

**Aus dem CharitéCentrum 13 für Innere Medizin mit Kardiologie,
Gastroenterologie und Nephrologie der**

Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1 und adrenale Androgene unter durch Fettsäuren induzierter Insulinresistenz

zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Volker Kullmann aus
Stuttgart

Gutachter/in: 1. PD Dr. med. S. Diederich
 2. PD Dr. med. M. Quinkler
 3. Prof. Dr. T. Rehmer

Datum der Promotion: 04. Februar 2011

Inhaltsverzeichnis:

1 Einleitung

1.1 In vivo Aktivität der 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1 (11 β -HSD1) bei durch Fettsäuren induzierter Insulinresistenz

1.1.1 Metabolisches Syndrom, Glucocorticoide und Insulinresistenz

1.1.2 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenasen

1.1.3 Metabolisches Syndrom, Freie Fettsäuren und Insulinresistenz der Leber

1.1.4 Metabolisches Syndrom, Freie Fettsäuren und Insulinresistenz der Skelettmuskulatur

1.2 Beeinflussung der Konzentration adrenaler Androgene unter Fettsäureinfusion und Insulinresistenz in vivo

1.2.1 Polyzystisches Ovar-Syndrom (PCOS)

1.2.2 PCOS und Insulinresistenz

1.2.3 PCOS und freie Fettsäuren

1.2.4 Androgene und Steroidhormonbiosynthese

2 Fragestellung und Zielsetzung

2.1 Freie Fettsäuren und 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1

2.2 Freie Fettsäuren und Hyperandrogenämie beim PCO-Syndrom

3. Material und Methoden

- 3.1 Probanden
- 3.2 Studienablauf
- 3.3 Euglykämischer, hyperinsulinämischer Clamp mit Fettsäuren- oder Kochsalzinfusion
- 3.4 Cortison-Kinetik mit Fettsäuren- oder Kochsalzinfusion
- 3.5 Steroidmetabolite im Urin
- 3.6 Androgene
- 3.7 Labormethoden und Statistik

4. Ergebnisse

- 4.1 Freie Fettsäuren
- 4.2 Glukose, Glukoseinfusionsrate und Insulin
- 4.3 Cortisol, Cortison, Cortisol/Cortison-Ratio und ACTH
- 4.4 Urinsteroide
- 4.5 Androstendion
- 4.6 17-OH-Progesteron, DHEA
- 4.7 Testosteron und Östron
- 4.8 LH und FSH
- 4.9 Insulinkonzentration und r-Homa innerhalb der ersten vier Stunden

5 Diskussion

- 5.1 Diskussion der Methodik
- 5.2 11 β -HSD1 und freie Fettsäuren bzw. Insulinresistenz
 - 5.2.1 Freie Fettsäuren und Insulinresistenz
 - 5.2.2 Freie Fettsäuren und hepatische 11 β -HSD1-Aktivität
 - 5.2.3 Urinsteroide
 - 5.2.4 Selektive Betrachtung der 11 β -HSD1-Aktivität in verschiedenen Geweben
 - 5.2.5 11 β -HSD1-Aktivität bei Diabetes mellitus und Übergewicht

5.3 Androgene und freie Fettsäuren bzw. Insulinresistenz

5.3.1 Freie Fettsäuren und Androgene

5.3.1.1 17-Hydroxyprogesteron

5.3.1.2 DHEA

5.3.1.3 Androstendion, Östron

5.3.2. Androgene und Hyperinsulinämie/Insulinresistenz

5.3.3 Androgene und ACTH

5.3.4 Andere Ursachen der Hyperandrogenämie beim PCOS

6 Zusammenfassung

6.1 Freie Fettsäuren und 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1

6.2 Freie Fettsäuren und Hyperandrogenämie beim PCO-Syndrom

7 Literaturangaben

8 Abbildungen und Tabellen

9 Lebenslauf

10 Selbständigkeitserklärung

Liste der öfter gebrauchten Abkürzungen:

11 β -HSD1	11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1
11 β -HSD2	11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2
FFA	Freie Fettsäuren
THF	5 β -Tetrahydrocortisol
5 α -THF	5 α -Tetrahydrocortisol
THE	Tetrahydrocortison
UFF	Freies Cortisol
UFE	Freies Cortison
SEM	Standardfehler
SD	Standardabweichung
MW	Mittelwert
AUC	Area under the curve
PCOS	Polyzystisches Ovar-Syndrom
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteron-Sulfat

1 Einleitung

1.1 In vivo Aktivität der 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1 bei durch Fettsäuren induzierter Insulinresistenz

1.1.1 Metabolisches Syndrom, Glucocorticoide und Insulinresistenz

Das „Metabolische Syndrom“ oder auch „Syndrom X“ ist durch zentrale Adipositas mit Übergewicht, Dyslipoproteinämie mit ungünstiger Blutkonzentration von Triglyzeriden und/oder HDL und LDL-Cholesterin, Glucoseintoleranz und Insulinresistenz (erhöhte Nüchtern glucose, erhöhter 2h-Wert im oralen Glucosetoleranz-Test oder manifester Diabetes mellitus) sowie arterielle Hypertonie gekennzeichnet (1-3).

Diese Beobachtungen sind typischerweise auch beim Cushing-Syndrom zu machen. Es existieren eine Vielfalt von Nachweisen einer herabgesetzten Insulinsensitivität unter Glucocorticoidtherapie (4-7).

So verschlechtert sich beispielsweise eine diabetische Stoffwechsellage unter Glucocorticoidtherapie bei vorbestehendem Diabetes mellitus (8,9) und im oralen Glucosetoleranztest sind erhöhte Glucose- und Insulinwerte zu beobachten. Auch haben Patienten mit Cushing-Syndrom im euglykämischen Clamp eine erhöhte Insulinresistenz (7).

Aufgrund dieser Erkenntnisse ist eine pathogenetische Bedeutung von Cortisol bzw. Glucocorticoiden bei der Entstehung des metabolischen Syndroms nicht unwahrscheinlich.

Bezüglich der Glucosehomöostase sind für Cortisol zwei grundlegende Mechanismen bekannt:

1) Zum Einen führen Glucocorticoide zu einer Induktion der für die Gluconeogenese wichtigen Schlüsselenzyme Pyruvatcarboxylase, Fructose1,6-Carboxykinase sowie, cAMP-vermittelt, zur Induktion des PPARgamma-Coaktivator-1. Letzterer ist von großer Bedeutung für die Induktion der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase und Glucose-6-Phosphatase, was zu einer erhöhten Glucoseproduktion und -freisetzung führt (10).

Einen repressiven Effekt auf diese Stoffwechselfvorgänge hat als physiologischer Gegenspieler das Insulin.

2) Zum Anderen führt ein Glucocorticoidexzess über die Hemmung der Translokation des GLUT4 Glucosetransporters in die Zellmembran zur Insulinresistenz des Skelettmuskels. Es konnte auch gezeigt werden, dass Glucocorticoide die Empfindlichkeit der Regulation der Glykogensynthese und der Glucoseoxidation durch Insulin herabsetzen, wohingegen die Glykolyse unbeeinträchtigt bleibt. Diese Beobachtungen wurden am Soleus-Muskel der Ratte gemacht (11).

Daher lässt sich eine pathogenetische Rolle der Glucocorticoide in der Entwicklung der Insulinresistenz vermuten.

1.1.2 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenasen

Entgegen diesen Überlegungen ist aber durch mehrere Studien gut belegt, dass die Cortisolkonzentration im Blut beim metabolischen Syndrom gegenüber Kontrollkollektiven nicht erhöht ist (12-15).

Da die eigentliche Cortisolwirkung durch den Metabolismus in den Zielgeweben beeinflusst und reguliert wird, könnten aber trotz der normalen Cortisolkonzentrationen im Blut unterschiedliche Gewebekonzentrationen für Cortisol beim metabolischen Syndrom eine Rolle spielen.

Die lokale Gewebekonzentration des Cortisols wird hauptsächlich durch zwei Enzyme bestimmt:

1) Die 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1 (11 β -HSD1) fungiert in vivo vornehmlich als eine Oxo-Reduktase und metabolisiert beim Menschen inaktives Cortison in aktives Cortisol (16) (Abb.1).

Somit beeinflusst die 11 β -HSD1 die intrazelluläre Konzentration aktiver Glucocorticoide. Sie ist in nahezu allen Geweben zu finden.

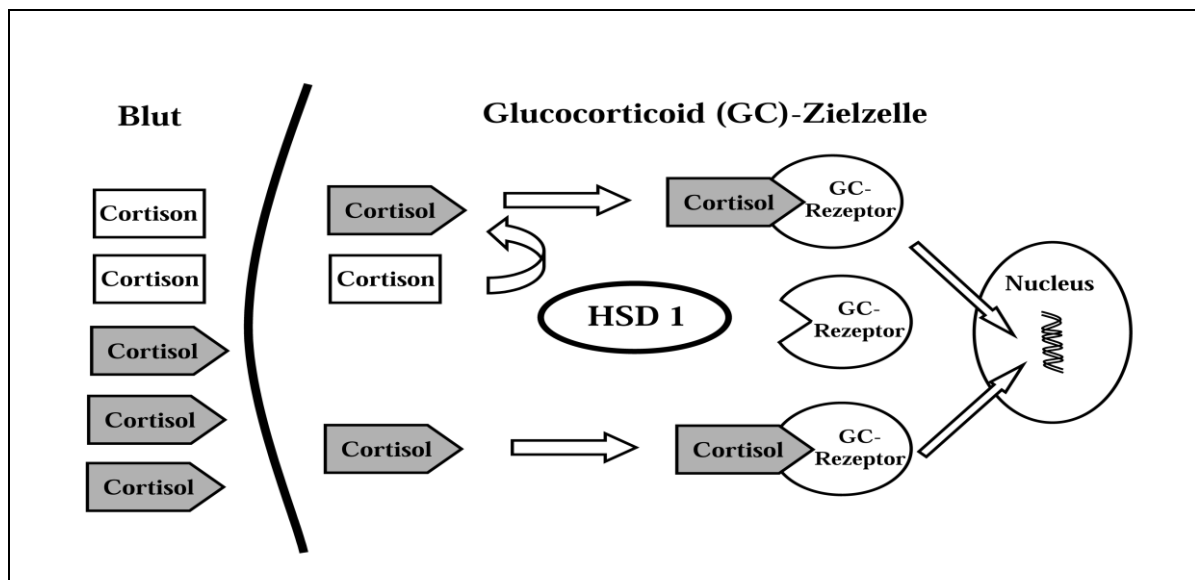


Abb. 1: Umwandlung von inaktivem Cortison zu aktivem Cortisol durch die 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 (11 β -HSD1). Das dargestellte Verhältnis zwischen freiem Cortisol und freiem Cortison im Blut (3 : 2 = 1,5) entspricht in etwa den physiologischen Bedingungen (17). Grafik mit freundlicher Genehmigung adaptiert aus der Habilitationsschrift von S. Diederich (18).

2) Zum Anderen fungiert die 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2 (11 β -HSD2) ausschließlich als eine Dehydrogenase, welche aktives Cortisol in inaktives Cortison überführt. Sie ist hauptsächlich in Colon, Plazenta und Nierengewebe zu finden (19). In Niere und Colon schützt die 11 β -HSD2 den Mineralocorticoidrezeptor vor einer Aktivierung durch Cortisol und bewahrt dadurch die Selektivität des Aldosterons als Mineralocorticoid. Aldosteron ist kein Substrat der 11 β -HSD2 und kann dadurch ungestört den Mineralocorticoidrezeptor erreichen. In allen 11 β -HSD2-exprimierenden Organen wird durch dieses Enzym aber auch gleichzeitig der Zugang des Cortisols zum Glucocorticoidrezeptor reguliert (Abb. 2).

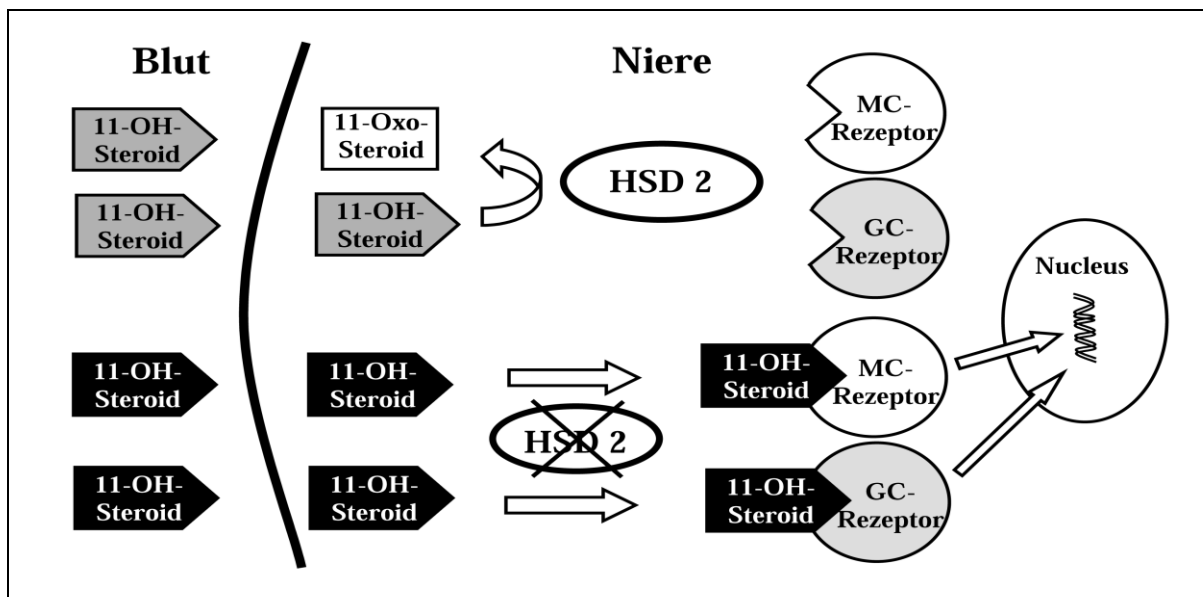


Abb. 2: Regulation renaler Mineralocorticoid (MC)- und Glucocorticoid (GC)-Rezeptoren durch die 11 β -HSD2. Die 11 β -HSD2 in der Niere ist hauptsächlich in den Mineralocorticoid-Zielzellen (distaler Tubulus, Sammelrohr) exprimiert (20-22). Es zeigt sich aber in Untersuchungen von Homogenaten des gesamten Organs eine eindeutig stärkere Expression als die der 11 β -HSD1 (23). Sie ist somit der determinierende Faktor für das 11-Hydroxy-/11-Oxo-Gleichgewicht (Cortisol/Cortison) in der Niere (24). Grafik mit freundlicher Genehmigung adaptiert aus der Habilitationsschrift von S. Diederich (18).

Beide 11 β HSD-Enzyme sind somit sehr entscheidende Determinanten der Cortisolwirkung in den Zielorganen (19).

Denkbar ist, dass eine erhöhte Cortisolkonzentration in den Zielgeweben als Folge einer lokal erhöhten Aktivität der 11 β -HSD1 eine pathogenetische Rolle in der Entstehung des metabolischen Syndroms spielt.

Diese könnte in der Leber zu einer Erhöhung der Schlüsselenzyme der Gluconeogenese führen und damit eine erhöhte hepatische Glucoseproduktion bewirken. Letztlich könnte hierdurch dann eine erhöhte hepatische Insulinresistenz resultieren.

Übereinstimmend mit dieser Annahme fanden Koteletsev et al. bei 11 β -HSD1 Knockout-Mäusen eine erhöhte Resistenz gegenüber Hyperglykämie als Folge abgeschwächter Aktivierung der hepatischen Schlüsselenzyme der Gluconeogenese (25).

Daten von Morton et al. weisen ebenfalls bei Mäusen auf eine Verbesserung des Lipidprofils, der Glucosetoleranz und der hepatischen Insulinempfindlichkeit bei 11 β -HSD1- Defizienz hin (26).

Bei einer spezifischen Überexpression der 11 β -HSD1 im Fettgewebe und vermehrter Aktivierung endogener Glucocorticoide entwickeln transgene Mäuse eine zentrale Adipositas. Bei diesen Tieren wurden zusätzlich eine gestörte Glucosetoleranz, eine Insulinresistenz und eine Hyperlipidämie, alles Symptome des metabolischen Syndroms, festgestellt (27).

Zusammenfassend lassen diese Erkenntnisse die lokale Aktivierung von Cortison durch die 11 β -HSD1 als Ursache der Entwicklung einer Insulinresistenz und eines metabolischen Syndroms vermuten.

1.1.3 Metabolisches Syndrom, freie Fettsäuren und Insulinresistenz der Leber

Es ist bekannt, dass eine Erhöhung der freien Fettsäuren (FFA) im Blut zu peripherer und hepatischer Insulinresistenz führt und das Risiko zur Entwicklung eines Diabetes bei erhöhten Triglyceriden steigt, was bei den meisten Übergewichtigen der Fall ist (28-30).

Experimentell lässt sich eine Insulinresistenz durch kurzzeitige Infusion von freien Fettsäuren nach zwei bis vier Stunden herbeiführen. Diese hält nach Beendigung der Infusion für etwa vier Stunden an (30-33).

Die hepatische Insulinresistenz entsteht durch die Blockierung der hemmenden Insulinwirkung auf Glykogenolyse und Gluconeogenese durch Fettsäuren (31-38). Genauere Mechanismen sind unklar.

Es finden sich aber wie beim Skelettmuskel (s.u.) vermehrte Konzentrationen intrazellulärer Triglyceride in der Leber (39-44).

Werden die freien Fettsäuren im Plasma gesenkt, so verbessert sich die Insulinsensitivität (45).

1.1.4 Metabolisches Syndrom, freie Fettsäuren und Insulinresistenz der Skelettmuskulatur

Mehr als 80 % der durch freie Fettsäuren vermittelten Insulinresistenz findet in der Skelettmuskulatur statt. Ein Mechanismus ist ein verminderter Glucose-transport in die Muskelzellen. Dressner et al. konnten mittels C13 markierter Glucose und Magnetresonanzspektroskopie zeigen, dass die intrazelluläre Glucoseaufnahme während fettsäurevermittelter Insulinresistenz nicht ansteigt (46).

Es lässt sich mittels Wasserstoffmagnetresonanzspektroskopie zeigen, dass vier Stunden nach Erhöhung der freien Fettsäuren im Plasma die intrazellulären Triglyceride ansteigen (45).

Die Tatsache, dass dieser Effekt zwei bis vier Stunden nach artifizierlicher Fettsäureexposition auftritt, gibt Grund zu der Annahme, dass freie Fettsäuren intrazellulär wieder verestert werden müssen, um eine Insulinresistenz zu verursachen.

Diese Hypothese wird auch durch Tierexperimente unterstützt, die den engen Zusammenhang zwischen intrazellulärem Fett und Insulinresistenz belegen (47).

Des Weiteren haben transgene Mäuse mit einer muskelspezifischen Überexpression der Lipoproteinlipase einen erhöhten Gehalt an intrazellulärem Fett und sind insulinresistent (44).

Diese Daten liefern aber keinen Beweis für einen direkten biochemischen Zusammenhang zwischen Insulinresistenz und intrazellulärer Triglyceridkonzentration. Vielmehr ist die Insulinresistenz ein Phänomen, welches bei der intramyozellulären Triglyceridsynthese oder auch deren Abbau auftreten könnte.

So aktivieren beispielsweise in verschiedenen Versuchen am Menschen und am Tier die Metabolite des Triglyceridstoffwechsels, Diacylglycerol und langkettiges Acylcoenzym A, die Proteinkinase C, eine Serin/Threonin-Kinase, welche die Insulinwirkung durch Phosphorylierung des Serins des Insulinrezeptors hemmen kann (48-53). Bei gesunden Probanden erhöht ein Anheben der freien Fettsäuren im Plasma die Aktivität der membranassoziierten Proteinkinase C um das Vierfache und die intramyozelluläre Diacylglyceridkonzentration um das Dreifache (54).

Es gibt also Hinweise darauf, dass Insulinresistenz im Rahmen des intrazellulären Triglyceridstoffwechsels entsteht.

1.2 Beeinflussung der Konzentration adrenaler Androgene unter Fettsäureinfusion und Insulinresistenz in vivo

1.2.1 Polyzystisches Ovar-Syndrom (PCOS)

Das Polyzystische Ovar-Syndrom ist eine häufige endokrine Störung und betrifft etwa eine von 15 Frauen weltweit (55), wobei übergewichtige oder adipöse Frauen etwa sechs Mal öfter betroffen sind als normalgewichtige (56,57). Aufgrund der klinischen Symptomatik (Zyklusstörungen und Hirsutismus) sind PCOS-Patientinnen oftmals einfach zu identifizieren. Es existieren aber verschiedene Definitionen zur Diagnosestellung des PCOS, bei denen mögliche paraklinische Befunde unterschiedlich gewichtet werden (57). Laut Definition der Konferenz der „European Society of Human Reproduction and Embryology“ (ESHRE) und der „American Society for Reproductive Medicine“ (ASRM), die 2003 in Rotterdam vorgestellt wurde (58,59), liegt ein PCOS vor, wenn zwei der drei folgenden Kriterien erfüllt werden:

- Polyzystische Ovarien
- Oligo- und/oder Anovulation
- klinische oder laborchemische Zeichen eines Hyperandrogenismus, nach Ausschluss anderer endokriner Erkrankungen (60).

Polyzystische Ovarien sind kein zwingendes Diagnosekriterium mehr, da sie auch bei unauffälligem Zyklus häufig vorkommen. Daher werden sie als begleitende Erscheinung, wenngleich historisch namengebend, betrachtet. Es besteht also ein Syndrom, bei dem die klinischen und paraklinischen Symptome Zyklusstörung, Hyperandrogenämie, gestörte Glucosehomöostase, Hirsutismus und Übergewicht auftreten. Da diese Befund im Einzelnen oder

zusammen auch bei anderen Erkrankungen auftreten können, ist es wichtig, andere endokrine Ursachen auszuschließen.

Krankheitswert erfährt die Störung neben den durch die Virilisierung entstehenden teils beträchtlichen kosmetischen Problemen auch durch ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Diabetes mellitus und damit erhöhtem kardiovaskulären Risiko, eines Endometrium-Carcinoms und von Infertilität (61-64).

1.2.2 PCOS und Insulinresistenz

Die Insulinresistenz ist ein häufiges Merkmal und wird als eine führende Ursache in der Entwicklung der Hyperandrogenämie angesehen, zumal Androgenspiegel und Hyperinsulinämie positiv korrelieren (65). Basale und durch ACTH stimulierte Androgenspiegel sind im Blut bei PCOS-Patientinnen mit Diabetes mellitus im Vergleich zu solchen mit normaler Glucosetoleranz erhöht (66). Der Mechanismus der durch Hyperinsulinämie induzierten Hyperandrogenämie könnte sein, dass dabei die Menge an Sexualhormon-bindendem Globulin (SHBG) reduziert ist und es somit zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit von Testosteron kommt. Auch ist ein direkter Einfluss auf den Hypothalamus oder die Hypophyse durch Hyperinsulinämie und somit auf die Freisetzung von Gonadotropinen denkbar, was zur Erhöhung der Androgenspiegel führt.

Es ist bekannt, dass Insulinresistenz an den Geweben selektiv auftreten kann. Während also z.B. der Stoffwechsel der Skelettmuskulatur bei Vorliegen einer Insulinresistenz unbeeinflusst von Insulin bleibt, könnten andere Organe, wie beispielsweise die Nebenniere und die Ovarien in ihrem Stoffwechsel beeinträchtigt werden (57).

Die Nebennierenrinde ist die Hauptsynthesestelle für DHEA, DHEAS und Androstendion bei Frauen. Androgene werden aber auch im Fettgewebe

gebildet (67,68). Beim PCOS werden sie in relevanten Mengen in den Ovarien gebildet.

Dass ein Zusammenhang zwischen Hyperinsulinämie bzw. Insulinresistenz und Hyperandrogenämie bestehen muss, zeigt sich in der Erkenntnis, dass die Behandlung mit Medikamenten, die die Insulinempfindlichkeit der Gewebe positiv beeinflussen, auch die Merkmale der Hyperandrogenämie verbessern (69-72). Weiterführende Beobachtungen diesbezüglich zeigen eine erhöhte Aktivität der 5 α -Reduktase (SRD5) bei Patientinnen mit PCOS. Von diesem Enzym existieren zwei Isoformen, die als 5 α -Reduktase Typ I und 5 α -Reduktase Typ II bezeichnet werden und deren Gene (SRD5A1 und SRD5A2) auf verschiedenen Chromosomen liegen. Beide Isozyme ermöglichen die Umwandlung des Sexualhormons Testosteron in das biologisch wirksamere Dihydrotestosteron.

Interessanterweise scheint ein Zusammenhang zwischen Hyperinsulinämie und 5 α -Reduktase-Aktivität bei Patientinnen mit PCOS, unabhängig vom Körpergewicht, zu bestehen, d.h. dass diese Beobachtung auch bei schlanken Frauen mit PCOS gemacht werden kann. Auch kann man unter Therapie mit Medikamenten, die die Insulinsensitivität verbessern, einem Abfall der 5 α -Reduktase-Aktivität sehen. Pathophysiologische Zusammenhänge sind bislang unklar. Es kann aber spekuliert werden, ob eine genetisch bedingte Fehlfunktion einer Serin/Threonin-Kinase sowohl den Insulinrezeptor im Sinne einer Resistenzentwicklung und Enzyme der Androgensynthese im Sinne der Entwicklung einer Hyperandrogenämie verursacht und somit eine pathophysiologische Verbindung zwischen den Phänomenen Insulinresistenz und Hyperandrogenämie besteht (73-75).

1.2.3 PCOS und freie Fettsäuren

Wie bereits erwähnt, ist eine Erhöhung freier Fettsäuren ebenfalls mit Insulinresistenz verbunden und kommt bei Frauen mit PCOS gehäuft vor (76). Sie stimulieren die Insulinsekretion und führen zu peripherer und hepatischer Insulinresistenz (s.o. sowie 30, 76-78, 79).

Daher kann man spekulieren, ob freie Fettsäuren alleine, die Hyperinsulinämie oder beides gemeinsam die Hyperandrogenämie verursachen.

Interessanterweise lassen sich offenbar bei Männern durch fettreduzierte Diät die Androgenspiegel im Blut senken (80-83).

Bei gesunden Männern scheint eine hohe Fettzufuhr mit geringem Ballaststoffanteil zu einem Anstieg des Testosterons zu führen (69). DHEAS, Androstendion, Testosteron und 5α -Dihydrotestosteron fallen bei fettarmer, faserreicher Diät ab (84).

Es konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme einer fettreichen Mahlzeit schnell zu reduzierten Testosteronwerten führt, wobei die LH-Sekretion nicht beeinflusst wird (80). Auch das spricht für die Annahme, dass freie Fettsäuren den Androgenhaushalt modulieren.

In klinischen Studien wird die Auswertung dadurch kompliziert, dass die Androgenregulation gewebeabhängig sein könnte und freie Fettsäuren unterschiedliche Effekte auf Ovarien und Nebennierenrinde haben könnten.

Dass ovarielle sowie adrenale Hyperandrogenämie eine Rolle beim PCOS spielen, ist bekannt (85). Wenngleich die Nebennierenrinde eine wichtige Quelle von Androgenen bei Frauen ist, so werden DHEA, DHEAS und Androstendion offenbar auch in relevanten Mengen in den Ovarien gebildet (86,87).

1.2.4 Androgene und Steroidhormonbiosynthese

Die Nebennierenrinde ist die Hauptsynthesestelle für DHEA, DHEAS und Androstendion bei Frauen.

Bei Männern werden diese Androgene nahezu ausschließlich, wenn nicht sogar gänzlich, von der Nebennierenrinde sezerniert. Eine weitere Umwandlung in Testosteron findet allerdings wohl nicht statt. Damit liegt die Hauptproduktionsstätte für Testosteron beim Mann in den Hoden. In der Nebennierenrinde gebildetes DHEA wird sulfatiert, als DHEAS ins Plasma abgegeben, von den Testes aufgenommen und als Testosteronvorläufer verwendet. Im Folgenden soll ein Überblick über die Produktion der einzelnen Steroidhormone gegeben werden:

Steroidhormone bestehen aus den Grundbausteinen der Lipide, weisen aber eine zyklische Konfiguration auf. Aus AcetylCoA entsteht Isopren, woraus Squalen synthetisiert wird, welches letztlich die Vorstufe zu „der“ Steroidvorläufersubstanz, dem Cholesterin, darstellt. Hierfür werden 6 Isoprenmoleküle benötigt. Fertiges Cholesterin hat 27 C-Atome und wird verestert im Cytosol von Steroidhormon-produzierenden Zellen in Form von Lipidtröpfchen gespeichert. Geschwindigkeitsbestimmendes Enzym ist die HMG-CoA-Reduktase (β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA-Reduktase). Die Freisetzung erfolgt, durch cAMP stimuliert, über die Aktivierung einer Proteinkinase A, welche die Phosphorylierung und somit Aktivierung der Cholesterinesterhydrolase bewirkt.

Die weitere Androgensynthese findet in den Mitochondrien sowie im endoplasmatischen Retikulum statt. Produktionsstätte von Steroidhormonen sind die Nebennierenrinde sowie die Gonaden. Die Enzymausstattung ist nahezu identisch. In der Nebenniere lassen sich histologisch drei Zonen unterscheiden, von außen nach innen die *Zonae glomerulosa*, *fasciculata* und *reticularis*. In der *Zona glomerulosa* werden hauptsächlich Mineralokortikoide, in der *Zona fasciculata* hauptsächlich Glukokortikoide und in der *Zona reticularis* vorwiegend Androgene gebildet.

CRH (Coroticotropin-releasing-Hormon) erreicht über das portale Gefäßsystem den Hypophysenvorderlappen und stimuliert dort die Sekretion von ACTH (Adrenocorticotropes Hormon), welches über den Blutkreislauf die Nebennierenrinde erreicht und dort vorwiegend die Freisetzung von Cortisol und DHEA reguliert (88,89).

Glukokortikoide und Mineralokortikoide sind C-21-Steroide (21 C-Atome), wohingegen Androgene, egal welchen Ursprungsgewebes, immer C-19-Steroide sind und durch Abspaltung zweier C-Atome in Position 17 entstehen. Das Ovar, aber auch im geringeren Maß die Testes, können durch Aromatisierung des A-Ringes aus C-19-Steroiden Östrogene produzieren. Zu Nomenklatur und Biosyntheseübersicht siehe bitte Abb. 3 und das Übersichtsschaubild Abb. 4.

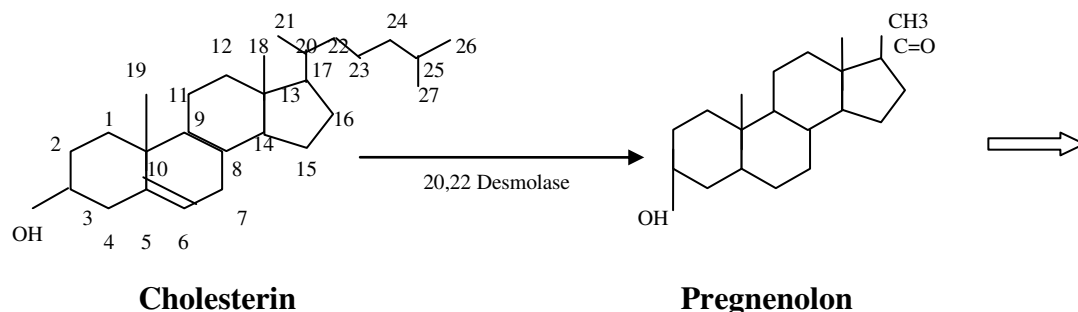
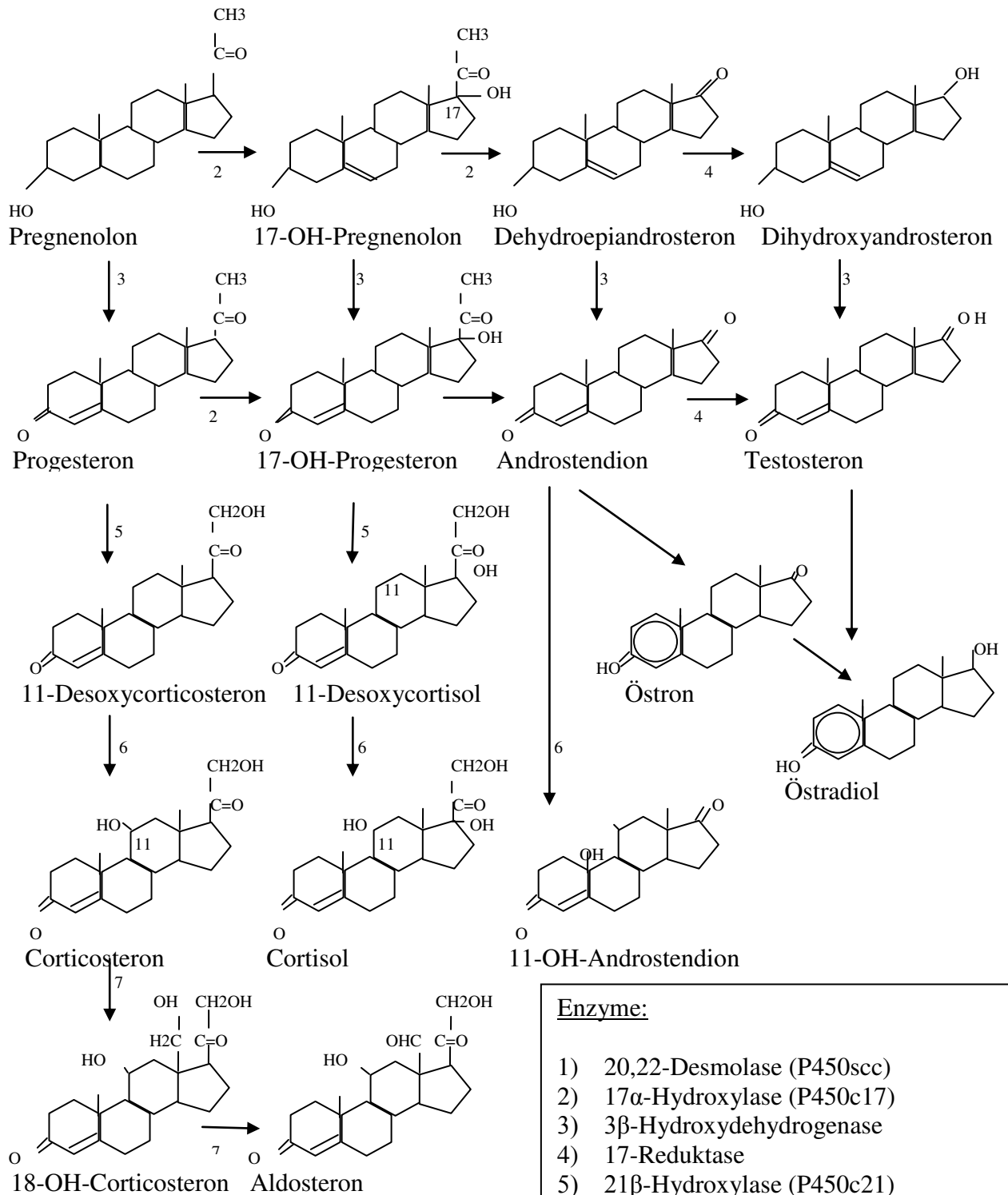


Abb. 3 Cholesterin ist der Grundbaustein aller Steroidhormone. Nach Transport ins Mitochondrium findet mittels 20,22-Desmolase (P450scc, StaR= Steroidogenic acute regulatory Protein) die Umsetzung in Pregnenolon statt. Der weitere Stoffwechsel findet dann im endopl. Retikulum statt (Abb. 4).

Abb. 4 Biosynthese der Steroidhormone. Produktionsstätte von Steroidhormonen sind die Nebennierenrinde sowie die Gonaden. Glucokortikoide und Mineralokortikoide sind 21-C Steroide, Östrogene und Androgene 19-C Steroide.



- Enzyme:**
- 1) 20,22-Desmolase (P450scc)
 - 2) 17 α -Hydroxylase (P450c17)
 - 3) 3 β -Hydroxydehydrogenase
 - 4) 17-Reduktase
 - 5) 21 β -Hydroxylase (P450c21)
 - 6) 11 β -Hydroxylase (P450c11)
 - 7) Aldosteronsynthetase (P450c18AS)

2 Fragestellung und Zielsetzung

2.1 Freie Fettsäuren und 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1

Freie Fettsäuren vermitteln hepatische und skelettmuskuläre Insulinresistenz und könnten somit Teil der Pathophysiologie bei der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 sein. Verantwortlich für diesen Effekt scheinen intrazelluläre Mechanismen zu sein, die ihrerseits eng mit der Konzentration freier Fettsäuren (FFA) verknüpft zu sein scheinen.

Ein Überschuss an Cortisol, wie er z.B. bei einem Cushing-Syndrom auftritt, iatrogen verursacht wird oder auch tierexperimentell durch Überexpression der 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase herbeizuführen ist, verursacht eine gestörte Glucosetoleranz wie sie beim metabolischen Syndrom zu finden ist. Ein sehr wichtiger para- und autokriner Mechanismus zur Regulation der intrazellulären Konzentration des Cortisols ist die 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1, welche das Gleichgewicht zwischen inaktivem Cortison und aktivem Cortisol einstellt.

Inwieweit freie Fettsäuren die Aktivität der 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1, die in allen Geweben vorkommt, beeinflussen und somit ein Hinweis auf die Entwicklung des metabolischen Syndroms als „FFA-induziertes Cushingssyndrom“ besteht, sollte in dieser Versuchsreihe geklärt werden.

2.2 Freie Fettsäuren und Hyperandrogenämie beim PCO-Syndrom

Fette scheinen einen Einfluss auf Androgenspiegel im Blut zu haben. Es ist bekannt, dass freie Fettsäuren Insulinresistenz vermitteln. Dieses ist ein häufig beobachtetes Phänomen beim PCOS.

Ob freie Fettsäuren in vivo einen direkten Einfluss auf ins Blut sezernierte Androgenmengen haben, ist bisher nicht geklärt.

In dieser Doktorarbeit sollte durch euglykämischen Clamp geklärt werden, ob freie Fettsäuren selbst oder/und die etwas verzögert einsetzende konsekutive Insulinresistenz zur Erhöhung von Androgenen führt.

3 Material, Methoden und Probanden

3.1 Probanden

Nach 10stündigem nächtlichen Fasten wurden sechs gesunde, leicht übergewichtige junge Männer in einer prospektiven Studie untersucht.

Alter, Körpergewicht, Größe, Waist-to-hip-Ratio, BMI und Blutdruck sind in Tabelle 1 ersichtlich.

In der medizinischen Vorgeschichte waren arterielle Hypertonie, Typ 2-Diabetes mellitus, Nieren-/Lebererkrankungen, Dyslipidämie oder Herzfehler ausgeschlossen.

Familienanamnestisch bestanden kein Diabetes mellitus oder andere endokrine Erkrankungen.

Über den Zeitraum der Untersuchung nahm keiner der Probanden Medikamente ein. Bei allen Probanden wurde initial eine körperliche Untersuchung inklusive einer Bestimmung von Standardlaborwerten durchgeführt, um aktuelle systemische Erkrankungen oder eine gestörte Nierenfunktion auszuschließen (siehe Tabelle 2). Hierbei ergaben sich keine Auffälligkeiten. Diabetes, gestörte Glukosetoleranz oder erhöhte Nüchtern glukose wurden mittels oralem Glukosetoleranztest (90) ausgeschlossen. Das Körpergewicht war während der letzten zwei Monate stabil.

Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von jedem Patienten unterzeichnet. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Charité, Universitätsmedizin Berlin, genehmigt (Ethikvotumnummer: ek. 211-02a).

Jeder Proband unterzog sich einem 4-Tages-Protokoll in zufälliger Reihenfolge. Um Interaktionen der einzelnen Versuchstage untereinander zu vermeiden, wurden mindestens zwei Tage Abstand eingehalten. Zur besseren Übersicht sind die einzelnen Versuchstage im Verlauf fortlaufend durchnummeriert.

Nach 10stündigem Fasten wurden um 08.00 Uhr morgens zwei Venen-Verweilkanülen, jeweils eine an jedem Unterarm, zum Einen für die Infusionen und zum Anderen für die Blutentnahmen, gelegt.

Tabelle 1: Probandendaten

	MW		SD
Alter (Jahre)	28,0	±	2,9
Gewicht (kg)	92,7	±	11,4
Grösse (cm)	183,7	±	4,5
BMI (kg/m ²)	27,5	±	3,1
Systolischer Blutdruck (mmHg)	133,3	±	6,8
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	77,5	±	12,5
WHR (waist-to-hip ratio)	0,98	±	0,08

Tabelle 2: Laborwerte der Probanden

	MW \pm S.E.M.
Cholesterol (mmol/l)	5.0 \pm 0.3
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.4 \pm 0.1
LDL-cholesterol (mmol/l)	3.0 \pm 0.2
Triglyceride (mmol/l)	1.4 \pm 0.2
Protein (g/l)	65.6 \pm 2.3
CRP (mg/l)	0.9 \pm 0.4
Kreatinin (μ mol/l)	85.8 \pm 3.0
Nüchtern Insulin (mU/l)	6.1 \pm 1.1
Nüchtern Glucose (mmol/l)	5.3 \pm 0.2
2-Stunden Glucose (mmol/l)	4.7 \pm 0.5

3.2 Studienablauf


























Auf den folgenden Seiten wird der Ablauf der einzelnen Versuchstage erklärt und tabellarisch dargestellt. Wie erwähnt, wurden mindestens zwei Tage Abstand zwischen den einzelnen Versuchstagen eingehalten um eine gegenseitige Beeinflussung zu vermeiden (Abb. 5-8).

3.3 Euglykämischer, hyperinsulinämischer Clamp mit Fettsäuren- oder Kochsalzinfusion

Am ersten Tag (Abb. 5) wurde eine 0,9 %ige Kochsalzlösung (Isotonische Kochsalzlösung Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany) mit Heparin (0,4 U/kg/min., Heparin-Natrium, Ratiopharm GmbH, Ulm, Germany) mit einer Geschwindigkeit von 1,5 ml/min. über sechs Stunden infundiert.

Vier Stunden nach Start der Kochsalzinfusion wurde ein euglykämischer, hyperinsulinämischer Clamp (91) durchgeführt. Zuvor hielten die Patienten Ruhe und es wurden in stündlichem Abstand Blutentnahmen für Insulin, freie Fettsäuren, Kalium, Glucose, ACTH und Androgene gewonnen. Beginn des Clamps war um 12.00 Uhr mittags. Dieser dauerte 2 ½ Stunden.

Es wurden 40 mIU/m²/min. humanes Insulin (Actrapid®, Novonordisk, Bagsvaerd, Denmark) und eine variable Infusion von 10 %iger Glukose (Glucose 10%, Serag-Wiesner, Naila, Germany) infundiert. Die Insulininitialdosis wurde wie von DeFronzo beschrieben berechnet (91). Die kapillare Blutglukose wurde alle fünf Minuten gemessen und zwischen 4,0 und 4,9 mmol/l mittels variierender Glukoseinfusionsrate gehalten (steady-state).

		Versuchstag 1																								
h		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
Kochsalzinfusion																										
Fettsäureinfusion																										
Clamp																										
Cortisonkinetik																										
Medikation																										
Sammelurin																										

→ bis 08:00

Abb. 5
 Urin wurde in je zwei Portionen von 08.00 bis 20.00 h und 20.00 bis 08.00h des Folgetages gesammelt

Am zweiten Tag (Abb. 6) erfolgte ein identischer Versuchsaufbau mit dem Unterschied, dass jetzt anstatt Kochsalzinfusion eine Lipidinfusion (Lipovenös 20 %; Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Germany) mit Heparin mit einer Geschwindigkeit von 1,5 ml/Min. über sechs Stunden infundiert wurde. Blutproben wurden vor Lipid/Heparin- oder Kochsalzinfusionen, vor Clamp-Beginn und zwei Stunden nach Erreichen einer konstanten Euglycämie entnommen. Alle Infusionen wurden über denselben venösen Zugang verabreicht, während die Blutentnahmen über den zweiten Zugang am kontralateralen Arm erfolgte. Die Blutproben wurden zentrifugiert, Plasma und Serum wurden unmittelbar bei -80°C eingefroren.

	Versuchstag 2																							
h	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Kochsalzinfusion																								
Fettsäureinfusion																								
Clamp																								
Cortisonkinetik																								
Medikation																								
Sammelurin																								

→ bis 08:00

Abb. 6
 Urin wurde in je zwei Portionen von 08.00 bis 20.00 h und 20.00 bis 08.00h des Folgetages gesammelt

3.4 Cortison-Kinetik mit Fett- oder Kochsalzinfusion

Eine Methode um die Aktivität der hepatischen 11- β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1 beim Menschen zu bestimmen, ist das Messen der Plasma-Cortisol-Werte nach oraler Einnahme von Cortisonacetat (92, 93).

Um die endogene Cortisol-Produktion zu unterdrücken, nahm jeder Proband am dritten Versuchstag (Abb. 7) um 24.00 Uhr vor Testdurchführung 1 mg orales Dexamethason (Fortecortin®, Merck KGaA Darmstadt, Deutschland) sowie ein weiteres Mal 0,5 mg um 10.00 Uhr morgens nach 10stündigem nächtlichen Fasten ein.

Am nächsten Morgen wurde eine Venenverweilkanüle gelegt und eine 0,9 %ige Kochsalzlösung mit Heparin (0,4 U/kg/min.) mit einer Geschwindigkeit von 1,5 ml/min. über sechs Stunden infundiert. Vier Stunden nach Infusionsbeginn nahm jeder Proband 37,5 mg Cortisonacetat ein (Cortisonacetat Ciba, CIBA AG, Basel, Schweiz).

Über einen Venenkatheter am kontralateralen Arm erfolgten über fünf Stunden halbstündliche Blutentnahmen zur Bestimmung von Serum-Cortisol und Serum-Cortison. Eine basale Blutentnahme erfolgte unmittelbar vor Einnahme von Cortisonacetat. Auch hier wurden die Blutproben zentrifugiert, Serum und Plasma wurden unmittelbar bei -80°C eingefroren.



		Versuchstag 3																							
h		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Kochsalzinfusion																									
Fettsäureinfusion																									
Clamp																									
Cortisonkinetik																									
Medikation		D									D		C												
Sammelurin																									

Abb. 7

Medikation: D: 00:00 h 1mg Dexamethason oral; 10:00 h 0,5 mg Dexamethason oral;
C: 12:00 h 37,5 mg Cortisonacetat oral.

Am vierten Versuchstag (Abb. 8) wurde derselbe Versuchsaufbau durchgeführt. Auch jetzt wurde anstelle von Kochsalzlösung eine Lipidlösung mit Heparin (0,4 E/kg/Min.) mit einer Geschwindigkeit von 1,5 l/Min. über sechs Stunden infundiert.



		Versuchstag 4																							
h		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Kochsalzinfusion																									
Fettsäureinfusion																									
Clamp																									
Cortisonkinetik																									
Medikation		D									D		C												
Sammelurin																									

Abb. 8

Medikation: D: 00:00 h 1mg Dexamethason oral; 10:00 h 0,5 mg Dexamethason oral;
C: 12:00 h 37,5 mg Cortisonacetat oral.

3.5 Steroidmetabolite im Urin

Die Aktivitäten der 11- β -Hydroxysteroiddehydrogenasen lassen sich anhand der Konzentrationen des Cortisonmetaboliten Tetrahydrocortison (THE) und der Cortisolmetaboliten 5 β -Tetrahydrocortisol und 5 α -Tetrahydrocortisol (THF und 5 α -THF) im Urin bestimmen. Für die Aktivität der 11- β -HSD 1 bildeten wir den Quotienten $(5\text{-}\alpha\text{-THF} + \text{THF})/\text{THE}$ und für die 11- β -HSD 2 den Quotienten aus freiem Cortisol und freiem Cortison (UFF/UFE).

Die Aktivitäten der 5- α - und 5- β -Reduktasen wurden über die Bildung des THF/ α -THF-Quotienten bestimmt. Desweiteren wurde der Quotient aus 5- α -THF/UFF, THF/UFF und THE/UFE bestimmt (94).

Der Urin wurde hierfür an allen Versuchstagen mit euglykämischem, hyperinsulinämischem Clamp in zwei Portionen gesammelt:

Eine Portion wurde von 08.00 Uhr morgens des Versuchstags bis 20.00 Uhr gesammelt, die zweite ab 20.00 Uhr bis 08.00 Uhr am Morgen des Folgetages. Diese Aufteilung sollte ermöglichen, evtl. nur kurzfristig auftretende Veränderungen während oder unmittelbar nach Clamp zu erfassen.

3.6 Androgene

An den Tagen mit euglykämischem, hyperinsulinämischem Clamp (Versuchstage eins und zwei) wurden vor, sowie zwei und vier Stunden nach Clamp-Beginn, als auch unter konstanter Euglykämie, Blutproben für DHEA, Androstendion, 17-OH-Progesteron, Testosteron, Östron, LH, FSH, ACTH und Cortisol abgenommen.

3.7 Labormethoden und Statistik

Die kapilläre Blutglukose wurde mittels Glukose-Oxidase-Methode an einem Dr. Müller Super GL Messgerät, Freital, Germany, gemessen.

Insulinkonzentrationen wurden mittels Elisa (DRG, Marburg, Germany) bestimmt.

Freie Fettsäuren im Serum wurden kalorimetrisch mit einem Cobas Mira (Roche, Basle, Switzerland) gemessen.

Serumkreatinin, Triglyceride, Cholesterin, HDL-Cholesterin, Protein und CRP wurden nach Standardlabormethoden bestimmt. Zur Berechnung des LDLs wurde die Friedewaldformel verwendet.

Serumsteroiden wurden mittels Radioimmunoassay (RIA) bestimmt. Urinsteroiden wurden mit Tritium versehen, dann mittels Chromatographie isoliert und mit Antikörpern markiert durch Radioimmunoassay bestimmt (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany). Es bestehen folgende Kreuzreaktivitäten:

Für Cortisol-Antiserum zu Cortison 0.5%; zu 17-Hydroxyprogesteron 2.6%; zu THE, THF und 5 α -THF <0.2%. Für Cortison-Antiserum zu Cortisol 2.9%; zu THE 2.6%; zu THF und 5 α -THF 0.2%. Für THE-Antiserum zu Cortisol 0.2%; zu Cortison 0.3%; zu THF 9.7%; zu 5 α -THF 0.1%. Für THF-Antiserum zu Cortisol und Cortison <0.1%; zu THE 0.3%; zu 5 α -THF <0.1%. Für 5 α -THF-Antiserum zu Cortisol und Cortison <0.1 %; zu THF 0.7 % und zu THE < 0,1 % (95).

Blutproben für ACTH, Cortisol und Testosteron wurden vollautomatisch mit dem chemilumineszenz-immunoassay System IMMULITE DPC Biermann

(Bad Nauheim, Deutschland) (Intra-assay CV von 6.7 bis 9.5%, 5.2 bis 7.4% und 7.2 bis 16.3%; Inter-assay CV 8.5%, 7.8% und 12.0%).

Östron, 17-OH-Progesteron, DHEA und Androstendion wurden durch spezifische RIAs bestimmt (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Sinsheim, Germany) (Intra-assay CV von 4.4 bis 9.4%, 8.1 bis 9.5%, 2.7 bis 3.8% und 2.7 bis 5.9%; Inter-assay CV 9.1%, 8.9%, 6.5% und 6.0%).

DHEA und Androstendion wurden zum Ausschluss eines systematischen Fehlers nach Hinzufügen von Lipid in vitro gemessen. Es wurde eine Konzentration von 2,5 % Lipidinfusion gewählt, was in vivo erreichten Triglyceridwerten entspricht. DHEA- und Androstendionwerte wurden nicht beeinflusst.

LH und FSH wurden mittels eines immunoradiometrischen Systems gemessen (Immuno-Biological Laboratories, Inc., Hamburg, Deutschland) (Intra-assay CV von 1.6 bis 3.1% und 3.5 bis 6.5% und Inter-assay CV von 4.7% und 6.7%).

Statistische Berechnungen wurden mittels SPSS-Software, V 11.5, SPSS Inc. (Chicago, IL, USA) durchgeführt.

Testverfahren waren t-Test für normalverteilte paarige und Mann-Whitney-Test für nicht normalverteilte paarige Variable.

Als signifikant galten Ergebnisse bei beidseitigem $\alpha < 0,05$. Werte wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) oder Standardfehler (SEM) angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Freie Fettsäuren:

Vor Beginn der Lipid/Heparin- oder Kochsalz/Heparin-Infusionen gab es keinen Unterschied in der Konzentration freier Fettsäuren ($0,48 \pm 0,20$ mmol/l vs. $0,78 \pm 0,41$ mmol/l; $p = \text{n.s.}$) (Abb. 9). Unter Lipid/Heparin-Infusion kam es zum Anstieg der freien Fettsäuren von $0,48 \pm 0,20$ mmol/l auf $4,82 \pm 1,45$ mmol/l nach zwei Stunden, auf $5,41 \pm 1,0$ mmol/l nach vier Stunden und $4,76 \pm 1,89$ mmol/l bei konstanter Euglykämie (6h-Wert) während Clamp ($p < 0,005$). Es gab keinen Anstieg der freien Fettsäuren während der Kochsalz/Heparin-Infusion ($0,78 \pm 0,41$ mmol/l, $1,17 \pm 0,47$ mmol/l, $1,17 \pm 0,45$ mmol/l und $0,22 \pm 0,13$ mmol/l. $p = \text{n.s.}$) (Abb. 9).

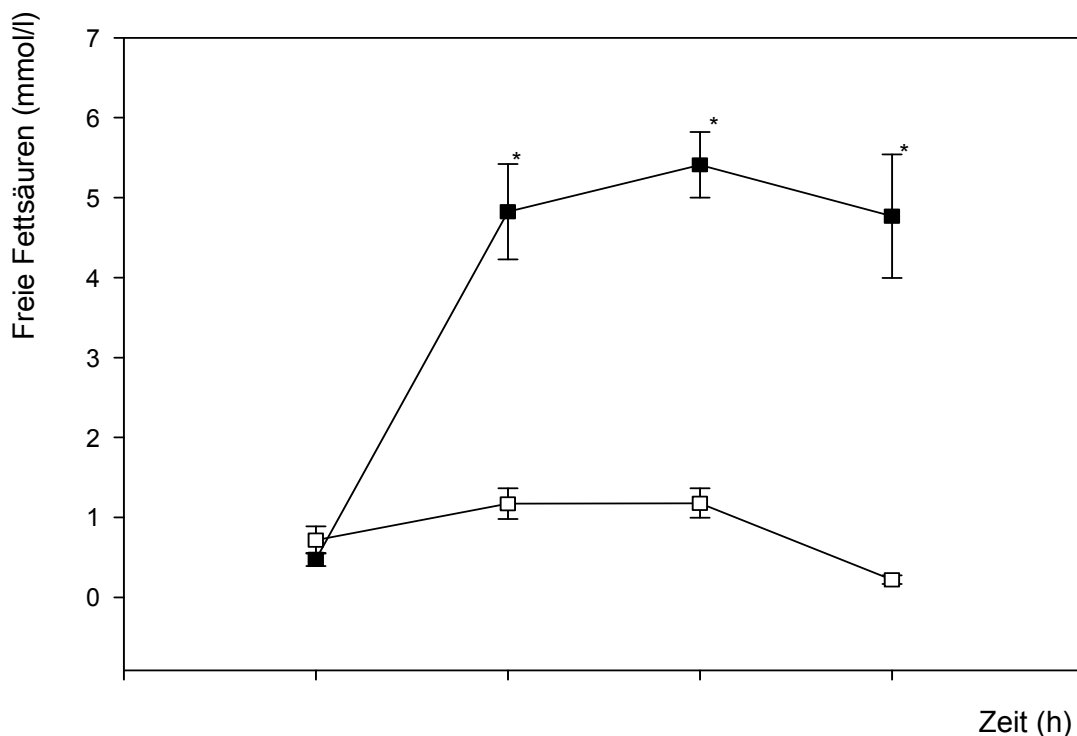


Abbildung 9: Freie Fettsäuren unter Lipid/Heparin-Infusion (■) und Kochsalz/Heparin-Infusion (□). MW \pm SEM der Serumkonzentration freier Fettsäuren. * = $p < 0,005$.

Vier Stunden nach Beginn der Lipid/Heparin-Infusion gab es keinen Unterschied in der Konzentration freier Fettsäuren vor Beginn des Clamps (siehe Kapitel 3.2) und vor Einnahme von Cortisonacetat bei der Cortisonkinetik (siehe Kapitel 3.3) ($5,41 \pm 1,00$ mmol/l vs. $5,45 \pm 0,79$ mmol/l; $p=n.s.$). Ebenso konnte kein Unterschied in den freien Fettsäuren während Kochsalz/Heparin-Infusion vor Beginn des Clamps oder der Cortison-Kinetikbestimmung gesehen werden ($1,17 \pm 0,45$ mmol/l vs. $1,16 \pm 0,43$ mmol/l; $p = n.s.$).

4.2 Glukose, Glukoseinfusionsrate (GIR) und Insulin

Während konstanter Euglykämie beim Clamp war die kapilläre Blutglukosekonzentration unter Lipid/Heparin-Infusion im Mittel $4,19 \pm 0,43$ mmol/l und unter Kochsalz/Heparin-Infusion $3,81 \pm 0,33$ mmol/l.

Die mittlere Glukoseinfusionsrate war unter Lipid/Heparin-Infusion signifikant niedriger als unter Kochsalz/Heparin-Infusion (GIR $6,02 \pm 2,60$ vs. $4,08 \pm 2,15$ mg/kg/Min. $p < 0,05$) (Abb. 10).

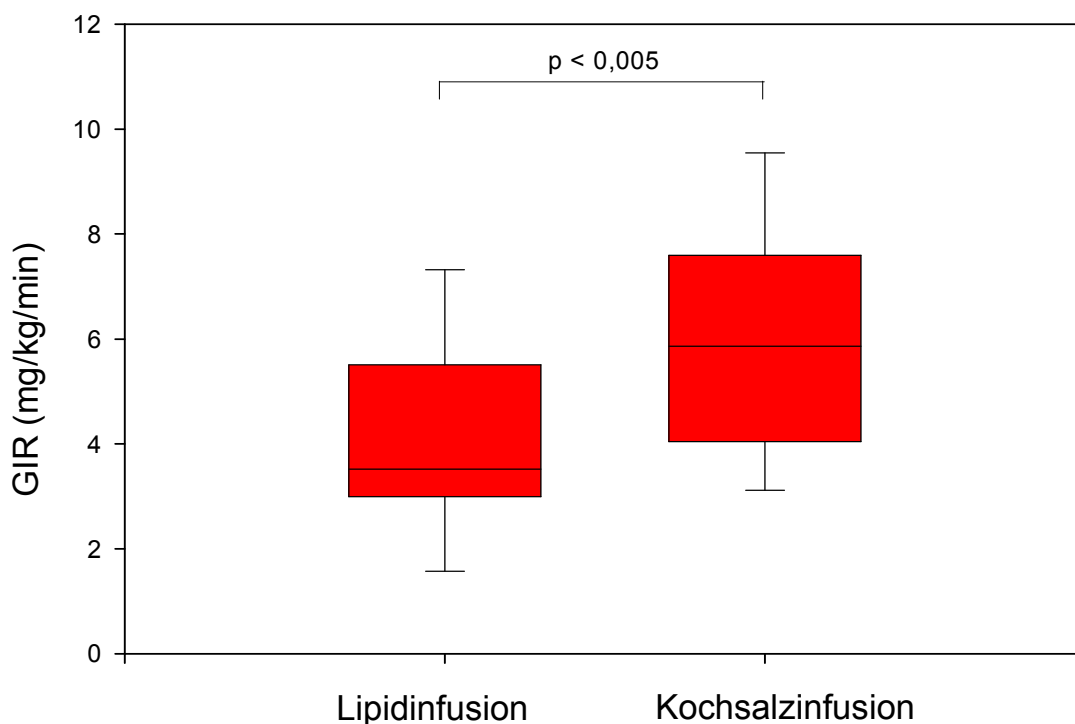


Abbildung 10: Glucoseinfusionsrate (GIR) bei konstanter Euglykämie unter Lipid/Heparin- oder Kochsalz/Heparin-Infusion. MW \pm SD.

Während des euglykämischen, hyperinsulinämischen Clamps stieg die Insulinkonzentration von $6,74 \pm 3,59$ mU/l vor eigentlichem Clamp-Beginn auf $56,4 \pm 13,59$ mU/l während konstanter Euglykämie ($p < 0,01$) unter Lipid/Heparin-Infusion an. Unter der Kochsalz/Heparin-Infusion gab es einen Anstieg von $2,87 \pm 2,07$ mU/l vor eigentlichem Clamp-Beginn auf $54,19 \pm 6,56$ mU/l während konstanter Euglykämie ($p < 0,001$).

Zu Beginn und zwei Stunden nach Kochsalz/Heparin- oder Lipid/Heparin-Infusion gab es keinen signifikanten Unterschied in der Insulinkonzentration ($4,76 \pm 3,18$ mU/l vs. $6,29 \pm 5,10$ mU/l und $5,65 \pm 3,66$ mU/l vs. $4,91 \pm 3,06$ mU/l).

Zu Beginn des eigentlichen Clamps, also nach vier Stunden Infusion, zeigte sich allerdings ein signifikanter Unterschied in den Insulinkonzentrationen unter Lipid/Heparin-Infusionen bzw. Kochsalz/Heparin-Infusionen ($6,74 \pm 3,59$ mU/l vs. $2,87 \pm 2,07$ mU/l; $p < 0,05$).

4.3 Cortisol, Cortison, Cortisol/Cortison-Ratio, ACTH und Urinsteroide

Nach Unterdrückung der endogenen Cortisol-Produktion mit Dexamethason gab es keinen signifikanten Unterschied in der Cortisol- und Cortison-Konzentration unter vierstündiger Lipid/Heparin-Infusion oder Kochsalz/Heparin-Infusion vor der Einnahme von Cortisonacetat ($36,0 \pm 24,1$ nmol/l vs. $26,2 \pm 11,1$ nmol/l und $7,4 \pm 4,2$ nmol/l vs. $11,0 \pm 4,6$ nmol/l; $p = n.s.$). Nach oraler Einnahme von Cortisonacetat gab es keinen Unterschied in der Serum-Cortisol-Konzentration oder bei der Cortisol/Cortison-Ratio unter Kochsalz/Heparin- oder Lipid/Heparin-Infusion (AUC 16857 ± 3032 vs. 18381 ± 2093 nmol/l x min., $p = 0,31$ und 2314 ± 463 vs. 2259 ± 355 nmol/l x min, $p = 0,79$). Wir fanden unter Kochsalz/Heparin-Infusion und Lipid/Heparin-Infusion zu keinem Zeitpunkt Unterschiede in der Cortisolkonzentration und Cortisol/Cortison-Ratio nach Einnahme von Cortisonacetat (Abb. 11,12).

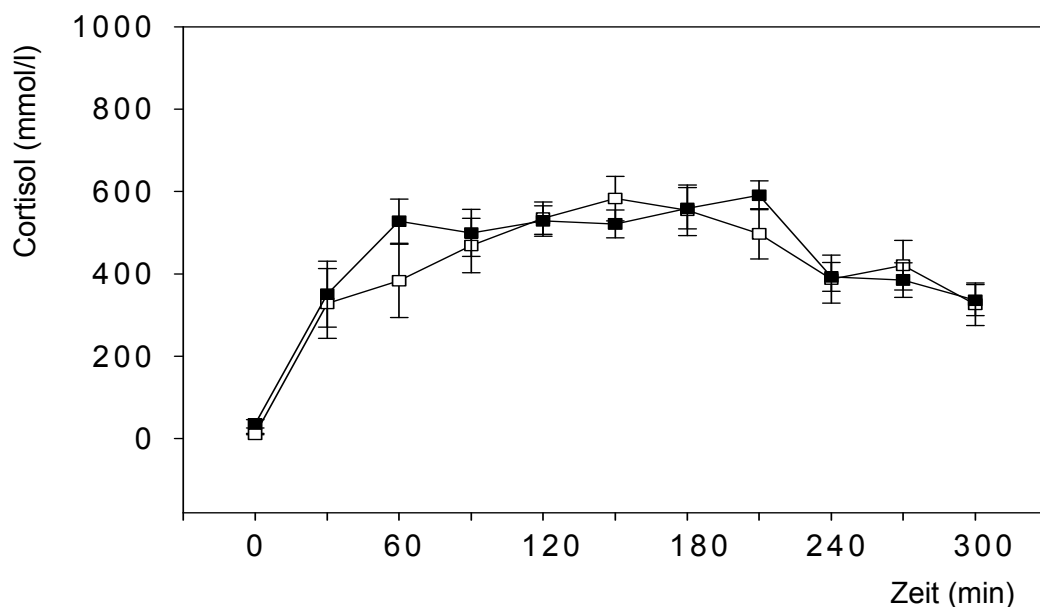


Abbildung 11: Cortisol nach der Einnahme von Cortisonacetat unter Lipid/Heparin-Infusion (■) und unter Kochsalz/Heparin-Infusion (□). Mittelwerte \pm SEM.

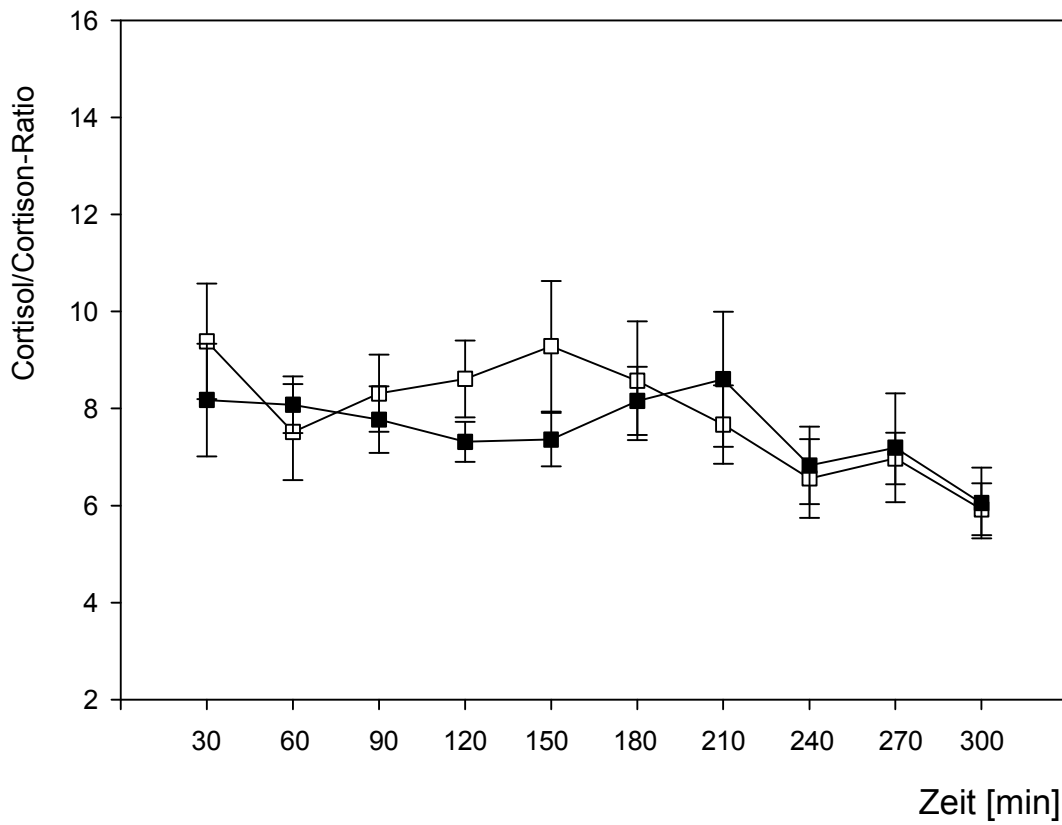


Abbildung 12: Cortisol/Cortison nach Einnahme von Cortisonacetat unter Lipid/Heparin-Infusion (■) und unter Kochsalz/Heparin-Infusion (□). Mittelwerte \pm SEM.

Die ACTH-Konzentrationen während Lipid/Heparin- oder Kochsalz/Heparin-Infusion (ohne Einnahme von Dexamethason) waren nicht unterschiedlich (Abbildung 13).

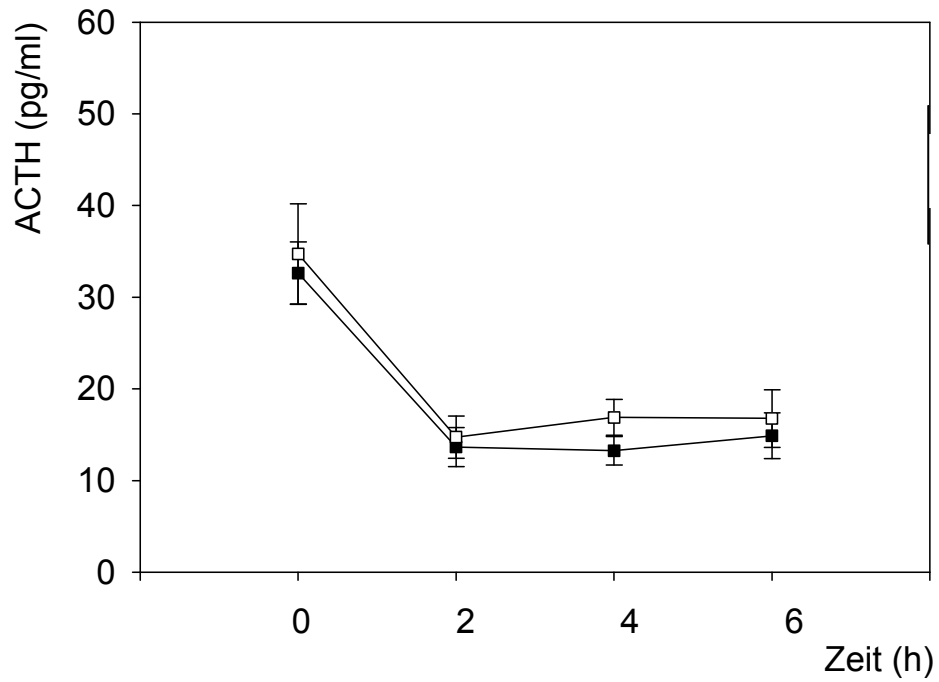


Abbildung 13: ACTH während Lipid/Heparin-Infusion (■) und Kochsalz/Heparin Infusion (□). Mittelwerte \pm SEM

4.4 Urinsteroide

Erläuterung zu den Ergebnissen in Tabelle 3 und den Abbildungen 14 und 15

Die Aktivitäten der 11- β -Hydroxysteroiddehydrogenasen lassen sich anhand der Konzentrationen des

Cortisonmetaboliten	Tetrahydrocortison (THE) und der
Cortisolmetaboliten	5 β -Tetrahydrocortisol (THF) und
	5- α -Tetrahydrocortisol (5- α -THF)

im Urin bestimmen.

Für die Bestimmung der Aktivität der 11- β -HSD 1 bildeten wir den Quotienten (5- α -THF + THF)/THE.

Für die Bestimmung der Aktivität der 11- β -HSD 2 bildeten wir den Quotienten aus freiem Cortisol und freiem Cortison (UFF/UFE).

Die Aktivitäten der 5- α - und 5- β -Reduktasen wurden über die Bildung des THF/5- α -THF-Quotienten bestimmt.

Während Lipid/Heparin- oder Kochsalz/Heparin-Infusionen gab es keinen Unterschied in den Konzentrationen von UFF, UFE, THF, 5- α -THF und THE (Tabelle 3).

Tabelle 3: Cortisol/Cortison-Metabolite im Urin unter Lipid/Heparin-Infusion und unter Kochsalz/Heparin-Infusion. Mittelwerte \pm SD.

Sammelzeiten	Lipid/Heparin-Infusion			Kochsalz/Heparin-Infusion		
	08.00-20.00	20.00-08.00	08.00-08.00	08.00-20.00	20.00-08.00	08.00-08.00
UFF [μ g]	31,4 \pm 15,5	24,6 \pm 10,2	56,0 \pm 15,0	35,5 \pm 19,3	31,8 \pm 21,4	66,8 \pm 34,8
UFE [μ g]	51,5 \pm 12,5	35,3 \pm 7,9	86,8 \pm 15,2	57,7 \pm 26,4	43,4 \pm 21,7	101,1 \pm 29,7
THF [mg]	2,22 \pm 0,62	1,75 \pm 0,66	3,97 \pm 1,12	2,17 \pm 0,85	1,91 \pm 1,01	4,08 \pm 1,75
5 α -THF [mg]	1,96 \pm 0,76	1,59 \pm 0,94	3,54 \pm 1,46	2,14 \pm 1,21	1,85 \pm 1,45	3,99 \pm 2,64
THE [mg]	3,85 \pm 1,05	3,0 \pm 1,37	6,86 \pm 2,18	4,14 \pm 1,97	3,71 \pm 2,04	7,86 \pm 3,88
UFF/UFE	0,59 \pm 0,21	0,69 \pm 0,21	0,64 \pm 0,15	0,63 \pm 0,24	0,72 \pm 0,34	0,68 \pm 0,28
$\frac{5\alpha\text{-THF}+\text{THF}}{\text{THE}}$	1,10 \pm 0,21	1,12 \pm 0,21	1,11 \pm 0,17	1,07 \pm 0,18	0,99 \pm 0,15	1,03 \pm 0,16
THF/5 α -THF	1,29 \pm 0,68	1,36 \pm 0,61	1,29 \pm 0,66	1,19 \pm 0,53	1,40 \pm 1,04	1,29 \pm 0,77
THF/UFF	80 \pm 23	88 \pm 61	76 \pm 28	69 \pm 23	79 \pm 56	65 \pm 22
THE/UFE	80 \pm 31	90 \pm 45	84 \pm 36	82 \pm 47	97 \pm 47	83 \pm 40
5 α -THF/UFF	78 \pm 35	78 \pm 58	69 \pm 33	65 \pm 31	79 \pm 70	62 \pm 33

UFF: Freies Cortisol im Urin; UFE: Freies Cortison im Urin; THF: 5 β -Tetrahydrocortisol, 5 α -THF: 5 α -Tetrahydrocortisol, THE: Tetrahydrocortison

Die UFF/UFE-Ratio während der Lipid/Heparin- oder Kochsalz/Heparin-Infusion war nicht unterschiedlich ($0,64 \pm 0,15$ vs. $0,68 \pm 0,28$; $p = \text{n.s.}$). Auch zeigte sich diese Ratio bei getrennter Betrachtung der Sammelurinperioden von 8.00 Uhr bis 20.00 Uhr und von 20.00 Uhr bis 08.00 Uhr am Morgen des Folgetages nicht unterschiedlich (Abbildung 14).

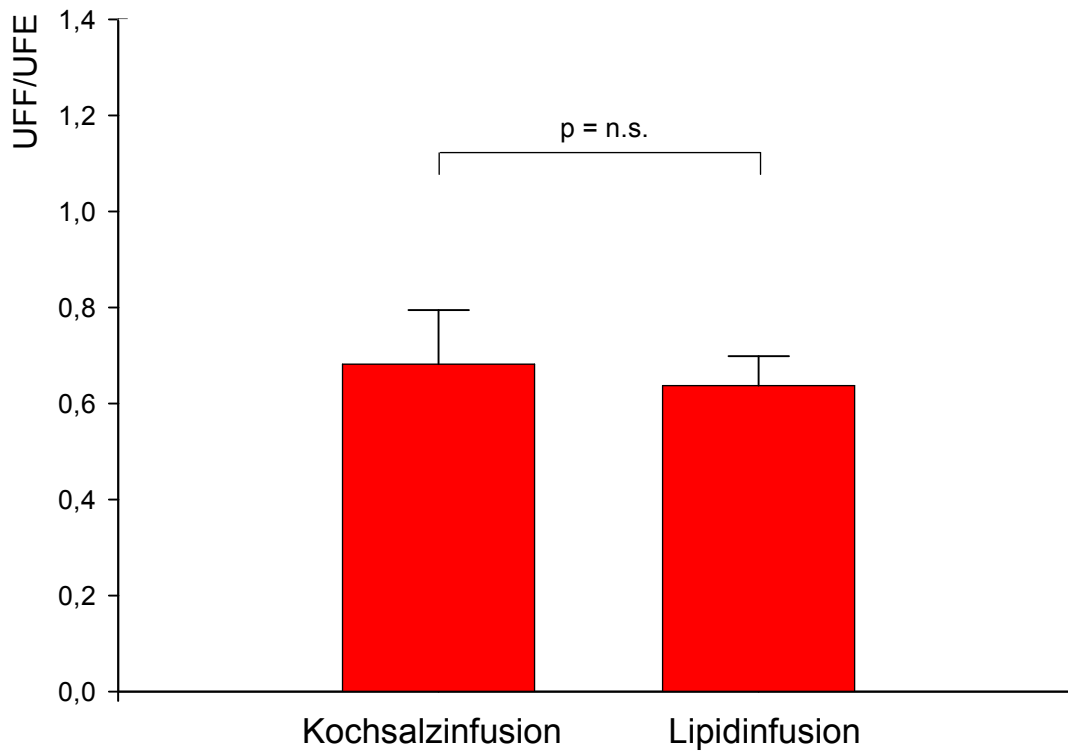


Abbildung 14: UFF/UFE während Lipid/Heparin-Infusion und Kochsalz/Heparin-Infusion. Gesamte Sammelperiode von 08:00h - 08:00h. Mittelwert \pm SD. UFF = Freies Cortisol im Urin; UFE = Freies Cortison im Urin

Die $(5\alpha\text{-THF} + \text{THF})/\text{THE}$ -Ratio während Lipidinfusion war nicht von der unter Kochsalz/Heparin-Infusion unterschiedlich $1,11 \pm 0,17$ vs. $1,03 \pm 0,16$; $p = \text{n.s.}$). Diese war auch bei aufgeteilter Betrachtung der Sammelurine von 08.00 Uhr bis 20.00 Uhr und von 20.00 Uhr bis 08.00 Uhr des Folgetages nicht unterschiedlich (Abbildung 15). Zu keinem Zeitpunkt war ein Unterschied in den zwei Quotienten der 5α - und 5β -reduzierten Metabolite des Cortisols in den Sammelurinen zu beobachten (Tabelle 3).

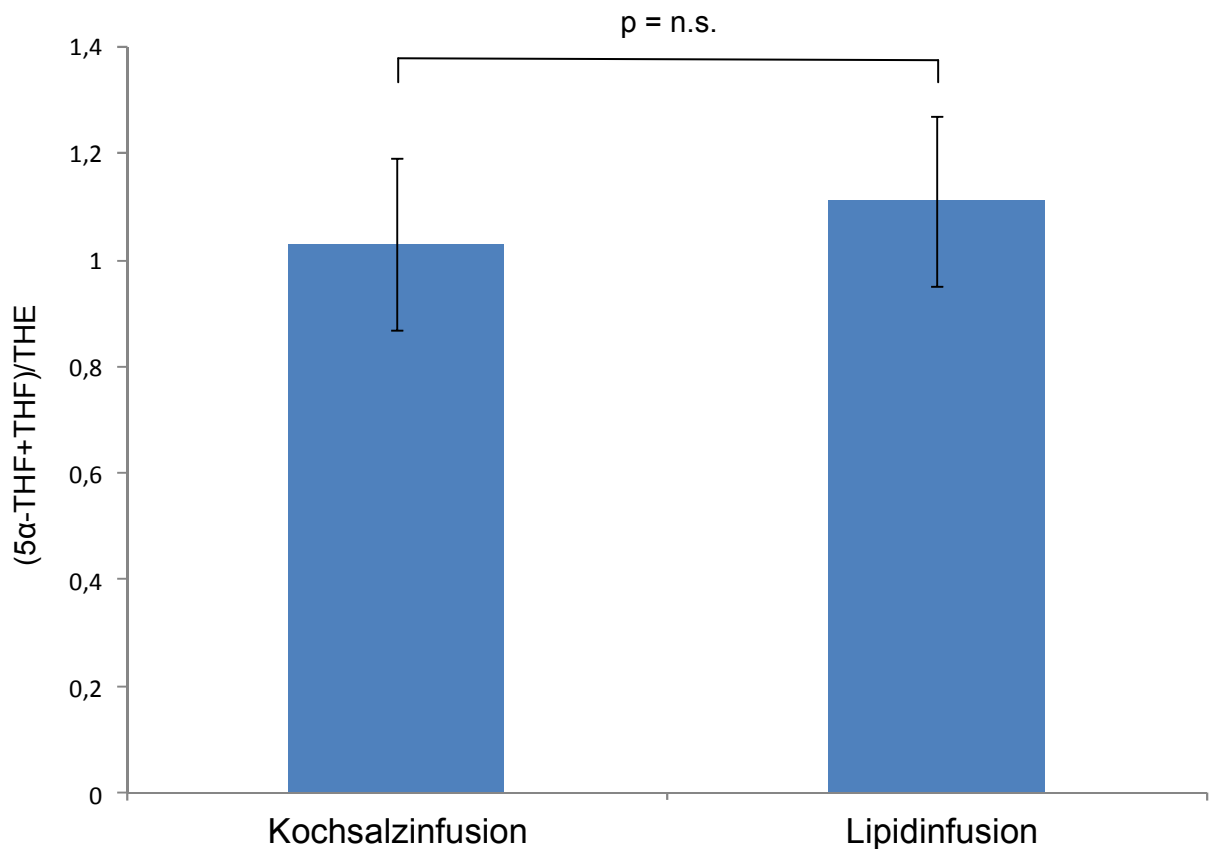


Abbildung 15: $(5\alpha\text{-THF} + \text{THF})/\text{THE}$ während Lipid/Heparin-Infusion und Kochsalz/Heparin-Infusion. Gesamte Sammelperiode von 08:00h – 08:00. Mittelwerte \pm SD.

THF = 5β -Tetrahydrocortisol, $5\alpha\text{-THF}$ = 5α -Tetrahydrocortisol,
THE = Tetrahydrocortison

4.5 Androstendion

Androstendion fiel stetig nach zwei und vier Stunden unter Kochsalz/Heparin-Infusion ab ($2,09 \pm 0,12$ ng/ml vs. $1,53 \pm 0,11$ ng/ml und $1,49 \pm 0,08$ ng/ml; $p < 0,05$), wohingegen unter Lipid/Heparin-Infusion kein solcher Abfall nach zwei und vier Stunden beobachtet werden konnte.

Androstendion war also unter Lipid/Heparin-Infusion signifikant höher als unter Kochsalz/Heparin-Infusion ($p < 0,05$).

Die AUC von Androstendion war signifikant höher unter Lipid/Heparin-Infusion als unter Kochsalz/Heparin-Infusion (479 ± 33 ng/ml x min vs. 397 ± 23 ng/ml x min; $p < 0,05$).

Während konstanter Euglykämie im Rahmen des Insulin-Clamps gab es keine signifikanten Veränderungen des Androstendions, unabhängig von der Infusionsart (Abb. 16).

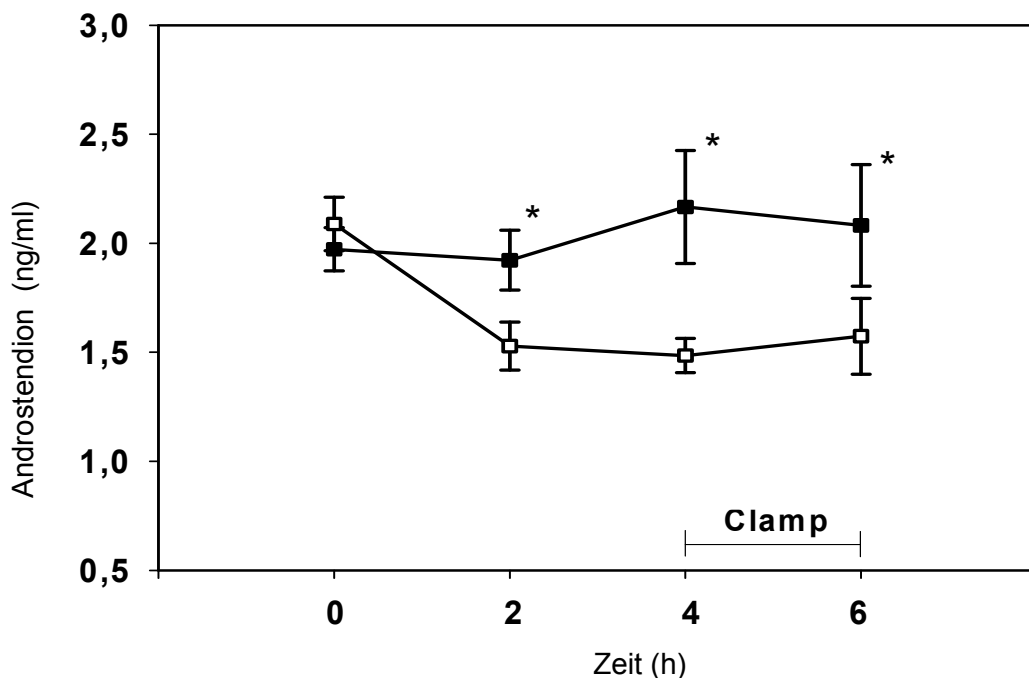


Abbildung 16: Androstendion während Lipid/Heparin-Infusion (■) vs. Kochsalz/Heparin-Infusion (□). * = $p < 0,05$. AUC 479 ± 33 ng/ml x min. während Lipid/Heparin-Infusion vs. 397 ± 23 ng/ml x min während Kochsalz/Heparin-Infusion ($p < 0,05$). Mittelwerte \pm SEM.

4.6 17-OH-Progesteron, DHEA

17-OH-Progesteron zeigte unter Kochsalz/Heparin-Infusion den physiologischen circadianen Abfall, der aber auch unter Lipid/Heparin-Infusion zu beobachten war (0 h vs. 6 h, $p < 0.05$). Erwartungsgemäß unterschied sich die AUC während Lipid/Heparin und Kochsalz/Heparin nicht (619 ± 85 ng/ml x min vs. 526 ± 39 ng/ml x min, $p = n.s.$) (Abb. 17A).

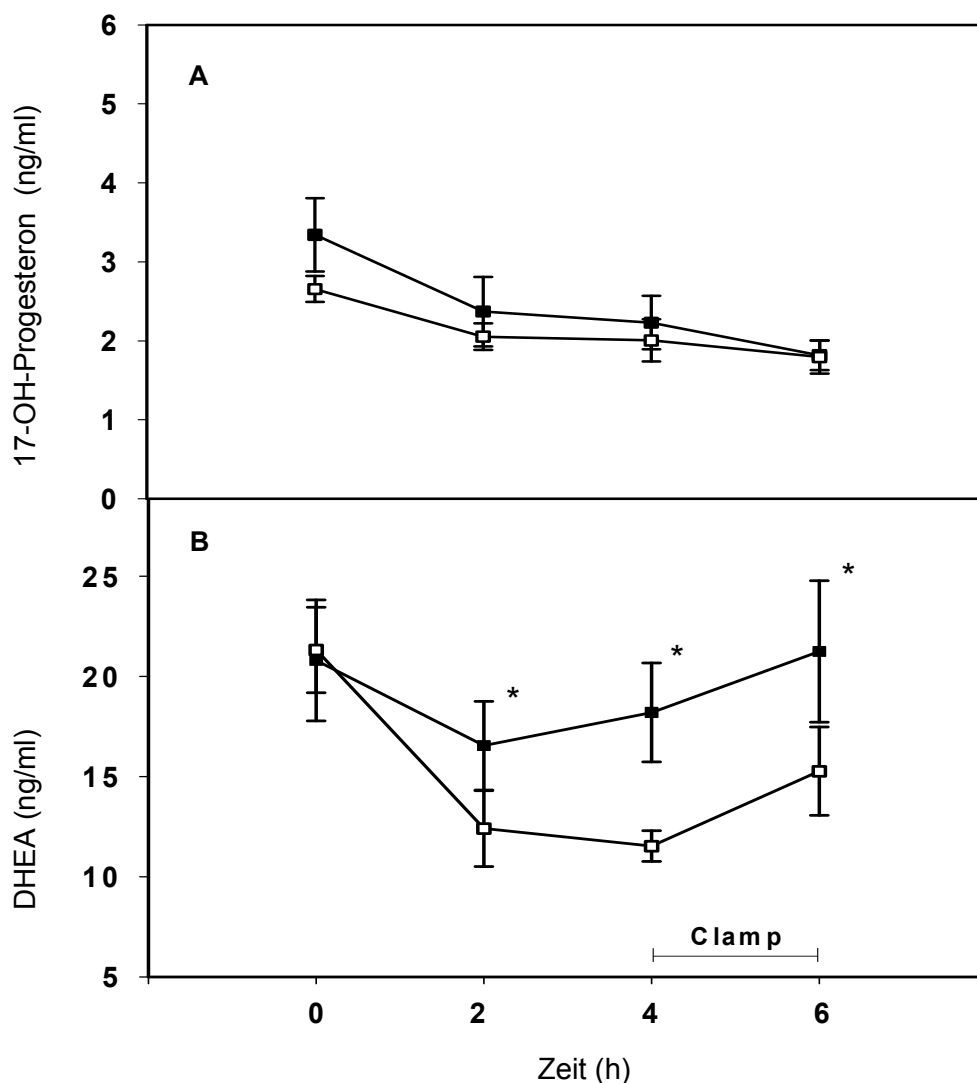


Abbildung 17: 17-Hydroxyprogesteron und DHEA während Lipid/Heparin- Infusion (■) und Kochsalz/-Heparin-Infusion (□).
AUC 619 ± 85 und 4263 ± 461 ng/ml x min während Lipid/Heparin- Infusion vs. 526 ± 39 und 3459 ± 380 ng/ml x min bei Kochsalz/Heparin-Infusion für 17-Hydroxyprogesteron und DHEA ($p = n.s.$ und $p < 0.05$).

DHEA fiel während Kochsalz/Heparin-Infusion nach zwei und vier Stunden ab. ($21,3 \pm 2,1$ ng/ml vs. $12,3 \pm 2,2$ ng/ml vs. $11,5 \pm 0,8$ ng/ml; $p < 0,05$), wohingegen unter Lipid/Heparin-Infusion nach zwei und vier Stunden kein Abfall zu beobachten war. Verglichen mit Kochsalz/Heparin-Infusion war DHEA also nach zwei und vier Stunden signifikant erhöht ($p < 0,05$).

Die AUC von DHEA unter Lipid/Heparin-Infusion war signifikant unterschiedlich zu der unter Kochsalz/Heparin-Infusion (4263 ± 461 ng/ml x min vs. 3459 ± 380 ng/ml x min, $p < 0,05$).

Unabhängig von der Infusionsart waren während konstanter Euglykämie im euglykämischen, hyperinsulinämischen Clamp keine signifikanten Änderungen bei DHEA zu beobachten. (Abb. 17B).

4.7 Testosteron, Östron

Testosteron während Lipid/Heparin-Infusion war nicht von dem während Kochsalz/Heparin-Infusion unterschiedlich. Auch gab es keinen Unterschied in der AUC (12468 ± 1243 nmol/l x min vs. 12384 ± 1951 nmol/l x min ; $p = n.s.$) (Abb. 18A).

Östron zeigte unter Kochsalz/Heparin-Infusion keine Änderung nach zwei und vier Stunden, wohingegen sich unter Lipid/Heparin-Infusion nach zwei und vier Stunden Unterschiede zeigten ($60,6 \pm 8,1$ pg/ml vs. $133,9 \pm 12,7$ pg/ml und $186,7 \pm 30,1$ pg/ml vs. $132,5 \pm 19,9$ pg/ml; $p < 0,05$). Daher wurde Östron insgesamt höher während Lipid/Heparin-Infusion als unter Kochsalz/Heparin-Infusion gemessen. Erwartungsgemäß war die AUC unter Lipid/Heparin-Infusion erhöht (Abb. 18B).

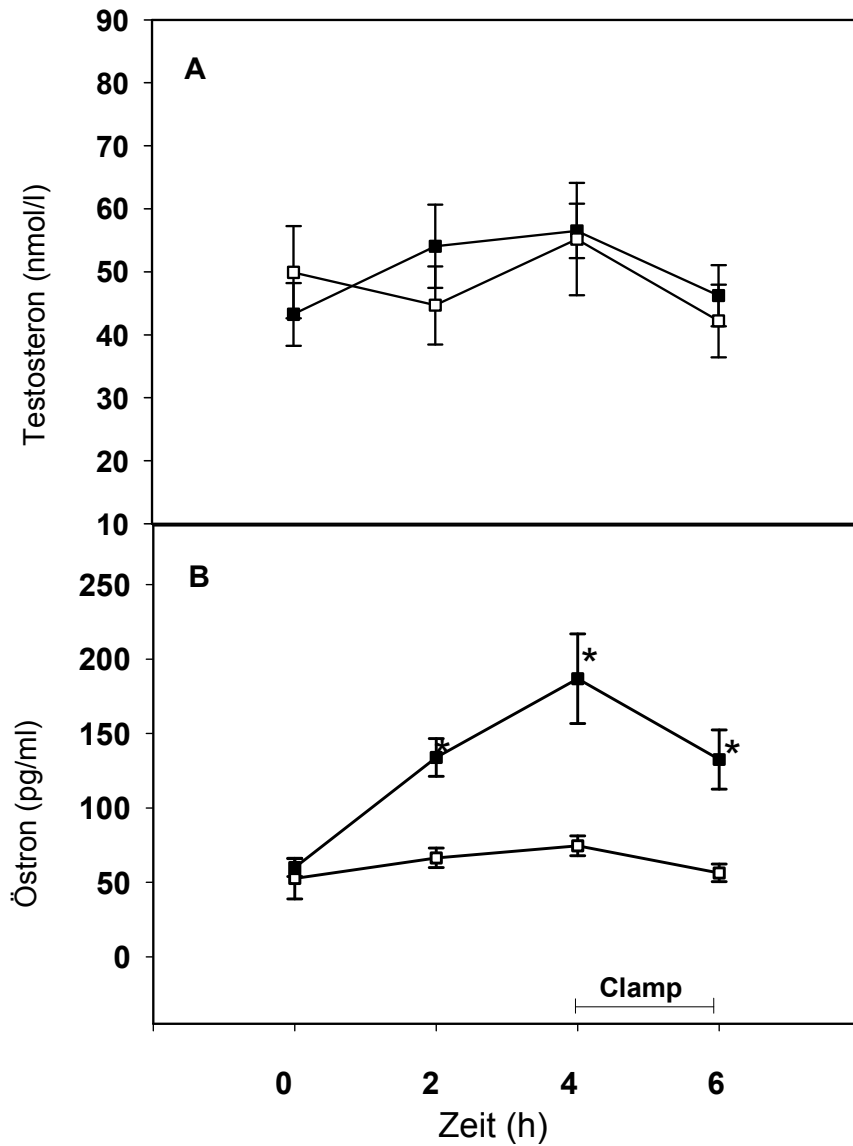


Abb. 18: Testosteron (A) und Östron (B) während Lipid/Heparin-Infusion —■— vs. Kochsalz/Heparin-Infusion —□—. AUC 12468 ± 1243 nmol/l x min und 30863 ± 2647 pg/ml x min während Lipid/Heparin-Infusion vs. 12384 ± 1951 nmol/l x min und 17238 ± 1970 pg/ml x min während Kochsalz/Heparin-Infusion für Testosteron bzw. Östron ($p = n.s.$ und $p < 0.05$). Mittelwerte \pm SEM. * = $p < 0,05$.

4.8 LH und FSH

LH und FSH unterschieden sich nicht während Lipid/Heparin- bzw. Kochsalz/Heparin-Infusion (AUC: LH 945 ± 89 U/l x min vs. 1045 ± 109 U/l x min, und FSH 935 ± 98 U/l x min vs. 971 ± 153 U/l x min; $p = n.s.$) (Abb. 19).

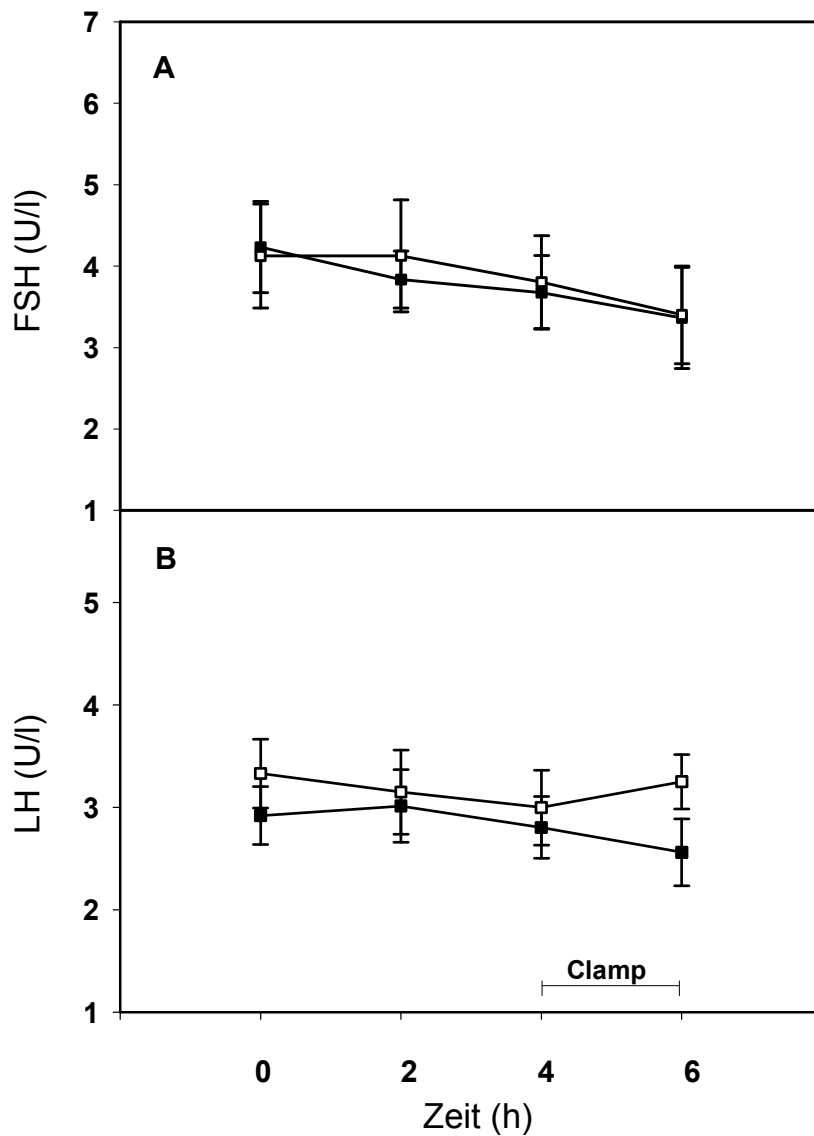


Abb. 19: FSH (A) und LH (B) während Lipid/Heparin-Infusion \blacksquare vs. Kochsalz /Heparin-Infusion \square . AUC 945 ± 89 und 935 ± 98 U/l x min während Lipid/Heparin-Infusion vs. 1045 ± 109 und 971 ± 153 U/l x min während Kochsalz/Heparin-Infusion für LH und FSH ($p = n.s.$). Mittelwerte \pm SEM.

4.9 Insulinkonzentration und r-Homa innerhalb der ersten vier Stunden

Während der Lipidinfusion wurde die Insulinresistenz zusätzlich über den r-HOMA-Score berechnet. Wie erwartet, zeigten sich zum Zeitpunkt Null und zwei Stunden nach Infusionsbeginn unveränderte HOMA-Werte (1.23 ± 0.29 vs. 1.17 ± 0.24 ; $p = n.s.$). Mittlere Insulinkonzentrationen und HOMA-Werte sind in Tabelle 3 ersichtlich.

Tab. 4 Insulin und HOMA unter Kochsalz/Heparin-Infusion und unter Lipid/Heparin-Infusion. Mittelwerte \pm SEM. * = $p < 0,05$ gegenüber HOMA 4h-Wert unter Lipidinfusion.

	Lipid-Infusion	Lipid-Infusion	Kochsalz-Infusion	Kochsalz-Infusion
Zeitpunkt	Insulin [mU/l]	HOMA	Insulin [mU/l]	HOMA
0 h	5.3 ± 1.2	1.23 ± 0.29	7.19 ± 1.98	1.69 ± 0.48
2 h	5.31 ± 1.15	1.17 ± 0.27	4.85 ± 0.91	1.06 ± 0.20
4 h	5.81 ± 1.26	1.27 ± 0.28	3.37 ± 0.70	$0.70 \pm 0.13^*$

Unter Kochsalzinfusion fällt der HOMA-Index als Parameter der Insulinresistenz entsprechend der Tagesrhythmik physiologisch ab.

Hingegen bleibt der HOMA-Index als Ausdruck der Insulinresistenz unter Lipid-Infusion entgegen der Tagesrhythmik unverändert. Dieser Effekt ist allerdings erst nach 4 h signifikant, so dass nach 2 h, passend zur Literatur (37), noch keine Insulinresistenz zu sehen ist.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

Probanden

In einem in vivo Experiment beim Menschen ist die spezifische Aktivität der 11- β -HSD in verschiedenen Organen nicht gut zu evaluieren. Daher konnten wir mit unserem Versuchsaufbau nur exakt die hepatische 11- β -HSD1-Aktivität bestimmen (Abb. 11,12) (92,95). Um zwischen der Aktivität in Leber- und Fettgewebe (von besonderem Interesse wäre omentales Fett) unterscheiden zu können, wären aufwendige bioptische Verfahren notwendig, die einer schnellen, Zeit- und Kostenintensiven Weiterverarbeitung bedürfen und auch aufgrund der erheblichen Mehrbelastung der Probanden so nicht durchführbar waren.

Um gegensinnige Effekte freier Fettsäuren auf die Androgensynthese in den Ovarien und der Nebennierenrinde auszuschließen und zunächst ausschließlich das Verhalten der Nebennierenrinde beobachten zu können, entschlossen wir uns, gesunde junge Männer als Probanden zu nehmen.

Clamp-Technik

Die Bestimmung der Glucoseinfusionsrate im hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp als Funktion der Gewebsempfindlichkeit für exogenes Insulin ist eine standardisierte Methode. Unsere Ergebnisse bei sechs jungen männlichen Probanden sind mit denen von DeFronzo, der die Methode 1979 zur Ermittlung der Insulinresistenz etablierte, vergleichbar (91). Andere Methoden zur Errechnung der Insulinresistenz bzw. Sensitivität (Homa, QUICKI, WBIS, OGTT) sind zwar hinsichtlich ihrer relativ guten Korrelation zum Clamp-Test evaluiert, verwenden allerdings zur Bestimmung jeweils Nüchtern-glucose- und

Nüchterninsulinwerte und waren daher für diesen Versuchsaufbau nicht im Sinne eines Goldstandard-Tests anwendbar. In Korrelation zu den Clamp-Resultaten zeigte aber auch die HOMA-Bestimmung die Insulinresistenz unter Lipidinfusion an (Tabelle 4). In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass ACTH-stimuliertes Cortisol in der Leber die 11- β -HSD 1 induziert (96). Eine stressinduzierte ACTH-Ausschüttung scheint in unserer Studie keine Rolle zu spielen, da die Werte unter Kochsalz- bzw. Lipidinfusion nicht unterschiedlich waren (Abb. 13).

Urinsteroide

Die Bestimmung von Cortisol, Cortison und deren Metabolite und Betrachtung deren Ratio im Urin ist eine Methode zur Einschätzung der Gesamtaktivität der 11- β -HSDs (95). Die Kreuzreaktivität der hier eingesetzten Antikörper zur Bestimmung der Steroide ist so gering, dass die hier eingesetzte Radioimmunoassay-Methode ähnlich valide ist wie die Gaschromatographie-Methodik, welche als Goldstandard gilt (95).

Wir halten unter Berücksichtigung der 11- β -HSD 2-Aktivität der Niere diese Methode unter Kenntnis des Risikos, schnelle gegenregulatorische Effekte nicht erfassen zu können, für ausreichend (s.u.). Um in der Urinanalytik auch Veränderungen im zeitlichen Ablauf zu erkennen, wählten wir sowohl 12h- als auch 24h-Sammelperioden (Tab. 3).

Cortisonkinetik

Die Ermittlung der Cortisol- und Cortisonwerte im Plasma nach Einnahme von Cortisonacetat ist eine Methode, um die hepatische 11- β -HSD 1-Aktivität zu erfassen (92,12). Wir führten diese Messungen unter Kochsalz- bzw. Lipidinfusion zu mehreren Zeitpunkten durch, um deren Kinetik zu erfassen. Gegenregulatorische Mechanismen bei der zuvor in den Clamp-Versuchen erwiesenen Insulinresistenz unter Lipidinfusion sollten so erfasst werden. Um Interak-

tionen mit in den Vorversuchstagen verabreichten Dexamethason zu vermeiden, hielten wir mindestens zwei volle Tage Abstand zwischen diesen Versuchen. Auch waren die bis dahin verabreichten Mengen an Dexamethason jeweils gleich.

Statistik

Ein grundsätzliches Problem dieser Studie könnte die geringe Anzahl an Probanden sein. Die Standardabweichung für Cortisol beispielsweise nach oral eingenommenem Cortison bei gesunden jungen Probanden beträgt etwa 11 bis 25 % (12). Daher konnten wir bei nur sechs Probanden eine Differenz der Serum-Cortisolwerte nach Cortisonacetat-Einnahme von bis zu 40 % feststellen.

Steward und Kollegen konnten einen auf 40 % reduzierten Anstieg des Serum-Cortisols bei übergewichtigen Probanden mit gestörter Insulinsensitivität im Vergleich zu schlanken Probanden 180 Min. nach Einnahme von Cortisonacetat feststellen (12). Eine Differenz von 39 % (AUC) in den Cortisol-Konzentrationen konnte bei übergewichtigen und schlanken Männern und Frauen beobachtet werden (15). Also scheint die physiologische Schwankungsbreite in dieser Größenordnung zu liegen und unsere Fallzahl ausreichend.

5.2 11 β -HSD und freie Fettsäuren bzw. Insulinresistenz

5.2.1 Freie Fettsäuren und Insulinresistenz

Die im euglykämischen, hyperinsulinämischen Clamp bestimmte Glukoseinfusionsrate ist ein Marker für die periphere Glukoseaufnahme (91), wenngleich der durch freie Fettsäuren verursachte Anstieg an peripher verfügbarer Glukose von einem Anstieg der hepatischen Glukoseproduktion während hyperinsulinämischem, euglykämischen Clamp begleitet wird.

In dieser Studie weist eine Verminderung der Glukoseinfusionsrate (Abb. 10) unter Lipid/Heparin-Infusion auf eine gesteigerte Insulinresistenz hin. Übereinstimmende Ergebnisse anderer Studien zeigen, dass freie Fettsäuren periphere und hepatische Insulinresistenz verursachen (30-33).

5.2.2 Freie Fettsäuren und hepatische 11 β -HSD1-Aktivität

Bei unseren leicht übergewichtigen jungen Männern (BMI = $27,5 \pm 3,1$) (Tab. 1) wurde die Aktivität der hepatischen 11- β -HSD Typ 1 über die Konversion von Cortison zu Cortisol gemessen. Diese Methode ist ein gutes Verfahren um die hepatische 11- β -HSD 1 zu erfassen (12,15,92). Im Vergleich zu Kochsalz/Heparin-Infusionen waren die Ratios und die Cortisolwerte während der Lipid/Heparin-Infusion unverändert (Abb. 11 und 12).

Diese Ergebnisse belegen, dass während fettsäureinduzierter Insulinresistenz keine akuten Veränderungen in der hepatischen 11- β -HSD Typ 1-Aktivität bei leicht übergewichtigen jungen Männern auftritt, was nahe legt, dass die hepatische 11- β -HSD 1 eine geringe Rolle in der Entwicklung der akuten fettsäureinduzierten Insulinresistenz spielt.

5.2.3 Urinsteroide

Die Messung der Urincortisol- und -cortisonmetabolite erbrachte keine Änderung der 11- β -HSD 1-Aktivität während fettsäureinduzierter Insulinresistenz (Tabelle 3). Die 5- α -THF und 5- β -THF/THE-Ratio war nicht verändert. Diese allerdings könnte nicht nur allein durch die 11- β -HSD 1-Aktivität beeinflusst werden. Die Aktivitäten der 11- β -HSD 2 sowie der 5- α -Reduktase und der 5- β -Reduktase beeinflussen diesen Quotienten ebenfalls (42,43,63). Wir konnten jedoch keine Unterschiede für 5- α -THF, THF und die UFF/UFE-, 5- α -THF/UFF-, THE/UFE- und THE/5- α -THF-Ratio finden, was eine unveränderte Aktivität der 11- β -HSD 2- und der 5- α - sowie 5- β -Reduktase-Aktivität belegt. Daher sprechen unsere Ergebnisse für eine unveränderte Ganzkörper-11- β -HSD 1-Aktivität.

Dies könnte durch eine unveränderte 11- β -HSD 1-Gesamtaktivität oder aber durch unterschiedliche Effekte der durch freie Fettsäuren induzierten Aktivität der 11- β -HSD in einzelnen Geweben verursacht sein (s.o.).

5.2.4 Selektive Betrachtung der 11 β -HSD1-Aktivität in verschiedenen Geweben

Bei transgenen Mäusen führt die Überexpression von 11- β -HSD 1 im Fettgewebe zu gestörter Glukosetoleranz, Insulinresistenz, arterieller Hypertonie und Hyperlipidämie sowie einer zentralen Adipositas (97). Im Gegensatz zu diesem voll entwickelten metabolischen Syndrom sind die Effekte bei selektiver Überexpression der 11- β -HSD 1 in der Leber weniger stark ausgeprägt mit nur geringer Insulinresistenz, Lipidämie und arterieller Hypertonie, jedoch unbeeinträchtigter Fettmasse. Die Tatsache, dass hierbei keine erhöhte Nüchtern-glukose zu finden ist sowie die hepatische Phosphoenolpyruvatcarboxyki-

nase-Expression unbeeinträchtigt ist, legt nahe, dass keine ausgeprägte Aktivierung der Glukoneogenese bei hepatischer 11- β -HSD 1-Überexpression stattfand (97,98).

In unserem Versuchsaufbau wurden keine Unterschiede in der Gesamtaktivität der 11 β -HSD1 und 2 festgestellt. Inwieweit allerdings die Aktivitäten der 11 β -HSD1 in unterschiedlichen Organen gegenregulatorisch erhöht oder vermindert sein könnten, muss in weiteren Studien untersucht werden. Wir konnten in unserem Versuchsaufbau keinen akuten Effekt auf die hepatische 11- β -HSD1 nachweisen. Chronische oder indirekte Effekte von freien Fettsäuren auf die 11- β -HSD1 sind hierdurch aber nicht auszuschließen.

Studien an Mäusen belegen den Effekt einer dauerhaften Stimulation des PPAR α auf die hepatische 11- β -HSD 1-Aktivität (99). Diese Rezeptoren werden durch freie Fettsäuren aktiviert (100). Andererseits hatten sowohl kurzfristige als auch dauerhafte diätetische Erhöhungen der freien Fettsäuren keinen Effekt auf die hepatische 11- β -HSD 1-Aktivität, senkten jedoch deren Aktivität im Fettgewebe (101).

Ein Effekt der freien Fettsäuren auf die 11- β -HSD 1 ist allerdings nicht auszuschließen. Auf die durch freie Fettsäuren induzierte periphere Insulinresistenz könnte ein gegenregulatorisches Herunterregulieren der hepatischen Aktivität folgen.

Unsere Ergebnisse basieren auf einer integrativen Messung der hepatischen 11- β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1-Aktivität. Wir können daher nicht ausschließen, dass eine durch Fettsäuren vermittelte Erhöhung der hepatischen 11- β -HSD-Aktivität unmittelbar durch Signale aus der Peripherie, die durch die periphere Insulinresistenz ausgelöst wird, herunter reguliert wird und somit die hepatische Gesamtaktivität der 11- β -HSD1 unbeeinflusst bleibt. Dass solche Mechanismen existieren, wird unter anderem durch die Ergebnisse bei übergewichtigen Zucker-Ratten unterstützt (102). Bei der Zucker-Ratte handelt es sich um eine Spontanmutation die zum sogenannten "obese"-bzw. "fatty"-Phänotyp führt. Beide Begriffe kennzeichnen Ratten, die übergewichtig

und fettsüchtig sind. Die Zucker-Ratte entwickelt schon frühzeitig eine Hyperphagie, woraus ein rapider Anstieg der Körpermasse (Übergewicht) resultiert. Schon im Alter von 5 bis 6 Wochen kommt es zum Entstehen von Hypertriglyceridämie, Hyperlipämie, Insulinresistenz, was mit der Entwicklung von Glucoseintoleranz und Hyperinsulinämie einhergeht. Im Alter von 12 Wochen wird die Glucosetoleranzstörung manifest und es kommt zur Entwicklung einer Hyperglykämie und damit zur Manifestation eines Typ 2-Diabetes ähnlichen Krankheitsbildes.

Diese Experimente zeigen eine Herunterregulation der hepatischen 11- β -HSD-Aktivität bei diesen Tieren. Diese gegensätzlichen Effekte während der Fettinfusion könnten sich also gegenseitig aufheben.

Hier besteht der Bedarf nach weiterer Forschung, um diese Hypothese auszuarbeiten. Möglich wäre die Untersuchung der HSD1-Aktivität in Proben subkutanen Fettgewebes, die sich an einen ähnlichen Versuchsaufbau anschließt. Interessant wäre die Untersuchung omentalen Fettes, was aber aus ethischen Gründen und technisch beim Menschen kaum durchführbar ist.

5.2.5 11- β -HSD1-Aktivität bei Diabetes mellitus und Übergewicht

Beim Menschen sind Übergewicht und Typ 2-Diabetes mit erhöhter 11- β -HSD-1-Aktivität im abdominalen und viszeralen Fettgewebe assoziiert, wohingegen die Aktivität in der Leber herabgesetzt ist (103,14).

Daher kann angenommen werden, dass eine erhöhte 11- β -HSD 1-Aktivität im abdominalen Fettgewebe von speziellem Interesse bei der Pathogenese des metabolischen Syndroms ist.

Möglicherweise stellt die Herunterregulierung der hepatischen 11- β -HSD 1-Aktivität einen Gegenmechanismus zur verstärkten Aktivität im adipösen Fettgewebe dar und somit keinen primären Prozess bei der Entwicklung eines metabolischen Syndroms.

Es gelang nicht, eine akute Beeinträchtigung der Aktivität der 11- β -HSD Typ 1-Aktivität unter Lipid/Heparin-Infusion nachzuweisen, aber ein indirekter oder chronischer Effekt auf deren Aktivität kann nicht ausgeschlossen werden.

5.3 Androgene und freie Fettsäuren bzw. Insulinresistenz

5.3.1 Freie Fettsäuren und Androgene

Es konnte gezeigt werden, dass Infusion freier Fettsäuren die Sexualhormone DHEA, Androstendion und Östron in vivo erhöhen. Dieser Effekt ist unabhängig von der darauf folgenden Erhöhung der Insulinresistenz, da er bereits zwei Stunden nach Infusionsbeginn eintrat (Abb. 16 bis 18).

5.3.1.1 17-Hydroxyprogesteron

In dieser Studie erhöhen freie Fettsäuren die messbare Konzentration von Androstendion im Blut (Abb. 16), dieses kann aus 17-OH-Progesteron oder aus DHEA (Dehydroepiandrosteron) synthetisiert werden (Abb. 20).

Während DHEA unter Lipid/Heparin-Infusion angestiegen ist (Abb. 17B), ist 17-OH-Progesteron nicht erhöht gemessen worden (Abb. 17A). Vorausgesetzt, die intrazellulären Spiegel korrelieren mit den Blutkonzentrationen, lässt sich daraus schließen, daß Androstendion nicht über diese Vorstufe vermehrt gebildet wurde, sondern über DHEA, was zu erhöht gemessenen Konzentrationen dieses Androgens in unserem Versuchsaufbau passt (Abb. 18). Da diese Erhöhung innerhalb von zwei Stunden eintritt, ist es unwahrscheinlich, dass freie Fettsäuren zu vermehrter Expression der mRNA für Synthesenzyme führen. Vielmehr spricht dies für eine direkte Beeinflussung der Enzymkinetik.

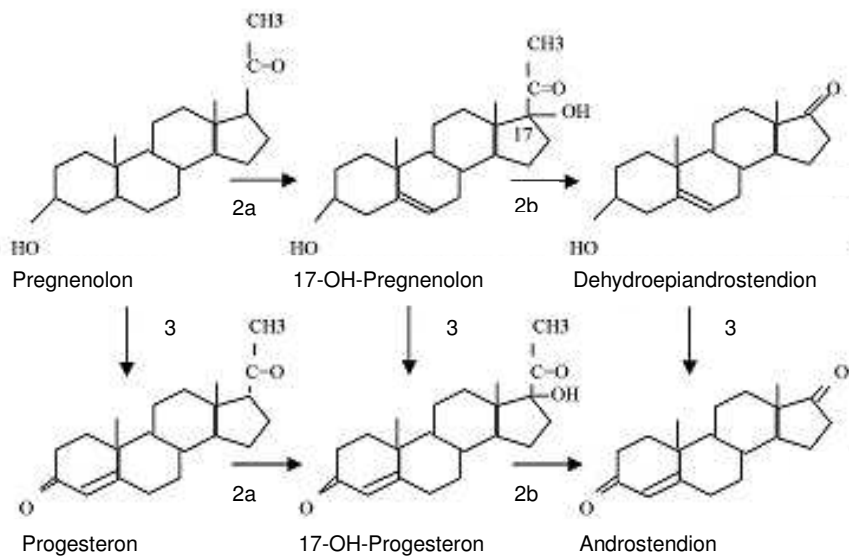


Abbildung 20: Androgenbiosynthese

2a: Hydroxylaseaktivität der P450C17

2b: Lyaseaktivität der P450C17

3 : 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase

5.3.1.2 DHEA

Da DHEA und DHEAS Androgene sind, die vornehmlich aus der Nebennierenrinde sezerniert werden (104-108), kann man davon ausgehen, dass der durch freie Fettsäuren vermittelte Effekt auf erhöhte Synthese in der Nebenniere zurückzuführen ist.

Interessanterweise traten keine erhöhten Werte für 17-OH-Progesteron auf. Eine erhöhte Aktivität der 17 α -Hydroxylase des P450c17 würde zu erhöhten Werten für 17-Hydroxypregnenolon, DHEA und 17-Hydroxyprogesteron führen. Jedoch würde eine relative Erhöhung der Lyaseaktivität des Enzyms zu erhöhtem DHEA, aber nicht zu erhöhtem 17-Hydroxyprogesteron führen, passend zu den hier erhobenen Ergebnissen.

Passend zu unseren Ergebnissen ist eine unterschiedliche Regulation dieses Enzyms bei Patienten mit schlecht eingestelltem Diabetes mellitus Typ 2, die erhöhte freie Fettsäuren haben, beschrieben (109). Ein akutes Anheben des Insulins in den hochnormalen Bereich führt wiederum zu selektiver Hemmung der 17,20-lyase Aktivität der Nebenniere (110). Man könnte vermuten, dass dieser Effekt durch den Insulin-induzierten Abfall freier Fettsäuren hervorgerufen wird.

Ein weiterer potentieller Mechanismus, der zu erhöhtem DHEA führen könnte, ist ein modulierender Effekt der freien Fettsäuren auf die hepatische Sulfotransferaseaktivität, der zu vermindertem DHEAS- und erhöhten DHEA-Werten führen könnte.

Es konnte keine Erniedrigung des DHEAS gemessen werden. Da die DHEA/DHEAS-Ratio sich zudem unter Lipid/Heparin-Infusion nicht änderte, ist eine Veränderung in der hepatischen Sulfotransferaseaktivität unwahrscheinlich (s. Kap. 4.6).

5.3.1.3 Androstendion, Östron

Androstendion ist sowohl die Vorläufersubstanz von Testosteron als auch von Östron (Abb 4).

Tatsächlich fanden wir erhöhte Werte für Östron, aber die Testosteronwerte blieben unverändert. Interessanterweise belegen Studien über die Pharmakokinetik und Verstoffwechslung von DHEA ein unterschiedliches Verhalten für Frauen und Männer mit signifikantem Anstieg der Androgene bei Frauen und Anstieg der Östrogene bei Männern (111,112).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass DHEA geschlechtsspezifische, gegensätzliche Effekte hat. Daher kann man spekulieren, dass die beschriebenen Effekte auf DHEA und Androstendion durch freie Fettsäuren zu Hyperandrogenämie bei Frauen führen, während diese bei gesunden jungen Männern

zu erhöht gemessenem Östron führen, wie es in diesem Versuchsaufbau der Fall war.

Wir verzichteten auf eine zusätzliche Messung des Östradiols, da wir keine Erhöhung für Testosteron fanden und somit keinen Hinweis auf eine veränderte 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenaseaktivität hatten. Die 17- β -HSD wandelt sowohl Androstendion in Testosteron als auch Östron in Östradiol um.

5.3.2 Androgene und Hyperinsulinämie/Insulinresistenz

Insulinresistenz, Hyperinsulinämie und Hyperandrogenämie sind Kennzeichen des PCO-Syndrom. Pathophysiologisch wird oft die Hyperinsulinämie als Auslöser für das PCO-Syndrom diskutiert.

Hierzu gibt es aber widersprüchliche Erkenntnisse. Rajkhowa et al. konnten keinen Zusammenhang zwischen Hyperinsulinämie und Hyperandrogenismus bei Frauen mit PCOS herstellen (113). Auch konnte bei Männern keine Übereinstimmung von Insulinsensitivität und Androgenspiegeln gefunden werden (114). Eine Reduktion des DHEAS kann bei schnellem Erhöhen des Insulinspiegels bei Normgewichtigen gefunden werden. Erzeugt man kurzzeitig Hyperinsulinämie nach oraler Glucosegabe, kann man beobachten, dass sowohl freie Fettsäuren als auch Androgene bei Frauen mit PCOS abfallen (115-118). Diese Befunde sind mit unseren in Übereinstimmung, da das Absinken der freien Fettsäuren unter Insulin zu einem Abfall der Androgene geführt haben kann.

In unserer Studie scheinen die Effekte der freien Fettsäuren auch von der anschließend erzeugten Insulinresistenz unbeeinträchtigt zu bleiben. Die Insulinresistenz beginnt bei diesem Versuchsaufbau nach etwa 210 min. (37), die Effekte auf die Androgene konnten bereits nach 120 Minuten Lipidinfusion beobachtet werden. Es ist daher unwahrscheinlich, dass zu diesem Zeitpunkt bereits eine Insulinresistenz bestand, zumal zu diesem Zeitpunkt die Bestim-

mung des r-HOMA im Vergleich zu Versuchsbeginn unverändert blieb (Tab. 4).

Zusammenschauend scheint es einige Hinweise darauf zu geben, dass die Hyperinsulinämie als pathogenetischer Faktor beim PCOS eher eine untergeordnete Rolle spielt. Allerdings hatte unsere Versuchsreihe nur einen kurzen Beobachtungszeitraum. Die Regulation bei chronisch Kranken hat möglicherweise andere Mechanismen, so dass auch hier Bedarf nach weiterer Forschung besteht. Unsere aktuellen Daten suggerieren allerdings, dass die Hyperandrogenämie eher durch die Fettsäuren selbst als durch die Insulinresistenz bedingt ist.

5.3.3 Androgene und ACTH

Die Aktivität der Nebennierenrinde unterliegt bekanntermaßen zum großen Teil zentraler Steuerung. Die gemessenen Werte von ACTH waren durch die Lipidinfusion nicht beeinträchtigt (Abb. 13), so dass wir davon ausgehen, dass die gesehenen Effekte durch Mechanismen innerhalb des Organs zustande kommen. Übereinstimmend mit dieser Erkenntnis gibt es keine Hinweise auf zentrale Beeinflussung bei durch dietätische Maßnahmen erzeugte Erniedrigung der Androgene (81).

Die genauen molekularen Mechanismen unserer Beobachtungen sind unklar und somit Gegenstand weiterer Studien.

5.3.4 Andere Ursachen der Hyperandrogenämie beim PCOS

Die in neueren Untersuchungen zum PCOS gezeigte vermehrte periphere Androgen-Umwandlung (73) war nicht Gegenstand dieser Untersuchung, spielt aber natürlich beim komplexen Krankheitsbild des PCOS auch eine Rolle. Eine veränderte Aktivität der 5 α -Reduktase konnten wir in unserem kurzen Versuch nicht darstellen (Tab. 3), so dass es sich hier um längere Regulationseffekte handeln muss. Ebenso war in unserem Versuch auch die Ausscheidung der Cortisolmetabolite nicht erhöht.

Inwieweit die erhöhten Androgene in unserem Experiment durch eine verminderte renale Clearance bedingt sind (119), konnten wir bei diesem Versuchsaufbau nicht klären.

6 Zusammenfassung

6.1 Freie Fettsäuren und 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1

Der genaue Pathomechanismus der Entwicklung einer Insulinresistenz unter erhöhten freien Fettsäuren im Blut ist unklar. Geprüft wurde die Hypothese, ob eine Erhöhung der freien Fettsäuren im Blut über eine Veränderung der Aktivität der hepatischen 11- β -HSD1 zur Insulinresistenz führen kann. In unserer Studie mit sechs gesunden, leicht übergewichtigen jungen Männern konnten wir während akuter, durch Infusion freier Fettsäuren induzierter Insulinresistenz keinen Effekt auf die Aktivität der 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (11- β -HSD1) in der Leber und im ganzen Körper sehen.

Somit scheinen Veränderungen der 11- β -HSD1-Aktivität keine signifikante pathophysiologische Bedeutung bei der Entwicklung der durch Fettsäuren induzierten Insulinresistenz zu haben. Allerdings können wir durch unsere Intervention nicht ausschließen, dass chronische Effekte auf die 11- β -HSD nicht doch stattfinden oder auch ein organspezifischer Einfluss auf die pathophysiologisch wichtige omentale 11- β -HSD1 vorliegt.

6.2 Freie Fettsäuren und Hyperandrogenämie beim PCO-Syndrom

Die Hyperandrogenämie als Leitsymptom des PCOS ist bisher pathophysiologisch nicht abschließend geklärt. Wir konnten in unserem Versuchsaufbau erstmalig zeigen, dass die Erhöhung der freien Fettsäuren alleine zu einer signifikanten Erhöhung der adrenalen Androgene führt. Dieser Befund war unab-

hängig von der Insulinresistenz aufgetreten und eröffnet möglicherweise neue therapeutische Optionen mit Medikamenten zur Senkung der freien Fettsäuren im Blut (z.B. Acipimox).

Unsere Befunde wurden bei Männern erhoben, um isoliert die adrenale Androgensynthese beurteilen zu können. Weitere Untersuchungen bei Frauen sind notwendig, um den Effekt der freien Fettsäuren auf die ovarielle Androgenproduktion zu untersuchen. Dennoch scheint der von uns gezeigte Zusammenhang eine klinisch wichtige Ursache in der sicherlich multifaktoriellen Genese des PCO-Syndroms zu sein.

- 1 Reaven GM, Hoffman BB. A role for insulin in the aetiology and course of hypertension? *Lancet* 1987; 2(8556):435-437.
- 2 DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991; 14(3):173-194.
- 3 M. Hanefeld · F. Schaper. A. Ceriello. Geschichte und Definition(en) des metabolischen Syndroms. *Internist* 2007 · 48:117–125.
- 4 Friedman TC, Mastorakos G, Newman TD et al. Carbohydrate and lipid metabolism in endogenous hypercortisolism: shared features with metabolic syndrome X and NIDDM. *Endocr J* 1996; 43(6):645-655.
- 5 Krakoff LR. Glucocorticoid excess syndromes causing hypertension. *Cardiol Clin* 1988; 6(4):537-545.
- 6 Imai Y, Abe K, Sasaki S et al. Altered circadian blood pressure rhythm in patients with Cushing's syndrome. *Hypertension* 1988; 12(1):11-19.
- 7 Nosadini R, Del PS, Tiengo A et al. Insulin resistance in Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57(3):529-536.
- 8 Olefsky JM, Kimmerling G. Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. *Am J Med Sci* 1976; 271(2):202-210.
- 9 Perley M, Kipnis DM. Effect of glucocorticoids on plasma insulin. *N Engl J Med* 1966; 274(22):1237-1241.
- 10 Yoon JC, Puigserver P, Chen G et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 2001; 413(6852):131-138.
- 11 Dimitriadis G, Leighton B, Parry-Billings M et al. Effects of glucocorticoid excess on the sensitivity of glucose transport and metabolism to insulin in rat skeletal muscle. *Biochem J* 1997; 321 (Pt 3):707-712.
- 12 Stewart PM, Boulton A, Kumar S, Clark PMS, Shackleton CHL. Cortisol metabolism in human obesity: impaired cortisone to cortisol conversion in subjects with central adiposity. *J Clin Endocrin Metabol* 1999; 84(3):1022-1027.
- 13 Glass AR, Burman KD, Dahms WT, Boehm TM. Endocrine function in human obesity. *Metabolism* 1981; 30(1):89-104.

- 14 Andrews RC, Herlihy O, Livingstone DE, Andrew R, Walker BR. Abnormal cortisol metabolism and tissue sensitivity to cortisol in patients with glucose intolerance. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(12):5587-5593.
- 15 Rask E, Walker BR, Soderberg S et al. Tissue-specific changes in peripheral cortisol metabolism in obese women: increased adipose 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(7):3330-3336.
- 16 Stewart PM, Krozowski ZS. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam Horm* 1999; 57:249-324.
- 17 Nomura S, Fujitaka M, Sakura N, Ueda K: Circadian rhythms in plasma cortisone and cortisol and the cortisone/cortisol ratio. *Clin Chim Acta* 1997; 266:83-91.
- 18 Endokriner und parakriner Metabolismus von endogenen und synthetischen Steroidhormonen. Habilitationsschrift von Dr. med. Sven Diederich. Berlin, 2003. Aus der Medizinischen Klinik IV, Endokrinologie, Diabetologie und Ernährungsmedizin, Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Freie Universität Berlin.
- 19 Bähr V, Pfeiffer AF, Diederich S. The metabolic syndrome x and peripheral cortisol synthesis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2002; 110(7):313-318.
- 20 Krozowski Z, Maguire JA, Stein-Oakley AN, Dowling J, Smith RE, Andrews RK: Immunohistochemical localization of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme in human kidney and placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:2203-2209.
- 21 Hirasawa G, Sasano H, Takahashi KI, Fukushima K, Suzuki T, Hiwatashi N, Toyota T, Krozowski ZS, Nagura H: Colocalization of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II and mineralocorticoid receptor in human epithelia. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3859-3863.
- 22 Shimojo M, Ricketts ML, Petrelli MD, Moradi P, Johnson GD, Bradwell AR, Hewison M, Howie AJ, Stewart PM: Immunodetection of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human mineralocorticoid target tissues: Evidence for nuclear localization. *Endocrinology* 1997; 138:1305-1311.
- 23 Whorwood CB, Mason JI, Ricketts ML, Howie AJ, Stewart PM. Detection of human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms using reverse-transcriptase-polymerase chain reaction and localization of the type 2 isoform to renal collecting ducts. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 110:R7-R12.

- 24 Escher G, Frey FJ, Frey BM : 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase accounts for low prednisolone/prednisone ratios in the kidney. *Endocrinology* 1994; 135:101-106.
- 25 Kotelevtsev Y, Holmes MC, Burchell A et al. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(26):14924-14929.
- 26 Morton et al. 2004, Novel adipose tissue-mediated resistance to diet-induced visceral obesity in 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-deficient mice. *Diabetes*. 2004 Apr;53(4):931-8.
- 27 Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H et al. A Transgenic Model of Visceral Obesity and the Metabolic Syndrome. *Science* 2001; 294:2166-2170.
- 28 Golay A, Swislocki AL, Chen YD, Jaspan JB, Reaven GM. Effect of obesity on ambient plasma glucose, free fatty acid, insulin, growth hormone, and glucagon concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63(2):481-484.
- 29 Guo Z, Hensrud DD, Johnson CM, Jensen MD. Regional postprandial fatty acid metabolism in different obesity phenotypes. *Diabetes* 1999; 48(8):1586-1592.
- 30 Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, Rossetti L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest* 1994; 93(6):2438-2446.
- 31 Boden G. Free fatty acids - the link between obesity and insulin resistance. *Endocr. Pract.* 2001 Jan-Feb; 7(1): 44-51.
- 32 Lam TK, Yoshii H, Haber CA et al. Free fatty acid-induced hepatic insulin resistance: a potential role for protein kinase C-delta. *Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2002; 283(4):E682-E691.
- 33 Lam TK, van de Werve G, Giacca A. Free fatty acids increase basal hepatic glucose production and induce hepatic insulin resistance at different sites. *Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003; 284(2):E281-E290.
- 34 Chen X, Iqbal N, Boden G. The effects of free fatty acids on gluconeogenesis and glycogenolysis in normal subjects. *J. Clin. Invest.* 1999; 103(3):365-372.

- 35 Baron AD, Brechtel G, Edelman SV. Effects of free fatty acids and ketone bodies on in vivo non-insulin-mediated glucose utilization and production in humans. *Metabolism* 1989; 38(11):1056-1061.
- 36 Ferrannini E, Barrett EJ, Bevilacqua S, DeFronzo RA. Effect of fatty acids on glucose production and utilization in man. *J Clin Invest* 1983; 72(5):1737-1747.
- 37 Boden G, Jadali F, White J et al. Effects of fat on insulin-stimulated carbohydrate metabolism in normal men. *J Clin Invest* 1991; 88(3):960-966.
- 38 Roden M, Stingl H, Chandramouli V et al. Effects of free fatty acid elevation on postabsorptive endogenous glucose production and gluconeogenesis in humans. *Diabetes* 2000; 49(5):701-707.
- 39 Ryysy L, Häkkinen A-M, Goto T, et al. Hepatic fat content and insulin action on free fatty acids and glucose metabolism rather than insulin absorption are associated with insulin requirements during insulin therapy in type 2 diabetic patients. 2000 May;49(5):749-58.
- 40 Koyama K, Chen G, Lee Y, Unger RH. Tissue triglycerides, insulin resistance, and insulin production: implications for hyperinsulinemia of obesity. *Am J Physiol* 1997 Oct;273(4 Pt 1):E708-13.
- 41 Simoneau JA, Colberg SR, Thaete FL, Kelley DE. Skeletal muscle glycolytic and oxidative enzyme capacities are determinants of insulin sensitivity and muscle composition in obese women. *FASEB J*. 1995 Feb;9(2):273-8.
- 42 Phillips DI, Caddy S, Ilic V, et al. Intramuscular triglyceride and muscle insulin sensitivity: evidence for a relationship in nondiabetic subjects. *Metabolism* 1996. Aug;45(8):947-50.
- 43 Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, et al. Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes* 1997 Nov;46(11):1768-74.
- 44 Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, et al. Tissue-specific overexpression of lipoproteinlipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 19;98(13):7522-7.
- 45 Boden G, Lebed B, Schatz M, et al. Effects of acute changes of plasma FFA on intramuscular fat content and insulin resistance in healthy subjects. *Diabetes* 2001 Jul;50(7):1612-7.

- 46 Dresner A et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest*. 1999 Jan;103(2):253-9.
- 47 Storlien LH, Jenkins AB, Chisholm DJ, et al. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and ω -3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes* 1991 Feb;40(2):280-9.
- 48 Farese RV et al. The role of diacylglycerol/protein kinase C signaling in insulin-stimulated glucose transport. *Trans Assoc Am Physicians*. 1991;104:187-930.
- 49 Bronfman M, Morales MN, Orellana A. Diacylglycerol activation of protein kinase C is modulated by long-chain acyl-CoA. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988 May 16;152(3):987-92.
- 50 Neshier M, Boneh A. Effect of fatty acids and their acyl-CoA esters on protein kinase C activity in fibroblasts: possible implications in fatty acid oxidation defects. *Biochim Biophys Acta* 1994 Mar 10;1221(1):66-72.
- 51 Chin JE, Dickens M, Tavaré JM, Roth RA. Overexpression of protein kinase C isoenzymes α , β I, γ and ϵ in cells overexpressing the insulin receptor. Effects on receptor phosphorylation and signaling. *J Biol Chem* 1993 Mar 25;268(9):6338-47.
52. Li J, DeFea K, Roth RA. Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1997 Apr 2;274(14):9351-6.
- 53 Ravichandran LV, Esposito DL, Chen J, Quon MJ. Protein kinase C- ζ phosphorylates insulin receptor or substrate-1 and impairs its ability to activate phosphatidylinositol. *J Biol Chem* 2001 Feb 2;276(5):3543-9.
54. Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G. Lipid induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C and I κ B- α . *Diabetes* 2002 Jul;51(7):2005-11.
- 55 Robert J Norman , Didier Dewailly , Richard S Legro , Theresa E Hickey. Polycystic ovary syndrome. *The Lancet*, Volume 370, Issue 9588, Pages 685 - 697, 25 August 2007.
- 56 Francisco Alvarez-Blasco, José I. Botella-Carretero, José L. San Millán, Héctor F. Escobar-Morreale. Prevalence and Characteristics of the Polycystic Ovary Syndrome in Overweight and Obese Women. *Arch Intern Med*. 2006;166:2081-2086.

- 57 Schöfl, Christof; Schill, Thilo; Geishövel, Franz; Brabant, Georg
Polyzystisches Ovarialsyndrom und Insulinresistenz Dtsch Arztebl 2004;
101(6): A-346 / B-294 / C-287
- 58 Geishövel F, Rabe T. The ESHRE/ASRM consensus on polycystic ovary
syndrome (PCOS)--an extended critical analysis. *Reprod Biomed online*
2007 Apr;14(4):522-35.
- 59 The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop
Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term
health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility*
- 60 Azziz R. Controversy in clinical endocrinology: diagnosis of polycystic
ovarian syndrome: the Rotterdam criteria are premature. *J Clin
Endocrinol Metab.* 2006 Mar;91(3):781-5.
- 61 Solomon CG, The epidemiology of polycystic ovary syndrome.
Prevalence and associated disease risks. *Endocrinol Metab Clin North
Am.* 1999 Jun;28(2):247-63.
- 62 Nicoletta Sonino, Giovanni A. Favali, Elisa Mani, Piera Belluardo and
Marco Boscaro. Quality of life of hirsute women. *Postgrad Med J* (1993)
69, 186- 189.
- 63 Ehrmann David A, Barnes Randall B., Rosenfield Robert L.,
Cavaghan Melissa K., Imperial Jacqueline. Prevalence of impaired
glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary
syndrome. *Diabetes Care* 22:141–146, 1999.
- 64 Robert J Norman , Didier Dewailly , Richard S Legro , Theresa E
Hickey. Polycystic ovary syndrome. *The Lancet*, Volume 370, Issue
9588, Pages 685 - 697, 25 August 2007
- 65 Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome:
mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 1997;
18(6):774-800.
- 66 Buffington CK, Givens JR, Kitabchi AE. Enhanced adrenocortical activity
as a contributing factor to diabetes in hyperandrogenic women.
Metabolism 1994; 43(5):584-590.
- 67 Deslypere JP, Verdonck L, Vermeulen A. Fat tissue: a steroid reservoir
and site of steroid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985
Sep;61(3):564-570.

- 68 Fehér T, Bodrogi L, Vallent K, Ribai Z. Role of human adipose tissue in the production and metabolism of steroid hormones. *Endokrinologie*. 1982 Oct;80(2):173-80.
- 69 Velazquez EM, Mendoza S, Hamer T, Sosa F, Glueck CJ. Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy. *Metabolism* 1994; 43(5):647-654.
- 70 Nestler JE, Jakubowicz DJ, Reamer P, Gunn RD, Allan G. Ovulatory and metabolic effects of D-chiro-inositol in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1999; 340(17):1314-1320.
- 71 Nestler JE, Jakubowicz DJ. Lean women with polycystic ovary syndrome respond to insulin reduction with decreases in ovarian P450c17 alpha activity and serum androgens. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(12):4075-4079.
- 72 Azziz R, Ehrmann D, Legro RS et al. Troglitazone improves ovulation and hirsutism in the polycystic ovary syndrome: a multicenter, double blind, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(4):1626-1632.
- 73 Dimitra A. Vassiliadi, Thomas M. Barber, Beverly A. Hughes, Mark I. McCarthy, John A. H. Wass, Stephen Franks, Peter Nightingale, Jeremy W. Tomlinson, Wiebke Arlt, and Paul M. Stewart. Increased 5 α -reductase activity and adrenocortical drive in women with Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. September 2009, 94(9):3558–3566.
- 74 Boda D, Păun D, Diaconeasa A. Evaluation of 5-alpha reductase activity on cultured fibroblast in patients with hyperandrogenemia. *Rom J Intern Med*. 2009;47(1):67-73.
- 75 Walter L. Miller Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA. *Molecular and Cellular Endocrinology* 198 (2002) 7 -14.
- 76 Holte J, Bergh T, Berne C, Lithell H. Serum lipoprotein lipid profile in women with the polycystic ovary syndrome: relation to anthropometric, endocrine and metabolic variables. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994; 41(4):463-471.
- 77 Boden G, Chen X, Rosner J, Barton M. Effects of a 48-h fat infusion on insulin secretion and glucose utilization. *Diabetes* 1995; 44(10):1239-1242.

- 78 Felber JP, Vannotti A. Effects of fat infusion on glucose tolerance and insulin plasma levels. *Med Exp Int J Exp Med* 1964; 10:153-156.
- 79 Lam TK, Carpentier A, Lewis GF, van de Werve G, Fantus IG, Giacca A. Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284(5):E863-E873.
- 80 Meikle AW, Stringham JD, Woodward MG, McMurry MP. Effects of a fat-containing meal on sex hormones in men. *Metabolism* 1990; 39(9):943-946.
- 81 Wang C, Catlin DH, Starcevic B, Heber D, Ambler C, Berman N, Lucas G, Leung A, Schramm K, Lee PW, Hull L, Swerdloff RS. Low-fat high-fiber diet decreased serum and urine androgens in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Jun;90(6):3550-9.
- 82 Belanger A, Locong A, Noel C et al. Influence of diet on plasma steroids and sex hormone-binding globulin levels in adult men. *J Steroid Biochem* 1989; 32(6):829-833.
- 83 Hill P, Wynder EL, Garbaczewski L, Garnes H, Walker AR. Diet and urinary steroids in black and white North American men and black South African men. *Cancer Res* 1979; 39(12):5101-5105.
- 84 Dorgan JF, Judd JT, Longcope C et al. Effects of dietary fat and fiber on plasma and urine androgens and estrogens in men: a controlled feeding study. *Am J Clin Nutr* 1996; 64(6):850-855.
- 85 Molta L, Schwartz U. Gonadal and adrenal androgen secretion in hirsute females. *Clin Endocrinol Metab* 1986; 15(2):229-245.
- 86 Lobo RA, Goebelsmann U, Brenner PF, Mishell DR, Jr. The effects of estrogen on adrenal androgens in oophorectomized women. *Am J Obstet Gynecol* 1982; 142(4):471-478.
- 87 Maroulis GB, Abraham GE. Ovarian and adrenal contribution to peripheral androgens during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1974; 39(2):340-346.
- 88 Besser GM, Rees LH (1985) *The pituitary-adrenocortical axis*, Saunders, Philadelphia (Clinics in endocrinology and metabolism, Vol. 14/4).
- 89 Keller-Wood ME, Dallman MF (1984) Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Rev* 5/1: 1-24.
- 90 Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2003 Jan;26 Suppl 1:S5-20.

- 91 DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979; 237(3):E214-E223.
- 92 Stewart PM, Wallace AM, Atherden SM, Shearing CH, Edwards CR. Mineralocorticoid activity of carbenoxolone: contrasting effects of carbenoxolone and liquorice on 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in man. *Clin Sci Colch* 1990; 78(1):49-54.
- 93 Mai K, Andres J, Bobbert T, Maser-Gluth C, Möhlig M, Bähr V, Pfeiffer AF, Spranger J, Diederich S. Rosiglitazone decreases 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in subcutaneous adipose tissue. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007 Sep;67(3):419-25.
- 94 Best R, Walker BR. Additional value of measurement of urinary cortisone and unconjugated cortisol metabolites in assessing the activity of 11b-hydroxysteroid dehydrogenase *in vivo*. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997; 47:231-236.
- 95 Müssig K, Remer T, Fritsche A, Häringa H-U, Maser-Gluth C: Urinary free cortisone, but not cortisol, is associated with urine volume in severe obesity. *Steroids* 74 (2009) 742-745
- 96 Quinkler M, Troeger H, Eigendorff E, Maser-Gluth C, Stiglic A, Oelkers W, Bähr V, Diederich S. Enhanced 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in stress adaption in the guinea pig. *J Endocrinol* 2003 Feb;176(2).185-92.
- 97 Paterson JM, Morton NM, Fievet C, Kenyon CJ, Holmes MC, Staels B, Seckl JR, Mullins JJ. Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 May 4;101(18):7088-93.
- 98 Masuzaki H, Yamamoto H, Kenyon CJ et al. Transgenic amplification of glucocorticoid action in adipose tissue causes high blood pressure in mice. *J Clin Invest* 2003; 112(1):83-90.
- 99 Hermanofwski-Vosatka et al. PPARalpha agonists reduce 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Dec 20;279(2):330-6.
- 100 Kliewer et al. 1997, Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 29;94(9):4318-23.

- 101 Morton NM, Ramage L, Seckl JR. Down-regulation of adipose 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 by high-fat feeding in mice: a potential adaptive mechanism counteracting metabolic disease. *Endocrinology* 2004; 145(6):2707-2712.
- 102 Livingstone DE, Kenyon CJ, Walker BR. Mechanisms of dysregulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obese Zucker rats. *J endocrinol* 2000; 167(3):533-539.
- 103 Paulmyer-Lacroix et al., Expression of the mRNA coding for 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase Type 1 in adipose tissue of obese patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87 (6):2701-2705.
- 104 Longcope C. Adrenal and gonadal androgen secretion in normal females. *Clin Endocrinol Metab* 1986; 15(2):213-228.
- 105 Endoh A, Kristiansen SB, Casson PR, Buster JE, Hornsby PJ. The zona reticularis is the site of biosynthesis of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in the adult human adrenal cortex resulting from its low expression of 3b-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3558-3565.
- 106 Lobo RA, Paul WL, Goebelsmann U. Dehydroepiandrosterone sulfate as an indicator of adrenal androgen function. *Obstet Gynecol* 1981; 57(1):69-73.
- 107 Burger HG. Androgen production in women. *Fertil Steril* 2002; 77 Suppl 4:S3-S5.
- 108 Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Simard J. DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. *Front Neuroendocrinol* 2001; 22(3):185-212.
- 109 Ueshiba H, Shimizu Y, Hiroi N et al. Decreased steroidogenic enzyme 17,20-lyase and increased 17-hydroxylase activities in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2002; 146(3):375-380.
- 110 Nestler JE, McClanahan MA, Clore JN, Blackard WG. Insulin Inhibits Adrenal 17,20-Lyase Activity in Man. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74:362-367.
- 111 Arlt W, Justl HG, Callies F et al. Oral dehydroepiandrosterone for adrenal androgen replacement: pharmacokinetics and peripheral conversion to androgens and estrogens in young healthy females after dexamethasone suppression. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(6):1928-1934.

- 112 Arlt W, Haas J, Callies F et al. Biotransformation of oral dehydroepiandrosterone in elderly men: significant increase in circulating estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(6):2170-2176.
- 113 Rajkhowa M, Bicknell J, Jones M, Clayton RN. Insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome: relationship to hyperandrogenemia. *Fertil Steril* 1994; 61(4):605-612.
- 114 Ebeling P, Stenman UH, Seppala M, Koivisto VA. Acute hyperinsulinemia, androgen homeostasis and insulin sensitivity in healthy man. *J Endocrinol* 1995; 146(1):63-69.
- 115 Nestler JE, Clore JN, et al. The effects of hyperinsulinemia on serum testosterone, progesterone, dehydroepiandrosterone sulfate, and cortisol levels in normal women and in a woman with hyperandrogenism, insulin resistance, and acanthosis nigricans. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64(1):180-184.
- 116 Diamond MP, Grainger DA, Laudano AJ, Starick-Zych K, DeFronzo RA. Effect of acute physiological elevations of insulin on circulating androgen levels in nonobese women. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72(4):883-887.
- 117 Buyalos RP, Geffner ME, Azziz R, Judd HL. Impact of overnight dexamethasone suppression on the adrenal androgen response to an oral glucose tolerance test in women with and without polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 1997; 12(6):1138-1141.
- 118 Hubert GD, Schriock ED, Givens JR, Buster JE. Suppression of circulating delta 4-androstenedione and dehydroepiandrosterone sulfate during oral glucose tolerance test in normal females. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73(4):781-784.
- 119 Remer T. Free fatty acids and androgen precursors in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 2006, letter re: K. Mai, T. Bobbert, V. Kullmann, J. Andres, H. Rochlitz, M. Osterhoff, M. O. Weickert, V. Bähr, M. Möhlig, A. F. H. Pfeiffer, S. Diederich, J. Spranger. Free Fatty Acids Increase Androgen Precursors *in Vivo*. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1501-1507

8 **Abbildungen und Tabellen**

- Abb. 1: Aktivierung der 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1 (11 β -HSD1)
- Abb. 2: Regulation renaler Glucocorticoid-Rezeptoren durch die 11 β -HSD2
- Abb. 3: Cholesterin-Grundgerüst
- Abb. 4: Übersicht über die Steroidbiosynthese
- Abb. 5: Versuchstag 1
- Abb. 6: Versuchstag 2
- Abb. 7: Versuchstag 3
- Abb. 8: Versuchstag 4
- Abb. 9: FFA unter Lipid/Heparin-Infusion und unter Kochsalz/Heparin-Infusion. Mittelwerte \pm SEM.
- Abb. 10: Glucoseinfusionsrate während konstanter Euglykämie beim hyperinsulinämischen Clamp mit Lipid/Heparin-Infusion und Kochsalz/Heparin-Infusion. Mittelwerte und SD.
- Abb. 11: Cortisol nach Einnahme von Cortisonacetat unter Lipid/Heparin-Infusion und unter Kochsalz/Heparin-Infusion. Mittelwerte \pm SEM

Abb. 12: Cortisol/Cortison-Ratio nach Einnahme von Cortisonacetat unter Lipid/Heparin- Infusion und unter Kochsalz/Heparin-Infusion. Mittelwerte \pm SEM.

Abb. 13: ACTH unter Kochsalz/Heparin- und unter Lipid/Heparin-Infusion. Mittelwerte \pm SEM.

Abb. 14: UFF/UFE-Ratio während Lipid/Heparin-Infusion und während Kochsalz/Heparin-Infusion. Mittelwert \pm SD.

Abb. 15: (5 α -THF+THF)/THE-Ratio während Lipid/Heparin-Infusion und während Kochsalz/Heparin-Infusion. Mittelwert \pm SD.

Abb. 16: Androstendion während Lipid/Heparin-Infusion vs. Kochsalz/Heparin-Infusion. Mittelwerte \pm SEM.

Abb. 17: 17-Hydroxyprogesteron und DHEA während Lipid/Heparin-Infusion vs. Kochsalz/Heparin-Infusion.

Abb 18: Testosteron und Östron während Lipid/Heparin-Infusion vs. Kochsalz/Heparin-Infusion. Mittelwerte \pm SEM.

Abb 19: LH und FSH während Lipid/Heparin-Infusion vs. Kochsalz /Heparin-Infusion. Mittelwerte \pm SEM.

Abb 20: Androgenbiosynthese

Tab. 1: Probandenanthropometrie

Tab. 2: Laborwerte der Probanden

Tab. 3: Urinsteroide. Mittelwerte \pm SD

Tab. 4: Mittlere Insulinkonzentration und HOMA-Werte

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Volker Kullmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema

11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1 und adrenale Androgene unter durch Fettsäuren induzierter Insulinresistenz

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin,

Volker Kullmann