

4. Ergebnisse

4.1. Oxidationsreaktion der 11 β -HSD-1 (humane Lebermikrosomen)

4.1.1. Inhibitionsversuche mit Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon

Die Glycyrrhetinsäure hemmte die 11 β -HSD-1-katalysierte Oxidation bei ansteigenden Konzentrationen in zunehmendem Maße. Während bei einer Konzentration von 10^{-9} mol/l noch keine signifikante Hemmung nachweisbar war, nahm die Inhibition der 11 β -HSD-1 bei Glycyrrhetinsäure-Konzentrationen zwischen 10^{-8} bis 10^{-6} mol/l stark zu. Bei 10^{-6} mol/l war die Inhibition bereits annähernd vollständig. Der IC₅₀-Wert, also die Inhibitorkonzentration bei der der Umsatz um 50 % gehemmt wird, betrug $4,0 \times 10^{-8}$ mol/l (siehe Abb. 4-1 und Tabelle 4-1) Eine ähnlich starke Hemmwirkung auf die 11 β -HSD-1-Oxidation mit fast identischem Verlauf der Inhibitionskurve wies Carbenoxolon auf, das einen IC₅₀-Wert von $6,0 \times 10^{-8}$ mol/l besaß.

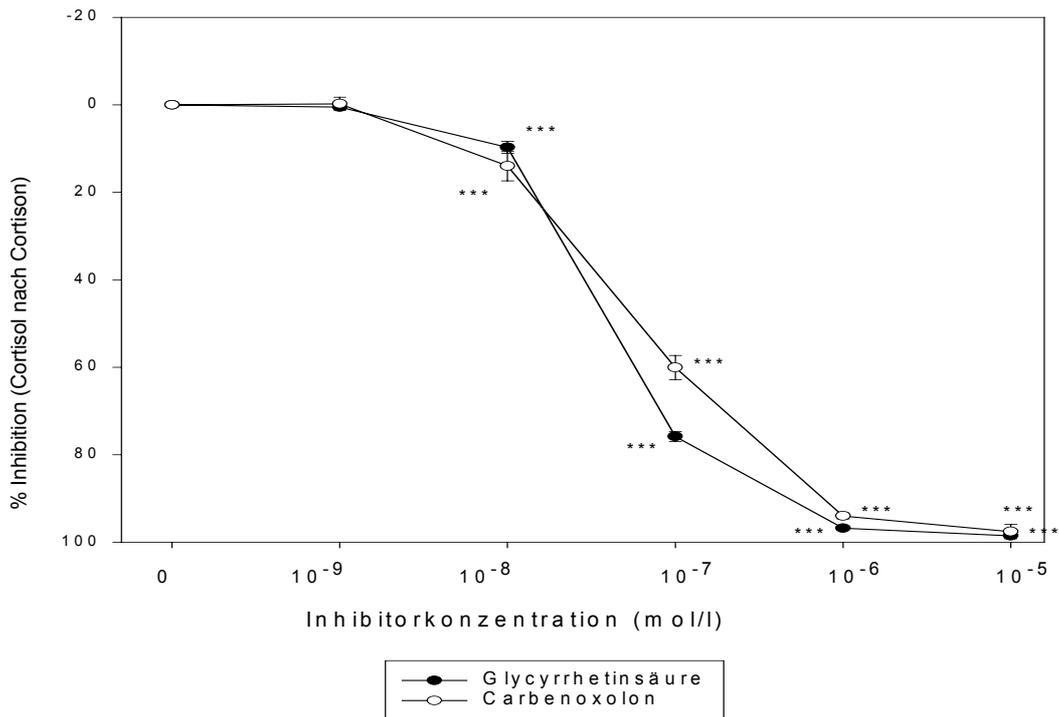


Abb. 4-1: Hemmung der Oxidationsreaktion der 11 β -HSD-1 in humanen Lebermikrosomen durch Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon bei Verwendung von Cortisol als Substrat. Mittelwerte \pm SD (n=3), *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 gegenüber Kontrollen ohne Inhibitor (0 % Hemmung).

Inhibitoren	IC50-Werte (mol/l)
Glycyrrhetinsäure	$4,0 \times 10^{-8}$
Carbenoxolon	$6,0 \times 10^{-8}$

Tabelle 4-1: IC50-Werte von Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon für die Oxidationsreaktion der 11 β -HSD-1.

4.1.2. Inhibitionsversuche mit Progesteron und 11-OH-Progesteron-Derivaten

Auch bei Progesteron und seinen beiden 11-Hydroxy-Derivaten 11 α - und 11 β -OH-Progesteron lag bei einer Konzentration von 10^{-9} mol/l noch keine signifikante Hemmung der 11 β -HSD-1-Oxidation vor. Ab Konzentrationen von 10^{-8} mol/l kam es zu einer mit der Konzentration der Inhibitoren ansteigenden Hemmung der Oxidation. Im Gegensatz zur Glycyrrhetinsäure und dem Carbenoxolon erreichte Progesteron keine vollständige Inhibition in dem von uns untersuchten Bereich. Die beiden stärker hemmenden 11-OH-Progesteron-Substanzen erzielten bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/l eine maximale Inhibition von ca. 95 %, wobei die Hemmung durch das 11 α -OH-Derivat geringfügig stärker war als durch das 11 β -OH-Derivat (siehe Abb. 4-2).

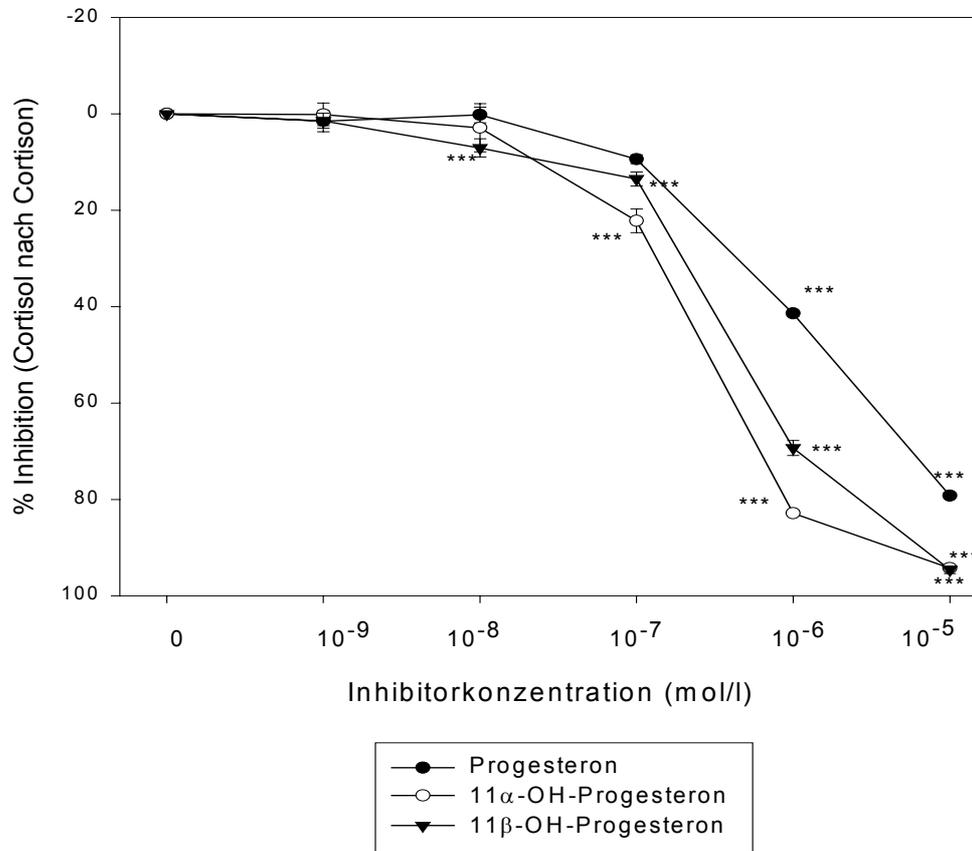


Abb. 4-2: Hemmung der Oxidationsreaktion der 11 β -HSD-1 in humanen Lebermikrosomen durch Progesteron und seine beiden 11-OH-Metaboliten 11 α - und 11 β -OH-Progesteron. Substrat ist Cortisol. Mittelwerte \pm SD (n=3), *P< 0,05, **P< 0,01, ***P< 0,001 gegenüber Kontrollen ohne Inhibitor (0 % Hemmung).

Die IC₅₀-Werte lagen bei $2,8 \times 10^{-7}$ bzw. bei $4,4 \times 10^{-7}$ mol/l für 11 α - bzw. 11 β -OH-Progesteron. Progesteron selbst besaß einen IC₅₀-Wert, der etwa eine Zehnerpotenz niedriger lag als die der 11-OH-Derivate, nämlich bei $1,7 \times 10^{-6}$ mol/l (siehe Tabelle 4-2).

Inhibitoren	IC50-Werte (mol/l)
11 α -OH-Progesteron	$2,8 \times 10^{-7}$
11 β -OH-Progesteron	$4,4 \times 10^{-7}$
Progesteron	$1,7 \times 10^{-6}$

Tabelle 4-2: IC50-Werte von 11 α -, 11 β -OH-Progesteron und Progesteron für die Oxidationsreaktion der 11 β -HSD-1.

Bei Vergleich der getesteten Substanzen erkennt man, daß die Glycyrrhetinsäure die Substanz mit dem niedrigsten IC50-Wert und folglich mit der stärksten Hemmkraft war. Weitere potente Inhibitoren waren 11 α -OH-Progesteron und das nur geringfügig schwächer hemmende 11 β -OH-Progesteron (siehe Abb. 4-3).

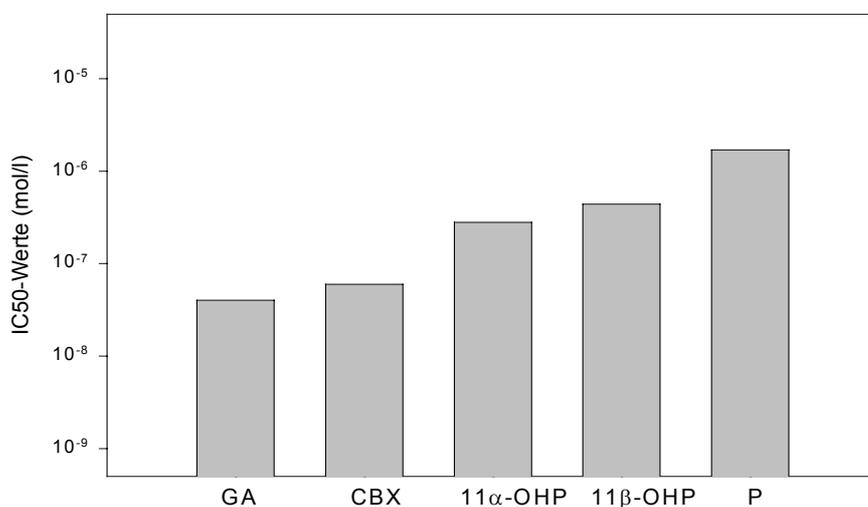


Abb. 4-3: IC50-Werte von Glycyrrhetinsäure (GA), Carbenoxolon (CBX), 11 α -OH-Progesteron (11 α -OH-P), 11 β -OH-Progesteron (11 β -OH-P) und Progesteron (P) für die Oxidationsreaktion der 11 β -HSD-1.

4.1.3. Inhibitionsversuche mit Progesteron und DOC-Metaboliten

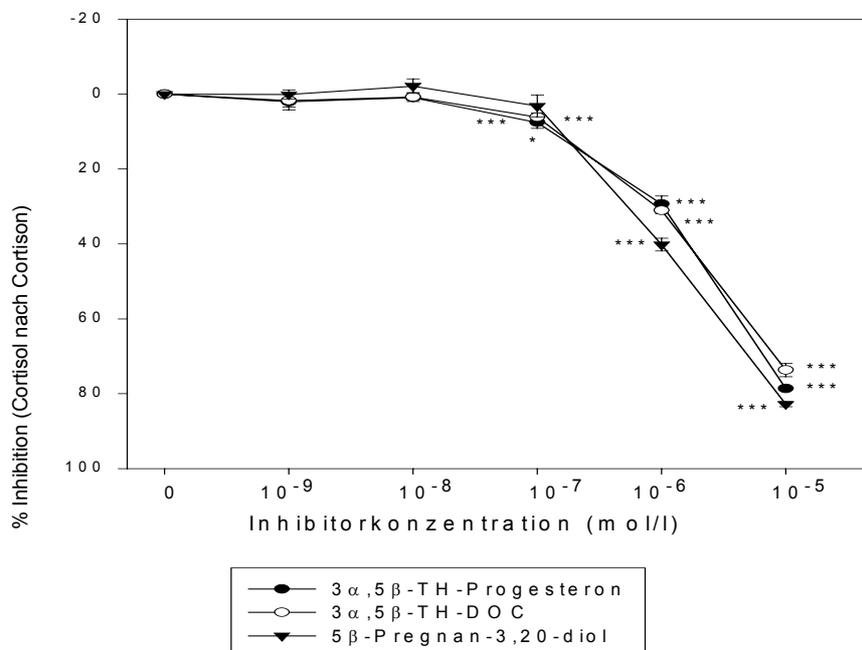
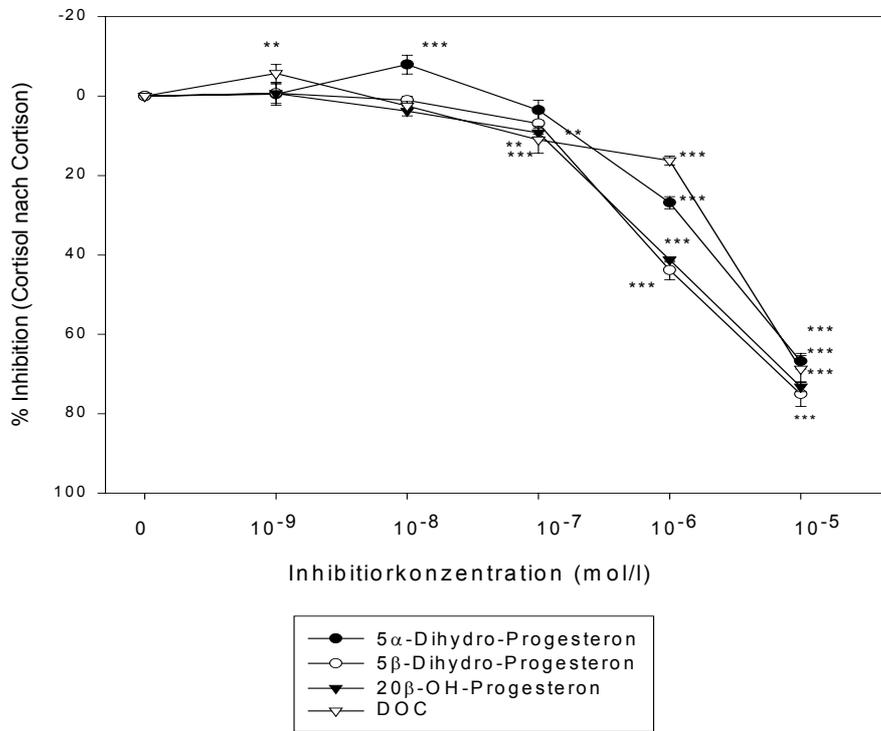


Abb. 4-4 (oben), Abb.4-5 (unten): Hemmung der Oxidationsreaktion der 11 β -HSD-1 in humanen Lebermikrosomen durch Progesteron-Metabolite mit Cortisol als Substrat. Mittelwerte \pm SD (n=3), *P< 0,05, **P< 0,01, ***P< 0,001 gegenüber Kontrollen ohne Inhibitor (0 % Hemmung).

Außer Progesteron (4-Pregnen-3,20-dion) und 11α - bzw. 11β -OH-Progesteron (4-Pregnen- $11\alpha/\beta$ -ol-3,20-dion) wurden weitere Progesteron-Derivate auf ihre 11β -HSD-1-hemmende Wirkung untersucht, und zwar 5α - und 5β -Progesteron ($5\alpha/\beta$ -Pregnan-3,20-dion), 20β -OH-Progesteron (4-Pregnen- 20β -ol-3-on) sowie die $3\alpha,5\beta$ -Tetrahydro-Derivate von Progesteron (5β -Pregnan- 3α -ol-20-on) und Deoxycorticosteron (DOC, 5β -Pregnan- $3\alpha,21$ -diol-20-on). Auch die Hemmwirkung des Hauptprogesteronmetaboliten 5β -Pregnan-3,20-diol wurde getestet. Es zeigte sich bis zu Konzentrationen von 10^{-7} mol/l keine signifikante Hemmung. Höhere Inhibitorkonzentrationen führten zu einer steil ansteigenden Inhibition (Inhibitionskurven siehe Abb. 4-4 und Abb. 4-5). Die negativen Steigungen der Inhibitionskurven der Progesteron-Derivate lagen im wesentlichen parallel zueinander. Bei der höchsten untersuchten Inhibitorkonzentration von 10^{-5} mol/l zeigten alle Inhibitoren noch einen dosisabhängig Abfall der Umsätze. Eine Sättigung der Hemmung war noch nicht zu erkennen, und die maximal erreichte Inhibition lag zwischen 68,7 % für Deoxycorticosteron und 82,8 % für 5β -Pregnan-3,20-diol. Dabei zeigte sich, daß sich die getesteten Progesteronmetabolite nur unwesentlich in ihrer Hemmwirkung auf die 11β -HSD-1-katalysierte Oxidationsreaktion unterschieden. Ihre IC_{50} -Werte lagen zwischen $1,6$ (5β -Dihydroprogesteron) und $4,4 \times 10^{-6}$ mol/l (DOC) (siehe Tabelle 4-3).

Inhibitoren	IC_{50} -Werte (mol/l)
5α -Dihydro-Progesteron	$3,8 \times 10^{-6}$
5β -Dihydro-Progesteron	$1,6 \times 10^{-6}$
20β -OH-Progesteron	$1,9 \times 10^{-6}$
Deoxycorticosteron (DOC)	$4,4 \times 10^{-6}$
$3\alpha,5\beta$ -Tetrahydro-DOC	$2,8 \times 10^{-6}$
$3\alpha,5\beta$ -Tetrahydro-Progesteron	$2,6 \times 10^{-6}$
5β -Pregnan-3,20-diol	$1,7 \times 10^{-6}$

Tabelle 4-3: IC_{50} -Werte von Progesteron-Derivaten für die Oxidationsreaktion der 11β -HSD-1.

4.1.4. Inhibitionsversuche mit Gallensäuren, Metopiron und Ketokonazol

Als weitere Inhibitor-kandidaten der 11β -HSD-1-Oxidationsreaktion testeten wir die beiden Gallensäuren Chenodeoxycholsäure und Lithocholsäure sowie Metopiron und Ketokonazol. Den Inhibitionskurven ist zu entnehmen, daß Lithocholsäure und Chenodeoxycholsäure die Oxidation der 11β -HSD-1 in derselben Größenordnung hemmten wie das Progesteron. Die hemmende Wirkung setzte etwa ab einer Konzentration von 10^{-7} mol/l ein und stieg dann mit zunehmender Inhibitor-konzentration bis auf eine Hemmung der Ausgangsreaktion um 78,4 % bei der Lithocholsäure bzw. um 65,8 % bei Chenodeoxycholsäure. Metopiron und Ketokonazol hatten keine signifikante hemmende Wirkung auf die 11β -HSD-1-katalysierte Oxidationsreaktion unter unseren Versuchsbedingungen (siehe Abb. 4-6).

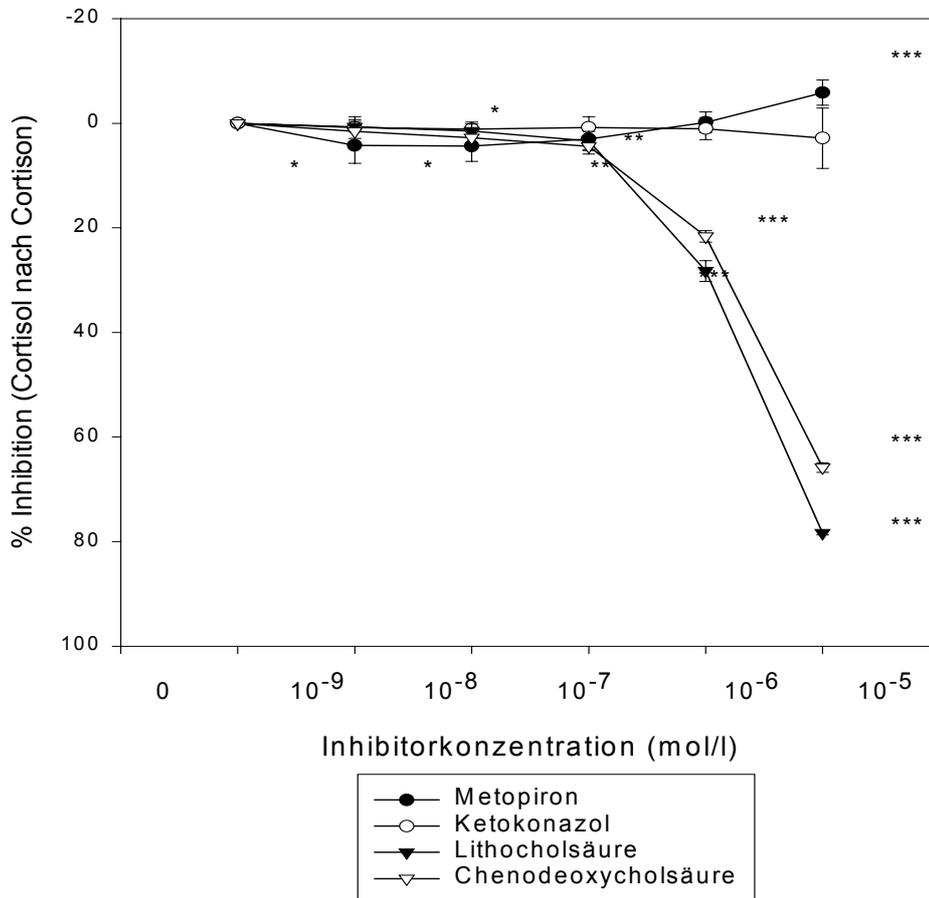


Abb. 4-6: Hemmung der Oxidationsreaktion der 11β -HSD-1 in humanen Lebermikrosomen bei Umsatz von Cortisol nach Cortison. Mittelwerte \pm SD (n=3), *P< 0,05, **P< 0,01, ***P< 0,001 gegenüber Kontrollen ohne Inhibitor (0 % Hemmung).

Entsprechend lagen auch die IC₅₀-Werte der Gallensäuren im Bereich des Progesterons, nämlich bei $2,7 \times 10^{-6}$ für Lithocholsäure und bei $4,4 \times 10^{-6}$ mol/l für Chenodeoxycholsäure; beide Gallensäuren hemmten die 11 β -HSD-1-Oxidationsreaktion also erst bei höheren Konzentrationen als das Progesteron (IC₅₀-Wert bei $1,7 \times 10^{-6}$ mol/l), wobei die Lithocholsäure wiederum bei niedrigeren Konzentrationen hemmte als die Chenodeoxycholsäure. Eine Übersicht über die IC₅₀-Werte gibt Tabelle 4-4.

Inhibitoren	IC ₅₀ -Wert (mol/l)
Lithocholsäure	$2,7 \times 10^{-6}$
Chenodeoxycholsäure	$4,4 \times 10^{-6}$
Metopiron	keine Hemmung
Ketokonazol	keine Hemmung

Tabelle 4-4: IC₅₀-Werte für Gallensäuren, Metopiron und Ketokonazol für die Oxidationsreaktion der 11 β -HSD-1 in humanen Lebermikrosomen.

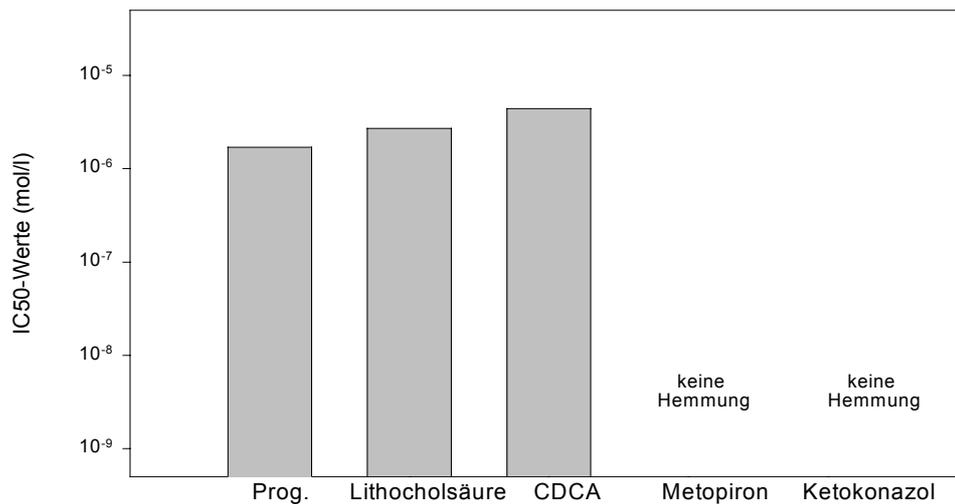


Abb. 4-7: IC₅₀-Werte für Progesteron, Lithocholsäure, Chenodeoxycholsäure (CDCA), Metopiron und Ketokonazol bezogen auf den Umsatz von Cortisol durch die 11 β -HSD-1 in humanen Lebermikrosomen.

4.2. Reduktionsreaktion der 11 β -HSD-1 (humane Lebermikrosomen)

4.2.1. Inhibitionsversuche mit Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon

In Analogie zu den Ergebnissen bei der Oxidation waren auch bei der Reduktionsreaktion der 11 β -HSD-1 die Glycyrrhetinsäure und ihr Succinylester die Inhibitoren mit den geringsten IC₅₀-Werten (siehe Abb. 4-8, Tabelle 4-5). Der IC₅₀-Wert für Carbenoxolon lag nur leicht niedriger als der für Glycyrrhetinsäure (3,0 bzw. 3,1 x 10⁻⁸ mol/l).

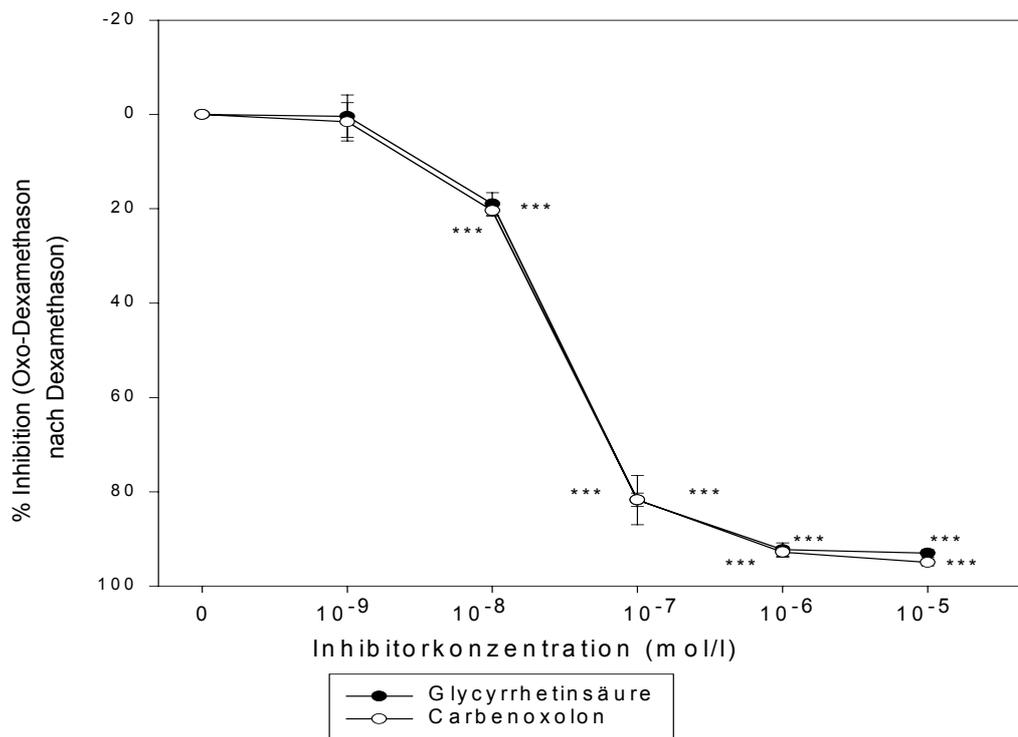


Abb. 4-8: Hemmung der Reduktionsreaktion der 11 β -HSD-1 in humanen Lebermikrosomen (0,03 mg/ml) durch Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon bei Verwendung von 1,6 μ mol/l Oxo-Dexamethason als Substrat. Mittelwerte \pm SD (n=3), *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 gegenüber Kontrollen ohne Inhibitor (0 % Hemmung).

Inhibitoren	IC ₅₀ -Werte (mol/l)
Glycyrrhetinsäure	3,1 x 10 ⁻⁸
Carbenoxolon	3,0 x 10 ⁻⁸

Tabelle 4-5: IC₅₀-Werte für Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon für die 11 β -HSD-1-katalysierte Reduktionsreaktion in humanen Lebermikrosomen.

4.2.2. Inhibitionsversuche mit Progesteron und 11-OH-Progesteron-Derivaten

Bei Verwendung von 11α -OH-Progesteron als Inhibitor trat eine Hemmung des Umsatzes um 50 % bei $5,1 \times 10^{-7}$ mol/l auf, also bei einem Wert, der etwa eine Zehnerpotenz höher lag als die IC_{50} -Werte für Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon. Das 11β -OH-Progesteron dagegen besaß einen höheren IC_{50} -Wert von $1,3 \times 10^{-6}$ mol/l, der knapp niedriger ist als der IC_{50} -Wert für Progesteron ($8,4 \times 10^{-6}$ mol/l). Im Gegensatz zu Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon erreichten weder Progesteron noch seine 11-OH-Metabolite bei der höchsten untersuchten Inhibitorkonzentration von 10^{-5} mol/l eine maximale Hemmung.

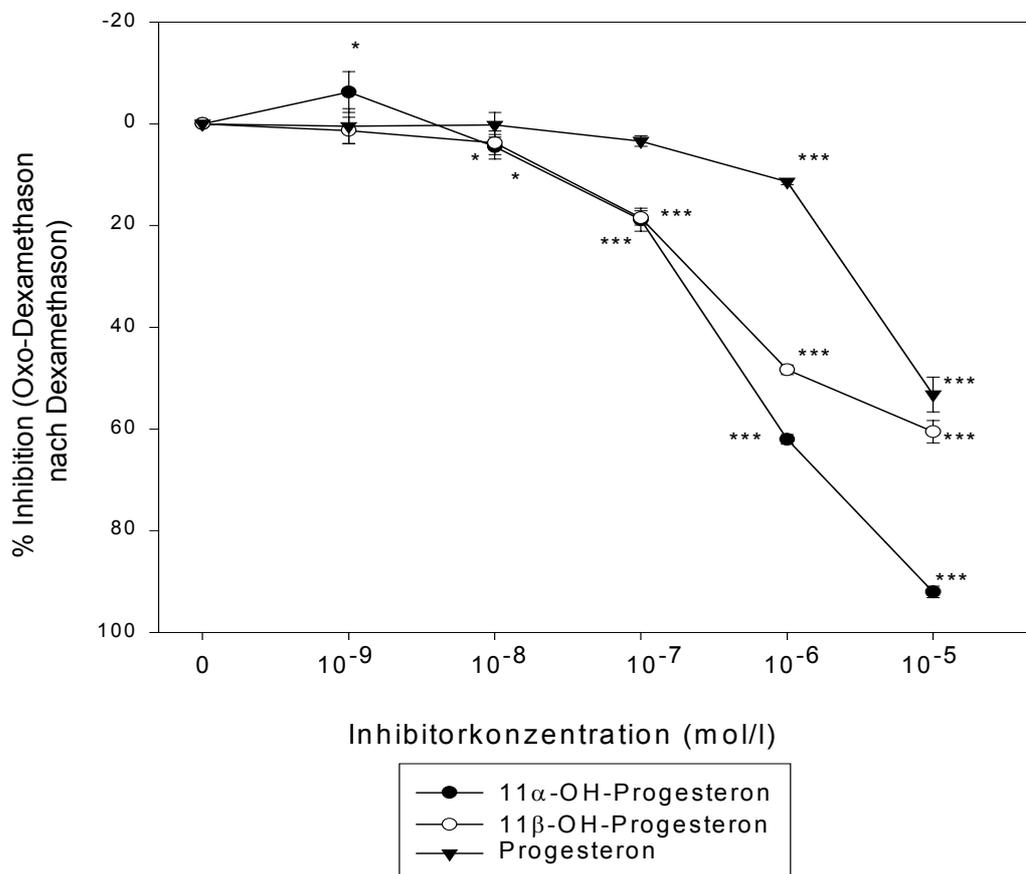


Abb. 4-9: Hemmung der Reduktionsreaktion der 11β -HSD-1 in humanen Lebermikrosomen (0,03 mg/ml) durch Progesteron und seine 11-OH-Progesteron-Metabolite bei Verwendung von $1,6 \mu\text{mol/l}$ Oxo-Dexamethason als Substrat. Mittelwerte \pm SD (n=3), * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ gegenüber Kontrollen ohne Inhibitor (0 % Hemmung).

Inhibitoren	IC50-Werte (mol/l)
11 α -OH-Progesteron	$5,1 \times 10^{-7}$
11 β -OH-Progesteron	$1,3 \times 10^{-6}$
Progesteron	$8,4 \times 10^{-6}$

Tabelle 4-6: IC50-Werte von 11 α -, 11 β -OH-Progesteron und Progesteron für die Reduktionsreaktion der 11 β -HSD-1 in humanen Lebermikrosomen.

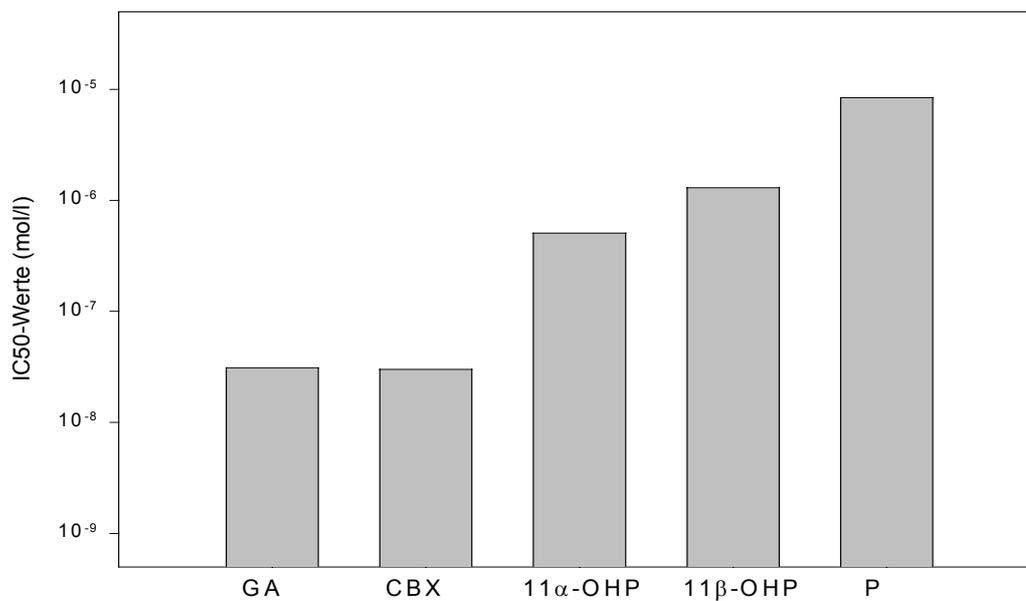


Abb. 4-10: Vergleich der IC50-Werte für Glycyrrhetinsäure (GA), Carbenoxolon (CBX), 11 α -OH-Progesteron (11 α -OHP), 11 β -OH-Progesteron (11 β -OHP) und Progesteron (P) für die Reduktionsreaktion der 11 β -HSD-1.

4.2.3. Inhibitionsversuche mit Progesteron und DOC-Metaboliten

Bei den Hemmversuchen der 11β -HSD-1-Reduktion mit den Progesteron-Derivaten 5α - und 5β -Dihydroprogesteron, 20β -Progesteron, $3\alpha,5\beta$ -Tetrahydro-Progesteron und $3\alpha,5\beta$ -Tetrahydro-DOC und DOC an humanen Lebermikrosomen waren die Hemmkurven ähnlich mit IC_{50} -Werten in der Größenordnung von 10^{-6} mol/l. Wieder lagen bei 10^{-5} mol/l die Hemmkurven noch im Bereich linear zunehmender Inhibition (siehe Abb.4-11 und 4-12 bzw. Tabelle 4-7).

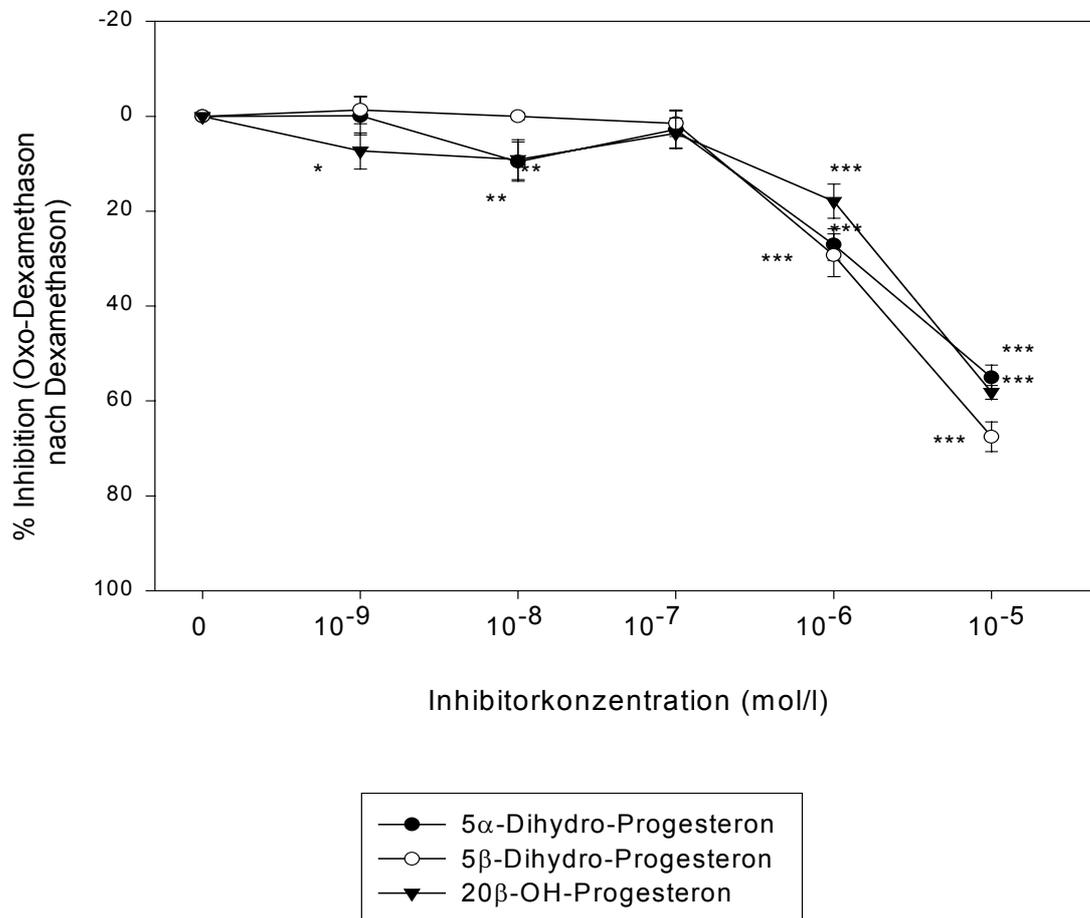


Abb. 4-11: Hemmung der Reduktionsreaktion der 11β -HSD-1 in humanen Lebermikrosomen (0,03 mg/ml) durch 5-Dihydro-Progesteron-Derivate und 20β -OH-Progesteron bei Verwendung von $1,6 \mu\text{mol/l}$ Oxo-Dexamethason als Substrat. Mittelwerte \pm SD (n=3), *P< 0,05, **P< 0,01, ***P< 0,001 gegenüber Kontrollen ohne Inhibitor (0 % Hemmung).

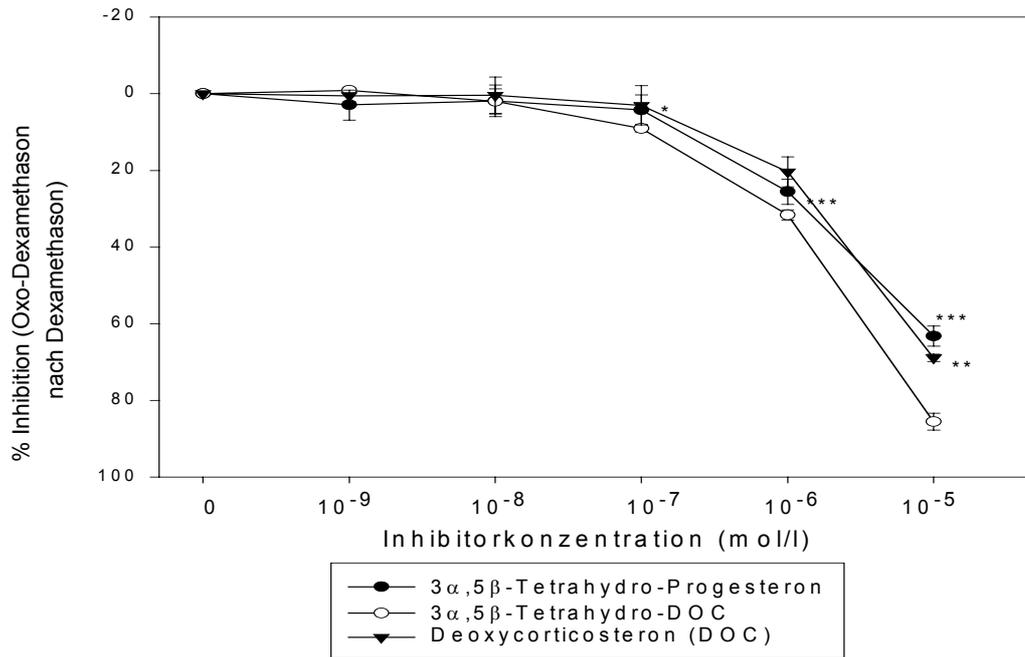


Abb. 4-12: Hemmung der Reduktionreaktion der 11 β -HSD-1 in humanen Lebermikrosomen (0,03 mg/ml) durch 3 α ,5 β -Tetrahydro-Progesteron, 3 α ,5 β -Tetrahydro-DOC und DOC bei Verwendung von 1,6 μ mol/l Oxo-Dexamethason als Substrat. Mittelwerte \pm SD (n=3), *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 gegenüber Kontrollen ohne Inhibitor (0 % Hemmung).

3 α ,5 β -Tetrahydro-DOC hemmte mit einem IC₅₀-Wert von $2,2 \times 10^{-6}$ mol/l am stärksten, gefolgt von 5 β -Dihydroprogesteron, DOC, 3 α ,5 β -Tetrahydro-Progesteron, 20 β -Progesteron und zuletzt 5 α -Dihydroprogesteron (siehe Tabelle 4-7).

Inhibitoren	IC 50-Werte (mol/l)
5 α -Dihydro-Progesteron	$6,5 \times 10^{-6}$
5 β -Dihydro-Progesteron	$3,4 \times 10^{-6}$
20 β -OH-Progesteron	$6,1 \times 10^{-6}$
3 α ,5 β -Tetrahydro-Progesteron	$4,4 \times 10^{-6}$
Deoxycorticosteron (DOC)	$4,0 \times 10^{-6}$
3 α -5 β -Tetrahydro-DOC	$2,2 \times 10^{-6}$

Tabelle 4-7: IC₅₀-Werte für die Reduktionreaktion der 11 β -HSD-1 in humanen Lebermikrosomen.

4.2.4. Inhibitionsversuche mit Gallensäuren, Metopiron und Ketokonazol

Auch für Lithocholsäure und Chenodeoxycholsäure wurden Inhibitionskurven der 11 β -HSD-1-katalysierten Reduktionsreaktion mit humanen Lebermikrosomen und Oxo-Dexamethason als Substrat erstellt. Diese zeigten etwa ab 10⁻⁷ mol/l InhibitorKonzentration eine Hemmung der Reduktionsreaktion (IC50-Werte im Bereich von 10⁻⁶ mol/l). Das außerdem untersuchte Metopiron zeigte bei InhibitorKonzentrationen bis 10⁻⁵ mol/l keine signifikante Hemmung der Reduktion. Da es für Metopiron in der Literatur widersprüchliche Angaben über die Beeinflussung der 11 β -HSD-Reaktionen gibt, und es von einigen Autoren als selektiver 11 β -HSD-1-Inhibitor dargestellt wird, führten wir Messungen mit InhibitorKonzentrationen bis 10⁻³ mol/l durch (siehe Abb. 4-13, Abb. 4-14, Tab. 4-8).

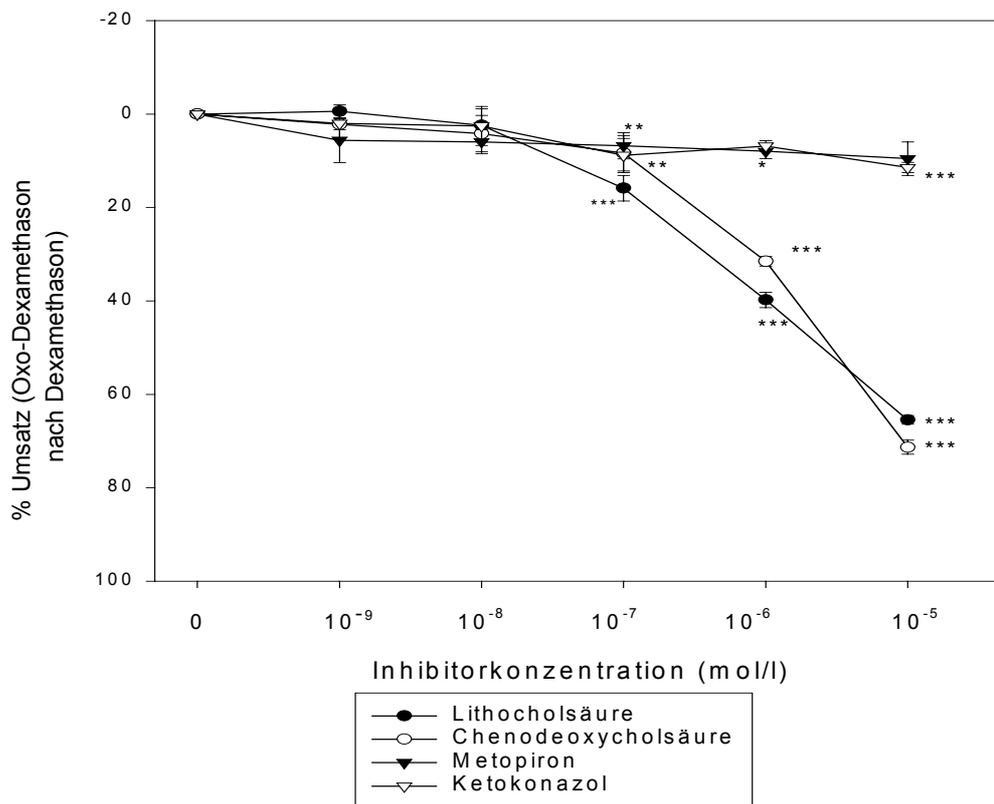


Abb. 4-13: Hemmung der Reduktionsreaktion der 11 β -HSD-1 in humanen Lebermikrosomen (0,03 mg/ml) durch Lithocholsäure, Chenodeoxycholsäure, Metopiron und Ketokonazol bei Verwendung von 1,6 μ mol/l Oxo-Dexamethason als Substrat. Mittelwerte \pm SD (n=3), *P< 0,05, **P< 0,01, ***P< 0,001 gegenüber Kontrollen ohne Inhibitor (0 % Hemmung).

Inhibitoren	IC50-Werte (mol/l)
Lithocholsäure	$2,4 \times 10^{-6}$
Chenodeoxycholsäure	$2,8 \times 10^{-6}$
Metopiron	$3,1 \times 10^{-3}$
Ketokonazol	$>10^{-5}$

Tabelle 4-8: IC50-Werte für die Gallensäuren Lithocholsäure, Chenodeoxycholsäure, Metopiron und Ketokonazol für die Reduktionsreaktion der 11 β -HSD-1 in humanen Lebermikrosomen .

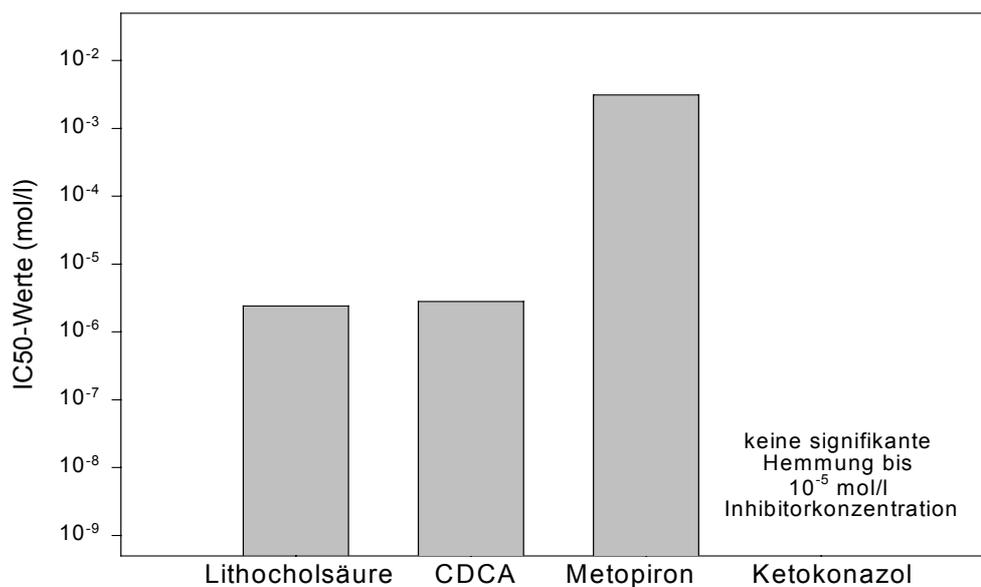


Abb. 4-14: IC50-Werte für Lithocholsäure, Chenodeoxycholsäure (CDCA), Metopiron und Ketokonazol für die Reduktionsreaktion von Oxo-Dexamethason durch 11 β -HSD-1 in humanen Lebermikrosomen.

4.3. Oxidationsreaktion der 11 β -HSD-2 (humane Nierenmikrosomen)

4.3.1. Inhibitionsversuche mit Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon

Als erste Inhibitor-kandidaten wurden wieder Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon untersucht, um eine gewisse Vergleichbarkeit mit anderen Arbeitsgruppen zu erzielen. Es zeigte sich bei den in Tabelle 3-6 angegebenen Versuchsbedingungen, daß Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon auch starke Hemmer der 11 β -HSD-2-katalysierten Oxidationsreaktion sind.

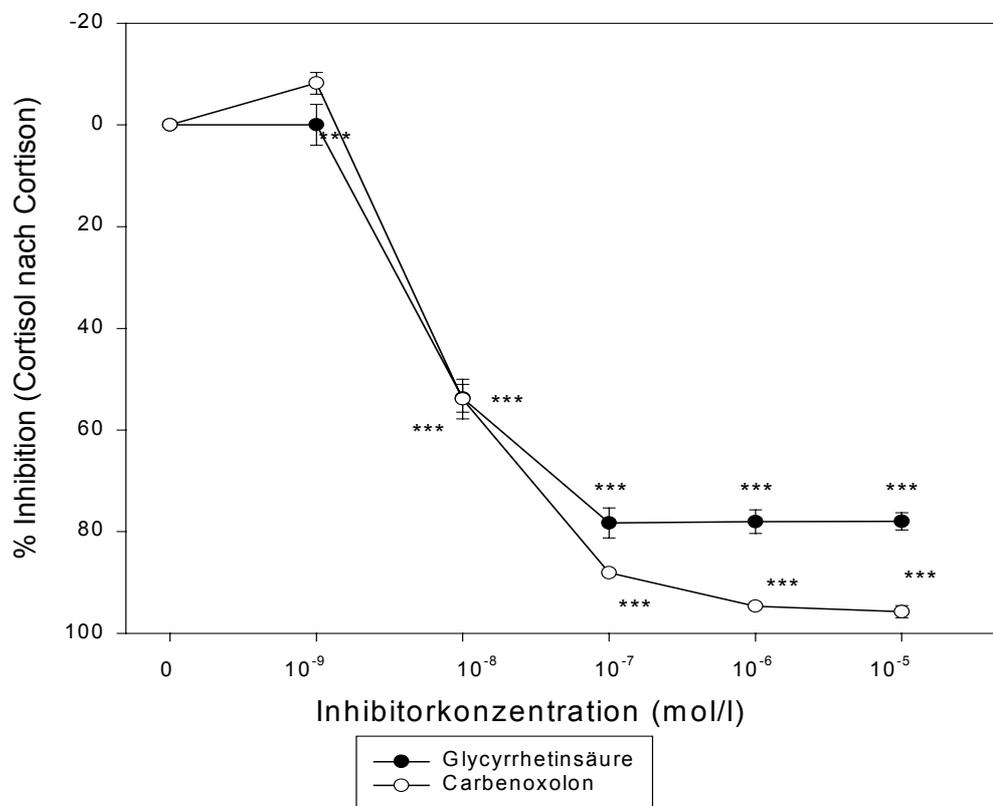


Abb. 4-15: Hemmung der Oxidationsreaktion der 11 β -HSD-2 in humanen Nierenmikrosomen (0,03 mg/ml) durch Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon bei Verwendung von 25 nmol/l Cortisol als Substrat. Mittelwerte \pm SD (n=3), *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 gegenüber Kontrollen ohne Inhibitor (0 % Hemmung).

Inhibitoren	IC50-Werte (mol/l)
Glycyrrhetinsäure	$8,0 \times 10^{-9}$
Carbenoxolon	$8,4 \times 10^{-9}$

Tabelle 4-9: IC50-Werte von Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon für die Oxidationsreaktion der 11 β -HSD-2 in humanen Nierenmikrosomen.

4.3.2. Inhibitionsversuche mit Progesteron und 11-OH-Progesteron-Derivaten

Bei den Hemmexperimenten der 11 β -HSD-2-Oxidationsreaktion durch Progesteron und seine 11-OH-Metabolite fiel auf, daß die 11-OH-Progesteron-Derivate beide stärker hemmten als die Standardsubstanzen Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon. Besonders die 11 α -OH-Form wirkte bereits bei 10^{-9} mol/l, der niedrigsten von uns getesteten Konzentration, sehr stark inhibitorisch. Allerdings erreichte sie nur eine maximale Hemmung von 79,4 %. 11 β -OH-Progesteron lag mit seiner Hemmwirkung im Bereich von Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon (IC50-Wert $6,8 \times 10^{-9}$ mol/l im Vergleich zu $8,0$ bzw. $8,4 \times 10^{-9}$ mol/l für Glycyrrhetinsäure bzw. Carbenoxolon), während Progesteron selbst schlechter hemmte und einen IC50-Wert von $4,8 \times 10^{-8}$ mol/l aufwies (siehe Tabelle 4-10). Die maximal erreichbare Hemmung lag bei 91,4 % für Progesteron und bei 86,5 % für 11 β -OH-Progesteron (siehe Abb. 4-16).

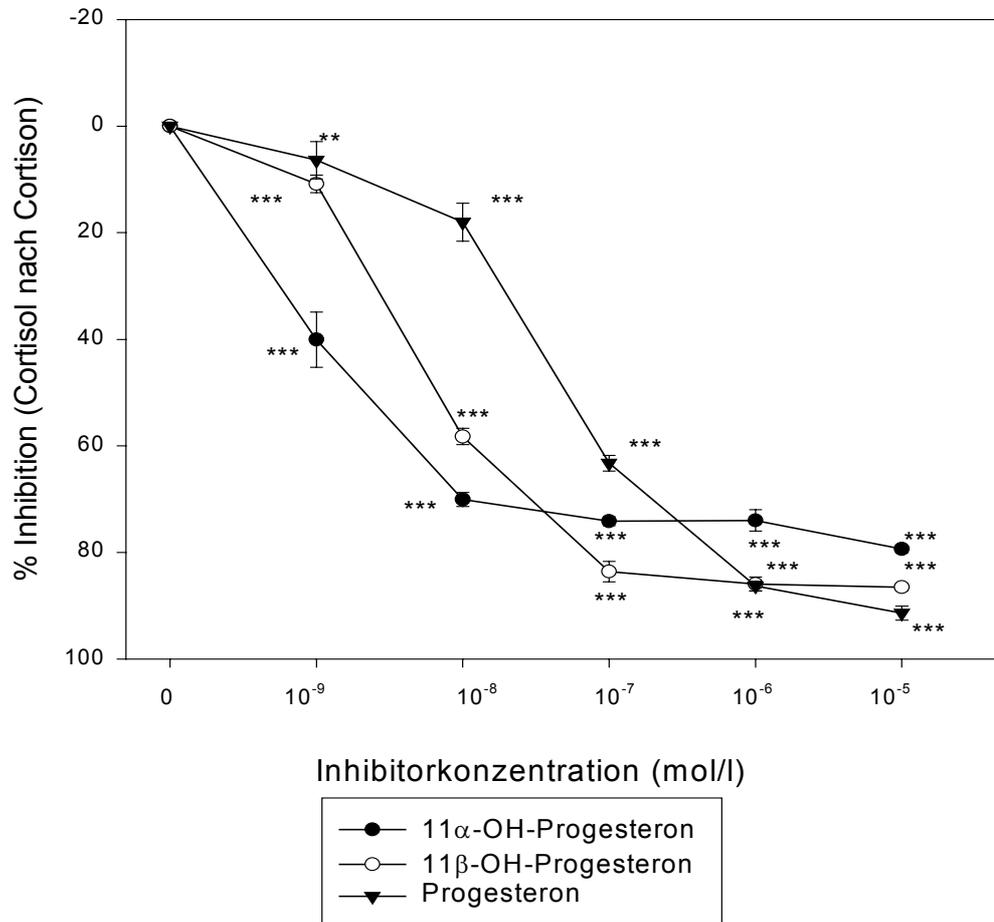


Abb. 4-16: Hemmung der Oxidationsreaktion der 11 β -HSD-2 in humanen Nierenmikrosomen (0,03 mg/ml) durch 11 α -OH-, 11 β -OH-Progesteron und Progesteron bei Verwendung von 25 nmol/l Cortisol als Substrat. Mittelwerte \pm SD (n=3), *P< 0,05, **P< 0,01, ***P< 0,001 gegenüber Kontrollen ohne Inhibitor (0 % Hemmung).

Inhibitoren	IC50-Werte (mol/l)
11 α -OH-Progesteron	$2,1 \times 10^{-9}$
11 β -OH-Progesteron	$6,8 \times 10^{-9}$
Progesteron	$4,8 \times 10^{-8}$

Tabelle 4-10: IC50-Werte von 11 α -, 11 β -OH-Progesteron und Progesteron für die Oxidationsreaktion der 11 β -HSD-2 in humanen Nierenmikrosomen.

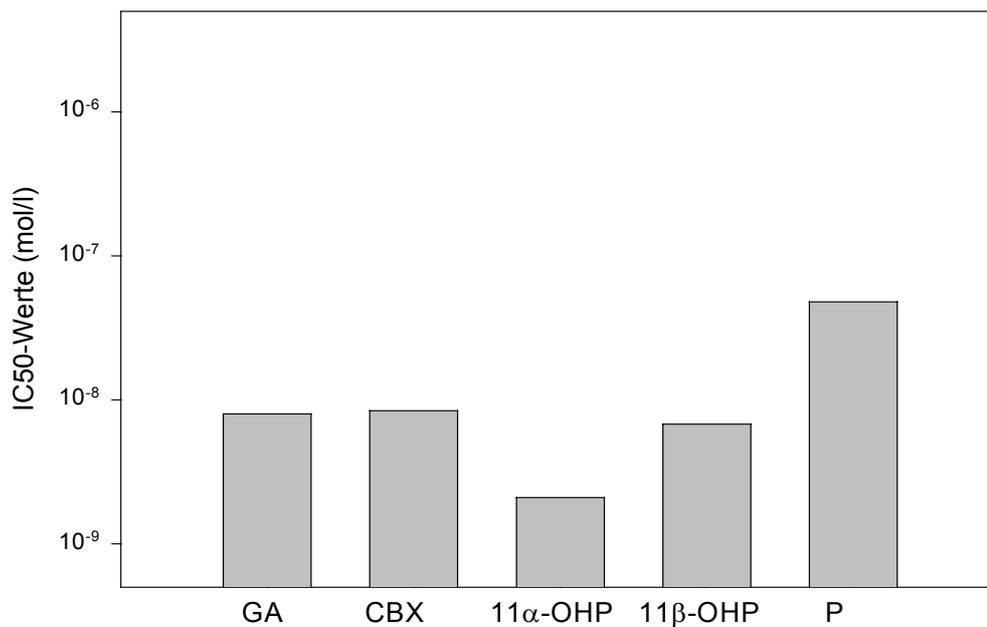


Abb. 4-17: Vergleich der IC50-Werte für Glycyrrhetinsäure (GA), Carbenoxolon (CBX), 11 α -OH-Progesteron (11 α -OHP), 11 β -OH-Progesteron (11 β -OHP) und Progesteron (P) für die Oxidationsreaktion der 11 β -HSD-2.

4.3.3. Inhibitionsversuche mit Progesteron und DOC-Metaboliten

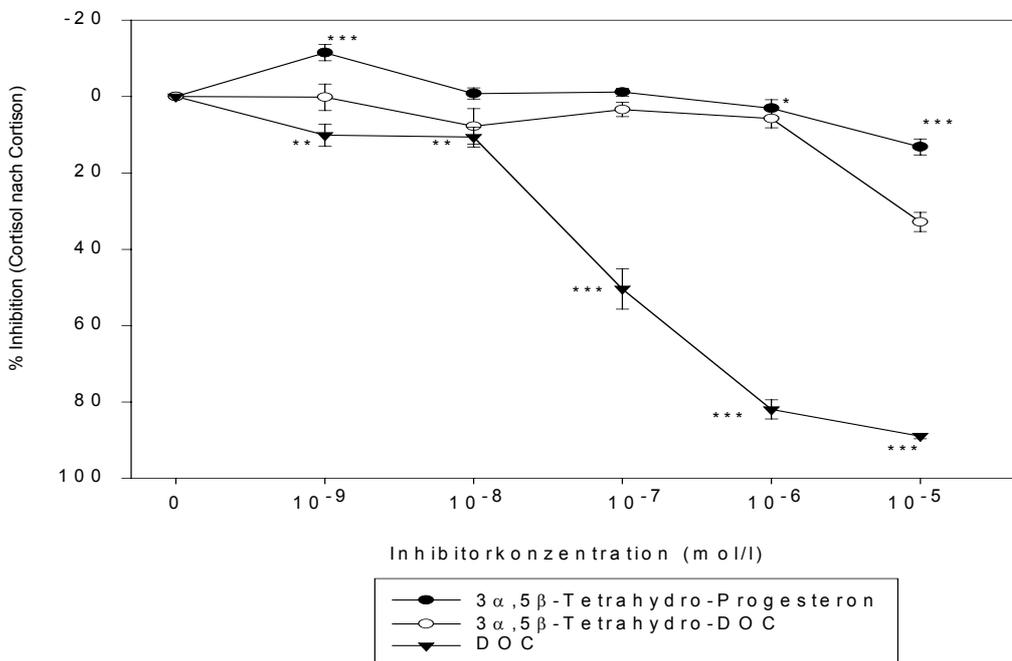
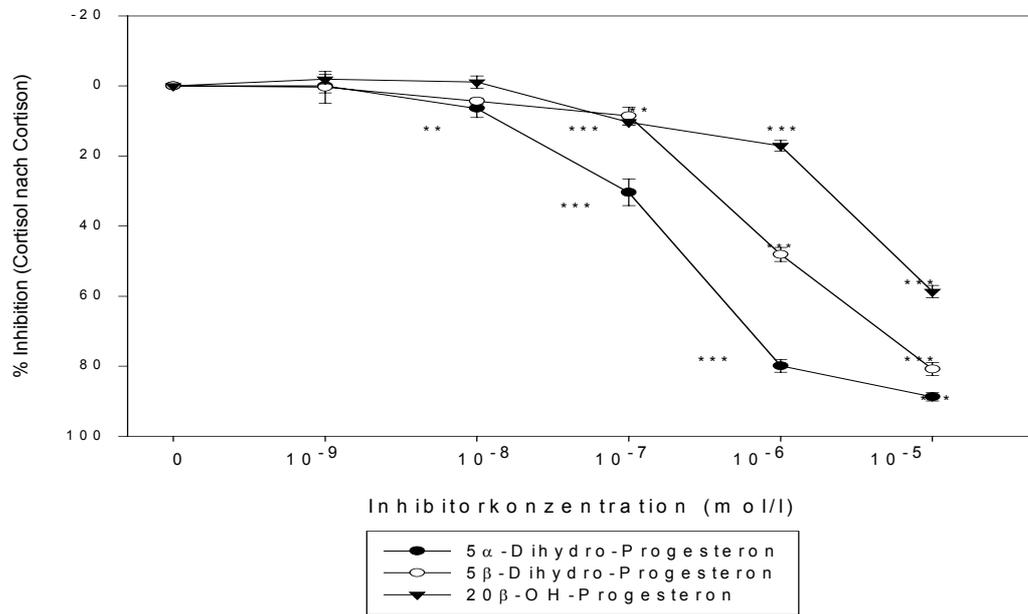


Abb. 4-18 (oben), 4-19 (unten): Hemmung der Oxidationsreaktion der 11 β -HSD-2 in humanen Nierenmikrosomen (0,03 mg/ml) durch Progesteron-Derivate bei Verwendung von 25 nmol/l Cortisol als Substrat. Mittelwerte \pm SD (n=3), *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 gegenüber Kontrollen ohne Inhibitor (0 % Hemmung).

Die weiteren untersuchten Progesteronmetabolite und DOC zeigten bei den 11 β -HSD-2-katalysierten Reaktionen eine größere Spannweite der Hemmwirkung. Wie Tabelle 4-11 zeigt, schwankten die IC₅₀-Werte von $9,9 \times 10^{-9}$ mol/l für DOC bis zu gar keiner Hemmung bei 3 α ,5 β -Tetrahydro-Progesteron. Auch bei 3 α ,5 β -Tetrahydro-DOC war die Hemmung zu gering, um einen IC₅₀-Wert bestimmen zu können. In Abb. 4-18 und 4-19 sind die Inhibitionskurven der einzelnen Kandidatensubstanzen abgebildet. Die Hemmwirkung nahm in folgender Reihenfolge ab: DOC, 5 α -Dihydroprogesteron, 5 β -Dihydroprogesteron, 20 β -OH-Progesteron, 3 α ,5 β -Tetrahydro-DOC und 3 α ,5 β -Tetrahydro-Progesteron (s. Abb. 4-20).

Inhibitoren	IC ₅₀ -Werte (mol/l)
5 α -Dihydro-Progesteron	$2,4 \times 10^{-7}$
5 β -Dihydro-Progesteron	$1,1 \times 10^{-6}$
20 β -OH-Progesteron	$5,8 \times 10^{-6}$
3 α ,5 β -Tetrahydro-Progesteron	keine Hemmung
Deoxycorticosteron (DOC)	$9,9 \times 10^{-8}$
3 α ,5 β -Tetrahydro-DOC	$> 10^{-5}$

Tabelle 4-11: IC₅₀-Werte von Progesteronmetaboliten für die Oxidationsreaktion der 11 β -HSD-2 in humanen Nierenmikrosomen.

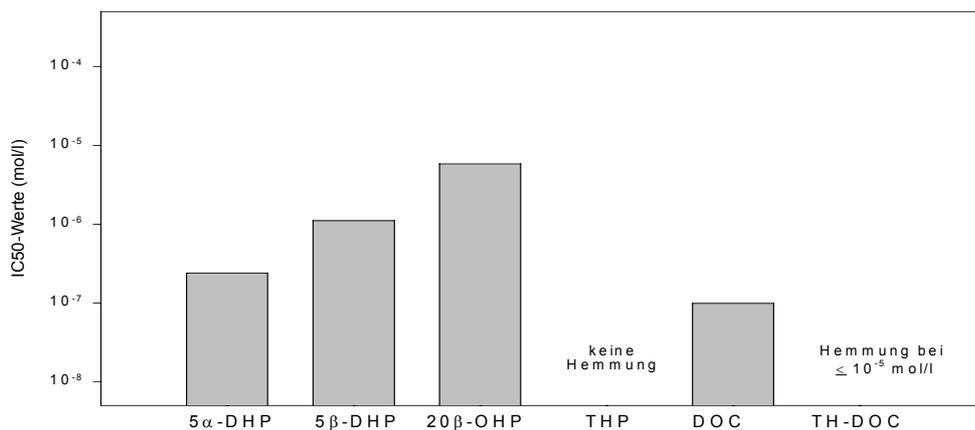


Abb. 4-20: Vergleich der IC₅₀-Werte von 5 α -Dihydro-Progesteron (5 α -DHP), 5 β -Dihydro-Progesteron (5 β -DHP), 20 β -OH-Progesteron (20 β -OHP), 3 α ,5 β -Tetrahydro-Progesteron (THP), Desoxycorticosteron (DOC) und 3 α ,5 β -Tetrahydro-Desoxycorticosteron (TH-DOC) für die Oxidationsreaktion der 11 β -HSD-2.

4.3.4. Inhibitionsversuche mit Gallensäuren, Metopiron und Ketokonazol

Auch für Lithocholsäure und Chenodeoxycholsäure sowie für Metopiron und Ketokonazol wurden Inhibitionsversuche mit humanen Nierenmikrosomen und Cortisol als Substrat durchgeführt. Die Hemmkurven (siehe Abb. 4-21) verdeutlichten, daß weder Metopiron noch die Gallensäuren bei den untersuchten Inhibitorkonzentrationen den Umsatz der Oxidation um 50 % hemmten. Lithocholsäure wies ab einer Inhibitorkonzentration von 10^{-6} mol/l eine Hemmung auf, die bei 10^{-5} mol/l 44,3 % betrug. Nur Ketokonazol erreichte in unserem Untersuchungsbereich bei $9,8 \times 10^{-6}$ mol/l bereits den IC₅₀-Wert (siehe Tabelle 4-12).

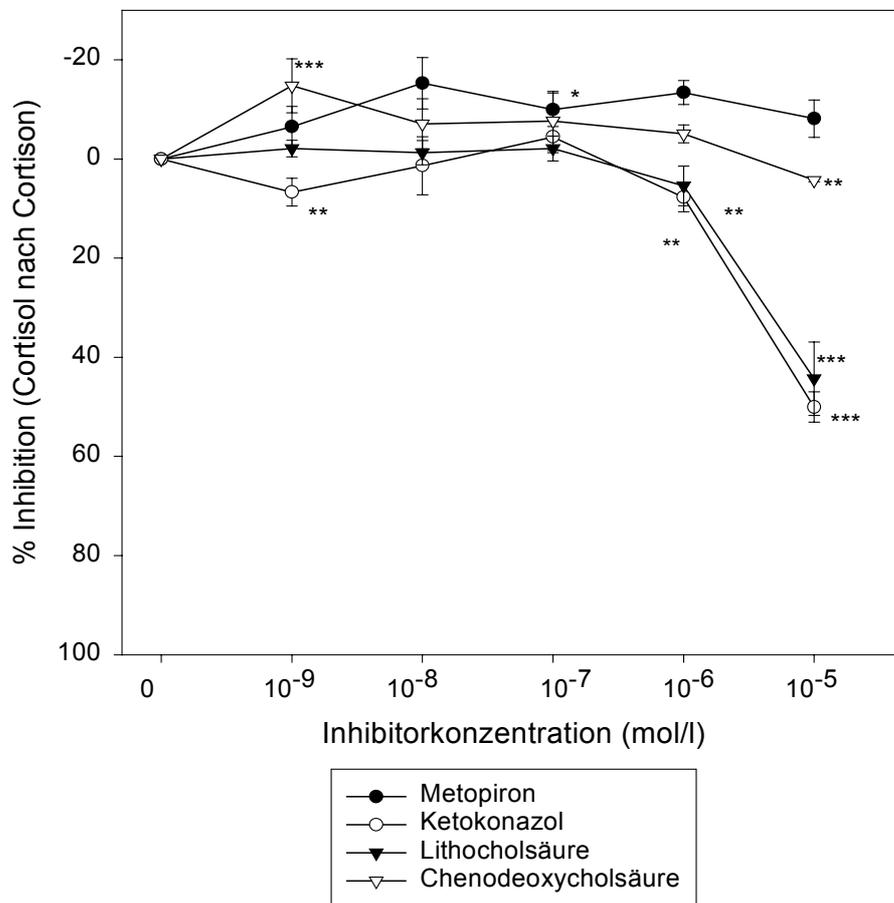


Abb. 4-21: Hemmung der Oxidationsreaktion der 11 β -HSD-2 in humanen Nierenmikrosomen (0,03 mg/ml) durch Gallensäuren (Lithocholsäure und Chenodeoxycholsäure), Metopiron und Ketokonazol bei Verwendung von 25 nmol/l Cortisol als Substrat. Mittelwerte \pm SD (n=3), *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 gegenüber Kontrollen ohne Inhibitor (0 % Hemmung).

Inhibitor	IC50-Werte (mol/l)
Lithocholsäure	$>10^{-5}$
Chenodeoxycholsäure	keine Hemmung
Metopiron	$>10^{-3}$
Ketokonazol	$9,8 \times 10^{-6}$

Tabelle 4-12: IC50-Werte für die Gallensäuren Lithocholsäure und Chenodeoxycholsäure und für Metopiron und Ketokonazol für die Oxidationsreaktion durch die 11 β -HSD-2 in humane Nierenmikrosomen.

4.4. Reduktionsreaktion der 11 β -HSD-2 (humane Nierenmikrosomen)

4.4.1. Inhibitionsversuche mit Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon

Eine Hemmung durch Carbenoxolon trat bereits bei 10^{-9} mol/l auf, während die Hemmkurve der Glycyrrhetinsäure zwar im wesentlichen parallel zu der von Carbenoxolon verlief, aber etwas in den Bereich höherer Inhibitorkonzentrationen verschoben war (siehe Abb. 4-22). Entsprechend besitzt Carbenoxolon einen niedrigeren IC₅₀-Wert und eine Sättigung der Inhibitorwirkung, die bereits bei 10^{-8} mol/l auftritt (siehe Tab. 4-13). Die maximale Hemmung liegt bei 84,8 % bei Carbenoxolon bzw. 90,9 % bei Glycyrrhetinsäure.

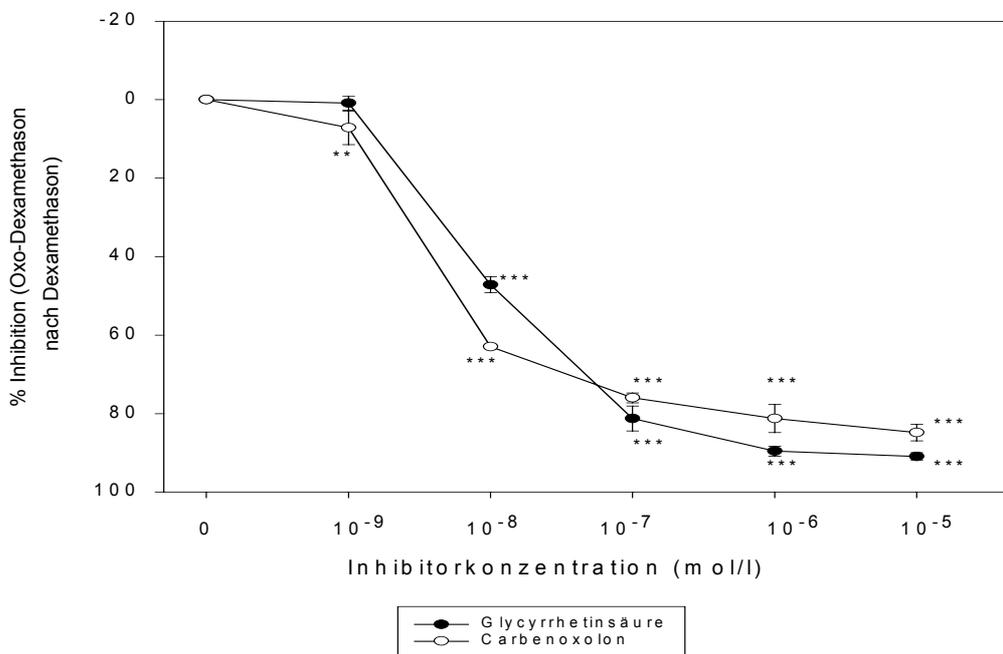


Abb. 4-22: Hemmung der Reduktionsreaktion der 11 β -HSD-2 in humanen Nierenmikrosomen (7,5 μ g/ml) durch Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon bei Verwendung von 65 nmol/l Oxo-Dexamethason als Substrat. Mittelwerte \pm SD (n=3), *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 gegenüber Kontrollen ohne Inhibitor (0% Hemmung).

Inhibitor	IC ₅₀ -Werte (mol/l)
Glycyrrhetinsäure	$1,2 \times 10^{-8}$
Carbenoxolon	$5,9 \times 10^{-9}$

Tabelle 4-13: IC₅₀-Werte für die 11 β -HSD-2-Reduktion mit 7,5 μ g/ml humanen Nierenmikrosomen und 65 nmol/l Oxo-Dexamethason als Substrat.

4.4.2. Inhibitorversuche mit Progesteron und 11-OH-Progesteron-Derivaten

Bei der Hemmung der 11β -HSD-2-katalysierten Reduktion von Oxo-Dexamethason zu Dexamethason in humanen Nierenmikrosomen durch Progesteron und seine 11-OH-Metabolite ergaben sich die in Abb. 4-23 dargestellten Kurven. Alle drei getesteten Substanzen zeigten bereits bei Konzentrationen von 10^{-9} mol/l eine Hemmung der Reduktion, die bis 10^{-7} mol/l steil anstieg und anschließend in eine Sättigungsfunktion überging. Die bei unseren Versuchsbedingungen maximal erreichte Hemmung lag bei 89,6 % für 11α -OH-Progesteron bzw. bei 87,9 und 85,5 % für 11β -OH-Progesteron und Progesteron. Die IC_{50} -Werte von 11α - und 11β -OH-Progesteron lagen eng nebeneinander und in derselben Größenordnung wie der IC_{50} -Wert von Glycyrrhetinsäure (siehe Tabelle 4-14).

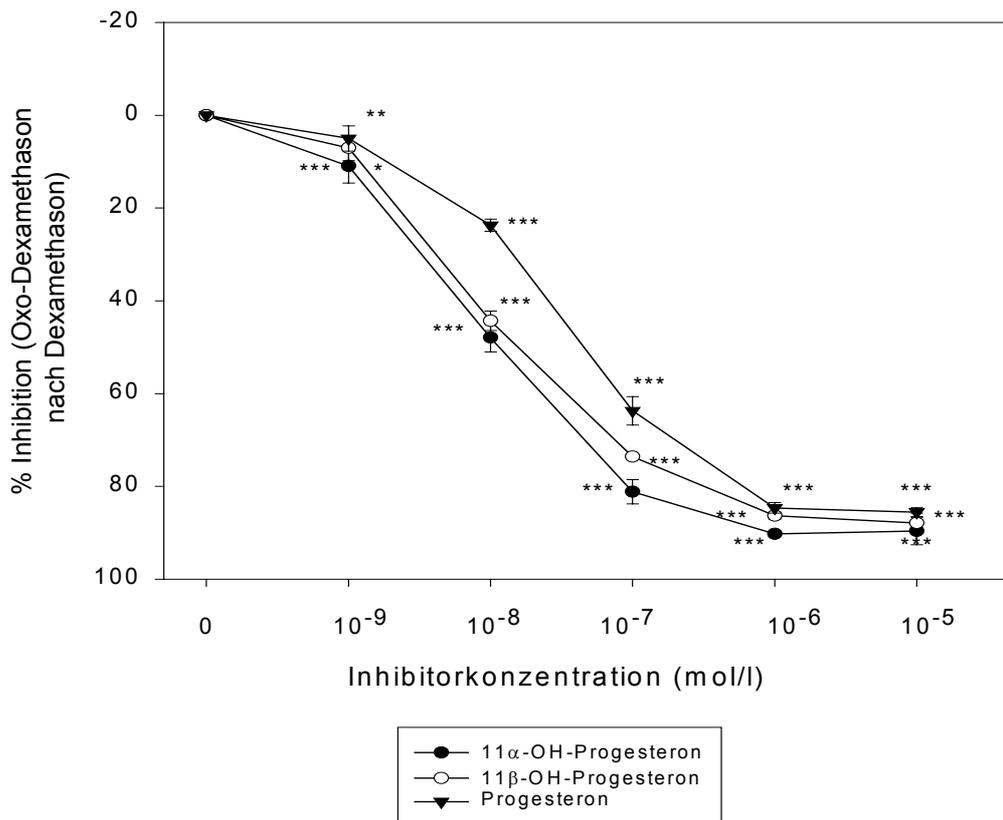


Abb. 4-23: Hemmung der Reduktionsreaktion der 11β -HSD-2 in humanen Nierenmikrosomen (7,5 μ g/ml) durch 11α -OH-, 11β -OH-Progesteron und Progesteron bei Verwendung von 65 nmol/l Oxo-Dexamethason als Substrat. Mittelwerte \pm SD (n=3), * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 gegenüber Kontrollen ohne Inhibitor (0 % Hemmung).

Inhibitoren	IC50-Werte (mol/l)
11 α -OH-Progesteron	1,1 x 10 ⁻⁸
11 β -OH-Progesteron	1,5 x 10 ⁻⁸
Progesteron	4,6 x 10 ⁻⁸

Tabelle 4-14: IC50-Werte von 11 α -OH- und 11 β -OH-Progesteron und Progesteron für die 11 β -HSD-2-Reduktionsreaktion mit 7,5 μ g/ml humanen Nierenmikrosomen und 65 nmol/l Oxo-Dexamethason als Substrat.

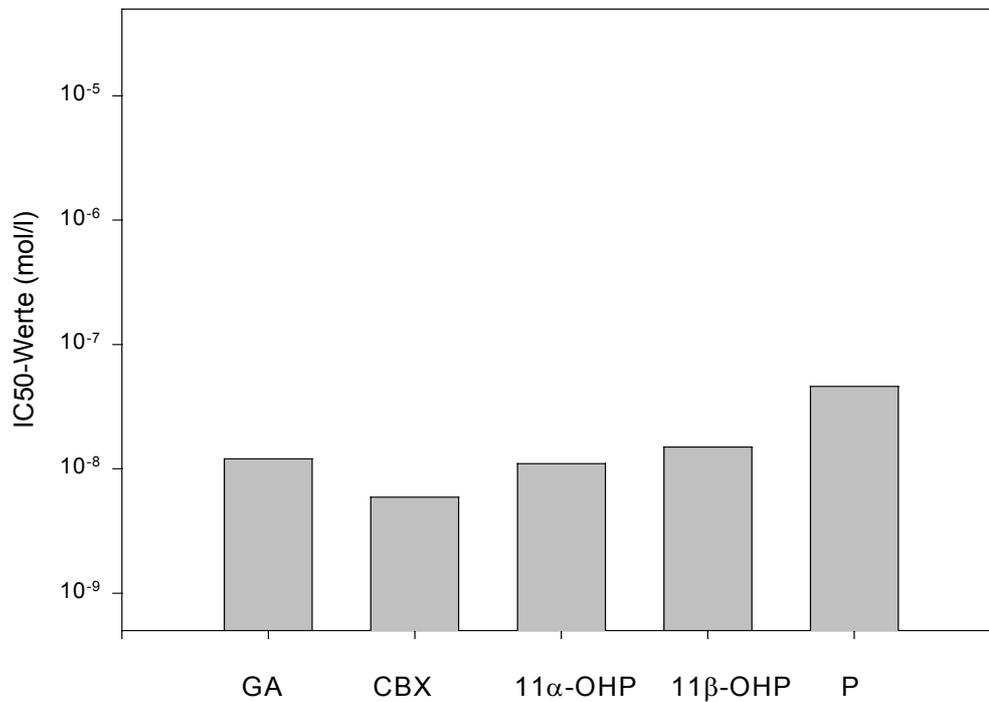


Abb. 4-24: Vergleich der IC50-Werte für Glycyrrhetinsäure (GA), Carbenoxolon (CBX), 11 α -OH-Progesteron (11 α -OHP), 11 β -OH-Progesteron (11 β -OHP) und Progesteron (P) für die Reduktionsreaktion der 11 β -HSD-2.

4.4.3. Inhibitionsversuche mit Progesteron und DOC-Metaboliten

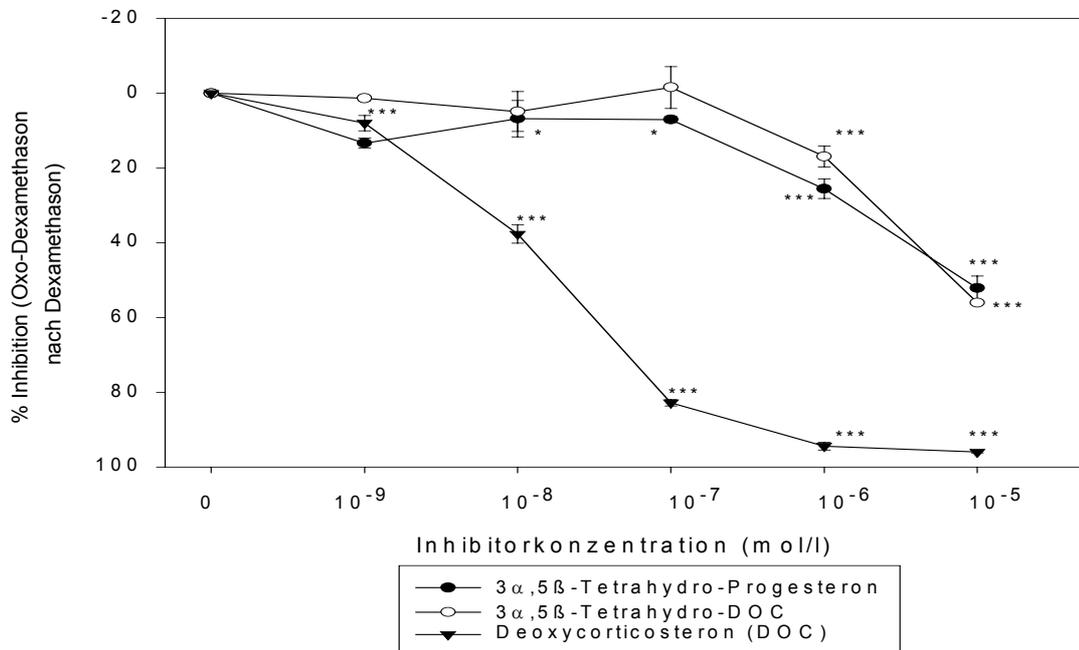
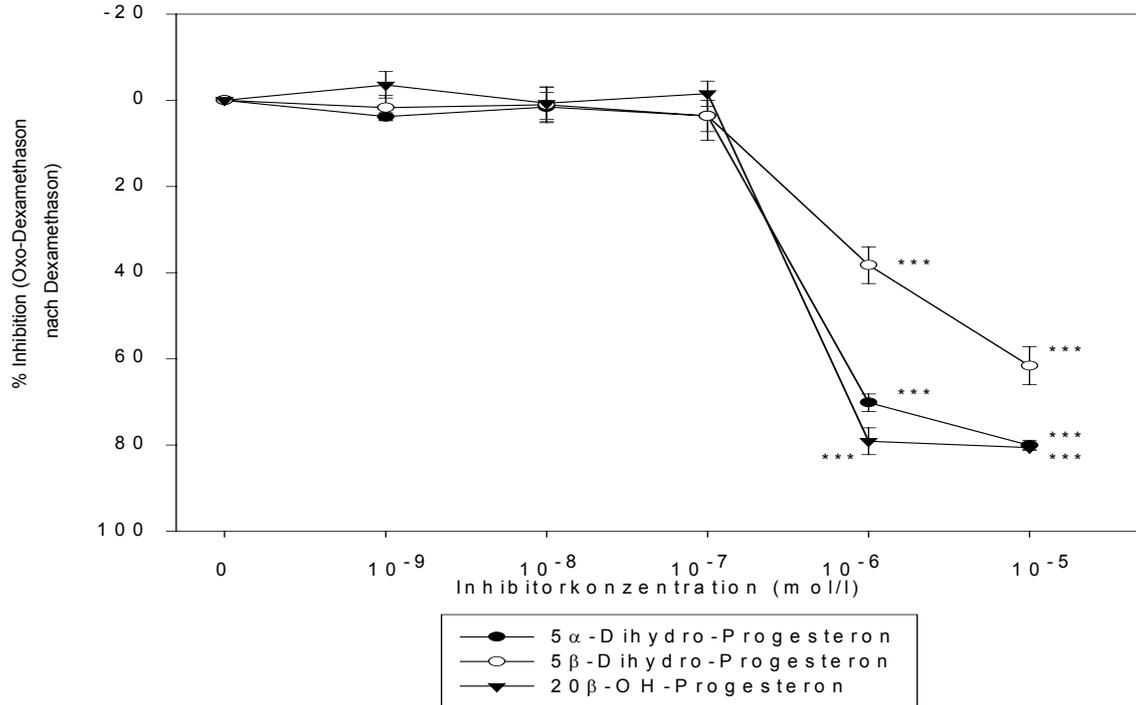


Abb. 4-25 (oben) und 4-26 (unten): Hemmung der Reduktionsreaktion der 11 β -HSD-2 in humanen Nierenmikrosomen (7,5 μ g/ml) bei Verwendung von 65 nmol/l Oxo-Dexamethason als Substrat. Mittelwerte \pm SD (n=3), *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 gegenüber Kontrollen ohne Inhibitor (0 % Hemmung).

Die 11 β -HSD-2-katalysierte Reduktion von Oxo-Dexamethason in humanen Nierenmikrosomen konnte durch 5 α - und 5 β -Dihydro-Progesteron, aber auch durch 20 β -OH-Progesteron bei Inhibitorkonzentrationen, die über 10⁻⁷ mol/l lagen, deutlich gehemmt werden (siehe Abb. 4-25). Die IC₅₀-Werte nahmen dabei von 20 β -OH-Progesteron über 5 α - zu 5 β -Dihydro-Progesteron zu (siehe Tabelle 4-15). Im Vergleich zu den 11-OH-Progesteronmetaboliten lagen die IC₅₀-Werte höher. Auch die 3 α ,5 β -Tetrahydro-Derivate von Progesteron und Deoxycorticosteron zeigten eine Hemmung der Reduktion bei Konzentrationen über 10⁻⁷ mol/l, allerdings lagen die IC₅₀-Werte wieder etwas höher als die von 20 β -OH-Progesteron und den 5-Dihydro-Progesteronen (8,0 x 10⁻⁶ mol/l für 3 α ,5 β -Tetrahydro-Progesteron und 7,1 x 10⁻⁶ mol/l für 3 α ,5 β -Tetrahydro-DOC). Deoxycorticosteron dagegen inhibierte auch bei niedrigeren Konzentration bereits deutlich und besaß einen IC₅₀-Wert von 1,9 x 10⁻⁸ mol/l, was im Bereich von Glycyrrhetinsäure (1,2 x 10⁻⁸ mol/l) und den 11-OH-Progesteronen liegt.

Inhibitor	IC 50-Werte (mol/l)
5 α -Dihydro-Progesteron	4,5 x 10 ⁻⁷
5 β -Dihydro-Progesteron	3,0 x 10 ⁻⁶
20 β -OH-Progesteron	4,2 x 10 ⁻⁷
3 α ,5 β -Tetrahydro-Progesteron	8,0 x 10 ⁻⁶
Deoxycorticosteron (DOC)	1,9 x 10 ⁻⁸
3 α -5 β -Tetrahydro-DOC	7,1 x 10 ⁻⁶

Tabelle 4-15: IC₅₀-Werte verschiedener Inhibitoren für die Reduktionsreaktion der 11 β -HSD-2 in humanen Nierenmikrosomen.

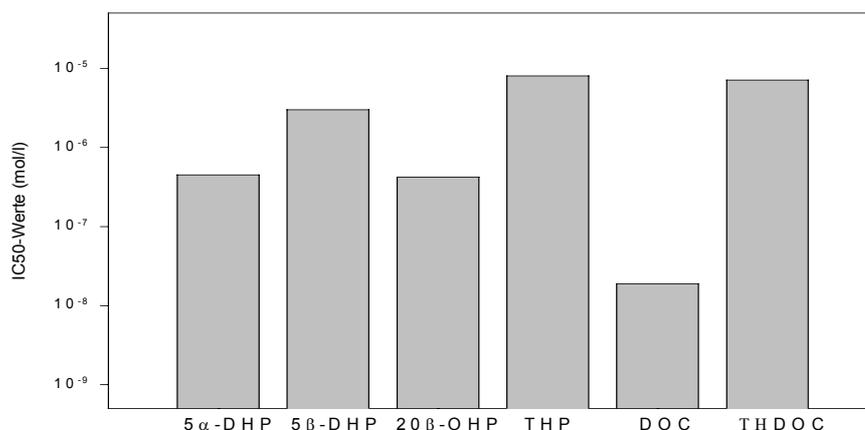


Abb. 4-27: Vergleich der IC₅₀-Werte der verschiedenen Progesteron-Derivate: 5α-Dihydro-Progesteron (5α-DHP), 5β-Dihydro-Progesteron (5β-DHP), 20β-OH-Progesteron (20β-OHP), 3α,5β-Tetrahydro-Progesteron (THP), Deoxycorticosteron (DOC) und 3α,5β-Tetrahydro-Desoxycorticosteron (TH-DOC) für die Reduktionsreaktion der 11β-HSD-2.

4.4.4. Inhibitionsversuche mit Gallensäuren, Metopiron und Ketokonazol

Bei Zugabe von bis zu 10⁻⁵ mol/l Lithocholsäure, Chenodeoxycholsäure und Metopiron zu den Inkubationsansätzen ergaben sich nur sehr geringe Hemmwirkungen (12,8 % für Lithocholsäure, 10,7 % für Chenodeoxycholsäure und 8,5 % für Metopiron). Lediglich Ketokonazol hemmte bei Konzentrationen über 10⁻⁷ mol/l die Konversion von Oxo-Dexamethason verstärkt (siehe Abb. 4-28), wobei der IC₅₀-Wert bei 2,1 × 10⁻⁶ mol/l lag. Für Metopiron wurden zusätzlich Konzentrationen bis 10⁻³ mol/l untersucht, bei denen es zu einer signifikanten Hemmung der Reduktionsreaktion der 11β-HSD-2 kam (IC₅₀-Wert siehe Tabelle 4-16).

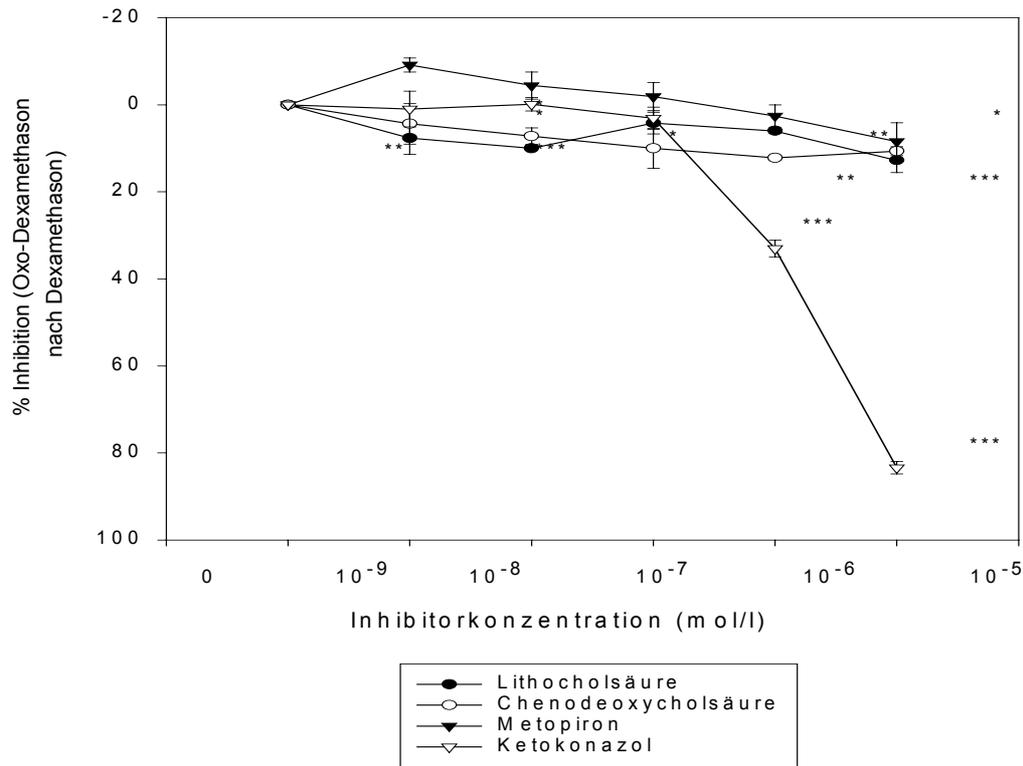


Abb. 4-28: Hemmung der Reduktionsreaktion der 11 β -HSD-2 in humanen Nierenmikrosomen (7,5 μ g/ml) bei Verwendung von 65 nmol/l Oxo-Dexamethason als Substrat. Mittelwerte \pm SD (n=3), *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 gegenüber Kontrollen ohne Inhibitor (0 % Hemmung).

Inhibitoren	IC50-Werte (mol/l)
Lithocholsäure	$>10^{-5}$
Chenodeoxycholsäure	keine Hemmung
Metopiron	$6,1 \times 10^{-3}$
Ketokonazol	$2,1 \times 10^{-6}$

Tabelle 4-16: IC50-Werte von Lithocholsäure, Chenodeoxycholsäure, Metopiron, und Ketokonazol für die Reduktionsreaktion der 11 β -HSD-2 in humanen Nierenmikrosomen.

4.5. Zusammenfassung der Ergebnisse der Inhibitionsversuche der 11 β -HSD-1- und -2-Oxidations- und -Reduktionsreaktion

Inhibitoren \ IC50-Werte (mol/l)	11 β -HSD-1 Oxidation	11 β -HSD-1 Reduktion	11 β -HSD-2 Oxidation	11 β -HSD-2 Reduktion
Glycyrrhetinsäure	$4,0 \times 10^{-8}$	$3,1 \times 10^{-8}$	$8,0 \times 10^{-9}$	$1,2 \times 10^{-8}$
Carbenoxolon	$6,0 \times 10^{-8}$	$3,0 \times 10^{-8}$	$8,4 \times 10^{-9}$	$5,9 \times 10^{-9}$
11 α -OH-Progesteron	$2,8 \times 10^{-7}$	$5,1 \times 10^{-7}$	$2,1 \times 10^{-9}$	$1,1 \times 10^{-8}$
11 β -OH-Progesteron	$4,4 \times 10^{-7}$	$1,3 \times 10^{-6}$	$6,8 \times 10^{-9}$	$1,5 \times 10^{-8}$
Progesteron	$1,7 \times 10^{-6}$	$8,4 \times 10^{-6}$	$4,8 \times 10^{-8}$	$4,6 \times 10^{-8}$
5 α -Dihydro-Progesteron	$3,8 \times 10^{-6}$	$6,5 \times 10^{-6}$	$2,4 \times 10^{-7}$	$4,5 \times 10^{-7}$
5 β -Dihydro-Progesteron	$1,6 \times 10^{-6}$	$3,4 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-6}$	$3,0 \times 10^{-6}$
20 β -OH-Progesteron	$1,9 \times 10^{-6}$	$6,1 \times 10^{-6}$	$5,8 \times 10^{-6}$	$4,2 \times 10^{-7}$
3 α ,5 β -Tetrahydro-Progesteron	$2,6 \times 10^{-6}$	$4,4 \times 10^{-6}$	keine Hemmung	$8,0 \times 10^{-6}$
Deoxycorticosteron (DOC)	$4,4 \times 10^{-6}$	$4,0 \times 10^{-6}$	$9,9 \times 10^{-8}$	$1,9 \times 10^{-8}$
3 α ,5 β -Tetrahydro-DOC	$2,8 \times 10^{-6}$	$2,2 \times 10^{-6}$	$>10^{-5}$	$7,1 \times 10^{-6}$
Lithocholsäure	$2,7 \times 10^{-6}$	$2,4 \times 10^{-6}$	$>10^{-5}$	$>10^{-5}$
Chenodeoxycholsäure	$4,4 \times 10^{-6}$	$2,8 \times 10^{-6}$	keine Hemmung	keine Hemmung
Metopiron	keine Hemmung	$3,1 \times 10^{-3}$	$> 10^{-3}$	$6,1 \times 10^{-3}$
Ketokonazol	keine Hemmung	$> 10^{-5}$	$9,8 \times 10^{-6}$	$2,1 \times 10^{-6}$

Tabelle 4-17: Liste der IC50-Werte der untersuchten Inhibitoren. Die 11 β -HSD-1 wurde aus humanen Lebermikrosomen gewonnen (0,15 mg/ml für Oxidation, 0,03 mg/ml für Reduktion), die 11 β -HSD-2 aus humanen Nierenmikrosomen (0,03 mg/ml für Oxidation, 7,5 μ g/ml für Reduktion). Substrate waren Cortisol für die Oxidation (0,98 μ mol/l bei der 11 β -HSD-1, 25 nmol/l bei der 11 β -HSD-2) und Oxo-Dexamethason für die Reduktion (1,6 μ mol/l bei der 11 β -HSD-1 und 65 nmol/l bei der 11 β -HSD-2).

Als selektive 11 β -HSD-1-Inhibitoren waren die getesteten Progesteron-Derivate ungeeignet, denn sie hemmten sowohl die 11 β -HSD-1- als auch die 11 β -HSD-2-katalysierten Reaktionen. Einzige Ausnahmen waren 3 α ,5 β -Tetrahydro-Progesteron und 3 α ,5 β -Tetrahydro-DOC, die auf die 11 β -HSD-2-Oxidationsreaktion keinen bzw. nur einen minimal hemmenden Effekt ausübten. In der Regel lagen die IC₅₀-Werte der Inhibitoren für Reduktions- und Oxidationsreaktionen in derselben Größenordnung.

Für die Hemmung der 11 β -HSD-1-katalysierten Reaktionen waren im Vergleich zu den 11 β -HSD-2-katalysierten niedrigere Konzentrationen Lithocholsäure ausreichend. Für die Reaktionen der 11 β -HSD-2 lagen die IC₅₀-Werte bereits außerhalb der von uns untersuchten Konzentrationen von 10⁻⁹ bis 10⁻⁵ mol/l, so daß es sich bei der Lithocholsäure um einen relativ selektiven 11 β -HSD-1-Inhibitor handelte (siehe Abb. 4-29). Einen selektiven 11 β -HSD-1-Inhibitor fanden wir in der Chenodeoxycholsäure, die die 11 β -HSD-1 hemmt und in dem von uns untersuchten Bereich kaum Einfluß auf die Aktivität der 11 β -HSD-2 zeigte. Die Hemmwirkungen auf die Oxidations- und Reduktionreaktionen, die durch die 11 β -HSD-Isoenzyme vermittelt werden, sind nochmals in Abb. 4-30 zusammengefaßt.

Metopiron hemmte die Oxidationsreaktion der 11 β -HSD-1 und -2 jeweils schlechter als die Reduktionsreaktion (IC₅₀-Werte außerhalb des untersuchten Bereichs). Für die 11 β -HSD-1-Oxidationsreaktion war keine signifikante Hemmung erkennbar (siehe Abb. 4-31).

Ketokonazol hemmte die 11 β -HSD-1-Oxidationsreaktion ebenfalls nicht und hatte auch auf die 11 β -HSD-1-Reduktionreaktion nur einen geringen Effekt. Die 11 β -HSD-2 katalysierten Reaktionen wurde dagegen wesentlich besser gehemmt, so daß es sich beim Ketokonazol um einen relativ selektiven 11 β -HSD-2-Inhibitor handelt.

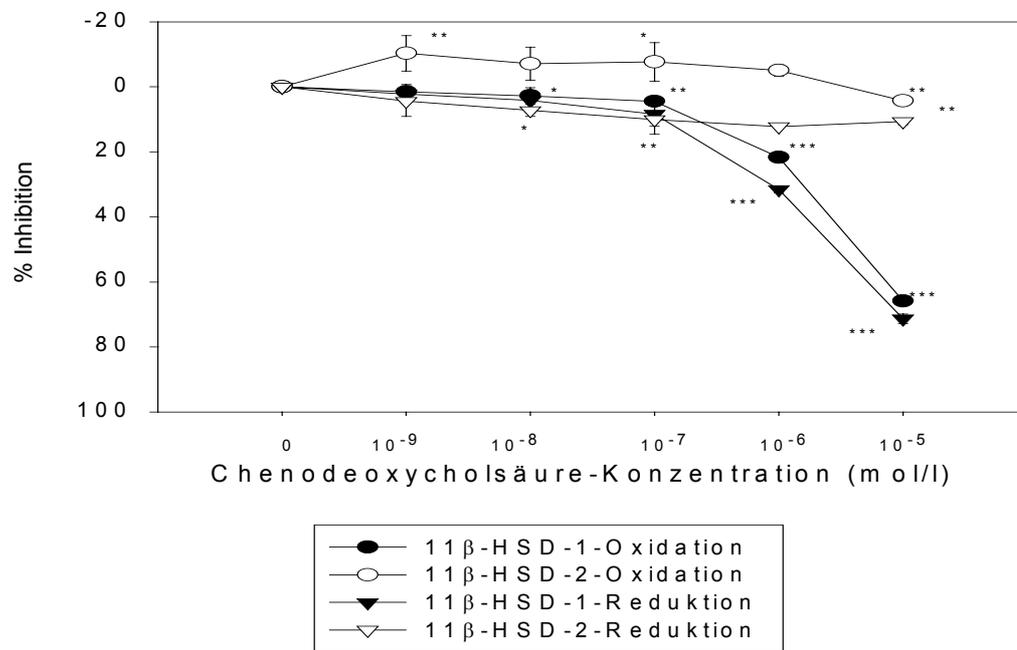
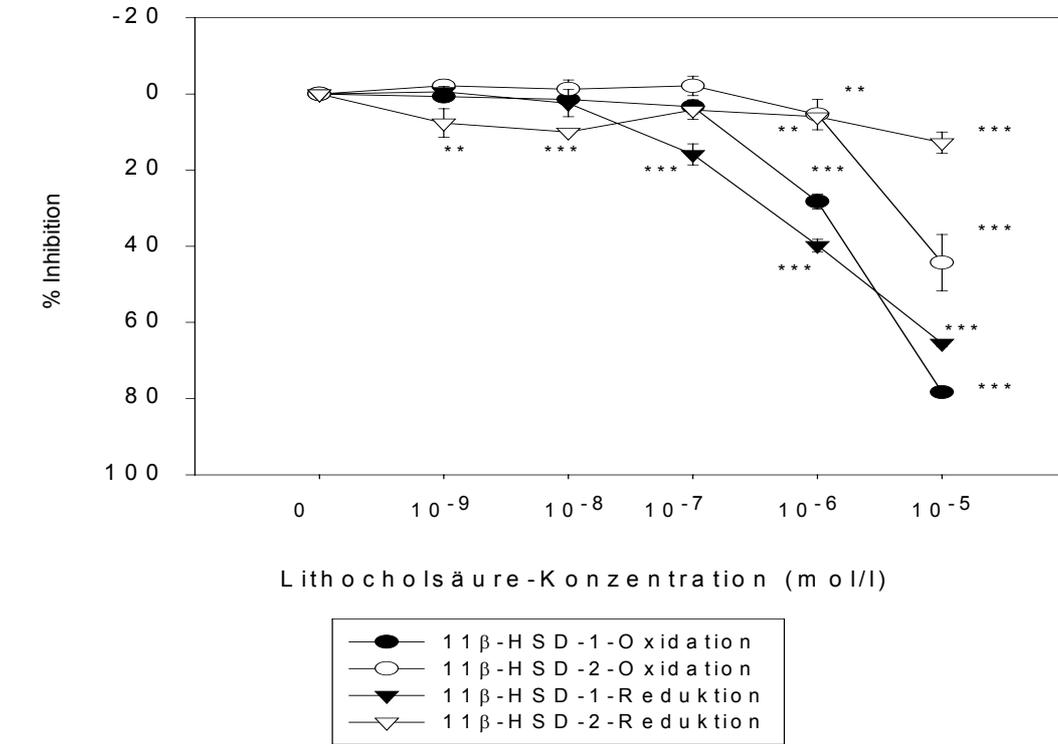


Abb. 4-29 (oben) und 4-30 (unten): Hemmung der 11β-HSD-1 bzw. -2-katalysierten Oxidation und Reduktion durch Lithocholsäure (Abb. 4-29) und Chenodeoxycholsäure (Abb. 4-30); *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

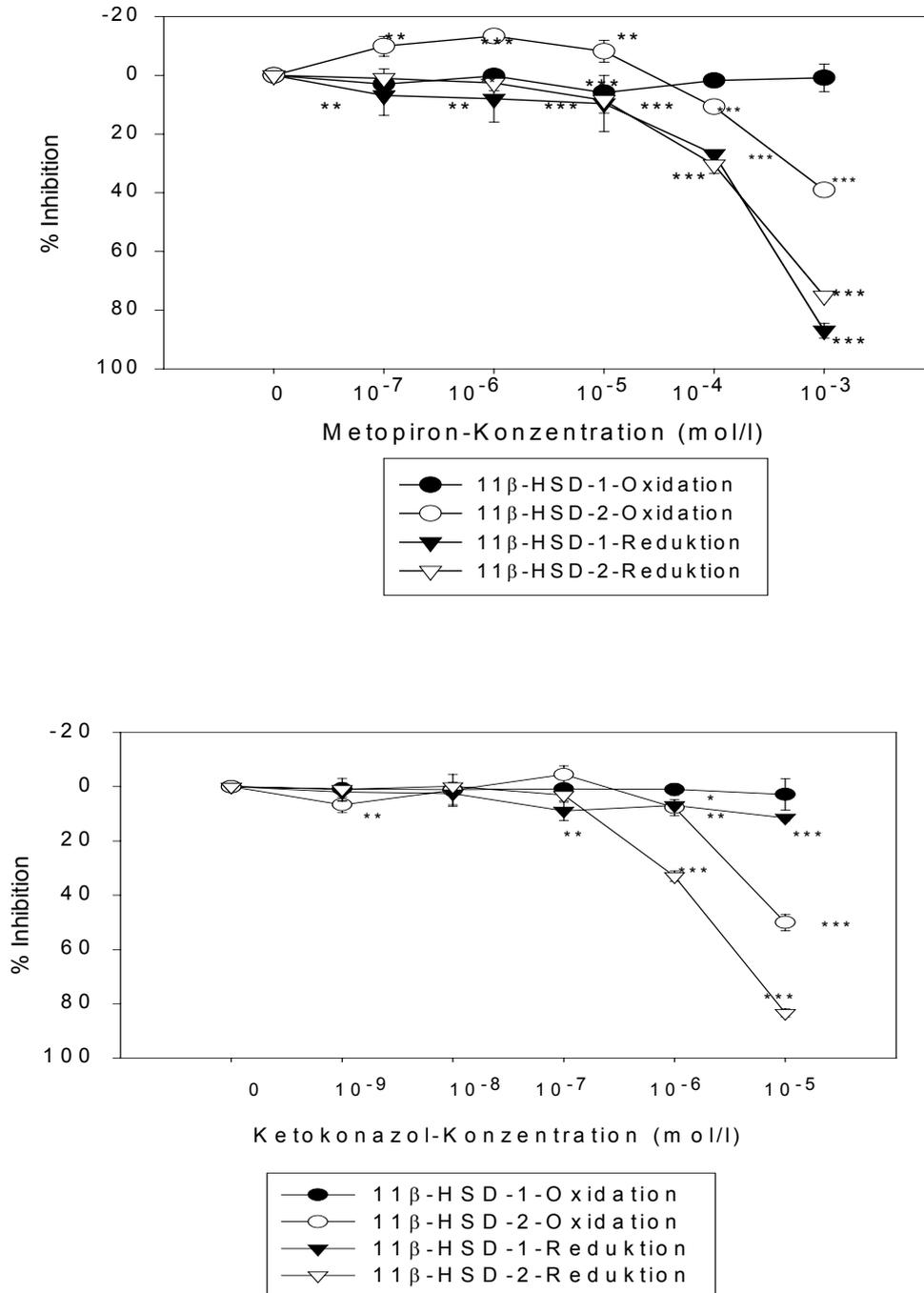


Abb. 4-31 (oben) und 4-32 (unten): Hemmung der 11β-HSD-1 bzw. -2-katalysierten Oxidation und Reduktion durch Metopiron (Abb. 4-31) und Ketokonazol (Abb. 4-32); *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.