

## 4. Ergebnisse

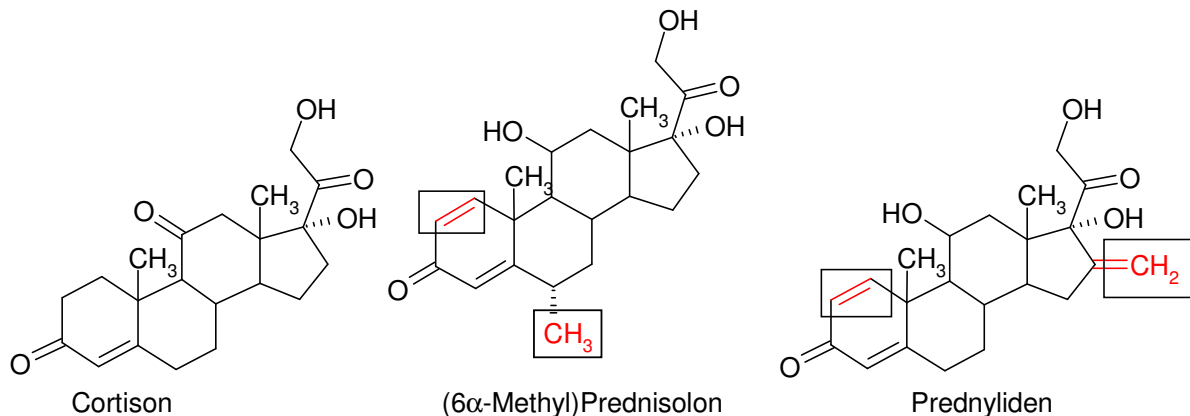
Zunächst wird auf die Ergebnisse der *in vitro* Versuche an stabil transfizierten CHO-Zellen eingegangen. Es folgen die an gesunden Probanden erhobenen *in vivo* Daten.

### 4.1. Umsatz von Steroiden in transfizierten CHO-Zellen

#### 4.1.1. 11-Reduktion durch die 11 $\beta$ -HSD1

Um den Bedingungen *in vivo* möglichst nahe zu kommen, wurde die Aktivität der 11 $\beta$ -HSD1 nur an intakten Zellen untersucht. Die mit der 11 $\beta$ -HSD1 transfizierten CHO-Zellen zeigten dabei auch unter Einsatz verschiedener Substratkonzentrationen keinerlei Oxidaseaktivität gegenüber Cortisol und Prednisolon nach 24-stündiger Inkubation.

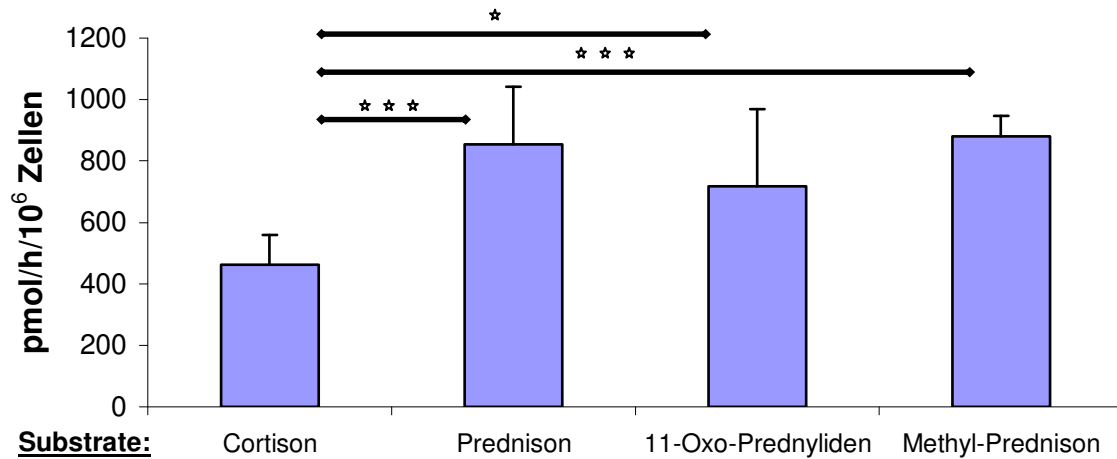
##### 4.1.1.1. Reduktion verschiedener nicht halogenerter Steroide durch die 11 $\beta$ -HSD1



**Abb.4.1.:** Strukturformeln von Cortison, (6 $\alpha$ -Methyl)-Prednisolon und Prednyliden, Unterschiede zur Cortison hervorgehoben.

Prednison ( $\Delta$ 1-Dehydro-Cortison) wird mit  $855 \pm 187$  pmol/ $10^6$ Zellen  $\times$  h<sup>-1</sup> signifikant stärker reduziert als Cortison ( $462 \pm 96$  pmol/ $10^6$ Zellen  $\times$  h<sup>-1</sup>) (Abbildung 4.2.).

Auch 11-Oxo-Prednyliden (16-Methylen-Prednison) und 6 $\alpha$ -Methylprednison (Abb.4.1.) erreichen mit  $717 \pm 251$  pmol/ $10^6$ Zellen  $\times$  h<sup>-1</sup> (11-Oxo-Prednyliden,  $p < 0,05$ ) und  $880 \pm 66$  pmol/ $10^6$ Zellen  $\times$  h<sup>-1</sup> (Methylprednison,  $p < 0,001$ ) einen im Vergleich zur Cortison signifikant stärkeren Umsatz.

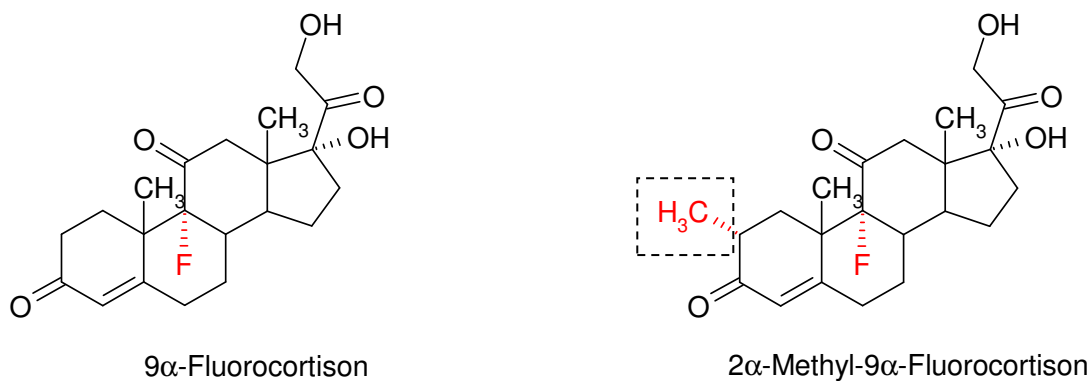


**Abb.4.2.:** Charakterisierung der 11 $\beta$ -HSD1-Reduktase-Aktivität gegenüber verschiedenen nicht halogenierten Steroiden. Mittelwerte +/- Standardabweichung (n=6) aus 2 Inkubationsversuchen,

(\* = p<0,05 ; \*\*\* = p<0,001), Inkubationszeit 24h, Substratkonzentration 10<sup>-5</sup> mol/l.

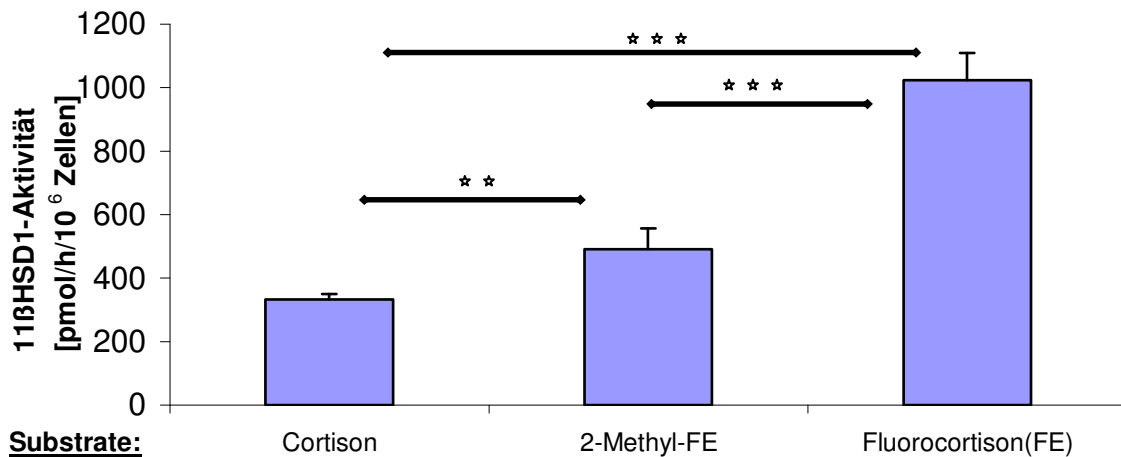
Bedingt durch hohe Standardabweichungen unterscheidet sich die Reduktaseaktivität der 11 $\beta$ -HSD1 gegenüber Prednison nicht signifikant von den Prednisolonderivaten 6 $\alpha$ -Methylprednison und Prednyliden. Im Trend wird Prednyliden (16-Methylenkonfiguration, Abb.4.1.) im Vergleich zu Prednison etwas geringer umgesetzt.

#### 4.1.1.2. Effekt einer 2 $\alpha$ -Methylgruppe auf die 11-Reduktion durch die 11 $\beta$ -HSD1



**Abb.4.3.:** Strukturformeln von 9 $\alpha$ -Fluorocortison und 2 $\alpha$ -Methyl-9 $\alpha$ -Fluorocortison.

Der Einbau einer 9 $\alpha$ -Fluorogruppe beschleunigt die Reduktion durch die 11 $\beta$ -HSD1 signifikant (Abb.4.4.). Fluorocortison erreicht mit 1023  $\pm$  86 pmol/10<sup>6</sup>Zellen x h<sup>-1</sup> die annähernd dreifache Vo-Geschwindigkeit von Cortison (332  $\pm$  18 pmol/10<sup>6</sup>Zellen x h<sup>-1</sup>, p<0,001).

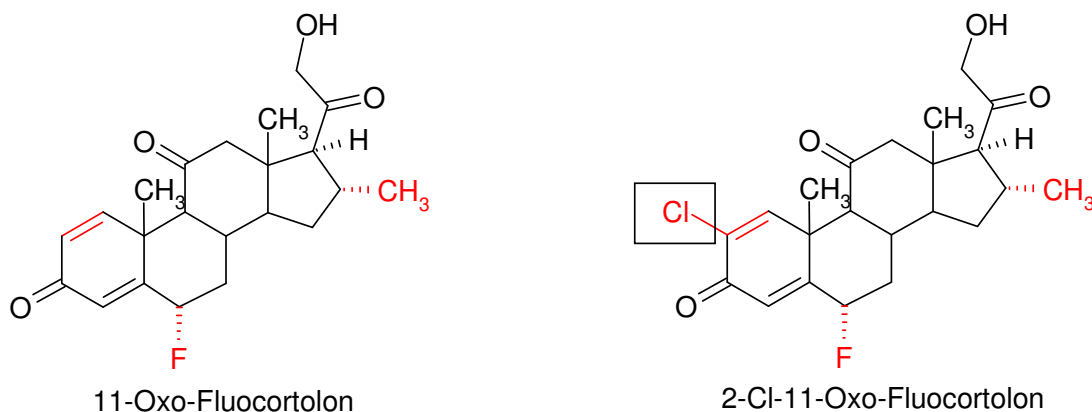


**Abb.4.4.:** 11β-HSD1-Reduktaseaktivität gegenüber Cortison, Fluorocortison (FE) und 2α-Methyl-FE Mittelwerte +/- Standardabweichung ( n=6) aus 2 Inkubationsversuchen.

( \* \* = p<0,01 ; \* \* \* = p<0,001 ) Inkubationszeit 24h, Substratkonzentration 10<sup>-5</sup> mol/l.

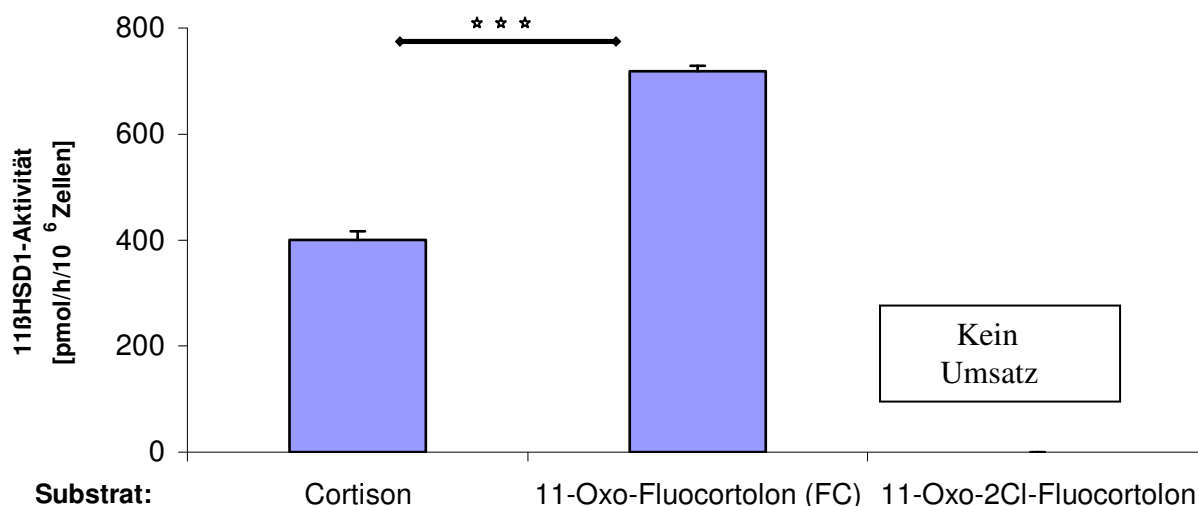
Die 2α-Methylgruppe des 2α-Methyl-Fluorocortisons (Abb.4.3.) bewirkt einen gegenteiligen Effekt. Der Substituent vermindert die Reduktaseaktivität der 11β-HSD1 sehr stark (p<0,001). Trotzdem erreicht 2α-Methyl-Fluorocortison (Abb.4.4.) mit 490 ± 66 pmol/10<sup>6</sup> Zellen x h<sup>-1</sup> einen signifikant höheren Umsatz als Cortison (p<0,01).

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



**Abb. 4.5.:** Strukturformeln der 11-Dehydroderivate von Fluocortolon und 2-Cl-Fluocortolon.

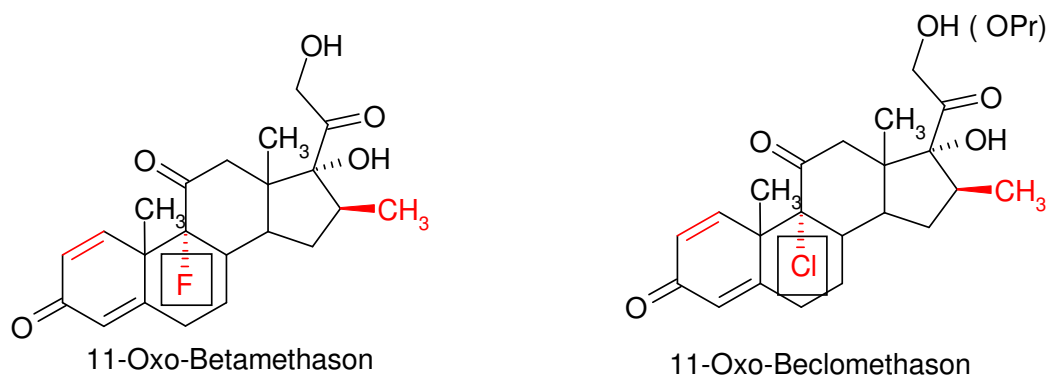
Fluocortolon unterscheidet sich von Cortisol vor allem durch die 6α-Fluorierung und die 17-Desoxykonfiguration (Abb.4.5.). Das 6α-fluorierte Steroid erreicht mit 718 ± 10 pmol/10<sup>6</sup>Zellen x h<sup>-1</sup> einen signifikant stärkeren Umsatz als Cortison, das mit einer Initialgeschwindigkeit von 400 ± 16 pmol/10<sup>6</sup>Zellen x h<sup>-1</sup> reduziert wird (p<0,001, Abb.4.6.).



**Abb.4.6.:** Reduktion von Cortison, 11-Oxo-Fluocortolon (FC) und 11-Oxo-2Cl-FC durch die 11β-HSD1 Mittelwerte +/- Standardabweichung (n=4) aus 2 Inkubationsversuchen ( \* \* \* = p<0,001 bezogen auf die Reduktion von Cortison); Inkubationszeit 24h, Substratkonzentration 10<sup>-5</sup> mol/l.

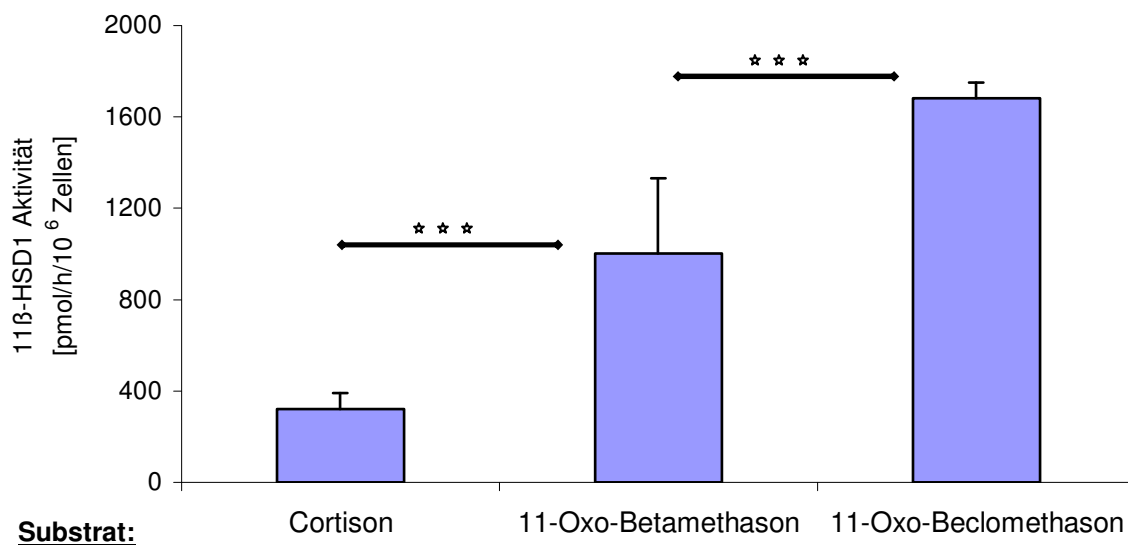
Das 2-Chlor-Derivat des Fluocortolons wurde unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht umgesetzt (Abb.4.6.). Auch nach mehrmaligen Inkubationsversuchen ließ sich bei der HPLC-Analytik kein Peak der entsprechenden 11-Hydroxy-Substanz nachweisen, ebenso keine weiteren Metaboliten. Spezifische toxische Effekte des Substrates auf die verwendeten CHO-Zellen waren nicht erkennbar. Die Zahl der abgestorbenen Zellen war ähnlich gering wie bei allen anderen Inkubationsversuchen. Die nicht umgesetzte 11-Oxo-Substanz ließ sich quantitativ im Inkubationsmedium in etwa derselben Menge nachweisen wie bei Inkubation unter Abwesenheit von Zellen. Daher ist auch eine weitere Metabolisierung des Substrates zu Substanzen, die sich eventuell dem chromatographischen Nachweis entziehen, unwahrscheinlich.

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



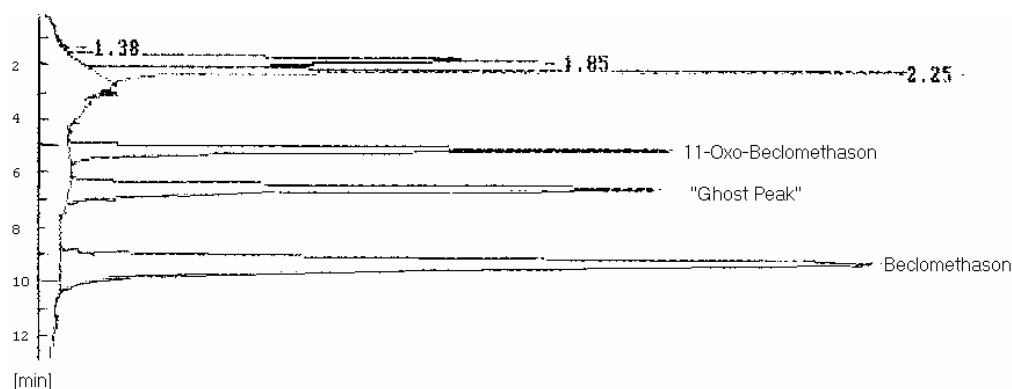
**Abb. 4.7.:** Strukturformeln der 11-Dehydroderivate von Betamethason und Beclomethason.

Wiederum erreicht das an Position 9 $\alpha$  fluorierte Steroid 11-Oxo-Betamethason (Abb.4.7.) mit  $1003 \pm 353$  pmol/10<sup>6</sup>Zellen x h<sup>-1</sup> einen im Vergleich zu Cortison ( $319,5 \pm 87$  pmol/10<sup>6</sup>Zellen x h<sup>-1</sup>) deutlich stärkeren Umsatz ( $p < 0,001$ , Abb.4.8.). Beclomethason besitzt anstelle der 9 $\alpha$ -Fluorgruppe des Betamethasons eine 9 $\alpha$ -Chlorogruppe, beide Substanzen unterscheiden sich sonst nicht (Abb.4.7.). Die 11-Reduktion von 11-Oxo-Beclomethason läuft jedoch mit einer signifikant höheren Vo-Geschwindigkeit ab ( $1691 \pm 75$  pmol/10<sup>6</sup>Zellen x h<sup>-1</sup>;  $p < 0,001$  im Vergleich zu Betamethason).



**Abb. 4.8.:** Reduktion von Cortison, 11-Oxo-Betamethason und 11-Oxo-Beclomethason durch die 11β-HSD1 Mittelwerte +/- Standardabweichung (n=7) aus 2 Inkubationsversuchen, (\* \* \* =  $p < 0,001$ ), Inkubationszeit 24h, Substratkonzentration 10<sup>-5</sup> mol/l.

Bei der Reduktion von 11-Oxo-Beclomethason fand sich in den HPLC-Läufen außer der entsprechenden 11-Hydroxysubstanz ein weiterer „ghost peak“ bei einer Retentionszeit von ca. 6,7 min (Abb.4.9.). Der unbekannte Metabolit wurde auch bei allen weiteren Versuchen zu 11-Oxidation und 11-Reduktion von Beclomethason detektiert und machte quantitativ etwa 30% der Gesamtpeakfläche aus. Die Substanz konnte nicht näher identifiziert werden, da unserer Arbeitsgruppe keine weiteren Metaboliten des Beclomethasons als Vergleichssubstanzen für die Analytik zur Verfügung standen.



**Abb.4.9:** UV-Chromatogramm (254 nm Wellenlänge) einer Inkubation von 11 $\beta$ -HSD1-Zellen mit 11-Oxo-Beclomethason. Die Peaks bei 2 min entsprechen dem Injektionspeak. Der „ghost peak“ bei 6,67 min ließ sich bei allen Inkubationen mit Beclomethason oder 11-Oxo Beclomethason nachweisen.

Eine massenspektrometrische Untersuchung konnte aufgrund der geringen Mengen der entstandenen Substanz nicht durchgeführt werden. In die Berechnungen von Umsatz und Vo-Geschwindigkeit wurden daher lediglich die Peakflächen von 11-Oxo- und 11-Hydroxysubstanz einbezogen.

Tabelle 4.1. fasst die an mit der 11 $\beta$ -HSD1 transfizierten CHO-Zellen gewonnenen Daten nochmals zusammen.

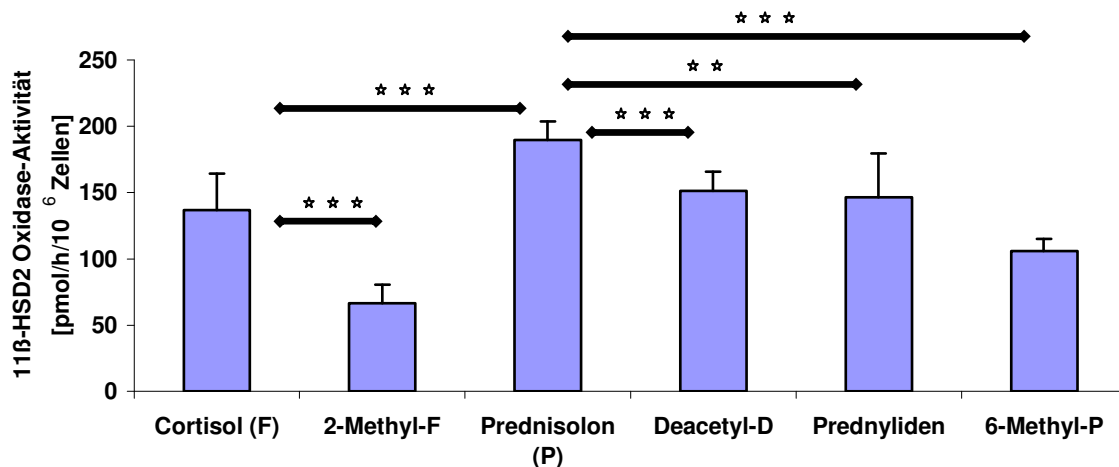
Steroid	Struktur	Vo Reduktion [pmol/10 <sup>6</sup> Zellen/h]
Cortison		379 $\pm$ 92
Prednison (P)	$\Delta$ 1-Dehydro-Cortison	852 $\pm$ 186
6 $\alpha$ -Methylprednison		878 $\pm$ 78
11-Oxo-Prednylidin	16-Methylen-Prednison	715 $\pm$ 250
9 $\alpha$ -Fluorocortison (FE)		1020 $\pm$ 86
2 $\alpha$ -Methyl-9 $\alpha$ -FE		490 $\pm$ 13
11-Oxo-Fluocortolon	16 $\alpha$ -Methyl-6 $\alpha$ -Fluor-17Desoxy-P	716 $\pm$ 10
2-Cl-11-Oxo-Fluocortolon		-----
11-Oxo-Betamethason	16 $\beta$ -Methyl-9 $\alpha$ Fluoro-Prednison	1002 $\pm$ 352
11-Oxo-Beclomethason	16 $\beta$ -Methyl-9 $\alpha$ Chloro-Prednison	1674 $\pm$ 74

**Tab. 4.1.:** Zusammenfassung der Vo-Initialgeschwindigkeiten für die 11-Reduktion verschiedener Steroide in mit der HSD1 transfizierten CHO-Zellen.

## 4.1.2. 11 $\beta$ -Oxidation durch die HSD2

### 4.1.2.1. Oxidation nicht halogener Steroide durch die 11 $\beta$ -HSD2

Bei den Experimenten zur Oxidation verschiedener Steroide durch die 11 $\beta$ -HSD2 wurden die Substrate in einer Konzentration von 1  $\mu$ mol/l eingesetzt. Daher ergeben sich bei gleichen Umsätzen geringere  $V_0$ -Initialgeschwindigkeiten als bei der 11 $\beta$ -Reduktion durch die 11 $\beta$ -HSD1 (Kap.4.1.1.).



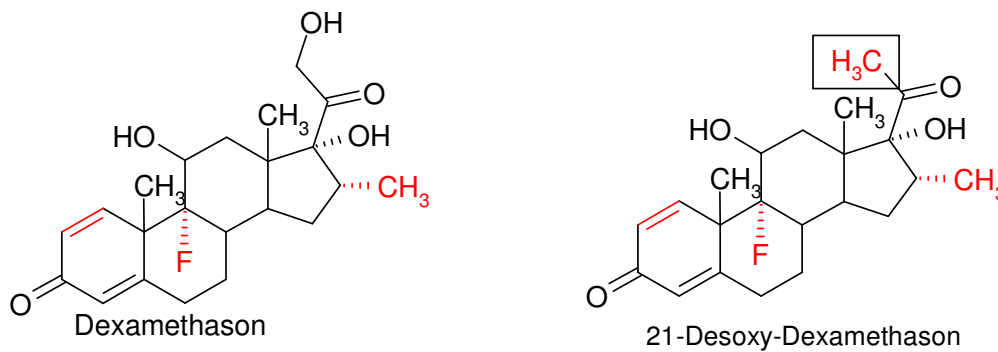
**Abb. 4.10.:** Charakterisierung der 11 $\beta$ -HSD2 Oxidase-Aktivität gegenüber verschiedenen nicht halogenierten Steroiden. Mittelwerte +/- Standardabweichung (n=6-9) aus 2 Inkubationsversuchen;

(\* \* =  $p < 0,01$  ; \* \* \* =  $p < 0,001$ ); Inkubationszeit 12 h, Substratkonzentration  $10^{-6}$  mol/l.

Deacetyl-D = 21-Deacetyl-Deflazacort (16,17-Methyloxazolin-Prednisolon).

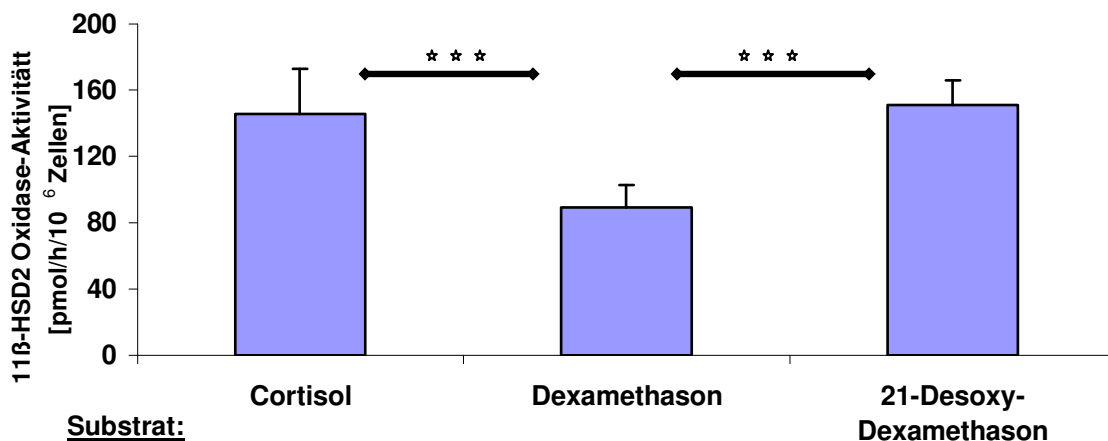
Eine 2 $\alpha$ -Methylierung beeinträchtigt die 11-Oxidation durch die 11 $\beta$ -HSD2 ähnlich stark wie die 11-Reduktion der 11 $\beta$ -HSD1. Das 2 $\alpha$ -Methyl-Cortisol erreicht mit  $67 \pm 14$  pmol/10<sup>6</sup>Zellen x h<sup>-1</sup> etwa 50% des Umsatzes von Cortisol ( $137 \pm 27$  pmol/10<sup>6</sup> Zellen x h<sup>-1</sup>;  $p < 0,001$ , Abb.4.10.). Ebenfalls in Analogie zur Reduktion durch die 11 $\beta$ -HSD1 werden  $\Delta$ 1-Dehydro-Steroide bevorzugt umgesetzt. Prednisolon erreicht mit  $189 \pm 14$  pmol/10<sup>6</sup> Zellen x h<sup>-1</sup> etwa den 1,5 fachen Umsatz von Cortisol. Die 16-Methylen- bzw. 6 $\alpha$ -Methylderivate des Prednisolons werden von der 11 $\beta$ -HSD2 signifikant geringer oxidiert als die Muttersubstanz Prednisolon. Der Umsatz von Prednyliden (16-Methylen-Prednisolon) erreicht mit  $147 \pm 33$  pmol/10<sup>6</sup>Zellen x h<sup>-1</sup> von Zellen etwa das Niveau von Cortisol. Das 6 $\alpha$ -Methyl-Prednisolon wird mit  $106 \pm 9$  pmol/10<sup>6</sup>Zellen x h<sup>-1</sup> sogar signifikant weniger umgesetzt als Cortisol ( $p < 0,01$ ). Auch die 16,17-Methyloxazolingruppe des 21-Deacetyl-Deflazacort ( $151 \pm 15$  pmol/10<sup>6</sup> Zellen x h<sup>-1</sup>) vermindert die 11-Oxidation durch die 11 $\beta$ -HSD 2 im Vergleich zu Prednisolon signifikant ( $p < 0,01$ ).

#### 4.1.2.2. Effekt der 21-Desoxy-Konfiguration auf die 11-Oxidation durch die 11 $\beta$ -HSD2



**Abb.4.11.:** Strukturformeln von Dexamethason und 21-Desoxydexamethason.

Dexamethason (9 $\alpha$ -Fluor-16 $\alpha$ -Methylprednisolon) erreicht mit  $89 \pm 13$  pmol/10<sup>6</sup>Zellen x h<sup>-1</sup> nur knapp zwei Drittel des Umsatzes von Cortisol ( $146 \pm 27$  pmol/10<sup>6</sup>Zellen x h<sup>-1</sup>) (Abb.4.12.). Da Prednisolon durch die 11 $\beta$ -HSD2 vergleichsweise stark umgesetzt wird (Abb.4.10.), scheinen beim Dexamethason 16 $\alpha$ -Methylgruppe und 9 $\alpha$ -Fluorogruppe für die Minderung der 11-Oxidation verantwortlich.



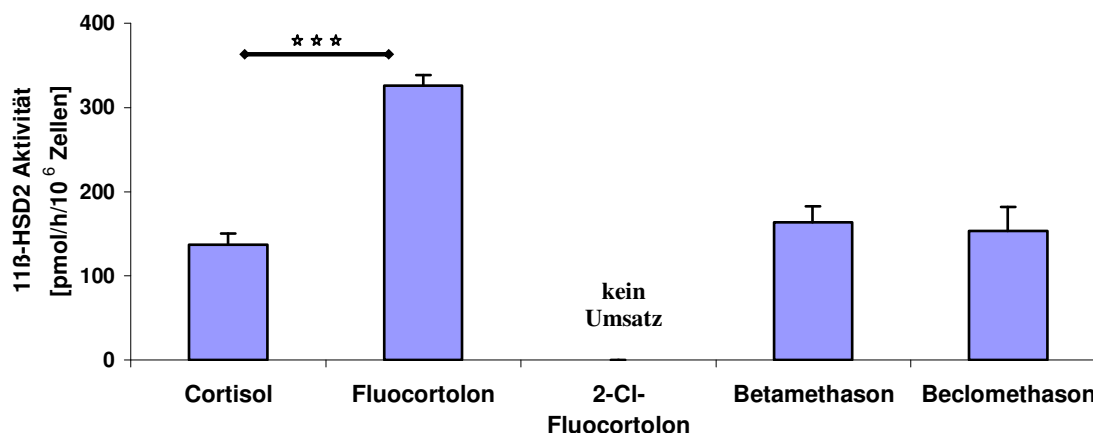
**Abb.4.12.:** Charakterisierung der 11 $\beta$ -HSD2 Oxidase-Aktivität gegenüber Cortisol, Dexamethason und 21-Desoxy-Dexamethason. Mittelwerte +/- Standardabweichung (n=6-9) aus 2 Inkubationsversuchen

(\* \* \* = p<0,001) Inkubationszeit 12h, Substratkonzentration 10<sup>-6</sup> mol/l.

Das 21-Desoxy-Dexamethason unterscheidet sich von Dexamethason lediglich durch das Fehlen der 21-Hydroxygruppe (Abb. 4.11.), wird von der 11 $\beta$ -HSD2 jedoch signifikant stärker umgesetzt als die Muttersubstanz (p<0,001). Mit  $151 \pm 15$  pmol/10<sup>6</sup>Zellen x h<sup>-1</sup> erreicht der Umsatz das Niveau von Cortisol. Das Fehlen der 21-Hydroxygruppe der Seitenkette begünstigt damit die 11-Oxidation durch die 11 $\beta$ -HSD2.



#### 4.1.2.3. Effekte von 9 $\alpha$ -Halogen- und 2-Chlorsubstituenten auf die 11-Oxidation durch die 11 $\beta$ -HSD2



**Abb.4.13.:** Charakterisierung der 11 $\beta$ -HSD2 Oxidase-Aktivität gegenüber Cortisol, Fluocortolon, 2-Cl-Fluocortolon, Betamethason und Beclomethason. Mittelwerte +/- Standardabweichung (n=6) aus 2 Inkubationsversuchen (\* \* \* = p<0,001) ; Inkubationszeit 12h, Substratkonzentration 10<sup>-6</sup> mol/l.

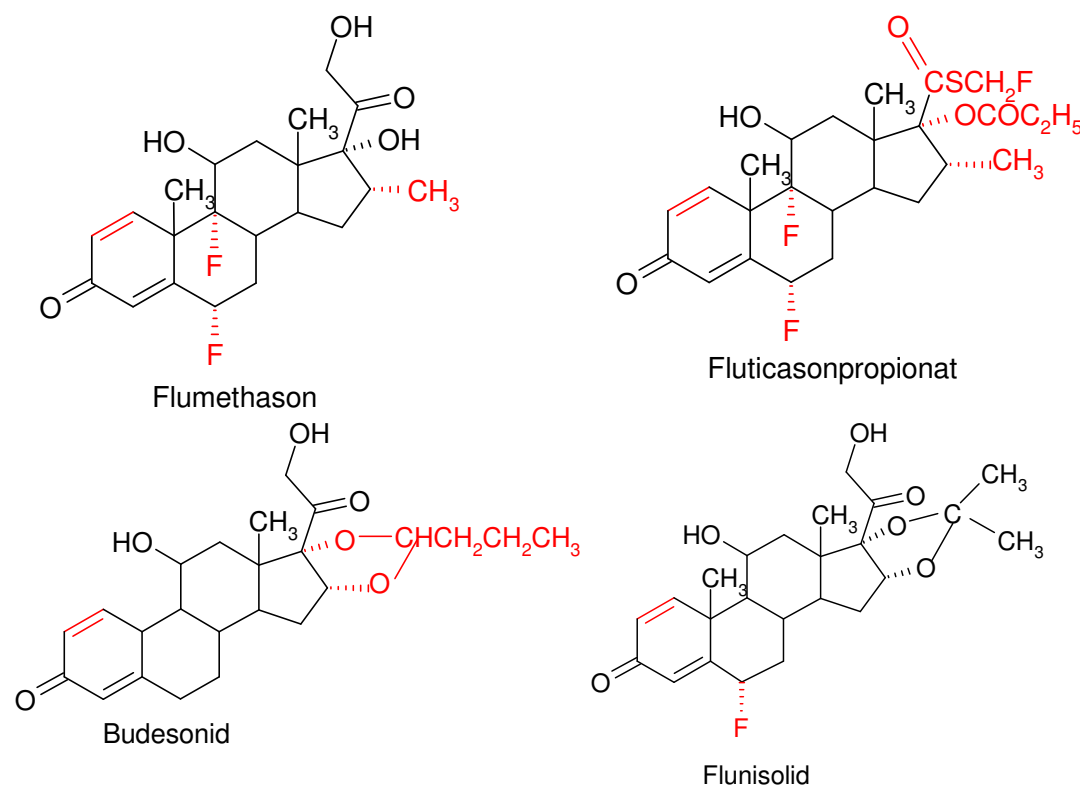
Fluocortolon (17Desoxy-16 $\alpha$ Methyl-6 $\alpha$ Fluoro-Prednisolon) wird von der 11 $\beta$ -HSD2 mit einer  $V_0$ -Geschwindigkeit von  $326 \pm 12$  pmol/10<sup>6</sup>Zellen x h<sup>-1</sup> sehr stark oxidiert (p<0,001 gegenüber Cortisol, Abb. 4.13.). Mit dem 2-Chlor-Derivat dieser Substanz ließ sich wie bei der Reduktion der 11-Oxo-Substanz (Abb.4.6.) durch die 11 $\beta$ -HSD1 kein Umsatz feststellen. In mehrfach durchgeführten Inkubationsversuchen konnten neben der reduzierten Ausgangssubstanz keine weiteren Metabolite detektiert werden.

Die Umsätze von Betamethason (9 $\alpha$ -**Fluor**-16 $\beta$ -Methyl-Prednisolon;  $163 \pm 19$  pmol/10<sup>6</sup>Zellen x h<sup>-1</sup>), Beclomethason (9 $\alpha$ -**Chlor**-16 $\beta$ -Methyl-Prednisolon;  $153 \pm 28$  pmol/10<sup>6</sup>Zellen x h<sup>-1</sup>) und Cortisol ( $137 \pm 13$  pmol/10<sup>6</sup>Zellen x h<sup>-1</sup>) unterschieden sich nur unwesentlich. Allerdings entstand wie bei der 11-Reduktion von Beclomethason ein nicht näher identifizierbarer Metabolit, der bei der Berechnung des Umsatzes nicht berücksichtigt wurde.

Betamethason erreicht nahezu den doppelten Umsatz seines Diastereoisomers Dexamethason (Abb.4.12.; Kapitel 4.1.2.2.). Damit scheint die 16 $\alpha$ -Methylgruppe (Dexamethason) die 11-Oxidation stärker zu hemmen als die 16 $\beta$ -Methylgruppe (Betamethason).

#### 4.1.2.4. Oxidation verschiedener topisch angewandter Steroide durch die 11 $\beta$ -HSD2

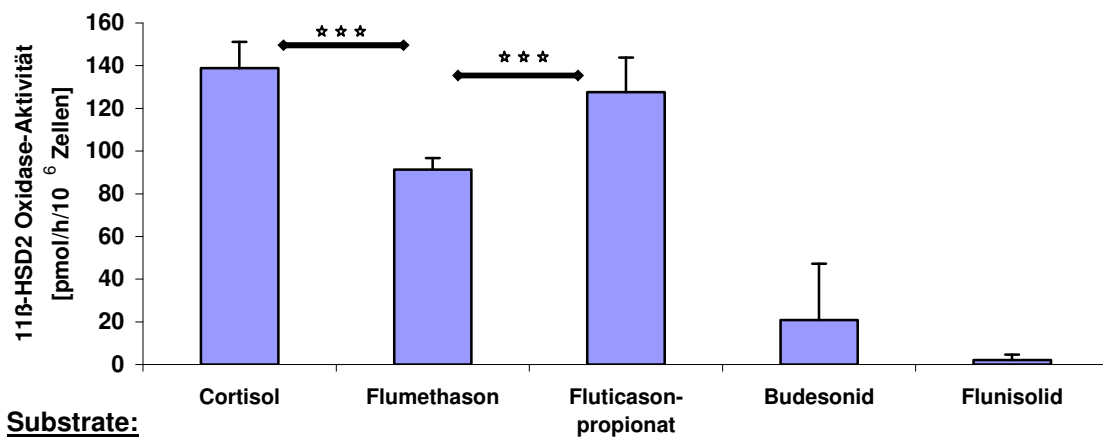
Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur 11 $\beta$ -HSD2 Oxidation verschiedener vorwiegend topisch angewandter Steroide (Abb.4.14.) sind in Abb.4.15. dargestellt.



**Abb.4.14.:** Strukturformeln verschiedener topisch angewandter Steroide.

Die Substanzen weisen teilweise komplexe Veränderungen des Steroidgerüsts auf. Der Einfluß einzelner Substituenten kann daher nicht immer eindeutig abgeleitet werden.

Eine im Vergleich zu Cortisol signifikant geringere Oxidation durch die 11 $\beta$ -HSD2 ist fast allen Substanzen gemein. Flumethason (6 $\alpha$ -Fluoro-Dexamethason) erreicht mit  $91 \pm 5$  pmol/10<sup>6</sup>Zellen x h<sup>-1</sup> ähnlich wie Dexamethason (Kap.4.1.2.2.) nicht den Umsatz von Cortisol ( $139 \pm 12$  pmol/10<sup>6</sup>Zellen x h<sup>-1</sup>) ( $p < 0,001$ ). Fluticasonpropionat unterscheidet sich von Flumethason durch Substituenten an C17 (Azetatgruppe) und C21 (Fluorierung und Sulfatierung) der Seitengruppe (Abb.4.14.) und wird von der 11 $\beta$ -HSD2 signifikant stärker oxidiert ( $p < 0,001$ ). Der Umsatz von Fluticasonpropionat erreicht mit  $128 \pm 16$  pmol/10<sup>6</sup>Zellen x h<sup>-1</sup> etwa das Niveau von Cortisol (Abb.4.15.).



**Abb.4.15.:** Charakterisierung der 11β-HSD2 Oxidase-Aktivität gegenüber verschiedenen überwiegend topisch angewandten Steroiden; Mittelwerte +/- Standardabweichung (n=6) aus 2 Inkubationsversuchen

(\* \* \* =  $p < 0,001$ ) Inkubationszeit 12h, Substratkonzentration  $10^{-6}$  mol/l.

Budesonid und Flunisolid unterscheiden sich vom Cortisol vor allem durch die  $\Delta 1$ -Dehydro-Konfiguration sowie durch die Einführung von Kohlenwasserstoffketten an C16 und C17, Flunisolid besitzt zudem eine  $6\alpha$ -Fluorgruppe (Abb.4.14.).

Mit beiden Substanzen ließen sich nur äußerst geringe Umsätze erzielen ( $21 \pm 26$  pmol/ $10^6$ Zellen x  $h^{-1}$  für Budesonid und  $2,2 \pm 2$  pmol/ $10^6$ Zellen x  $h^{-1}$  für Flunisolid, Abb.4.15.).

Tabelle 4.2. fasst die Daten zur 11-Oxidation der 11β-HSD2 an transfizierten CHO Zellen nochmals zusammen (s. nächste Seite):

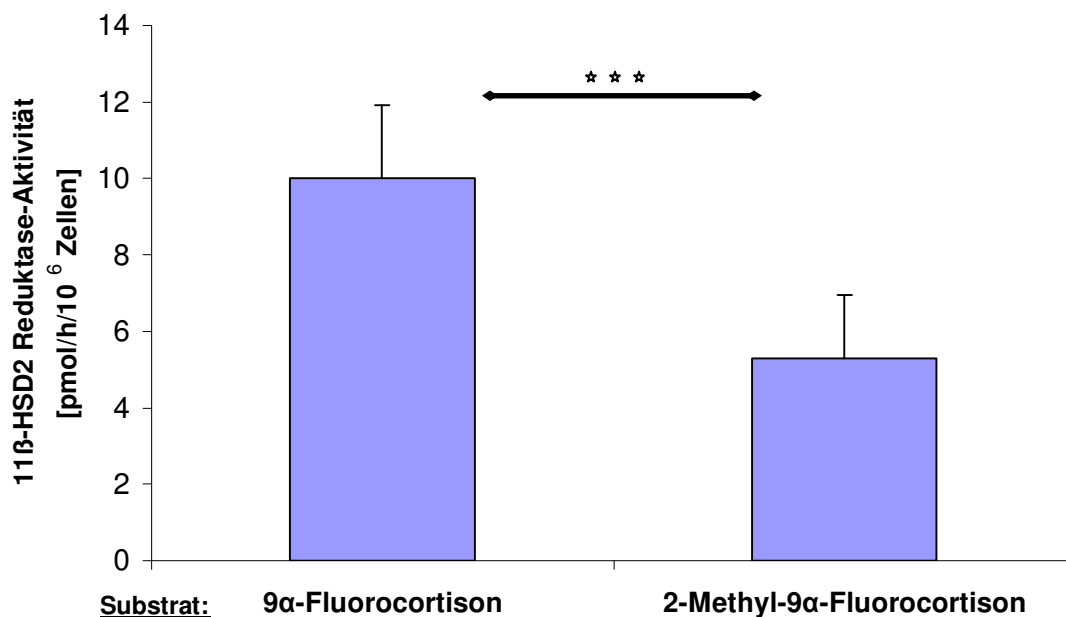
<b>Steroid</b>	<b>Vo-Oxidation [pmol/10<sup>6</sup>Zellen/h]</b>
<b>Cortisol</b>	137 ± 23
<b>2<math>\alpha</math>-Methylcortisol</b>	67 ± 14
<b>Prednisolon</b>	190 ± 14
<b>Prednyliden</b>	147 ± 33
<b>6<math>\alpha</math>-Methyl-Prednisolon</b>	106 ± 9
<b>Dexamethason</b>	89 ± 13
<b>21-Desoxy-Dexamethason</b>	150 ± 15
<b>Deacetyl-Deflazacort</b>	151 ± 15
<b>Fluocortolon</b>	326 ± 13
<b>2-Chlor-Fluocortolon</b>	-----
<b>Betamethason</b>	163 ± 19
<b>Beclomethason</b>	153 ± 28
<b>Budesonid</b>	21 ± 13
<b>Flunisolid</b>	2,2 ± 1,7

**Tab. 4.2.:** Zusammenfassung der Vo-Initialgeschwindigkeiten für die 11-Oxidation verschiedener Steroide in mit der 11 $\beta$ -HSD2 transfizierten CHO-Zellen.

### 4.1.3. Die 11-Reduktion durch die 11 $\beta$ -HSD2

#### 4.1.3.1. Effekt einer 2 $\alpha$ -Methylgruppe auf die 11-Reduktion durch die 11 $\beta$ -HSD2

Mit den für die 11 $\beta$ -HSD2 Oxidation verwendeten Inkubationsbedingungen ( $2,7 \times 10^6$  Zellen pro Kulturflasche, Substratkonzentration  $1 \mu\text{mol/l}$ ) konnte kaum eine Reduktion von 9 $\alpha$ -Fluorocortison erzielt werden. Für Umsätze im Bereich von 20-40% musste die Inkubation mit der 5-fachen Menge an CHO-Zellen ( $13,5 \times 10^6$  Zellen pro Kulturflasche) durchgeführt werden, gleichzeitig wurde die Substratkonzentration auf  $5 \times 10^{-7}$  mol/l reduziert. Eine weitere Verringerung der Substratkonzentration war nicht möglich, da die zu detektierenden Stoffmengen dann zu gering für Nachweis der HPLC-Analytik wären.



**Abb. 4.16.:** Einfluß einer 2 $\alpha$ -Methylgruppe auf die Reduktaseaktivität der 11 $\beta$ -HSD2.

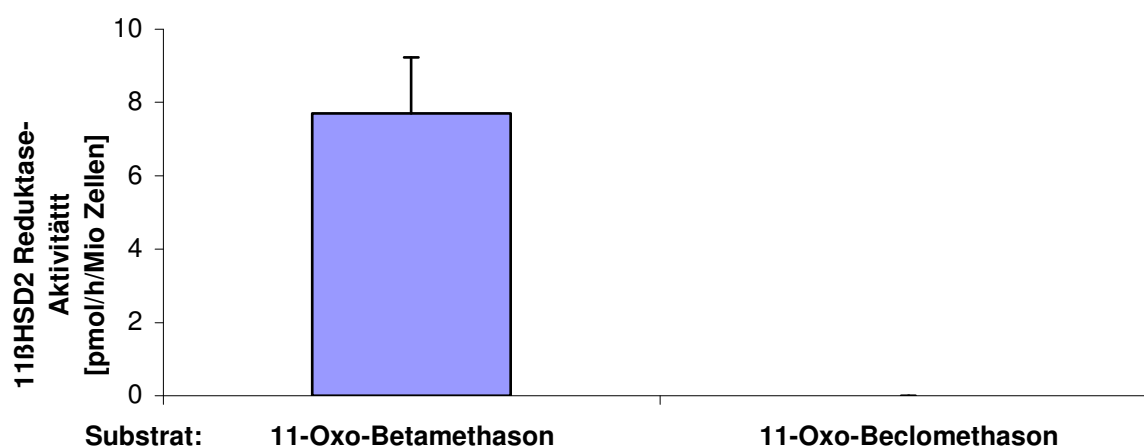
Mittelwerte +/- Standardabweichung (n=6) aus 2 Inkubationsversuchen. Inkubationszeit 24h, 13,5 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Kulturflasche, Substratkonzentration 5 x 10<sup>-7</sup> mol/l ( \*\*\* = p<0,001 ).

Damit entsprach die Reduktaseaktivität der 11 $\beta$ -HSD2 nur etwa 1/10 der Oxidaseaktivität (Tab.4.2.; Tab.4.3.). Die Vo-Geschwindigkeiten betragen für 9 $\alpha$ -Fluorocortison 10 ± 1,9 pmol/10<sup>6</sup> Zellen x h<sup>-1</sup> und für 2 $\alpha$ -Methylfluorocortison 5,3 ± 1,6 pmol/10<sup>6</sup> Zellen x h<sup>-1</sup>.

Eine 2 $\alpha$ -Methylgruppe hemmt damit in gleichem Maße sowohl die Oxidation und Reduktion durch die 11 $\beta$ -HSD2 als auch die 11-Reduktion durch die 11 $\beta$ -HSD1 (p<0,001) (Abb.4.3.; Abb.4.10. ; Abb.4.16.).

#### 4.1.3.2. Effekte von 9 $\alpha$ -Halogensubstituenten auf die 11-Reduktion durch die 11 $\beta$ -HSD2

Der Einfluß verschiedener Halogensubstituenten auf die Reduktion durch die 11 $\beta$ -HSD2 wurde wiederum mit dem Steroidpaar Betamethason (9-Fluorogruppe) und Beclomethason (9-Chlorogruppe) untersucht (Abb. 4.17.). Mit 7,7 ± 1,5 pmol/10<sup>6</sup> Zellen x h<sup>-1</sup> erreicht 11-Oxo-Betamethason etwas geringere Umsätze als Fluorocortison (10 ± 1,9 pmol/10<sup>6</sup> Zellen x h<sup>-1</sup>, Abb.4.16.).



**Abb.4.17.:** Charakterisierung der 11β-HSD2 Reduktase-Aktivität gegenüber 11-Oxo-Betamethason und 11-Oxo-Beclomethason. Mittelwerte +/- Standardabweichung (n=6) aus 2 Inkubationsversuchen. Inkubationszeit 24h, Substratkonzentration  $5 \times 10^{-7}$  mol/l.

Das 11-Oxo-Beclomethason ist kein Substrat für die 11β-HSD2. Weder nach 24h, noch nach 48h Inkubation konnte reduziertes Beclomethason detektiert werden. Unter oben genannten Inkubationsbedingungen wurden außerdem Cortison und 2Cl-11Oxo-Fluocortolon als Substrat für die 11-Reduktion der 11β-HSD2 eingesetzt. Mit beiden Substanzen konnte keinerlei Umsatz erzielt werden.

Tabelle 4.3. fasst die Ergebnisse zur 11-Reduktion durch die 11β-HSD2 zusammen:

Steroid	Vo-Reduktion [pmol/h/10 <sup>6</sup> Zellen]
<b>9α-Fluorocortison</b>	10 ± 2
<b>2α-Methyl-9α-Fluorocortison</b>	5,3 ± 1,6
<b>11-Oxo-Betamethason</b>	6,3 ± 1,9
<b>11-Oxo-Beclomethason</b>	-----

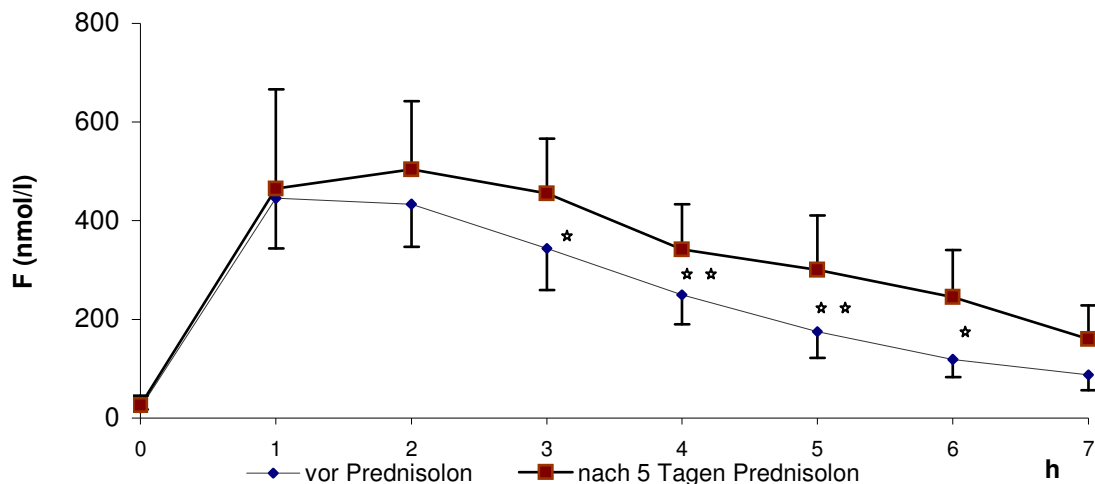
**Tab.4.3.:** Zusammenfassung der Vo-Initialgeschwindigkeiten für die 11-Reduktion verschiedener Steroide in mit der 11β-HSD2 transfizierten CHO-Zellen.

## 4.2. Ergebnisse der *in vivo*-Versuche an gesunden Probanden

### 4.2.1. Induktion der 11 $\beta$ -HSD1 durch Glucocorticoide

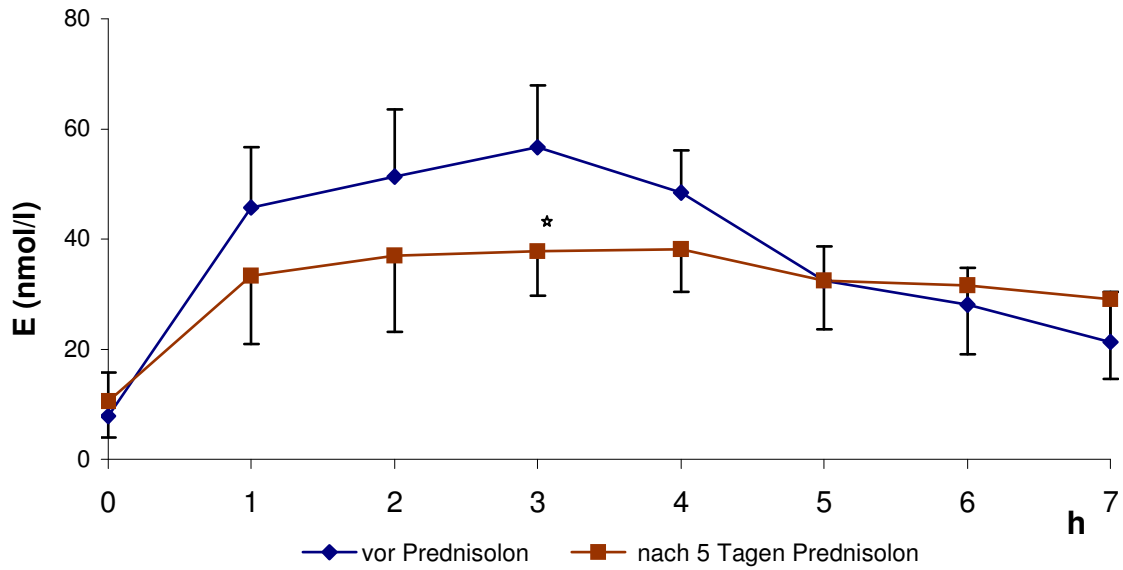
In Abbildung 4.18–4.20 werden die gewonnenen Daten zusammengefasst. An beiden Versuchstagen ist nach Prämedikation mit Dexamethason oder Betamethason die Cortisolkonzentration vor Einnahme des Cortisonazetat wunschgemäß nicht messbar. Nach der Einnahme von 25mg Cortisonazetat steigen die Serumkonzentrationen von Cortisol steil an und erreichen nach ein bis zwei Stunden ihr Maximum mit  $445 \pm 102$  nmol/l. Danach erfolgt ein langsamer Abfall auf Werte von  $88 \pm 32$  nmol/l sieben Stunden nach der Einnahme von Cortisonazetat.

Nach fünftägiger Einnahme von 30mg Prednisolon pro Tag werden höhere Cortisolkonzentrationen ( $503 \pm 139$  nmol/l zwei Stunden bzw.  $160 \pm 68$  nmol/l sieben Stunden nach Einnahme von Cortisonazetat) erreicht als am Kontrolltag. Die Unterschiede sind jedoch erst 4 Stunden nach der Einnahme von Cortisonazetat signifikant (p<0,05 bzw. p<0,01).



**Abb. 4.18.:** Serumspiegel von Cortisol (F) 0–7 Stunden nach Einnahme von 25 mg Cortisonazetat, dargestellt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 7 gesunden männlichen Probanden vor und nach 5 tägiger Einnahme von Prednisolon, [ \* = p < 0,05, \* \* = p < 0,05 gegenüber den Werten vor Prednisolon].

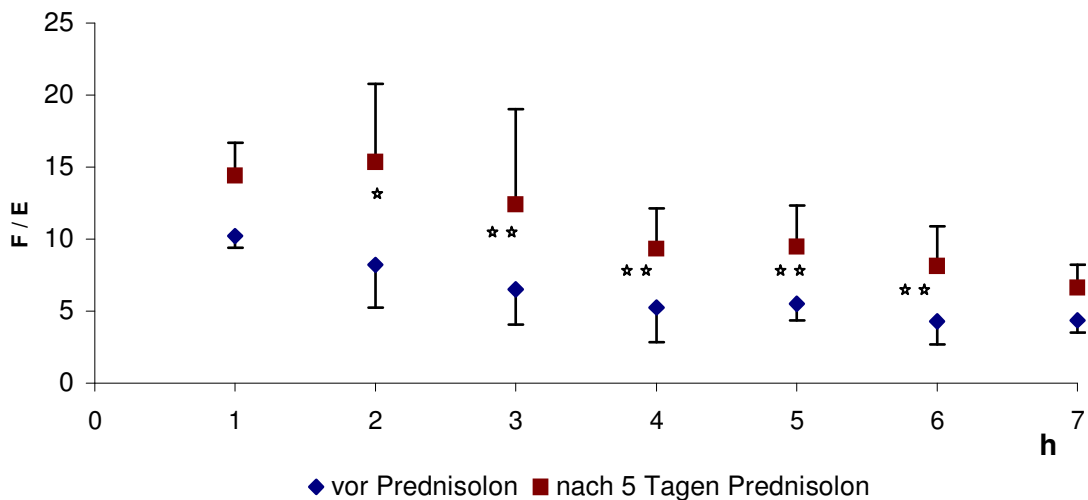
Die Serumkonzentration von Cortison erreicht nur etwa 10-25 % der Cortisolkonzentration und ist in Analogie zum Serumcortisol zu Versuchsbeginn kaum messbar (Abb. 4.19.).



**Abb. 4.19.:** Serumspiegel von Cortison (E) 0-7 Stunden nach Einnahme von 25 mg Cortisonazetat, dargestellt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 7 gesunden männlichen Probanden vor bzw. nach 5 tägiger Einnahme von Prednisolon, [ \* =  $p < 0,05$  gegenüber dem Wert vor Prednisolon].

Nach fünftägiger Einnahme von Prednisolon zeigt sich zunächst ein Trend zu geringeren Cortisonkonzentrationen (signifikant mit  $p < 0,05$  nach drei Stunden). Etwa 5 Stunden nach der Einnahme von Cortisonazetat gleichen sich die Serumwerte wieder an.

Setzt man die gemessenen Serumwerte von Cortisol (F) und Cortison (E) ins Verhältnis (als Maß für die Aktivität der 11 $\beta$ -HSD1), so stellt sich nach fünftägiger Einnahme von Pred-

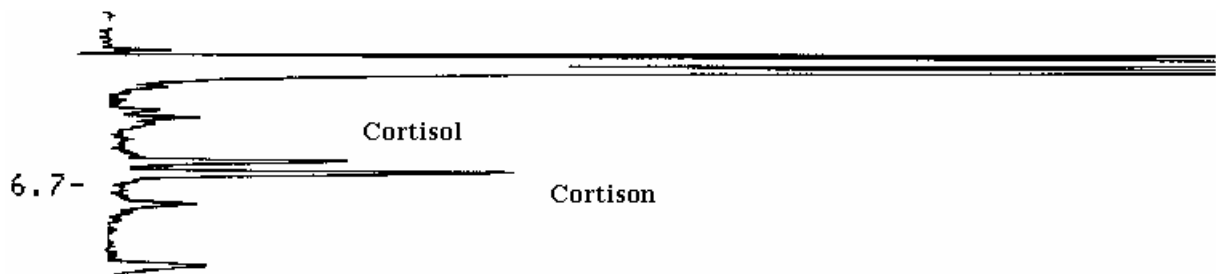


**Abb. 4.20.:** F/E ratio im Serum 0-7 h nach Einnahme von 25 mg Cortisonazetat, dargestellt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 7 gesunden männlichen Probanden vor bzw. nach 5 tägiger Einnahme von Prednisolon [ \* =  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  gegenüber dem Wert vor Prednisolon].



nisolon ein Trend zu einem erhöhten F/E-Quotienten im Serum dar (Zweistundenwert  $8,24 \pm 2,45$  vor und  $15,37 \pm 6,65$  nach Prednisoloneinnahme). Dieser ist 2 - 6 Stunden nach der Einnahme von Cortisonazetat signifikant höher als am Kontrolltag ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$  Abb.4.20).

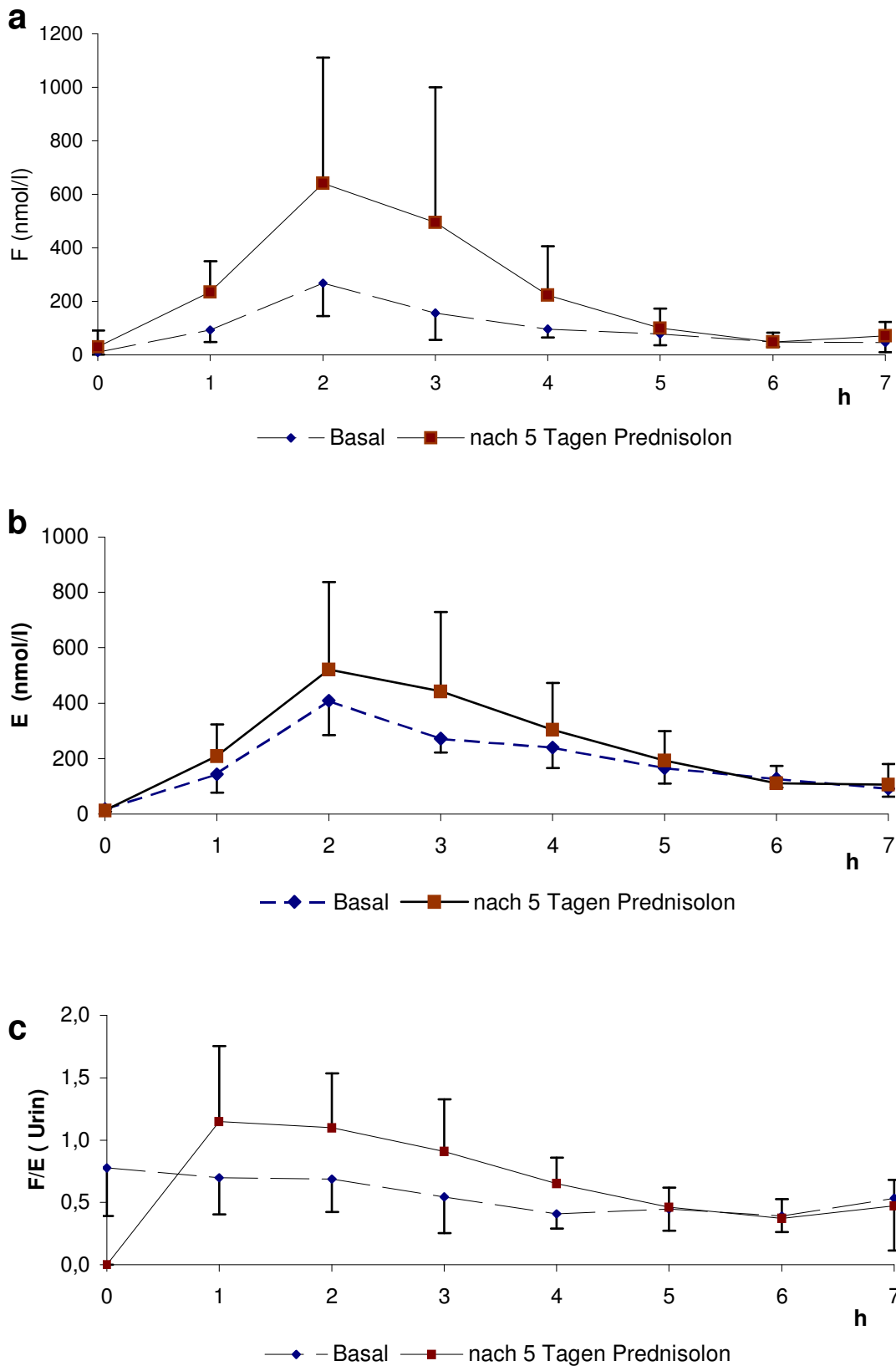
Simultan zu den Bestimmungen von Cortisol und Cortison im Serum konnten die Konzentrationen der Substanzen im Urin mit Hilfe des gleichen vollautomatischen flüssigkeitschromatographischen Systems wie im Serum bestimmt werden. Die Peaks von 11-Oxo- und 11-Hydroxysubstanz ließen sich bei der Durchführung der HPLC-Analytik ausreichend trennen (Abb.4.21.).



**Abb. 4.21.:** UV-Chromatogramm des vollautomatischen flüssigkeitschromatographischen Systems; Auswertung der Urinprobe eines Probanden 4 Stunden nach Einnahme von 10mg Cortisol

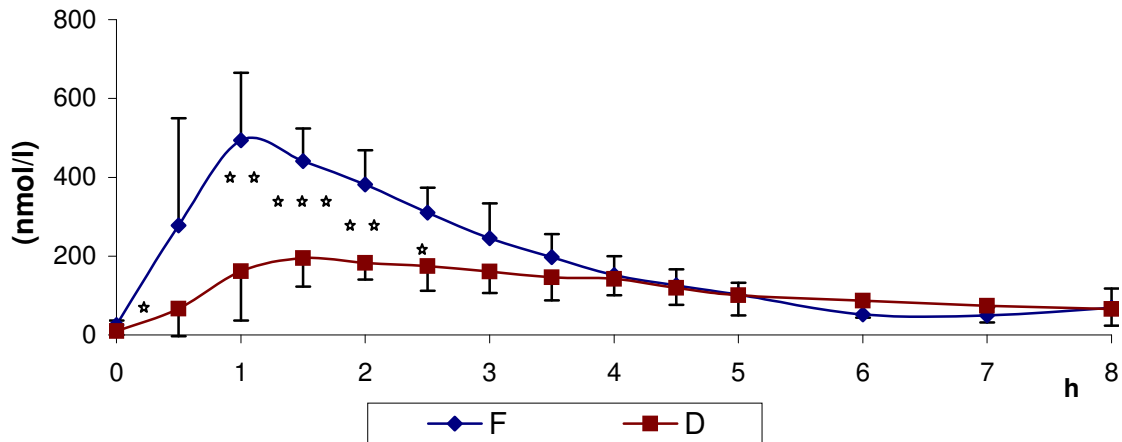
Die Urinkonzentrationen von Cortisol (F) erreichen dabei analog zum Plasmaspiegel nach zwei Stunden ein Maximum (Abb.4.22.a). Es wurden maximal  $268 \pm 124$  nmol/l (Kontrolltag) bzw.  $640 \pm 469$  nmol/l (nach Prednisolon) erreicht. Bedingt durch die 11 $\beta$ -HSD2 Aktivität der Niere liegen die Urinkonzentrationen von Cortison etwa im Bereich derer von Cortisol (Abb.4.22.b). Wie bei den Serumkonzentrationen wird nach 2 Stunden ein Maximum erreicht ( $409 \pm 125$  nmol/l am Kontrolltag bzw.  $523 \pm 314$  nmol/l unter Prednisolon).

Als Maß für die Aktivität der 11 $\beta$ -HSD2 dient das Verhältnis von F/E im Urin (Abb. 4.22.c). Die Werte betragen bedingt durch die hohe Oxidaseaktivität nur etwa 1/10 der entsprechenden Plasmaquotienten. Mit  $0,7 \pm 0,29$  vor und  $1,15 \pm 0,61$  nach Prednisoloneinnahme (eine Stunde nach Einnahme von Cortisonazetat) unterscheiden sich die Urinratios F/E nur unwesentlich. Allenfalls ergibt sich ein Trend zu höheren F/E-Quotienten nach Prednisoloneinnahme. Signifikante Unterschiede ergeben sich jedoch zu keinem Zeitpunkt.



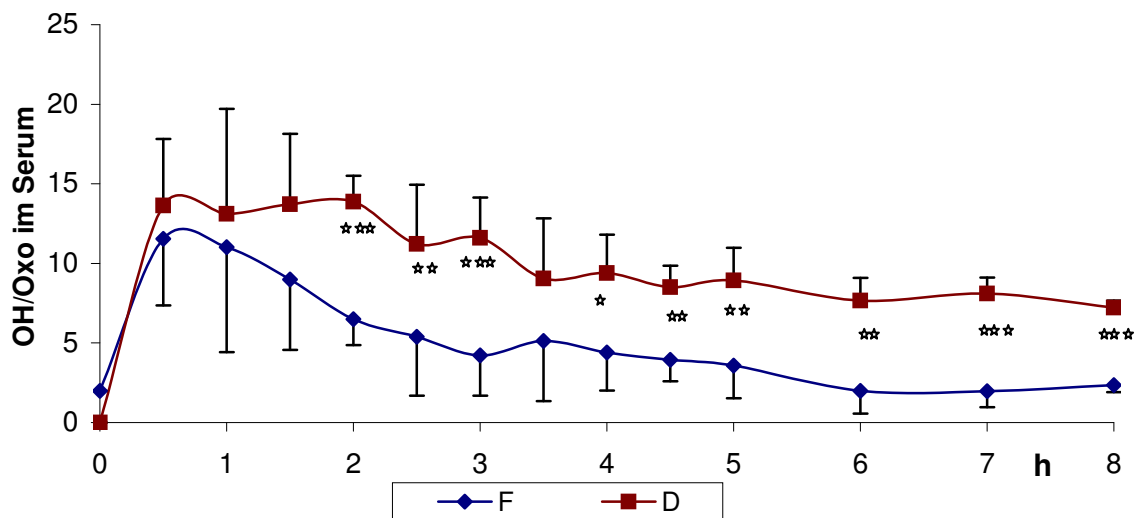
**Abb. 4.22.:** a) freies Cortisol (F) im Urin b) freies Cortison (E) im Urin c) ratio F/E im Urin 0-7 h nach Einnahme von 25 mg Cortisonazetat, dargestellt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 5 gesunden männlichen Probanden vor bzw. nach 5 tägiger Einnahme von Prednisolon.

#### 4.2.2. Metabolisierung von Cortisol und Dexamethason *in vivo*



**Abb. 4.23.:** Serumspiegel von Cortisol(F) und Dexamethason(D) 0–7 Stunden nach Einnahme von 10 mg Steroid, dargestellt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 5 gesunden männlichen Probanden. Die Einnahme von 10 mg F bzw. D erfolgte um 8.00Uhr. Zur Suppression der endogenen Steroide wurden um 0 Uhr 1mg und um 6 Uhr 0,5 mg Betamethason eingenommen [ \* =  $p < 0,05$ ; \* \* =  $p < 0,01$ , \* \* \* =  $p < 0,001$  gegenüber Dexamethason].

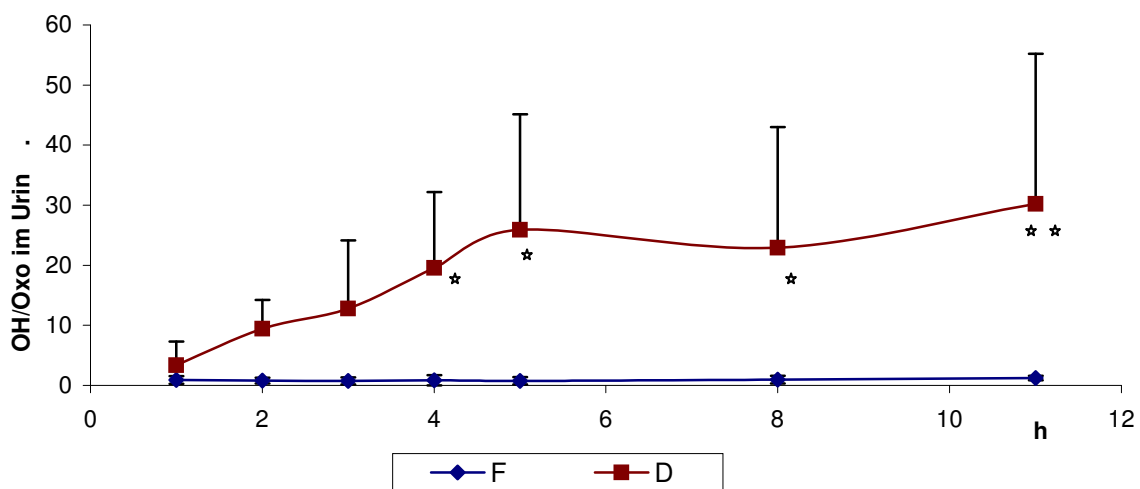
Wiederum sind zu Versuchsbeginn die Serumspiegel von Cortisol durch die vorherige Einnahme von Betamethason wunschgemäß supprimiert. Eine Stunde nach oraler Gabe von je 10mg Cortisol bzw. Dexamethason erreichen die Serumkonzentrationen beider Substanzen ein Maximum ( $494 \pm 171$  nmol/l für Cortisol,  $194 \pm 71$  für Dexamethason).



**Abb. 4.24.:** Quotient OH/Oxo im Serum 0-8 h nach Einnahme von 10 mg Cortisol (F) oder Dexamethason (D), dargestellt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 5 gesunden männlichen Probanden [ \* =  $p < 0,05$ ; \* \* =  $p < 0,01$ ; \* \* \* =  $p < 0,001$  gegenüber Cortisol].

Mit 10mg Cortisol lassen sich jedoch im Vergleich zur selben Menge an Dexamethason signifikant höhere Serumspiegel erreichen (Abb.4.24). Während die Serumkonzentration von Cortisol nach Erreichen des Maximums rasch wieder abfällt, zeigen die Spiegel von Dexamethason für ca. 6 Stunden ein relativ konstantes Niveau von etwa 150nmol/l.

Auch die Plasmaquotienten aus 11-Hydroxy- und 11-Oxosubstanz erreichen für Dexamethason relativ gleichbleibende Werte, während sie für Cortisol nach kurzem Anstieg auf ein im Vergleich zu Dexamethason signifikant niedrigeres Niveau abfallen ( $5,4 \pm 1,1$  für Cortisol vs.  $11,2 \pm 3,7$  für Dexamethason, Abb.4.25).

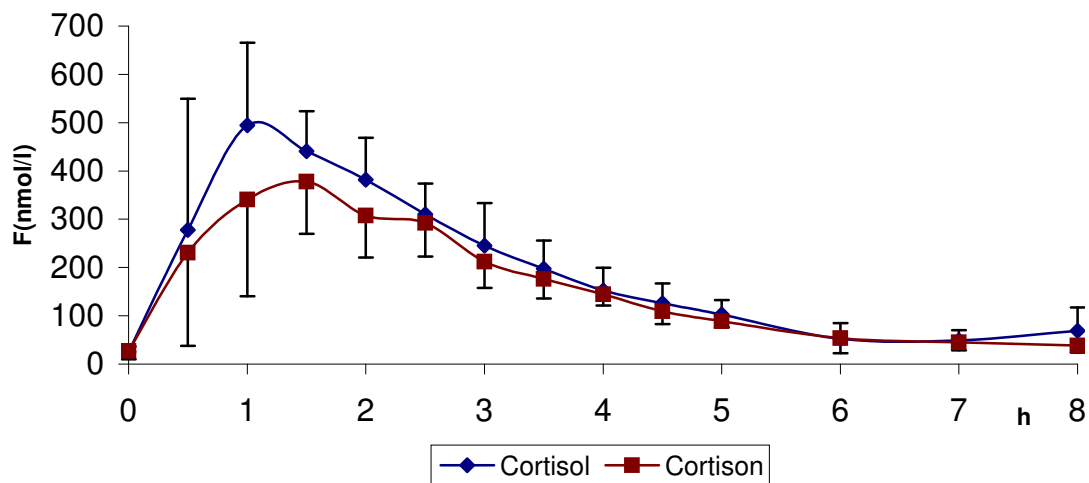


**Abb. 4.25.:** Quotient OH/Oxo im Urin 1-11 h nach Einnahme von 10 mg Cortisol (F) oder Dexamethason (D), dargestellt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 5 gesunden männlichen Probanden, [ \* =  $p < 0,05$ , \* \* =  $p < 0,01$ ; gegenüber Cortisol].

Im Urin zeigt sich das Verhältnis F/E über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant kleiner als 1,0 und liegt damit signifikant unter den im Serum bestimmten Werten ( $0,78 \pm 0,48$  nach 2 Stunden bei einem Serumquotienten von  $5,4 \pm 1,1$  zum gleichen Zeitpunkt). Das Verhältnis aus Dexamethason zu 11-Dehydrodexamethason steigt mehrere Stunden nach der Einnahme der Substanz an und erreicht nach 5 Stunden ein konstant hohes (und im Vergleich zu Cortisol signifikant höheres) Niveau ähnlich den im Serum gemessenen Werten ( $9,45 \pm 4,79$  nach 2 Stunden).

### 4.2.3. Selektive Hemmung der 11 $\beta$ -HSD1 durch Chenodesoxycholsäure

Die nach oraler Einnahme von 12,5mg Cortisonazetat gemessenen Cortisolkonzentrationen unterscheiden sich nicht signifikant von den nach der Gabe von 10mg Cortisol gemessenen Werten. Die maximalen Serumkonzentrationen werden jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt erreicht ( $494 \pm 171$  nmol/l 1h nach Cortisol vs.  $378 \pm 108$  nmol/l nach Cortisonazetat). Im Trend zeigen die Cortisolkonzentrationen nach der Einnahme von Cortisonazetat einen etwas gleichmäßigeren Verlauf (Abb. 4.26).

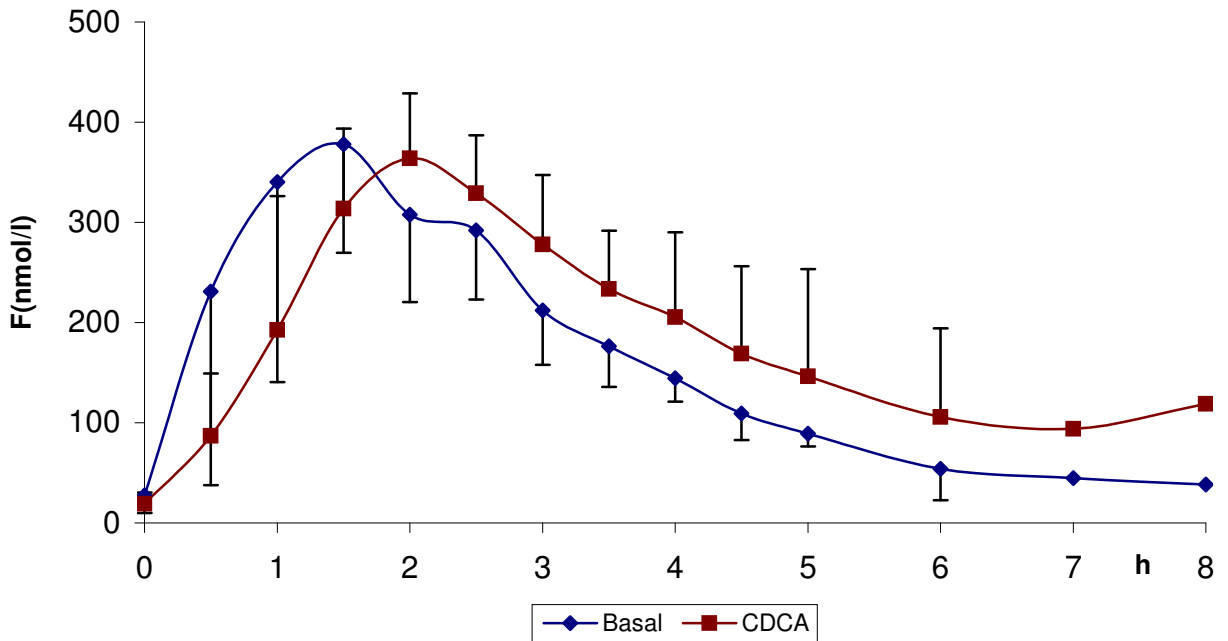


**Abb. 4.26.:** Serumkonzentration von Cortisol (F) 0–8 Stunden nach Einnahme von 12,5mg Cortisonazetat oder 10mg Cortisol, dargestellt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 5 gesunden männlichen Probanden.

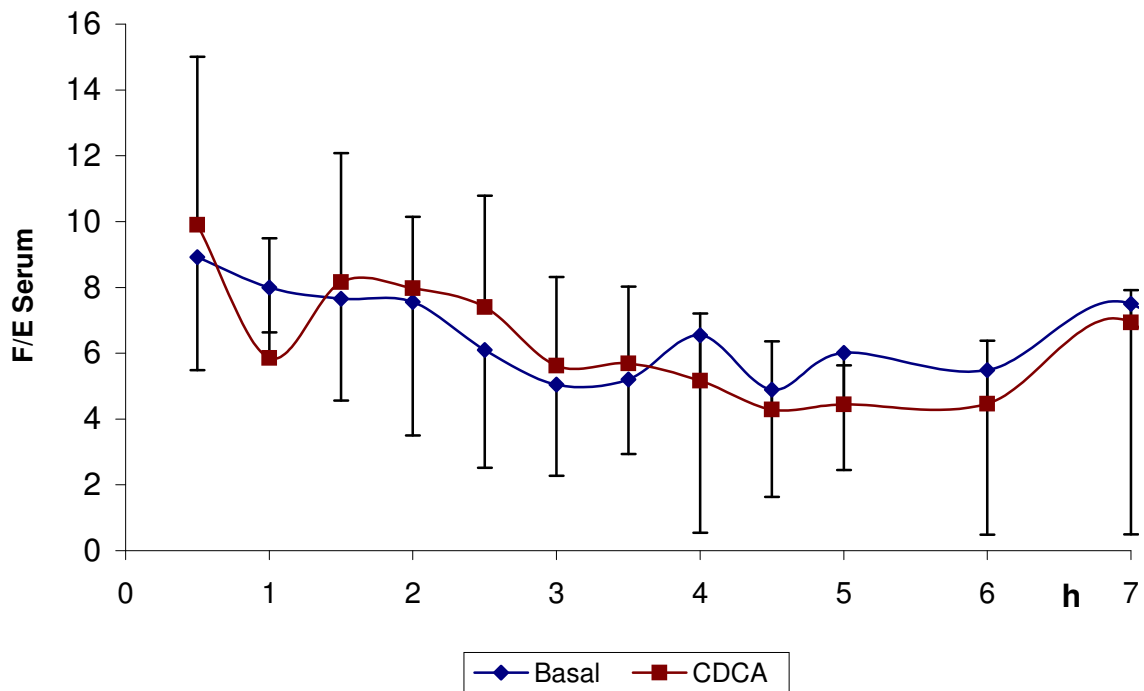
Bei gleichzeitiger Einnahme von Cortisonazetat und Chenodesoxycholsäure (CDCA) zeigen sich im Vergleich zur basalen Messung keine signifikant verschiedenen Cortisolkonzentrationen. Der Anstieg der Serumkonzentration ist jedoch nach der Einnahme von CDCA tendenziell verzögert (Abb.4.27a). Ebenso wird die maximale Serumkonzentration von Cortisol erst zu einem späteren Zeitpunkt erreicht ( $378 \pm 108$  nmol/l 1,5h nach Cortisonazetat vs.  $364 \pm 65$  nmol/l 2h nach Cortisonazetat + CDCA).

Auch die Serumquotienten F/E unterscheiden sich bei Einnahme von CDCA nicht vom Kontrolltag (Abb.4.27b). Mit Werten zwischen 5 und 10 werden ähnliche Quotienten erreicht wie nach der Einnahme von 10mg Cortisol (Abb.4.24). Allerdings zeigt sich bei kombinierter Gabe von F und CDCA ein im Trend gleichmäßigerer Verlauf des Verhältnisses ohne den nach Einnahme von Cortisol zu beobachteten Abfall nach etwa 2 Stunden.

a)



b)



**Abb. 4.27.:** a) Serumkonzentration von Cortisol (F) sowie b) Serumquotient F/E 0–7 Stunden nach Einnahme von 12,5 mg Cortisonazetat mit oder ohne Chenodesoxycholäure. Dargestellt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 5 gesunden männlichen Probanden.