

DIE WIRKUNG VON GLYKOCORTICOÏDEN UND EINIGEN ANDEREN AKTIVEN STEROÏDEN AUF DIE KREBS-CYCLUS-AKTIVITÄT DER RATTENNIERE

P. GÖRÖG und L. SZPORMY

Pharmakologisches Laboratorium der Chemischen Fabrik Gedeon Richter AG.
Budapest, Ungarn

(Received 13 January 1964; accepted 13 October 1964)

Abstract—The effect of biologically active steroids on the activity of the Krebs-cycle of the rat kidney was investigated *in vivo* and *in vitro*. Gluco-corticoids in therapeutic doses decreased Krebs-cycle activities. In high doses other steroids showed small inhibitions or none at all. The activity of the gluco-corticoids was much greater *in vivo* than *in vitro*, but the *in vitro* activity could be increased by prior incubation with tissue homogenate.

DER WIRKUNGSMECHANISMUS der antiphlogistischen Steroide ist trotz der zahlreichen durchgeföhrten Untersuchungen auf diesem Gebiete auch heute noch nicht geklärt. Es ist nicht bekannt, wie die verschiedenen biochemischen Wirkungen der Glykocorticoide mit dem therapeutisch verwertbaren antiphlogistischen Effekt zusammenhangen. Den entscheidendsten Beweis dafür, dass solche Zusammenhänge bestehen, liefert die Tatsache, dass die auf den Kohlenhydratstoffwechsel ausgeübte Wirkung bei jedem natürlichen und synthetischen entzündungshemmenden Steroid mit dem antiphlogistischen Effekt gemeinsam auftritt.

Es wurden auch bisher schon zahlreiche Daten über die glykogenetische, auf den Stickstoff-Stoffwechsel ausgeübte Wirkung der Corticosteroide publiziert, gleichzeitig haben sich jedoch nur wenige Untersuchungen mit der Analyse der auf die Geweboxydation ausgeübten Wirkung beschäftigt. Es wurde bisher lediglich festgestellt, dass der Krebs-Cyclus durch das Cortison gehemmt wird,¹⁻⁴ während die Ansichten über die Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung ziemlich auseinander gehen.^{5, 6} Die in den erwähnten Untersuchungen festgestellten Effekte wurden mit weit über den therapeutischen Dosen liegenden Cortison-Gaben (50 mg/kg) mit chronischer Behandlung erreicht. Angesichts dieser Tatsache ist es also fraglich, ob diese Effekte auch bei der Verabreichung therapeutischer Dosen in Erscheinung treten. Es stehen auch keine Daten darüber zur Verfügung, ob die synthetischen Glykocorticoide, deren Aktivität die Wirksamkeit des Cortisons weit übertrifft, diese Wirkungen gleichfalls ausüben.

Wir haben in unserer Arbeit versucht, auf diese Fragen eine Antwort zu erhalten und anderenteils haben wir auch untersucht, inwieweit die festgestellten Stoffwechselwirkungen innerhalb der Steroide für die entzündungshemmend wirkenden Verbindungen charakteristisch sind.

MATERIALEN UND METHODEN

In den in-vitro-Versuchen verwendeten wir wasserlösliche Formen der Steroide, und zwar Hydrocortison-Hemisuccinat, Prednisolon-Hemisuccinat (Richter) und Dexamethasone-21-Phosphat (Organon). In den in-vivo-Versuchen wurden 120–150 g schwere männliche Wistar-Ratten angewandt. Die Glykocorticoide wurden in 10%iger Propylenglykol-Lösung, die übrigen untersuchten Steroide in Öl gelöst, täglich einmal, 6 Tage hindurch subcutan verabreicht. 24 Stunden nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet, die Nieren herauspräpariert und in physiologischer KCl-Lösung homogenisiert (10% Gew./Vol.). Das Homogenisat wurde 10 Minuten hindurch mit $2000 \times g$ bei 0° zentrifugiert und zu den Versuchen wurde die Supernatante verwendet. Die Krebs-Cyclus-Aktivität des Nieren-Homogenisats stellten wir mit der durch uns modifizierten Methode von Aisenberg und Potter⁷ fest. Das Reaktionsgemisch hatte die folgende Zusammensetzung: 0,3 ml 0,1 M KH_2PO_4 -Puffer ($\text{pH} = 7,3$), 0,2 ml 0,1 M Natrium-fumaratlösung, 0,2 ml 0,1 M Natriumpyruvatlösung, 0,4 ml 0,03 M MgCl_2 , 0,3 ml 0,01 M Natrium-ATP, 0,25 ml H_2O , 0,95 ml 0,5 M Sucrose und 0,4 ml 10% igcs (Gew./Vol.) Nierenhomogenisat. Nach einer 10 Minuten dauernden Ausgleichsperiode wurde der Sauerstoffverbrauch bei 37° 40 Minuten hindurch gemessen.

Bei der Untersuchung des Gewebsmetabolismus wurde Prednisolon Hemisuccinat mit dem Nierenhomogenisat bei 37° verschieden lange Zeit hindurch in einem folgendermassen zusammengesetzten System inkubiert: 0,3 ml 0,1 M KH_2PO_4 -Puffer ($\text{pH} = 7,3$), 0,3 ml 0,01 M Natrium-ATP, 0,4 ml 0,03 M MgCl_2 , 1,0 ml Nierenhomogenisat (10% Gew./Vol.), und 5,0 mg Prednisolon Hemisuccinat, mit physiologischer KCl-Lösung auf ein Endvolumen von 3,0 ml ergänzt.

Die Enzymaktivität wurde durch 10 Minuten dauerndes Erwärmen des Inkubats in einem Wasserbad von 70° eingestellt. Wir filtrierten das ausgeschiedene Eiweiss und untersuchten 0,1 ml des Filtrates (250 µg Prednisolon-Hemisuccinat) in dem erwähnten System vom Gesichtspunkte der auf den Krebs-Cyclus ausgeübten Wirkung.

Den Proteingehalt stellten wir nach Lowry und Mitarb.⁸ spektrophotometrisch fest.

ERGEBNISSE

Es wurde untersucht, auf welche Weise die Krebs-Cyclus-Aktivität des Nierenhomogenisats durch die Vorbehandlung mit biologisch verschiedenartig wirkenden Steroiden beeinflusst wird. Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, wird die Krebs-Cyclus-

TABELLE 1. WIRKUNG DER STEROIDE AUF DIE KREBS-CYCLUS-AKTIVITÄT
DER RATTENNIERE IN VIVO

Präparat	Tagesdosen mg/100 g	Zahl d. Ratten*	O_2 -Verbrauch/ $\mu\text{l}/$ Std./mg Protein	P	Hemmung (%)
Kontroll	—	21	$52,6 \pm 1,68$		0
Progesteron	5,0	9	$50,6 \pm 3,07$	$>0,5$	3,8
Testosteron	5,0	9	$45,7 \pm 3,31$	$\geq 0,05$	13,2
Norandrostenolon	5,0	9	$45,4 \pm 3,25$	$\leq 0,05$	13,7
Hydrocortison	0,5	9	$13,5 \pm 1,74$	$< 0,001$	74,3
Prednisolon	0,1	9	$15,0 \pm 2,49$	$< 0,001$	71,5
Dexamethason	0,025	9	$18,9 \pm 1,71$	$< 0,001$	64,0

* Bei jeder Ratte wurden zwei parallele Bestimmungen durchgeführt.

Aktivität durch die antiphlogistisch wirkenden Steroide schon in niedrigen Dosen stark gehemmt. Die Vorbehandlung mit Progesteron ist unwirksam, während Testosteron und Norandrostenedion sehr hohen Dosen eine massig signifikante Hemmungswirkung ausüben. Die Wirkung der wasserlöslichen Glykocorticoide in vitro ist in Tabelle II gezeigt. Auch in vitro kann eine Hemmungswirkung nachgewiesen werden, zu ihrer Herbeiführung müssen jedoch wesentlich grossere Mengen angewandt werden, als in den in vivo durchgeführten Versuchen.

TABELLE 2. WIRKUNG DER GLYKOCORTICOIDE AUF DIE KREBS-CYCLUS-AKTIVITÄT
DER RATTENNIERE IN VITRO

Präparat	Dosis mg*	O ₂ -Verbrauch µl/Std.		
		mit Präparat	ohne Präparat	Hemmung %
Hydrocortison	4,0	55†	369	85
Prednisolon	2,0	169	369	54
Dexamethason	0,5	210	314	33

* Endvolumen: 3,0 ml.

† Jeder Wert ist das Ergebnis von 4 Paralleluntersuchungen in zwei Versuchen.

TABELLE 3. WIRKUNG DER VORINKUBATION DES PREDNISOLONS MIT
NIERENHOMOGENISAT AUF DIE HEMMUNG DES KREBS-CYCLUS

Inkubations- zeit Min.	O ₂ -Verbrauch µl/Std. (Trockensubstanz)		Hemmungs- wirkung %
	Kontrolle	mit 250 µg Prednisolon	
0	44,1*	37,6	14,8
15	40,6	30,0	26,1
30	34,6	23,4	32,4
60	33,9	21,1	37,9
60 + 30†	37,4	23,6	36,8

* Durchschnitt von zwei Parallelversuchen in drei Experimenten.

† Nach 60 Min. wurde 1 ml frisches Nierenhomogenisat (10 Vol./Gew. %) zugegeben und die Inkubation für weitere 30 Min. fortgesetzt.

Es wurde auch die Frage untersucht, ob sich die Intensität der Hemmung des Krebs-Cyclus ändert, wenn die zu untersuchenden Glykocorticoide vorher mit dem Gewebshomogenisat inkubiert werden. Wie aus den Daten der Tabelle 2 ersichtlich ist, kann die Hemmung des Krebszyklus beim Prednisolon durch vorherige Inkubation mit dem Nierenhomogenisat erheblich gesteigert werden, eine weitere Steigerung durch Zugabe weiterer Mengen von frischem Homogenisat ist jedoch nicht möglich.

DISKUSSION

Bekanntlich üben die Glykocorticoide schon in geringen Mengen eine bedeutende physiologische Wirkung aus (Hemmung des Hypophysen-Nebennieren-Systems),

während der therapeutisch verwertbare antiphlogistische Effekt nur mit der Verabreichung höherer, sogenannter "pharmakologischer" Dosen herbeigeführt werden kann. Vergleicht man jedoch die in Tierversuchen wirksamen Dosen der antiphlogistischen Steroide mit jenen Mengen, in denen die Nicht-Steroid-Antiphlogistika (wie Phenylbutazon, Salicylate usw.) wirksam sind, so kann man feststellen, dass die wirksamem Dosen der antiphlogistischen Steroide um mehrere Größenordnungen niedriger sind, als die der Nicht-Steroide. Dies deutet darauf hin, dass wenn der therapeutische Effekt auf der Beeinflussung der Enzymaktivität beruht, sich diese Stoffwechselwirkungen der Glykocorticoide schon nach der Verabreichung derart niedriger Dosen einstellen müssten.

In unseren Versuchen hemmten die Glykocorticoide die Krebs-Cyclus-Aktivität *in vivo* schon in niedrigen Dosen beträchtlich. Die Intensität der Hemmungswirkung stimmte bei den untersuchten Glykocorticoiden in groesen Zügen mit der gegenseitigen therapeutischen Äquivalenz dieser Steroide überein. (Die durch uns angewandte experimentelle Methode ist zur genauen Bestimmung der relativen Wirksamkeit vom Gesichtspunkte der Hemmung der Krebscyclus-Aktivität nicht geeignet.) In hohen Dosen angewandt hat das Progesteron die Krebs-Cyclus-Aktivität in unseren Versuchen nicht gehemmt, während die Hemmungswirkung des Testosterons und Norandrostolons gering war. Auf diese Weise konnte die durch Kowalevszky^{3, 4} festgestellte stimulierende Wirkung der Anabolika auf die Enzyme des Krebs-Cyclus unter den Bedingungen unserer Versuche bei der Untersuchung des gesamten Cyclus nicht nachgewiesen werden.

Mehrere Autoren halten bei den antiphlogistisch wirkenden Nicht-Steroiden die Entkoppelung als ausschlaggebend vom Gesichtspunkte der entzündungshemmenden Wirksamkeit,⁹ andere wieder sind der Ansicht, dass die Hemmung des Einbaus von radioaktivem Schwefel in die Bindegewebe für die Antiphlogistika spezifisch ist.¹⁰ Auf Grund unserer eigenen Ergebnisse halten wir die Hemmung des Krebs-Cyclus durch die Glykocorticoide für eine spezifische Wirkung der antiphlogistischen Steroide, auf Grund der die Erscheinungen der Entzündungshemmung bis zu einer gewissen Tiefe erklärt werden können. Die bei den antiphlogistisch wirkenden Nicht-Steroiden festgestellte Entkoppelungswirkung und die in unserer Vorliegenden Arbeit beschriebene Hemmung des Krebs-Cyclus führen gleichermassen zu einer Senkung des ATP-Spiegels in den Geweben und damit zu einer Hemmung der synthetischen Prozesse. Wahrscheinlich wird auch die Hemmung des Einbaus von radioaktivem Schwefel in die Bindegewebe durch diesen Effekt verursacht, da eine direkte Wirkung der Glykocorticoide auf die spezifischen Enzyme, die in diesem Prozess teilnehmen, nicht nachgewiesen werden konnte. durch Whitehouse und Lash.¹¹

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Wirkung einiger Glykocorticoide und anderer biologisch aktiver Steroide auf die Krebs-Cyclus-Aktivität der Rattenniere *in vivo* und *in vitro* untersucht. Durch Vorbehandlung mit Glykocorticoid-Mengen die den therapeutischen Dosen nahe stehen, wird die Krebs-Cyclus-Aktivität stark gehemmt. In hohen Dosen angewandt zeiget das Testosteron und Norandrostolon eine geringe Hemmungswirkung, während das Progesteron unwirksam ist. Die Glykocorticoide üben ihre Hemmungswirkung auch *in vitro* aus, jedoch nur in wesentlich höheren Konzen-

trationen. Durch Vorinkubation mit einem Gewerbshomogenisat kann die *in vitro* beobachtete Hemmungswirkung stark gesteigert werden.

Die erhaltenen Ergebnisse werden im Zusammenhang mit der antiphlogistischen Wirkung der Glykocorticoide besprochen.

LITERATUR

1. E. LACROIX and I. LEUSEN, *Acta endocr.* **31**, 324 (1959).
2. W. KERPPOLA, *Proc. Soc. exp. Biol. N.Y.* **67**, 252 (1960).
3. K. KOWALEWSKI, *Proc. Soc. exp. Biol. N.Y.* **109**, 971 (1962).
4. K. KOWALEWSKI, *Proc. Soc. exp. Biol. N.Y.* **113**, 310 (1963).
5. R. DERACHE, J. TREMOLIERES, G. GRIFFATON and R. LOWY, *Bull. Soc. Chim. biol. Paris*, **39**, 607 (1957).
6. J. H. CLARK and L. A. PESCH, *J. Pharmac.* **117**, 202 (1956).
7. A. C. AISENBERG and V. R. POTTER, *J. biol. Chem.* **215**, 737 (1955).
8. O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL, *J. biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
9. M. W. WHITEHOUSE, *J. Pharm. Lond.* **15**, 556 (1963).
10. M. W. WHITEHOUSE and H. BOSTRÖM, *Biochem. Pharmac.* **11**, 1175 (1962).
11. M. W. WHITEHOUSE and J. W. LASH, *Nature, Lond.* **189**, 37 (1961).