

6. Diskussion

6.1. Kritik der Methodik

6.1.1. Untersuchungssystem Mikrosomen

Leber- und Nierenrindemikrosomen sind gut etablierte Systeme zur Untersuchung der 11- β -Hydroxysteroiddehydrogenasen. Sowohl mit enzymkinetischen wie auch mit molekularbiologischen Methoden konnte gezeigt werden, dass in der Leber praktisch ausschließlich 11- β -HSD 1 und in der Nierenrinde nur 11- β -HSD 2 vorliegt [34, 49].

Die hier ermittelten Initialgeschwindigkeiten für bereits untersuchte Substanzen (Cortisol, 9-fluoro-Cortisol, Dexamethason) liegen im Bereich der in der Literatur beschriebenen V_{max} -Werte [49]. Die verwendeten Pools von 6 Individuen für die Nieren- bzw. 15 für die Lebermikrosomen sollte eine Verfälschung der Ergebnisse durch interindividuelle Unterschiede der Enzymaktivität weitgehend ausschließen. Allerdings litten alle diese Patienten an malignen Erkrankungen, und eine eventuelle Beeinflussung der Aktivität der 11- β -HSD in nicht betroffenem Nieren- oder Lebergewebe ist denkbar. So sind bei metastasierenden Malignomen meist die Akutphase-Proteine erhöht, und für diese Zustände ist eine Enzyminduktion der 11- β -HSD 1 beschrieben [39, 40]. Nephrektomierte Patienten zeigen wiederum eine verminderte Expression der 11- β -HSD 2 in der verbleibenden Niere [59]. Gewebe von gesunden Individuen – z.B. von Traumapatienten – dürfte allerdings schwer zu beschaffen sein, zudem auch ein traumatisch bedingter Schockzustand die Aktivität der Enzyme beeinflussen könnte [60, 61]. Problematisch für die Interpretation der Ergebnisse ist weiterhin die Mittelstellung des Mikrosomensystems zwischen einer isolierten Darstellung des zu untersuchenden Proteins und einer den Verhältnissen *in vivo* näher kommenden Untersuchungstechnik, etwa an Gewebeschnitten oder im physiologischen Tiermodell.

Eine Optimierung von pH und Kosubstratangebot ermöglicht zwar durch die standardisierten Reaktionsbedingungen eine bessere Vergleichbarkeit einzelner Versuchsreihen, lässt aber nur noch beschränkte Rückschlüsse auf die Relevanz unter physiologischen Bedingungen zu. Andererseits lassen sich durch Berücksichtigung der Oxidations- und Reduktionsgeschwindigkeiten relativ valide Aussagen für das *in vivo* Reaktionsgleichgewicht ableiten [54].

Gleichzeitig bleiben Mikrosomen ein biologisches System, so dass eine Beeinflussung der Ergebnisse durch bisher unbekannte Faktoren, etwa weitere Isoformen der 11- β -HSD oder diese beeinflussende Kofaktoren, nicht auszuschließen ist [62, 63].

6.1.2. Steroidsynthese und Analytik

Die Untersuchung der 11-Reduktaseaktivität erforderte die Verwendung von 11-Dehydroderivaten einer großen Anzahl von Steroiden. Außer Cortison und Prednison sind diese nicht kommerziell erhältlich, und die Synthese durch pharmazeutische Unternehmen ist sehr kostspielig. Etliche 11-DH-Derivate wurden uns als Geschenk zur Verfügung gestellt, trotzdem mussten einige selbst hergestellt werden. Eine eindeutige Identifikation des Produkts durch die *gold standard* Verfahren Massenspektrometrie und nukleare Magnetresonanz wurde nur bei zwei Substanzen durchgeführt, dem 11-DH-Dexamethason und dem 11-DH-Diflucortolon, die weiteren Produkte wurden nach Reinheitsprüfung mit DC und HPLC im Vertrauen auf die Methode verwendet. Da es sich ausschließlich um halogenierte Substanzen handelt, die durch beide Mikrosomentypen reduziert wurden, und das Produkt in der HPLC-Analyse der korrespondierenden 11-Hydroxy-Substanz entsprach, kann von einer hinreichenden Identifizierung ausgegangen werden. Verunreinigungen, die deutlich polarer sind als die untersuchten Substanzen, wären durch die aufeinander folgenden HPLC-Läufe in einem späteren Lauf als unregelmäßiger Peak aufgefallen, stark apolare Substanzen wären aber in den stets sehr ausgeprägten Injektionspeak geraten und so nicht bemerkt worden.

6.1.3. Datenerfassung und Auswertung

Bedingt durch den niedrigen K_m -Wert der 11- β -HSD 2, sowohl für Cortisol wie auch für Dexamethason, und die relativ hohe Detektionsschwelle der UV-Absorption konnten keine kompletten Enzymkinetiken erstellt werden [48, 57]. Wir begnügten uns mit der Ermittlung der Initialgeschwindigkeit V_0 , also der Bestimmung der Umsatzgeschwindigkeit im quasi linearen Bereich, bevor eine Produkthemmung stattfindet. Besonderheiten in der Enzymkinetik für einzelne Substanzen konnten somit nicht erfasst werden. Die Anzahl der Replikate und die Messabweichung ermöglichte hinreichende Signifikanz. Da jeweils die V_0 von Substanzen verglichen wurde, die eine einzelne Modifikation in der Molekülstruktur aufwiesen, verwendeten wir einen zweiteiligen t-Test für gepaarte Stichproben.

6.2. Interpretation der Ergebnisse

6.2.1. Metabolismus in Nieren- und Lebermikrosomen

Die Versuche ergaben folgende Effekte verschiedener Modifikationen des Cortisolmoleküls auf Oxidation und Reduktion:

Halogenierung – Niere
<ul style="list-style-type: none"> § 9α-Fluorierung oder 6α-Fluorierung hemmt bei allen untersuchten Substanzen signifikant die Oxidation und ist Voraussetzung für eine Reduktion in NRM.
Halogenierung – Leber
<ul style="list-style-type: none"> § Es erfolgt keine Oxidation halogenerter 11-Hydroxysteroiden. § Es erfolgt keine Reduktion unhalogenerter 11-Dehydrosteroiden.

Ring(A)-Konfiguration – Niere
<ul style="list-style-type: none"> § Die Δ1-Dehydro-Stellung des Prednisolonmoleküls begünstigt die Oxidation. Prednisolon wird durch NRM stärker oxidiert und damit inaktiviert als Cortisol. § Dieser Effekt wird durch die 9α-Fluorierung aufgehoben: 9-fluoro-Cortisol und 9-fluoro-Prednisolon werden gleich stark oxidiert. § Prednison und Cortison werden nicht reduziert, 9-fluoro-Prednison wird aber deutlich stärker reduziert als 9-fluoro-Cortison, so dass die Δ1-Dehydrokonfiguration sowohl Oxidation als auch Reduktion begünstigt.
Ring(A)-Konfiguration – Leber
<ul style="list-style-type: none"> § Prednisolon wird auch hier stärker oxidiert als Cortisol. § Fluorierte Steroide mit Prednisolonstruktur werden stärker reduziert als solche mit Cortisolstruktur. § Somit hat die Δ1-Dehydrokonfiguration auch bei der hepatischen HSD 1 einen begünstigenden Effekt auf Oxidation und Reduktion.

6 α -Methylierung – Niere

- § 6 α -Methylierung vermindert signifikant die Oxidation in NRM.
- § Die Reduktion des 9-fluoro-Derivates wird nicht beeinflusst.

6 α -Methylierung – Leber

- § Kein Einfluss auf Oxidation oder Reduktion

16-Methylierung – Niere

- § Die Methylgruppe in 16 α -Stellung behindert die Oxidation stärker als in 16 β -Stellung. Dieser sterische Effekt besteht auch bei den 9 α -fluorierten Korrespondenten Dexamethason und Betamethason.
- § Die Reduktion wird durch 16-Methylierung behindert, wobei hier die 16- β -Methylierung den stärkeren Effekt hat.

16-Methylierung – Leber

- § 16 α - (aber nicht 16 β)-Methylierung vermindert Oxidation und Reduktion.

17-Hydroxylierung – Niere

- § Diflucortolon (ein Corticosteronderivat) und Flumethason (ein Cortisolderivat) zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Oxidation, so dass die 17-OH-Gruppe keinen Effekt auf die Oxidation zu haben scheint.
- § Diflucortolon wird signifikant stärker reduziert als Flumethason, die 17-OH-Gruppe begünstigt also hier die Reduktion.

17-Hydroxylierung – Leber

- § 11-DH-Diflucortolon wird stärker reduziert als 11-DH-Flumethason, die 17-OH-Gruppe stimuliert also auch die Reduktion durch hepatische HSD 1.

21-Hydroxylierung – Niere

§ 21-Desoxymethason zeigte keinen Unterschied in Oxidation oder Reduktion, so dass die 21-OH-Gruppe keinen Effekt auf die HSD hat.

6.2.2. Halogenierte Steroide

Der Effekt der Halogenierung ist nicht überraschend und entspricht den Voruntersuchungen [48, 49]. Auch hier findet sich bei den fluorierten Substanzen ein weit auf der Seite der Reduktion liegendes Gleichgewicht für beide 11- β -HSD-Isoformen.

Alle fluorierten 11-Dehydrosteroiden werden durch die hepatische 11- β -HSD 1 effektiv reduziert und damit aktiviert. Die Oxidation durch die renale 11- β -HSD 2 ist abgeschwächt; das Gleichgewicht liegt deutlich bei den reduzierten Substanzen.

Würden die Untersuchungsbedingungen den physiologischen Gegebenheiten entsprechen, wäre also zu erwarten, dass die fluorierten Substanzen bei gleicher Dosierung potentere Glukokortikoide sind, da sie durch die hepatische 11- β -HSD 1 fast ausschließlich reduziert werden und somit das Gleichgewicht von 11-Dehydro- zu 11-Hydroxysteroiden im Plasma weit auf der Seite der aktiven Substanz liegt.

Entsprechend sollte sich die mineralokortikoide Potenz verhalten, da die renale 11- β -HSD 2 ihrer Torwächterfunktion für Steroide mit MR-Affinität nicht nachkommen kann [64].

Grundstruktur	Modifikation	Einfluss auf die antiinflammatorische Potenz	Einfluss auf die mineralokortikoide Potenz
Cortisol	9-fluoro-	++	+++
Prednisolon	9-fluoro-	++	++++
6α-methyl-Prednisolon	9-fluoro-	++	o
16α-methyl-Prednisolon	9-fluoro-	++	o

Tabelle 9: Einfluss des Substituenten auf die physiologischen Wirkungen (nach *Bush* und *Fried*)

Im Vergleich mit den Daten von *Fried et al.* bestätigt sich diese Hypothese. Es findet sich eine massive Steigerung der glukokortikoiden Potenz bei allen halogenierten Substanzen, eine

Erhöhung der mineralokortikoiden Wirkung aber nur bei Cortisol und Prednisolon. Bei Prednisolon wird die im Vergleich zu Cortisol verminderte Wirkung auf die Natriumretention durch die Halogenierung vollständig aufgehoben: 9-fluoro-Cortisol und 9-fluoro-Prednisolon sind als Mineralokortikoide gleich potent [27]. Der hemmende Einfluss der Methylierung auf die Natriumretention bleibt dagegen durch die Fluorierung unbeeinflusst.

6.2.3. Methylierte Steroide

Der Einfluss der 6 α -Methylierung ist interessant, weil das 6 α -methyl-Prednisolon klinisch eingesetzt wird (in Deutschland z.B. als Urbason®). In unserem Versuch wurde das 11-Dehydro-Derivat der Substanz nicht reduziert, zeigte aber gegenüber Prednisolon und Cortisol eine geringere Oxidation in hepatischen und renalen Mikrosomen. Was den Einfluss der 11- β -HSD angeht, sollte die Substanz also als Gluko- und Mineralokortikoid stärker als Cortisol und Prednisolon, aber schwächer als die fluorierten Steroide wirken.

Grundstruktur	Modifikation	Einfluss auf die antiinflammatorische Potenz	Einfluss auf die mineralokortikoide Potenz
Prednisolon	6 α -methyl-	+	-
9α-fluoro-Prednisolon	6 α -methyl-	+	--

Tabelle 10: Einfluss des Substituenten auf die physiologischen Wirkungen (nach *Bush* und *Fried*)

Wie erwartet ist die Substanz ein etwas stärkeres Glukokortikoid als Prednisolon, die aufgehobene mineralokortikoide Potenz ist aber durch unser Modell nicht zu erklären. 6 α -methyl-Prednisolon wird kaum durch die 11- β -HSD 2 oxidiert, sollte also den MR problemlos in aktivem 11-Hydroxy-Zustand erreichen. Die selektive Glukokortikoidwirkung wird nicht durch die 11- β -HSD 2 vermittelt. Die 6 α -Methylgruppe scheint die Bindung oder Transaktivierung am MR zu behindern.

16-methyl-Prednisolon wird nicht klinisch verwendet, aber die fluorierten Derivate des 16 α - und 16 β -methyl-Prednisolon, Dexamethason und Betamethason, sind häufig gebrauchte Medikamente. Da auch die unfluorierten, und erst recht die fluorierten 16-Methylkortikoide kaum von der 11- β -HSD 2 inaktiviert werden, wären, was die pharmakokinetischen Wirkungen der 11- β -HSD angeht, ähnliche Effekte zu erwarten wie bei 6- α -methyl-Prednisolon.

Grundstruktur	Modifikation	Einfluss auf die antiinflammatorische Potenz	Einfluss auf die mineralokortikoide Potenz
Cortisol	16 α -methyl-	+	--
Prednisolon	16 α -methyl-	+	-
9α-fluoro-Cortisol	16 α -methyl-	+	---
9α-fluoro-Prednisolon	16 α -methyl-	+	---

Tabelle 11: Einfluss des Substituenten auf die physiologischen Wirkungen (nach *Bush* und *Fried*)

Hier ist das gleiche Phänomen zu beobachten: Die Methylgruppe an C 16 eliminiert die mineralokortikoide Wirkung der Grundsubstanz und dieser Effekt ist unabhängig von der *gatekeeper* Funktion der 11- β -HSD 2. Für das 16 α -methyl-Prednisolon stehen leider keine genauen Daten zur Verfügung, aber die klinische Erfahrung zeigt, dass Betamethason in seiner antiinflammatorischen Wirkung dem Dexamethason etwa gleichwertig ist und ebenfalls keine mineralokortikoide Wirkung hat [3]. Die C 16-Methylgruppe vermittelt ebenfalls eine GR-Selektivität, die nicht durch die 11- β -HSD zu erklären ist.

6.2.4. 17-dehydroxylierte Steroide

Diflucortolon ist das 17-Dehydroxyderivat des Flumethason. Beide sind 6,9-difluorierte, 16 α -methylierte Prednisolonabkömmlinge. Das Diflucortolon ist, entsprechend der Corticosteronstruktur, an C 17 dehydroxyliert. Es zeigt von allen untersuchten Substanzen die höchste Reduktions/Oxidations-Ratio und sollte daher ein hochpotentes Glukokortikoid mit hoher Penetranz in MR-exprimierende Gewebe sein. Die 16 α -Methylgruppe sollte die mineralokortikoiden Effekte eliminieren. Leider sind keine Daten über die physiologischen Effekte der Substanz verfügbar, wohl weil sie ausschließlich topisch eingesetzt wird.

6.2.5. Δ 1-dehydrierte Steroide

Die Δ 1-Dehydrierung in Ring A des Steroidgerüsts von Cortisol ergibt Prednisolon. Es ist das erste synthetische Cortisolderivat und wahrscheinlich das am häufigsten klinisch eingesetzte. Diese Modifikation führte zu einer mäßigen Verstärkung der glukokortikoiden und einer fast vollständigen Aufhebung der mineralokortikoiden Wirkung des Cortisol. Da die 6- und 16-Methyl-derivate des Cortisol und auch des Prednisolon ihre Selektivität als reine Glukokortikoide auch nach Fluorierung an C 9 erhalten, wäre dies auch beim Prednisolon zu erwarten.

Grundstruktur	Modifikation	Einfluss auf die antiinflammatorische Potenz	Einfluss auf die mineralokortikoide Potenz
Cortisol	Δ 1-Dehydrierung	++	-
9-fluoro-Cortisol	Δ 1-Dehydrierung	++	+

Tabelle 12: Einfluss der Ring A-Konfiguration auf die physiologischen Wirkungen (nach *Bush* und *Fried*)

Der antimineralokortikoide Effekt der Δ 1-Dehydrierung erhält sich nicht, wenn die Substanz durch 9-Fluorierung der inaktivierenden Wirkung der 11- β -HSD 2 entzogen wird. Hier unterscheidet sich diese molekulare Modifikation von der 6- und 16-Methylierung und der 16-Hydroxylierung. Zugleich liegt das Redox-Gleichgewicht beim Prednison/Prednisolon sowohl in Nieren- wie auch Lebermikrosomen noch stärker auf der inaktiven 11-Dehydro-Seite als bei Cortisol. Vor allem in 11- β -HSD 2-reichen Geweben wie Niere und Plazenta ist diese Tatsache auch in physiologischen Modellen beobachtet worden. Im Nierengewebe von Ratten liegt nach intraperitonealer Prednisolongabe der Anteil der aktiven Substanz bei unter 40%, im Gegensatz zu Lunge und Herz, wo 80-90% des Steroids im aktiven 11-Hydroxy-Zustand vorliegen. Im perfundierten Plazentamodell werden sogar mehr als 90% des verabreichten Prednisolon inaktiviert [65, 66].

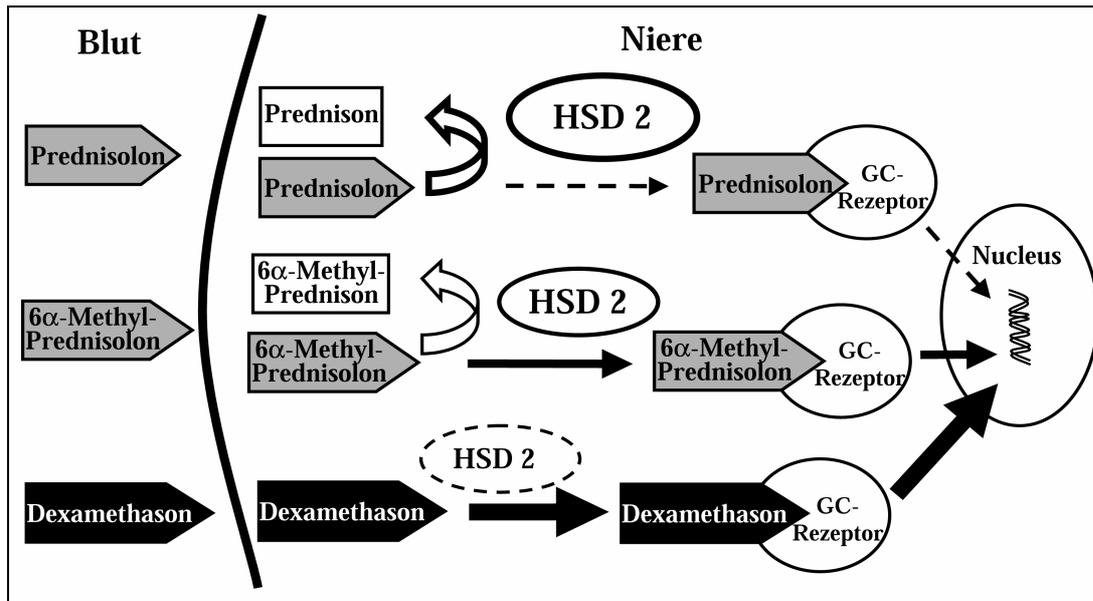


Abbildung 26: Die geringe mineralokortikoide Aktivität von Prednisolon ist auch seiner starken Inaktivierung durch die renale HSD 2 zu verdanken. Dieser nicht-rezeptorspezifische Effekt führt auch zu verminderter glukokortikoider Wirkung in HSD 2-haltigen Geweben.

Diese Beobachtungen stützen die Hypothese, dass die geringe mineralokortikoide Aktivität des Prednisolon nicht ausschließlich Folge einer MR-Selektivität ist. Die hohe Inaktivierungsrate durch 11-β-HSD 2 führt vielmehr zu einer insgesamt niedrigen Aktivität in MR-exprimierenden Geweben (Abb.26).