

5. Ergebnisse

5.1. Nierenmikrosomen: Oxidation der 11-Hydroxysteroidoide

5.1.1. Übersicht der Initialgeschwindigkeiten

Initialgeschwindigkeiten in humanen Nierenrindenmikrosomen (NRM):

n = 6, c(Substrat): 1 $\mu\text{mol/l}$, c(Kosubstrat): 1 mmol/l NAD⁺, pH=8,5

Substanz	c(Protein) mg/ml	t(Inkubation) min	nmol/min/mg Protein
Cortisol	0,05	120/180	29,3 \pm 2,2
Δ 1-dehydro-Cortisol (Prednisolon)	0,05	120/180	57,7 \pm 3,2
6- α -methyl-Prednisolon	0,05	120/180	16,2 \pm 1,9
16- α -methyl-Prednisolon	0,05	120/180	27,2 \pm 2,3
16- β -methyl-Prednisolon	0,05	120/180	38,7 \pm 1,9
9- α -fluoro-6- α -methyl-Prednisolon	0,2	60/120	18,8 \pm 3,6
9- α -fluoro-16- α -methyl-Prednisolon (Dexamethason)	0,2	60/120	15,3 \pm 1,1
9- α -fluoro-16- β -methyl-Prednisolon (Betamethason)	0,1	60/120	24,3 \pm 1,6
6,9- α -difluoro-16- α -methyl-Prednisolon (Flumethason)	0,2	60/120	19,0 \pm 2,8
6- α -fluoro-Cortisol	0,2	60/120	19,0 \pm 1,0
9- α -fluoro-Cortisol	0,2	60/120	21,0 \pm 1,2
9- α -fluoro-Prednisolon	0,1	60/120	21,5 \pm 1,3
21-Desoxydexamethason	0,1	60/120	15,4 \pm 1,3
Δ 1-dehydro-6,9- α -difluoro-16- α -methyl- Corticosteron (Diflucortolon)	0,2	60/120	11,8 \pm 0,6

Tabelle 5: Nierenmikrosomen: Verwendete Proteinkonzentration c, Inkubationszeiten t und Initialgeschwindigkeit (\pm Standardabweichung) der Oxidation durch die 11-HSD 2.

Anmerkung: Zur Beurteilung des Reaktionsgleichgewichtes und damit der bevorzugten Reaktionsrichtung sind jeweils die Initialgeschwindigkeiten von Oxidations- und Reduktionsreaktion zu berücksichtigen.

5.1.2. Einfluss von Ring(A)-Konfiguration und 9- α -Fluorierung

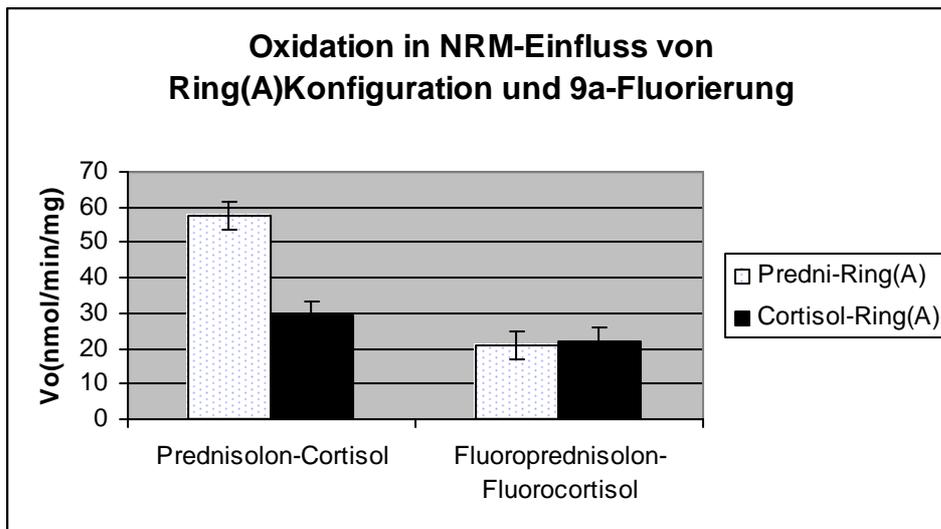


Abbildung 14: Δ^1 -Dehydrocortisol (Prednisolon) wird stärker durch humane Nierenrindenmikrosomen zum inaktiven 11-Dehydroderivat oxidiert als Cortisol ($V_o=57,7\pm 3,2$ bzw. $29,3\pm 2,2$ nmol/min/mg, $p<0,0001$). Das Einfügen einer 9- α -Fluorgruppe vermindert sowohl die Oxidation von Prednisolon wie auch von Cortisol ($V_o=21,5\pm 1,3$ bzw. $21,0\pm 1,2$ nmol/min/mg, $p<0,0001$), der Effekt der Fluorierung ist bei Prednisolon signifikant stärker als bei Cortisol ($p<0,001$).

Die Δ^1 -Dehydrokonfiguration (der Unterschied zwischen Cortisol und Prednisolon) verstärkt signifikant die Oxidation in humanen Nierenrindenmikrosomen (NRM).

Die 9- α -Fluorierung hemmt die Oxidation beim Prednisolon stärker als bei Cortisol aber auch die Oxidation von Cortisol wird durch das Fluoratom signifikant gehemmt.

5.1.3. Einfluss von 9- α -Fluorierung und 6- α -Methylierung

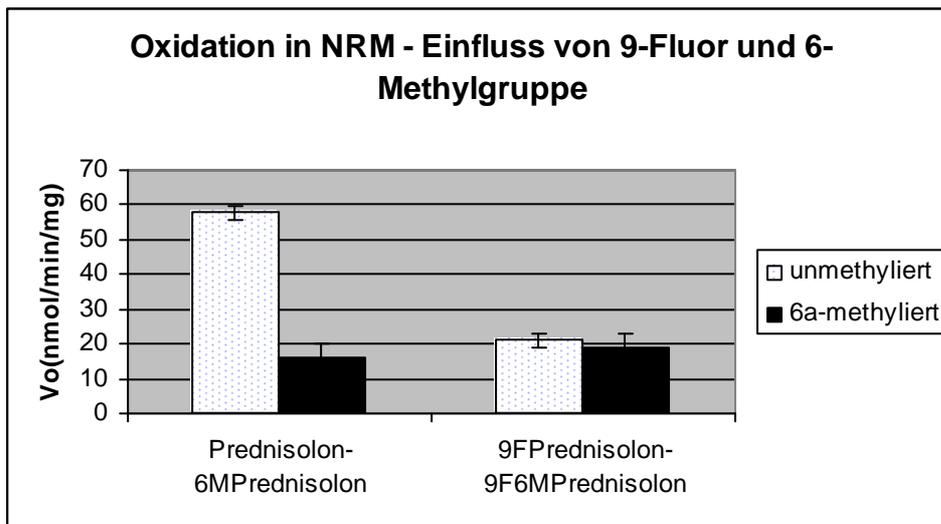


Abbildung 15 :6- α -methyl-Prednisolon (6MPrednisolon) wird signifikant langsamer oxidiert als Prednisolon ($V_o=16,2\pm 1,9$ bzw. $57,7\pm 3,2$ nmol/min/mg, $p<0,0001$). Auch die Oxidation von 9-fluoro-Prednisolon (9FPrednisolon) verläuft signifikant langsamer als die von Prednisolon. Der Unterschied zwischen 6-methyl-Prednisolon und 9-fluoro-6-methyl-Prednisolon (9F6MPrednisolon) ist nicht signifikant.

Am Prednisolongerüst führt sowohl das Einfügen einer Methylgruppe an Position 6 (6- α -methyl-Prednisolon) wie auch eines Fluoratoms an Position 9 (9- α -fluoro-Prednisolon) zu einer verminderten Oxidation durch humane NRM. Die Effekte addieren sich allerdings nicht: 9- α -fluoro-6- α -methyl-Prednisolon wird nicht signifikant schwächer oxidiert als 9-fluoro- oder 6-methyl-Prednisolon.

5.1.4. Einfluss von 16 α/β -Methylierung und 9- α -Fluorierung

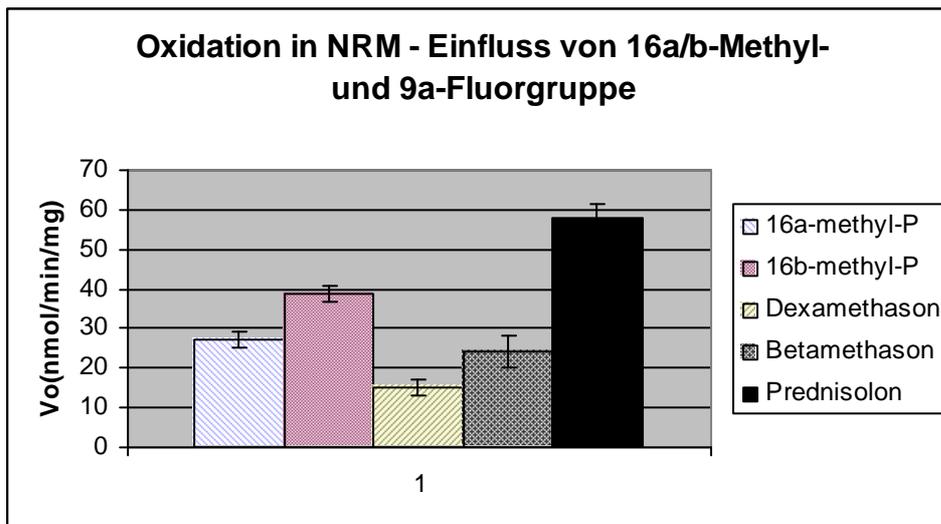


Abbildung 16: Die Oxidation von Prednisolon wird durch 16- α -Methylierung signifikant stärker gehemmt als durch 16- β -Methylierung ($V_o = 27,2 \pm 2,3$ bzw. $38,7 \pm 1,9$ nmol/min/mg, $p < 0,001$). Durch zusätzliches Einfügen einer 9- α -Fluorgruppe entsteht Dexamethason bzw. Betamethason. Die 9- α -Fluorierung verlangsamt die Oxidation bei beiden Substanzen zusätzlich ($V_o = 15,3 \pm 1,1$ bzw. $24,3 \pm 1,6$ nmol/min/mg, beide $p < 0,0001$). Auch der Unterschied zwischen Dexamethason und Betamethason bleibt signifikant ($p < 0,01$).

Die Substitution einer Methylgruppe an Position 16 des Prednisolonmoleküls verringert dessen Oxidation und zwar in 16 α -Stellung (16-a-methyl-P) signifikant stärker als in 16 β -Stellung (16-b-methyl-P). Dieser sterische Effekt bleibt auch bei den korrespondierenden 9 α -fluorierten Steroiden Dexamethason und Betamethason erhalten. Die Effekte der 16-Methylierung und der 9 α -Fluorierung addieren sich hier; beide werden schwächer oxidiert als ihre unfluorierten Gegenstücke.

5.1.5. Einfluss der Hydroxylgruppe an Position 17 und 21

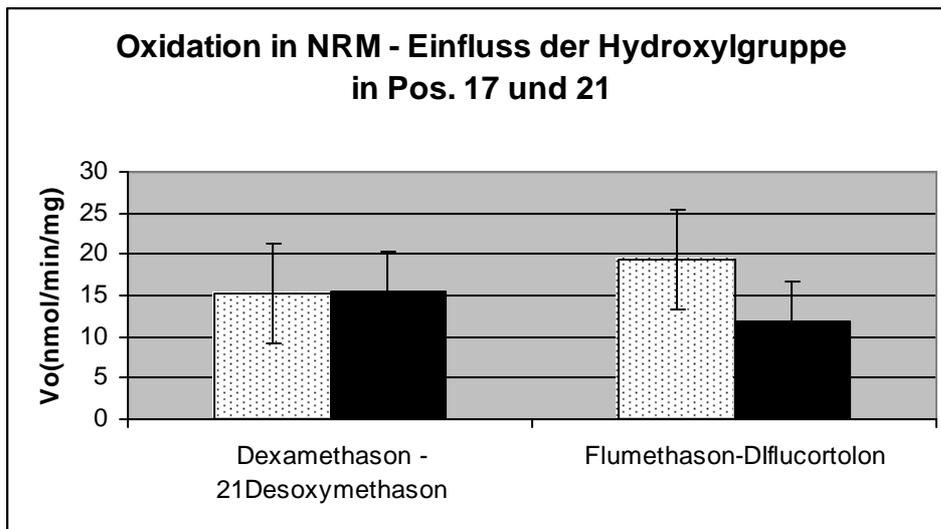


Abbildung 17: Keine signifikanten Unterschiede bei der Oxidation von Dexamethason (9- α -fluoro-16- α -methyl-Prednisolon) und dem 21-Desoxyderivat. Ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen Flumethason (6,9- α -Difluoro-16- α -methyl-Prednisolon) und Diflucortolon (6,9- α -Difluoro-16- α -methyl- Δ 1-Dehydro-Corticosteron)

Das Entfernen der Hydroxylgruppe an Position 21 führt beim Dexamethason nicht zu einer veränderten Oxidationsgeschwindigkeit. Die Unterschiede in der Oxidierbarkeit von Flumethason und Diflucortolon (die sich durch das Fehlen der Hydroxylgruppe an Position 17 beim Diflucortolon unterscheiden) sind ebenfalls nicht signifikant.

5.1.6. Oxidation in Nierenmikrosomen: Zusammenfassung

- § Ring(A)-Konfiguration: Die Δ^1 -Deydro-Stellung des Prednisolonmoleküls begünstigt die Oxidation. Prednisolon wird durch NRM stärker oxidiert und damit inaktiviert als Cortisol (Abb.14)
- § 9- α -Fluorsubstitution und 6- α -Methylierung vermindern beide deutlich die Oxidation, die Effekte sind aber nicht synergistisch (Abb.15)
- § 9- α -Fluorsubstitution und Einfügen einer Methylgruppe an Position 16 reduzieren ebenfalls stark die Oxidation. Diese Wirkungen sind synergistisch und bei 16- α -Stellung der Methylgruppe am ausgeprägtesten (Abb.16)
- § Das Vorliegen einer Hydroxylgruppe an Position 17 und 21 hat bei den untersuchten Substanzen keinen Einfluss auf die Oxidationsgeschwindigkeit (Abb.17)
- § Die stärkste Hemmung der Oxidation zeigt sich bei den auch therapeutisch eingesetzten Substanzen 6- α -methyl-Prednisolon (z.B. Urbason®) und Dexamethason (z.B. Fortecortin®)

5.2. Nierenmikrosomen: Reduktion der 11-Dehydrosteroidoide

5.2.1. Übersicht der Initialgeschwindigkeiten

Initialgeschwindigkeiten in humanen Nierenrindenmikrosomen (NRM):

n=6, c(Substrat): 1 $\mu\text{mol/l}$, c(Kosubstrat): 1mmol/l NADH, pH=6,0

Substanz	c(Protein) mg/ml	t(Inkubation) min	nmol/min/mg Protein
Cortison	0,2	120/180	Kein Umsatz
Δ 1-dehydro-Cortison (Prednison)	0,2	120/180	Kein Umsatz
6- α -methyl-Prednison	0,2	120/180	Kein Umsatz
16- α -methyl-Prednison	0,2	120/180	Kein Umsatz
16- β -methyl-Prednison	0,2	120/180	Kein Umsatz
9- α -fluoro-6- α -methyl-Prednison	0,02	60/120	354,9 \pm 49,5
9- α -fluoro-16- α -methyl-Prednison (11-dehydro-dexamethason)	0,02	60/120	230,6 \pm 22
9- α -fluoro-16- β -methyl-Prednison (11-dehydro-betamethason)	0,02	60/120	149,3 \pm 23
6,9- α -difluoro-16- α -methyl-Prednison (11-dehydro-flumethason)	0,02	60/120	376,4 \pm 24,8
6- α -fluoro-Cortison	0,02	60/120	88,2 \pm 15
9- α -fluoro-Cortison	0,02	60/120	100,7 \pm 8,1
9- α -fluoro-Prednison	0,02	30/60	462,5 \pm 81,9
11-dehydro-21-Desoxydexamethason	0,02	60/120	218,8 \pm 18,2
11-dehydro- Δ 1-dehydro-6,9- α -difluoro-16- α - methyl-Corticosteron (11-DH-Diflucortolon)	0,02	30/60	709 \pm 30,9

Tabelle 6: Nierenmikrosomen: Verwendete Proteinkonzentration c, Inkubationszeiten t und Initialgeschwindigkeit (\pm Standardabweichung) der Reduktion durch die 11-HSD 2.

5.2.2. Einfluss der 9 α -Fluorierung

Auch unter Einsatz höherer Proteinkonzentrationen und längerer Inkubationszeiten konnte für die nichtfluorierten Steroide keine Reduktion durch humane Nierenrindemikrosomen (NRM) gezeigt werden. Der Einfluss der Δ 1-Dehydrokonfiguration und der Methylierung konnte daher nur an halogenierten Substanzen untersucht werden.

5.2.3. Einfluss der Ring(A)-Konfiguration

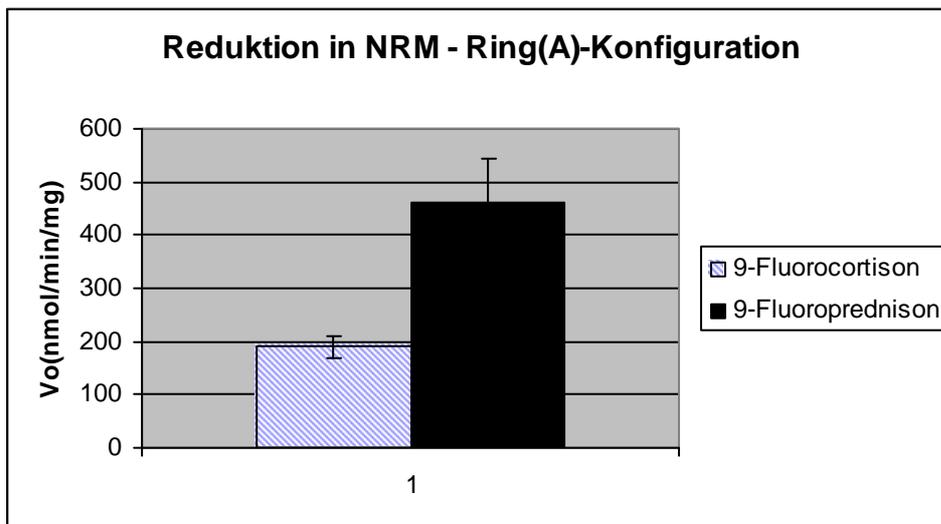


Abbildung 18: Die Reduktionsgeschwindigkeit von 9- α -fluoro-Prednison (Δ 1-dehydrostellung in Ring A) ist höher als die von 9- α -fluoro-Cortisol ($V_o=462,5\pm 81,9$ bzw. $100,7\pm 8,1$ nmol/min/mg, $p<0,002$)

9- α -fluoro-Prednison wird stärker durch humane NRM reduziert als 9- α -fluoro-Cortison.

5.2.4. Einfluss der 6- α - und 16- α/β -Methylierung

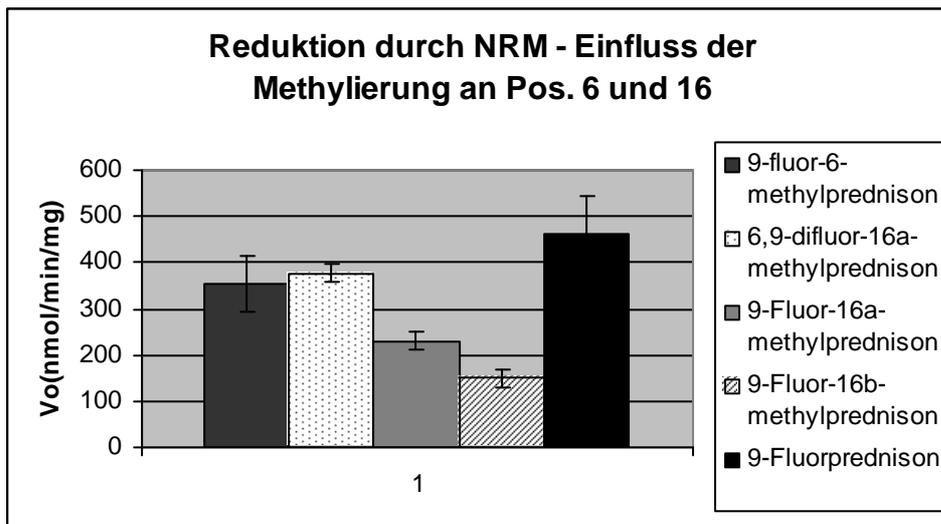


Abbildung 19: 11-dehydro-(im folgenden: 11-DH-)Dexamethason (9-fluoro-16- α -methyl-Prednison) und 11-DH-Betamethason (9-fluoro-16- β -methyl-Prednison) werden signifikant langsamer reduziert als 9-fluoro-Prednison, 9-fluoro-6-methyl-Prednison und 6,9-Difluor 16- α -methyl-Prednison (11-DH-Flumethason). $V_o = 230,6 \pm 22,0$ und $149,3 \pm 23,0$ nmol/min/mg für 11-DH-Dexamethason und 11-DH-Betamethason bzw. $462,5 \pm 81,9$, $354,9 \pm 49,5$ und $376,4 \pm 24,8$ nmol/min/mg, alle $p < 0,0001$ für die übrigen Substanzen. Der Unterschied zwischen 11-DH-Dexamethason und 11-DH-Betamethason ist ebenfalls signifikant ($p < 0,001$).

9- α -fluoro-Prednison, 9- α -fluoro-6- α -methyl-Prednison und 6,9- α -difluoro-16- α -methyl-Prednison (11-DH-Flumethason) werden gleich stark durch NRM reduziert. Die Reduktionsneigung aller drei Substanzen ist stärker als die von 9- α -fluoro-16- α -methyl-Prednison (11-DH-Dexamethason) und 9- α -fluoro-16- β -methyl-Prednison (11-DH-Betamethason). 11-DH-Dexamethason wiederum wird stärker reduziert als 11-DH-Betamethason. Beide 16-methylierten Fluorprednisonderivate werden signifikant schwächer reduziert als 9-fluoro-Prednison, so dass von einem hemmenden Einfluss der 16-Methylgruppe auf die Reduktionsreaktion in NRM auszugehen ist.

5.2.5. Einfluss der Hydroxylgruppe an Position 17 und 21

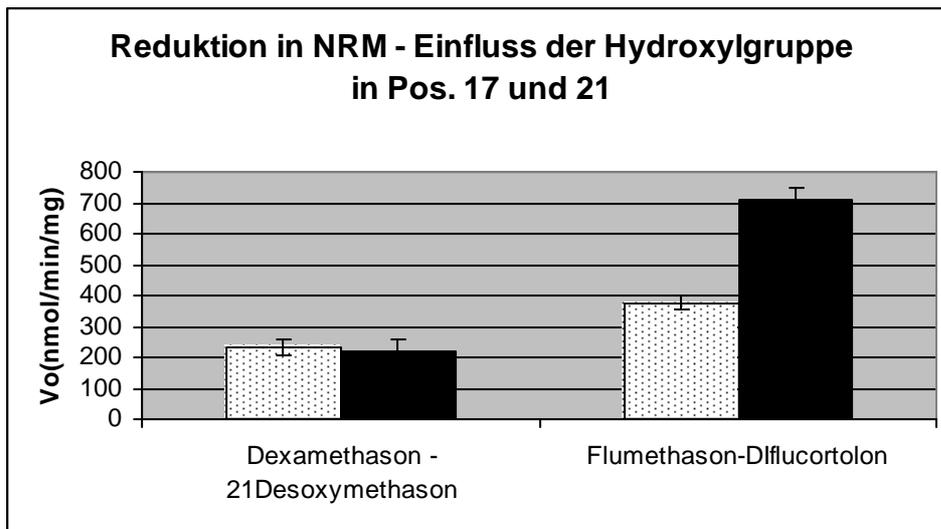


Abbildung 20: 11-DH-Flumethason (6,9- α -Difluoro-16- α -methyl-Prednisolon) und 11-DH-Diflucortolon (6,9- α -Difluoro-16- α -methyl- Δ 1-Dehydro-Corticosteron) unterscheiden sich in ihrer Reduktionsgeschwindigkeit: $V_o = 376,4 \pm 24,8$ bzw. $709,0 \pm 30,9$ nmol/min/mg, $p < 0,0001$). Zwischen 11-DH-Dexamethason und 11-DH-21-Desoxydexamethason besteht kein signifikanter Unterschied.

11-dehydro- Δ 1-dehydro-6,9- α -difluoro-16- α -methyl-Corticosteron (11-DH-Diflucortolon) wird deutlich stärker durch NRM reduziert als sein Gegenstück mit Hydroxylgruppe an Position 17, das 11-DH-Flumethason. Zwischen 11-DH-Dexamethason und 11-DH-Desoxymethason, die sich in der 21-Hydroxylgruppe unterscheiden, besteht hingegen kein Unterschied in der Reduktionsgeschwindigkeit.

5.2.6. Reduktion in Nierenmikrosomen: Zusammenfassung

- § Unhalogenierte Steroide werden unter den dargestellten Bedingungen nicht reduziert
- § 9-fluoro-Prednison wird stärker reduziert als 9-fluoro-Cortison (Abb.18)
- § Methylierung an Position 16, nicht aber an Position 6 vermindert die Reduktion. Dieser Effekt wird ausgeglichen durch ein zusätzliches Fluoratom beim 11-DH-Flumethason und 11-DH-Diflucortolon (Abb.19)
- § Der sterische Effekt der 16-Methylgruppe ist auch hier nachzuweisen: 11-DH-Dexamethason (16- α -Methyl) wird stärker reduziert als 11-DH-Betamethason (16- β -Methyl) (Abb.19)
- § Die 17-Hydroxylgruppe behindert die Reduktion (Abb.20)

5.3. Lebermikrosomen: Oxidation der 11-Hydroxysteroidoide

5.3.1. Übersicht der Initialgeschwindigkeiten

Initialgeschwindigkeiten in humanen Lebermikrosomen (LM):

n=6, c(Substrat): 10 μ mol/l, c(Kosubstrat): 1mmol/l NADP⁺, pH=8,5

Substanz	c(Protein) mg/ml	t(Inkubation) min	nmol/min/mg Protein
Cortisol	0,2	30/60	101,4 \pm 21,0
Δ 1-dehydro-Cortisol (Prednisolon)	0,2	30/60	136,7 \pm 11,6
6- α -methyl-Prednisolon	0,2	30/60	138,6 \pm 17,8
16- α -methyl-Prednisolon	0,2	30/60	72,2 \pm 7,1
16- β -methyl-Prednisolon	0,2	30/60	143,1 \pm 11,7
9- α -fluoro-16- α -methyl-Prednisolon (Dexamethason)	0,2	60/120	Kein Umsatz
9- α -fluoro-16- β -methyl-Prednisolon (Betamethason)	0,2	60/120	Kein Umsatz
6,9- α -difluoro-16- α -methyl-Prednisolon (Flumethason)	0,2	60/120	Kein Umsatz
6- α -fluoro-Cortisol	0,2	60/120	Kein Umsatz
9- α -fluoro-Cortisol	0,2	60/120	Kein Umsatz
9- α -fluoro-Prednisolon	0,2	60/120	Kein Umsatz
Δ 1-dehydro-6,9- α -difluoro-16- α -methyl-Corticosteron (Diflucortolon)	0,2	60/120	Kein Umsatz

Tabelle 7: Lebermikrosomen: Verwendete Proteinkonzentration c, Inkubationszeiten t und Initialgeschwindigkeit (\pm Standardabweichung) der Oxidation durch die 11-HSD 1.

5.3.2. Einfluss der 9- α -Fluorierung

Unter den angegebenen Versuchsbedingungen fand keine messbare Oxidation fluorierter Steroide durch humane LM statt.

5.3.3. Einfluss der Ring(A)-Konfiguration

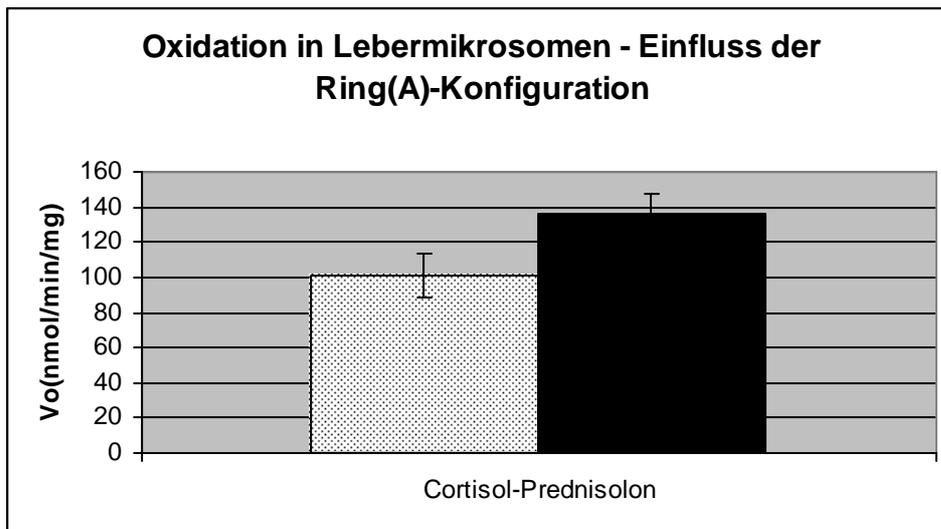


Abbildung 21: Die Δ^1 -Dehydrostellung in Ring A fördert die Oxidation durch die HSD 1: Prednisolon wird stärker oxidiert als Cortisol ($V_o = 136,7 \pm 11,6$ bzw. $101,4 \pm 21,0$ nmol/min/mg, $p < 0,01$).

Prednisolon wird stärker durch humane Lebermikrosomen (LM) oxidiert als Cortisol.

5.3.4. Einfluss der 6- α - und 16- α/β -Methylierung

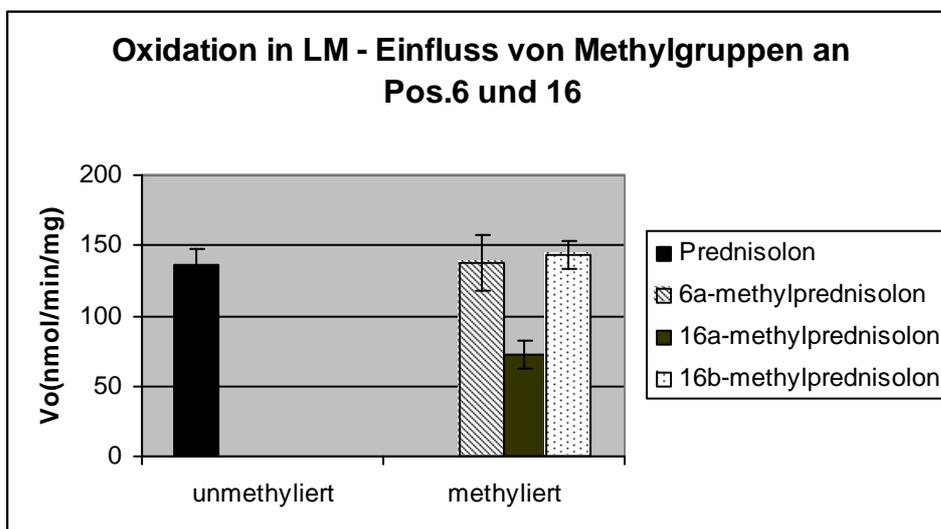


Abbildung 22: Prednisolon, 6- α -methyl-Prednisolon und 16- β -methyl-Prednisolon (die Vorläufersubstanz des Betamethason) unterscheiden sich nicht signifikant in ihrer Oxidationsgeschwindigkeit ($V_o = 136,7 \pm 11,6$, $138,6 \pm 17,8$ und $143,1 \pm 11,7$ nmol/min/mg). Nur 16- α -methyl-Prednisolon, der Vorläufer des Dexamethason wird signifikant langsamer oxidiert: $V_o = 72,2 \pm 7,1$ nmol/min/mg ($p < 0,001$ für alle drei erstgenannten Substanzen).

Nur das Einfügen einer Methylgruppe in 16 α -Position führt zu einer Verminderung der Oxidationsgeschwindigkeit in Lebermikrosomen.

5.3.5. Oxidation in Lebermikrosomen: Zusammenfassung

- § Steroide, die ein Fluoratom enthalten, wurden unter den angegebenen Bedingungen nicht oxidiert
- § Die Δ^1 -Dehydro-Stellung (Prednisolonstruktur) verstärkt die Oxidation in humanen Lebermikrosomen (Abb.21)
- § Methylierung an Position 6 oder 16 β führen nicht zu einer Veränderung (Abb.22)
- § Methylierung an 16 α -Position vermindert die Oxidation in LM (Abb. 22)

5.4. Lebermikrosomen: Reduktion der 11-Dehydrosteroidoide

5.4.1. Übersicht der Initialgeschwindigkeiten

Initialgeschwindigkeiten in humanen Lebermikrosomen (LM):

n=6, c(Substrat): 10 μ mol/l, c(Kosubstrat): 1mmol/l NADPH, pH=6,0

Substanz	c(Protein) mg/ml	t(Inkubation) min	nmol/min/mg Protein
Cortison	0,2	120/180	Kein Umsatz
Δ 1-dehydro-Cortison (Prednison)	0,2	120/180	Kein Umsatz
6- α -methyl-Prednison	0,2	120/180	Kein Umsatz
16- α -methyl-Prednison	0,2	120/180	Kein Umsatz
16- β -methyl-Prednison	0,2	120/180	Kein Umsatz
9- α -fluoro-16- α -methyl-Prednison (11-dehydro-dexamethason)	0,02	30/60	540,0 \pm 55,3
9- α -fluoro-16- β -methyl-Prednison (11-dehydro-betamethason)	0,02	30/60	377,8 \pm 34,2
6,9- α -difluoro-16- α -methyl-Prednison (11-dehydro-flumethason)	0,02	30/60	650,0 \pm 84,3
6- α -fluoro-Cortison	0,02	30/60	218,9 \pm 20,8
9- α -fluoro-Cortison	0,02	30/60	260,6 \pm 30,9
9- α -fluoro-Prednison	0,02	30/60	1175,0 \pm 105,3
11-dehydro, Δ 1-dehydro-6,9- α -difluoro-16- α -methyl-Corticosteron (11-DH-Diflucortolon)	0,02	30/60	1338,9 \pm 139,3

Tabelle 8: Lebermikrosomen: Verwendete Proteinkonzentration c, Inkubationszeiten t und Initialgeschwindigkeit (\pm Standardabweichung) der Reduktion durch die 11-HSD 1.

5.4.2. Einfluss der 9- α -Fluorierung

Unter den angegebenen Versuchsbedingungen fand keine messbare Reduktion unfluorierter Steroide statt. Der Einfluss der Ring(A)-Konfiguration und der Methylierung konnte daher nur an den fluorierten Substanzen untersucht werden.

5.4.3. Einfluss der Ring(A)-Konfiguration

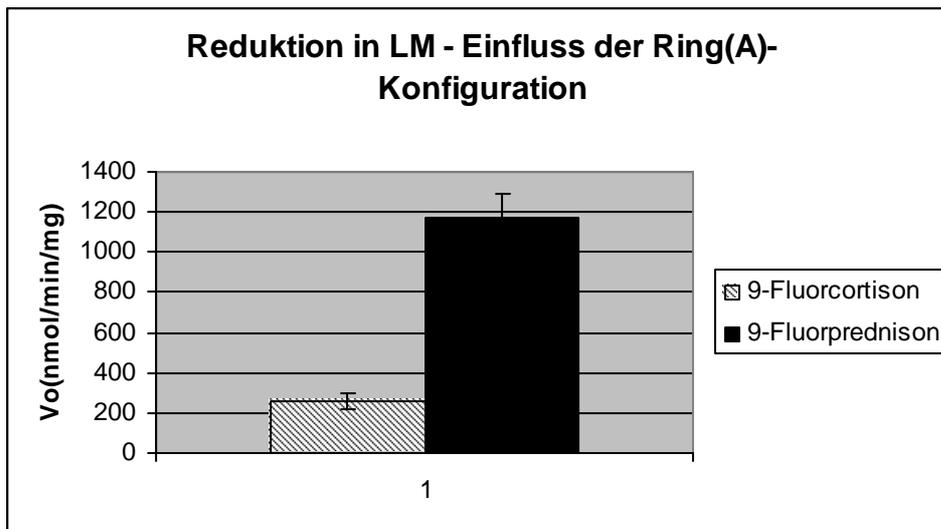


Abbildung 23: 9- α -fluoro-Prednison wird signifikant schneller durch die HSD 1 reduziert als 9- α -fluoro-Cortison ($V_o=1175,0\pm105,3$ bzw. $260,6\pm30,9$ nmol/min/mg, $p<0.0001$).

Die $\Delta 1$ Dehydrokonfiguration in Ring(A) begünstigt deutlich die Reduktion in LM.

5.4.4. Einfluss der 16- α/β -Methylierung

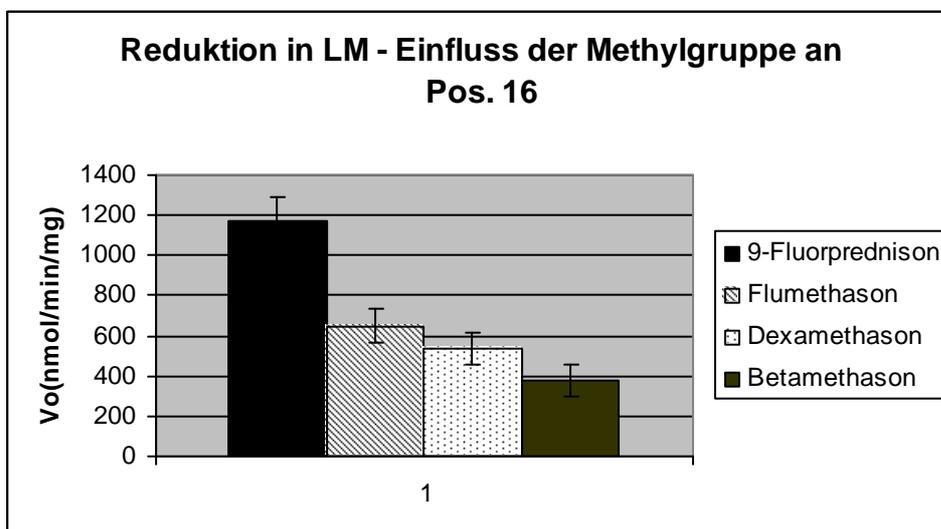


Abbildung 24: Die Reduktionsgeschwindigkeit ist bei 9-fluoro-Prednison am höchsten ($V_o=1175,0\pm105,3$ nmol/min/mg), gefolgt von 11-DH-Flumethason (6,9- α -Difluoro-16- α -methyl-Prednison, $V_o=650,0\pm84,3$ nmol/min/mg). 11-DH-Dexamethason (9-fluoro-16- α -methyl-Prednison) und 11-DH-Betamethason (9-fluoro-16- β -methyl-Prednison) zeigen geringere Reduktionsgeschwindigkeiten ($540,0\pm55,3$ bzw. $377,8\pm34,2$ nmol/min/mg). Die Unterschiede zwischen 9-fluoro-Prednison und 11-DH-Flumethason sowie zwischen 11-DH-Flumethason und 11-DH-Dexamethason/11-DH-Betamethason sind signifikant (beide $p<0,001$).

Die Methylgruppe an Position 16 vermindert die Reduktion in Lebermikrosomen. 9- α -fluoro-Prednison wird stärker reduziert als die untersuchten Substanzen mit 16-Methylgruppe. Die Doppelfluorierung des 11-DH-Flumethason an Position 6 und 9 führt zu verstärkter Reduktion (im Gegensatz zu den einfach fluorierten Dexamethason und Betamethason).

5.4.5. Einfluss der 17-Hydroxylgruppe

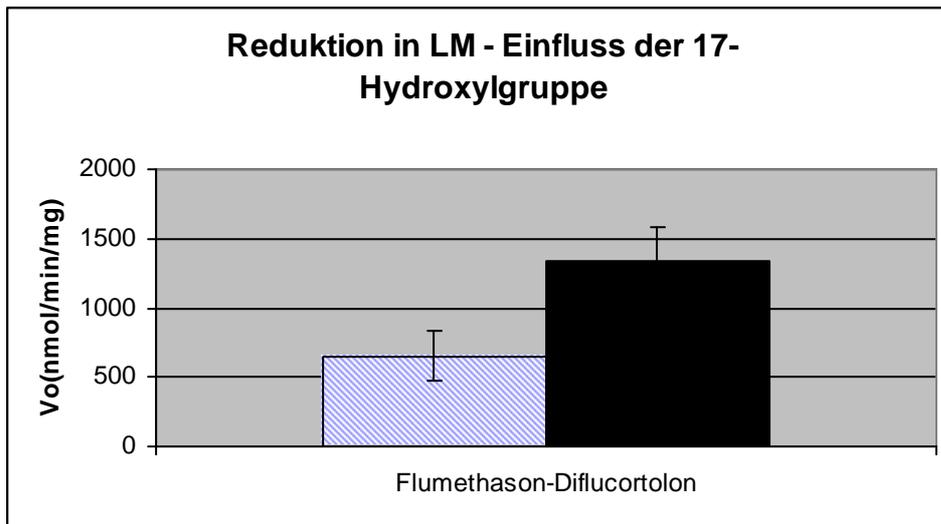


Abbildung 25: 11-DH-Flumethason (6,9- α -Difluoro-16- α -methyl-Prednison) und 11-DH-Diflucortolon (11-dehydro-6,9- α -Difluoro-16- α -methyl- Δ 1-Dehydro-Corticosteron) unterscheiden sich in ihrer Reduktionsgeschwindigkeit: $V_o = 650,0 \pm 84,3$ bzw. $1338,9 \pm 139,3$ nmol/min/mg, $p < 0,0001$.

Die stärkste Reduktion in LM zeigt 11-DH-Diflucortolon, das sich vom 11-DH-Flumethason nur durch das Corticosteron-Grundgerüst (Fehlen der Hydroxylgruppe an Position 17) unterscheidet.

5.4.6. Reduktion in Lebermikrosomen: Zusammenfassung

- § Es konnte keine messbare Reduktion unfluorierter Steroide gezeigt werden
- § Fluorierte Steroide mit Prednison-Grundstruktur (Δ^1 -Dehydrokonfiguration) werden stärker reduziert als solche mit Cortisol-Grundstruktur (Abb.23)
- § 16α -Methylierung vermindert die Reduktionsgeschwindigkeit in LM, dieser Effekt wird durch Zusatz eines zweiten Fluoratoms (bei 11-DH-Flumethason) abgeschwächt, die Doppelfluorierung scheint die Reduktion zu begünstigen (Abb.24)
- § Dehydroxylierung an C 17 erhöht die Reduktionsgeschwindigkeit (Abb.25)