

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

5.1.1 Wahl der Versuchsbedingungen

Als Untersuchungsmaterial für die 11 β -HSD-Aktivität und -Hemmbarkeit wählten wir Mikrosomen aus Geweben, die sofort nach operativer Entfernung in flüssigem Stickstoff tiefgefroren worden waren. Auch die Lagerung der Mikrosomen erfolgte in flüssigem Stickstoff, um die Enzymaktivität langfristig unverändert zu erhalten. Die 11 β -HSD ist hauptsächlich in den Mikrosomen lokalisiert, so daß es durch Gewinnung dieser Zellfraktion zu einer Anreicherung an Enzym kommt, wodurch die Untersuchung der Inhibition erleichtert wird. Da die Mikrosomen jeweils aus einem Gewebepool gewonnen wurden, konnten interindividuelle Unterschiede der Enzymaktivität ausgeglichen werden. Für die Untersuchungen der 11 β -HSD-1 wurden humane Lebermikrosomen verwendet, da diese 11 β -HSD-1 mit besonders hoher Aktivität exprimieren (178). In humanen Nierenrindemikrosomen findet man nur 11 β -HSD-2-Aktivität (167), so daß dieses Gewebe für die Untersuchung der 11 β -HSD-2 genutzt wurde. Zur Abschätzung der benötigten Mikrosomenkonzentration und Reaktionszeiten erstellten wir Zeitkinetiken mit unterschiedlichen Mikrosomenkonzentrationen. Ziel war es, Reaktionszeit und Proteinkonzentration so zu wählen, daß ein hoher maximaler Umsatz erzielt wurde, der noch im Bereich linear zunehmender Reaktionsumsätze lag. Dadurch wurde gewährleistet, daß die Abnahme des Substratumsatzes den Inhibitorkonzentrationen proportional war und die Einflüsse der Inhibitoren miteinander vergleichbar waren.

Als Substrate wurden für die Oxidation Cortisol und für die Reduktion 11-Oxo-Dexamethason verwendet. Cortisol ist das physiologische Substrat der 11 β -HSDs. In vitro können mit Cortisol gute Umsätze erzielt werden, was zur Quantifizierung einer Hemmung wichtig ist. Da von den meisten anderen Arbeitsgruppen auch Cortisol als Substrat verwendet wurde, besteht eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Die Reduktion von Cortison zu Cortisol durch Mikrosomen ist dagegen selbst nach Zugabe von Hilfsenzymen zur Cosubstratbereitstellung kaum meßbar (39). Daher wählten wir für die Reduktion ein

fluoriertes Steroid. Durch Fluorierung kommt es zu einer deutlichen Verlagerung des Reaktionsgleichgewichtes in Richtung Reduktion. Als Substratkonzentrationen wählten wir die jeweiligen K_m -Werte. In diesem Bereich bindet die Hälfte der Enzymmoleküle das Substrat und die Reaktion läuft mit 50 % der Maximalgeschwindigkeit ab. Es ist also ein Bereich, in dem die Umsätze besonders sensibel auf Inhibition ansprechen. Als Radionuklid wurde $[1,2,6,7-^3\text{H}]$ -Cortisol sowie selbst hergestelltes $[1,2,4,6,7-^3\text{H}]$ -11-Oxo-Dexamethason verwendet.

Untersuchungen zur Enzymkinetik zeigten eine Cosubstratpräferenz der 11β -HSD-1 für NADP(H), während die 11β -HSD-2-katalysierten Umsätze am besten durch NAD(H) zu steigern waren. Durch Zugabe von supraphysiologischen Konzentrationen der Coenzyme läßt sich das Gleichgewicht der Reaktionen so beeinflussen, daß die Reaktion fast ausschließlich in eine Richtung abläuft und sich die Umsätze der Reaktionen somit deutlich steigern lassen. In Analogie zu anderen Autoren wurden dafür Cosubstratkonzentrationen von 1 mmol/l in den einzelnen Reaktionsansätzen gewählt.

Zur Stabilisierung des pH-Wertes wurde die Reaktion in einem 0,1 molaren Natriumphosphat-Puffer durchgeführt. Wie von anderen Autoren beschrieben (15, 91, 92, 123) hat die Dehydrogenasereaktion ihr pH-Optimum im leicht alkalischen Bereich, während die Reduktionsreaktion bei pH-Werten zwischen 6-6,5 optimal abläuft. Die Oxidationsreaktionen wurden daher bei pH 8 und die Reduktionsreaktionen bei pH 6,5 durchgeführt.

Es wurde darauf geachtet, daß die Gesamtkonzentration an Methanol in dem die Steroide gelöst waren, unter 1 % lag, um eine Hemmung der Umsätze durch Methanol zu vermeiden. Bei Inkubationsansätzen ohne Methanol und mit bis zu 1 % Methanol waren keine Unterschiede in den Umsätzen zu erkennen.

5.1.2 Wahl der Analytik

Aufgrund der einfacheren Handhabung und schnelleren Durchführbarkeit wurde die Proteinbestimmung der Mikrosomen nach der Bradford-Methode (100) durchgeführt und nicht nach der aufwendigeren Methode von Lowry (69). Nachdem in Vorversuchen mit HPLC gezeigt werden konnte, daß bei der Oxidation von Cortisol und der Reduktion von 11-Oxo-Dexamethason außer Cortison bzw. Dexamethason keine weiteren Metabolite nachweisbar waren, wurde die Routineanalytik mit der kostengünstigeren und einfacheren Dünnschichtchromatographie durchgeführt.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Hemmung durch Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon

Seit Jahrhunderten wird Lakritze medizinisch genutzt (37), aber erst 1946 wurde die erste wissenschaftliche Arbeit über ihre Anwendung bei peptischen Ulzera veröffentlicht (112). Bereits 1950 wurden zum ersten Mal die Mineralocorticoid-mimetischen Effekte von Lakritze beschrieben (46, 89, 122). Als aktiver Bestandteil der Lakritze wurde die Glycyrrhetinsäure, das Aglykon des glykosylierten Triterpens Glycyrrhizinsäure, identifiziert und ihre hemmende Wirkung auf die 11 β -HSD als Ursache für die mineralocorticoide Wirkung erkannt (44, 125, 185). Um 1990 wurde der *in vitro* Effekt der Glycyrrhetinsäure auf die 11 β -HSD in verschiedenen Geweben untersucht (111). Es zeigte sich, daß durch Einnahme von Glycyrrhetinsäure ein „Apparent Mineralocorticoid Excess“-ähnliches Syndrom mit hypokaliämischer Hypertonie ausgelöst wird (14, 46, 185), das durch Hemmung der 11 β -HSD und konsekutive Erhöhung der lokalen Cortisolkonzentration in der Niere entsteht (110, 125, 185). Die Glycyrrhetinsäure und der Succinylester Carbenoxolon sind die am besten untersuchten Hemmstoffe der 11 β -HSD. Sie werden von vielen Autoren als experimentelle Inhibitoren der 11 β -HSD eingesetzt und eignen sich als Referenz-Inhibitoren. Aus diesem Grund nahmen auch wir diese beiden Substanzen in die Liste der zu untersuchenden potentiellen Inhibitoren auf.

Die für die Glycyrrhetinsäure ermittelten IC50-Werte (11 β -HSD-1: Oxidation $4,0 \times 10^{-8}$ mol/l, Reduktion $3,1 \times 10^{-8}$ mol/l; 11 β -HSD-2: Oxidation 8×10^{-9} mol/l, Reduktion: $1,2 \times 10^{-8}$ mol/l) stimmen in der Größenordnung mit den Werten anderer Arbeitsgruppen überein (siehe Tabelle 5-1 und 5-2), wobei die Versuchsergebnisse wegen unterschiedlicher Substrate und Enzympräparationen nur eingeschränkt miteinander vergleichbar sind.

| Untersuchungsmaterial | Substrat | Inhibitorkonstanten | Quelle |
|--|---------------|--|--------|
| rekombinante humane 11β-HSD-1 | Cortisol | Ki (Ox): $0,35 \pm 0,09 \mu\text{mol/l}$ Ki (Red): $1,87 \pm 0,3 \mu\text{mol/l}$ | (71) |
| Ratten-Leber-Homogenate | Corticosteron | Ox: Ki = 8 nmol/l | (125) |
| COS-Zellen (Transfektion mit humaner 11β-HSD-1) | Corticosteron | IC50-Wert = 1000 nmol/l | (52) |
| Zellextrakte von COS-Zellen (Transfektion mit humaner 11β-HSD-1) | Corticosteron | IC50-Werte zwischen $1-10 \text{ nmol/l}$ | (52) |
| Rattenlebermikrosomen | Corticosteron | IC50-Wert = $3,0 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$ | (178) |
| aufgereinigte Rattenleber-11β-HSD | Corticosteron | IC50-Werte = $1,2 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$ | (176) |

Tabelle 5-1: 11 β -HSD-1: Inhibitionskonstanten für Glycyrrhetinsäure bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen.

| Untersuchungsmaterial | Substrat | Inhibitor konstanten | Quelle |
|---|--|--|--------|
| JEG-3-Zellen (humane Chorion-karzinomzelllinie mit 11 β -HSD-2-Expression) | Corticosteron | IC50-Wert = $1,3 \times 10^{-8}$ mol/l | (55) |
| Rattennieren-Mikrosomen | Corticosteron | Ox: 75 %-Hemmung bei 20 nmol/l GE Red: keine Hemmung in vergleichbaren Konz. | (125) |
| Rattennieren-Mikrosomen | Corticosteron 11-Dehydro-Corticosteron | Ki = $2,8 \pm 0,3$ nmol/l keine Hemmung | (125) |
| Humane Nierenmikrosomen | Cortisol | IC50-Wert = $697 \mu\text{g/L}$ ($1,5 \times 10^{-6}$ mol/l) | (153) |
| Rattennieren-Mikrosomen | Corticosteron | IC50-Wert = $8,0 \times 10^{-8}$ mol/l | (127) |
| Rattennieren-Mikrosomen | Corticosteron (Ox) 11-Dehydro-Corticosteron (Red) | IC50-Wert = $2,9 \pm 0,5 \times 10^{-9}$ mol/l IC50-Wert = $1,3 \pm 0,1 \times 10^{-8}$ mol/l | (25) |
| Rattennieren-Mikrosomen | Corticosteron (Ox) 11-Dehydro-Corticosteron (Red) | IC50-Wert = $3,4 \times 10^{-9}$ mol/l IC50-Wert = $1,2 \times 10^{-8}$ mol/l | (176) |
| Humane Nierenmikrosomen | Cortisol | IC50-Wert = $1,5 \times 10^{-6}$ mol/l | (176) |
| Humane Nierenhomogenate | Cortisol | IC50-Wert = $1,6 \times 10^{-8}$ mol/l | (186) |
| intakte COS-Zellen (Transfektion mit humaner 11β-HSD-2) | Corticosteron | IC50-Werte zwischen 100 und 1000 nmol/l | (52) |
| Zellextrakte von COS-Zellen (Transfektion mit humaner 11β-HSD-2) | Corticosteron | zwischen 1 und 10 nmol/l | (52) |
| Mikrosomen von CHO-Zellen (stabile Transfektion mit Ratten-11β-HSD-2) | Corticosteron | IC50-Wert = $1,5 \times 10^{-8}$ mol/l | (127) |
| intakte CHO-Zellen (stabile Transfektion mit Ratten-11β-HSD-2) | Corticosteron | IC50-Wert = $5,0 \times 10^{-7}$ mol/l | (127) |
| Homogenate von CHOP-Zellen (Transfektion mit Ratten- 11β-HSD-2) | Dehydro-Dexamethason | IC50-Wert = 80 nmol/l | (99) |

Tabelle 5-2: 11 β -HSD-2: Inhibitionskonstanten für Glycyrrhetinsäure bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen.

Insgesamt zeigte sich, daß für die Hemmung der 11 β -HSDs in intakten Zellen höhere Inhibitorkonzentrationen nötig waren, um gleich starke Effekte zu erzielen, als in Homogenaten und Mikrosomenpräparationen. Ursache dafür scheint die Permeabilitätsbarriere der Zellen zu sein (127). Beispielsweise liegen die IC₅₀-Werte für intakte mit 11 β -HSD-2 transfizierte CHO-Zellen um eine Zehnerpotenz höher als die für Mikrosomen derselben Zellen. Noch ausgeprägter ist dieser Unterschied bei den von Fuster et al. untersuchten COS-Zellen, deren IC₅₀-Werte von Zellextrakten um zwei bis drei Zehnerpotenzen niedriger lagen als die von intakten Zellen (52). Die Inhibitionsstärke von Glycyrrhetinsäure bei Homogenaten und Mikrosomen ist sehr ähnlich (125), so daß in Homogenaten keine Substanzen zur Modifizierung der Glycyrrhetinsäure-Wirkung vorhanden zu sein scheinen.

Arbeitsgruppen, die Versuche zur Hemmung der Oxidation und der Reduktion durchführten, fanden mit Glycyrrhetinsäure eine stärkere Hemmung der Oxidations- als der Reduktionsreaktion. Dabei lag für die Niere der IC₅₀-Wert der Oxidation bei 10⁻⁹ mol/l, während er bei der Reduktion 10⁻⁸ mol/l betrug (bei Rattennieren; keine Enzymaktivität bei humaner Niere) (25, 66). Bei unseren Versuchen lagen die IC₅₀-Werte der humanen Niere in einem ähnlichen Bereich (10⁻⁸ bzw. 10⁻⁹ mol/l).

Carbenoxolon, der Succinylester der Glycyrrhetinsäure, ist ebenfalls ein starker Inhibitor der 11 β -HSDs. IC₅₀-Werte wurden für JEG-3-Zellysate (enthalten 11 β -HSD-2) und für Rattenleber-Mikrosomen (enthalten 11 β -HSD-1) publiziert (178). Der IC₅₀-Wert für die Oxidation der 11 β -HSD-1 lag hierbei bei 3,0 x 10⁻⁷ mol/l, der für die 11 β -HSD-2 bei 7,0 x 10⁻⁸ mol/l (178). Als Substrat wurde Corticosteron verwendet. Die Reduktionsrichtung wurde nicht untersucht. Obwohl unsere Werte mit 6,0 x 10⁻⁸ für die 11 β -HSD-1 bzw. 8,4 x 10⁻⁹ mol/l für die 11 β -HSD-2 eine Zehnerpotenz geringer waren, bestätigt sich auch hier die Tendenz, daß die 11 β -HSD-1 erst bei höheren Inhibitorkonzentrationen gehemmt wird als die 11 β -HSD-2. Anders als durch Glycyrrhetinsäure wird durch Carbenoxolon die Reduktion stärker gehemmt als die Oxidation (IC₅₀-Werte: 6,0 x 10⁻⁸ und 3,0 x 10⁻⁸ mol/l für die Oxidation / Reduktion in der Leber; 8,4 x 10⁻⁹ und 5,9 x 10⁻⁹ mol/l für die Oxidation /

Reduktion in der Niere, siehe Tab.4-17.). Li et al. testeten 1997 an Homogenaten von mit Ratten-11 β -HSD-2 transfizierten CHOP-Zellen die Reduktion mit Dehydro-Dexamethason und fanden eine 50 %ige Hemmung bei 100 nM Carbenoxolon, was bei seinen Untersuchungen dem Wert der Glycyrrhetinsäure entsprach (80 nM) (99).

5.2.2 Hemmung durch endogene Progesteron-Derivate

Die 11 β -HSD kann durch exogen zugeführte Inhibitoren wie die Glycyrrhetinsäure aber möglicherweise auch durch endogen gebildete Substanzen gehemmt werden. Um dieser Vermutung nachzugehen, untersuchten Morris et al. verschiedene Patientenkollektive auf Inhibitoren im Urin (129). Dabei fanden sie bei normotensiven Männern und Frauen tatsächlich solche Inhibitoren. Erhöhte Werte konnten im 2. bis 3. Trimenon der Schwangerschaft und bei Herzinsuffizienz nachgewiesen werden, nicht jedoch bei Hypertonikern. Wie diverse Untersuchungen und die Analyse mit HPLC belegten, handelt es sich um mindestens sechs verschiedene Steroide bzw. ihre Glucuronide. Diese werden wegen ihrer Wirkung auch als Glycyrrhetic Acid Like Factors (GALFs) bezeichnet (106). Aufgrund ihres Laufverhaltens in der HPLC scheinen die Substanzen 3 α ,5 α -Tetrahydro-Steroide zu sein. Passend dazu werden die meisten Steroidhormone beim Menschen als Glucuronid- und Sulfatkonjugate der 3 α ,5 α , bzw. 3 α 5 β -Tetrahydro-Derivate ausgeschieden. Normalerweise kommen die 5 α -Metabolite in niedrigen Konzentrationen im Urin vor, aber bei Zuständen mit eingeschränkter 11 β -HSD-Aktivität sind sie erhöht. Da ein Teil der GALFs selektiv auf die Isoformen der 11 β -HSD wirken, und ihre Konzentration im Blut von Schwangeren und von Feten erhöht ist, sind Progesteronmetabolite geeignete Kandidaten für einen selektiven 11 β -HSD-Inhibitor. Es besteht zusätzlich eine Strukturähnlichkeit zu anderen bekannten Inhibitoren.

Die 11 β -HSD hemmende Wirkung von Progesteron selbst ist bereits mehrfach beschrieben worden (47, 55, 95, 127) und zeigt einen kompetitiven Hemmechanismus. Tabelle 5-3 stellt die IC50-Werte von verschiedenen Untersuchungen zusammen.

| Testsystem (Substrat) | Quelle | IC50-Wert mol/l (Oxidase) 11 β -HSD-1 | IC50-Wert mol/l (Reduktase) 11 β -HSD-1 | IC50-Wert mol/l (Oxidase) 11 β -HSD-2 | IC50-Wert mol/l (Reduktase) 11 β -HSD-2 |
|---|-----------------|--|--|--|--|
| JEG-3-Zellen (humane 11 β -HSD-2) (Corticosteron) | (55) | | | 10 ⁻⁸ | |
| Mikrosomen von 11 β -HSD-2 transfizierten CHO-Zellen (Corticosteron) | (127) | | | 6 x 10 ⁻⁹ | |
| Homogenate von 11 β -HSD-2 transfizierten CHOP-Zellen (Cortisol) | (47) | | | 10 ⁻⁶ | |
| Ratten-Lebermikrosomen (Corticosteron) für 11 β -HSD-1; Schaf-Nierenmikrosomen (Corticosteron) für 11 β -HSD-2 | (95) | 1,5 x 10 ⁻⁵ | | 1.1 x 10 ⁻⁶ | |
| humane Nierenhomogenate (Cortisol) | (186) | | | 5,7 x 10 ⁻⁷ | |
| humane Nieren- und Leber- mikrosomen (s. 3. Methoden) | eigene Daten | 1,7 x 10 ⁻⁶ | 8,4 x 10 ⁻⁶ | 4,8 x 10 ⁻⁸ | 4,6 x 10 ⁻⁸ |

Tabelle 5-3: IC50-Werte von Progesteron für die 11 β -HSD-1 und -2 bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen.

Hierholzer et al. gaben zusätzlich Ki-Werte von $2,7 \times 10^{-4}$ mol/l für die Oxidase und $2,0 \times 10^{-5}$ mol/l für die Reduktase an (65).

Da die meisten Autoren ausschließlich die 11 β -HSD-2-katalysierte Oxidationsreaktion untersucht und dabei unterschiedliche Reaktionsbedingungen gewählt haben, kann man die Ergebnisse nur mit Vorbehalt vergleichen. Die von Latif et al. (95) festgestellte Tendenz, daß die 11 β -HSD-1-Inhibition erst bei höheren Inhibitorkonzentrationen auftritt als die 11 β -HSD-2-Inhibition, traf auch auf unsere Versuche zu. In der Literatur liegen die IC50-Werte der 11 β -HSD-2-Oxidationsreaktion zwischen 6×10^{-9} mol/l und 10^{-6} mol/l, wobei unser Ergebnis mit $4,8 \times 10^{-8}$ mol/l ebenfalls in diesem Bereich liegt. Wie Murphy et al. 1981 bereits zeigten, enthält das fetale Blut am Ende der Schwangerschaft einen 11 β -HSD-Inhibitor mit großer Aktivität (132). Als zugrundeliegende Substanzen kommen besonders 11-OH-Progesterone in

Betracht. Das 11 β -OH-Progesteron ist ein endogener Progesteronmetabolit, während das 11 α -OH-Progesteron endogen im Darm vorkommt, wo es von Bakterien produziert werden kann. Beide 11-OH-Progesterone induzieren in niedrigen Konzentrationen bei adrenaletomierten, mit Cortisol substituierten Ratten eine starke mineralocorticoide Wirkung (178). Auch die Arbeitsgruppen von Latif und Souness untersuchten die 11-OH-Progesterone und fanden eine deutlich stärkere Hemmung gegenüber der 11 β -HSDs durch 11-OH-Progesterone als durch Progesteron oder Carbenoxolon (IC50-Werte, Versuchsbedingungen siehe Tabelle 5-4) (95). Klinisch konnte durch Gaben von niedrig dosiertem Cortisol in Kombination mit 11 α -OH-Progesteron eine Verstärkung der antiinflammatorischen Wirkung an der Haut im Vergleich zu Cortisol alleine gezeigt werden (154).

| Quellen/Substanzen | 11 β -HSD-1-Oxidation (IC50-Werte [mol/l]) | 11 β -HSD-2-Oxidation (IC50-Werte [mol/l]) | Versuchsbedingungen |
|---|--|--|---|
| Latif 1997 (95) <ul style="list-style-type: none"> • 11α-OH-Prog. • 11β-OH-Prog. • Progesteron | 1×10^{-6} 11×10^{-6} $1,5 \times 10^{-5}$ | 1×10^{-7} 5×10^{-8} $1,1 \times 10^{-6}$ | } 11 β -HSD-1: Rattenlebermikrosomen; 11 β -HSD-2: Schafnierenmikrosomen; Substrat: Corticosteron |
| Souness 1995 (178) <ul style="list-style-type: none"> • 11α-OH-Prog. • 11β-OH-Prog. • Carbenoxolon | 1×10^{-6} 11×10^{-6} 3×10^{-7} | $1,4 \times 10^{-7}$ $3,2 \times 10^{-7}$ 7×10^{-8} | |
| Stewart 1995 (186) <ul style="list-style-type: none"> • 11α-OH-Prog. • 11β-OH-Prog. • Progesteron | | $1,8 \times 10^{-8}$ $1,0 \times 10^{-8}$ $5,7 \times 10^{-7}$ | } humane Nierenhomogenate (11 β -HSD-2); Substrat: Cortisol |
| eigene Daten <ul style="list-style-type: none"> • 11α-OH-Prog. • 11β-OH-Prog. • Progesteron | $2,8 \times 10^{-7}$ $4,4 \times 10^{-7}$ $1,7 \times 10^{-6}$ | $2,1 \times 10^{-9}$ $6,8 \times 10^{-9}$ $4,8 \times 10^{-8}$ | |

Tabelle 5-4: Vergleich von IC50-Werten für 11-OH-Progesterone aus der Literatur mit eigenen Ergebnissen (Versuchsbedingungen siehe Text).

Insgesamt tritt die Hemmung der 11 β -HSD-1 im Vergleich zur 11 β -HSD-2 erst bei höheren Konzentrationen an 11 α - oder 11 β -OH-Progesteron auf. Progesteron war jeweils ein schwächerer Hemmstoff als seine 11-OH-Metabolite. Unsere IC50-Werte lagen etwas niedriger als in der Literatur beschrieben.

Auch Bujalska et al. fanden bei stabil mit humaner 11 β -HSD-1 oder -2 transfizierten fetalen Nieren-293-Zellen (besitzen keine endogene 11 β -HSD-Aktivität) eine Hemmung der 11 β -HSD-1-Reduktion, die in der Reihenfolge 11 α -OH-Progesteron, Carbenoxolon = Glycyrrhetinsäure, Progesteron abnahm (29). Bei der 11 β -HSD-2-Oxidation waren 11 α - und 11 β -OH-Progesteron gleich potente Inhibitoren, die stärker hemmten als Glycyrrhetinsäure. Diese war wiederum dem Carbenoxolon überlegen, das genauso gut hemmte wie Progesteron. Während die Reihenfolge der Inhibitorstärke bei der Oxidation mit unseren Ergebnissen übereinstimmte, waren bei der Reduktion bei uns Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon den 11-OH-Progesteronen überlegen und diese wiederum dem Progesteron.

In Mikrosomen von stabil mit 11 β -HSD-2 transfizierten CHO-Zellen war 11 α -OH-Progesteron ein mehr als 10fach stärkerer Inhibitor als Glycyrrhetinsäure (IC₅₀-Wert = 0,9 bzw. 15 nmol/l) während 11 β -OH-Progesteron, Progesteron und Glycyrrhetinsäure etwa gleich stark die Oxidation hemmten (127). Diese Reihenfolge ist mit unserer identisch mit Ausnahme der Progesteronhemmwirkung, die bei uns etwas schwächer war als die der anderen Inhibitoren. Bei intakten transfizierten CHO-Zellen war 11 α -OH-Progesteron ein stärkerer Inhibitor als Glycyrrhetinsäure (IC₅₀-Wert = 50 versus 150 nmol/l), was wahrscheinlich mit einer höheren Permeabilität der Zelle für 11 α -OH-Progesteron als für Glycyrrhetinsäure zu erklären ist (127).

Weitere mögliche Abbauege des Progesterons bestehen in der 5 α - oder 5 β -Reduktion oder in der Umwandlung in Tetrahydroprogesterone. Für 5 α - und 5 β -Dihydroprogesteron sind in der Literatur IC₅₀-Werte um 10⁻⁷ mol/l beschrieben. Die 5 α -Konfiguration führt zu einer etwas stärkeren Hemmung als die 5 β -Konfiguration, wie Morita et al. 1996 an Mikrosomen von CHO-Zellen, die mit 11 β -HSD-2 transfiziert worden waren und Corticosteron umsetzten, zeigen konnten (127). Bei Gomez-Sanchez et al. (55) lagen die Werte in ähnlichen Größenordnungen (JEG-2-Zellen: humane Chorionkarzinomzellen, die ausschließlich 11 β -HSD-2 exprimieren; Substrat: Corticosteron). Auch bei unseren Versuchen war die Hemmung der 11 β -HSD-2 katalysierten Oxidation durch 5 α -Dihydroprogesteron stärker als durch die 5 β -Form. Für die 11 β -HSD-2 katalysierte Reduktion traf dieses Muster ebenfalls

zu, während die 11 β -HSD-1 katalysierte Oxidation und Reduktion fast identische IC50-Werte aufwiesen mit einem leicht geringeren Wert bei 5 β -Dihydroprogesteron.

Wie umfangreiche Studien an Schafsnierenmikrosomen (11 β -HSD-2) und Rattenlebermikrosomen (11 β -HSD-1) zeigten, wird durch die 3 α ,5 α -Form von Tetrahydro-Steroiden sowohl die 11 β -HSD-1 als auch die 11 β -HSD-2 stark gehemmt, während die 3 α ,5 β -Form die 11 β -HSD-1 hemmt, aber nicht die 11 β -HSD-2. Dies trifft auf die Tetrahydroderivate von Corticosteron, DOC und Progesteron zu (95). Da unser primäres Ziel die Suche nach einem selektiven 11 β -HSD-1-Inhibitor war, testeten wir nur 3 α ,5 β -Tetrahydro-DOC und 3 α ,5 β -Tetrahydroprogesteron. Beide Substanzen erfüllten unsere Erwartungen jedoch nicht, sondern hemmten die 11 β -HSD-1 katalysierte Oxidation und Reduktion und die 11 β -HSD-2 katalysierte Reduktion. Die Oxidation durch die 11 β -HSD-2 wurde durch 3 α ,5 β -Tetrahydro-DOC gar nicht und durch 3 α ,5 β -Tetrahydro-DOC nur leicht gehemmt. Beide Steroidmetabolite eignen sich somit nicht für unser Konzept des drug targeting durch fluorierte Steroide oder für die Therapie von metabolischen Störungen. Deoxycorticosteron (=21-OH-Progesteron) hemmt die Oxidations- und Reduktionsreaktionen, die durch die 11 β -HSDs katalysiert werden (IC50-Werte der Literatur siehe Tabelle 5-5).

| Versuchsbedingungen | Quelle | IC50-Werte Oxidation |
|---|--------------|--|
| Homogenate von 11 β -HSD-2 transfizierten CHOP-Zellen; Substrat: Cortisol | (47) | Größenordnung 10 ⁻⁸ mol/l |
| 11 β -HSD-1: Ratten-Lebermikrosomen; 11 β -HSD-2: JEG-3-Zelllysate; Substrat: Corticosteron | (95) (95) | 3,1 x 10 ⁻⁵ mol/l 1 x 10 ⁻⁶ mol/l |
| humane Nierenhomogenate (11 β -HSD-2); Substrat: Cortisol | (186) | 2,1 x 10 ⁻⁷ mol/l |

Tabelle 5-5: Hemmung von 11 β -HSD-1 und-2 durch 11-Deoxycorticosteron

5.2.3 Hemmung durch Metopiron, Ketokonazol und die Gallensäuren Lithocholsäure und Chenodeoxycholsäure

5.2.3.1 Metopiron

Metopiron ist ein 11-Hydroxylasehemmer, der überwiegend den letzten Schritt der Cortisolbiosynthese in der Nebenniere hemmt und somit die Plasma-Cortisolkonzentration verringert. Wie Raven et al. (1995) zeigen konnten, kommt es aber unter einer Metopirontherapie (2-4 g/d) in Kombination mit einer Cortisolsubstitutionstherapie zum Aufrechterhalten der Plasma-Cortisolkonzentration und zu einer Abnahme der Quotienten aus Gesamt-11 β -Hydroxy-Cortisolmetaboliten / Gesamt-11 β -Oxo-Cortisolmetaboliten und aus (THF+allo-THF) / THE im 24-h-Sammelurin (158). Beides weist auf eine Hemmung der Reduktion durch die 11 β -HSD hin. Diese könnte auf eine selektive Hemmung der 11 β -HSD-1 zurückgeführt werden, da die 11 β -HSD-2 bei physiologischen Substraten nur als Oxidase fungiert. In vitro Untersuchungen an Nieren- und Lebermikrosomen von neugeborenen Lämmern zeigten eine kompetitive Hemmung der 11 β -HSD-1 katalysierten Reduktion bei Verwendung von Metopiron als Inhibitor ($K_i = 30 \mu\text{mol/l}$) (168). Die Oxidationsreaktion dagegen wurde erst ab $100 \mu\text{mol/l}$ inhibiert, während die 11 β -HSD-2-Oxidation gar nicht beeinflusst wurde. Da die Plasmakonzentrationen von Metopiron bei Einnahme von therapeutischen und diagnostischen Dosen zwischen 10 und $65 \mu\text{mol/l}$ liegen, wäre ein Einfluß auf die 11 β -HSD und ein daraus resultierender Effekt auf den Cortisolmetabolismus wahrscheinlich. In unseren Untersuchungen zeigte sich dagegen keine (11 β -HSD-1) bzw. nur eine sehr geringe Hemmung (11 β -HSD-2) der 11 β -HSD katalysierten Oxidationsreaktion. Auch die Reduktionsreaktion wurde erst bei extrem hohen Dosen gehemmt (IC₅₀-Werte: $3,1 \times 10^{-3}$ bzw. $6,1 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ für die 11 β -HSD-1 bzw. 11 β -HSD-2-Reduktionsreaktion). Diese Hemmung beruht wahrscheinlich auf einer Substratkompetition bei der Reduktion durch die 11 β -HSD-1, denn Metopiron selbst wird durch das Enzym zu Metopirol umgesetzt. Die Hemmung der 11 β -HSD-2 katalysierten Oxidation entsteht vermutlich durch Produkthemmung, einem Phänomen, das für die 11 β -HSD-2 charakteristisch ist, aber nicht für die 11 β -HSD-1 (7). Somit ist es unwahrscheinlich, daß Metopiron beim Menschen in vivo zu einer 11 β -HSD-Hemmung und zu einer konsekutiven Beeinflussung des Cortisolmetabolismus führt.

5.2.3.2. Ketokonazol

Ketokonazol ist ein Antimykotikum der Imidazolgruppe und besitzt einen hemmenden Einfluß auf die ACTH-induzierte Cortisol-, Corticosteron- und Aldosteronsekretion. In unseren Experimenten zeigte sich, daß Ketokonazol die 11 β -HSD-1 nicht (Oxidation) bzw. sehr gering (Reduktion) hemmt, wohingegen beide 11 β -HSD-2-katalysierte Reaktionen bei IC₅₀-Werten um 10⁻⁶ mol/l inhibiert werden. Die oben beschriebenen Effekte können daher nicht über die 11 β -HSDs vermittelt sein, sondern beruhen wahrscheinlich ausschließlich auf einer Hemmung steroidogener CYP-450-Enzyme. Insgesamt ist Ketokonazol ein relativ selektiver 11 β -HSD-2-Inhibitor, wodurch die verstärkte immunsuppressive Wirkung von Prednisolon, wenn es zusammen mit Ketokonazol verabreicht wird, erklärt werden könnte (42).

5.2.3.3. Gallensäuren

Die strukturelle Ähnlichkeit einiger exogener Inhibitoren der 11 β -HSD mit den Gallensäuren macht diese zu Kandidaten für endogene Inhibitoren (24, 25, 66, 196). Die klinische Beobachtung, daß es bei Leberzirrhose und extrahepatischen Gallengangsverschlüssen zu einer Erhöhung des Serum-Cortisols kommt, verstärkt diese Vermutung. Wie Ackermann et al. 1999 zeigten, kann es bei Leberzirrhose bereits sehr früh zu einer renalen Natriumretention und zu Kaliumverlusten kommen, die nicht völlig durch eine Erhöhung der Aldosteronkonzentration erklärt werden können (1). Es ist deshalb möglich, daß die 11 β -HSD-2 bei Leberzirrhose gehemmt wird und daß es über die Erhöhung der Cortisolkonzentration zu einer vermehrten MR-Aktivierung mit den oben dargelegten Elektrolytveränderungen kommt. Diese funktionelle „down-Regulierung“ könnte über eine Hemmung der 11 β -HSD durch Gallensäuren zustande kommen, was auch in vitro-Versuche mit Seren cholestatischer Patienten und Rattennierenmikrosomen nahelegen (24). Die in der Literatur untersuchten Monohydroxy-Gallensäuren (Lithocholsäure), Dihydroxygallensäuren (Chenodeoxycholsäure, Deoxycholsäure, Ursodeoxycholsäure, Tauroursodeoxycholsäure) und Trihydroxygallensäuren (Cholsäure, Glycocholsäure, Taurocholsäure) sind alle Hemmstoffe der 11 β -HSD (IC₅₀-Werte in Tabelle 5-6). Am potentesten war Lithocholsäure, gefolgt von Chenodeoxycholsäure. Dies wird auf das Fehlen einer C12-OH-Gruppe und die

α -Konfiguration der C7-OH-Gruppe zurückgeführt. Die Umwandlung der primären Gallensäuren (Cholsäure, Chenodeoxycholsäure) durch Darmbakterien in 7-Dehydroxy-Produkte (Lithocholsäure und Deoxycholsäure) oder die Konjugation mit Glycin oder Taurin hatten keinen signifikanten Einfluß auf die Inhibitorpotenz dieser Gallensäuren. Sie übten auf die 11 β -HSD-1 in humanen Lebermikrosomen eine stärkere Inhibition aus als auf die 11 β -HSD-2 in humanen Nierenmikrosomen.

| Substanzen | IC50-Werte Oxidase (mol/l) | IC50-Werte Reduktase (mol/l) |
|--|-------------------------------|--------------------------------|
| a) β-Glycyrrhetinsäure | $3 \pm 0,5 \times 10^{-9}$ | $1 \pm 0,1 \times 10^{-8}$ |
| Lithocholsäure | $0,7 \pm 0,1 \times 10^{-6}$ | $0,6 \pm 0,1 \times 10^{-5}$ |
| CDCA | $2 \pm 0,3 \times 10^{-6}$ | $0,7 \pm 0,1 \times 10^{-5}$ |
| Deoxycholsäure | $70 \pm 6 \times 10^{-6}$ | $350 \pm 24 \times 10^{-5}$ |
| Ursodeoxycholsäure | $30 \pm 1 \times 10^{-6}$ | $320 \pm 12 \times 10^{-5}$ |
| Cholsäure | $60 \pm 7 \times 10^{-6}$ | $40 \pm 5 \times 10^{-5}$ |
| b) Lithocholsäure | $0,3 \pm 0,02 \times 10^{-6}$ | $0,08 \pm 0,01 \times 10^{-5}$ |
| CDCA | $7 \pm 1 \times 10^{-6}$ | $2 \pm 0,1 \times 10^{-5}$ |
| Ursodeoxycholsäure | $20 \pm 1 \times 10^{-6}$ | $7 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ |
| Cholsäure | $80 \pm 6 \times 10^{-6}$ | $50 \pm 2 \times 10^{-5}$ |
| c) Chenodeoxycholsäure | 513×10^{-6} | nicht untersucht |
| Cholsäure | 3529×10^{-6} | nicht untersucht |

Tabelle 5-6: 11 β -HSD-1 und -2: IC50-Werte aus der Literatur für einige Gallensäuren (24, 217):

- Rattennieren-Mikrosomen mit Corticosteron als Substrat,
- humane Lebermikrosomen mit Corticosteron als Substrat,
- Meerschweinchen-Nierenrinden-Mikrosomen mit Cortisol als Substrat.

Wir untersuchten Lithocholsäure und Chenodeoxycholsäure, da sie in Analogie zu den Progesteronmetaboliten einen reduzierten 3 α ,5 β -A-Ring besitzen und die Chenodeoxycholsäure eine gute Hemmung der 11 β -HSD-1 an Rattenleber und -niere gezeigt hat, ohne die 11 β -HSD-2 in der Schafsniere wesentlich zu hemmen (94). Die Lithocholsäure wiederum unterscheidet sich nur durch eine zusätzliche OH-Gruppe an C7 von der Chenodeoxycholsäure. Unsere Untersuchungen bestätigten, daß die Chenodeoxycholsäure zu einer guten Hemmung der 11 β -HSD-1 führt (IC50-Werte: $4,4 \times 10^{-6}$ und $2,8 \times 10^{-6}$ mol/l), die 11 β -HSD-2 aber nicht signifikant gehemmt wird. Die Lithocholsäure dagegen erreichte bei

10^{-5} mol/l eine maximale Hemmung von 44,3 % für die 11 β -HSD-2-Oxidation (12,8 % für die Reduktion). Sie hemmte damit auch die 11 β -HSD-2 signifikant, wenn auch schwächer als die 11 β -HSD-1. Dies stimmt mit einem Versuch zur Hemmung der 11 β -HSD-2 katalysierten Oxidation in humanen Nierenrindenmikrosomen mit Corticosteron als Substrat überein, der für Chenodeoxycholsäure keine Hemmung zeigte, aber für Lithocholsäure (149). Als einzige der untersuchten Substanzen war somit die Chenodeoxycholsäure in vitro ein selektiver Inhibitor der 11 β -HSD-1 in den untersuchten Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-5} mol/l. Ob dieser in-vitro-Effekt auch in vivo von Bedeutung ist, muß noch untersucht werden. Lindblad zeigte, daß die Konzentration der Gallensäuren bei Gesunden im Portalsystem dreimal so hoch ist wie im systemischen Kreislauf (12,9 μ mol/l bzw. 4,8 μ mol/l) (35). Bei extrahepatischer Cholestase steigen die Konzentrationen sogar auf Werte um 10^{-3} mol/l an, so daß eine 11 β -HSD-Inhibition in diesem Zustand möglich ist. Auch bei oraler Einnahme von Gallensäuren z.B. zur Auflösung von Gallensteinen können Gallensäurekonzentrationen im systemischen Kreislauf erreicht werden, die zu einer 11 β -HSD-Inhibition führen. Die Chenodeoxycholsäure macht beim Menschen etwa 1/3 der Gallensäuren aus. Bei oraler Gabe von Chenodeoxycholsäure in pharmakologischen Dosen (10-15 mg/kg/d) steigt ihr Anteil an der Gesamtgallensäurenkonzentration sogar auf 70 bis 95 %. Eine Hemmung der 11 β -HSD in vivo ist durch orale Chenodeoxycholsäuregabe daher durchaus möglich. Zur Therapie von Gallensteinen wird Chenodeoxycholsäure in einer Dosierung von 250 bis 750 mg, auf drei Tagesdosen verteilt, eingesetzt, wodurch sich Chenodeoxycholsäure-Konzentrationen von 10^{-5} bis über 2×10^{-5} mol/l nachweisen lassen (152). Auch bei primär biliärer Zirrhose ist die Chenodeoxycholsäure seit langem als nebenwirkungsarme Therapie etabliert (40).