

5 Ergebnisse

5.1 Transaktivierungsversuche

5.1.1 Agonistische Potenz

In Abbildung 5.1 sind die agonistischen Eigenschaften der untersuchten Steroide graphisch dargestellt. In Tabelle 5.1 sind die ermittelten $EC_{50(Aldo)}$ -Werte aufgeführt. In den durchgeführten Versuchen zeigte Aldosteron als physiologischer Ligand die stärkste Transaktivierung aller untersuchten Steroide. Als Grad der agonistischen Potenz wurde der Quotient aus dem erreichten Transaktivierungsquotienten aus induzierbarer Firefly-Luciferase und konstitutiv exprimierter Renilla-Luciferase und der maximalen Transaktivierung durch Aldosteron (=100%) berechnet. Die Basalexpression als der Quotient aus basal exprimierter, d. h. nicht induzierter Firefly-Luciferase und konstitutiv exprimierter Renilla-Luciferase betrug $2,7\% \pm 1\%$ bezogen auf die maximale Transaktivierung durch Aldosteron (=100%).

Bei der Inkubation der nur mit den Reporterplasmiden transfizierten Zellen mit Aldosteron bzw. Cortisol in einer Konzentration von 10^{-6} mol/l wurde ein Transaktivierungsquotient ermittelt, der der Basalexpression von $2,7\% \pm 1\%$ entspricht.

DOC zeigte im verwendeten System eine maximale Transaktivierung von etwa 70% im Vergleich zu Aldosteron. Bei einer niedrigen mit Aldosteron vergleichbaren $EC_{50(Aldo)}$ erreichte DOC bereits bei einer Konzentration von 10^{-9} mol/l die Plateauphase der Transaktivierung.

Für Cortisol stellte sich das Plateau der Transaktivierung bei Konzentrationen von 10^{-8} mol/l ein. Mit einer etwa um den Faktor 10 höheren $EC_{50(Aldo)}$ zeigt Cortisol im Vergleich zu Aldosteron eine etwa 10fach schwächere agonistische Potenz. Die maximal erreichte Transaktivierung betrug 80%.

Progesteron zeigt am hMR relativ schwache agonistische Eigenschaften und erreicht, bezogen auf Aldosteron, eine maximale Transaktivierung im untersuchten Konzentrationsbereich von 27% erst bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 10^{-6} mol/l.

Unter den Progesteronmetaboliten zeigte 20α -DH-Progesteron mit einer maximalen Transaktivierung im untersuchten Konzentrationsbereich von 11,5% die stärksten agonistischen Eigenschaften. Die C_{11} -hydroxylierten Metabolite des Progesterons 11β -OH-Progesteron und 11α -OH-Progesteron zeigen mit 9% bzw. 5,1% eine geringere agonistische

Potenz, wobei 11β -OH-Progesteron bei Konzentrationen zwischen 10^{-9} und 10^{-8} mol/l ein Plateau zu erreichen scheint.

Mit 4,2% maximal erreichter Transaktivierung zeigte 17α -OH-Progesteron noch geringere agonistische Aktivität. Alle anderen untersuchten Progesteronmetabolite zeigten mit Transaktivierungsquotienten von unter 3% im Vergleich mit der Basalexpression von $2,7\% \pm 1\%$ keine transaktivierenden Eigenschaften am hMR.

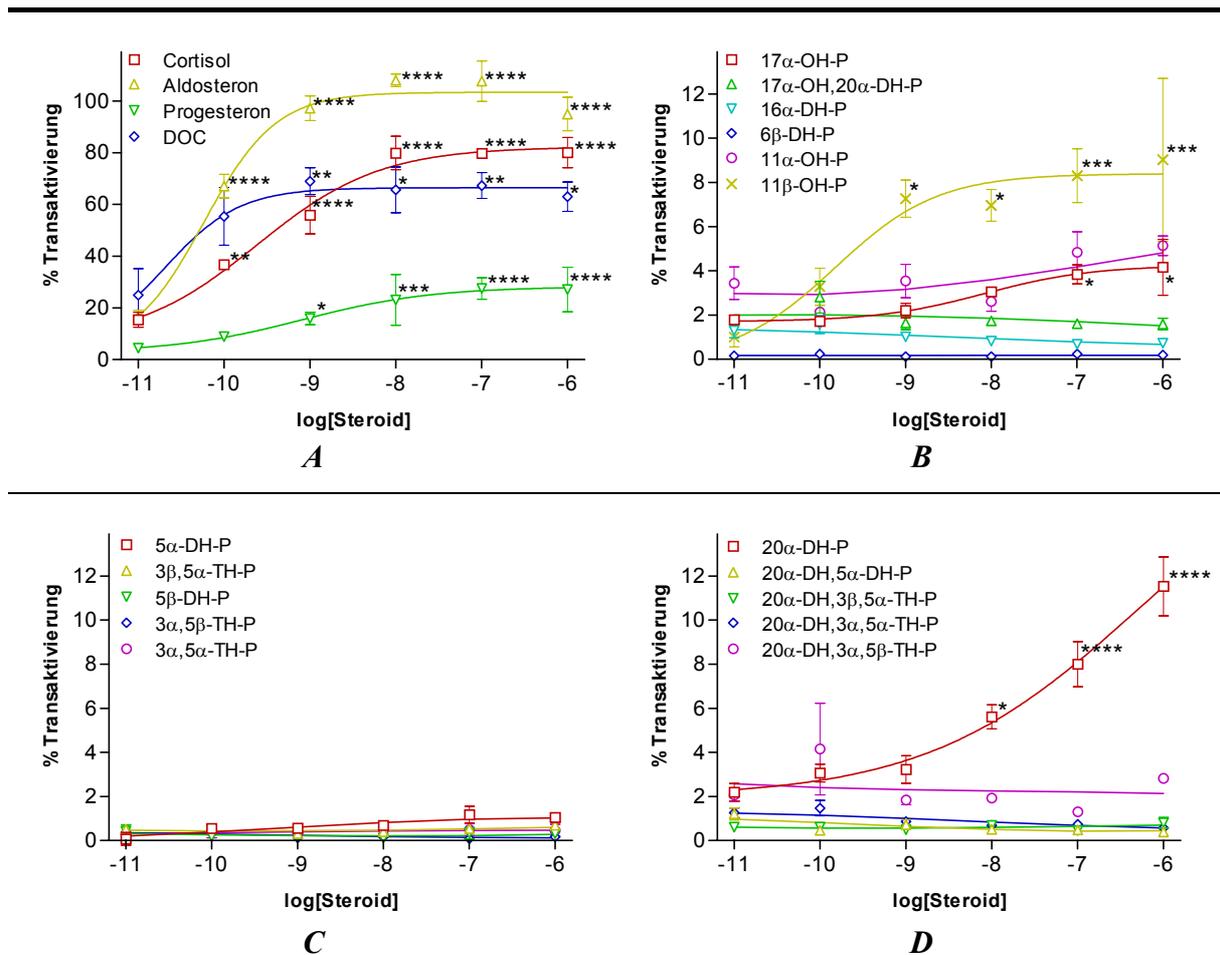


Abbildung 5.1: Agonistische Potenz der 19 untersuchten Steroide am hMR im Transfektionsmodell

(%Transaktivierung bezogen auf Aldosteron, $MW \pm SEM$, $n=4$). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,005$, **** $P < 0,001$ im Vergleich mit dem jeweiligen Wert bei 10^{-11} mol/l (Duncans multiple range Test).

5.1.2 Antagonistische Potenz

In Abbildung 5.2 ist die antagonistische Potenz der 19 untersuchten Steroide dargestellt. Die Kurven zeigen die durch Aldosteron in einer Konzentration von 10^{-9} mol/l in Gegenwart des untersuchten Steroids in der angegebenen Konzentration verbliebene Induktion der Transaktivierung. 100% stellt die nur durch Aldosteron bei der eingesetzten Konzentration erreichte maximale Transaktivierung dar. Die errechneten $IC_{50(Aldo)}$ -Werte sind in Tabelle 5.1 (S. 68) aufgeführt.

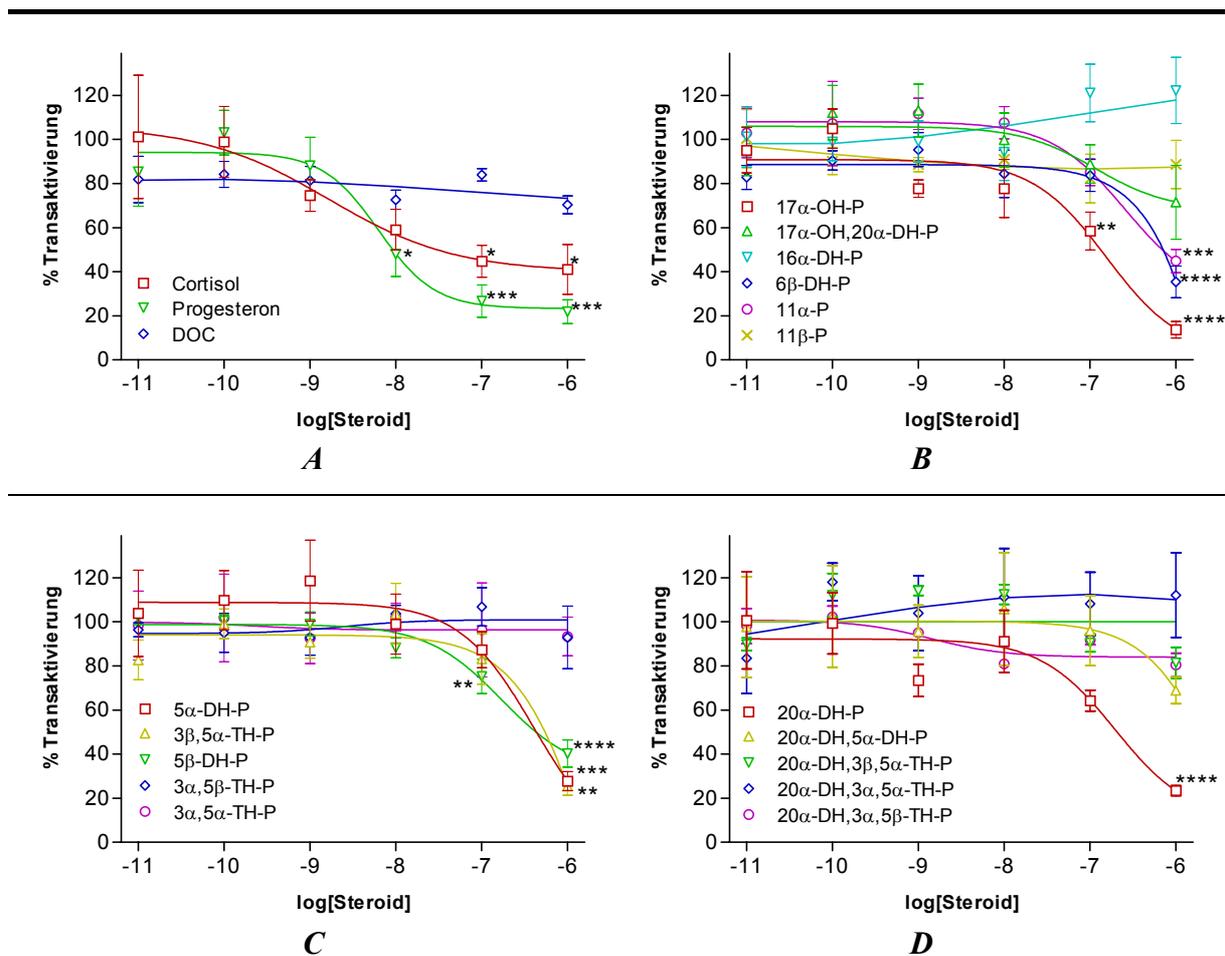


Abbildung 5.2: Antagonistische Potenz der 19 untersuchten Steroide am hMR gegenüber Aldosteron im Transfektionsmodell

(%Transaktivierung bezogen auf Aldosteron, $MW \pm SEM$, $n=4$). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,005$, **** $P < 0,001$ im Vergleich mit dem jeweiligen Wert bei 10^{-11} mol/l (Duncans multiple range Test).

Progesteron zeigte mit einer $IC_{50(Aldo)}$ von 9,2 nmol/l von den untersuchten Substanzen die höchste antagonistische Potenz. Bei einer Konzentration von 10^{-7} mol/l betrug die Minderung

der Transaktivierung etwa 75%. 17α -OH-Progesteron und 20α -DH-Progesteron stellten sich als schwächere Antagonisten dar, erreichten aber immer noch eine Hemmung der Transaktivierung durch Aldosteron von mehr als 40% bzw. 35% bei 100fachem Überschuss des jeweiligen Substanz. Eine zusätzliche Ring-A-Reduktion vermindert die antagonistische Potenz von 20α -DH-Progesteron weiter; auch die 20α -Reduktion von 17α -OH-Progesteron vermindert die antagonistische Potenz bei 100fachem Überschuss weiter auf 11%. Die C_5 -reduzierten Progesteronmetabolite 5α -DH-Progesteron und 5β -DH-Progesteron zeigen eine noch geringere, aber noch messbare antagonistische Aktivität. Eine weitere Reduktion in Position C_3 zu $3\alpha,5\alpha$ -TH-Progesteron und $3\alpha,5\beta$ -TH-Progesteron führt zu einer nicht mehr messbaren antagonistischen Aktivität. Im Gegensatz dazu führt die 3β -Reduktion von 5α -DH-Progesteron zu $3\beta,5\alpha$ -TH-Progesteron zu keiner Minderung der antagonistischen Potenz. Die hydroxylierten Progesteronmetabolite 16α -OH-Progesteron, 6β -OH-Progesteron und 11α -OH-Progesteron zeigen am hMR antagonistische Eigenschaften, die im Vergleich mit Progesteron weiter vermindert sind. 11β -OH-Progesteron zeigt überraschenderweise trotz der vorhandenen Bindungsaffinität keine signifikanten antagonistischen Eigenschaften (Abbildung 5.2). Desoxycorticosteron und Cortisol zeigen als Agonisten am MR eine entsprechend geringe antagonistische Potenz. Zur Übersicht stellt Abbildung 5.3 die agonistische Potenz der antagonistischen Potenz gegenüber.

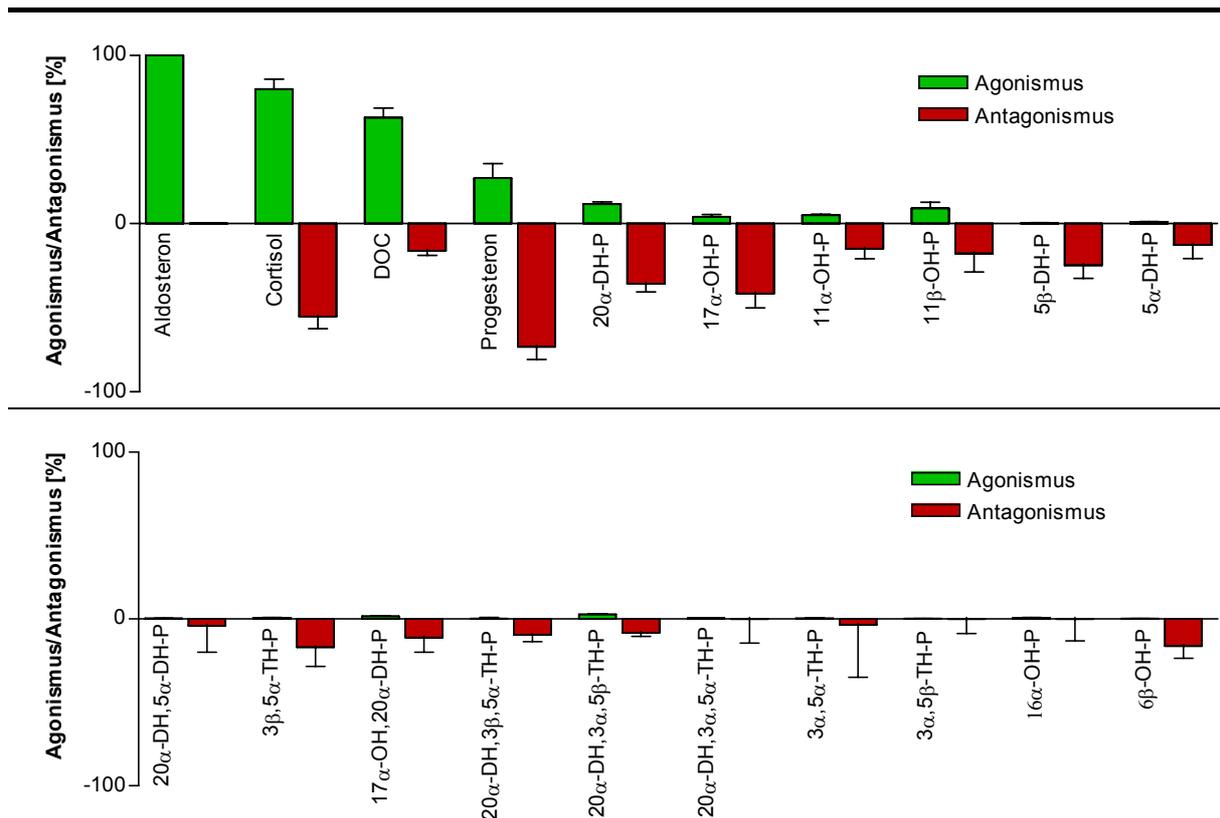


Abbildung 5.3: Übersicht über die maximal erreichte Transaktivierung im eingesetzten Konzentrationsbereich als Maß für die agonistische Potenz (Konzentrationsbereich 10^{-11} mol/l bis 10^{-6} mol/l) und die Minderung der Transaktivierung als Maß für die antagonistische Potenz bei 100fachem Überschuss des Kompetitors (Aldosteron 10^{-9} mol/l, Kompetitor 10^{-7} mol/l, $n=4$, MW \pm SEM)

5.2 Rezeptorbindungsstudien

5.2.1 Scatchard-Experiment

Im Rahmen des Scatchard-Experiments des *in vitro* hergestellten hMR wurde der K_d -Wert mittels nichtlinearer Regression nach Abzug der ermittelten unspezifischen Bindung mittels GraphPad Prism[®] 3.0-Software bestimmt. Es ergab sich für [³H]Aldosteron am hMR ein K_d -Wert von $5,2 \pm 1,8$ nmol/l ($MW \pm SEM$). Abbildung 5.4 zeigt exemplarisch die ermittelten Punktwerte und die ermittelte Funktion für die spezifische Bindung.

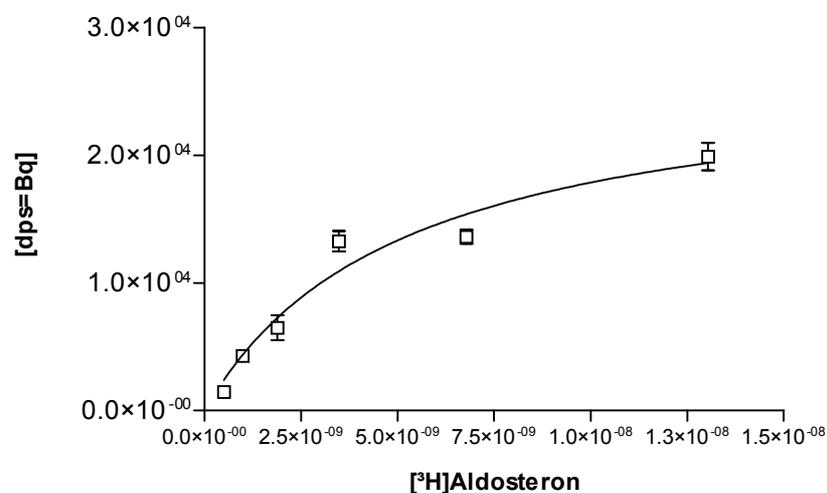


Abbildung 5.4: Darstellung der spezifischen Bindung von [³H]Aldosteron in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration am hMR
($n=2$, $MW \pm SEM$)

5.2.2 Wettbewerbsversuche

Die Bindungsaffinitäten der untersuchten Steroide zum hMR wurden im Rahmen der Wettbewerbsversuche ermittelt, wobei als zu verdrängender Tracer [³H]Aldosteron eingesetzt wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.5 graphisch dargestellt. Die Gegenüberstellung der im Transfektionsmodell ermittelten $EC_{50(Aldo)}$ - und $IC_{50(Aldo)}$ -Werte und der aus den Wettbewerbsversuchen berechneten K_i -Werte zeigt die Tabelle 5.1.

Progesteron und 11 β -OH-Progesteron zeigen mit K_i -Werten von 1,5 bzw. 2,4 nmol/l eine etwas höhere Bindungsaffinität zum hMR als Cortisol (K_i 3,3 nmol/l), DOC (K_i 3,6 nmol/l) und Aldosteron (K_i 4,0 nmol/l). Progesteron führt bereits bei der niedrigsten standardmäßig eingesetzten Konzentration von 10^{-11} mol/l zu einer Minderung der [³H]Aldosteronbindung um etwa 20%. Bei einer aus diesem Grund nur für Progesteron eingesetzten Konzentration

von 10^{-13} mol/l zeigte sich immer noch eine Verdrängung von $[^3\text{H}]$ Aldosteron von 9% (nicht graphisch dargestellt).

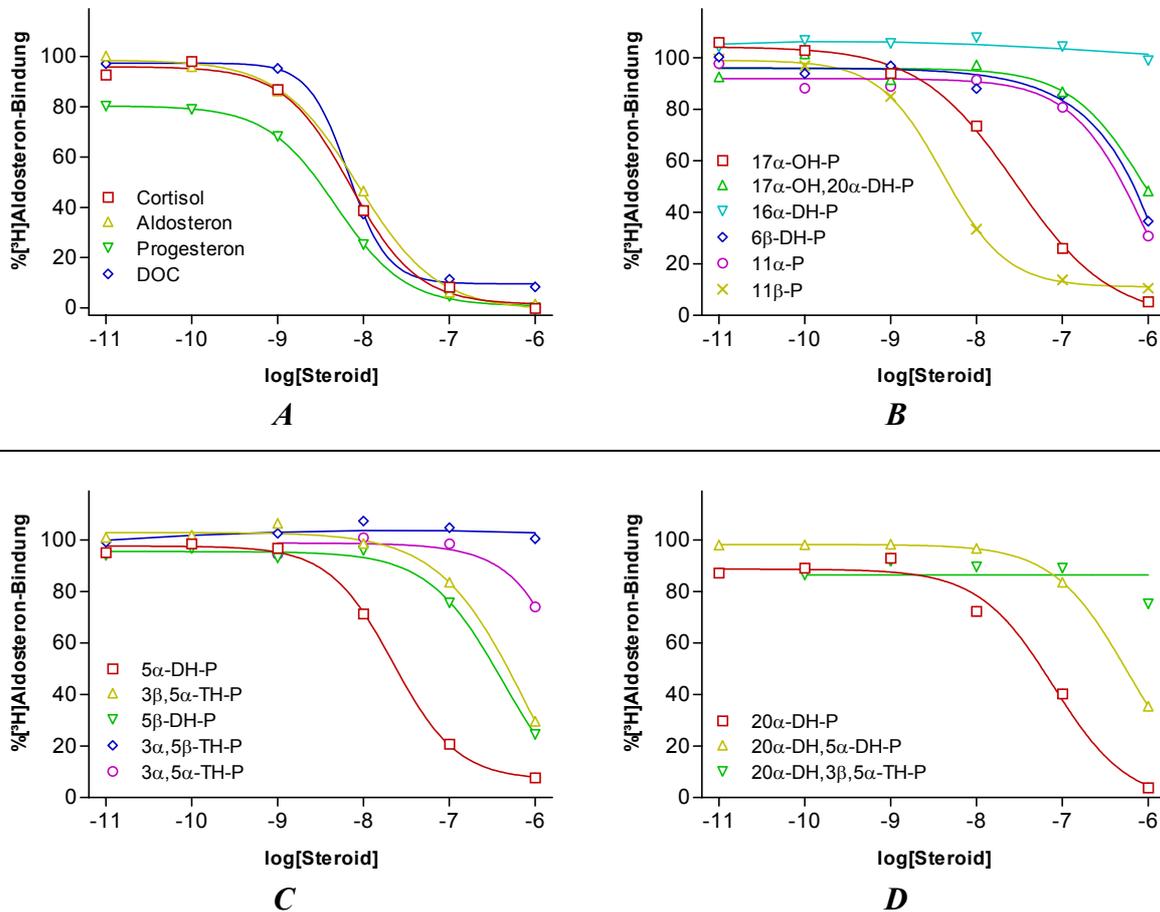


Abbildung 5.5: Darstellung der anteiligen Verdrängung von $[^3\text{H}]$ Aldosteron durch die 20 untersuchten Steroide aus der Bindung an den hMR im Kompetitionsversuch (100% $[^3\text{H}]$ Aldosteronbindung entspricht der gebundenen Aktivität bei Zugabe von $[^3\text{H}]$ Aldosteron alleine in der eingesetzten Konzentration von 5nmol/l)

Im Vergleich zu Progesteron zeigen die Progesteronmetabolite 20α -DH-Progesteron, 5α -DH-Progesteron und 17α -OH-Progesteron eine um etwa eine Zehnerpotenz geringere Bindungsaffinität. Noch geringer stellt sich die Affinität der Metabolite 5β -DH-Progesteron, $3\beta,5\alpha$ -TH-Progesteron, 11α -OH-Progesteron, 20α -DH, 5α -DH-Progesteron, 6β -OH-Progesteron und 17α -OH, 20α -DH-Progesteron mit K_i -Werten im Bereich von 169 nmol/l bis 455 nmol/l dar. Alle anderen untersuchten Metabolite zeigten im untersuchten Konzentrationsbereich eine noch geringere bzw. fehlende Affinität zum hMR.

Die im Rahmen der Transfektionsversuche untersuchten Substanzen 20 α -DH,3 α ,5 α -TH-Progesteron und 20 α -DH,3 α ,5 β -TH-Progesteron wurden im Wettbewerbsversuch nicht eingesetzt, da bereits 3 α ,5 α -TH-Progesteron und 3 α ,5 β -TH-Progesteron keine Bindungsaffinität zum hMR zeigten und die C₂₀-Reduktion zu einem weiteren Affinitätsverlust führt.

Zusammenfassend stellt die Tabelle 5.1 die Ergebnisse der Transfektionsversuche und der Wettbewerbsversuche für die untersuchten Steroide dar.

Tabelle 5.1: Darstellung der in den Wettbewerbsversuchen ermittelten K_i -Werte und der in den Transfektionsversuchen ermittelten $EC_{50(Aldo)}$ und $IC_{50(Aldo)}$ -Werte.

	K_i [nmol/l]	$EC_{50(Aldo)}$ [nmol/l]	$IC_{50(Aldo)}$ [nmol/l]
Progesteron	1,5	>1000	9,2
11 β -OH-Progesteron	2,4	>1000	>1000
Cortisol	3,3	0,40	30,0
DOC	3,6	0,06	>1000
Aldosteron	4,0	0,05	---
5 α -DH-Progesteron	11,8	>1000	434,6
17 α -OH-Progesteron	14,8	>1000	132,4
20 α -DH-Progesteron	28,7	>1000	185,7
5 β -DH-Progesteron	169,2	>1000	428,4
3 β ,5 α -TH-Progesteron	237,9	>1000	548,9
11 α -OH-Progesteron	257,2	>1000	692,9
20 α -DH, 5 α -DH-Progesteron	268,6	>1000	>1000
6 β -OH-Progesteron	335,5	>1000	710,5
17 α -OH, 20 α -DH-Progesteron	455,1	>1000	>1000
16 α -OH-Progesteron	>1000	>1000	>1000
3 α ,5 α -TH-Progesteron	>1000	>1000	>1000
3 α ,5 β -TH-Progesteron	>1000	>1000	>1000
20 α -DH,3 β ,5 α -TH-Progesteron	>1000	>1000	>1000
20 α -DH,3 α ,5 α -TH-Progesteron	n. b.	>1000	>1000
20 α -DH,3 α ,5 β -TH-Progesteron	n. b.	>1000	>1000

5.3 Progesteroninfusionsstudie

Im Rahmen der Progesteroninfusionsstudie wurde der Effekt von parenteral verabreichtem Aldosteron und Progesteron auf die Elektrolytexkretion über den Urin als Parameter für die Aktivierung bzw. Hemmung des Mineralocorticoidrezeptors bestimmt.

In Tabelle 4.7 (S. 55) wird die Ätiologie der Nebenniereninsuffizienz der in die Studie eingeschlossenen Addison-Patienten aufgeführt, Tabelle 5.2 zeigt die zu Beginn der Studie bestimmten Albumin-, SHBG- und Kreatininkonzentrationen im Serum.

Bei keinem der Probanden lag eine Erhöhung des Kreatininwertes im Serum als Zeichen einer eingeschränkten Nierenfunktion vor. Die Albuminkonzentration im Serum lag bei allen Probanden im Referenzbereich für gesunde Probanden. Bei drei Probanden lag die SHBG-Konzentration im Serum leicht über dem Referenzbereich für gesunde Probanden.

Tabelle 5.2: Darstellung der ermittelten Serum-Albumin, Serum-SHBG und Serum-Kreatininwerte und der zugehörigen Referenzbereiche für gesunde Probanden. (Einfachbestimmungen zum Zeitpunkt $t=0h$)

Nr.	Patient	Geschlecht	Serum-Albumin [g/l]	Serum-SHBG [nmol/l]	Serum-Kreatinin [μmol/l]
Referenzbereich (für gesunde Probanden):			38 – 51 g/l	♂ 13 – 55 nmol/l ♀ 30 – 95 nmol/l	♂ 58 – 110 μmol/l ♀ 50 – 98 μmol/l
W1	I. B.	♀	35,5	136	79
W2	K. S.	♀	45,3	136	81
M1	U. W.	♂	38,2	49	84
W3	M. K.	♀	44,5	218	80
M2	K.-W. K.	♂	42,6	47	83
M3	P.W.	♂	45,0	53	100
M4	N.W.	♂	38,9	44	71
M5	B. B.	♂	40,4	153	74

Zu Beginn der Studie zeigten die Patienten auf Grund der abgesetzten Mineralocorticoidsubstitution Aldosteronkonzentrationen im Plasma von unter 0,06 nmol/l (Abbildung 5.6 A) und befanden sich in einem leicht hypomineralocorticoiden Zustand, was im erhöhten Natrium/Kalium-Quotienten Ausdruck findet (Abbildung 5.8 D). Unter der

kontinuierlichen Aldosteroninfusion erreichten die Probanden während des

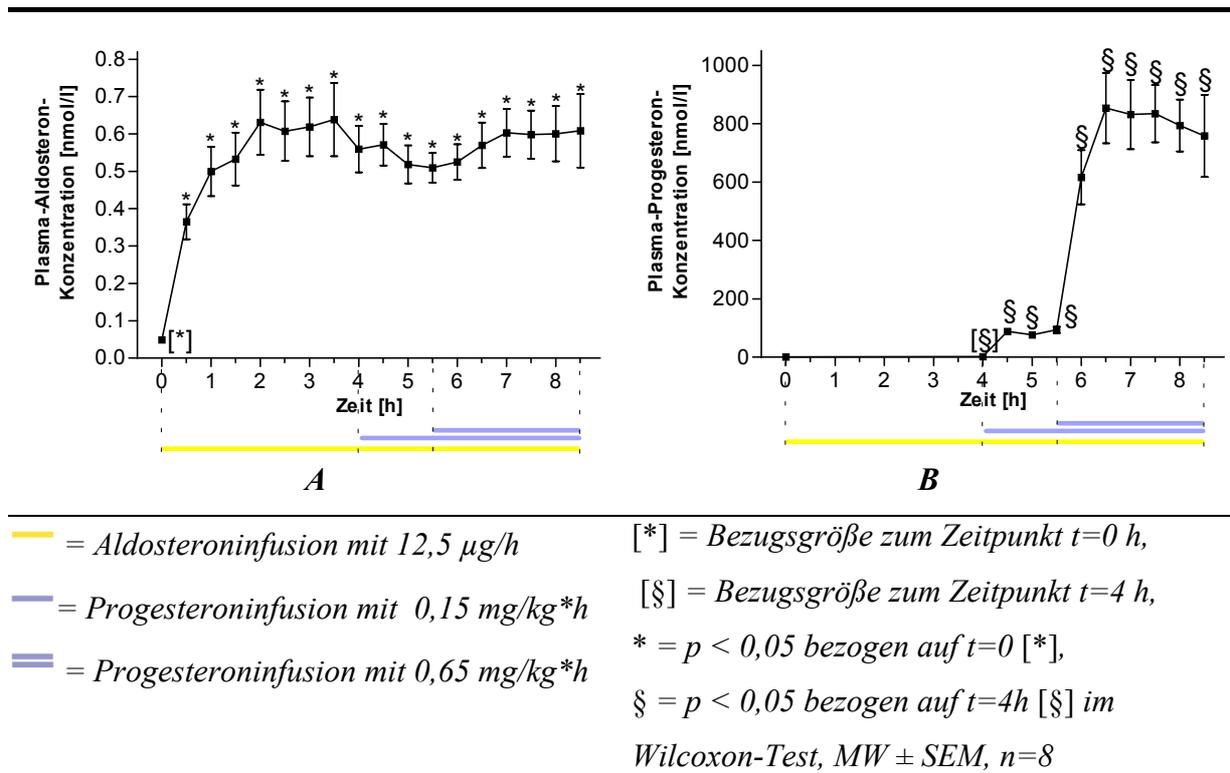


Abbildung 5.6: Darstellung der Aldosteron- (A) und Progesteronkonzentration (B) im Plasma

gesamten Zeitraums der Studie Aldosteronkonzentrationen (Abbildung 5.6 A), die denen von gesunden, nicht schwangeren Probanden entsprechen (0,2 - 1 nmol/l). Ebenso war auf Grund der Aldosteroninfusion in den ersten vier Stunden (unter alleiniger Aldosteroninfusion) ein signifikanter Abfall des Natrium/Kalium-Quotienten zu verzeichnen (Abbildung 5.8 D), der überwiegend auf die verminderte Natriumexkretion und weniger auf die gesteigerte Kalium-Exkretion zurückzuführen war (Abbildung 5.8 A + B). Die Chloridexkretion im Urin (Abbildung 5.8 C) sowie die Reninkonzentration im Plasma (Abbildung 5.10 F) zeigten keine signifikante Änderung während dieses Zeitraums. Das Urinvolumen stieg während der Infusionen signifikant auf etwa 140ml/30min an (Abbildung 5.8 E).

Nach vier Stunden wurde mit der Progesteroninfusion begonnen, wobei dies von den Probanden gut toleriert wurde. Über einen Zeitraum von 90 Minuten wurde Progesteron in niedrigen Dosen verabreicht. Danach wurde über einen Zeitraum von 3 Stunden die Progesteroninfusion mit höheren Dosen fortgeführt. In halbstündlichen Abständen wurden die Probanden nach ihren Befinden befragt. Insbesondere wurde auf den möglichen Eintritt von Übelkeit hingewiesen, wobei keiner der Probanden dies bestätigte. Alle Probanden

berichteteten jedoch etwa eine Stunde nach dem Beginn der Progesteroninfusion über Müdigkeit.

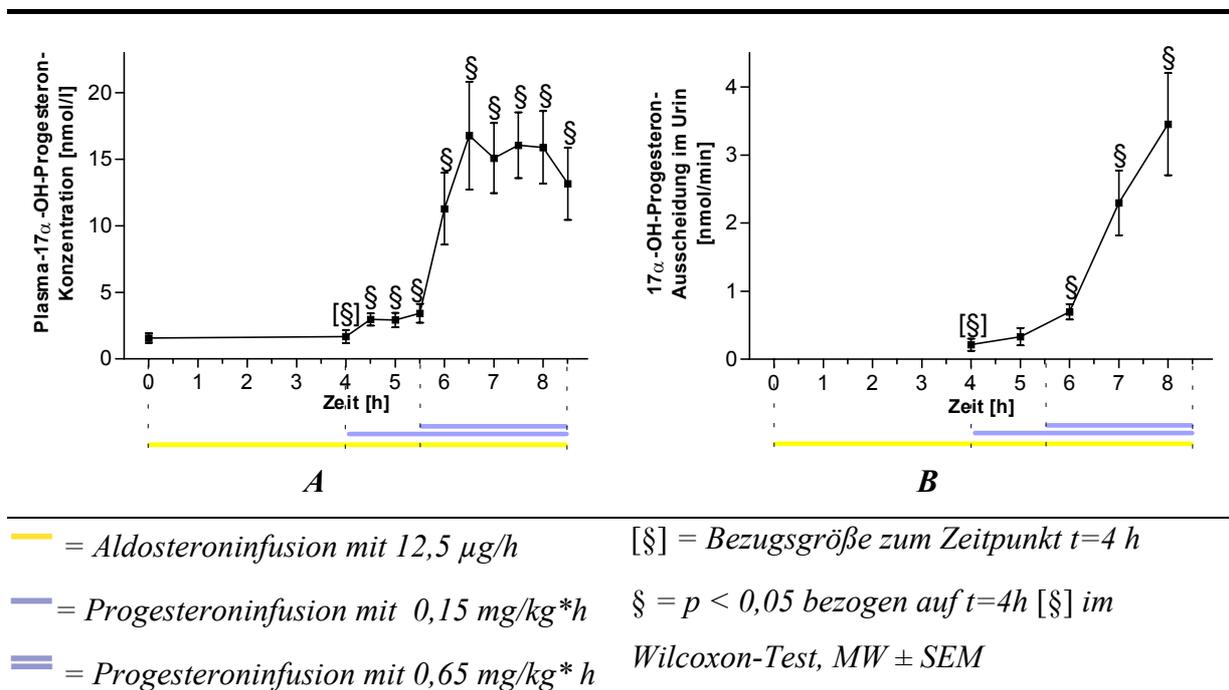
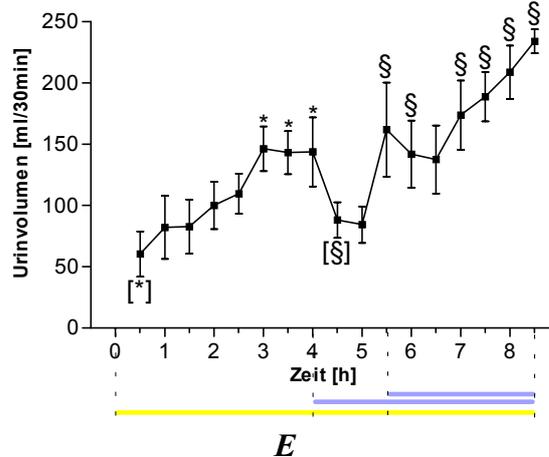
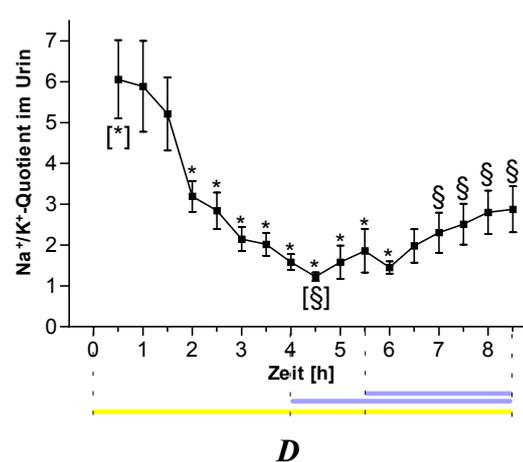
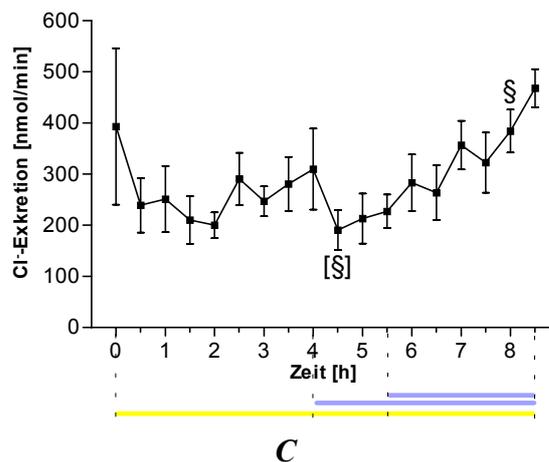
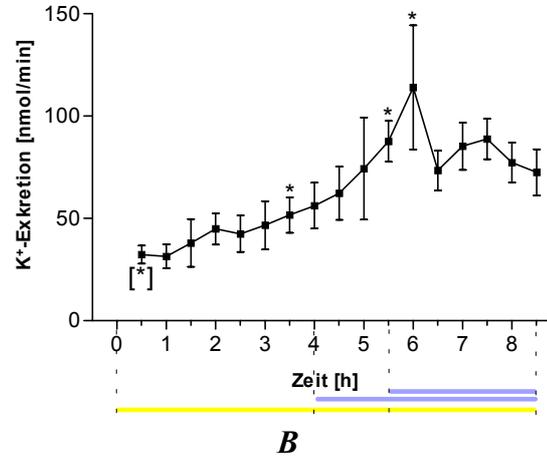
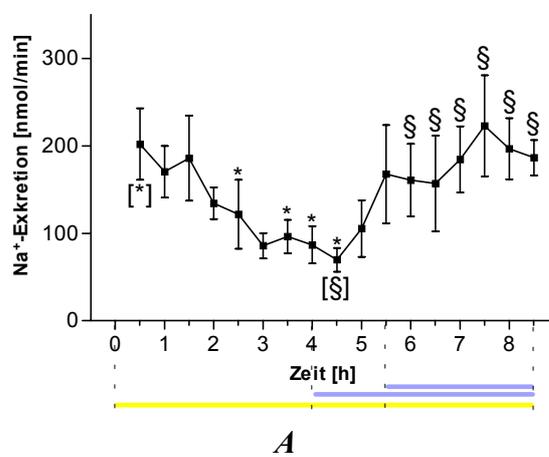


Abbildung 5.7: Darstellung der 17α-OH-Progesteron-Konzentration im Plasma (A) und 17α-OH-Progesteron-Ausscheidung im Urin (B)

In der ersten Phase der niedrigdosierten Progesteroninfusion stiegen die Progesteronkonzentration (Abbildung 5.6 B) und 17α-Hydroxy-Progesteronkonzentration (Abbildung 5.7 A) leicht an (94 ± 11 nmol/l bzw. $2,9 \pm 0,6$ nmol/l). Die erreichten Progesteronkonzentrationen entsprachen somit in etwa den in der zweiten Zyklushälfte auftretenden Werten (30 - 110 nmol/l) [69, 123]. Während der zweiten Phase der höherdosierten Progesteroninfusion zeigte sich ein wesentlich stärker ausgeprägter Anstieg der Progesteronkonzentration (830 ± 119 nmol/l, Abbildung 5.6 B) und der 17α-Hydroxy-Progesteronkonzentration ($16 \pm 2,6$ nmol/l, Abbildung 5.7 A), wobei die gemessenen Progesteronkonzentrationen im Plasma in etwa denen im dritten Trimenon der Schwangerschaft entsprechen bzw. diese sogar leicht übersteigen (320 - 700 nmol/l) [69, 123]. Berücksichtigt man die starke Plasmaproteinbindung des Progesterons von etwa 95 bis 97% [37], so lagen Konzentrationen von freiem Progesteron von 25 bis 42 nmol/l vor. Demnach betrug der Quotient aus 17α-Hydroxy-Progesteronkonzentration und freier Progesteronkonzentration im Plasma 38% bis 65%.

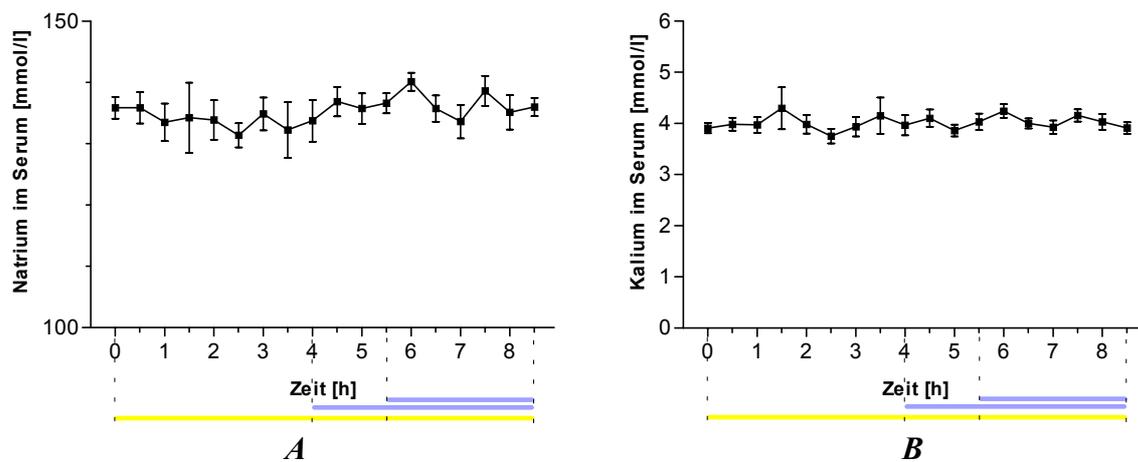
Der Natrium/Kalium-Quotient im Urin (Abbildung 5.8 D) sowie die Natriumexkretion im Urin (Abbildung 5.8 A) zeigten einen signifikanten Anstieg unter der Progesteroninfusion



— = Aldosteroninfusion mit 12,5 µg/h,
 — = Progesteroninfusion mit 0,15 mg/kg*h,
 — = Progesteroninfusion mit 0,65 mg/kg*h,
 [*] = Bezugsgröße zum Zeitpunkt t=0:30 h,
 [§] = Bezugsgröße zum Zeitpunkt t=4:30 h,
 * = p < 0,05 bezogen auf t=0:30 h [*],
 § = p < 0,05 bezogen auf t=4:30 h [§]
 im Wilcoxon-Test, MW ± SEM

Abbildung 5.8: Darstellung der bestimmten Natrium- (A), Kalium- (B) und Chlorid-Exkretion (C) sowie des Natrium/Kalium-Quotienten (D) im Urin und des Urinvolumens (E)

(Natrium/Kalium-Quotient: $1,23 \pm 0,11$ auf $2,8 \pm 0,5$; Natriumexkretion 70 ± 13 auf 222 ± 58 nmol/l), jedoch erreichte der Natrium/Kalium-Quotient nicht die zu Beginn der Studie im hypomineralocorticoiden Zustand zu verzeichnenden Werte. Die Chloridexkretion im Urin (Abbildung 5.8 C) und die 17α -Hydroxy-Progesteronkonzentration im Urin zeigten einen signifikanten Anstieg unter der Progesteroninfusion. Der Blutdruck der Probanden (Tabelle 5.3), die Natrium- und Kaliumkonzentration im Serum (Abbildung 5.9 A + B) sowie die Reninkonzentration im Plasma (Abbildung 5.10 F) zeigten keine signifikanten Änderungen.

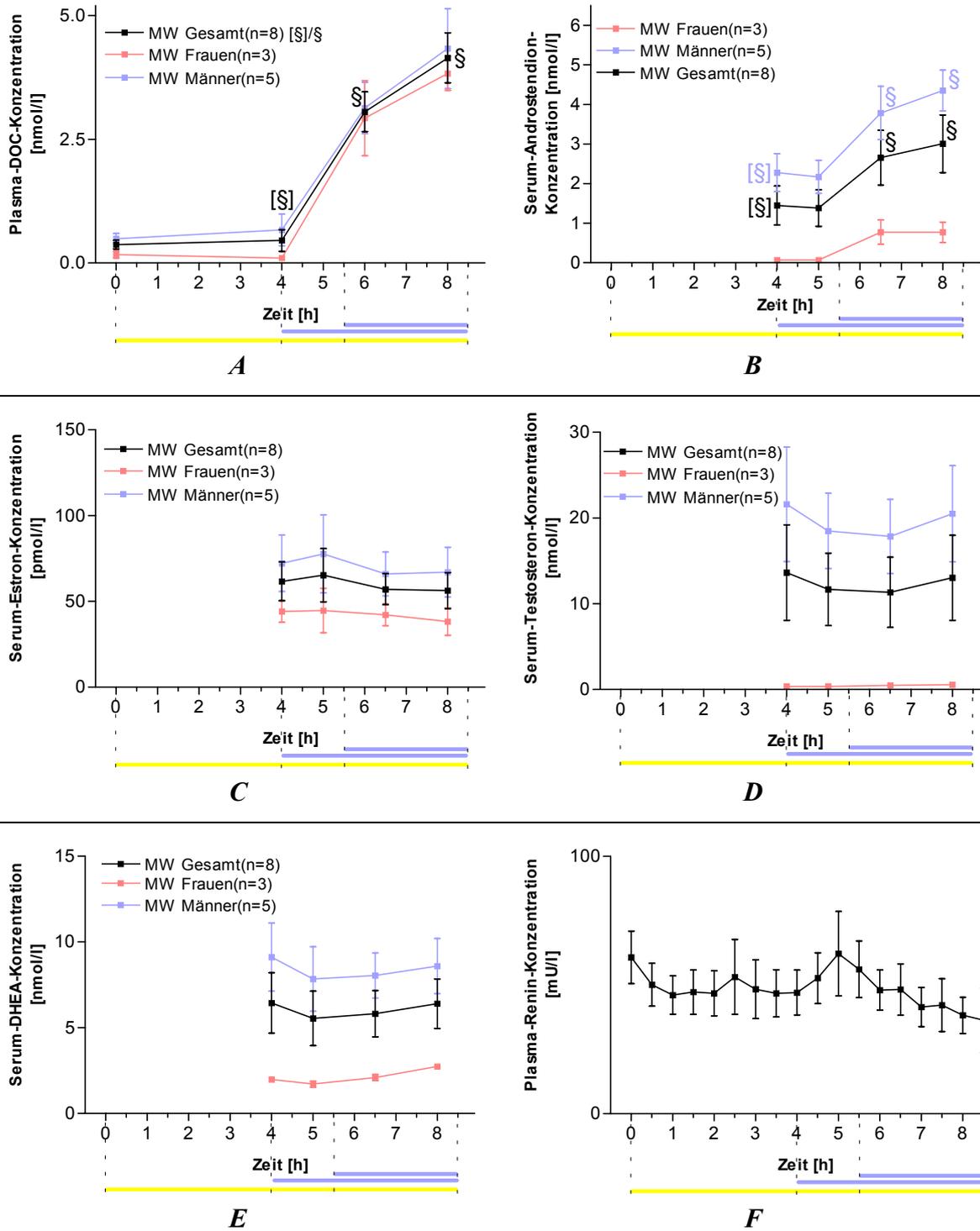


— = Progesteroninfusion mit $0,15 \text{ mg/kg} \cdot \text{h}$, — = Progesteroninfusion mit $0,65 \text{ mg/kg} \cdot \text{h}$,
 — = Aldosteroninfusion mit $12,5 \text{ } \mu\text{g/h}$, $MW \pm SEM$

Abbildung 5.9: Natrium- (A) und Kaliumkonzentration (B) im Serum

Tabelle 5.3: unblutiger Blutdruck (RR, systolisch/diastolisch nach Riva-Rocci im [mmHg]) und Puls (P, in [min^{-1}]) der Probanden zu den Zeitpunkten $t = 0, 2\text{h}, 4\text{h}, 6\text{h}$ und 8h

Proband	t = 0		t = 2:00 h		t = 4:00 h		t = 6:00		t = 8:00	
	RR	P	RR	P	RR	P	RR	P	RR	P
W1	108/76	88	113/81	80	104/73	92	100/72	88	117/84	86
W2	152/96	64	140/90	62	114/86	64	121/88	64	117/84	86
M1	125/70	61	124/70	60	129/74	70	129/64	56	119/65	58
W3	120/74	79	126/69	68	124/80	70	132/86	83	117/69	70
M2	120/80	69	127/80	67	124/85	66	138/71	74	134/83	74
M3	124/82	87	132/88	65	132/84	71	132/83	70	131/84	70
M4	125/70	66	120/62	54	136/72	52	118/77	62	124/78	49
M5	119/70	76	130/64	68	135/67	74	136/68	75	132/64	72



— = Aldosteroninfusion mit 12,5 µg/h

— = Progesteroninfusion mit 0,15 mg/kg*h

— = Progesteroninfusion mit 0,65 mg/kg*h

[§] = Bezugsgröße zum Zeitpunkt t=4h

§ = p < 0,05 bez. auf t=4h [§] im Wilcoxon-T.

MW ± SEM, n=8 bzw. 3 (♀) und 5 (♂)

Abbildung 5.10: Darstellung der bestimmten Hormonkonzentrationen für DOC (A), Androstendion (B), Estron (C), Testosteron (D), DHEA (E) sowie der Reninkonzentration (F)

Unter der Progesteroninfusion zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Androstendionkonzentration im Blut der Probanden, wobei bei den männlichen Probanden höhere Androstendionkonzentrationen gemessen werden konnten als bei den postmenopausalen Frauen (Abbildung 5.10 B). Des Weiteren war ein signifikanter Anstieg der gemessenen DOC-Konzentrationen im Serum der Probanden unter der Progesteroninfusion zu verzeichnen (Abbildung 5.10 A).

Im Gegensatz dazu blieben die gemessenen Konzentrationen im Serum von Estron, Testosteron und DHEA im Verlauf der Infusionsstudie unverändert (Abbildung 5.10 C, D und E).

Da die Probanden keine intakte endogene Cortisolsynthese aufwiesen und die letzte Cortisolsubstitution am Vorabend erfolgte, wurde den Probanden am Studientag Prednisolon verabreicht, um eine Addisonkrise zu verhindern.

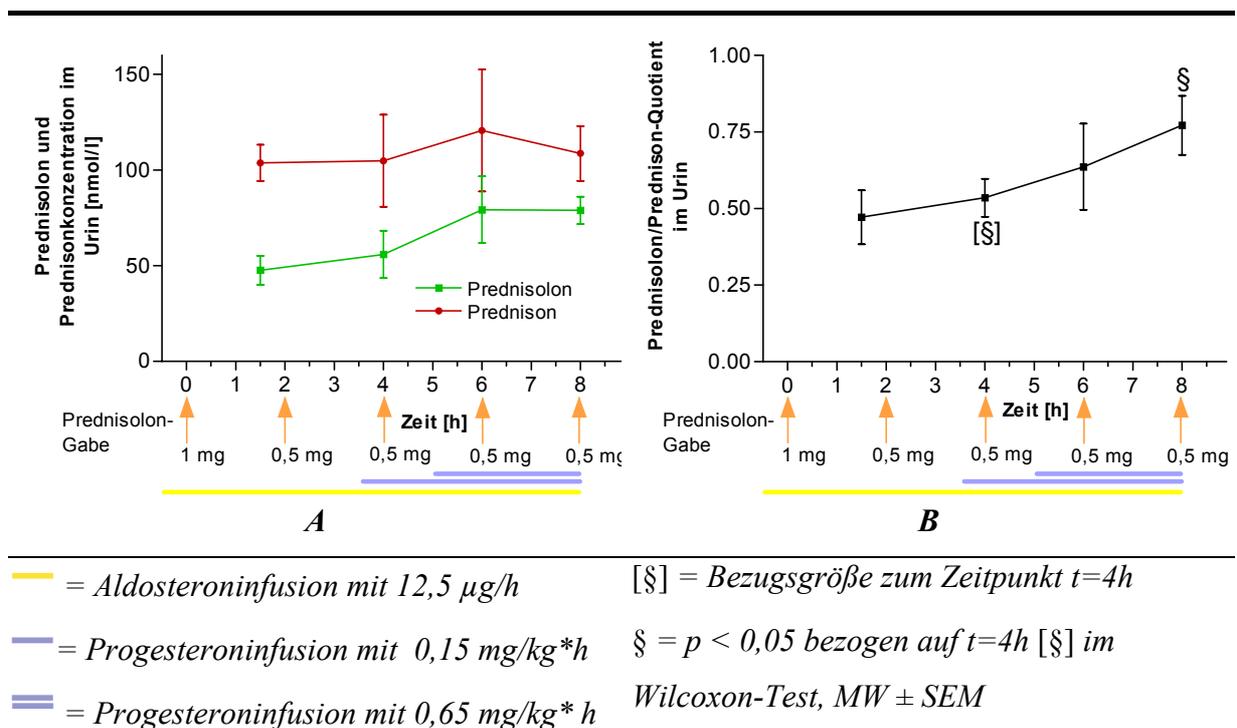


Abbildung 5.11: Darstellung der bestimmten Prednisolon- und Prednisololkonzentrationen (A) und des Prednisolon/Prednisolon-Quotienten (B) im Urin

Um die Aktivität der 11 β -HSD Typ 2 in der menschlichen Niere zu charakterisieren, wurde der Prednisolon/Prednisolon-Quotient im Urin bestimmt. Hierzu konnten auf Grund von Interferenzen im Rahmen der HPLC nur Urinproben von sechs der insgesamt acht Probanden herangezogen werden.

Wie in Abbildung 5.11 dargestellt, stellte sich unter der Progesteroninfusion ein signifikanter Anstieg des Prednisolon/Prednison-Quotienten ein.