

5. Diskussion

5.1. Diskussion der Methodik

5.1.1. Versuche an stabil transfizierten CHO-Zellen

5.1.1.1. Zellmaterial und Transfektionsbedingungen

Zur Charakterisierung der HSD-Aktivität benutzten wir transfizierte CHO-Zellen. Die seit langem etablierte Zelllinie verfügt über keine eigene 11 β -HSD-Aktivität und wird daher häufig zur Expression von Isoenzymen der 11 β -HSD eingesetzt (63;117).

Brown et al. stellten das Translationsprodukt der 11 β -HSD2 in CHO-Zellen durch Affinitätsmarkierung mit tritiiertem Corticosteron im Western Blot dar. Wie im plazentaren Gewebe zeigte sich eine für die 11 β -HSD2 typische Bande bei 40 KDa, die in nicht transfizierten Zellen fehlte (30). Bei dem für die Transfektionsexperimente verwendeten Vektor pcDNA3.1 sowie der Transfektionstechnik mit der Lipofektamin-Methode handelt es sich um molekularbiologische Standardmethoden, die auch für Transfektionsexperimente der 11 β -HSD mit CHO-Zellen bereits mehrfach angewandt wurden (30;117). Im Gegensatz zu unserer Arbeit handelte es sich jedoch größtenteils um transiente Expressionen der Isoenzyme der 11 β -HSD der Ratte.

Da bei transienten Transfektionsexperimenten die Enzymexpression schwanken kann und Untersuchungen zur Enzymkinetik nicht immer konsistent sind, erfolgte eine stabile Transfektion unter Verwendung des Selektionsmarkers Geneticin® (G418).

Auch nach mehrfacher Passage der transfizierten Zellen war kein Verlust der 11 β -HSD-Aktivität zu verzeichnen. Als Referenz wurde bei jedem Experiment die 11 β -HSD-Aktivität gegenüber Cortisol (für die 11-Oxidation) beziehungsweise Cortison (für die 11-Reduktion) bestimmt. Insgesamt ergab sich eine Standardabweichung von 16,8% für die 11 β -Oxidation von Cortisol durch die HSD2 und von 23,5% für die 11 β -Reduktion von Cortison durch die HSD1. Schwankungen des erreichten Umsatzes können vor allem Folge einer fehlerhaften Aussaat der transfizierten Zellen sein. Ein dauerhafter Verlust der Enzymaktivität konnte jedoch nicht festgestellt werden (Kap.4).

Bei Zellkulturexperimenten werden die zu untersuchenden Enzyme meist in unphysiologischen Geweben exprimiert. Die Isoenzyme der 11 β -HSD kommen hauptsächlich mikrosomal vor und unterliegen zum Teil posttranslationaler Modifizierung (4;127). Untersuchungen verschiedener Autoren konnten jedoch belegen, dass Glykosilierungsvorgänge kaum Einfluß auf die Enzymaktivität der 11 β -HSD besitzen (27;98). Redoxreaktionen werden auch durch die intrazelluläre Ausstattung mit Kofaktoren beeinflusst. In verschiedenen Geweben kann daher das absolute Ausmaß von Oxidase- und Reduktaseaktivität variieren. Dennoch können durch Expressionsexperimente mit Zelllinien sehr gut Kinetiken eines Isoenzym isoliert charakterisiert werden. Insbesondere die in unserer Arbeit untersuchten relativen Einflüsse verschiedener Substituenten von Steroiden auf deren Oxidation und Reduktion sind vom Kofaktorbesatz vermutlich weitgehend unabhängig.

5.1.1.2. Inkubationsbedingungen

Um *in vivo*-Bedingungen möglichst nahe zu kommen, wurde nicht mit Zellhomogenaten gearbeitet. Auf die Verwendung von Kofaktoren wurde verzichtet, da diese bei intakten Zellen nicht in das Innere des Mitochondriums gelangen können (72). Im Gegensatz dazu können Steroide frei durch die Zellmembran permeieren. Aus diesem Grund genügt es, die Substrate dem Inkubationsmedium zuzufügen und die Umsätze durch Detektion der Steroide im Medium zu bestimmen. Die Auswahl der Versuchsbedingungen erfolgte nach Durchführung von Inkubationskinetiken (Abb.3.8.; Abb.3.9.). Reaktionszeit und Zellzahl wurden so gewählt, dass sich die Reaktion am Versuchsende noch im Bereich linear zunehmender Reaktionsumsätze befand. Da es sich bei Steroiden um hydrophobe Substanzen handelt, wurden die Substrate zunächst in Methanol gelöst. Es ist umstritten, ab welcher Konzentration Alkohole die 11 β -HSD Aktivität hemmen (22;172). Um toxische Effekte weitgehend auszuschließen, wurde jeweils mit einer Methanolkonzentration von nur 0,1% im Inkubationsmedium gearbeitet. Diese Alkoholkonzentration liegt damit im bisher von verschiedenen Arbeitsgruppen verwendeten Bereich (130).

5.1.1.3. Analytik

Die Probenaufbereitung mittels Sep-Pak® Kartuschen stellt ein etabliertes Verfahren zur Aufreinigung steroidhaltiger Proben dar (148). Die HPLC-Analytik konnte in guter Qualität durchgeführt werden. Die Peaks der 11-Hydroxy- und 11-Oxo-Substanzen ließen sich chromatographisch ausreichend trennen (Abb.3.1.). Da etwaige durch das Reinigungsverfahren entstandenen Substanzverluste in gleicher Weise die 11-Oxo- und die

11-Hydroxysubstanz betreffen, bleiben die relativen Umsatzmessungen unbeeinflusst. Bis auf die Inkubationen mit Beclomethason (Abb.4.9.) konnten bei den Versuchen außer dem jeweiligen Redoxpartner keine weiteren Metabolite nachgewiesen werden.

5.1.1.4. Steroidsynthese

Sämtliche Steroide wurden in einer Reinheit von 95-99% gekauft oder von der *Schering AG* zur Verfügung gestellt. Jede Substanz wurde vor der Inkubation nochmals mittels HPLC-Analyse hinsichtlich ihrer Reinheit überprüft. Fehlermöglichkeiten ergeben sich lediglich aus der Eigensynthese von 11-Oxo-Prednyliden (mit Chrom-IV-Oxyd), 11-Oxo-Beclomethason und 11-Oxo-2-Cl-Fluocortolon (Verseifung mit Perchlorsäure) (Kap.3.4.). Die Oxidation von 11-Hydroxysteroiden mit Chrom-VI-oxyd ist eine gebräuchliche Methode, die von *Fried und Sabo* entwickelt wurde (42;49;66). Die nach der chemischen 11-Oxidation bzw. der Verseifungsreaktion gewonnenen Steroide konnten beim Durchlauf durch die HPLC isoliert und in ausreichender Reinheit aufgefangen werden. Konzentration und Reinheit der synthetisierten Substanzen wurden kurz vor Einsatz in die Inkubationsexperimente nochmals bestimmt (chromatographischer Vergleich mit dem reduzierten Steroid bekannter Konzentration) (170) (Abb.3.4.). Nach der Inkubation ließ sich im Chromatogramm wieder der reduzierte Redoxpartner detektieren. Damit ist sicher gewährleistet, dass auch die von uns selbst synthetisierten Steroide die notwendige Reinheit vor der Inkubation hatten.

5.1.2. Methodik der *in vivo* Versuche bei gesunden Probanden

5.1.2.1. Versuchsbedingungen und Suppression endogener Steroide

An gesunden männlichen Probanden wurde die 11 β -HSD-Aktivität nach oraler Gabe von Steroiden charakterisiert. Als Aktivitätsmaß dienten die Quotienten aus 11-Hydroxy- und 11-Oxo-Derivaten in Plasma (11 β -HSD1) und Urin (11 β -HSD2).

Die Suppression der endogenen Steroidproduktion durch geringe Dosen von Dexamethason stellt ein anerkanntes Verfahren dar, das vor allem als Dexamethason-Hemmtest seit langem klinisch etabliert ist. Eine Beeinflussung der 11 β -HSD-Aktivität durch diese geringen Dosen kann weitgehend ausgeschlossen werden. Da die Vorbehandlung an allen Versuchstagen durchgeführt wurde, sollten sich beim Vergleich der Daten dadurch keine Fehler ergeben. Die durchschnittliche Serumkonzentration von Cortisol betrug bei den Probanden zu Versuchsbeginn (um 8.00Uhr) $22 \pm 13,8$ nmol/l (Abb.4.18.) und ist damit an der unteren Detektionsgrenze der HPLC und der gängigen RIA-Methoden (15). Der Normalbereich (ohne

Prämedikation mit Dexamethason) liegt um diese Uhrzeit bei 160–770nmol/l (15). Für die Bestimmung der 11 β -HSD-Aktivität ist daher kaum mit Interferenzen durch endogene Steroide zu rechnen.

5.1.2.2. Messung der 11 β -HSD-Aktivität und Analytik

Es besteht Konsens darüber, dass die Messung von Cortisol und Cortison im Serum nach oraler Gabe von Cortison ein valider Parameter zur Aktivitätsbeurteilung der hepatischen 11 β -HSD1 ist (Abb.5.1.) (160). Analoges gilt für die Bestimmung von freiem Cortisol und freiem Cortison im Urin. Bezüglich der Charakterisierung der renalen 11 β -HSD2-Aktivität ist die Bestimmung der freien Steroide besser geeignet als die Messung der an Ring A reduzierten Metabolite (26;129;137). Beim Vergleich der Serumkonzentrationen von Cortisol und Cortison ist zu berücksichtigen, dass Cortisol zu ca. 95 % an Proteine gebunden ist, Cortison jedoch weitaus geringer. Die „freien“ Hormonspiegel unterscheiden sich weit weniger deutlich (92).

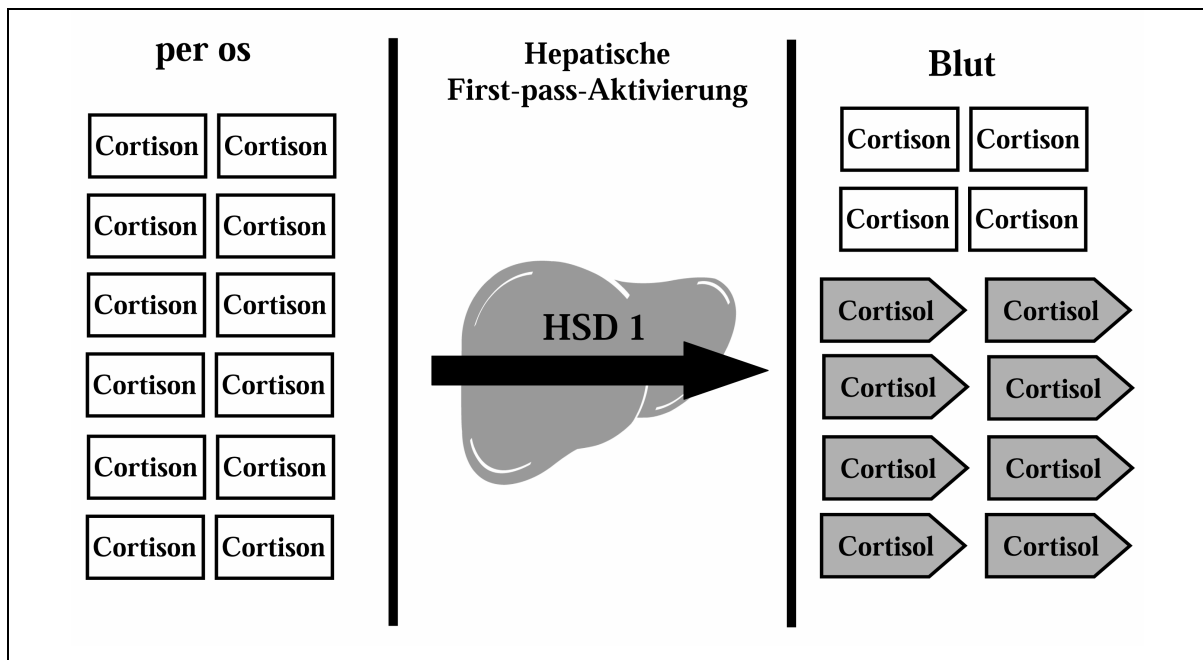


Abb. 5.1.: Bioassay zur Charakterisierung der hepatischen 11 β -HSD1-Aktivität. Nach Suppression der endogenen Glucocorticoide durch Vorbehandlung mit Dexamethason oder Betamethason wird Cortisonazetat per os verabreicht, aus welchem schon im Darm Cortisol freigesetzt wird. Die im Serum gemessenen Cortisol-Konzentrationen und das Verhältnis F/E sind ein valider Parameter zur Beurteilung der hepatischen 11 β -HSD1-Aktivität.

Die Analytik von Cortisol, Dexamethason und den entsprechenden 11-Oxo-Metaboliten erfolgte mit einem vollautomatischen flüssigkeitschromatographischen System ohne

vorherige Aufreinigung durch Sep-Pak® Kartuschen (146). Im Chromatogramm ließen sich die entstandenen peaks qualitativ und quantitativ ausreichend trennen. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte durch den Vergleich mit der Peakfläche der definierten Menge einer Standardlösung (Abb.4.21.).

Die Versuche zur Induktion der 11β-HSD1 durch Glucocorticoide wurden ebenfalls an gesunden Probanden durchgeführt und die Enzymaktivität durch Bestimmung der Ratio F/E in Plasma und Urin gemessen. Die gewonnenen Serum- und Urinproben wurden wiederum mit Hilfe des automatischen flüssigkeitschromatographischen Systems ausgewertet. Für eine möglichst optimale Induktion der 11β-HSD wurde die Applikation der Steroide bis zum letzten Versuchstag fortgesetzt. Dabei wurde Prednisolon durch die Äquivalenzdosis von Dexamethason ersetzt, um eine einwandfreie Analytik von Cortisol und Cortison zu gewährleisten (Prednisolon interferiert in der HPLC mit Cortisol).

In einem weiteren Probandenversuch wurde der Einfluß von Chenodesoxycholsäure auf die Aktivität der 11β-HSD1 *in vivo* untersucht. Die Bioverfügbarkeit von Chenodesoxycholsäure liegt nach oraler Gabe zwischen 80 und 100%. Mit den im Versuch verwendeten Dosen lassen sich Plasmaspiegel von etwa 2×10^{-5} mol/l erreichen. Damit liegen die Plasmakonzentrationen im Bereich der von *Diederich et al. in vitro* gefundenen IC₅₀ von Chenodesoxycholsäure für die selektive Inhibition der 11β-HSD1 ($2,8 \times 10^{-6}$ mol/l) (48;134).

5.2. Untersuchungen an transfizierten CHO-Zellen

5.2.1. 11 β -HSD1 und 11-Oxidation

Die mit der 11 β -HSD1 transfizierten CHO-Zellen zeigten keinerlei Oxidaseaktivität. Dieses Charakteristikum der 11 β -HSD1 ist sowohl für intakte humane Zelllinien als auch für intakte Hefezellen vielfach beschrieben (83;106;175). Eine Oxidaseaktivität der 11 β -HSD1 kann üblicherweise erst nach Homogenisierung von Zellen beobachtet werden. In Homogenaten ist die 11 β -Oxidation sogar die vorherrschende Reaktionsrichtung. Die Reduktaseaktivität scheint insgesamt wesentlich labiler zu sein als die Oxidaseaktivität. Das Phänomen konnte bisher nicht zufriedenstellend erklärt werden, reflektiert aber möglicherweise die intrazelluläre Lokalisation der 11 β -HSD1 in der inneren Membran des Endoplasmatischen Retikulums in direkter Nachbarschaft zu NADPH-regenerierenden Enzymen (147). Für die Präferenz der 11 β -Reduktion *in vivo* werden unter anderem intrazelluläre pH-Verhältnisse, ein hoher NADPH/NADP-Quotient und eine veränderte posttranslationale Modifizierung in den Wirtszellen verantwortlich gemacht (83;106).

5.2.2. Die 11-Reduktion durch die 11 β -HSD1

5.2.2.1. 11-Reduktion nicht halogener Steroide durch die 11 β -HSD1

Nach unseren Daten werden sowohl Prednison als auch die Prednisolonderivate Prednylidin und Methylprednisolon von der 11 β -HSD1 bevorzugt umgesetzt (Abb.4.2.). Der Einfluß der Δ 1-Dehydro-Konfiguration auf die Reduktion der 11 β -HSD1 wird in der Literatur größtenteils als aktivitätssteigernd beschrieben. Lediglich *Bush et al.* kamen im Jahr 1964 anhand von tierexperimentellen *in vivo* Untersuchungen zu der Auffassung, dass die Doppelbindung im Ring A die Reduktion durch die 11 β -HSD1 behindert (42). Passend zu unseren *in vitro* Versuchen mit transfizierten Zellen konnten wir auch in menschlichen Lebermikrosomen eine Verstärkung der Reduktion durch die Δ 1-Dehydro-Konfiguration zeigen (52). Auch in mit der 11 β -HSD1 transfizierten Hefezellen wird Prednison mit der im Vergleich zu Cortison etwa doppelten Maximalgeschwindigkeit reduziert, während bei der 11 β -Oxidation durch Zellhomogenate keine Unterschiede festgestellt werden konnten (83). Aus *in vivo*-Versuchen ist bekannt, dass Prednison nach oraler Gabe effektiver in das korrespondierende Hydroxyderivat (Prednisolon) umgewandelt wird als Cortison (91). Der Plasmquotient aus 11-Hydroxy- und 11-Oxoform scheint sogar bei zunehmender oraler Dosis von Prednison zu steigen (65).

Die beiden Prednisolonderivate 6 α -Methylprednisolon und Prednyliden (16-Methylenprednisolon) unterscheiden sich bezüglich der Reduktion durch die 11 β -HSD1 nicht signifikant von der Muttersubstanz (Abb.4.2.). Dafür sprechen ebenfalls Daten unserer Arbeitsgruppe aus Versuchen an Mikrosomenpräparaten. Demnach hemmt die 6 α -Methylgruppe zwar die 11-Oxidation der 11 β -HSD2, lässt aber die 11-Reduktion der 11 β -HSD1 weitgehend unbeeinflusst (37;47).

Zusammenfassend scheinen first pass - Aktivierung und damit die Bioverfügbarkeit für Prednison effektiver zu sein als für Cortison (Abb.5.2.). Das gleiche scheint auch für die von uns untersuchten Prednisolonderivate zu gelten, so dass auch bei oraler Gabe der entsprechenden 11-Oxo-Substanzen effektive Plasmakonzentrationen des aktivierten Steroids zu erwarten sind.

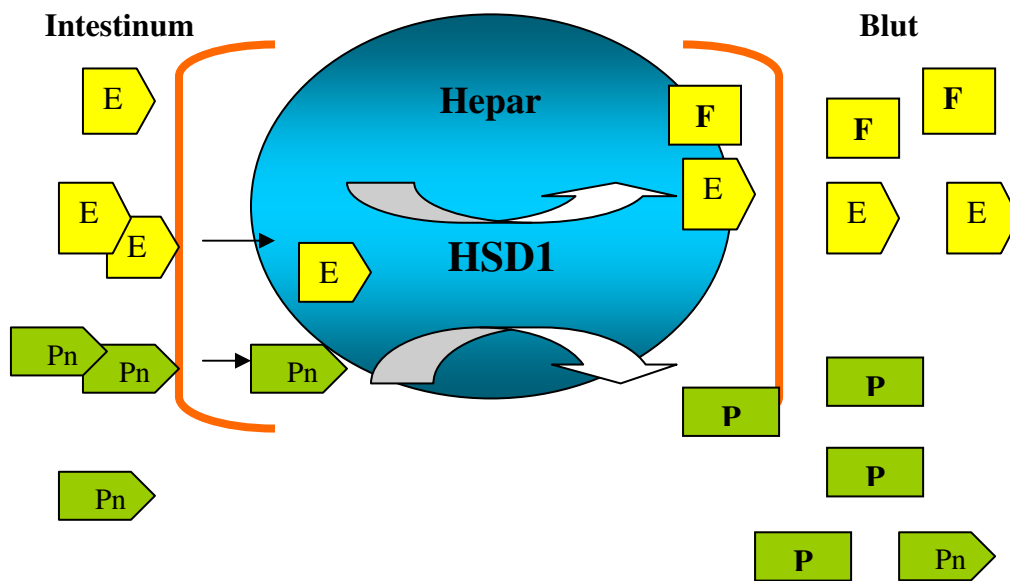


Abb.5.2.: Reduktion von Cortison (E) zu Cortisol (F) und von Prednison (Pn) zu Prednisolon (P) durch die 11 β -HSD1 der Leber nach oraler Applikation. Die 11-Reduktion des Δ 1-Dehydrosteroids Prednison läuft effektiver ab.

5.2.2.2. Effekt einer 2 α -Methylgruppe auf die 11-Reduktion von 9 α -Fluorocortison durch die 11 β -HSD1

Halogenierte Steroide werden von der 11 β -HSD1 ausserordentlich stark reduziert. Die entsprechenden 11-OH-Derivate lassen sich jedoch auch *in vitro* (im Gegensatz zu nahezu allen anderen Steroiden) nicht durch das Enzym oxidieren, obwohl die 11-Oxidation *in vitro* in Homogenaten und Mikrosomenpräparaten die vorherrschende Reaktionsrichtung der 11 β -HSD1 ist (48;50). So wird an Mikrosomenpräparationen von Meerschweinchenleber 9 α -Fluorocortison mit der im Vergleich zu Cortison 5-10fachen Maximalgeschwindigkeit reduziert (42). Gleichzeitig scheint die konkurrierende 11 β -Oxidation von 9 α -Fluorocortisol blockiert. *Abel et al.* konnten selbst unter Einsatz von 5mmol NADP an humanen Lebermikrosomen keine 11 β -Oxidation von Fluorocortisol feststellen (1). Die 9 α -Fluorierung blockiert neben der 11 β -Oxidation vermutlich auch die 5 β -Reduktion, während die 5 α -Reduktion bevorzugt abläuft (1).

Bei unseren Untersuchungen zur Reduktion der 11 β -HSD1 erreicht 9 α -Fluorocortison den etwa dreifachen Umsatz von Cortison (Abb.4.4.). Nach Ansicht von *Bush et al.* wird durch einen negativen induktiven Effekt des Fluoratoms eine partiell positive Ladung am Kohlenstoffatom 11 erreicht. Dadurch wird die 11-Reduktion aus thermodynamischer Sicht begünstigt (42).

Cortison wird nach oraler Gabe in der Leber größtenteils zu Cortisol aktiviert. Die Reduktion von 2 α -Methylcortison erfolgt jedoch nur zu 5-10%. Selbst mehrere Stunden nach Einnahme von 50mg 2 α -Methylcortison beträgt der Plasmaquotient aus 11-Hydroxy- und 11-Oxo-Form nur annähernd 1/10. Aufgrund der schwachen 11-Reduktion erreicht 2 α -Methylcortison *in vivo* nur etwa 5-10% der glucocorticoiden und mineralocorticoiden Wirkung von 2 α -Methylcortisol (41).

Bei unseren *in vitro* Untersuchungen war der Effekt der 2 α -Methylgruppe etwas geringer ausgeprägt. Methyliertes Fluorocortison erreichte zwar nur 50% des Umsatzes von 9 α -Fluorocortison, wurde damit aber von der 11 β -HSD1 immer noch signifikant stärker reduziert als Cortison (Abb.4.3.). Unter dem Gesichtspunkt eines möglichen Glucocorticoid - targeting für 11 β -HSD2-Zielzellen sollte die hepatische Aktivierung von Precursorsubstanzen nahezu vollständig geblockt sein.

Die Hemmung der 11-Reduktion durch die 2 α -Methylgruppe wird jedoch durch den gegenteiligen Effekt der 9 α -Fluorierung mehr als kompensiert. *Bush et al.* kamen schon in den 60er Jahren zu ähnlichen Ergebnissen. Sie untersuchten die 11-Reduktion von 11-Oxo-Androstendion, einer Substanz, die von der 11 β -HSD1 stärker umgesetzt wird als Cortison. An Mikrosomenpräparationen der Leber konnte durch eine 2 α -Methylierung die Reduktion von 11-Oxo-Androstendion lediglich auf das Niveau von Cortison reduziert werden (40).

5.2.2.3. Effekt einer 2-Chlorgruppe auf die 11-Reduktion durch die 11 β -HSD1

Zur Metabolisierung von Fluocortolon durch 11-Hydroxysteroid Dehydrogenasen existieren bisher nur wenige Daten. Nach oraler Gabe von 20mg [³H]-Fluocortolon entspricht der überwiegende Teil der extrahierbaren Verbindungen der unveränderten Substanz, nur wenige Prozent dem 11-Oxo-Fluocortolon (71). Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass die Kombination aus 6 α -Fluorgruppe und 17-Desoxykonfiguration die Reduktion durch die 11 β -HSD1 begünstigt (Abb. 4.6.). Diese *in vitro* Befunde sprechen wiederum für eine Benachteiligung der Oxidation durch die 11-HSD1 (von uns nicht getestet), was wiederum mit den *in vivo* Befunden in Einklang wäre. Der Effekt ist jedoch im Vergleich zur 9 α -Fluorierung geringer ausgeprägt. Dafür sprechen auch Daten unserer Arbeitsgruppe zur 11 β -Reduktion durch humane Lebermikrosomen (47). Demnach stimuliert eine 6 α -Fluorgruppe die 11-Reduktion durch die 11 β -HSD1 in geringerem Maße als die 9 α -Fluorgruppe (Abb.4.4.; Abb.4.6.).

Mit 2Cl-11-Oxo-Fluocortolon ließ sich keine Reduktion durch die 11 β -HSD1 feststellen. Ebenso waren Oxidation und Reduktion der Substanz durch die 11 β -HSD2 komplett geblockt (Abb. 4.13.; Kap.4.1.3.2.). Eine sterische Behinderung der 11-Reduktion ist schon von der 2 α -Methylgruppe bekannt (Abb.4.4.) (41). Offenbar ist dieser Effekt bei der 2-Chlorgruppe so stark ausgeprägt, dass 2-Chlorsteroidoide das katalytische Zentrum des Enzyms nicht erreichen können.

5.2.2.4. Effekte von 9 α -Halogensubstituenten auf die 11-Reduktion durch die 11 β -HSD1

Neben 9 α -Fluorosteroiden werden auch 9 α -Chlorsteroidoide von der 11 β -HSD1 bevorzugt reduziert (40). *Bush et al.* berichten über eine im Vergleich zu Cortison 2-5 fache Maximalgeschwindigkeit für die 11 β -Reduktion (39). Die 9 α -Chlorsteroidoide wurden jedoch nur etwa halb so stark umgesetzt wie 9 α -Fluoroderivate (5-10 fach im Vergleich zu Cortison).

Die Autoren postulierten daher, dass mit sinkender Elektronegativität der Einfluß von Halogensubstituenten auf die 11 β -Reduktion schwächer wird. Der bereits erwähnte negative induktive und damit die Hydroxyform stabilisierende Effekt sei daher bei chlorierten Substanzen geringer ausgeprägt als bei fluorierten (40).

Nach dieser Theorie müsste die 11 β -HSD1 Betamethason (9 α -Fluorgruppe) im Vergleich zu Beclomethason (9 α -Chlorgruppe) als Substrat bevorzugen. Bei unseren Untersuchungen wurde jedoch Beclomethason stärker reduziert (Abb.4.8.). Allerdings entstand bei allen Redoxreaktionen mit Beclomethason neben 11-Oxo- und 11-Hydroxysubstanz ein weiterer Metabolit, der nicht identifiziert werden konnte (Abb.4.9.). Da dieser nicht in die Berechnung des Umsatzes eingeflossen ist, werden die Ergebnisse möglicherweise zugunsten der 11 β -Reduktion verfälscht.

Zur Pharmakokinetik von Beclomethason selbst liegen bisher nur wenige Daten vor, da lediglich das 17-21-Dipropionat der Substanz in der Asthmatherapie klinisch angewendet wird. Beclomethasondipropionat (BDP) wird nach Applikation als Aerosol hauptsächlich zu Beclomethason-17-monopropionat (BMP) hydrolysiert. Diese Substanz besitzt eine sehr hohe glucocorticoide Potenz und stellt vermutlich den eigentlichen Wirkstoff dar (43). Auch aus Versuchen an Lebermikrosomen ist bekannt, dass bei Halogensteroiden neben dem jeweiligen Redoxpartner weitere Metabolite entstehen. *Bush et al.* berichten, dass bei der 11 β -Reduktion von 9 α -Bromocortison zu etwa 30% eine Substanz entsteht, die in allen Eigenschaften Cortison ähnelt. Das durch Debromierung entstandene Cortison wurde nicht reduziert, was die Autoren im Sinne einer Interaktion des Bromatoms mit dem aktiven Zentrum des Enzyms diskutierten (40). Die Retentionszeit des bei unseren Untersuchungen entstandenen Metaboliten liegt zumindest sehr nahe an der von Cortison. Massenspektrometrische Untersuchungen wurden jedoch nicht durchgeführt. Diese Ergebnisse könnten durchaus auf eine bisher nicht beschriebene zusätzliche Eigenschaft der 11 β -HSD1 hinweisen. Eine zusätzliche Funktion als debromierendes bzw. dechlorierendes Enzym ist durchaus denkbar, da es Hinweise gibt, dass die 11 β -HSD1 auch an der Entgiftung von Nitrosaminen beteiligt ist (52).

Insgesamt konnten alle untersuchten 9-Halogensteroiden die 11 β -Reduktion der HSD1 stimulieren. Ob der Einfluß der Halogenierung tatsächlich mit steigender Elektronegativität des Substituenten zunimmt, konnte aufgrund des bei der Reduktion von Beclomethason entstandenen unbekanntes Reaktionsproduktes nicht mit Sicherheit geklärt werden.

5.2.3. Die 11-Oxidation durch die 11 β -HSD2

5.2.3.1. Oxidation nicht halogener Steroide durch die 11 β -HSD2

Aufgrund des um etwa eine Zehnerpotenz niedrigeren K_m -Wertes der 11 β -HSD2 werden geringere Maximalgeschwindigkeiten erreicht als bei den Versuchen zur 11-Reduktion durch die 11 β -HSD1.

Durch die 2 α -Methylgruppe wird die 11-Oxidation durch die 11 β -HSD2 in ähnlichem Ausmaß sterisch gehemmt wie die 11-Reduktion durch die 11 β -HSD1 (Abb.4.10.). Diese *in vitro* - Befunde sind in Übereinstimmung mit aus der Literatur bekannten *in vivo* - Daten, wonach die geringe 11 β -Oxidation von Methylsteroiden eine Urinquotienten von Methylcortisol/Methylcortison von 2:1 bedingt, während der Quotient F/E üblicherweise nur etwa 0,5 beträgt (41;129) (Abb.4.22.).

Prednisolon (Δ 1-Dehydrocortisol) ist nach unseren Daten für die 11-Oxidation durch die 11 β -HSD2 ein besseres Substrat als Cortisol. Auch an humanen Nierenrindemikrosomen wird Prednisolon verglichen mit Cortisol etwa doppelt so stark inaktiviert (37;52). In MCF-7 Zellen (aus humanem Mammacarcinom-Gewebe) konnten mit Prednisolon etwa gleich starke Umsätze wie mit Corticosteron erreicht werden (85). Corticosteron ist auch für die humane 11 β -HSD2 ein besseres Substrat als Cortisol (103). Aus Tierversuchen ist bekannt, dass auch nach hohen intraperitonealen Dosen von Prednisolon der renale Prednisolon/Prednison-Quotient (11 β -HSD2!) sehr gering ist (59). Möglicherweise ist die starke renale 11-Oxidation von Prednisolon der entscheidende Effekt für die geringen mineralocorticoiden Effekte der Substanz.

Anders als bei der 11-Reduktion durch die 11 β -HSD1 hemmen sowohl die 16-Methylenkonfiguration (Prednylidin) als auch die 6 α -Methylgruppe (Methylprednisolon) die Oxidation durch die 11 β -HSD2 signifikant (Abb.4.10.). In Mikrosomenpräparaten der Nierenrinde wird sogar ein noch stärkerer Hemmeffekt der 6 α -Methylgruppe beobachtet. Dort erreicht der Umsatz von Methylprednisolon nur etwa 30% des Niveaus von Prednisolon (47).

Obwohl Methylprednisolon im Vergleich zu Prednisolon weniger stark durch die 11 β -HSD2 inaktiviert wird, unterscheiden sich beide Substanzen hinsichtlich ihrer mineralocorticoiden Potenz kaum (92). Die verringerte Inaktivierung des 6 α -Methylderivates könnte für eine renale immunsuppressive Therapie (zum Beispiel nach Nierentransplantation oder bei

Glomerulonephritiden) von Vorteil sein, da Methylprednisolon im Vergleich zum weithin verwendeten Prednisolon offensichtlich einen ungehinderteren Zugang zu den renalen GC-Rezeptoren findet und daher möglicherweise für eine effektive Immunsuppression nur in geringerer (und damit vermutlich nebenwirkungsärmerer) Dosis gegeben werden muß (87;165).

Dies gilt vermutlich auch für Deflazacort. Bei dieser Substanz wird die 11-Oxidation der 11 β -HSD2 wahrscheinlich durch den Einfluß der 16,17-Methyloxazolinkonfiguration behindert. Da das oral gegebene Deflazacort in einem „First pass Metabolismus“ in Position 21 deacetyliert wird, wurde von uns die systemisch verfügbare Substanz 21-Deacetyldeflazacort untersucht (14). Die im Vergleich zu Prednisolon häufig beschriebene bessere Verträglichkeit von Deflazacort bezüglich typischer steroidbedingter Nebenwirkungen hängt möglicherweise auch mit der besseren Verfügbarkeit der 11-OH-Substanz in Zielorganen mit 11 β -HSD2 - Expression zusammen, die eine Therapie mit niedriger Dosierung erlaubt (32). Allerdings sind diese postulierten Vorteile des Deflazacort gegenüber dem weitaus billigeren Prednisolon bisher in keiner größeren, exakte Äquivalenzdosen benutzenden Studie belegt worden. Für eine bevorzugte Verwendung dieser Substanz fehlen daher noch harte evidenzbasierte Daten.

5.2.3.2. Effekt der 21-Desoxy-Konfiguration auf die 11-Oxidation durch die 11 β -HSD2

Dexamethason als Substrat der 11 β -HSD2 wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht (30;151). Die Substanz unterscheidet sich von Cortisol durch die (bereits vom Prednisolon bekannte) Δ 1-Dehydrokonfiguration, die 9 α -Fluorierung und die 16 α -Methylgruppe, die unter anderem die mineralocorticoide Aktivität vermindern soll.

Die im Vergleich zu Cortisol signifikant geringere 11 β -Oxidation von Dexamethason entspricht weitgehend den bisher bekannten Daten. An menschlichen Nierenrindenmikrosomen läuft die 11-Oxidation in der Reihenfolge Cortisol > 9 α -Fluorocortison > Dexamethason ab (37). Damit scheint die 16 α -Methylgruppe des Dexamethasons die durch die 9 α -Fluorierung ohnehin verringerte 11 β -Oxidation weiter zu behindern. An Gewebeschnitten der Niere konnte mit Dexamethason nur 30% des Umsatzes von Cortisol erreicht werden (151). Auch die bisher an CHO und CHOP-Zellen gewonnenen Daten entsprechen weitgehend unseren Ergebnissen. Für die 11-Oxidation von Dexamethason wurden dabei höhere Km- und niedrigere Vmax-Werte ermittelt als für Cortisol (30;103).

Bedingt durch die nur geringe parakrine Präzeptor-Inaktivierung durch die 11 β -HSD2 sollte Dexamethason die renalen GC-Rezeptoren noch effektiver besetzen können als die von uns getesteten Prednisolonderivate. Auch die kaum vorhandene mineralocorticoide Aktivität macht die Substanz für die Immunsuppression in Organen mit hauptsächlichlicher Aktivität der 11 β -HSD2 interessant (Abb.5.3.).

Nach unseren Daten wird 21-Desoxydexamethason signifikant stärker durch die 11 β -HSD2 umgesetzt als Dexamethason. Die 21-OH-Gruppe des Dexamethasons scheint demnach die 11 β -Oxidation eher zu hemmen (Abb.4.12.).

Untersuchungen zum Einfluß von Substituenten der Seitenkette liegen bisher nur zur Reduktion durch die 11 β -HSD1 vor. Das völlige Fehlen der 17 β -Seitenkette soll dabei die 11-Reduktion der 11 β -HSD1 erleichtern (41). *Bush et al.* begründen dies durch eine bessere Rotation des Substrates an das aktive Zentrum des Enzyms. Unsere Daten sprechen dafür, dass dies auch bei der 11 β -HSD2 eine Rolle spielt.

5.2.3.3. Effekte von 6 α - und 9 α -Halogen- und 2-Chlorsubstituenten auf die 11-Oxidation durch die 11 β -HSD2

Fluocortolon (17Desoxy-16 α Methyl-6 α Fluoro-Prednisolon) ist im Gegensatz zu Dexamethason ein hervorragendes Substrat für die 11 β -HSD2. Auch aus Versuchen an humanen Nierenmikrosomen ist bekannt, dass sie Substanz wesentlich stärker von der 11 β -HSD2 umgesetzt wird als Cortisol (47). Dieses Charakteristikum war bei keinem anderen Fluorosteroid zu beobachten. Bisher wurde vermutet (71), dass von Fluocortolon im Urin die 11-Hydroxymetabolite überwiegen und die 11-Oxidation der Substanz eher gering ausgeprägt ist. Vermutlich ist erst die Kombination aus 6 α -Fluorogruppe und 17-Desoxykonfiguration für die im Vergleich zu Cortisol stärkere Oxidation verantwortlich, da bekannt ist, dass beide Substituenten allein die 11-Oxidation durch die 11 β -HSD2 eher behindern (47). Das Wissen um die den unfluorierten Steroiden ähnliche Pharmakokinetik von Fluocortolon ist bei der Auswahl der Indikation der Substanz von Bedeutung (s.u.).

Die zusätzliche Einführung einer 9 α -Fluorogruppe beim Difluocortolon verringert in Mikrosomen der Nierenrinde die 11-Oxidation auf etwa ein Fünftel (37).

Wie bei der 11-Reduktion der HSD1 blockiert die Einführung einer 2Cl-Gruppe aufgrund sterischer Effekte auch die 11-Oxidation durch die 11 β -HSD2 vollständig (Abb.4.13, Fluocortolon versus 2-Chlor-Fluocortolon).

Anders als bei der 11-Reduktion durch die 11 β -HSD1 (Kap.4.1.1.4.) beeinflussen unterschiedliche 9 α -Halogensubstituenten die 11-Oxidation durch die 11 β -HSD2 kaum. Die von *Bush et al.* postulierte Theorie eines negativen induktiven Effektes [zunehmende Stabilisierung der 11-Hydroxyform von 9 α -Halogensteroiden mit wachsender Elektronegativität des Halogensubstituenten (40)] kommt bei der 11-Oxidation durch die 11 β -HSD demnach kaum zur Geltung. Betrachtet man jedoch zusätzlich die konkurrierend ablaufende - und *in vivo* vorherrschende - 11-Reduktion (Abb.4.17.; Kap.4.1.3.; Kap.4.2.2.), so zeigt sich, dass sich das Redoxgleichgewicht der 11 β -HSD2 für 9 α -Fluorsteroiden (Betamethason) tatsächlich weiter auf Seiten der 11-Hydroxyform befindet als dies bei 9 α -Chlorsteroiden (Beclomethason) der Fall ist. Durch das Überwiegen der 11-Oxidation und der damit raschen Metabolisierung bereits am Wirkort sind 9 α -Chlorsteroiden auch für den klinischen Einsatz in der topischen Steroidtherapie (geringere systemische Nebenwirkungen) besser geeignet (Kap.5.3.).

5.2.3.4. Oxidation verschiedener topisch angewandter Steroide durch die 11 β -HSD2

Die meisten der getesteten Substanzen wurden in den 70er Jahren zur Therapie der allergischen Rhinitis eingeführt, da sie eine hohe topische Potenz bei relativ geringer systemischer Bioverfügbarkeit besitzen (164). Pharmakokinetische Daten insbesondere zur 11 β -Oxidation gibt es bisher kaum. Neben Halogengruppen an Position 6 und/oder 9 (Verstärkung der glucocorticoiden Wirkung) verfügen die Steroide häufig über komplexe Substituenten am Ring D, insbesondere an C16, C17 und C21 (s. Anhang). Vor allem letztere sollen für eine hohe topische Wirkung bei geringer systemischer Bioverfügbarkeit verantwortlich sein.

Die im Vergleich zu Cortisol schwächere 11 β -Oxidation von Flumethason ist bereits aus Untersuchungen an Nierenmikrosomen bekannt (37) (Abb. 4.15.). Offenbar überwiegen hier hemmende Einflüsse von 6 α - und 9 α -Fluorogruppe die Bevorzugung der 11 β -Oxidation durch die Δ 1-Dehydrokonfiguration.

Fluticasonpropionat ähnelt in der chemischen Struktur dem Flumethason, besitzt jedoch eine zusätzliche Fluorogruppe an der Seitenkette (Abb. 4.14.). Die bessere Metabolisierung der Substanz durch die 11 β -HSD2 steht eventuell im Zusammenhang mit der im Vergleich zu den anderen Substanzen schlechteren Bioverfügbarkeit (Tab.5.1.).

Steroid	F (%)	PEB (%)	t1/2(h)
Budesonid	98	88	2,3
Flunisolid	49	80	1,6
Fluticasonpropionat	1,8	90	7,8

Tab. 5.1.: Bioverfügbarkeit nach topischer im Vergleich zur i.v. Applikation (F), Plasmaeiweißbindung (PEB) sowie Halbwertszeit (t1/2) nach i.v. Administration verschiedener topischer Steroide (164).

Budesonid und Flunisolid wurden von der 11 β -HSD2 fast gar nicht umgesetzt. Für die Blockierung der 11-Oxidation scheint vor allem die 16 α ,17 α -Propylmethylenkonfiguration beider Substanzen verantwortlich. Budesonid wird auch von der 11 β -HSD1 kaum metabolisiert. So konnte an Mikrosomenpräparaten transfizierter Hefezellen keinerlei Umsatz erreicht werden, obwohl die 11-Oxidation *in vitro* die vorherrschende Reaktionsrichtung der 11 β -HSD1 ist (83). Indirekte Hinweise auf den Metabolismus von Budesonid geben auch die Daten von *Feinstein et al.* an kultivierten Bronchialepithelien. Dort kann Glycyrrhetinsäure durch Hemmung der 11 β -HSD2 die Steroideffekte von Cortisol vervielfachen. Bei Inkubation mit Budesonid hatte die Hemmung der 11 β -HSD2 keinen Einfluss (60). Bei Budesonid könnte es einen Zusammenhang zwischen mangelnder Metabolisierung durch die pulmonale 11 β -HSD2 und der guten Bioverfügbarkeit geben (Tab. 5.3.) (56).

Die insgesamt eher schwache Metabolisierung der Substanzen durch die 11 β -HSD2 ist aus pharmakologischer Sicht eher von Vorteil, da das Enzym nach neueren Daten zusätzlich zu den Mineralokortikoidzielzellen auch in den Zielorganen topischer Steroidtherapie (Lunge, Kolorektum, Haut) exprimiert wird. Aufgrund der geringen Inaktivierung am Wirkort müssen daher nur kleine Dosen verabreicht werden (81;163).

5.2.4. Die 11-Reduktion durch die 11 β -HSD2

Die Reduktion von Cortison durch die 11 β -HSD2 gelang bisher nur an Nierenrindenmikrosomen. Dabei wurde unter Einsatz eines NADH regenerierenden Hilfsenzymystems die konkurrierende Oxidationsreaktion unterdrückt (49). Bei Expressionsexperimenten an transfizierten Zellen ist bisher keinerlei Reduktaseaktivität der 11 β -HSD2 gegenüber Cortison festgestellt worden (30;103). Auch nach unseren Daten fungiert die 11 β -HSD2 gegenüber physiologischen Steroiden ausschließlich als Oxidase (Kap.4.1.3.).

Die Reduktion von 9 α -Fluorocortison und 11-Oxo-Dexamethason läuft an Mikrosomenpräparaten und Homogenaten der Niere mit hoher Maximalgeschwindigkeit ab. Auch an Gewebeschnitten liegt das Redoxgleichgewicht für 9 α -Fluorosteroiden eher auf Seiten der Hydroxysubstanz (51;95;126) (25;151).

Bei unseren Untersuchungen an transfizierten CHO-Zellen erwies sich die Reduktaseaktivität der 11 β -HSD2 jedoch auch gegenüber fluorierten Steroiden als gering. Um ähnliche Umsätze wie bei der 11-Oxidation durch die 11 β -HSD2 zu erzielen, musste eine fünffach höhere Zellmenge eingesetzt und die Substratkonzentration halbiert werden (Abb.4.16.; Kap. 4.1.3.). Die relativ schwache Reduktaseaktivität durch die 11 β -HSD2 der transfizierten CHO-Zellen kann folgende Gründe haben:

1. Die mangelnde intrazelluläre Verfügbarkeit von Kofaktoren.

Nach *Brown et al.* bindet die 11 β -HSD2 Glucocorticoide lediglich im Beisein eines geeigneten Kosubstrates (31). Bei den meisten Arbeiten zur Reduktion von Fluorosteroiden durch die 11 β -HSD2 wurde dem Reaktionsansatz NADH im Überschuss beigefügt (51;126). Da die Zellmembran für NADH nicht frei permeabel ist, stand uns diese Möglichkeit nicht zur Verfügung (72). Die gute 11-Reduktion der mit der 11 β -HSD1 transfizierten CHO-Zellen stellt eine NADPH abhängige Reaktion dar und lässt wenig Rückschlüsse auf die (NADH abhängige) Reduktaseaktivität der 11 β -HSD2 zu. Auch die vergleichsweise starke 11-Reduktion von Fluorocortisol in Gewebeschnitten der Niere (ein Gewebe mit hoher 11 β -HSD2-Expression *in vivo*) ist am ehesten durch einen von CHO-Zellen verschiedenen Kofaktorbesatz bedingt (51)

2. Spezifische Einflüsse durch das intrazelluläre Millieu.

Von der 11 β -HSD1 ist bekannt, dass sich die vorherrschende Reaktionsrichtung in intakten Zellen von der in Homogenaten unterscheidet (Kap.1.3.1). Die Reduktion von Fluorosteroiden durch die 11 β -HSD2 ist bisher vorrangig an Mikrosomenpräparationen und an Homogenaten untersucht worden. *Ferrari et al.* führten Versuche zur 11 β -HSD2-Reduktion an modifizierten CHO-Zellen durch, bei denen durch das sogenannte Groß-T-Antigen eine viel stärkere Replikation des Inserts erreicht werden kann. Dabei fanden sie in Homogenaten transfizierter Zellen eine NADH(0,5mmol) - abhängige Reduktion von 11-Dehydro-Dexamethason (63). Lediglich *Li et al.* konnten auch an intakten CHOP-Zellen eine Reduktion von Dehydrodexamethason mit einer hohen erreichbaren Maximalgeschwindigkeit nachweisen (103). Auffallend bei dieser Arbeit ist jedoch, dass der für die 11 β -HSD2 ermittelte Km-Wert größer ist als der für die 11 β -HSD1. Von den meisten Autoren wird der Km-Wert der 11 β -HSD2 als etwa eine Zehnerpotenz unter dem der 11 β -HSD1 liegend angegeben (51).

Gewebespezifische Faktoren der CHO-Zellen können mit dem Enzym komplexieren und dessen Bidirektionalität beeinflussen. Die posttranslationale Prozessierung des Enzyms erfolgt in Abhängigkeit von der enzymatischen Ausstattung des Muttergewebes. So konnte bei Zugabe von Mikrosomen aus Pankreasgewebe des Hundes zu Lysaten 11 β -HSD2 translatisierender Kaninchenretikulozyten im Western Blot eine zusätzliche Bande bei 31kDa identifiziert werden (Interaktion der 11 β -HSD2 mit lokalen Proteinen) (30). Um gewebespezifische Einflüsse möglichst gering zu halten, müsste die Charakterisierung der Enzymaktivität in kultivierten Mineralocorticoid-Zielzellen erfolgen.

3. Einsatz einer Substratkonzentration über dem Km-Wert für die 11 β -HSD2 Reduktion.

Die Km-Werte für die 11 β -HSD2-Reduktion von Fluorosteroiden liegen im zweistelligen Nanomolbereich und sind damit niedriger als die Km-Werte für die 11 β -HSD2-Oxidation (49;51;103). Die Unterschiede fallen jedoch insgesamt gering aus.

Für unsere Untersuchungen wurden keine radioaktiv markierten Tracersubstanzen verwendet. Daher mußte mit einer Substratkonzentration von mindestens 1 μ mol/l gearbeitet werden, um die Qualität der HPLC-Analytik nicht zu gefährden. Dieses kann möglicherweise zu einer stärkeren Beeinflussung der 11 β -Reduktion im Vergleich zur 11 β -Oxidation geführt haben.

Schwankungen des absoluten Ausmaßes der bidirektionalen Eigenschaften der 11 β -HSD - Isoenzyme sind nicht ungewöhnlich. So konnten *Li. et al.* die 11 β -Oxidation von Cortisol und Corticosteron durch die HSD1 nicht nur an Homogenaten, sondern auch an intakten CHOP-Zellen beobachten (103). Anderen Gruppen gelang dies nicht (83;106;175). *Brown et al.* exprimierten wie wir die 11 β -HSD2 in CHO-Zellen und charakterisierten die Enzymaktivität gegenüber Cortisol und Dexamethason. Eine Reduktaseaktivität konnten sie nicht feststellen, das Dehydrodexamethason wird jedoch leider als Substrat nicht explizit erwähnt (30).

Zur Beurteilung der Hauptreaktionsrichtung eines Enzymes ist zusätzlich die Rückreaktion von Bedeutung. Da zur 11 β -Oxidation von 9 α -Fluorocortisol bereits an Gewebeschnitten der Niere (47) sowie an Nierenrindemikrosomen (50) und *in vivo* (126) erhobene Daten aus unserer Arbeitsgruppe vorliegen, haben wir dieses nicht erneut an CHO Zellen untersucht. Dennoch ist durch zahlreiche Arbeiten sicher belegt (47;50;51;103), dass für 9 α fluorierte Steroide das Gleichgewicht der 11 β -HSD2 sehr stark auf der Hydroxyseite liegt und somit die 11-Reduktion bevorzugt wird.

5.2.4.1. Effekt einer 2 α -Methylgruppe auf die 11-Reduktion durch die 11 β -HSD2

Trotz der schwachen Reduktaseaktivität der 11 β -HSD2 ließen sich valide Daten zum Einfluß einer 2 α -Methylgruppe auf die 11-Reduktion erheben. Es konnte gezeigt werden, dass eine 2 α -Methylgruppe die Reduktion von 9 α -Fluorocortison um etwa 50% vermindert (Abb.4.16.). Damit hemmt der Substituent in etwa gleichem Ausmaß sowohl 11-Oxidation und 11-Reduktion durch die 11 β -HSD2 als auch die 11-Reduktion durch die 11 β -HSD1 (Abb.4.4.; -4.10. und -4.16.).

Unter dem Gesichtspunkt eines möglichen renalen Glucocorticoid - targeting ist methyliertes 9 α -Fluorocortison daher ungeeignet. Die sterische Hemmwirkung der equatorialen 2 α -Methylgruppe wirkt sich auf die 11-Reduktion von 11 β -HSD1 und 11 β -HSD2 gleichsinnig aus.

5.2.4.2. Effekte von 9 α -Halogensubstituenten auf die 11-Reduktion der 11 β -HSD2

Betamethason ist das Diastereoisomer von Dexamethason (16 β - statt 16 α -Methylgruppe). Nach unseren Daten wird Dehydrobetamethason in etwas geringerem Ausmaß von der 11 β -HSD2 reduziert als 9 α -Fluorocortison (Abb.4.16.; Abb.4.17.). Bedingt durch das Zusammenspiel von nur gering ausgeprägter 11-Oxidation und effektiver Rückumwandlung der entstehenden 11-Oxosubstanz in die aktive 11-Hydroxysubstanz durch die 11 β -HSD2 der Niere überwiegt letztere nach Einnahme von radioaktiv markiertem Betamethason im Urin (121).

Aufgrund des bereits erwähnten negativen induktiven Effektes von 9-Halogensubstituenten war auch für 11-Oxo-Beclomethason eine Reduktion durch die 11 β -HSD2 zu erwarten (39). Im Versuch konnten wir jedoch keinerlei Reduktion von 11-Oxo-Beclomethason durch die 11 β -HSD2 beobachten (Abb.4.17.). Es muß daher bezweifelt werden, dass Halogensubstituenten die Redoxreaktionen der 11 β -HSD immer gleichsinnig beeinflussen. So berichten *Bush et al.* beispielsweise, dass eine 12 α -Chlorgruppe die Reduktaseaktivität der 11 β -HSD1 in Lebermikrosomen erhöht, während eine 12 α -Bromogruppe die Reaktion hemmt (40).

5.2.5. Zusammenfassung der Effekte verschiedener Substituenten auf die Oxidation und die Reduktion von 11 β -HSD1 und 11 β -HSD2

In den Tabellen 5.2. und 5.3. werden die in unserer Arbeitsgruppe gewonnen Erkenntnisse zum Einfluss von Substituenten auf die Aktivität von 11 β -HSD1 und -2 zusammengefasst.

11 β -HSD1-Oxidation		11 β -HSD1-Reduktion	
gesteigert durch	Vermindert durch	gesteigert durch	vermindert durch
Δ 1-Dehydro-	9 α -Fluor-, 6 α -Fluor- 16 α -Methyl-	Δ 1-Dehydro- 17-Desoxy- 9 α -Fluor-, 6 α -Fluor- 9 α -Chlor-	2 α -, 16 α -, 16 β -Methyl- 2-Chlor-

Tab.5.2.: Zusammenfassung der in unserer Arbeitsgruppe durch Untersuchungen an Lebermikrosomen und transfizierten CHO-Zellen gewonnenen Erkenntnisse über den Einfluss von Substituenten auf die Aktivität der 11 β -HSD2.

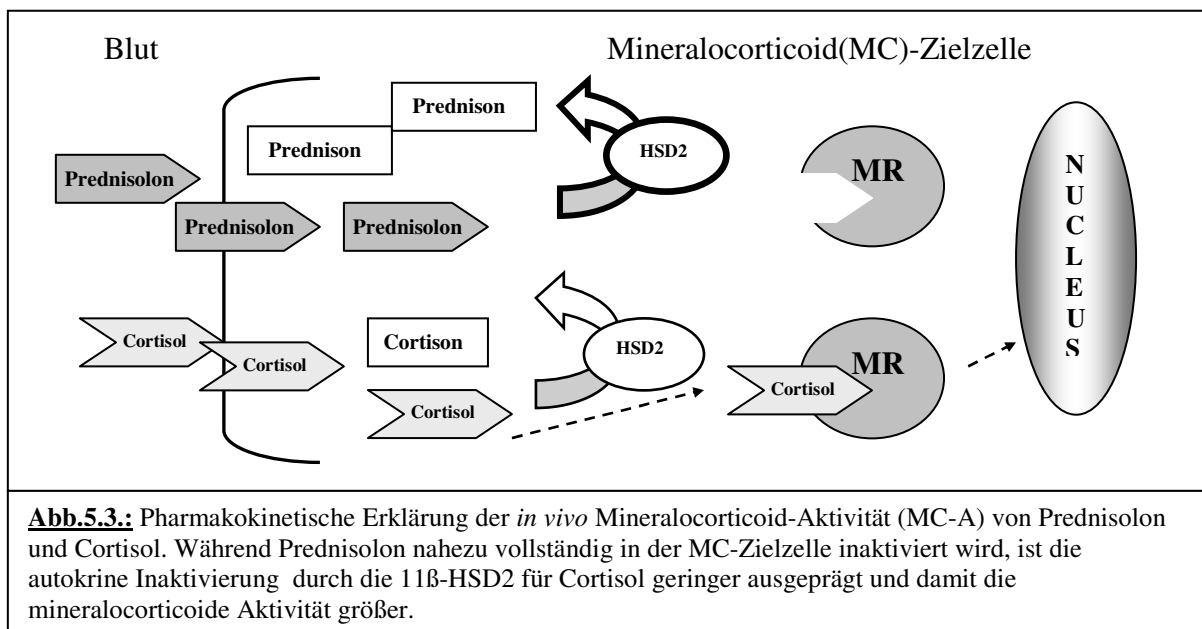
11 β -HSD2-Oxidation		11 β -HSD2-Reduktion	
Gesteigert durch	vermindert durch	gesteigert durch	vermindert durch
Δ 1-Dehydro- 17-Desoxy- ²	9 α -Fluor-, 6 α -Fluor- 16 α -, 16 β -Methyl- 2 α -, 6 α -Methyl- 16-Methylen, 2-Chlor- 16,17-Methyloxazolin- 17-Desoxy- ¹	Δ 1-Dehydro- 9 α -Fluor-, 6 α -Fluor- 17-Desoxy- ¹	16 α -, 16 β -Methyl- 2 α -Methyl- 2-Chlor- 17-Desoxy- ²

Tab.5.3.: Zusammenfassung der in unserer Arbeitsgruppe durch Untersuchungen an Nierenmikrosomen und transfizierten CHO-Zellen gewonnenen Erkenntnisse über den Einfluss von Substituenten auf die Aktivität der 11 β -HSD2; ¹ in Kombination mit einer doppelten Fluorierung in Position 6 und 9 (Diflucortolon). ² : in Kombination mit einer einfachen Fluorierung in Position 6 (Fluocortolon). In Kombination mit einer einfachen Fluorierung in Position 9 (Desoxymetason versus Dexamethason in Tabelle 6) hat die 17-Desoxy-Konfiguration keinen Effekt auf HSD2-Oxidation bzw. -Reduktion.

5.3. Bedeutung der Ergebnisse für die Auswahl von Gluco- und Mineralocorticoiden in der humanen Pharmakotherapie

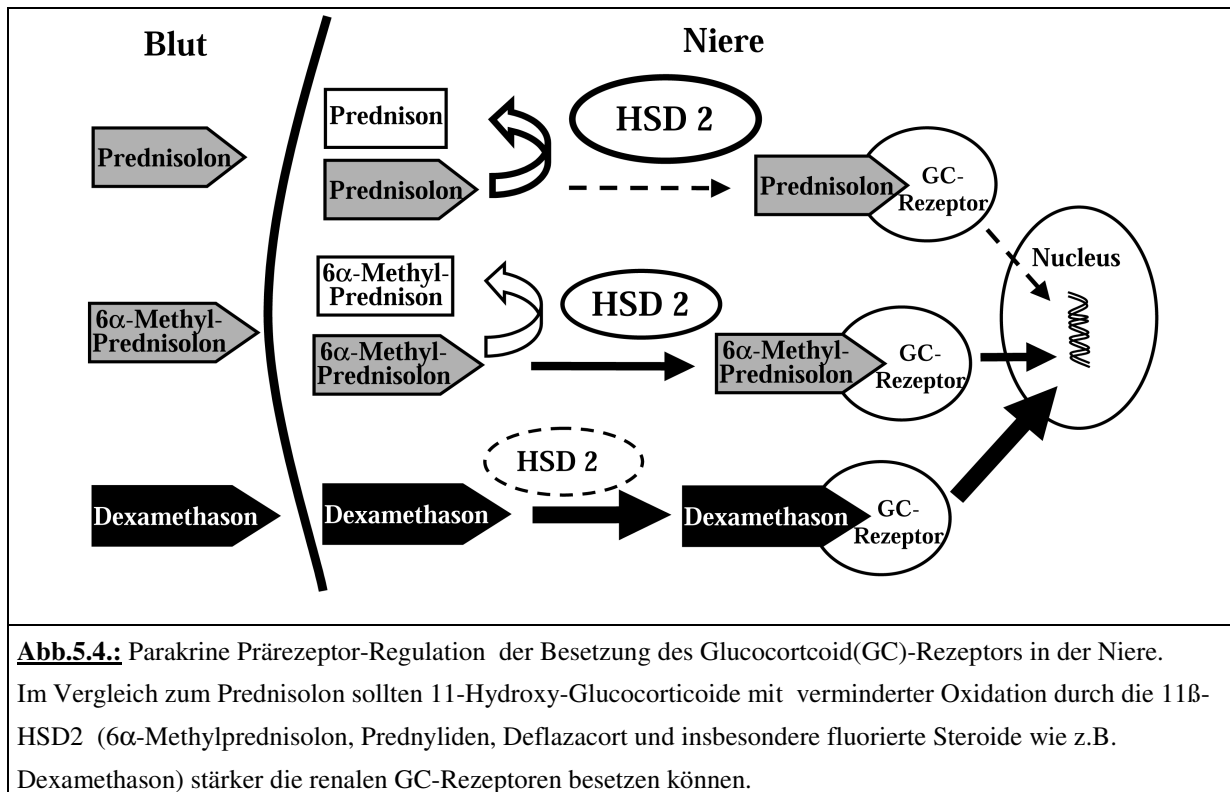
1) Das Wissen um Expression und bevorzugte Reaktionsrichtung der Isoenzyme der 11 β -HSD ist aufgrund des entscheidenden Einflusses auf die Pharmakokinetik von Steroiden von klinischer Relevanz. So werden oral verabreichte Prodrugs wie Cortison oder Prednison durch die 11 β -HSD1 der Leber rasch zu den aktiven 11-Hydroxyderivaten reduziert (91). Diese Reaktion läuft bei Steroiden mit einer Δ 1-Dehydrokonfiguration im Vergleich zu Cortison bevorzugt ab (Kap.5.2.2.1.).

2) Prednisolon wird sowohl in Nierenrindenzellen als auch in mit der 11 β -HSD2 transfizierten CHO-Zellen stärker als Cortisol oxidiert. Da beide Steroide pharmakodynamisch bezüglich der Transaktivierung am Mineralocorticoid-Rezeptor keine relevanten Unterschiede zeigen (101), ist die unterschiedliche autokrine Pharmakokinetik eine gute Erklärung für die schwächere *in vivo* Mineralocorticoid-Aktivität von Prednisolon (Abb.5.3.) (101).



3) Da das am häufigsten für die renale Immunsuppression eingesetzte Prednisolon eine sehr starke intrarenale Inaktivierung zeigt, scheint es aufgrund unserer Daten für diese Indikation nicht das ideale Glucocorticoid zu sein. Die als äquipotent geltenden Prednisolonderivate Prednyliden, Methylprednisolon oder Deflazacort sollten aufgrund einer verminderten

Oxidation durch die 11 β -HSD2 die renalen GC-Rezeptoren stärker besetzen können (Abb.5.4.). Obwohl die in der Literatur aufgeführten Äquivalenzdosen kaum durch tierexperimentelle oder klinische Studien hinreichend abgesichert sind, wäre eine vergleichende Untersuchung verschiedener in „äquivalenter“ Dosis eingesetzter Steroide bei einem gut definierten Krankheitsbild (z.B. der minimal change Glomerulonephritis) durchaus lohnend.



4) Die Erkenntnis, dass die 11 β -HSD2 *in vitro* gegenüber fluorierten Steroiden vorwiegend als Reduktase fungiert, führte zu der Idee einer selektiven Immunsuppression für Organe mit hoher Expression des Enzyms (50). Für eine zielgerichtete Immunsuppression von z.B. Niere oder Kolon wäre nach unseren Daten eine Kombination aus 6 α - oder 16 α -Methylierung (Hemmung von 11 β -HSD1-Reduktion und 11 β -HSD2-Oxidation) zusammen mit 6 α - oder 9 α -Fluorierung (Überwiegen der 11 β -HSD2-Reduktion) von Vorteil (Kap.4). Da die von uns getesteten Methylsubstituenten gleichsinnig und in nahezu gleichem Ausmaß die 11 β -Reduktion durch beide Isoenzyme behindern, sind diese Modifikationen für eine selektive Aktivierung durch die 11 β -HSD2 nicht optimal. Nach unseren Ergebnissen ist damit zu rechnen, dass auch methylierte 11-Oxo-Fluorosteroiden zum großen Teil bereits vor Erreichen von Niere oder Colon durch die 11 β -HSD1 der Leber aktiviert und damit systemisch wirksam werden (Kap.4.1.1.2.). Die mit methyliertem Fluorocortison gewonnenen Daten sind durchaus

auf das aus klinischer Sicht für eine selektive Immunsuppression besser geeignete Dehydrodexamethason (geringere mineralocorticoide Wirkung) übertragbar, da sich beide Substanzen bezüglich der Reduktion durch die 11 β -HSD2 kaum unterscheiden und eine ähnliche Affinität zum Glucocorticoidrezeptor Typ 2 besitzen (44;52).

5) Bei der intrauterinen Therapie haben pharmakokinetische Kenntnisse über die plazentare 11 β -Oxidation schon seit langem die klinische Präparateauswahl mitbestimmt (102). Physiologische Steroide durchdringen die Plazentaschranke aufgrund der hohen Expression der 11 β -HSD2 im Syncytiotrophoblast kaum, da sie durch die plazentare 11 β -HSD2 nahezu vollständig inaktiviert werden (21). Die 9 α -Fluorosteroide zeigen im Gegensatz dazu, bedingt durch mangelnde Oxidation und zusätzlicher Reduktion, nur eine sehr geringe Inaktivierung durch die 11 β -HSD2 in Placenta und embryonaler Lungenanlage (163). Aufgrund dieser sich auch in unseren Daten widerspiegelnden „unphysiologischen“ Kinetik eignen sich die klinisch am häufigsten zur fetalen Lungenreifung eingesetzten Präparate Betamethason und Dexamethason nahezu ideal für diese Indikation (102). Die klinische Prüfung von Präparaten, die *in vitro* eine noch geringere Inaktivierung zeigen (z.B. Difluorcortolon oder Flumethason), scheint jedoch aufgrund der guten Wirksamkeit der Standardtherapie nur von fraglichem Nutzen. Soll umgekehrt der Embryo von schädlichen Einflüssen einer Steroidtherapie während der Schwangerschaft geschützt werden, bieten sich Steroide an, die stark durch die 11 β -HSD2 oxidiert werden (z.B. Prednisolon, Abb.5.5.) (3). Da die fetale 11 β -HSD1 erst am Ende der Schwangerschaft exprimiert wird, ist eine relevante intrafetale Reaktivierung des die Placenta permeirenden Prednisons zu Prednisolon nicht zu erwarten (161).

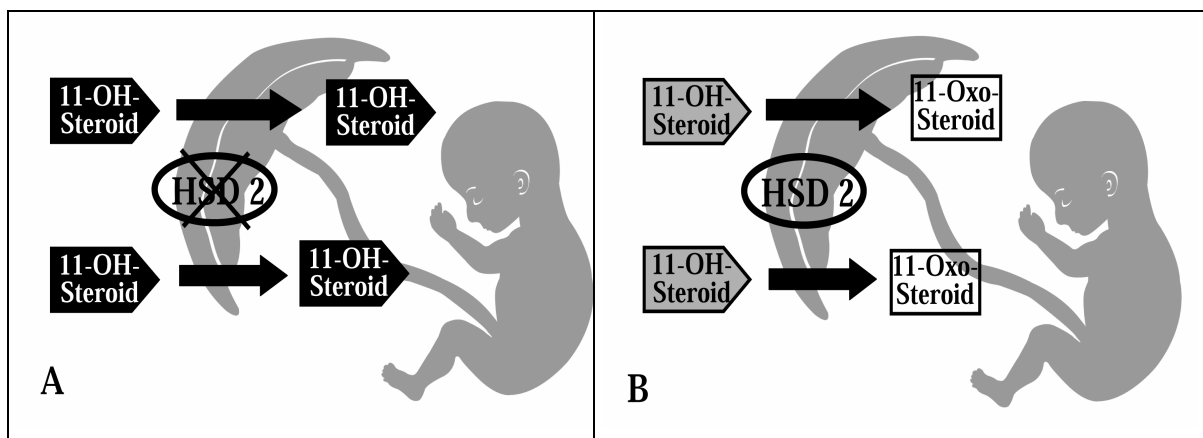


Abb. 5.5.: Pharmakologische Bedeutung der plazentaren 11 β -HSD2.

A: Bei Behandlung des Feten (z.B. zur Lungenreifung) wählt man ein Steroid, welches nur wenig durch die 11 β -HSD2 inaktiviert wird. **B:** Soll die Mutter während der Schwangerschaft systemisch mit Glucocorticoiden behandelt werden, wählt man ein 11-Hydroxy-Steroid mit starker Inaktivierung durch die 11 β -HSD2.

6) Da in Zielorganen topischer Steroidtherapie (Lunge, Haut, Kolon) vorwiegend die 11 β -HSD2 exprimiert wird, sind Substanzen mit dem pharmakokinetischen Profil einer nur geringen Oxidation durch dieses Enzym (Budesonid; Flunisolid) für diese Therapie von Vorteil (81) (Kap.4.1.2.4.).

5.4. *In vivo* - Versuche bei gesunden Probanden

5.4.1. Induktion der 11 β -HSD1 durch Glucocorticoide

Aus *in vitro* Untersuchungen ist bekannt, dass unter dem Einfluß von Glucocorticoiden die Aktivität der 11 β -HSD1 zunimmt (88;90). *Voice et al.* fanden ausserdem Glucocorticoid-Bindungsstellen in der Promotorregion des Gens der 11 β -HSD1 (175). Im Tiermodell kommt es nach ACTH-Gabe zu einer verstärkten hepatischen Reduktion von Cortison (138). Dieser Effekt ist wahrscheinlich nicht durch ACTH selbst, sondern durch den ACTH-bedingten Hypercortisolismus bedingt.

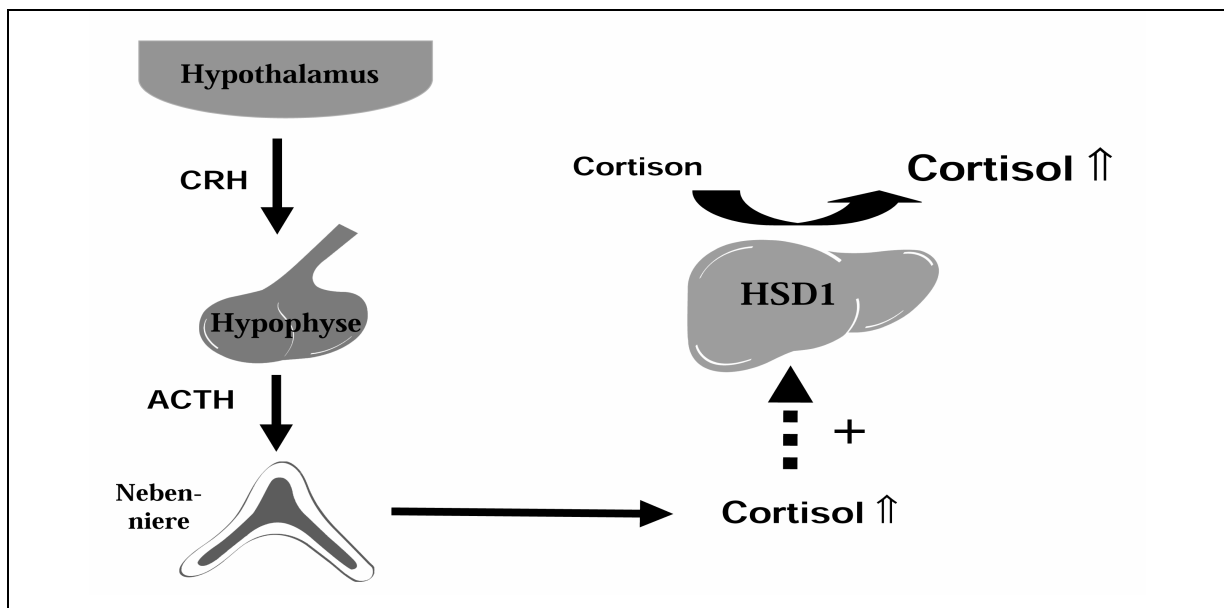


Abb. 5.6.: Rolle der hepatischen 11 β -HSD1 bei der Streßadaptation.

Neben der hypothalamisch-hypophysär regulierten adrenalen Cortisol-Synthese kommt es durch Cortisol selbst zu einer Aktivierung der hepatischen 11 β -HSD1, wodurch sowohl parakrin als auch endokrin der inaktive Cortison-Pool zum aktiven Cortisol-Pool verschoben wird.

Nach unseren Daten vermögen Glucocorticoide auch beim Menschen *in vivo* die Aktivität der 11 β -HSD1 zu steigern (Kap.4.2.1.). Nach einer fünftägigen Prednisolongabe wird nach Einnahme von Cortisonazetat ein signifikant höherer Plasmaquotient von F/E erreicht als am Kontrolltag (Abb.4.20.). Mit Werten zwischen zehn und fünfzehn erreicht der Quotient ähnlich hohe Werte wie beim Cushing-Syndrom oder nach ACTH-Stimulation der

Nebennierenrinde (53). Auffallend ist neben der leichten Steigerung des Cortisolspiegels ein tendenzielles Abfallen des Plasmacortisons (Abb.4.13.). Dieses Phänomen lässt sich ebenfalls beim Glucocorticoid Excess nach Gabe von ACTH beobachten (174). Unsere *in vivo*-Daten machen daher eine direkte GC vermittelte Aktivitätssteigerung der 11 β -HSD1 sehr wahrscheinlich. Obwohl die Promotorregion der 11 β -HSD1 noch nicht eindeutig charakterisiert ist, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit das Vorhandensein eines GC-responsiblen Elements zu erwarten. Unter Glucocorticoid-Einfluß scheint daher die autokrine Feinregulation in den 11 β -HSD1 exprimierenden Zellen zugunsten des aktiven Cortisol verschoben zu sein (Abb.5.6.).

Neben der Funktion in der Stressadaptation ist dieser Mechanismus möglicherweise auch von pharmakologischer und pathophysiologischer Relevanz: 1) So kann der durch GC induzierte Diabetes mellitus zumindest teilweise die Folge einer durch die parakrine Erhöhung (11 β -HSD1) der intrahepatischen Cortisolkonzentration bedingten Aktivitätssteigerung der Gluconeogenese sein (10). 2) Aufgrund der hohen 11 β -HSD1-Aktivität im omentalen Fettgewebe und deren starker Induktion durch Glucocorticoide wird die Stammfettsucht beim Cushing-Syndrom vermutlich auch durch die Aktivitätssteigerung der autokrin wirkenden

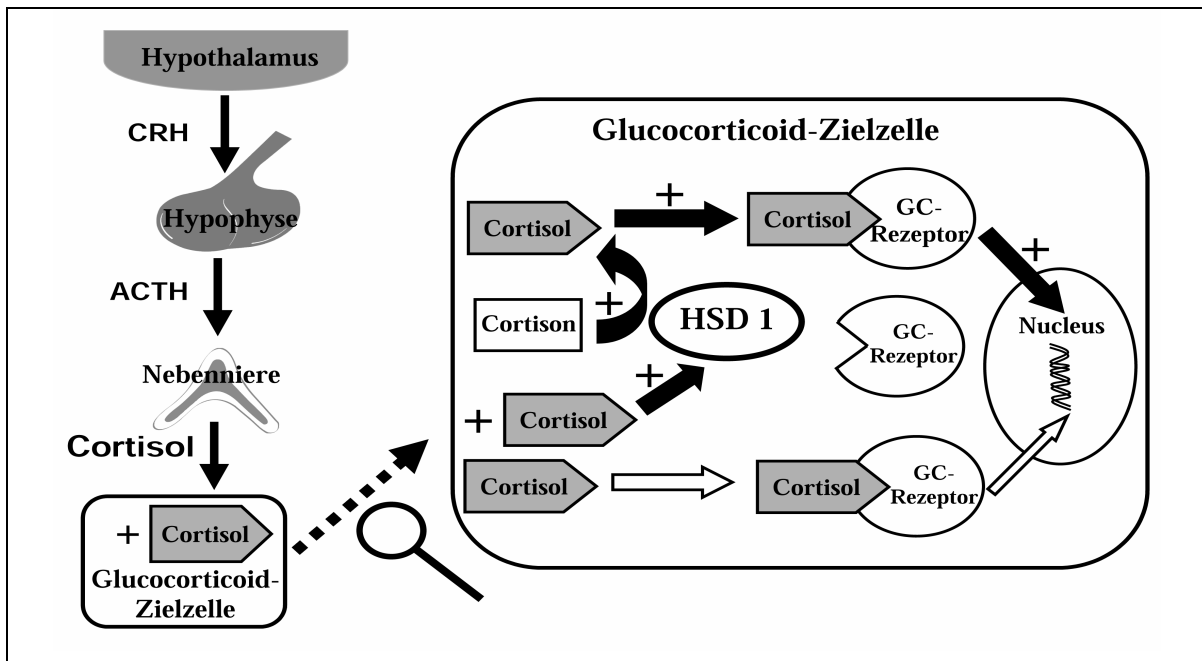


Abb. 5.7.: Autokrine Stressadaptation in der Glucocorticoid-Zielzelle. Das unter Stressbedingungen vermehrt gebildete Cortisol führt in allen Glucocorticoid-Zielzellen zu einer Induktion der koexprimierten 11 β -HSD1, wodurch das intrazelluläre Cortisol/Cortison-Gleichgewicht auf die Seite des aktiven Cortisol verschoben wird.

11 β -HSD1-Aktivität verstärkt (Abb.5.7.) (35). Daher besteht die Vermutung, dass Streß ein möglicher Risikofaktor für die Entstehung des Metabolischen Syndroms sein könnte (54;111). Entsprechende epidemiologische Daten sind jedoch bisher nicht publiziert.

Im Urin steigen das Cortisol und der Urinquotient F/E nach Prednisoloneinnahme leicht an (Abb.4.22.a; 4.22.c). Die Bestimmung der 11 β -HSD2-Aktivität am Ende der Versuchsreihe wird durch die gleichzeitige Gabe von Dexamethason beeinflusst, da beide Substrate theoretisch um das Enzym konkurrieren. Nach *Frey et al.* wirkt sich exogenes Dexamethason jedoch nicht auf die *in vivo* - Bestimmung der Enzymaktivität aus (83).

Die erhöhten Spiegel von Cortisol und Cortison im Urin nach Prednisolongabe sind daher am ehesten durch die höheren Serumkonzentrationen der Steroide bedingt im Sinne einer Überladung der 11 β -HSD2, wie sie auch beim ektope ACTH-Syndrom zu beobachten ist (129;170). Alternativ ist auch eine Glucocorticoid bedingte down-regulation der 11 β -HSD2 - Expression bei vermehrtem Substratangebot denkbar. Dafür gibt es jedoch in der Literatur bisher keine Hinweise.

Insgesamt scheinen Glucocorticoide *in vivo* sowohl die 11 β -HSD1-Aktivität zu steigern als auch - via vermehrter Bereitstellung von Substrat - die Aktivität der 11 β -HSD2 zu beeinflussen. Die 11 β -HSD1 vermag damit physiologisch nicht nur autokrine und parakrine Wirkungen zu entfalten, sondern auch die ACTH-induzierte Glucocorticoidwirkung in Stressituationen zu verstärken. Neben einer adrenalen de novo - Synthese von Cortisol scheint die Leber (durch Erhöhung der 11 β -HSD1-Aktivität) mit zur vermehrten Bereitstellung vom aktivem Glucocorticoid Cortisol beizutragen (167;174).

5.4.2. Metabolismus von Cortisol und Dexamethason *in vivo*

An Mikrosomenpräparaten und Gewebeschnitten der Niere zeigen 9 α -Fluorosteroide eine auffällige Verlagerung des kinetischen Redoxgleichgewichtes zugunsten der 11-Hydroxyform (49). Dies ist vermutlich die Ursache für die hohe mineralocorticoide Potenz von Fluorocortisol (126). Dexamethason (16 α -Methyl-9 α -Fluoro-Prednisolon) besitzt eine vergleichsweise geringe Affinität zum Mineralocorticoidrezeptor (144). Daher spricht eine geringe mineralocorticoide Potenz per se nicht für eine starke 11-Oxidation durch die 11 β -HSD2. Dexamethason wird nicht nur renal an Position 11 oxidiert, sondern auch zu polaren

Metaboliten verstoffwechselt (76). In der Literatur werden als Hauptabbauprodukte 6 β -Hydroxy- und 20-Dihydro-Dexamethason genannt (108;113). *In vivo* - Daten zur Aktivität der 11 β -HSD2 gegenüber Dexamethason gibt es bisher kaum.

Die in unserer Arbeitsgruppe erhobenen Daten sprechen dafür, dass Dexamethason sowohl *in vivo* als auch *in vitro* kein Substrat der 11 β -HSD1 ist (50). Nach oraler Gabe von Dexamethason ist daher der Quotient aus 11-Hydroxy- zu 11-Oxosubstanz im Serum signifikant höher als nach der Einnahme von Cortisol (Abb.4.24). Zum selben Ergebnis kommen auch *Best et al.* nach intravenöser Gabe von 2mg Dexamethason und *Bush. et al.* nach oraler Gabe von 25mg der verwandten Substanz 9 α -Fluorocortisol (25;42).

Bedingt durch mangelnde 11-Oxidation durch 11 β -HSD1 und 11 β -HSD2 und eventuell teilweiser Reduktion der in geringem Ausmaß entstehenden 11-Oxo-Derivate durch die 11 β -HSD2 sind im Gegensatz zu Cortisol für Dexamethason Urin- und Plasmaquotienten aus 11-Hydroxy- und 11-Oxosubstanz nahezu gleich (Abb.4.24 und -4.25). Zu diesem Sachverhalt existieren bisher lediglich Daten für die dem Dexamethason verwandten Substanzen 9 α -Fluoroprednisolon und 9 α -Fluorocortisol. *Bush et al.* geben die Urinquotienten aus 11-Hydroxy- und 11-Oxoform für Fluoroprednisolon mit 10 und für Fluorocortisol mit 50 an, während das Verhältnis F/E im Urin üblicherweise 0,5-1 beträgt (42;129). Das 9 α -Fluoroprednisolon hat wie Dexamethason die Δ 1-Dehydrokonfiguration, die die 11-Oxidation erleichtert und damit den inhibierenden Effekt der 9 α -Fluorogruppe vermindert. Dadurch wird das Redoxgleichgewicht bei dieser Substanz nicht ganz so weit auf die Seite der 11-Hydroxysubstanz verschoben wie beim Fluorocortisol (Tabelle 5.4.).

	Serumquotient	Urinquotient
Cortisol	>15	1
9 α -Fluorocortisol	>10	>50
9 α -Fluoroprednisolon	>11	10

Tab. 5.4.: Serum- und Urinquotient (11-Hydroxy- zu 11-Oxo-Form) verschiedener Steroide nach oraler Gabe der 11-Oxosubstanz, modifiziert nach *Bush et al.* (42) sowie *Oelkers et al.*(126).

5.4.3. Einfluß von Chenodesoxycholsäure auf die Aktivität der 11 β -HSD1 *in vivo*

Verschiedene Autoren vermuten einen Zusammenhang zwischen 11 β -HSD1, Adipositas, Diabetes mellitus und Metabolischem Syndrom. Insbesondere die 11 β -HSD1 des visceralen Fettgewebes soll zur Pathogenese dieser Erkrankungen beitragen (36;96). Im Tiermodell führt eine Überexpression der 11 β -HSD1 zu visceraler Adipositas, Insulinresistenz, Hyperlipidämie und Hyperphagie (111). Umgekehrt konnten Untersuchungen an 11 β -HSD1 - knockout - Mäusen zeigen, dass eine fehlende Funktion des Enzyms zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität und einem verbesserten Lipidprofil führt. Möglicherweise können auch neurotoxische Effekte von Glucocorticoiden durch eine Hemmung der 11 β -HSD1 vermindert werden (96;119;187).

Für einen hochselektiven Inhibitor der 11 β -HSD1 ist daher der Einsatz bei verschiedenen Stoffwechselerkrankungen denkbar. Außerdem könnten durch die kombinierte Gabe mit Dehydrodexamethason im Sinne eines „glucocorticoid targeting“ für Organe mit hoher 11 β -HSD2-Expression wie z.B. der Niere Nebenwirkungen einer immunsuppressiven Steroidtherapie vermindert werden (Kap.5.3.2., Abb. 5.8.).

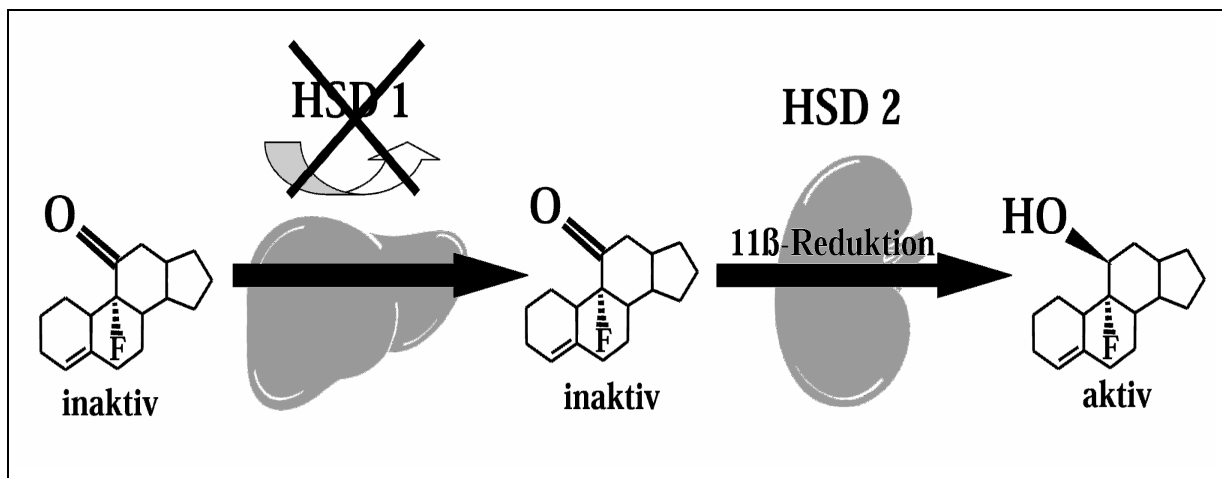


Abb. 5.8.: Idee des „Glucocorticoid-targeting“ für Organe mit hoher 11 β -HSD2 Expression.

Ein fluoriertes, inaktives 11-Dehydrosteroid wird von der 11 β -HSD2 isoliert in den Mineralocorticoid-Zielorganen (insbesondere Niere) aktiviert. Voraussetzung: Die hepatische „First pass-Aktivierung“ wird durch einen selektiven Inhibitor der 11 β -HSD1 geblockt.

Die Inhibition der 11 β -HSD1 durch Gallensäuren ist seit über 10 Jahren bekannt (130). Dabei hemmen monohydroxylierte Gallensäure wie Lithocholsäure und Chenodesoxycholsäure das Enzym effektiver als dihydroxylierte Gallensäuren (mit zusätzlicher 12-Hydroxygruppe).

Nach *Diederich et al.* hemmt Chenodesoxycholsäure die 11 β -HSD1 selektiv mit einer IC₅₀ von 2,8 μ mol/l (48). *Perschel et al.* geben die IC₅₀ für die 11-Reduktion mit 7,4 μ mol/l an (130).

Wir untersuchten den Effekt von Chenodesoxycholsäure auf die Reduktion von oral gegebenem Cortisonazetat *in vivo*. Die von uns verwendeten Dosen hatten keinen Einfluss auf die Reduktaseaktivität der 11 β -HSD1 (Abb.4.26). Zu keinem Zeitpunkt unterschied sich der Plasmaquotient F/E von den am Kontrolltag erreichten Werten (Abb.4.27). Lediglich ein verzögertes Erreichen der maximalen Serumkonzentration von Cortisol ließ sich nachweisen. Als Ursache für den mangelnden Effekt der Chenodesoxycholsäure kommen in Frage:

1. Eine zu niedrige Konzentration des Inhibitors in den Hepatozyten.

Nach oraler Gabe von 500mg Chenodesoxycholsäure lassen sich Plasmaspiegel von $1-2 \times 10^{-5}$ mol/l erreichen (134). Obwohl diese Konzentrationen theoretisch im Bereich der ermittelten IC₅₀ liegen, reichen sie wahrscheinlich für *in vivo* - Effekte nicht aus. Ähnliches wird über Carbenoxolon und Glycyrrhetinsäure als klassische Inhibitoren der 11 β -HSD berichtet. Zur halbmaximalen Hemmung der 11 β -HSD1 *in vitro* werden bei beiden Substanzen Konzentrationen von ca. 10^{-8} mol/l benötigt (48;141). Für *in vivo* Studien werden jedoch meist Dosen von 500 mg Glycyrrhetinsäure oder 3 x 100 mg Carbenoxolon verabreicht. Die damit erreichbaren Plasmaspiegel von $5-10 \times 10^{-6}$ respektive $1-2 \times 10^{-5}$ mol/l liegen um ein Vielfaches höher als die *in vitro* benötigten Konzentrationen (80;133). Zudem ist bekannt, dass für die Inhibition der 11 β -HSD1 an ganzen Zellen teilweise bis zu 100fach höhere Konzentrationen an Carbenoxolon eingesetzt werden müssen als bei Homogenaten (141). Die Hemmkonstanten für Chenodesoxycholsäure wurden bisher ausschließlich an Mikrosomenpräparaten ermittelt. Hinzu kommt, dass effektive Effluxsysteme für Gallensäuren existieren, die die Konzentration von Chenodesoxycholsäure in den Hepatozyten zusätzlich vermindern könnten (9).

2. Die lediglich eintägige Gabe von Chenodesoxycholsäure.

Carbenoxolon und Glycyrrhetinsäure vermindern die 11 β -HSD1-Aktivität auch durch Hemmung der Transkription des Enzyms (89;185). Bei den *in vivo* - Versuchen zur Verbesserung der Insulinsensitivität wurde Carbenoxolon von den Probanden daher sieben Tage lang eingenommen (177). Falls indirekte Effekte auf die Enzymaktivität auch bei der

Chenodesoxycholsäure eine Rolle spielen, könnte eine längere Gabe der Substanz von Vorteil sein.

In kürzlich erschienenen Arbeiten wird außerdem die Selektivität von Chenodesoxycholsäure für die 11 β -HSD1 angezweifelt. Demnach hemmt die Substanz mit einer IC₅₀ im Bereich von etwa 10⁻⁵ mol/l ebenfalls die 11 β -HSD2 (2;58). *In vivo* Effekte auf die Aktivität der 11 β -HSD2 beruhen möglicherweise auf einer Akkumulation der Chenodesoxycholsäure in Nierengewebe, wo sich die Substanz auf etwa das 30fache anreichern soll (19).

Bisher konnten nur bei Untersuchungen an 11 β -HSD1 knockout - Mäusen eindeutige Verbesserungen von Insulinsensitivität und Lipidprofil nachgewiesen werden. Als Kompensationsmechanismen wurde bei den Tieren eine Hyperplasie der Nebennierenrinde und eine vermehrte Sekretion von Corticosteron beobachtet (96;119). Bedingt durch peripheren Cortisolmangel und kompensatorische ACTH-Ausschüttung kann es ebenfalls zu einer Erhöhung der Androgenausschüttung kommen, wie sie z.B. bei Patienten mit Cortison-Reduktase Mangel zu verzeichnen ist (79). Dies sind auch potentielle Nebenwirkungen einer Therapie mit hochselektiven Inhibitoren der 11 β -HSD1. Voraussetzung für deren Entwicklung ist vermutlich die röntgenkristallographische Aufklärung der Tertiärstruktur beider Isoenzyme der 11 β -HSD. Ob die Spezifität von Arylsulfonamidothiazolen, erst kürzlich durch Screeninguntersuchungen identifizierter selektiver Inhibitoren der 11 β -HSD1, für einen klinischen Effekt beim Menschen ausreicht, wird Gegenstand weiterer Studien sein (20).

Unabhängig von Stoffwechseleffekten eines spezifischen Inhibitors der 11 β -HSD1 ist durch die gleichzeitige Gabe von fluorierten 11-Dehydrosteroiden eine selektive Immunsuppression für Organe mit hoher 11 β -HSD2-Expression denkbar (52). Da neuere Untersuchungen eine Adaptation der 11 β -HSD1 an stark unterschiedliche Substratkonzentrationen postulieren, müsste auch die Reduktion von Dehydrosteroiden in nur geringer Konzentration effektiv durch einen Inhibitor der 11 β -HSD1 geblockt werden (110).