then I have been working as an affairs assistant in a dental practice in Meckenheim/Bonn.

Prof. Dr. W. NOCKE, head of the endocrinological department of the University Women's Clinic Bonn-Venusberg (Director: Prof. Dr. E. J. PLOTZ), I thank you for providing me with the topic and for his friendly willingness to help.

My special thanks go to Dr. G. LEYENDECKER, who, based on his knowledge and experience in the radioimmunological determination of gonadotropins and steroids, gave me many suggestions and guided and supported me in carrying out the examinations and drafting the manuscript.

I would like to thank Miss B. LEFFEK, Miss R. KLASSEN, and Mr. E. JOST for the valuable help in carrying out the investigations.

I would also like to thank my test subjects who made themselves available for the daily blood collection and thus made this work possible.

German Original

UNTERSUCHUNGEN ZUR PHARMAKOKINETIK VON ÖSTRADIOL-17 β , ÖSTRADIOL-BENZOAT,
ÖSTRADIOL-VALERIANAT UND ÖSTRADIOL-UNDEZYLAT BEI DER FRAU: DER VERLAUF DER
KONZENTRATIONEN VON ÖSTRADIOL-17 β , ÖSTRON, LH UND FSH IM SERUM

Inaugural — Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
Gerhard Geppert
aus
Klostermoor, Krs. Leer/Ostfr.

BONN 1975

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Nocke
2. Gutachter: Priv. Doz. Dr. J. Breuer

Aus der Universitäts-Frauenklinik, Bonn-Venusberg
Direktor: Prof. Dr. E. J. Plotz,
Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie.
Leiter: Prof. Dr. W. Nocke

Druck: V + V Sofortdruck GmbH & Co. KG - 5300 BONN

Meinen lieben Eltern
Meiner lieben Cordula

Inhaltsverzeichnis

- Einleitung
- Material und Methodik
 - A. Material
 - B. Methodik
 - I. Gonadotropinbestimmung im Plasma
 - a) Gonadotropinpräparate und Antiseren
 - b) FSH-Präparate und Antiseren
 - c) LH-Präparate und Antiseren
 - d) Standardpräparate
 - e) Radioaktive Markierung mit Jod^{125} und Jod^{131} , Reinigung des jodinierten Hormons.
 - II. Steroidbestimmung im Plasma
 - a) Prinzip der Methode
 - b) Extraktion
 - c) Verteilungschromatographie an Kieselgursäulen
 - d) Antiseren
 - e) Endpunktbestimmung
- Ergebnisse
- Diskussion
- Zusammenfassung
- Tabellen
- Abbildungen
- Literaturverzeichnis
- Lebenslauf

EINLEITUNG

Durch die Anwendung von Steroidestern ist es gelungen, die Wirkung von therapeutisch verabreichten Steroidhormonen zu verlängern. Die Wirkungsdauer von Depotöstrogenen ist in früheren Untersuchungen indirekt vaginalcytologisch (WIED, 1954) und direkt durch Messung der Östrogenausscheidung im Harn (KAISER, 1961) und zusätzlich durch Messung der Östrogenkonzentration im Blut erfaßt worden (ITTRICH und POTS, 1965).

Die Einführung radioimmunologischer Meßmethoden für Gonadotropine und Steroide im Serum ermöglicht heute ohne größere Belästigung des Patienten Serienbestimmungen dieser Hormone im Blut über einen längeren Zeitraum.

Angesichts der breiten therapeutischen Anwendung von Östradiolestern erschien uns eine Untersuchung über ihre Pharmakokinetik mit diesen Methoden wünschenswert. Es war daher das Ziel der Arbeit, den Verlauf der Konzentrationen von Östradiol-17 β und Östron im Serum nach Gabe verschiedener Östradiolester zu verfolgen. In der gleichzeitigen Messung der serumgonadotropine wurde ein weiterer wertvoller Parameter für Beurteilung und Vergleich der verschiedenen Depotöstrogene gesehen.

MATERIAL und METHODIK

A. Material

12 Frauen im Alter von 42-61 Jahren stellten sich als Versuchspersonen zur Verfügung. 8 - 14 Tage vor Versuchsbeginn waren vaginale oder abdominale Hysterektomien mit oder ohne Ovariektomie vorausgegangen. Nicht ovariektomierte Frauen befanden sich mindestens zwei Jahre in der Postmenopause,

Alle 12 Frauen befanden sich in stationärer Behandlung. Steroidhormone, sowie zentral sedierende Medikamente, wurden während der laufenden Untersuchungen und der den Untersuchungen vorausgehenden Woche nicht verabreicht. (Tabellen 1a - 1d)

Jeweils drei Frauen erhielten äquimolare Dosen von Östradiol-17 β , Östradiol-Benzoat, Östradiol-Valerianat und Östradiol-Undezylat in parenteraler Applikationsform: Östradiol-17 β (20,0 mg) wurde in 4 ml Propylenglykol und 50 ml 20% Humanalbumin gelöst und in Form einer Kurzinfusion intravenös verabreicht. Östradiol-Benzoat (27,6 mg), Östradiol-Valerianat (26,2 mg) und Östradiol-Undezylat (32,2 mg) wurden in 4 ml Öliger Lösung intraglutäal injiziert.

Blutproben wurden täglich um 9 Uhr, im Falle der Gaben von Östradiol-17 β und Östradiol-Benzoat zusätzlich auch um 18 Uhr am Tage der Injektion und am darauffolgenden Tag entnommen. Die Injektion von Östradiol-17 β und seiner Ester erfolgte am vierten Tag im Anschluß an die Blutentnahme um 9 Uhr. Nach Abseren wurden die Proben bis zur Aufarbeitung bei - 20 °C gelagert.

B. Methodik

I. Gonadotropinbestimmung im Plasma

Konnten bis vor wenigen Jahren Gonadotropine nur mit biologischen Methoden bestimmt werden, ist es heute möglich, durch ihre Reindarstellung aus menschlichen Hypophysen und aus dem Urin von Frauen

in der Postmenopause, sowie durch die Gewinnung von spezifischen Antiseren, radioimmunologische Methoden anzuwenden, mit denen die Konzentrationen dieser Hormone im Plasma bestimmt werden können.

Die radioimmunologische Gonadotropinbestimmung basiert auf der kompetitiven Verdrängung eines radioaktiv markierten Hormons von einem spezifischen Antikörper durch ein nicht radioaktiv markiertes Hormon in Form eines Standardpräparates oder eines zu bestimmenden Hormons in der Serumprobe.

Das radioaktiv markierte Hormon wird zusammen mit einem gegen dieses Hormon gerichteten Antiserum inkubiert. Beide reagieren miteinander und bilden Hormon-Antikörper-Komplexe. Durch Verdünnung des Antiserums läßt sich erreichen, daß von dem markierten Hormon nur ein bestimmter Prozentsatz gebunden wird. Durch Zugabe von nicht markiertem Hormon wird ein Teil des markierten Hormons aus seiner Antikörperbindung verdrängt und durch nicht markiertes Hormon ersetzt. Daraus resultiert ein Absinken der gebundenen Aktivität.

Durch eine Serie von Inkubationen läßt sich eine Standardkurve anfertigen. Man erhält sie, indem man die Konzentration der Probe auf der Abszisse gegen die gebundene Aktivität auf der Ordinate aufträgt. Die Hormonkonzentration in einer unbekanntem Plasmaprobe ergibt sich aus dem Standardwert (Abszisse), welcher der gefundenen gebundenen Aktivität entspricht.

a) Gonadotropinpräparate und Antiseren

Gonadotropinpräparate und Antiseren wurden vom National Institute of Health (Bethesda, Md., USA) und vom Medical Research Council (London) zur Verfügung gestellt oder käuflich erworben (Istituto Serono, Rom).

b) FSH-Präparate und -Antiseren

Zur radioaktiven markierung benutzt: LER 1366 (NIH; 3014 IE, FSH und 213 IE LH mg: biologisch bestimmt). Die FSH Antiseren batch 1 und batch 3, NIH, wurden in einer Arbeitsverdünnung von 1 : 3000 verwandt.

c) LH-Präparate und -Antiseren

LER 960 (NIH; 923 IE und 1,9 IE FSH mg, biologisch bestimmt) wurde radioaktiv markiert. Arbeitsverdünnung von Anti-LH 1 (NIH): 1 : 10000 bis 1 : 20000.

d) Standardpräparate

LER 907 (NIH), ein grober Hypophysenextrakt und 2nd IRP-HMG, ein Gonadotropinpräparat aus Postmenopausenurin. LER 907 enthält 40 IE LH und 20 IH FSH/mg bezogen auf 2nd IRP-HMG. Beim 2nd IRP-HMG ist die biologische Aktivität auf 40 IE FSH und LH pro Ampulle festgesetzt worden.

e) Radioaktive Markierung mit Jod¹²⁵ und Jod¹³¹ Reinigung des jodinierten Hormons.

Zwei mg des hochgereinigten Gonadotropinpräparates werden in 20 µl einer Lösung von MPO_4 und 0,1 M NaCl gelöst. 20 µl Phosphatpuffer (0,5 M, ph 7,5) und 2 mCi J^{131} bzw. J^{125} werden dazu pipettiert. Zur Oxidation des Hormons werden 20 µl einer Chloramin-T-Lösung (3,5 mg/ml) in das Jodierungsgefäß

gegeben. Nach 20 sec wird die Reaktion durch Zusatz von 100 µl Natriummetabisulfitlösung (2,4 mg/ml) beendet. Natriummetabisulfit reduziert Jod zu Jodid und verhindert so den Fortgang der Reaktion.

Mit Hilfe einer Adsorptionschromatographie an Zellulosesäulen wird das jodinierte Hormon von den Bruchstücken des durch die Jodination geschädigten Hormons und vom freien Jod getrennt. Das jodinierte Hormon wird durch 5 % Rinderserumalbumin (Gew./Vol.) und 20 % Aceton (Vol./Vol.) in 0,05 M Phosphatpuffer von der Zellulosesäule eluiert (LEYENDECKER et al., 1971 b).

Zur Bestimmung der Aktivität wird in 50 µl des Reaktionsgemisches vor der Chromatographie die Radioaktivität gemessen. Nach Zusatz von 50 µl Rinderplasma wird das Gesamtprotein durch Zugabe von 2 ml 100%igem Dioxan gefällt und die Radioaktivität des Präzipitats gemessen. Durch Abzug von der Gesamtradioaktivität erhält man den Prozentsatz des Anteils von Radiojod, der in das Hormon übergegangen ist. Damit läßt sich die spezifische Aktivität in mCi Radiojod/µg Hormon berechnen. Das radioaktiv markierte Hormon wird mit Albuminpuffer (0,01 % Albumin in 0,05 M Phosphatpuffer) soweit verdünnt, daß 200 µl etwa 10000 Zerfallsprodukte pro min. enthalten.

Die Inkubation erfolgt über 72 Stunden bei 4°C. Nach der Inkubation werden jedem Röhrchen 2,4 ml einer 66 %igen frisch hergestellten Dioxanlösung zur Fällung des Hormon-Antikörper-Komplexes zugesetzt (LEYENDECKER et al., 1971 b, THOMAS und FERIN, 1968).

Nach Zentrifugation bei 4000 U/min für 30 Minuten wird der Überstand abpipettiert und die Aktivität der Präzipitate im Autogamma-Spektrometer bestimmt.

Die der Aktivität entsprechende Hormonmenge wird an der Standardkurve abgelesen.

II. Steroidbestimmung im Plasma.

a) Prinzip der Methode

Das Prinzip entspricht der Gonadotropinbestimmungsmethode, die Messung der Steroidkonzentration im Plasma erfolgt also ebenfalls durch radioimmunologische Messungen. Antiseren gegen die Steroidhormone werden von Schafen und Kaninchen gewonnen (LEYENDECKER et al., 1975).

Allerdings kann, im Gegensatz zur LH- und FSH-Bestimmung, die Bestimmung der Steroide nicht direkt im Plasma erfolgen. Miteinander kreuzreagierende Steroide erfordern eine Extraktion des Plasmas und die chromatographische Trennung der Steroide voneinander.

b) Extraktion

Die Plasmaproben (1-3 ml) werden nach Zugabe eines internen Standards (bekannte Menge eines radioaktiv markierten Steroids zur Berechnung methodisch bedingter Verluste während der Aufarbeitung) zweimal mit je 3 ml Diäthyläther je eine min. geschüttelt. Die vereinigten Ätherextrakte werden unter Stickstoff zur Trockne eingedampft.

c) Verteilungschromatographie an Kieselgursäulen

Chromosorb W/AW (Merck, Darmstadt) wird mit Äthylenglykol als stationäre Phase (4 + 3; Gew. u. Vol.) gemischt. Je 2 g des Gemisches werden mit einem Glasstab in Chromatographiesäulen (Pipetten 320 x 7,5 mm, innerer Durchmesser 6 mm) gestopft, so daß sich eine Säulenhöhe von etwa 12 cm ergibt. Die

Säulen werden einmal mit 10 ml 40 % Äthylacetat in iso-Octan und zweimal mit 4 ml iso-Octan gewaschen. Die Trockenrückstände der vereinigten Ätherextrakte werden nacheinander mit zweimal 0,5 ml 5 % Essigsäureäthylester in iso-Octan auf die Säule gebracht. Das ablaufende Lösungsmittel wird verworfen.

Die Säulen werden wie folgt eluiert:

1. 4 ml iso-Octan (Progesteron-Fraktion, enthält Cholesterin)
2. 1 ml iso-Octan (enthält kleine Mengen von Progesteron und Androstendion)
3. 5 ml iso-Octan (Androstendion-Fraktion, enthält Pregnenolon)
4. 10 ml 5 % Essigsäureäthylester in iso-Octan, (20- α -Di-hydroprogesteron-Fraktion, enthält 5- α -Dihydrotestosteron)
5. 10 ml 15 % Essigsäureäthylester in iso-Octan (17- α -OHP-Fraktion, enthält Testosteron, Östron und 11-Desoxycorticoosteron)
6. 10 ml 40 % Essigsäureäthylester in iso-Octan, (Östradiol-Fraktion, enthält 17 α -Hydroxypregnenolon, Corticoosteron und 11-Desoxycortisol)

Die Fraktionen 1 - 4 werden verworfen, da lediglich Östron und Östradiol zur Bestimmung gelangen sollen.

d) Antiseren

Zur radioimmunologischen Endpunktbestimmung wurden folgende Antiseren benutzt:

Anti-E, wurde durch Immunisierung von Schafen mit Östradiol-17 β -Hemisuccinat-Albumin-Konjugat gewonnen und in einer Arbeitsverdünnung von 1 : 50 000 verwandt.

Anti-E, wurde durch Immunisierung von Schafen gewonnen und in einer Arbeitsverdünnung von 1 : 100 000 verwandt. (S-52/8, 1 : 100 000).

e) Endpunktbestimmung

Der Trockenrückstand der entsprechenden Steroidfraktion wird in Extraktionsröhrchen aufgefangen und in einem Wasserbad von 40°C unter Stickstoffstrom zur Trockne gebracht. Der Trockenrückstand wird in 1 ml Äthanol gelöst. Davon werden 0,2 ml Portionen als Duplikate in Inkubationsröhrchen pipettiert und eingedampft. Die verbleibenden 0,6 ml werden ebenfalls eingedampft und dienen der Berechnung von methodisch bedingten Verlusten. In jedes Röhrchen werden 0,5 ml Gammaglobulin-Protektion (LEYENDECKER et al., 1972), 30 - 120pg des H³-markierten Steroids und 0,1 ml der entsprechenden Antiserumverdünnung einpipettiert. Die Röhrchen werden für ca. 15 sec auf einem Vortex-Mixer geschüttelt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Eine Standardkurve wird nach dem gleichen verfahren angefertigt (LEYENDECKER et al., 1975).

Die Trennung von freier und an Antikörper gebundenem Hormon erfolgt mit dextranbeschichteter Aktivkohle. 20 ml einer Suspension von Aktivkohle in Phosphatpuffer (Merck, Darmstadt, 5g/100 ml) unter

Zusatz von 1g/100 ml Dextran T 70 (Pharmacia Uppsala), werden in jedes Röhrchen einpipettiert. Nach kurzem Schütteln werden die Röhrchen für 15 min in ein Eisbad gestellt, anschließend 10 min bei 3000 U/min in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. 0,5 ml des Überstandes werden in Tri-Carb-Gefäße pipettiert. Die Messung der Radioaktivität erfolgt nach Zugabe von 10 ml Szintillationslösung in einem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer.

ERGEBNISSE

Östradiol:

Die mittlere Konzentration von Östradiol-17 β im Serum betrug vor der Hormongabe 45,1 pg/ml mit einer Schwankungsbreite von 7 - 104 pg/ml. Neun Stunden nach i.v. Gabe von 20 mg Östradiol stieg die Serumkonzentration auf fast 3,0 ng/ml. Vierundzwanzig Stunden später waren die Werte in den Bereich physiologischer Konzentrationen zurückgefallen und hatten 48 Stunden nach der Gabe wieder das Niveau der Ausgangswerte erreicht. (Abb. 1)

Der Anstieg von Östradiol-17 β im Serum war ebenfalls schnell nach i.m. Gabe von 27,6 mg Östradiol-Benzoeat in öliger Lösung. Neun Stunden nach der Injektion wurden bereits mehr als 2,0 ng/ml gemessen. Mit 2,1 ng/ml wurde 24 Stunden nach der Gabe ein Maximalwert erreicht. Der anschließende graduelle Abfall erstreckte sich über mehr als neun Tage.

Langsamer war der Anstieg der Serumkonzentrationen von Östradiol-17 β nach Gabe 26,2 mg Östradiol-Valerianat. Erst 48 Stunden nach Injektion wurde mit 1,6 ng/ml ein Maximum erreicht. Der anschließende Abfall der Östradiol-Konzentration im Serum verlief weitgehend parallel derjenigen nach Injektion von Östradiol-Benzoeat.

Nach i.m. Injektion von 32,2 mg Östradiol-Undecylat wurden Konzentrationen von Östradiol-17 β im Serum erreicht, die nicht über den Bereich physiologischer Konzentrationen während des menstruellen Cyclus hinausgingen.

Östron:

Die Serumkonzentration von Östron betrug vor der Hormongabe im Mittel 56,6 pg/ml mit einer schwankungsbreite von 8-248 pg/ml. Die Konzentrationsverläufe von Östron im Serum nach Gabe von Östradiol-17 β und seiner Ester ähnelten jenen von Östradiol-17 β , waren jedoch flacher und erschienen um Stunden bzw. Tage verschoben. So wurde das Maximum der Östron-Konzentration im Serum 72 Stunden nach Gabe von Östradiol-Benzoeat und 96 Stunden nach Gabe von Östradiol-Valerianat erreicht. Das Verhalten der Östronkonzentration zeigt deutlicher den stärkeren 'Depoteffekt' von Östradiol-Valerianat gegenüber Östradiol-Benzoeat als der Verlauf der Östradiol-Werte im Serum.

Gonadotropine (Abb.2):

Die mittlere Serumkonzentration von LH betrug 53,7 mIE/ml mit einer Schwankungsbreite von 9-128 mIE/ml und die FSH 80,2 mIE/ml mit einer Schwankungsbreite von 28 - 190 mIE/ml vor Gabe von Östradiol-17 β und seiner Ester. Während des kurzzeitigen Anstieges von Östradiol-17 β im Serum nach i.v. Gabe von freiem Östradiol erfolgte eine deutliche Senkung der LH- und FSH-Werte, die jedoch nicht auf das Niveau während des menstruellen Cyclus abfielen. Nach Applikation der Ester fiel die erhöhte Serumkonzentration der Gonadotropine in den Bereich der Werte während des menstruellen Cyclus ab. Dieser Abfall erfolgte langsamer nach Gabe von Östradiol-Undecylat entsprechend dem protrahiert

verlaufenden Anstieg von Östradiol-17 β im Serum. Nach anfänglich fast parallelem Abfall von LH und FSH kam es im späteren Verlauf der Konzentrationen im Serum nach Gabe von Östradiol-17 β zu einem früheren Anstieg von LH als FSH und nach Gabe der Ester nur zu einem Anstieg von LH während der Beobachtungszeit. Dies wird in der graphischen Darstellung (Abb. 2) in einer Überkreuzung der Konzentrationsverläufe von LH und FSH sichtbar.

DISKUSSION

Der Konzentrationsverlauf von Östradiol-17 β im Serum nach Gabe von Ostradiolestern in öliger Lösung ist das Resultat verschiedener Vorgänge, deren Bedeutung im einzelnen schwer abschätzbar ist. Folgende Faktoren müssen diskutiert werden:

- a) Die Feinverteilung des Depots und dessen Verweildauer innerhalb der Muskulatur.
- b) Die Lipidlöslichkeit des Esters im öligen Depot.
- c) Die Löslichkeit in einem sekundären Depot (Fettgewebe).
- d) Die Geschwindigkeit der Esterspaltung.
- e) Die Metabolisierung und Ausscheidung des freien Steroids.

Bei vergleichbarem primärem Depot (4 ml ölige Lösung; i.m. Applikation) und vergleichbarer Metabolisierung und Ausscheidung des freien Steroids müssen die Unterschiede in den Konzentrationsverläufen von Östradiol-17 β im Serum auf unterschiedliche Affinitäten der Ester zum primären und eventuell sekundären Depot und auf eine unterschiedlich schnelle Esterspaltung zurückgeführt werden.

Bei Untersuchungen von SCHENK und JUNKMANN (1955) nahm die Geschwindigkeit der Esterspaltung bei chemischer Hydrolyse mit zunehmender Kettenlänge der Karbonsäure ab.

DIRSCHERL et al. (1954) glaubten zeigen zu können, daß auch die enzymatische Esterspaltung im o. gen. Sinne von der Kettenlänge der Karbonsäure beeinflusst wurde. Diese in vitro Befunde schienen die Beobachtung beim Menschen zu erklären, wonach langkettige Östradiolester eine längere biologische Wirkung entfalten als kurzkettige (WIED, 1954).

BELLMANN et al. (1973, 1974) zeigten dagegen, daß langkettige Steroidester im Fettgewebe schneller als kurzkettige und im Lebergewebe lang- und kurzkettige Steroidester gleich schnell gespalten werden. DIRSCHERL et al. (1954) führten ihre Untersuchungen mit Kristallsuspensionen durch, während BELLMANN et al. (1973, 1974) mit echten Lösungen radioaktiv markierter Ester arbeiten. Es ist demnach sehr wahrscheinlich, daß Löslichkeitsfaktoren die Diskrepanz der Resultate verursacht haben. Bei schneller Esterspaltung sowohl in Fett- als auch Lebergewebe in vitro sehen BELLMANN et al. (1975, 1974) die Ursache für den "Depoteffekt von langkettigen Steroidestern in vivo darin, daß der lipophile Ester innerhalb der Fetttropfen des primären und sekundären Depots den Lipasen und unspezifischen Esterasen für eine Spaltung schwerer zugänglich ist.

Der Verlauf der Konzentrationen von FSH und LH im Serum zeigt, daß schon eine kurzzeitige, allerdings sehr deutliche Erhöhung der Plasmaöstrogene nach i.v. Gabe von Östradiol-17 β zu einer negativen Rückkoppelung auf die hypophysäre Gonadotropinsekretion führt. Der sofort eintretende Effekt auf die

Gonadotropinkonzentration bei schnellem Anstieg von Östradiol-17 β im Serum und der langsame Abfall der Gonadotropine bei flachem Anstieg von Östradiol-17 β (nach Gabe von Östradiol-Undezylat) verdeutlichen die Dosis-Wirkungsbeziehungen innerhalb des negativen Rückkoppelungsmechanismus zwischen Östradiol- und Gonadotropinkonzentration im Serum. In Übereinstimmung mit den Resultaten von VANDE WIELE et al.(1970) kann die negative Rückkoppelung oberhalb einer gewissen Östradiolkonzentration im Serum nicht durch einen weiteren Anstieg verstärkt werden. Aufgrund der Ergebnisse der Untersuchungen mit Östradiol-Undezylat dürfte die maximale negative Rückkoppelung der Östrogene auf die Gonadotropinsekretion im Bereich physiologischer Östradiolkonzentrationen liegen.

Nach Ovariectomie im geschlechtsreifen Alter fanden CZYGAN und MARUHN (1972) einen schnelleren Anstieg von FSH als von LH. Der in der eigenen untersuchungsreihe beobachtete schnellere Anstieg von LH nach Lockerung der negativen Rückkopplung durch abfallende Östrogene (vor allem nach Gabe von Östradiol-17 β i.v.) kann auf positive Rückkoppelungseffekte der Östradiolgabe auf die hypophysäre LH-Sekretion zurückgeführt werden. Der Verlauf der LH-Konzentrationen im Serum ist demnach das Resultat einer Überlagerung negativer und positiver Rückkoppelungen auf die LH-Sekretion.

Zusammenfassung

Östradiol-17 β , Östradiol-Benzoat, Östradiol-Valerianat und Östradiol-Undezylat wurde Frauen in der Postmenopause und Kastratinnen in äquimolarer Dosierung bezogen auf 20 mg Östradiol-17 β parenteral injiziert.

Mit der vorliegenden Untersuchung wurden erstmalig die Konzentrationen von Östradiol-17 β und Östron im Serum nach Gabe von Östradiol-17 β und Östradiolestern radioimmunologisch gemessen und miteinander verglichen.

Die Befunde bestätigen frühere Resultate über den unterschiedlichen "Depoteffekt" der untersuchten Ester.

Die vorgelegten Ergebnisse ermöglichen eine differenziertere therapeutische Anwendung der Ester, was Auswahl und Dosierung betrifft.

[Tabellen]

Tabelle 1a: Gabe von Östradiol i.v.

Patient	B. K.	B. G.	M. E.
Alter (Geb.Dat.)	15.3.22	11. 3. 12	5.8.22
Menopause	11.1.73	1964	30.1.73
Tag der Operation	2.2.73	8. 2, 73	12.2.73
Art der Operation	vaginale Hys- terektomie, Adnexektomie	vaginale Hys- terektomie	Lap-TE Adnexektomie
Beginn der Blutentnahme	13.2.73 09.00 Uhr	20. 2. 73 09.00 Uhr	20. 2. 73 09.00 Uhr
Tag der Injektion	16. 2. 73 09.00 Uhr	23. 2. 73 09.00 Uhr	23. 2. 73 09.00 Uhr
Injektion	20 mg Östradiol i.v.	20 mg Östradiol i.v.	20 mg Östradiol i.v.
Letzter Tag der Blutent- nahme	23.2.73 09.00 Uhr	2. 3. 73 09.00 Uhr	2. 3. 73 09.00 Uhr

Tabelle 1b: Gabe von Östradiol-Benzooat i.m.

Patient	B. E.	S. A.	W. A.
Alter (Geb.Dat.)	7. 4.13	15. 9.26	3. 4.17
Menopause	1960	8. 2.73	Jan. 71
Tag der Operation	15. 2.73	16. 2.73	26.2.73
Art der Operation	vaginale TE	Lap-TE Adnexektomie	Lap-TE Adnexektomie
Beginn der Blutentnahme	25. 2.73 09.00 Uhr	24. 2.73 09.00 Uhr	6. 3.73 09.00 Uhr
Tag der Injektion	28. 2.73 09.00 Uhr	27.2.73 09.00 Uhr	9.3.73 09.00 Uhr
Injektion	27,6 mg Östradiol- Benzoat i. m.	27,6 mg Östradiol- Benzoat i. m.	27,6 mg Östradiol- Benzoat i. m.
Letzter Tag der Blut- entnahme	9. 3.73 09.00 Uhr	6. 3. 73 09.00 Uhr	23. 3. 73 09.00 Uhr

Tabelle 1c: Gabe von Östradiol-Valerianat i.m.

Patient	D. I.	S. K.	S. G.
Alter (Geb.Dat.)	16. 2.15	17. 3.15	23. 7.14
Menopause	1963		1971
Tag der Operation	12. 3.73	2. 3.73	6. 3.73
Art der Operation	Lap-TE Adnexektomie	vaginale Hys- terektomie Adnexektomie	vaginale Hys- terektomie Adnexektomie
Beginn der Blutentnahme	6. 3.73 09.00 Uhr	10. 3. 73 09.00 Uhr	16. 3. 73 09.00 Uhr
Tag der Injektion	23. 3.73 09.00 Uhr	13. 3.73 09.00 Uhr	18. 3. 73 09.00 Uhr
Injektion	26,2 mg Östradiol- Valerianat i.m.	26,2 mg Östradiol-Va- lerianat	26,2 mg Östradiol-Va- lerianat
Letzter Tag der Blut- entnahme	14. 4.73 09.00 Uhr	23. 3. 73 09.00 Uhr	7. 4. 73 09.00 Uhr

Tabelle 1d: Gabe von Östradiol-Undecylat i.m.

Patient	Sch. M.	P. G.	Sch. G.
Alter (Geb.Dat.)	10. 7. 20	28. 1. 20	10.11.31
Menopause	12. 3. 73	7/71	27. 2.73
Tag der Operation	22. 3. 73	26. 3. 73	2. 4.73
Art der Operation	abdominale Hysterektomie, Adnexektomie	vaginale Hysterektomie	Lap-TE Adnexektomie
Beginn der Blutentnahme	8. 3.73 09.00 Uhr	3. 4. 73 09.00 Uhr	10. 4. 73 09.00 Uhr
Tag der Injektion	1. 4. 73 09.00 Uhr	5. 4. 73 09.00 Uhr	13. 4. 73 09.00 Uhr
Injektion	32,3 mg Östradiol- Undecylat i.m.	32,3 mg Östradiol- Undecylat i.m.	32,3 mg Östradiol- Undecylat i.m.
Letzter Tag der Blutent- nahme	28. 4. 73 09.00 Uhr	17. 4. 73 09.00 Uhr	28. 4. 73 09.00 Uhr

	Tag	Kontrolle				20 mg E ₂ i.v. (Tag 4, 0900 Uhr)							
		1	2	3	4	4	5	6	7	8	9	10	11
B.K.	E ₂ (pg/ml)	77	56	30	36	2378	311	64	57	34	81	21	41
	E ₁ (pg/ml)	46		27	41	3879	711	67	100	30	49	17	5
	LH(mIU/ml)	89	111	128	160	71	74	114	160	113	119	135	135
	FSH(mIU/ml)	102	89	120	82	61	49	60	62	68	77	86	113
B.G.	E ₂ (pg/ml)	47	35	30	7	2258	504	141	90	58	39	41	42
	E ₁ (pg/ml)	15	11	22	16	2655	2208	409	152	54	39	69	61
	LH(mIU/ml)	64	63	78	63	31	43	49	38	74	75	90	53
	FSH(mIU/ml)	130	84	110	89	81	80	46	46	85	79	165	89
M.E.	E ₂ (pg/ml)	14	104	32	28	4212	451	54	36	29	33	26	20
	E ₁ (pg/ml)	41	106	29	9	1480	291	131	47	19	18	5	
	LH(mIU/ml)	25	27	24	53	32	30	38	55	34	53	70	59
	FSH(mIU/ml)	34	44	46	108	53	34	28	20	28	50	87	92
Mittel- werte	E ₂ (pg/ml)	46	65	33	24	2949	422	86	61	40	51	29	34
	E ₁ (pg/ml)	34	39	26	22	2671	1090	202	100	34	34	30	22
	LH(mIU/ml)	59	67	77	92	45	49	67	84	74	82	98	82
	FSH(mIU/ml)	88	71	92	93	65	54	45	43	60	69	113	98

Tabelle 2: Einzelwerte und Mittelwerte nach parenteraler Gabe von Östradiol-17 β i.v.. Die Serumkonzentrationen von E₁ und E₂ (pg/ml) und LH und FSH (mIU/ml).

		Kontrolle				27,6 mg E ₂ -Benzoat i.m. (Tag 4, 09.00 Uhr)									
Tag		1	2	3	4	4	5	5	6	7	8	9	10	11	12
S.A.	E ₂	100	44	128	60	1873		1280	609	560	401	354	349		
	E ₁	27	40	248	8			372	699	338	208	181			
	LH	31	40	46	63	20	18	15		17	31	48	29	39	
	FSH	73	115	123	190	86	40	32		20	20	21	20	20	
B.E.	E ₂	89	65	46	88	2156	2201	2007	2350	1495	1183	1156	837	657	458
	E ₁	116	83	83	107	965	986	1321	1235	964	1020	814	628	397	243
	LH	52	55	45	43	24	22	16	15	16	19	16		23	40
	FSH	88	100	91	88	85	56	38	30	21	19	16		11	12
W.H.	E ₂	25	29	43	28		2092		2020	2004	1673	1645	1319	1055	644
	E ₁	52	60	142	49		368		629	777	713	763	604	657	456
	LH	13	13	9	20		10		7	9	5	11	8	60	20
	FSH	35	28	42	65		27		21	16	12	15	16	34	21
Mittelwerte	E ₂	71	46	72	58	2015	2147	1679	1659	1353	1105	1051	835	856	551
	E ₁	65	49	157	54				745	813	690	595	471		
	LH	32	36	33	42	22	17	16	11	14	18	21	19	41	30
	FSH	65	81	85	114	86	41	35	26	19	17	17	18	22	17

Tabelle 3: Einzelwerte und Mittelwerte nach parenteraler Gabe von Östradiol-Benzoat i.m.. Die Serumkonzentrationen von E1 und E2 (pg/ml) und LH und FSH (mIU/ml).

		Kontrolle				26,2 mg E ₂ -Valerianat i.m. (Tag 4, 09.00 Uhr)										
Tag		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
S.G.	E ₂	21	16	16	20	764	1163	1003	721	1176	639	753	632	485	884	
	E ₁	46	40	39	62	302	514	894	724	992	1132	992	518	459	371	
	LH	40	39	37	37	23	25	25	28	32	33	39	44	40	18	
	FSH	46	53	52	52	31	24	18	19	18	21	13	15	12	13	
S.K.	E ₂	40	7	24	11	1323	2456	1729	1681	1477	1512	1271	698	629	509	
	E ₁	69	92	66	20	340	760	1006	1155	523	862	558	558	508	347	
	LH	67	75	74	84	26	30	38	45	50	42	55	24	19	46	
	FSH	90		112	110	41	33	24	18	22	20	19	14	15	15	
D.I.	E ₂	138	34	42	48	882	1180	1202	1616	905	942	495	343	483	586	431
	E ₁		38	33	84	152	369	384	589	349	248	443	491	367	351	322
	LH	43	28	40	44	12	10	14	12	51	41	9	40	65	31	26
	FSH	78	60	73	84	27	17	21	10	15	18	12	15	12	14	6
Mittelwerte	E ₂	31	19	27	26	989	1599	1311	1339	1186	1031	839	557	532	659	
	E ₁	58	56	46	55	204	547	761	822	621	747	664	522	444	356	
	LH	50	47	50	55	20	22	25	28	44	38	34	36	41	31	
	FSH	71	68	79	82	33	24	21	15	18	19	14	15	13	14	

Tabelle 4: Einzelwerte und Mittelwerte nach parenteraler Gabe von Östradiol-Valerianat i.m..Die Serumkonzentrationen von E1 und E2 (pg/ml) und LH und FSH (mIU/ml).

		Kontrolle				32,3 mg E ₂ -Undecylat i.m. (Tag 4, 09.00 Uhr)											
		Tag 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
F.G.	E ₂	64	69	78	44	173	210	108	149	94	132	120	166	179			115
	E ₁	80	101	74	72	210	282	145	178	177	161	186	68	167			183
	LH	49	56	55	47	73	40	22	38	21	21	28	42	45	33	44	30
	FSH	72	62	67	82	88	69	44	42	35	29	26	21	25	19	20	18
Sch.G.	E ₂	53	45	42	30	126	170	247	253	283	206						273
	E ₁	74	104	43	66	120	116	148	211	129	177						35
	LH	43	38	49	55	50	35	24	20	16	13						19
	FSH	63	71	80	89	64	48	30	21	19	15						38
Sch.M.	E ₂	39	68	56	28	67	131	793	244	124	58	172	69	146	138		
	E ₁	66	16	42	8	18	263	297	109	91	132	154	165	133	116		
	LH	64	64	64	65	78	82	52	56	45	51	31	40	30	40		
	FSH	88	64	69	80	106	67	61	52	40	29	30	28	23	25		
Mittelwerte	E ₂	52	60	58	34	122	170	382	215	167	132	146	118	163			194
	E ₁	70	73	53	48	116	220	196	166	132	156	170	117	150			109
	LH	52	53	59	55	67	52	32	38	27	28	30	41	38	37		25
	FSH	74	65	72	83	86	61	45	38	31	24	28	25	24	22		28

Tabelle 5: Einzelwerte und Mittelwerte nach parenteraler Gabe von Östradiol-Undecylat i.m.. Die Serumkonzentrationen von E1 und E2 (pg/ml) und LH und FSH (mIU/ml).

[Abbildungen]

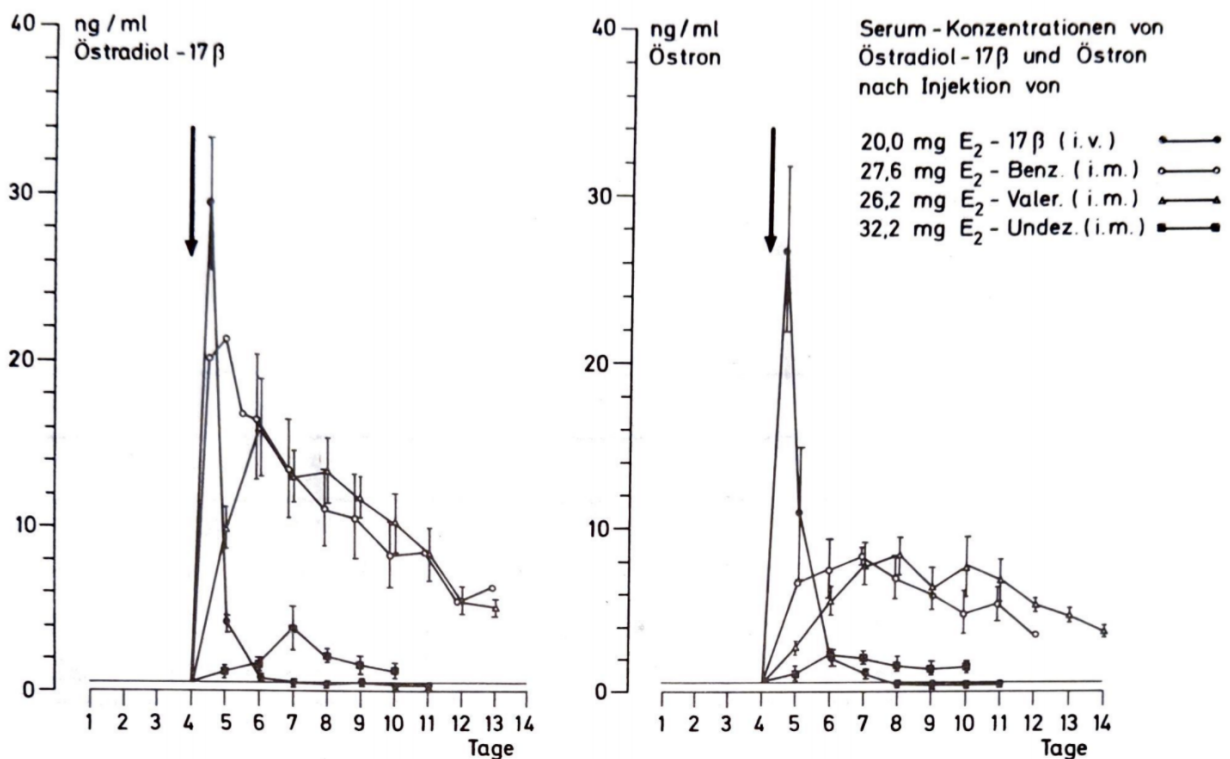


Abb. 1: Die Serumkonzentrationen von Östradiol-17β und Östron nach parenteraler Gabe von Östradiol-17β, Östradiol-Benzoat, Östradiol-Valerianat und Östradiol-Undecylat. Mittelwerte ± SEM. Die Linie parallel zur Abszisse markiert die Ausgangskonzentrationen.

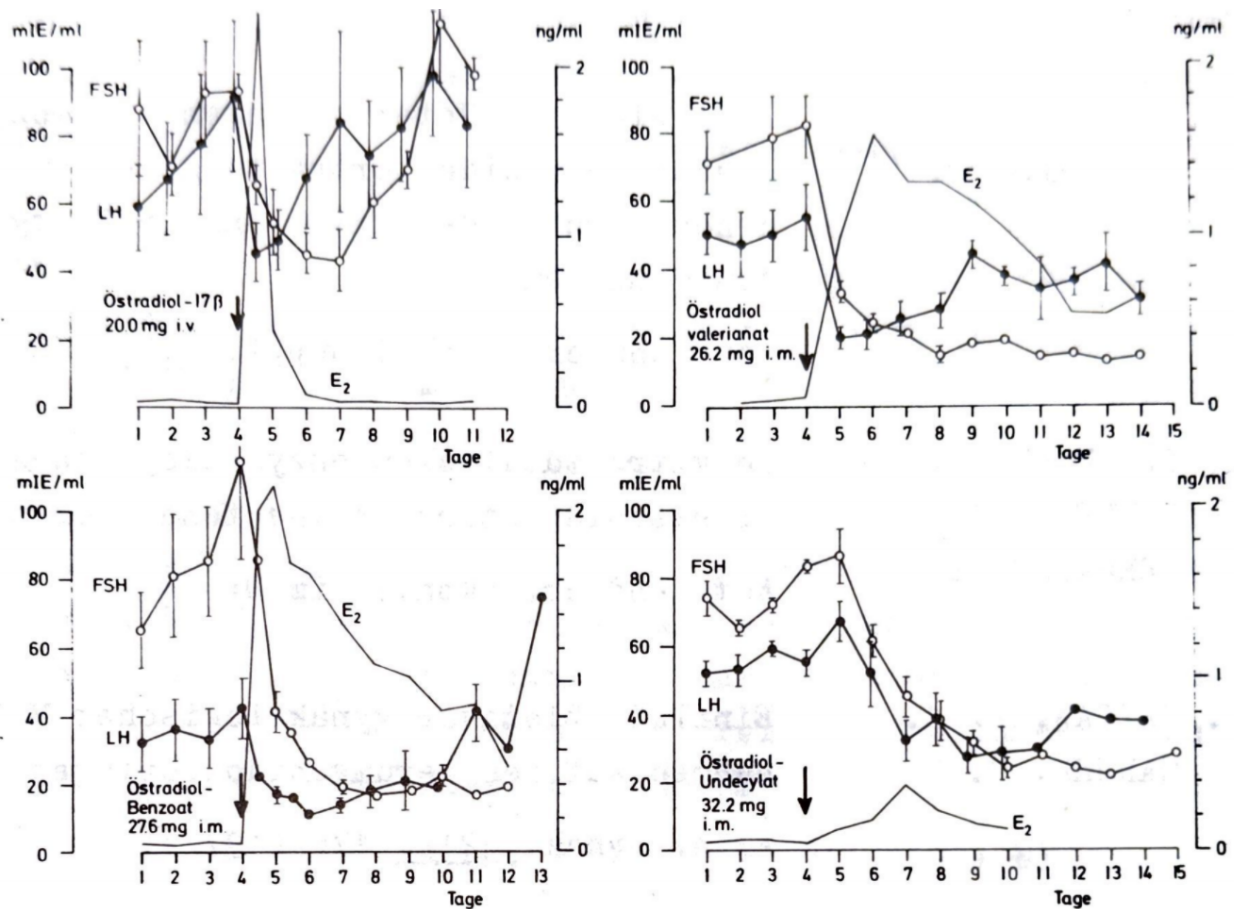


Abb. 2: Die Konzentrationsverläufe von LH und FSH sowie Östradiol-17 β vor und nach parenteraler Gabe von Östradiol-17 β , Östradiol-Benzoat, Östradiol-Valerianat und Östradiol-Undecylat. Mittelwert + SEM.

LITERATURVERZEICHNIS:

1. BELLMANN, O., GERHARDS, E. Vergleichende Untersuchungen zur enzymatischen Steroidesterspaltung in verschiedenen Geweben der Ratte und im Fettgewebe des Menschen. Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 173, 138 (1973).
2. BELLMANN, O., DUHME, H. J., GERHARDS, E. In vitro studies on enzymatic cleavage of steroid esters in the female organism. Acta endocr. (Kbh.) im Druck.
3. CZYGAN, P. J., MARUHN, G. Einfluß ablativer gynäkologischer Maßnahmen auf den Serumgonadotropingehalt. Arch. Gynak. 212, 176 (1972).
4. DIRSCHERL, W., DARDENNE, U. Spaltung von Steroidhormonestern durch menschliche und tierische Organe. Biochem. Z. 325, 195 (1954).
5. ITRICH, G., POTS, P. Östrogenbestimmungen in Blut und Urin nach Verabreichung von Östrogenen. Abhandlungen der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Klasse für Medizin 1, 53 (1965).

6. KAISER, R. Die Östrogenausscheidung im Cyclus und nach Injektion von Ostradiolestern. Geburtsh. u. Frauenhk. 21, 868 (1961).
7. KORENMAN, S. G., TULCHINSKY, D., EATON, L. W. Radioligand procedures for estrogen assay in normal und pregnancy plasma. Acta endocr. (Kbh) Suppl. 147, 291 (1970).
8. LEYENDECKER, G., SAUNDERS, D. M., Saxena, B. B. Further improvements in the radioimmunoassay of human pituitary follicle stimulating hormone (FSH). Klin. Wschr. 49, 658 (1971 a).
9. LEYENDECKER, G., SCHNEIDER, K., NOCKE, W. FSH und LH im Plasma während des menschlichen Cyclus. Radioimmunologische Bestimmungen unter Anwendung der Dioxantrennung von freien und gebundenem markierten Antigen. Arch. Gynäk. 211, 213 (1971 b).
10. LEYENDECKER, G., WARDLAW, S., NOCKE, W. Gamma globulin protection of radioimmunoassay and competitive protein binding saturation analysis of steroids. J. clin. Endocrin. Metab. 34, 430 (1972).
11. LEYENDECKER, G., WARDLAW, S., NOCKE, W. Radioimmunologische Bestimmung von 17-Hydroxyprogesteron im Serum, in: BREUER, H., HAMEL, D., KRÜSKEMPER, H.L. (Hrsg.): Methoden der Hormonbestimmung S. 230, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1975.
12. SCHENK, M., JUNKMANN, K. Über protrahiert wirksame Androgene. Arch. exper. Path. Pharmacol. 227, 210 (1955).
13. STROTT, C. A., LIPSETT, M. B. Measurement of 17-hydroxyprogesterone in human plasma. J. clin. Endocr. 28, 1426 (1968).
14. THOMAS, K., FERIN, J. A new rapid radioimmunoassay for HCG (LH, ICSH) in plasma using dioxan. J. clin. Endocrin. Metab. 28, 1667 (1968).
15. WIED, G. L. Östradiol-valerianat und Östradiol-undecylat, zwei neue protrahiert wirkende Östrogene. Wirkungsvergleich mit Östradiol-benzoat. Geburtsh. u. Frauenk. 14, 45 (1954).
16. VANDE WIELE, R., BOGUMIL, J., DYRENFURTH, I., FERIN, M., JEWELLEWICZ, R., WARREN, M., RIZKALLAH, T., MIKHAIL, G. Mechanisms regulating the menstrual cycle in women. Rec. Progr. Hormone Res. 26, 63 (1970).

Lebenslauf

Am 8. September 1948 wurde ich als ältester Sohn des Landwirts Reinhold Geppert und dessen Ehefrau Hildegard, geb. Repsch, in Burlage, Kreis Leer/Ostfriesland, geboren.

Nach vierjähriger Volksschulzeit, zwei Jahren Mittelschulbesuch und siebenjährigem Besuch des Gymnasiums Papenburg erhielt ich im Mai 1967 das Zeugnis der Reife.

Anschließend absolvierte ich zwei Jahre bei der Bundeswehr der BRD und erreichte den Rang eines Leutnants der Reserve.

Im Wintersemester 1969/70 begann ich das Studium der Zahnmedizin an der Universität Bonn, wo ich im Sommersemester 1970 meine naturwissenschaftliche und im Wintersemester 1971/72 meine zahnärztliche Vorprüfung ablegte.

Im Februar 1975 legte ich das zahnmedizinische Staatsexamen in Bonn ab und erhielt meine Approbation als Zahnarzt.

Seither bin ich in einer zahnärztlichen Praxis in Meckenheim/Bonn als Assistent tätig.

Herrn Prof. Dr. W.NOCKE, Leiter der endokrinologischen Abteilung der Universitäts-Frauenklinik Bonn-Venusberg (Direktor: Prof. Dr. E.J. PLOTZ), danke ich für die Überlassung des Themas und für seine freundliche Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. G. LEYENDECKER, der mir auf Grund seiner Kenntnisse und Erfahrungen bei der radioimmunologischen Bestimmung von Gonadotropinen und Steroiden viele Anregungen gab und mich bei der Durchführung der Untersuchungen und Abfassung des Manuskriptes anleitete und unterstützte.

Für die wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen danke ich FrI. B. LEFFEK, FrI. R. KLASSEN und Herrn E. JOST.

Ebenso danke ich meinen Versuchspersonen, die sich zu den täglichen Blutentnahmen zur Verfügung stellten und dadurch diese Arbeit ermöglichten.