

Journal of Chromatography, 162 (1979) 573–578

Biomedical Applications

©Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 291

Note

Profile bei chronischen Erkrankungen

II. Steroidprofile von Patienten mit Psoriasis vulgaris

HELGA LUDWIG-KÖHN, F. MESSING und G. SPITELLER

Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen, Tammannstrasse 2, 3400 Göttingen (B.R.D.) und Lehrstuhl für Organische Chemie, Universitätsstrasse 30, 8580 Bayreuth (B.R.D.)

und

D. MATTHAEI, H.V. HENNING und F. SCHELER

Medizinische Universitätsklinik Göttingen, Abteilung für Nephrologie, Robert-Koch-Strasse 40, 3400 Göttingen (B.R.D.)

(Eingegangen am 1. August 1978; geänderte Fassung eingegangen am 20. Oktober 1978)

Wie wir kürzlich zeigen konnten [1], unterscheiden sich die Steroidprofile von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz von denen gesunder Kontrollpersonen durch eine extrem starke Verschiebung des Verhältnisses von Dehydroepiandrosteron (DHEA) zu Androstendiol. Während das Verhältnis DHEA zu Androstendiol im Blut von Gesunden etwa 10:1 beträgt, ist die Relation bei Urämikern auf etwa 1:1 verschoben.

Ein verminderter DHEA-Gehalt im Plasma und Gewebe und verminderte Ausscheidung im Urin wurde auch bei anderen Krankheitsbildern beobachtet: Nach Untersuchungen von Sonka et al. [2] soll ein Mangel an DHEA über eine verminderte Hemmung der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase als pathogenetischer Faktor eine wichtige Rolle bei verschiedenen Erkrankungen spielen. In der Folge konnte durch Holzmann et al. [3] gezeigt werden, dass Psoriatiker gegenüber Gesunden einen um durchschnittlich 40–70% erniedrigten DHEA-Spiegel im Serum aufweisen. Weitere Untersuchungen über den Steroidstoffwechsel von Psoriatikern erbrachten den Nachweis, dass Erythrozyten aus Psoriatikerblut nicht nur eine verminderte Menge DHEA gegenüber Erythrozyten gesunder Kontrollpersonen enthalten, sondern auch an Androsteron, Androstendion und Etiocholanolon verarmt sind. Gleichzeitig wurde ein erhöhter Gehalt von Androstendiol in den Erythrozyten von Psoriatikern gefunden

[4]. Von den gleichen Autoren wurde eine verminderte Ausscheidung von C_{19} -Steroiden im Urin von Kranken mit Psoriasis vulgaris gefunden [5].

Die Ergebnisse von Holzmann et al. über verminderte DHEA-Spiegel und erhöhten Gehalt an Androstendiol im Blutplasma von Psoriatikern weisen eine überraschende Parallele zu unseren Befunden über Plasmasteroidprofile von Urämikern auf, wenn auch bei letzteren wesentlich stärkere Unterschiede im Gehalt dieser beiden Steroide gefunden wurden.

Holzmann und Mitarbeiter hatten die Steroidmengen durch Einzelbestimmungen ermittelt. Da Profile einen direkten Vergleich von Steroidgehalten erlauben, wollten wir mit dieser Methode, die bisher weder bestätigten noch widerlegten Ergebnisse der Untersuchungen von Holzmann überprüfen.

EXPERIMENTELLES

Untersuchungsgut und Methodik

Da zur Aufnahme von Steroidprofilen mit der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) Plasmamengen zwischen 50 und 60 ml benötigt werden, wurden die Plasmaprofile in der hier vorgelegten Untersuchung von drei Plasmapools zu jeweils 75 ml, die von Psoriatikern stammten, aufgenommen. Zur Verfügung standen zwei gepoolte Plasmaproben von Frauen und eine gepoolte Plasmaprobe von Männern. Gleichzeitig wurden 16 Einzelurinproben (jeweils 40 ml) von sechs weiblichen und zehn männlichen Psoriatikern in verschiedenen Krankheitsstadien und Altersgruppen untersucht. Zehn Plasmaproben (200 ml) von gesunden Blutspendern und zehn Urinproben (40 ml) von gesunden Probanden dienten als Kontrollen.

Die Aufarbeitung von Urin und Plasma bis zur GC-MS-Analyse erfolgte wie kürzlich beschrieben [1, 6].

Plasma wurde mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt über XAD-4 gegeben und der organische Rückstand an Sephadex LH-20 fraktioniert. Die Steroidkonjugate wurden enzymatisch verseift und die freigesetzten Steroide verschiedenen säulenchromatographischen Reinigungsschritten unterworfen.

Die Urinsteroide wurden nach der Methode von Pfaffenberger und Horning verseift und extrahiert [7].

Derivatisierung

Die Steroide wurden mit N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) als Reaktant und Lösungsmittel bei Raumtemperatur in 24 h zu den Trimethylsilylether umgesetzt. Die Reaktion wurde im Mikromassstab in einem verschlossenen Schmelzpunktröhrchen durchgeführt. Die Probe wurde sofort für GC- oder GC-MS-Messungen eingesetzt, da nach etwa drei Tagen mit überschüssigem MSTFA eine Reaktion von Keto- und sterisch gehinderten Hydroxylgruppen stattfindet.

Chemikalien

Für die Chemikalien gelten die gleichen Bezugsquellen wie in [1] angegeben.

Verwendete Geräte

Gaschromatograph. Mit Glaskapillarsäule ausgerüstetes Carlo Erba-2300-Gerät, Glaskapillarsäule (24 m) nach statischer Methode mit SE-30-Film belegt [8, 9]. Injektortemperatur: 275°; Detektor: Flammenionisationsdetektor. Temperaturprogramm: 150–300°, 2°/min; Split: 1/30; Durchflussgeschwindigkeit (Wasserstoff): 2 ml/min.

Gaschromatograph–Massenspektrometer-Kombinationen. CH-7 Varian-MAT-Gerät mit gepackter Säule, belegt mit 3% SE-30 auf Supelcoport 100–210 mesh. Injektortemperatur: 270°; Temperaturprogramm: 200–300°, 4°/min; Durchflussgeschwindigkeit (Helium): 20 ml/min. Separator: Biemann–Watson (zweistufig); Ionisierungsenergie: 70 eV. Die Kombination wurde mit einem Computer (Spectrosystem 100, Varian-Computer 620/L) gekoppelt.

LKB-2091-Gerät mit Glaskapillarsäule, 25 m (nach statischer Methode mit SE-30 belegt). Injektortemperatur: 275°; Temperaturprogramm: 150–300°, 2°/min; Durchflussgeschwindigkeit (Helium): 5 ml/min; Ionisierungsenergie: 70 eV. Registrierung des Totalionenstroms bei 20 eV; LKB-2130-Datensystem mit PDP-11-05-Computer der Firma Digital Equipment.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Fig. 1 zeigt das Glaskapillargaschromatogramm der Steroidsulfatfraktion aus einem Plasmapool weiblicher Psoriatiker, dem in Fig. 2 ein Steroidprofil aus dem Plasma einer gesunden Frau gegenübergestellt ist. Hauptsteroid ist in beiden Plasmaproben das DHEA, jedoch ist in dem in Fig. 1 dargestellten Profil aus Psoriatikerplasma Androstendiol in stark erhöhter Menge vorhanden.

Auf die Zuordnung der übrigen GC-Peaks wurde in dieser Arbeit verzichtet, da das hier diskutierte Ergebnis hiervon nicht berührt wird. Entsprechende Arbeiten wurden bereits früher durchgeführt [1, 6].

Bei der Trimethylsilylierung ergab jedes Steroid bei exaktem Einhalten der Reaktionsbedingungen nur ein GC-Signal, von wenigen Ausnahmen abgesehen. In den Gaschromatogrammen einer Testmischung von 15 Steroiden zeigte sich, dass die Silylierung der 17-Ketogruppe der Androstanone in der angegebenen Reaktionszeit ca. 10% beträgt. Bei verlängerter Reaktionszeit wurden Androsteron und Etiocholanolon wesentlich langsamer als DHEA zum 17-Enolether umgesetzt, noch langsamer reagierte 11-Ketoandrosteron. Eine Enoletherbildung der 11-Ketogruppe hingegen wurde nie beobachtet. Von den Pregnanen des Testgemisches wurden α -Tetrahydrocortisol und Tetrahydrocortisol mit MSTFA in der angegebenen Zeit etwa nur zur Hälfte umgesetzt, alle anderen reagierten offenbar vollständig.

Die Ergebnisse dieser Derivatisierungsmethode sind gut reproduzierbar und für solche Untersuchungen, wie hier beschrieben, gut geeignet. Beispielsweise lieferten auch Wiederholungsmessungen mit jeweils frisch angesetzten Steroidtrimethylsilylethern aus Urinextrakten nahezu identische GC-Profile. Auf die Bestimmung von Standardabweichungen wurde verzichtet, da in dieser Arbeit nur qualitative und halbquantitative Auswertungen durchgeführt wurden.

In Übereinstimmung mit den Befunden von Oertel et al. [10] ist ein Men-

genverhältnis von Dehydroepiandrosteronsulfat zu Androstendiolsulfat im Blutplasma von Psoriatikern von 5:3 vorhanden. Dieses Verhältnis wurde bei unseren Messungen in etwa gleichem Ausmass beobachtet und ist im Gaschromatogramm aus den Peakhöhen der beiden Steroide ersichtlich.

Die Steroidprofile im Urin von Psoriasis-kranken wiesen kein einheitliches Muster auf, das sie charakteristisch von denen aus Urin von Kontrollpersonen unterscheiden liess.

Die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigen die von Holzmann et al. beschriebene Veränderung des Verhältnisses DHEA zu Androstendiol im Serum von Patienten mit Psoriasis vulgaris. Nicht nachvollziehen können wir hingegen die Beobachtungen einer unterschiedlichen Ausscheidungsrate an Steroiden im Harn. Der Urinsteroidgehalt ist stark abhängig vom Alter, so dass

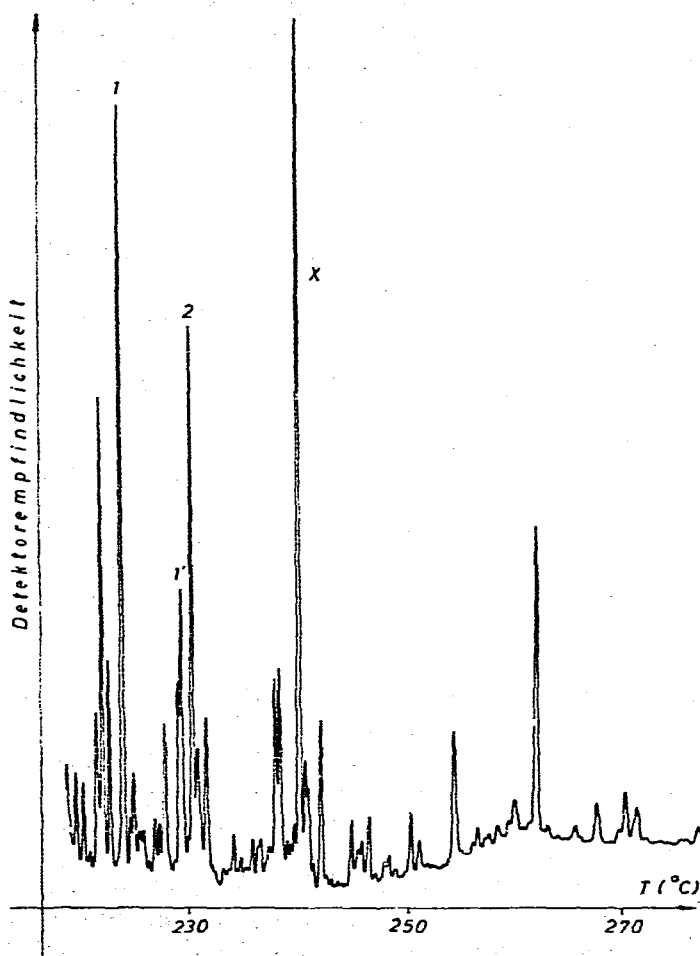


Fig. 1. Glaskapillargaschromatogramm der Steroidtrimethylsilylether, Sulfatfraktion aus Plasma weiblicher Psoriatiker. 24-m-Glaskapillarsäule, SE-30; Temperaturprogramm: 150–300°, 2°/min. 1 = DHEA (3β -Hydroxy-5-androsten-17-on); 1' = Enol von DHEA; 2 = Androstendiol ($3\beta,17\beta$ -Dihydroxy-5-androsten); x = Arzneimittelmetabolit.

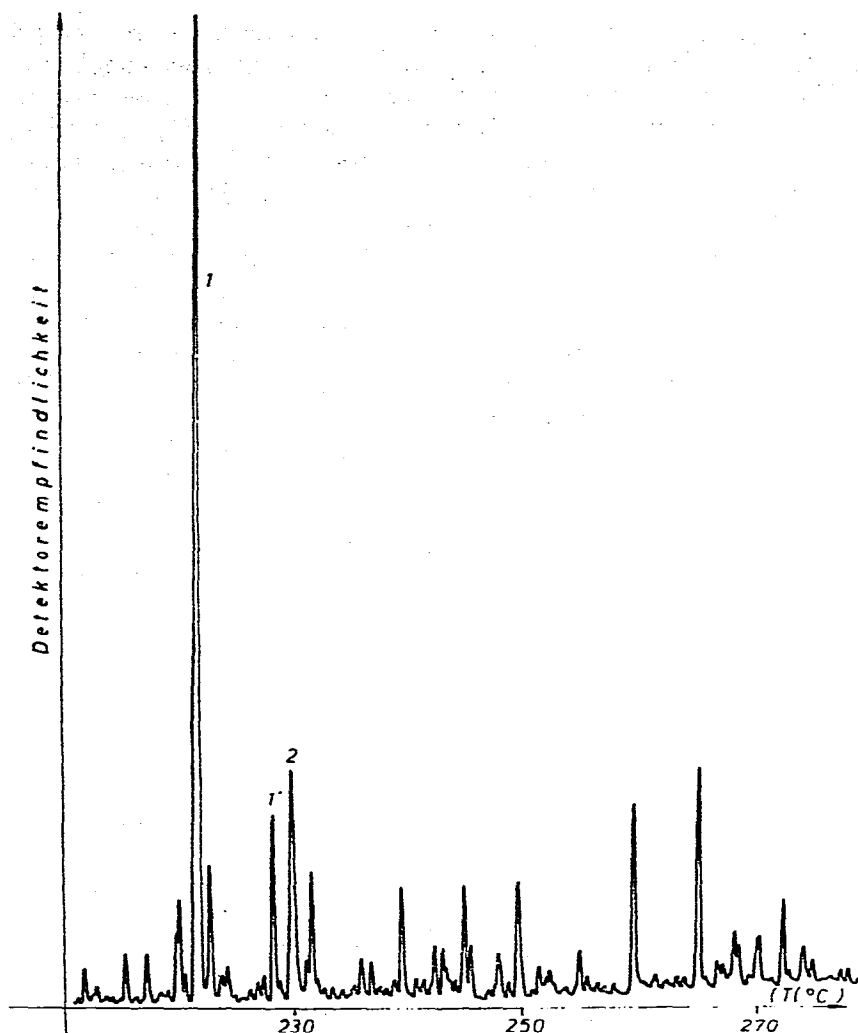


Fig. 2. Glaskapillargaschromatogramm der Steroidtrimethylsilylether, Sulfatfraktion aus Plasma einer gesunden Frau. Übrige Angaben wie in Fig. 1.

relative Schwankungen in der Grössenordnung von 50–100% durchaus noch als normal angesehen werden können [7].

Bei Radioimmunoassaymessungen, wie Holzmann et al. sie durchgeführt hatten, können immer nur einzelne Steroide erfasst und quantitativ gemessen werden. Mit der Massenfragmentographie, wie sie von der Arbeitsgruppe Sjövall [11, 12] eingesetzt wird, kann man weitere Informationen über die Zusammensetzung der Steroide in biologischen Proben erhalten. Neben bekannten Steroiden, die quantitativ bestimmt werden können, lassen sich auch unbekannte erfassen, von denen allerdings kein vollständiges Massenspektrum, sondern nur der Massenfragmentlauf ("fragment ion current") eines oder mehrerer Bruchstücke aufgezeichnet wird. Steroide, die diese Bruchstücke nicht enthalten, entziehen sich dem Nachweis. Mit der GC-MS-Kombination lassen

sich dagegen über den Totalionenstrom nun auch unbekannte Steroide auffinden und anhand ihrer Massenspektren interpretieren. Da die hier angewandte Methode zusätzlich einen direkten GC-Vergleich der Steroidmenge erlaubt, kommen die starken Änderungen in den Steroidprofilen (siehe Fig. 1 und 2) in Plasma von Gesunden und Psoriatikern viel stärker zum Ausdruck als bei Einzelmessungen. Nachteil dieser Methode ist eine relativ hohe Reinheitsanforderung an die isolierte Steroidfraktion. Liegt diese Fraktion nur als Spur in nicht abgetrennten Begleitstoffen vor, sind die Steroidmassenspektren oft mit Beimengungen anderer Verbindungen vermischt, was leicht zu Fehlinterpretationen führen kann. Bei Radioimmunoassaymessungen kommt man hingegen mit einer Extraktion der freien Steroide und bei der Massenfragmentographie mit nur einigen Trennstufen zur Anreicherung der Steroidfraktion aus, wodurch eine quantitative Messung erleichtert wird.

Die Bestätigung der von Holzmann et al. mittels anderer Methoden erhobenen Befunde durch unsere Messungen mit der Kombination GC—MS lassen weitere Untersuchungen über die Ursachen der Psoriasis vulgaris sinnvoll erscheinen, zumal dies die einzigen gesicherten Stoffwechselveränderungen bei dieser Erkrankung sind, die bis heute nur symptomatisch-empirisch therapiert werden kann.

LITERATUR

- 1 H. Ludwig, G. Spittler, D. Matthaai und F. Scheler, *J. Chromatogr.*, 146 (1978) 381.
- 2 J. Sonka, I. Gregorova, M. Jiranek, F. Kölbl und Z. Matys, *Endokrinologie*, 47 (1965) 152.
- 3 H. Holzmann, B. Morsches, R. Gebhardt, G. Hoffmann, P. Menzel und G.W. Oertel, *Z. Haut- Geschlechtskr.*, 45 (1970) 579.
- 4 B. Morsches, G. Hoffmann-Tiefz, G. Hoffmann, G.W. Oertel und H. Holzmann, *Arch. Dermatol. Forsch.*, 250 (1974) 269.
- 5 B. Morsches, H. Holzmann, G.W. Oertel und M. Biegenzer, *Arch. Dermatol. Forsch.*, 240 (1971) 204.
- 6 H. Ludwig, J. Reiner und G. Spittler, *Chem. Ber.*, 110 (1977) 217.
- 7 C.D. Pfaffenberger und E.C. Horning, *J. Chromatogr.*, 112 (1975) 581.
- 8 J. Bouche und M. Verzele, *J. Chromatogr. Sci.*, 6 (1968) 501.
- 9 J. Reiner, *Dissertation, Universität Göttingen*, 1978.
- 10 G.W. Oertel, P. Menzel, G. Hoffmann, H. Holzmann und B. Morsches, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 9 (1971) 28.
- 11 M. Axelson und J. Sjövall, *J. Chromatogr.*, 126 (1976) 705.
- 12 T.A. Baillie, R.A. Anderson K. Sjövall und J. Sjövall, *J. Steroid Biochem.*, 7 (1975) 203.