

Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Endokrinologie,  
Diabetes und Ernährungsmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Metabolische Regulation adrenaler Androgene bei gesunden jungen  
Frauen: Ergebnisse einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Studie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Franziska Reinecke

aus Berlin

---

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. J. Spranger  
2. Prof. Dr. med. U. Kintscher  
3. Priv.-Doz. Dr. S. Engeli

Datum der Promotion: 03.09.2010

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>5</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
1.1. Polyzystisches Ovarialsyndrom (PCOS) .....	7
1.2. Androgenstoffwechsel bei Frauen .....	8
1.2.1. Androgene bei Frauen .....	8
1.2.2. Regulation der Androgensynthese und –sekretion .....	9
1.2.2.1 Regulation durch Hypothalamus und Hypophyse .....	9
1.2.2.2 Androgenbiosynthese in der Nebennierenrinde .....	10
1.2.2.3 Androgen- und Östrogenbiosynthese im Ovar .....	12
1.2.2.4 Metabolisierung der Androgene .....	13
1.3. Ätiologie des PCOS .....	13
1.3.1. PCOS und Hypophyse/ Hypothalamus .....	14
1.3.2. PCOS und ovarieller Androgenexzess .....	14
1.3.3. PCOS und adrenaler Androgenexzess .....	15
1.3.4. PCOS und peripherer Androgenbeitrag .....	15
1.3.5 Einfluss von Insulin auf die Androgenspiegel .....	16
1.4. Freie Fettsäuren und Androgene .....	20
1.5. Ziel der Studie .....	22
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>23</b>
2.1. Probandinnen .....	23
2.2. Untersuchungsmethoden .....	24
2.3. Labormethoden .....	27
2.4. Fettsäurelösung .....	31
2.5. Urinandrogene .....	31
2.6. Statistik .....	32
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>34</b>
3.1. Stoffwechselfparameter .....	34
3.2. Hormonanalyse .....	37
3.2.1. Androgenvorstufen .....	37

3.2.2.	Androgene und SHBG .....	40
3.2.3.	Gestagene und Östrogene .....	43
3.2.4.	Evaluation hypophyseärer Hormone .....	45
<b>3.3.</b>	<b>Urinmetabolite .....</b>	<b>48</b>
<b>3.4.</b>	<b>Indizes für Enzymaktivitäten .....</b>	<b>53</b>
<b>3.5.</b>	<b>Standardlaborwerte .....</b>	<b>54</b>
<b>3.6.</b>	<b>Assaybeeinflussung .....</b>	<b>55</b>
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>56</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>68</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>70</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>78</b>
	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>79</b>

# Abkürzungsverzeichnis

<b>3<math>\beta</math>-HSD</b>	3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
<b>16<math>\alpha</math>-OH-DHEA</b>	16 $\alpha$ -Hydroxy-DHEA
<b>17-OHP</b>	17-Hydroxyprogesteron
<b>17<math>\beta</math>-HSD</b>	17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
<b>ACTH</b>	Adrenocorticotropes Hormon
<b>ADG</b>	Androstandiol- Glucuronid
<b>An</b>	Androsteron
<b>Androstendiol</b>	5-Androsten-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol
<b>Androstendion</b>	4-Androsten-3,17-dion
<b>Androstentriol</b>	5-Androsten-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol
<b>AR</b>	Androgen-Rezeptors
<b>ASRM</b>	American Society for Reproductive Medicine
<b>AUC</b>	area under the concentration-time-curve
<b>BMI</b>	Body-Mass-Index
<b>cAMP</b>	Cyclisches Adenosinmonophosphat
<b>CBG</b>	Cortisol bindendes Globulin
<b>CRH</b>	Corticotropin-Releasing-Hormon
<b>CRP</b>	C-reaktives Protein
<b>DAG</b>	Diacylglycerol
<b>DHEA</b>	Dehydroepiandrosteron
<b>DHEAS</b>	Dehydroepiandrosteronsulfat
<b>DHT</b>	Dihydrotestosteron
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>ESHRE</b>	European Society for Human Reproduction and Embryology
<b>Et</b>	Etiocolanolon
<b>FAI</b>	Freier Androgenindex
<b>FFA</b>	Freie Fettsäuren
<b>FSH</b>	Follikelstimulierendes Hormon
<b>fTesto</b>	Freies Testosteron

<b>GC-MS</b>	Gaschromatographie und Massenspektrometrie
<b>GH</b>	Wachstumshormon (Growth hormone)
<b>GH-RH</b>	Growth-hormone-releasing hormone
<b>GIR</b>	Glukoseinfusionsrate
<b>GnRH</b>	Gonadotropin-Releasing-Hormon
<b>HDL-Cholesterin</b>	High-Density-Lipoprotein-Cholesterin
<b>HOMA-Index</b>	Homeostasis Model Assessment Index
<b>HVL</b>	Hypophysenvorderlappen
<b>IGF-1</b>	Insulin-like growth factor 1
<b>IR</b>	Insulinresistenz
<b>IRMA</b>	Immunoradiometrische Assay
<b>KOF</b>	Körperoberfläche
<b>LDL-Cholesterin</b>	Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin
<b>LH</b>	Luteinisierendes Hormon
<b>LHI</b>	Lipid/Heparin-Infusion
<b>MAPK</b>	mitogen-activated protein-kinase
<b>n.s.</b>	nicht signifikant
<b>NHI</b>	Natrium-Chlorid/Heparin-Infusion
<b>NNR</b>	Nebennierenrinde
<b>PCOS</b>	Polyzystisches Ovarialsyndrom
<b>PI-3K</b>	Phosphatidyl-inositol-3-kinase
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>RIA</b>	Radioimmunoassays
<b>SHBG</b>	Sexualhormonbindendes Globulin
<b>TRH</b>	Thyreotropin-releasing-hormone
<b>TSH</b>	Thyroidea-stimulating-hormone
<b>WHR</b>	Waist-to-Hip-Rati

# 1. Einleitung

## 1.1. Polyzystisches Ovarialsyndrom (PCOS)

Das Polyzystische Ovarialsyndrom zählt mit einer Prävalenz von sechs bis acht Prozent zu den häufigsten Endokrinopathien der Frau (1). Die Ätiologie und die klinischen Manifestationen sind äußerst vielfältig (1).

Nach den aktuellen Rotterdam-Kriterien von 2003 der European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) und der American Society for Reproductive Medicine (ASRM) (2) liegt ein Polyzystisches Ovarialsyndrom vor, wenn zwei der drei folgenden Kriterien erfüllt sind:

- chronische Anovulation (Oligo- bzw. Amenorrhoe),
- klinischer (Hirsutismus, Akne, Alopezie) oder laborchemischer (Hyperandrogenämie) Hyperandrogenismus,
- und polyzystische Ovarien.

Dabei müssen andere potentiell ursächliche Erkrankungen vor Diagnosestellung ausgeschlossen werden (2). Zu diesen Erkrankungen zählen z.B. androgenproduzierende Tumoren der Nebennieren und der Ovarien, das late-onset-adrenogenitale Syndrom, Cushing-Syndrom, angeborene Insulin-Resistenz-Störungen, idiopathischer Hirsutismus, Hyperprolaktinämie, Schilddrüsenfunktionsstörungen, Akromegalie oder auch Essstörungen wie Anorexie. Zudem muss ausgeschlossen werden, dass die Symptomatik nicht durch die Einnahme bestimmter Medikamente wie z.B. Sexualsteroiden mit androgener Partialwirkung oder androgene Anabolika hervorgerufen wurde. (3,4). Neben den drei Hauptkriterien können weitere hormonelle und metabolische Veränderungen beobachtet werden. So kann häufig eine gestörte Gonadotropinsekretion mit erhöhten LH-Spiegeln und einem angehobenem LH/FSH-Quotienten festgestellt werden (3). Zudem sind oft metabolische Abweichungen wie Insulinresistenz, Hyperinsulinämie, gestörte Glukosetoleranz (40%) (3), Diabetes mellitus Typ 2 (10%) sowie eine Dyslipidämie mit niedrigem HDL-Cholesterin, erhöhtem LDL-Cholesterin und eine Hypertriglyzeridämie zu beobachten (3). Insgesamt ist das metabolische Syndrom bestehend aus abdomineller Adipositas, Hypertonie, Hypertriglyceridämie, verringertem HDL-Cholesterin und

erhöhter Nüchternblutglukose bei 46% dieser Patientinnen zu beobachten. Adipositas (50%) (3), vermehrte Infertilität und eine höhere Abortrate (5) sind außerdem häufig geschilderte Probleme der Patientinnen.

Obwohl die Ausprägung der klinischen Symptomatik bei PCOS- Patientinnen individuell sehr variabel ist, besitzen sowohl schlanke als auch übergewichtige PCOS-Patientinnen oft eine ausgeprägtere Insulinresistenz und einen stärkeren Hyperinsulinismus als gleichaltrige Frauen mit vergleichbarem Gewicht jedoch ohne PCO-Syndrom (6). Die Hyperandrogenämie gehört zu den zentralen Symptomen beim PCOS. Jedoch scheint diese nicht bei allen PCOS-Patientinnen vorzukommen, was die Heterogenität dieses Krankheitsbildes unterstreicht. Insgesamt ist eine Hyperandrogenämie bei 50-90% der PCOS-Patientinnen zu beobachten, wobei folgende Androgene häufig betroffen sind: Dehydroepiandrosteron (DHEA), Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS), Androstendion, Testosteron, Dihydrotestosteron (DHT) und Androstandiol-Glucuronid (ADG) (7). Auch hier scheint eine Adipositas zur zusätzlichen Verstärkung der Hyperandrogenämie beizutragen. Dementsprechend konnte in einer Untersuchung gezeigt werden, dass ein ansteigender BMI mit steigenden Spiegeln von totalem Testosteron, freiem Testosteron und DHEAS bei PCOS-Patientinnen verbunden war (1).

## **1.2. Androgenstoffwechsel bei Frauen**

Die Androgene bei Frauen werden in der Nebennierenrinde und im Ovar gebildet. In peripheren Organen wie dem Fettgewebe oder der Haut, können jedoch auch Androgene aus Androgenvorstufen produziert werden (8). Sowohl die Nebennierenrinde als auch das Ovar enthalten alle für die Biosynthesewege notwendigen Enzyme für die Androgensynthese und Sekretion (9).

### **1.2.1. Androgene bei Frauen**

Die Androgenvorstufen DHEAS, DHEA und Androstendion sind selbst nur schwach androgen wirksam, während hingegen Testosteron und DHT eine starke androgene Wirkung besitzen (8,10). Die Nebennierenrinde produziert in der Zona reticularis DHEA (60-70%), DHEAS (80-90%), Androstendion (50%), Testosteron (20-30%) und in sehr geringen Mengen auch DHT (5, 8). Die Sekretion steht unter der Kontrolle des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH) (9). Das



Hauptandrogen der Nebennierenrinde DHEA steht im Gleichgewicht mit seinem sulfatierten Metaboliten DHEAS durch die DHEA-Sulfotransferase (Hydroxysteroid-Sulfotransferase) und die Steroid-Sulfatase (11,5,12). Die DHEA-Sulfotransferase ist hauptsächlich in der Leber aber auch in der Nebenniere und in der Haut lokalisiert (11,12). DHEAS ist nach Abgabe an die Blutbahn eine wichtige Quelle für die periphere Androgenproduktion (8), aus der dann in den peripheren Zielorganen Androstendion und Testosteron (20-50%) gewonnen werden kann (8,5). Neuere Studien scheinen zu belegen, dass nach Umwandlung von DHEA zu DHEAS keine Rückumwandlung mehr zu DHEA stattfindet, was die Rolle des DHEAS als periphere Androgenquelle etwas in Frage stellt (12). Hier bleiben weitere, bestätigende Studien vorerst abzuwarten. Im Ovar wird neben Androstendion (50%) auch Testosteron (20-30%) und DHEA (10-25%) gebildet (5,9). Die Produktion findet in den Thekazellen des Follikels statt und wird dort durch das Luteinisierende Hormon (LH) gesteuert (9). DHT ist der stark potente Hauptmetabolit des Testosterons und entsteht hauptsächlich peripher durch Konversion aus Testosteron durch die 5 $\alpha$ -Reduktase in der Haut (8). ADG wiederum ist der Hauptmetabolit von DHT und gilt als ein Marker für den peripheren Androgenmetabolismus (13).

Für die Wirksamkeit der einzelnen Androgene sind zwei Faktoren entscheidend. Zum einen ist es die Androgenkonzentration im Blut, wobei nur die freien Androgene, die nicht an das Sexualhormonbindende Globulin (SHBG) und an Albumin gebunden sind, biologische Wirksamkeit besitzen (5). Zum anderen spielt die Androgensensitivität der Zielgewebe eine wichtige Rolle, denn das klinische Ausmaß, zum Beispiel einer kutanen Androgenisierung, ist individuell sehr variabel und korreliert nicht genau mit den zirkulierenden Androgenspiegeln im Blut (3). So ist die Androgenwirkung von der Rezeptordichte, Rezeptorverteilung und der Rezeptoraktivität der Zielgewebe abhängig. Bei Männern korrelierte in einer Studie die Aktivität des Androgen-Rezeptors (AR) negativ mit der CAG-Repeat-Länge in Exon 1 des x-chromosomal gelegenen AR-Gens (14).

## **1.2.2. Regulation der Androgensynthese und –sekretion**

### **1.2.2.1 Regulation durch Hypothalamus und Hypophyse**

Im Hypothalamus wird das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) gebildet und in das hypothalamisch-hypophysäre Pfortadersystem freigesetzt, wodurch es dann zum

Hypophysenvorderlappen (Adenohypophyse) gelangt und dort die Synthese und Sekretion von LH und FSH bewirkt. Die Sekretion von GnRH erfolgt in pulsatilem Form alle 60-120 Minuten. Von besonderer Bedeutung ist, dass nur eine regelrechte pulsatile Sekretion von GnRH zu einer wirksamen Freisetzung von LH und FSH führt. Das heißt, dass es bei einer dauerhaften Stimulation mit GnRH zu einer Desensibilisierung der Hypophyse mit Abnahme der Gonadotropinsekretion kommt (15).

Die LH und FSH-Ausschüttung aus der Hypophyse in den Systemblutkreislauf folgt ebenfalls einem pulsatilem Charakter, der den kurz zuvor stattgefundenen GnRH-Puls reflektiert (15). Die Gonadotropine aber auch GnRH werden zudem durch einen negativen Feedback-Mechanismus durch die Sexualsteroiden (Östrogene, Gestagene) reguliert. LH und FSH haben ihre Wirkung vornehmlich an den Gonaden, wo sie die Hormon- und Keimzellproduktion kontrollieren (16).

Das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) aus dem Hypothalamus führt zur Ausschüttung von ACTH aus dem Hypophysenvorderlappen (HVL). Auch die Ausschüttung von CRH und ACTH erfolgt pulsatil und unterliegt einem zirkadianen Rhythmus (17). CRH und ACTH unterliegen ebenfalls einem negativen Feedback-Mechanismus durch die Serum-Kortisol-Konzentration. Die Funktion des ACTH besteht in der Kontrolle der Synthese und Ausschüttung der Nebennierenrindenhormone (Glukokortikosteroide, adrenale Androgene und in geringerem Ausmaß auch Mineralokortikosteroide). Dabei stimuliert ACTH u.a. die Expression mehrerer Enzyme, wie zum Beispiel der 20,22-Desmolase, der 17-Hydroxylase und der 17,20-Lyase, die für die Steroidhormonbiosynthese in der Nebennierenrinde verantwortlich sind (18).

### **1.2.2.2 Androgenbiosynthese in der Nebennierenrinde**

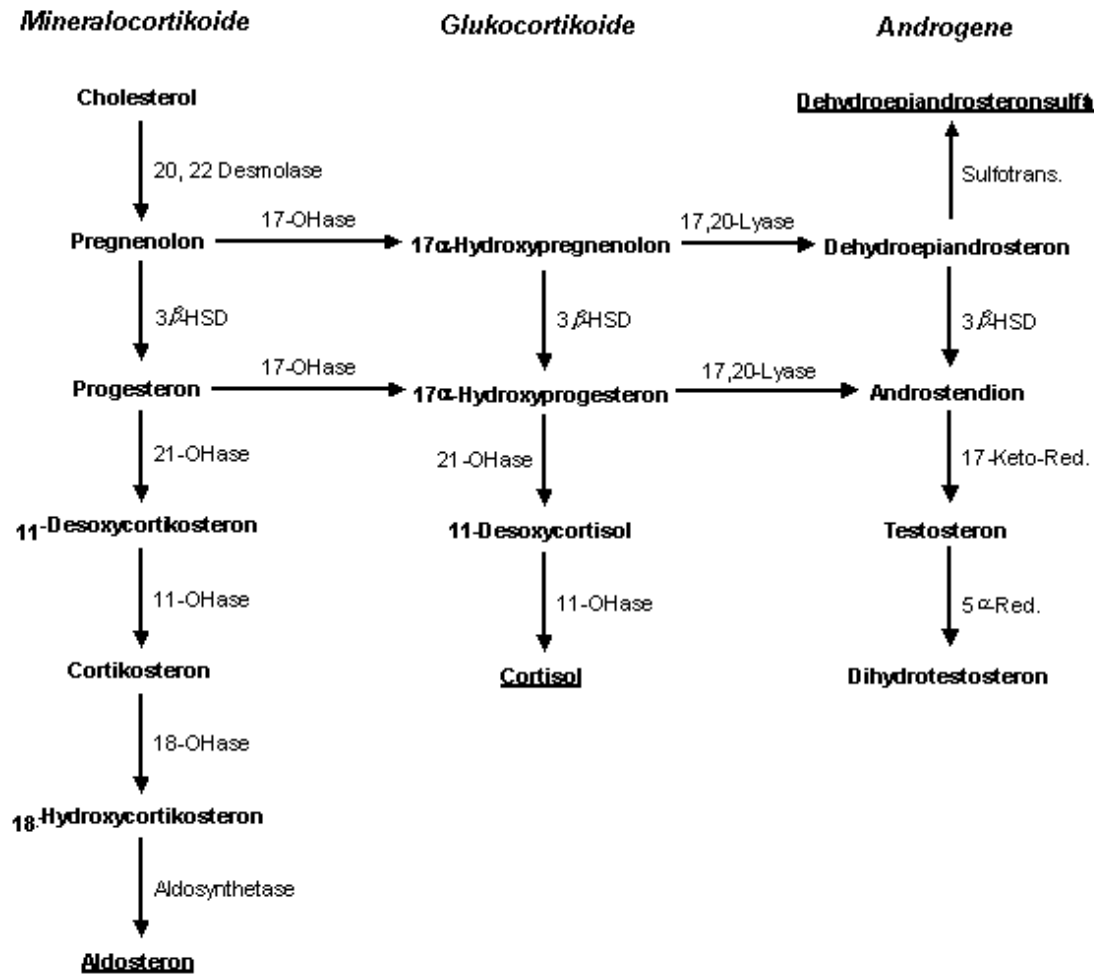
Ausgangsprodukt für die gesamten Steroidbiosynthesen der Nebennierenrindenhormone ist das Cholesterin. Die Umwandlung von Cholesterin zu Pregnenolon ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Steroidbiosynthese. Diese Reaktion findet in den Mitochondrien statt und erfolgt durch die 20,22-Desmolase, die zu den cytochromabhängigen P450-Oxygenasen gehört und durch ACTH induziert wird (19). Eine weitere wichtige Oxygenase in der Androgenbiosynthese ist die P450c17-Oxygenase, die ebenfalls zu den cytochromabhängigen P450-Oxygenasen gehört und zwei Enzyme katalysiert, die 17-Hydroxylase und die 17,20-Lyase. Die 17 $\alpha$ -Hydroxylase ist notwendig für die Produktion von 17-Hydroxypregnenolon und 17-Hydroxyprogesteron aus Pregnenolon und Progesteron. Die

17,20-Lyase wiederum wird benötigt für die Bildung von DHEA und Androstendion aus 17-Hydroxypregnenolon und 17-Hydroxyprogesteron.

Ein weiteres wichtiges Enzym in der Androgenbiosynthese ist die  $3\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase ( $3\beta$ -HSD), die für die Konversion von Pregnenolon, 17-Hydroxypregnenolon und DHEA zu Progesteron, 17-Hydroxyprogesteron und Androstendion verantwortlich ist.

Die Bildung von Testosteron erfolgt wiederum aus Androstendion durch die  $17\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase ( $17\beta$ -HSD) und die von Dihydrotestosteron aus Testosteron durch die  $5\alpha$ -Reduktase (8). Diese beiden Umwandlungsschritte finden aber meist peripher statt, trotz aller für die Synthese vorhandenen Enzyme in der Nebennierenrinde (20). Durch die Aromatase kann nachfolgend Androstendion in Östron und Testosteron in Östradiol umgewandelt werden. Die Aromatase befindet sich in den Gonaden, im Fettgewebe und in der Haut (21). Die einzelnen Metabolisierungsschritte sind zusammenfassend in Abbildung 1 dargestellt.

**Abbildung 1: Steroidhormonbiosynthesen in der Nebennierenrinde**



Quelle: (22).

**1.2.2.3 Androgen- und Östrogenbiosynthese im Ovar**

Die Hormonbiosynthese und -sekretion im Ovar findet in den äußeren Thekazellen und inneren Granulosazellen des Follikels und im Corpus luteum statt. Wie auch in der Nebennierenrinde stellen die Androgene hier die obligaten Vorstufen der Östrogene dar. Die Hormonsynthesewege mit den beteiligten Enzymen unterscheiden sich nicht von denen der Nebennierenrinde (23).

Die Thekazellen synthetisieren und sezernieren zum einen unter Einfluss von LH die Androgene Androstendion und Testosteron oder gewinnen beide Hormone durch Umwandlung aus aufgenommenem DHEA aus der NNR. Androstendion und Testosteron diffundieren dann in die Granulosazellen und werden dort durch die Aromatase zu den Östrogenen Östron und Östradiol umgewandelt. Die Aromatase wird durch FSH induziert. Im Gegensatz dazu wird das Gestagen Progesteron im Ovar überwiegend vom Corpus luteum sezerniert, das sich durch den Einfluss von LH aus den verbliebenden Follikelresten nach der Ovulation bildet (16). Das biologisch aktivere Östradiol ist im Serum an SHBG und an Albumin gebunden (24).

#### **1.2.2.4 Metabolisierung der Androgene**

DHEAS kann direkt durch die Niere ausgeschieden, durch Hydrolyse der Sulfatgruppe zu DHEA abgebaut oder zu Androstendiolsulfat metabolisiert werden. Jedoch werden DHEAS und seine Metaboliten deutlich langsamer über die Niere ausgeschieden als nicht sulfatierte Metaboliten. Zudem werden DHEA und seine Metaboliten zu einem bedeutenden Anteil auch über die Fäzes ausgeschieden, DHEAS-Metaboliten sogar zu 30-45 Prozent (12). Androstendion wird durch die 5 $\alpha$ -Reduktase zu Androsteron und Etiocholanolon reduziert.

### **1.3. Ätiologie des PCOS**

Die Pathophysiologie des Polyzystischen Ovarialsyndroms ist noch nicht vollständig geklärt, ebenso wenig wie die Ursachen der hormonellen und metabolischen Veränderungen die mit diesem Syndrom einhergehen. Es wird aber eine multifaktorielle Genese angenommen (15,3,25), wobei Familienuntersuchungen zudem eine genetische Komponente nahelegen (3). So tritt ein PCOS ebenfalls bei bis zu 22% der Schwestern von PCOS-Patientinnen auf (26). Es existieren mehrere Erklärungsmodelle für die Ätiologie dieser Erkrankung, die alle von verschiedenen Ursachen des Syndroms ausgehen oder eine bestimmte Abweichung als vorherrschend in dieser Erkrankung betrachten. So gibt es Theorien, die die Ursache vor allem in einer adrenalen oder ovariellen Hyperandrogenämie sehen (27). Andere Autoren gehen eher von einer Störung auf der Ebene der Hypophyse oder des Hypothalamus aus (27) oder vermuten die Ursache in der mit diesem Syndrom einhergehenden Insulinresistenz bzw. Hyperinsulinämie (27). Im

Nachfolgenden sind diese Theorien im Einzelnen näher dargestellt, wobei grundsätzlich die Ätiologie des PCOS durchaus heterogen sein dürfte.

### **1.3.1. PCOS und Hypophyse/ Hypothalamus**

Der Hypothalamus könnte über eine Störung der GnRH-Freisetzung mit Zunahme der Frequenz und Amplitude der pulsatilen LH-Sekretion eine Hyperandrogenämie bewirken (3). So besteht die Vermutung, dass der bei PCOS-Patientinnen erhöhte LH-Spiegel und verminderte FSH-Spiegel aus einer dauerhaft erhöhten GnRH-Pulsfrequenz resultieren könnte. Passend dazu konnte in einer tierexperimentellen Studie gezeigt werden, dass eine höhere Frequenz von GnRH-Pulsen zu einer gesteigerten Produktion von LH und eine langsamere GnRH-Pulsfrequenz zu einer erhöhten Produktion von FSH führt. Durch eine dauerhafte Erhöhung der GnRH-Pulsfrequenz ohne eine zeitweilige Verlangsamung würde es sowohl zu einer erhöhten LH-Sekretion wie auch zu einer verminderten FSH-Sekretion kommen. Ein Mangel an FSH führt wiederum zu einer eingeschränkten Follikelgenese und Ovulation (15).

Die Hyperandrogenämie könnte aber auch aus einer erhöhten Sensibilisierung der Hypophyse auf GnRH resultieren, was ebenfalls zu einer erhöhten Ausschüttung der Gonadotropine führen würde (27). So konnte bei PCOS-Patientinnen eine überschießende LH-Ausschüttung nach GnRH-Injektion im Vergleich zu gesunden Kontroll-Patientinnen gezeigt werden (27). Zudem führte eine Desensibilisierung der Hypophyse mit einem langwirksamen GnRH-Agonist über die Reduzierung der Gonadotropine zur Abnahme der Testosteronspiegel bei PCOS-Patientinnen (27).

### **1.3.2. PCOS und ovarieller Androgenexzess**

Hinweise auf eine erhöhte ovarielle Androgensekretion lieferten in vitro Untersuchungen mit Thekazellen von PCOS-Patientinnen, in denen erhöhte Werte für DHEA, Testosteron und eine erhöhte Aktivität der P450c17 $\alpha$  Oxygenase gefunden wurden (7,28). Zudem konnte gezeigt werden, dass die ovarielle Stimulation mit einem GnRH-Agonisten zu höheren Androgenspiegeln bei PCOS-Patientinnen führte als bei gesunden Probandinnen, während hingegen eine ovarielle Suppression mit einem langwirksamen GnRH-Agonisten von einem signifikanten Abfall der

Androgene im Serum begleitet wurde, wobei die Androgenspiegel bei PCOS-Patientinnen immer noch höher verblieben als die bei gesunden Kontrollpatientinnen (7).

Es wäre jedoch auch denkbar, dass es durch eine abnehmende Aromataseaktivität, möglicherweise durch die verminderte FSH-Sekretion, zu einer ungenügenden Umwandlung von Androgenen zu Östrogen und damit zu einem Anstieg der Androgene im Serum kommt (13).

### **1.3.3. PCOS und adrenaler Androgenexzess**

Ähnlich wie im Ovar führt auch die adrenale Stimulation mit ACTH zu einer überschießenden adrenalen Androgenausschüttung von DHEA und Androstendion bei PCOS-Patientinnen, was wahrscheinlich auf eine erhöhte adrenokortikale Sensitivität auf ACTH zurückzuführen ist (29). Dementsprechend ist das Polyzystische Ovarialsyndrom mit höheren basalen und ACTH stimulierten DHEAS-Spiegeln verbunden (27). Andererseits konnte bei PCOS-Patienten nach adrener Suppression mit Dexamethason eine signifikante Senkung von DHEA, DHEAS, Androstendion, Gesamttestosteron und freiem Testosteron um 40-60% erreicht werden, wobei auch hier bei PCOS-Patientinnen höhere Androgenspiegel verblieben als bei gesunden Kontrollpatientinnen (30,7). Überdies gibt es Vermutungen, dass eine erhöhte Aktivität der 17,20-Lyase oder der 17-Hydroxylase (P450c17 $\alpha$  Oxygenase) in der Nebennierenrinde zum adrenalen Androgenexzess beitragen könnten (31,32). Insgesamt wird angenommen, dass circa 25-50% der PCOS-Patientinnen von einer adrenalen Hyperandrogenämie betroffen sind (33,31).

### **1.3.4. PCOS und peripherer Androgenbeitrag**

Neben der ovariellen und adrenalen Hyperandrogenämie gibt es auch Hinweise auf eine erhöhte periphere Androgenaktivierung über eine erhöhte Aktivität der 5 $\alpha$ -Reduktase der Haut, der Leber und anderer peripherer Androgenzielgewebe. Dies legen Daten nahe, die einen signifikant stärkeren Anstieg von 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron, dessen Hauptmetaboliten Androstandiol-Glucuronid (ADG) und dem 5 $\alpha$ -reduzierten Urinandrogenermetaboliten Androsteron nach Dexamethason-Suppression und anschließender DHEA-Gabe bei PCOS-Patientinnen im Vergleich zu gesunden Kontrollpatientinnen aufzeigten. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass PCOS-Patientinnen auch eine signifikant höhere basale Exkretion von 5 $\alpha$ -reduzierten Glukokortikoid- und Mineralokortikoidmetaboliten aufweisen als gesunde Frauen (7).

### 1.3.5 Einfluss von Insulin auf die Androgenspiegel

Weitestgehend unklar ist der Zusammenhang zwischen metabolischen Veränderungen und Hyperandrogenämie. Insbesondere Insulinresistenz und Hyperinsulinämie scheinen zu einem gewissen Teil zur Hyperandrogenämie beim Polyzystischen Ovarialsyndrom beizutragen. Möglicherweise stellen sie sogar eine Ursache für diese Erkrankung dar (34, 25,35). So besteht eine positive Korrelation zwischen Insulin- und Androgenspiegeln beim PCOS (3). Zudem konnte gezeigt werden, dass die hepatische SHBG-Synthese durch die Hyperinsulinämie gehemmt wird, woraus ein Anstieg der freien und damit biologisch aktiven Androgene, insbesondere des Testosterons, resultiert (3).

Die Bedeutung von Insulinresistenz und Hyperinsulinämie in Bezug auf das Auftreten der Hyperandrogenämie wird durch eine Vielzahl von Studien unterstrichen, die den Effekt einer insulinsensitivitätssteigernden Therapie beim PCOS untersucht haben. So war unter der Therapie mit Metformin bei Patientinnen mit PCOS eine Verbesserung der Hyperinsulinämie und Insulinresistenz zum einen und eine Verminderung der Hyperandrogenämie (totales und freies Testosteron, Androstendion, DHEAS) und eine Erhöhung der SHBG-Spiegel zum anderen zu beobachten (36). Parallel dazu zeigte sich auch eine Verbesserung der klinischen Symptomatik (Hirsutismus) (3) sowie eine Regulierung des Menstruationszyklus mit Erhöhung von FSH und Reduzierung von LH mit Steigerung der Fertilität und Abnahme der Abortraten. (3,36,15). Dementsprechend ließen sich durch Therapie mit Metformin und einer zusätzlichen Diät alle Parameter des metabolischen Syndroms bei PCOS-Patientinnen senken (37).

In den letzten Jahren ist neben den Biguaniden noch eine weitere Substanzgruppe bei Patientinnen mit PCOS erfolgreich eingesetzt worden, die Glitazone. So führte eine Therapie mit Troglitazon sowohl zu einer Minderung der Insulinresistenz mit Abfall der Glukose- und Insulinspiegel als auch zu einer Absenkung des freien Testosterons mit Erhöhung der SHBG-Konzentration. Zudem verbesserten sich die Ovulationsraten und die Hirsutismussymptomatik (38). Überdies konnte auch mit Diazoxid, einem Insulinsekretionshemmer, bei übergewichtigen Frauen mit PCOS neben einer Senkung der Insulinspiegel ein Abfall von totalen und freien Testosteron erreicht werden (39).



Beim Polyzystischen Ovarialsyndrom ist es noch unklar wie es zur Insulinresistenz und Hyperinsulinämie kommt (35) und ob die Insulinresistenz bzw. Hyperinsulinämie primär kausaler Faktor oder Folge der Veränderungen beim PCOS ist (3).

Ein weiterer interessanter Aspekt ergibt sich in diesem Kontext bei der Frage, ob eher die Hyperinsulinämie per se oder vor allem die Insulinresistenz eine pathophysiologische Bedeutung besitzt. So gab es in letzter Zeit Überlegungen, ob eventuell Unterschiede in der Insulinsensitivität verschiedener Gewebe zum PCOS beitragen könnten. Es wird unter anderem das Bild einer selektiven Insulinresistenz diskutiert, wobei möglicherweise eine erhaltene Insulinsensitivität für steroidhormonproduzierende Gewebe, wie beispielsweise für das Ovar existiert, bei gleichzeitigem Vorliegen einer Insulinresistenz für die klassischen insulinsensitiven Gewebe wie Muskel- und Fettgewebe und der Leber (3). Zudem treten bei Patientinnen mit einem extremen Insulinresistenzsyndrom, zum Beispiel aufgrund eines Insulinrezeptorgendefektes, ebenfalls polyzystische Ovarien und ein starker ovarieller Hyperandrogenismus auf (40). Daher wäre vielleicht auch anzunehmen, dass Insulin am Ovar über andere Signalwege wirkt als über die klassischen Insulinsignalwege (40). Insulin hat seine Wirkung bei den klassischen insulinsensitiven Geweben unter anderem über drei Signalwege: den Phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI-3K) Signalweg (vorrangig für metabolische Effekte), den MAPK Signalweg (vorrangig für mitogenetische Effekte) und den Proteinkinase C (PKC) Signalweg (35). Weiterführende Überlegungen haben so zu der Annahme geführt, dass eine eventuelle selektive Resistenz der Insulinaktion im metabolischen Signalweg mit Einschränkung des Kohlenhydratstoffwechsels und eine erhaltene oder sogar verstärkte Stimulation von Insulin im mitogenetischen Signalweg mit Steigerung der DNS-Synthese und Anregung der Zellvermehrung vorliegt. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es bei Fibroblasten und Granulosazellen von PCOS-Patientinnen zu einer selektiven Einschränkung der Insulinaktion im metabolischen aber nicht im mitogenetischen Signalweg kommt. Dadurch könnte die Insulinresistenz im Kohlenhydratstoffwechsel und die erhöhte Androgenproduktion durch erhaltene oder erhöhte Insulinsensitivität steroidhormonproduzierender Gewebe erklärt werden. (35).

Nicht jede Hyperinsulinämie führt jedoch notwendigerweise zu einer Hyperandrogenämie oder zu einem PCOS. Bei prädisponierten Frauen aber könnten unterschwellige Veränderungen

verstärkt und zur klinischen Manifestation gebracht werden. Das entspricht der klinischen Beobachtung, dass nicht alle Frauen mit einer Insulinresistenz oder Hyperinsulinämie unter einem PCOS leiden und nicht alle Frauen mit einem PCOS insulinresistent oder hyperinsulinämisch sind. Eine Abwesenheit der ovariellen Hypersensitivität auf Insulin im ersten Fall und eine extreme ovarielle Hypersensitivität auf Insulin im zweiten Fall könnte eine Erklärung für dieses Phänomen sein (35). Solch eine ovarielle Hypersensitivität auf Insulin könnte begründen, warum Frauen mit PCOS nach nur geringer medikamentöser Absenkung der Insulinspiegel oder nur geringer Verbesserung der Insulinsensitivität eine deutlichen Abnahme der Testosteronspiegel im Serum zeigten (35). Es lässt sich daher vermuten, dass bei der Entwicklung eines PCOS eine selektive und gewebespezifische Erhöhung der Insulinsensitivität im Ovar beteiligt ist (35). Bei den meisten Frauen mit PCOS ist der Grad der ovariellen Hypersensitivität jedoch so ausgeprägt, dass die gleichzeitige Entwicklung einer Insulinresistenz oder Hyperinsulinämie für die phänotypische Ausprägung des Syndroms notwendig ist (35).

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass Insulin zu einer Erhöhung der ovariellen Androgenproduktion in den Thekazellen führt (35). Passend dazu konnten auch spezifische Insulinbindungsstellen im Ovar gefunden werden (44). Dabei belegen in vitro- als auch in vivo Studien eine synergistische Wirkung von Insulin und LH bezüglich des ovariellen Wachstums, einer gesteigerten Androgensekretion und der Ausbildung polyzystischer Ovarien (45). LH erhöht in den Thekazellen durch den cAMP-Proteinkinase A-Signalweg die Androgenproduktion, Insulin verstärkt diesen Signalweg durch Erhöhung der cAMP Akkumulation (35). Dementsprechend konnte durch Verbesserung der Insulinsensitivität auch die LH induzierte überschießende ovarielle Androgensekretion reduziert werden (35). Es existieren zudem Daten die belegen, dass Insulin allein und stärker als durch LH die Androstendion-, Testosteron- und Dihydrotestosteronsekretion in kultivierten Ovarzellen von Frauen mit Hyperandrogenismus stimulieren konnte. Im Vergleich dazu zeigten die Ovarzellen von gesunden Kontrollpatientinnen nur nach gemeinsamer Stimulation von Insulin und LH eine Sekretion von Androstendion, die zudem auch deutlich geringer ausfiel (46). Diese Ergebnisse weisen auf eine eigenständige Rolle von Insulin bei der ovariellen Androgenproduktion hin. Es existieren jedoch auch Daten, die eine eher permissive Rolle des Insulins bei der Entwicklung einer ovariellen Hyperandrogenämie nahe legen. So konnten Cara und Mitarbeiter zeigen, dass Insulin nur die LH-stimulierte Synthese von

Androstendion in ovariellen Thekazellen von Ratten potenzieren konnte, nicht jedoch zu einer eigenständigen Stimulation der Androsteronsynthese führte (47).

Zudem scheint Insulin über eine Stimulation der ovariellen cytochromabhängigen P450c17 $\alpha$  Oxygenase zu einer erhöhten ovariellen Androgenproduktion beitragen zu können. Dabei spielt anscheinend die 17 $\alpha$ -Hydroxylase eine größere Rolle als die 17,20-Lyase. Die 17 $\alpha$ -Hydroxylase gilt als ein Schlüsselenzym in der Androgenbiosynthese (48,6).

Eine Erhöhung der adrenalen Androgenproduktion durch Insulin ist ebenfalls hinlänglich belegt. So fand sich nach Dexamethasonsuppression eine Erhöhung der ACTH-induzierten Erhöhung von Androstendion und 17-Hydroxyprogesteron bei PCOS-Patientinnen mit Hyperinsulinämie im Vergleich zu normoinsulinämischen PCOS-Patientinnen. Dieses Ergebnis legte die Vermutung einer erhöhten Sensitivität der adrenalen androgenproduzierenden Zellen auf ACTH bei Hyperinsulinämie nahe (49). Die Tatsache, dass unter der Therapie mit Metformin neben einer Verbesserung der Insulinsensitivität und Hyperinsulinämie auch eine Reduzierung der ACTH stimulierten adrenalen Androgenproduktion von Androstendion, 17-Hydroxyprogesteron und 17-Hydroxypregnenelon bei übergewichtigen PCOS-Patientinnen erreicht werden konnte, führte zudem zu der Annahme, dass Insulin möglicherweise durch die Erhöhung der Aktivität der adrenalen P450c17 $\alpha$ -Oxygenase zum adrenalen Androgenexzess beitragen könnte (50). Gleichmaßen führte eine Behandlung mit Troglitazon sowohl zu einer Senkung der basalen Insulinspiegel als auch zu einer Senkung der DHEAS-Spiegel bei PCOS-Patientinnen (51). In Analogie dazu geht eine Verschlechterung der Insulinresistenz mit einer Erhöhung der DHEAS-Spiegel bei PCOS-Patientinnen einher (52). In vergleichbarer Weise zeigte auch die Therapie mit Pioglitazon neben der Senkung der Insulinspiegel und Verbesserung der Insulinsensitivität eine signifikante Senkung der adrenalen Sekretion von Androstendion nach ACTH-Stimulation (53). Weitere Hinweise auf eine verstärkte adrenale Androgenproduktion in Verbindung mit Insulinresistenz fanden sich bei PCOS-Patientinnen mit Typ 2 Diabetes, die im Vergleich zu PCOS-Patientinnen ohne Diabetes mellitus eine höhere basale und ACTH stimulierte adrenale Sekretion von Cortisol, DHEA und DHEAS aufwiesen (54).

Auch wenn die Assoziation zwischen Hyperinsulinämie und Hyperandrogenämie beim PCOS vielfach gezeigt wurde, konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden, zu welchem Anteil Insulin

zur Hyperandrogenämie beim PCOS beiträgt und zu welchem Anteil es für die Ursache des Syndroms verantwortlich ist. Demzufolge müssen auch andere Ursachen für eine Androgenerhöhung beim PCOS in Erwägung gezogen werden.

## 1.4. Freie Fettsäuren und Androgene

Neben Insulin werden auch andere metabolische Parameter, wie erhöhte freie Fettsäuren, als ein möglicher pathogenetischer Faktor bei der Entstehung der Hyperandrogenämie beim PCOS diskutiert. In der Tat sind auch die freien Fettsäuren bei PCOS-Patientinnen häufig erhöht (55).

So konnte mit Metformin und Rosiglitazon auch bei schlanken und nicht hyperinsulinämischen PCOS-Patientinnen eine Normalisation der Testosteronspiegel und der Ovulation erreicht werden (35), obwohl nur Metformin hier signifikant die Insulinspiegel senken konnte. Daraus lässt sich schließen, dass es noch andere Mechanismen zu geben scheint, die unabhängig vom Insulin die Androgenspiegel modulieren können. Entsprechend der Hypothese, dass freie Fettsäuren an der Regulation der Androgene beteiligt sind, konnte gezeigt werden, dass Rosiglitazon auch zu einer signifikanten Senkung der freien Fettsäuren führt (56).

Bisher wurde der Zusammenhang zwischen freien Fettsäuren und Androgenen nur in Ernährungsstudien untersucht. Diese unterstreichen jedoch den Zusammenhang. So fand sich fast einheitlich ein Anstieg der Androgene im Serum und im Urin bei Erhöhung der freien Fettsäuren durch eine fettreiche Ernährung. Wang und Mitarbeiter konnten bei 39 gesunden älteren Männern zeigen, dass es unter einer fettarmen ballaststoffreichen Diät neben dem Abfall der freien Fettsäuren auch zu einer signifikanten Senkung von totalem Testosteron, freiem Testosteron, Dihydrotestosteron, Androstendion, DHEAS, Östradiol und SHBG gekommen ist (57). In Analogie dazu untersuchten Dorgan und Mitarbeiter den Effekt einer 10-wöchigen fettreichen ballaststoffarmen Ernährung versus einer fettarmen, ballaststoffreichen Ernährung auf die Androgenspiegel von 43 gesunden Männern. Dabei führte die fettreiche Ernährung zu 13% höheren Gesamttestosteronspiegeln im Plasma und zu einer 13% höheren Ausscheidung von Testosteron im 24-Sammelurin im Vergleich zur fettarmen Ernährung (58). Weiterhin konnte in einer Ernährungsanalyse bei älteren Männern (40-60Jahre) gezeigt werden, dass schwarze

Südafrikaner mit ihrer herkömmlichen vegetarischen Ernährungsweise eine geringere Östrogen- und Androgenausscheidung haben als schwarze und weiße Nordamerikaner mit einer fett- und fleischreichen westlichen Ernährungsweise. Ebenso zeigte der Wechsel schwarzer Südafrikaner zu einer westlichen Ernährung eine signifikante Erhöhung der Androgenausscheidung und die Umstellung schwarzer Nordamerikaner auf eine vegetarische Ernährung eine Abnahme der Androgenausscheidung (59).

Zusammenfassend legen diese Daten eine Rolle der freien Fettsäuren bei der Entstehung der Hyperandrogenämie nahe. Zwar induzieren erhöhte freie Fettsäuren sowohl eine Insulinresistenz als auch eine Hyperinsulinämie und können so indirekt zur Hyperandrogenämie beitragen und schon damit eine mögliche Ursache für das PCOS darstellen. Jedoch wäre auch ein direkter Effekt der freien Fettsäuren auf die Erhöhung der Androgene über einen bisher unbekanntem Mechanismus denkbar.

Kürzlich konnte in einer Untersuchung mit acht gesunden jungen schlanken Männern gezeigt werden, dass der Anstieg freier Fettsäuren von einem signifikanten Anstieg von DHEA, DHEAS, Androstendion und Östron begleitet war. Diese Veränderungen konnten innerhalb von zwei Stunden nach Infusionsstart beobachtet werden, während sich in dieser Zeit keine Anzeichen für eine Beeinträchtigung der Insulinsensitivität ergaben, die typischerweise erst nach ca. 3-4 h eintritt (60). Da die Erhöhung der Androgenspiegel unter Lipid/Heparin-Infusion jedoch schon früher auftrat, legt dies einen unabhängigen Effekt der freien Fettsäuren auf die Androgenspiegel nahe. Da LH, FSH und ACTH keine signifikanten Unterschiede zwischen Lipid/Heparin- und NaCl/Heparin-Infusion aufwiesen, erschien eine Modulation der Hormonspiegel durch eine Beeinflussung freier Fettsäuren auf Ebene der Hypophyse eher unwahrscheinlich (61). Woraus nun der Anstieg der Androgenspiegel in der Studie resultierte, konnte im Rahmen dieser Studie nicht beantwortet werden. Zudem blieb offen, in wieweit die gefundenen Veränderungen auch für Frauen gelten und insofern tatsächlich potentiell relevant für die Pathogenese des PCOS sind.

## **1.5. Ziel der Studie**

Aufgrund der Datenlage war das Ziel dieser Studie herauszufinden, ob zirkulierende Androgene und Androgenvorstufen bei Frauen durch freie Fettsäuren moduliert werden. Weiteres Ziel der Studie war es, den Pathomechanismus des potentiell durch freie Fettsäuren induzierten Androgenanstiegs näher abzuklären.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Probandinnen

In einer prospektiven, randomisierten Studie wurden 12 junge gesunde Probandinnen untersucht. Die klinischen und anthropometrischen Daten sind in Tabelle 1 dargestellt. Bei den Probandinnen bestand ein regelmäßiger Zyklus und es zeigten sich keine klinischen und laborchemischen Zeichen für einen Hyperandrogenismus. Der Ausschluss einer systemischen Erkrankung oder einer Einschränkung der Leber- oder Nierenfunktion erfolgte mittels Anamnese, körperlicher Untersuchung und Bestimmung von Standardlaborwerten (Natrium, Kalium, Kreatinin, Harnstoff, Cholesterin, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin, Triglyceride, CRP, Protein). Hepatische oder renale Erkrankungen, Stoffwechselstörungen, Dyslipidämien, ein polyzystisches Ovarsyndrom, eine eingeschränkte Glukose-Toleranz oder ein Diabetes mellitus sowie Erkrankungen des Herzkreislaufsystems galten als Ausschlusskriterien. Zudem führten dekompensierte endokrinologische Erkrankungen wie zum Beispiel eine Hyperthyreose oder Hypothyreose zum Studienausschluss. Keine der Probandinnen änderte während der Studiendauer ihre Ernährungsgewohnheiten oder veränderte ihre körperliche Aktivität. Zudem nahm keine der Probandinnen im Zeitraum von mindestens drei Monaten vor Studienbeginn und während der Studiendauer Medikamente ein, die bekanntermaßen die Steroidhormonspiegel im Serum beeinflussen können. Dies galt insbesondere für orale Kontrazeptiva. Jede Probandin wurde vor Studienbeginn über das Studienziel und mögliche Komplikationen und Nebenwirkungen aufgeklärt und unterzeichnete eine schriftliche Einverständniserklärung. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Charité, Universitätsmedizin Berlin, genehmigt. Die Studie wurde vorab bei [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) registriert.

**Tabelle 1:** Klinische und anthropometrische Daten der Probandinnen

	Mittelwert	Standardfehler
Alter (Jahre)	25,5	± 1,0
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21,9	± 0,8
Größe (cm)	168,6	± 2,0
Gewicht (kg)	62,8	± 2,5
WHR	0,8	± 0,0
Taille(cm)	74,3	±1,4
Hüfte(cm)	98,1	±1,8
Körperoberfläche (m <sup>2</sup> )	1,7	± 0,0
Zyklusdauer (Tage)	28,7	± 1,3
mittlerer Regeltag	5,4	± 0,2
Hirsutismusscore	2,6	± 0,7
systol.Blutdruck (mmHg)	109,9	± 2,8
diastol.Blutdruck(mmHg)	67,3	± 1,3
Puls	63,5	± 2,5

## 2.2. Untersuchungsmethoden

Bei dieser Untersuchung handelte es sich um eine prospektive, randomisierte, klinisch-experimentelle Studie im Cross-over-Design. Da das Ziel der Untersuchung die Erfassung der adrenalen und gonadalen Hormone war, welche im Verlauf des Menstruationszyklus starken Schwankungen unterliegen, wurden alle Probandinnen jeweils in der frühen Follikelphase (4-6 Regeltag) untersucht. Die Untersuchungen wurden jeweils an zwei separaten Tagen durchgeführt, wobei zwischen diesen beiden Untersuchungstagen mindestens ein Menstruationszyklus lag, um mögliche Interaktionen zu vermeiden. An beiden Untersuchungstagen erfolgte nach zehnstündigem nächtlichen Fasten morgens um 8.00 Uhr die beidseitige Punktion einer Unterarmvene und die beidseitige Anlage einer intravenösen Dauerverweilkanüle. Über eine dieser Dauerverweilkanülen erfolgte nach Randomisierung entweder die Infusion einer 20% Lipid/Heparin-Lösung (LHI) (Lipovenös® 20% [Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland]/ 0,4 Units Heparin/kg/min) oder einer 0,9% Natrium-Chlorid/Heparin-Lösung (NHI) (NaCl 0,9%/ 0,4 Units Heparin/kg/min). Die jeweilige Infusionslösung wurde mit einer konstanten Geschwindigkeit von 1,5 ml/min über fünf Stunden infundiert. Der Beginn der Infusion lag zwischen 8.00 und 9.00 Uhr, wobei bei derselben Probandin die Infusion an beiden Tagen zur



gleichen Zeit gestartet wurde. Die Blutabnahmen (EDTA-Plasma und Serum) erfolgten über die Dauerverweilkanüle am kontralateralen Arm zu den Zeitpunkten 0, 60, 120 und 240 Minuten. Während der Infusion sollten die Probandinnen ruhig liegen und weiterhin nüchtern bleiben. Es kam bei keiner der Probandinnen zu einer unerwünschten Nebenwirkung während der Studie.

Die EDTA-Blutproben wurden unverzüglich, die Serumproben erst nach einer Koagulation über eine halbe Stunde bei Raumtemperatur, für 10 Minuten bei 4°C und 3000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurden die Plasmen und Seren aliquotiert und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

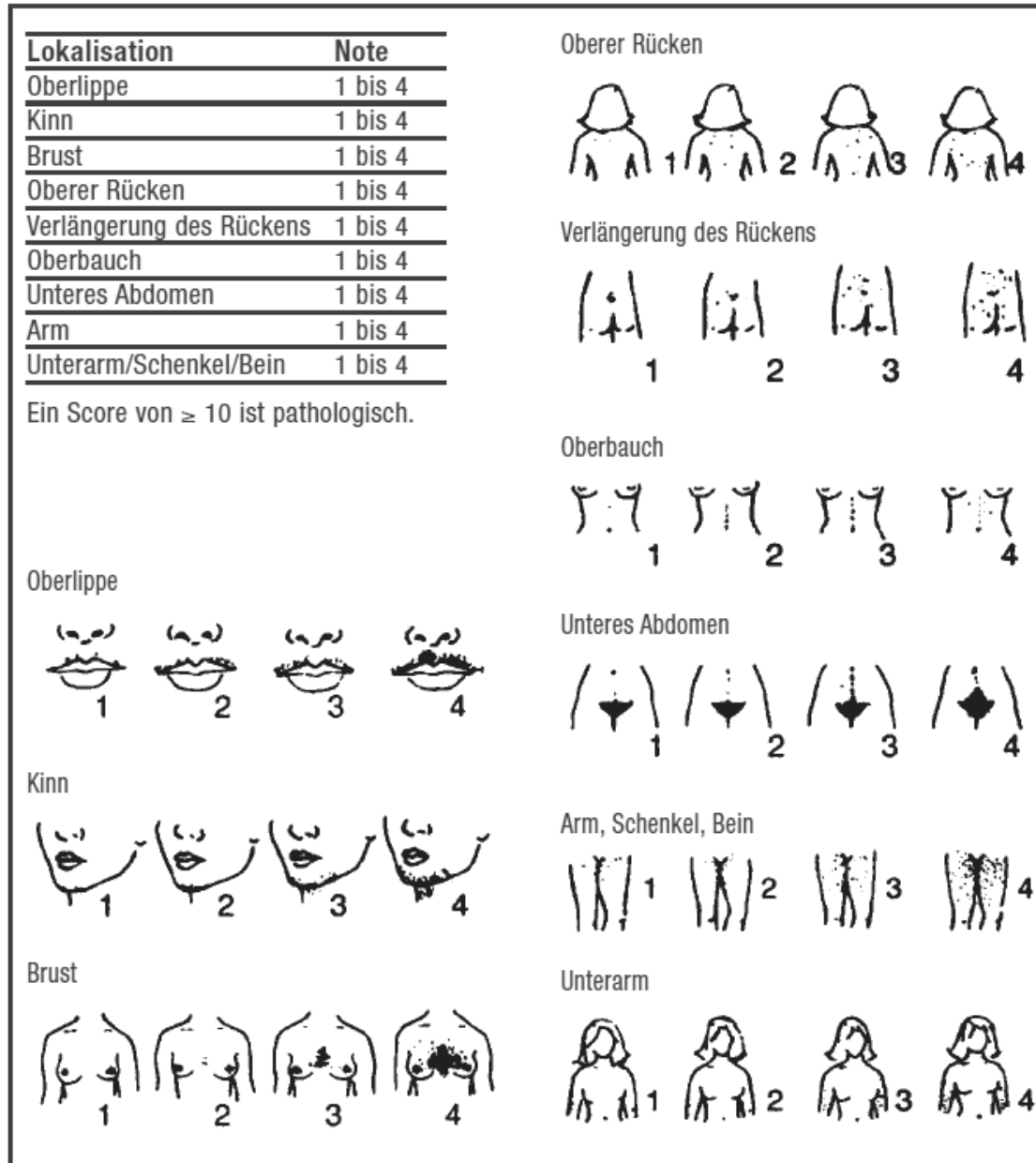
In den Serumproben erfolgte die Bestimmung von: follikelstimulierendem Hormon (FSH), luteinisierendem Hormon (LH), Östron, Östradiol, Progesteron, 17-Hydroxyprogesteron (17-OHP), Dehydroepiandrosteron (DHEA), Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS), Androstendion, Testosteron, Dihydrotestosteron (DHT), Insulin, Glukose, freien Fettsäuren (FFA), Triglyceride, Glycerol und Sexualhormonbindendem Globulin (SHBG). Das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) wurde im Plasma bestimmt. Die Untersuchung von Gesamtcholesterin, HDL (high density lipoprotein)-Cholesterin, LDL (low density lipoprotein)-Cholesterin, Triglyceride, Protein, C-reaktives Protein (CRP), Harnstoff und Kreatinin erfolgte in den Serumproben vor Infusionsbeginn.

Weiterhin wurde an beiden Untersuchungstagen zur Einschätzung der Tagessekretion der adrenalen und gonadalen Androgene 24-Stunden-Sammelurin beginnend von 8.00 Uhr am Untersuchungstag gesammelt. In diesen Urinproben wurde die Exkretion der nachfolgenden Steroide bzw. Steroidmetaboliten gemessen: DHEA, DHEAS, 4-Androsten-3,17-dion (Androstendion), Androsteron (An), Etiocholanolon (Et), 5-Androsten-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (Androstendiol), 16 $\alpha$ -Hydroxy-DHEA und 5-Androsten-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol (Androstentriol).

Bei den Probandinnen wurden im Rahmen der anthropometrischen Analyse der Body-Mass-Index (BMI, Körpergewicht (kg)/ Körperlänge (m)<sup>2</sup>) bestimmt, die Waist-to-Hip Ratio (WHR, Taillenumfang/ Hüftumfang) zur Bestimmung der Körperfettverteilung gemessen und die Körperoberfläche (KOF) nach der Formel von Dubois berechnet (62). Der Hirsutismusgrad

wurde mittels des Hirsutismus-Scores nach Ferriman und Gallway eingeschätzt (63) (Abbildung 2).

**Abbildung 2: Hirsutismus-Score\***



\*Klinische Kriterien (Scores) zur Beschreibung und zur quantitativen Erfassung des Behaarungsmusters nach Ferriman und Gallway. (63)

## 2.3. Labormethoden

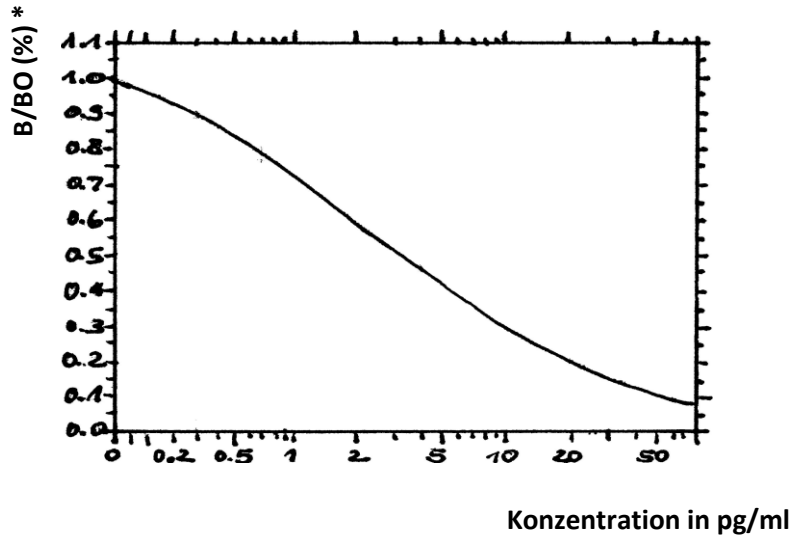
Die Messungen von **Östron**, **Progesteron** und **17-OH-Progesteron** erfolgten mit einem Radioimmunoassays (RIA) und spezifischen Assays [Diagnostic Systems Laboratories, Inc.,

Sinsheim, Deutschland (Intra-assay CV: 4.4 - 9.4%, 4.4 - 8.0%, 8.1 - 9.5%; Inter-assay CV: 9.1%, 11.7%, 8.9%]).

Beim **Radioimmunoassay (RIA)** handelt es sich um einen kompetitiven Assay, bei dem die natürlichen Antigene aus der Probe mit den künstlichen radioaktiv (<sup>125</sup>Iod)-markiertem Antigenen um die Antikörperbindungsstellen konkurrieren. Die Antikörper sind spezifisch gegen das gesuchte Antigen gerichtet, sie können aber nicht zwischen natürlichen und künstlichen Antigenen unterscheiden. Die Antikörper liegen hier im Unterschuss vor. Die natürlichen und markierten Antigene werden in einem ihrer jeweiligen Menge entsprechendem Verhältnis an den Antikörper gebunden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden jeweils die Standardlösungen, Kontrollen mit bekannter Antigenkonzentration und die Proben mit unbekannter Antigenkonzentration in einer festgelegten Menge (50 µl für Östron; 50 µl für Progesteron und 50 µl für 17-OH-Progesteron) in die Reaktionsgefäße gegeben. Danach wurde das <sup>125</sup>I-markierte Antigen hinzugefügt (100µl; 500 µl; 500 µl). Die Antikörper waren beim Progesteron- und 17-OH-Progesteron-Assay fest am Boden der Polystyren-Röhrchen verankert (Coated Tubes), beim Östron-Assay wurden die Antikörper erst nach den radioaktiv markierten Antigenen dazugegeben. Nach einer Inkubation von einer Stunde erfolgte die Trennung von gebundenem und ungebundenem Material durch Dekantieren. Beim Östron-Assay erfolgte zuvor noch die Zugabe eines zweiten Antikörpers zur Immunpräzipitation. Dieser zweite Antikörper bindet an den ersten Antikörper mit den schon gebundenen Antigenen und es entstehen so größere Doppelantikörperkomplexe. Von den entstandenen unlöslichen Immunkomplexen können dann die ungebundenen Antigene in der flüssigen Phase durch Zentrifugation leichter getrennt werden. Nachfolgend wurde die Radioaktivität in den einzelnen Reaktionsgefäßen mit einem Gamma-Counter für 60 Sekunden gemessen.

Die Konzentrationen der Testsubstanzen wurden schließlich anhand einer parallel erstellten Standardkurve mit bekannten Antigenkonzentrationen ermittelt (siehe Abbildung 3). Je mehr von den unmarkierten Antigenen in der Probe waren, desto weniger radioaktiv markierte Antigene konnten gebunden werden und umso geringer fiel die Radioaktivität aus. Die gebundene Radioaktivität war demnach umgekehrt proportional zu der Antigenkonzentration in der Probe (64).

**Abbildung 3: RIA Standardkurve**

\*B/BO ist der gebundene Anteil im Verhältnis zum Nullstandard.

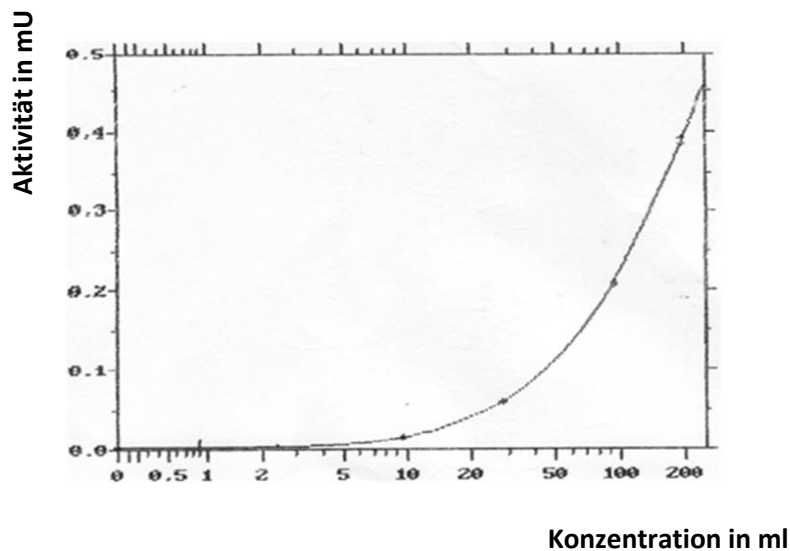
Die Messung von **LH** und **FSH** erfolgte mit Hilfe eines Immunoradiometrischen Assays (IRMA). Die verwendeten Assays stammten von den Immuno-Biological Laboratories, Inc., Hamburg, Deutschland. (Intra-assay CV: 1,6 - 3,1% und 3,5 - 6,5%; Inter-assay CV: 4,7% und 6,7%).

Der **Immunoradiometrische Assay (IRMA)** ist hingegen ein nicht kompetitives Verfahren, bestehend aus einem 3-Reaktanden-System. In den Reaktionsgefäßen sind die Antikörper fest an der Wand fixiert und werden mit den Antigenen aus der Probe inkubiert. Die Antikörper liegen im Überschuss vor und sind spezifisch gegen eine bestimmte Stelle am Antigen gerichtet. Es werden alle Antigene gebunden. Danach wird ein zweiter radioaktiv  $^{125}\text{I}$ -markierter Antikörper (Tracer) zugefügt, der das Antigen an einer anderen Stelle erkennt. Es kommt zur Bildung von einem Sandwich (fixierter Antikörper/ Antigen/ markierter Antikörper). Das radioaktive Signal des Zweit-Antikörpers kann quantifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Kalibratoren, Kontrollen und Proben in einer festgelegten Menge (100  $\mu\text{l}$  für LH; 100  $\mu\text{l}$  für FSH) in die Reaktionsgefäße gegeben. Danach wurde eine Standardmenge des Tracers hinzugefügt (50  $\mu\text{l}$ ; 50  $\mu\text{l}$ ). Nach einer einstündigen Inkubation

erfolgte die Abtrennung von ungebundenen markierten Antikörpern durch zweimaliges Absaugen und Waschen. Die Radioaktivität wurde dann in den einzelnen Reaktionsgefäßen durch einen Gamma-Counter (60 Sekunden) gemessen. Sie war proportional zur Zahl der gebundenen Antigenmoleküle. Die Konzentration der Testsubstanz ergab sich aus der parallel ermittelten Standardkurve (siehe Abbildung 4) (64).

**Abbildung 4: IRMA Standardkurve**



**ACTH, Östradiol, Testosteron und SHBG** wurden vollautomatisch mit dem Chemilumineszenz-Immunoassay-System IMMULIT von DPC Biermann (Bad Nauheim, Deutschland) in unserem Labor ermittelt. (Intra-assay CV: 6.7 - 9.5%, 4.3 - 9.9%, 5.1 - 16.3%, 2.3 - 5.3%; Inter-assay CV: 8.5%, 9.7%, 12.0%, 5.0%).

Die nicht veresterten **freien Fettsäuren** wurden mit einem gängigen kalorimetrischen Assay (NEFA C, Wako, Neuss, Deutschland) mit Cobas Mira (Roche, Basel, Schweiz) im Serum gemessen (Intra-assay CV: < 5%; Inter-assay CV: 4.7%). Die Bestimmung von **Glycerol** erfolgte mittels eines freien Glycerolkits (Biovision, California, USA). **Glukose** wurde durch die Glucose-Hexokinase-Methode mit dem Pentra- 400-System (ABX Horiba Diagnostics) bestimmt

(Intra-assay CV: 1.7%; Inter-assay CV: 0.5 - 1.2%). **Kreatinin, Harnstoff, Cholesterin, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin, Triglyceride, Protein, CRP, Serumnatrium** und **Serumkalium** wurden im Deutschen Institut für Ernährungsmedizin mit Hilfe von Standardlabormethoden ermittelt.

Die Bestimmung von **DHEA, DHEAS, Androstendion, DHT und Insulin** erfolgte in Zusammenarbeit mit dem endokrinologischen Labor des Endokrinologikums in Hamburg. Diese Hormone wurden ebenfalls mit einem RIA unter Verwendung spezifische Assays gemessen [Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Sinsheim, Deutschland. (Intra-assay CV: 2.7 - 3.8%, 3.3 - 5.5%, 2.7 - 5.9%, 3.7 - 7.7%, 4.9 - 9.8%; Inter-assay CV: 6.5%, 5.1%, 6.0%, 9.5%, 9.8% )].

## 2.4. Fettsäurelösung

Die 20% Lipovenös®-Lösung enthielt in 1000 ml: 200g Sojabohnenöl, 25g Glycerol, 12g Phospholipide und 0.3g Ölsäureester. Da bekannt ist, dass Fettsäuren und Triglyceride die Messung von Hormonen beeinflussen können, wurde in vitro nach Addition verschieden konzentrierter Lipidlösung zum basalen Serum erneut DHEAS, Testosteron und Östradiol bestimmt, um so eventuell verfälschte Ergebnisse möglichst ausschließen zu können.

## 2.5. Urinandrogene

Folgende Steroidmetabolite wurden im Urin bestimmt: DHEA, DHEAS, Androstendion, Androsteron (An), Etiocholanolon (Et), Androstendiol, 16 $\alpha$ -hydroxy-DHEA und Androstentriol. Die Messung von DHEA, DHEAS und Androstendion im Urin erfolgte in Kooperation mit dem Steroidlabor des Pharmakologischen Instituts der Ruprechts-Karl-Universität in Heidelberg (Frau Dr. Ch. Maser-Gluth). Androstendion und DHEAS wurden mit einem spezifischen hauseigenen Radioimmunoassay bestimmt, der im Steroidlabor der Universität Heidelberg hergestellt wurde. Die titrierten Steroide (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) und Antikörper wurden in dem Labor selbst entwickelt und charakterisiert. Androstendion wurde vor der Messung mittels RIA aus den Urinproben extrahiert. DHEAS wurde direkt in den verdünnten Urinproben gemessen (Inter-assay CV: <15 %; Intra-assay CV: < 10 %) (65).

Die Analyse der anderen Urinsteroidprofile wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Professor Wudy aus dem Steroid-Forschungslabor der Abteilung für Allgemeinpädiatrie und Neonatologie der Justus Liebig Universität in Gießen mittels gekoppelter Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) durchgeführt (66,65). Freie und konjugierte Urinsteroide konnten durch die feste Phase-Extraktion gewonnen werden (Sep-Pak C18 cartridge, Waters Associates, Milford, MA) und konjugierte Steroide wurden zudem enzymatisch hydrolysiert (Sigma type I powdered Helix pomatia, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Die hydrolysierten Steroide wurden zurückgewonnen mit der Sep-Pak Extraktion, bevor sie anschließend durch das GC-MS Verfahren mit einer spezifischen Ionen-Monitoring-Methode quantifiziert wurden (66).

## 2.6. Statistik und Kalkulation

Die totale Androgensekretion (C19) wurde hier definiert als die Summe von Androsteron (An), Etiocholanolon (Et), Androstendiol, DHEA, 16 $\alpha$ -hydroxy-DHEA und Androstentriol. Die Summe der folgenden drei Steroide, DHEA, die 16-hydroxylierten Metabolite 16 $\alpha$ -hydroxy-DHEA und Androstentriol (DHEA+Metabolite), sind ein guter Marker für die adrenalen Androgenspiegel, da sie die Hauptmetaboliten von DHEA und DHEAS darstellen. Androstendiol (5-Androsten-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol) ist ein weiterer direkter Metabolit von DHEA und kann Auskunft über die Urinexkretion von DHEA geben. Somit kann die Summe von DHEA+Metabolite und Androstendiol (5-androstene-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol) als Marker für die totale adrenale Androgensekretion (adrenale Urinandrogene) gesehen werden.

Die Summe aus An und Et repräsentiert hingegen sowohl die gonadale als auch die adrenale Androgenexkretion (65). Die Aktivität 5 $\alpha$ -Reduktase im Urin wurde durch das Verhältnis der Urinsteroidmetabolite An/Et bestimmt .

Freies Testosteron wurde mit Hilfe eines Kalkulators der Universität Gent (Belgien) berechnet, der neben Gesamttestosteron und SHBG auch Albumin berücksichtigt (<http://www.issam.ch/freetesto.html>). Die Aktivitäten der 17-a-Hydroxylase und der 17-20-Lyase wurden mittels der Quotienten aus 17-OHP und Progesteron bzw. aus Androstendion und 17-OHP eingeschätzt. Die DHEA-Sulfotransferase-Aktivität wurde aus dem Quotienten DHEAS/DHEA ermittelt (65).



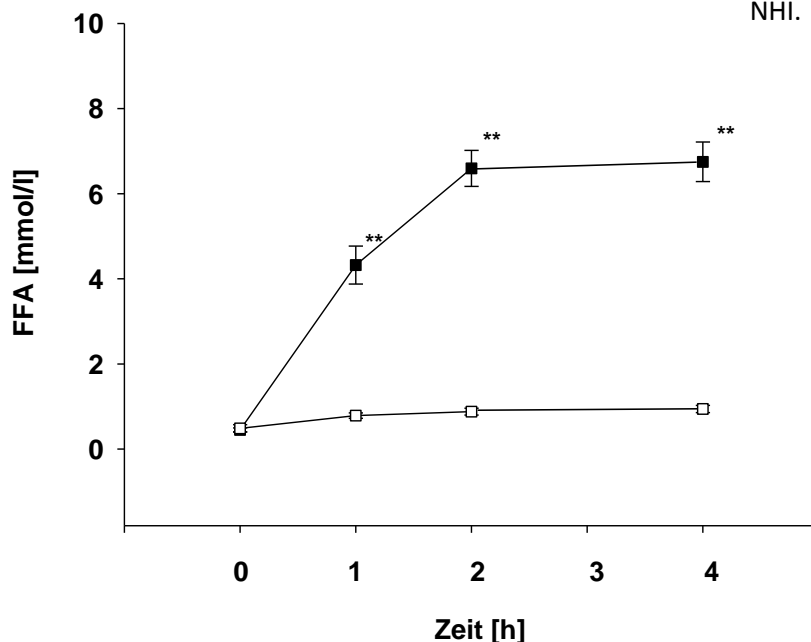
Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe von SPSS-Software Version 12 (Chicago, USA) durchgeführt. Die Variablen sind mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft worden. Für nicht normal verteilte Variablen wurde der Wilcoxon-Test, für alle normal verteilten Variablen der T-Test verwendet. Der Vergleich zwischen den einzelnen Behandlungen (LHI/NHI) wurde zu den jeweiligen Messpunkten mittels allgemeinem linearen Modell mit Messwertwiederholungen (Zweifaktorielle Varianzanalyse) durchgeführt, wobei die einzelnen Messwerte über die Zeit und die beiden Behandlungen als Innersubjektfaktoren definiert wurden. Zudem sind beide Behandlungsregime mit Hilfe der Fläche unterhalb der Kurve (AUC [area under the concentration-time-curve]) verglichen worden. Die AUC ist mit den Variablen Konzentration und Zeit mittels Integralrechnung berechnet worden. Als signifikant wurden Ergebnisse gewertet, bei denen der  $\alpha$ -Fehler kleiner als 0,05 war. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben. Die graphische Darstellung erfolgte mittels SPSS Science SigmaPlot 2001.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Stoffwechselfparameter

#### Freie Fettsäuren (FFA)

Unter der NHI kam es zu einem signifikanten Anstieg der freien Fettsäuren nach 1, 2 und 4 Stunden im Vergleich zum Basalwert ( $p < 0.005$ ). Auch unter der LHI zeigte sich nach 1, 2 und 4 Stunden ein signifikanter Anstieg ( $p < 0.005$  vs. Baseline). Dabei war dieser Anstieg jedoch deutlich stärker ausgeprägt als unter NHI, so dass die freien Fettsäuren zu den Zeitpunkten 1, 2 und 4 Stunden ( $p < 0.005$  im Paarvergleich) signifikant höher unter LHI als unter NHI waren ( $p < 0.005$ ; zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwertwiederholung). Dementsprechend war auch die AUC ( $p < 0.005$ ) signifikant höher im Vergleich zur NHI (siehe Tabelle 2 und Grafik 1).

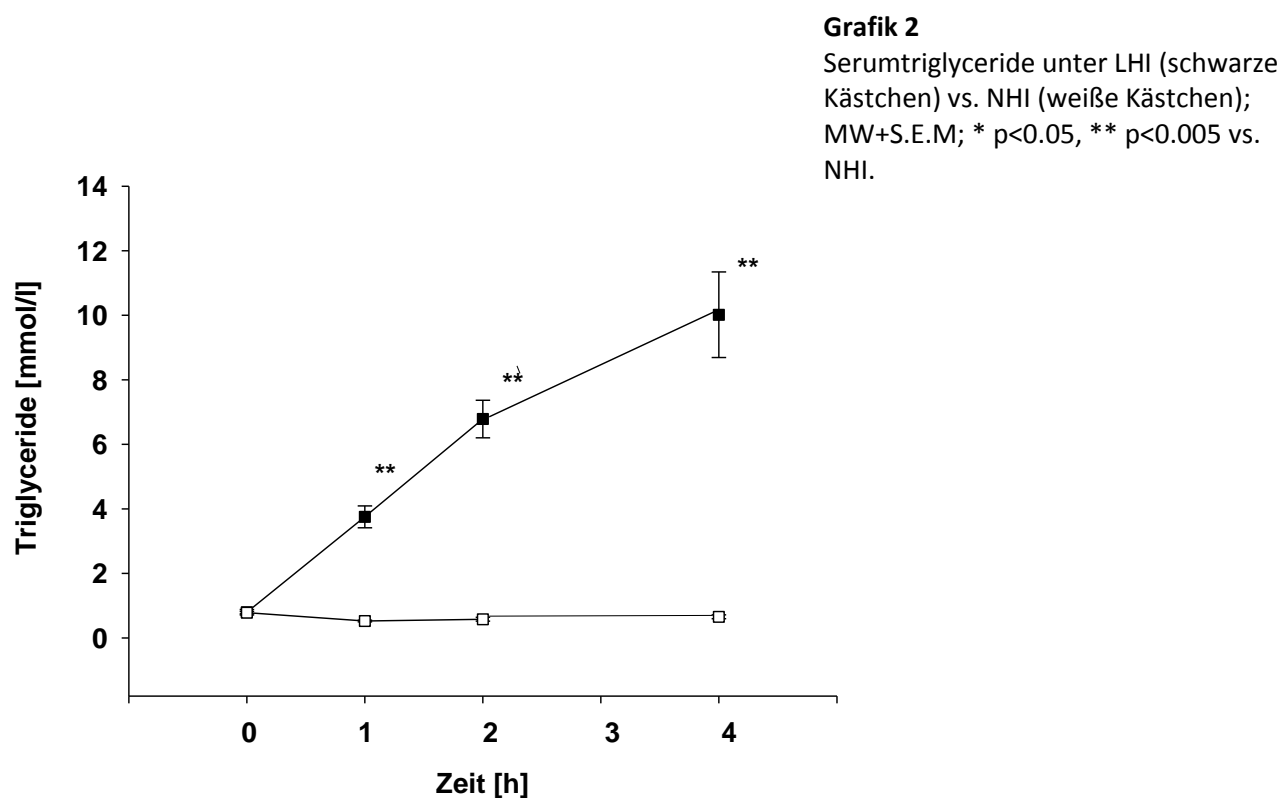


**Grafik 1**

Serum-FFA's unter LHI (schwarze Kästchen) vs. NHI (weiße Kästchen); MW+S.E.M; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$  vs. NHI.

## Triglyceride

Im Verlauf der NHI war ein signifikanter Abfall der Triglyceride nach der ersten ( $p < 0.005$ ) und zweiten Stunde ( $p < 0.05$ ) im Vergleich zu basal zu verzeichnen. Währenddessen war es unter der LHI zu einem progredienter Anstieg nach 1, 2 und 4 Stunden gekommen ( $p < 0.005$  vs. Baseline). Dies führte zu signifikant höheren Triglyceridspiegeln unter der LHI zu den Zeitpunkten 1, 2 und 4 Stunden ( $p < 0.005$  im Paarvergleich) im Vergleich zur NHI ( $p < 0.005$ ; zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwertwiederholung). Dies bestätigte sich auch im Vergleich der AUC ( $p < 0.05$ ) (siehe Tabelle 2 und Grafik 2).



## Glycerol

Bei Glycerol war es unter der NHI zu einem leichten Anstieg nach ein ( $p < 0.05$ ) und zwei Stunden ( $p < 0.005$ ) im Vergleich zu basal gekommen, ebenso war unter der LHI ein Anstieg nach 1 und 2 Stunden ( $p < 0.005$  vs. Baseline) zu verzeichnen. Der Anstieg unter der LHI war jedoch deutlich stärker, weshalb sich nach 1 und 2 Stunden ( $p < 0.005$  im Paarvergleich) signifikant höhere Werte für die LHI im Vergleich zur NHI ergaben ( $p < 0.005$ ; zweifaktorielle

Varianzanalyse mit Messwertwiederholung). So war auch die AUC signifikant höher unter der LHI ( $p < 0.005$ ) (siehe Tabelle 2).

### Glukose

Sowohl im Verlauf der NHI als auch unter der LHI zeigten sich keine nennenswerten Veränderungen in den Glukosespiegeln. Somit waren bei vergleichbaren Basalwerten auch die Glukosewerte zu den Zeitpunkten 1, 2 und 4 Stunden nicht unterschiedlich zwischen LHI und NHI ( $p = \text{n.s.}$ ) Dementsprechend zeigte auch die AUC keinen signifikanten Unterschied (siehe Tabelle 2).

### Insulin

Unter der NHI war ein progredienter Abfall der Insulinspiegel zu den Zeitpunkten 1, 2 ( $p < 0.05$ ) und 4 Stunden ( $p < 0.005$ ) im Vergleich zum Basalwert zu beobachten, während unter der LHI im Verlauf keine signifikanten Änderungen der Insulinspiegel detektierbar waren. Insgesamt führte dies zu signifikant unterschiedlichen Insulinspiegeln zwischen LHI und NHI zu den Zeitpunkten 2 und 4 Stunden ( $p < 0.05$ ) mit höheren Insulinspiegeln unter der LHI ( $p < 0.05$ ; zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwertwiederholung). Dementsprechend war auch die AUC von Insulin signifikant erhöht unter LHI ( $p < 0.05$ ) (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Stoffwechselfparameter im Serum

FFA [mmol/l]	0h	1h	2h	4h	AUC
Verlauf LHI	0,5±0,1	4,3±0,5##	6,6±0,4##	6,8±0,5##	21,2±1,3
Verlauf NHI	0,5±0,1	0,8±0,1###**	0,9±0,1###**	0,9±0,1###**	3,3±0,3**
Triglyceride[mmol/l]					
Verlauf LHI	0,8±0,1	3,8±0,3##	6,8±0,7##	9,6±1,5##	24,7±1,2
Verlauf NHI	0,8±0,0	0,5±0,0###**	0,6±0,1###**	0,7±0,1**	2,4±0,2*
Glycerol[nmol/l]					
Verlauf LHI	0,0±0,0	0,6±0,0##	0,7±0,0##	n.d.	0,9±0,0
Verlauf NHI	0,0±0,0	0,0±0,0###**	0,0±0,0###**	n.d.	0,1±0,0**
Glukose [mmol/l]					
Verlauf LHI	4,5±0,1	4,5±0,1	4,4±0,1	4,5±0,1	17,9±0,4
Verlauf NHI	4,5±0,1	4,4±0,1#	4,5±0,1	4,4±0,1	17,8±0,2
Insulin [mmol/l]					
Verlauf LHI	5,1±0,6	5,2±0,8	6,3±1,0	4,2±0,6	19,0±2,2
Verlauf NHI	5,5±0,6	4,1±0,5#	3,7±0,3#*	2,8±0,3###*	14,4±1,2*

MW+S.E.M; \*  $p < 0.05$  vs. Lipid/Heparin-Infusion (LHI), \*\*  $p < 0.005$  vs. Lipid/Heparin-Infusion (LHI); #  $p < 0.05$  vs. Baseline, ##  $p < 0.005$  vs. Baseline; n.d.=keine Messung erfolgt.

## 3.2. Hormonanalyse

Die Basalwerte für DHEA, DHEAS, Androstendion, Testosteron, DHT, Östron, Östradiol, Progesteron, 17-OH-Progesteron, ACTH, LH, FSH und SHBG lagen bei allen Probandinnen im Normbereich. Zudem fanden sich bei diesen Hormonen und SHBG keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Untersuchungstagen vor Beginn der Infusionen. Allerdings zeigte sich ein dezenter, wenn auch signifikanter Unterschied ( $p < 0.05$ ) in den basalen Testosteronwerten zwischen LHI und NHI. Eine ähnliche Situation ergab sich auch bei LH, wo sich ebenfalls ein minimaler, jedoch signifikanter Unterschied ( $p < 0.05$ ) basal zwischen beiden Infusionentagen ergab.

### 3.2.1. Androgenvorstufen

#### Dehydroepiandrosteron (DHEA)

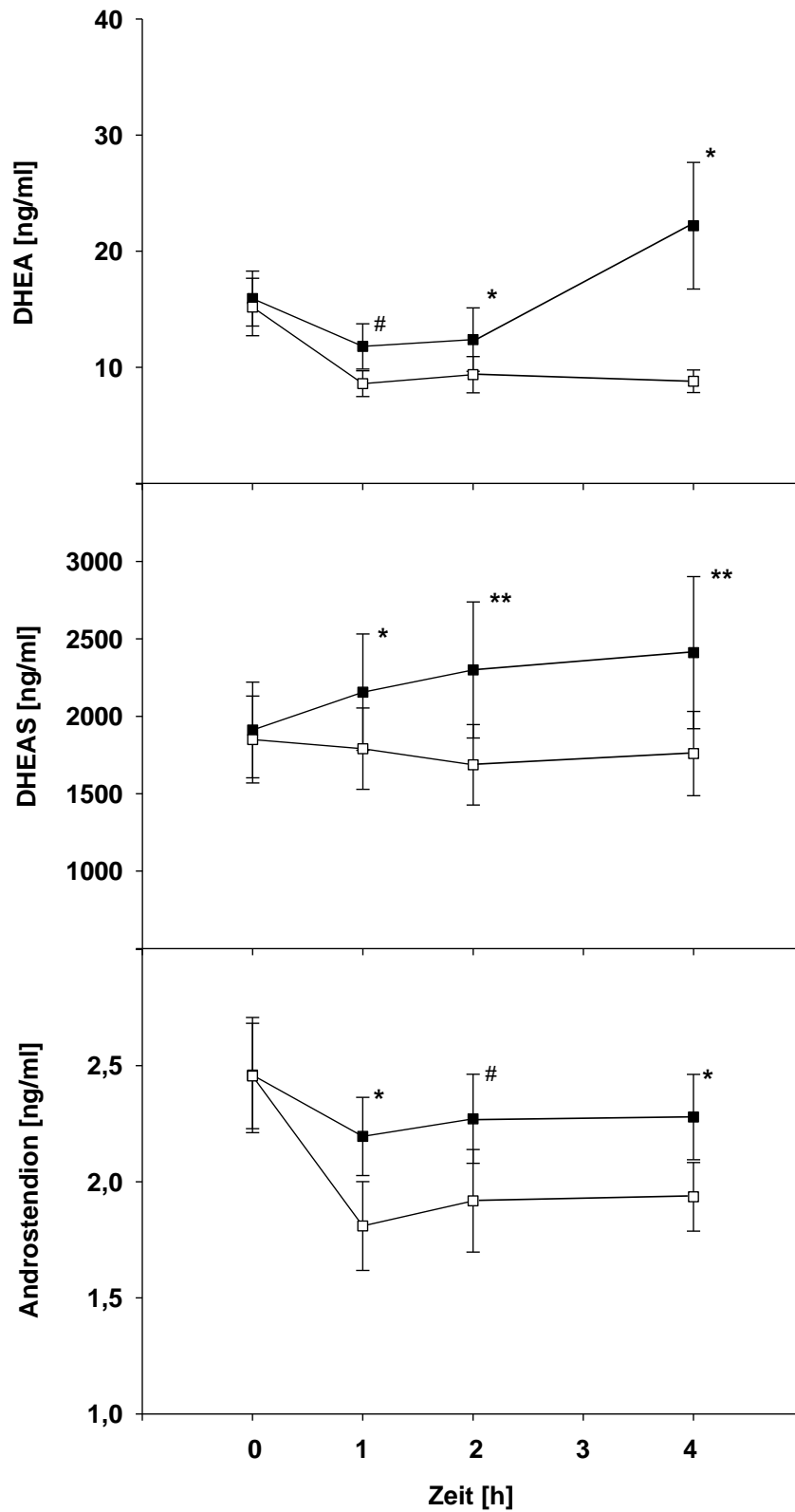
Unter der NHI kam es entsprechend der Tagessrhythmik zu einem Abfall von DHEA nach 1 und 2 Stunden ( $p < 0.05$ ) im Vergleich zu basal. Auch unter der LHI war nach 1 Stunde ( $p < 0.05$ ) ein leichter Abfall zu beobachten, der jedoch deutlich geringer ausgeprägt war als unter NHI, während hingegen die DHEA-Werte nach 2 und 4 Stunden nicht signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert waren. Durch den stärkeren Abfall während der NHI lagen die DHEA-Spiegel unter der LHI nach 2 und 4 Stunden signifikant höher als unter NHI ( $p < 0.05$ ). Während die zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwertwiederholung nur sehr knapp das Signifikanzniveau verfehlte ( $p = 0.052$ ), war die AUC jedoch signifikant höher unter der LHI als unter NHI ( $p < 0.05$ ). Der 1-Stunden-Wert, der zwar schon unter der LHI einen deutlich höheren DHEA-Spiegel zeigte als unter NHI, verfehlte die statistische Signifikanz ( $p = 0,14$ ) (siehe Tabelle 3 und Grafik 3).

**Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS)**

Im Verlauf der NHI konnte ein Abfall der DHEAS-Werte beobachtet werden, der jedoch nur nach 2 Stunden signifikant zu basal war ( $p < 0.05$ ). Unterdessen stiegen die DHEAS-Spiegel unter der LHI kontinuierlich an, so dass sich nach 1 und 2 Stunden signifikant höhere Werte gegenüber dem Basalwert fanden ( $p < 0.05$ ). Insgesamt ergaben sich daraus deutlich höhere DHEAS-Werte unter der LHI nach 1 ( $p < 0.05$ ), 2 und 4 Stunden ( $p < 0.005$ ) im Vergleich zur NHI ( $p < 0.05$ ; zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwertwiederholung). Entsprechend der Dynamik war auch die AUC deutlich höher unter der LHI ( $p < 0.05$ ) (siehe Tabelle 3 und Grafik 3).

**Androstendion**

Androstendion fiel unter der NHI nach 1, 2 und 4 Stunden im Vergleich zum Basalwert ab ( $p < 0.005$ ). Unter der LHI zeigte sich zwar auch ein leichter Abfall, der allerdings nur in der ersten Stunde signifikant war ( $p < 0.05$  vs. Baseline). Der Abfall unter der LHI war aber deutlich geringer ausgeprägt als unter der NHI, so dass sich hier signifikant höhere Androstendion-Spiegel nach 1 und 4 Stunden ( $p < 0.05$ ) im Vergleich zur NHI ergaben ( $p < 0.05$ ; zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwertwiederholung). Der 2-Stunden-Wert verfehlte nur knapp die statistische Signifikanz ( $p = 0.117$ ). Aufgrund des Verlaufes war die AUC signifikant höher unter der LHI ( $p < 0.05$ ) (siehe Tabelle 3 und Grafik 3).



**Grafik 3**

Serum-DHEA, -DHEAS und -Androstendion unter LHI (schwarze Kästchen) vs. NHI (weiße Kästchen); MW+S.E.M.; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$  vs. NHI; # [DHEA]  $p = 0.136$ ; # [Androstendion]  $p = 0.117$ .

**Tabelle 3:** Androgenvorstufen im Serum

<b>DHEA [ng/ml]</b>	0h	1h	2h	4h	AUC
Verlauf LHI	15,9±2,4	11,8±2,0#	12,4±2,7	22,2±5,5	3631±610
Verlauf NHI	15,2±2,5	8,6±1,1#	9,4±1,6#*	8,8±1,0*	2341±284*
<b>DHEAS [ng/ml]</b>					
Verlauf LHI	1912±309	2156±376#	2299±440#	2411± 491	538275±100611
Verlauf NHI	1850±281	1791±263	1687±260##**	1759±272**	420300±63471*
<b>Androstendion [ng/ml]</b>					
Verlauf LHI	2,5±0,3	2,2±0,2#	2,3±0,2	2,3±0,2	547±43,7
Verlauf NHI	2,5±0,2	1,8±0,2##*	1,9±0,2##	1,9±0,2##*	471±44,5*

MW+S.E.M; \* p<0.05 vs. Lipid/Heparin-Infusion (LHI), \*\* p<0.005 vs. Lipid/Heparin-Infusion (LHI);

# p<0.05 vs. Baseline, ## p<0.005 vs. Baseline .

DHEA nach 1h LHI vs. NHI: 0.136; Androstendion nach 2h LHI vs. NHI: 0.117.

### 3.2.2. Androgene und SHBG

#### Testosteron

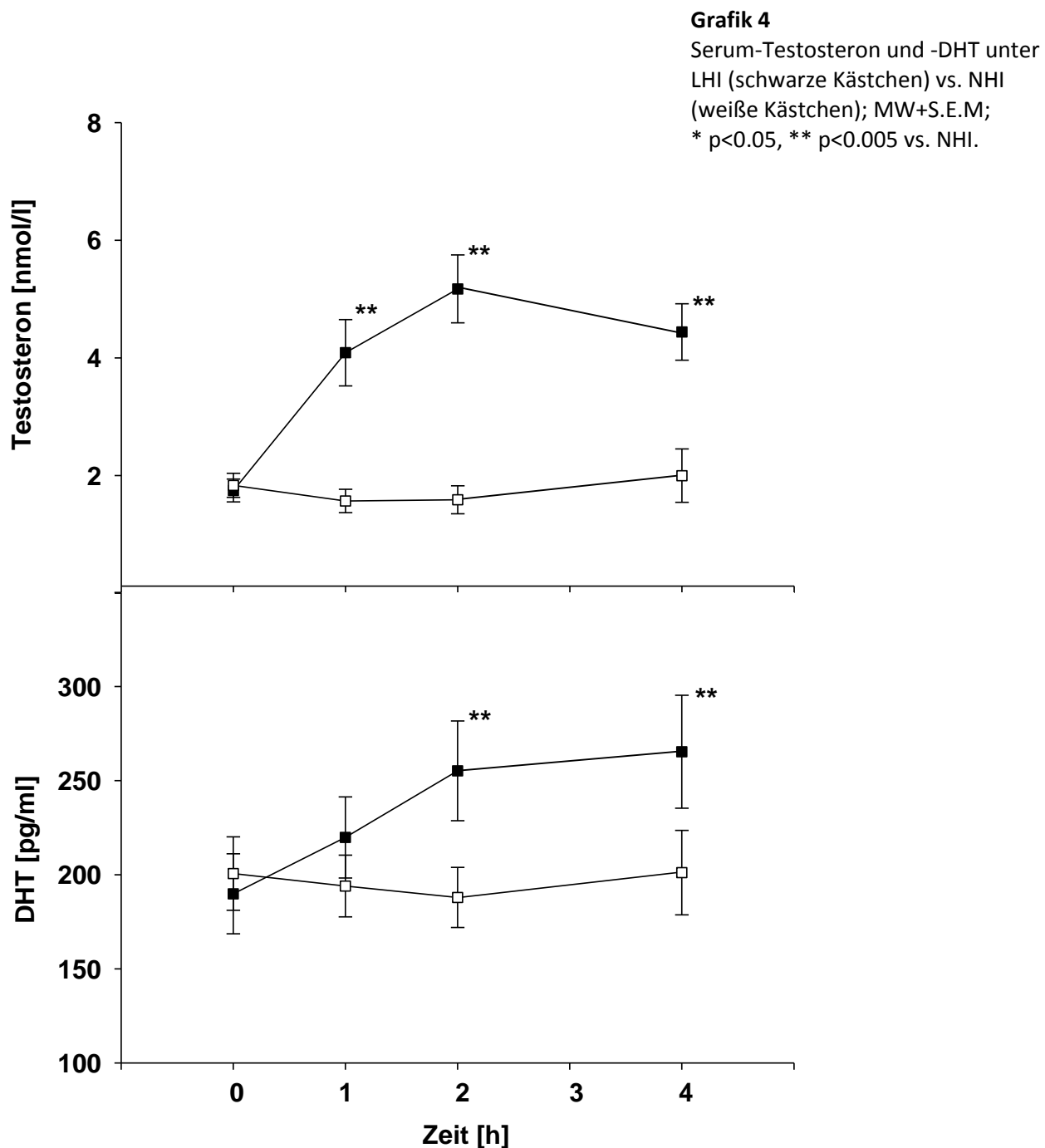
Auch wenn der Testosteronwert eine Stunde nach Infusionsbeginn leicht unter dem Basalwert lag ( $p<0.05$ ), blieben die Testosteronwerte insgesamt unter NHI unverändert und es zeigten sich auch nach 2 und 4 Stunden keine signifikanten Unterschiede zum Basalwert. Unter der LHI kam es zu einem deutlichen Anstieg nach 1, 2 und 4 Stunden ( $p<0.005$  vs. Baseline). Daraus folgte eine signifikante Erhöhung von Testosteron zu den Zeitpunkten 1, 2 und 4 unter LHI im Vergleich zur NHI ( $p<0.005$ ; zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwertwiederholung). Passend dazu ergab auch die AUC einen deutlich höheren Wert unter der LHI ( $p<0.005$ ) (siehe Tabelle 4 und Grafik 4).

#### Dihydrotestosteron (DHT)

Unter der NHI zeigte DHT im Verlauf keine nennenswerten Veränderungen. DHT stieg jedoch unter der LHI kontinuierlich nach 1 ( $p<0.05$ ), 2 und 4 Stunden ( $p<0.005$ ) im Vergleich zum Basalwert an. Daraus ergab sich eine signifikante Erhöhung von Dihydrotestosteron nach 2 ( $p<0.05$ ) und 4 Stunden ( $p<0.005$ ) unter LHI im Vergleich zur NHI ( $p<0.005$ ; zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwertwiederholung). Auch schon nach der ersten Stunde war DHT unter



der LHI deutlich erhöht im Vergleich zur NHI, verfehlte aber trotzdem die statistische Signifikanz ( $p=0,1$ ). Entsprechend der Dynamik zeigte die AUC eine deutliche Erhöhung von DHT unter LHI ( $p<0.005$ ) (siehe Tabelle 4 und Grafik 4).



### Freies Testosteron (fTesto)

Während das freie Testosteron keine großen Veränderungen im Verlauf der NHI zeigte, ergab sich unter der LHI ein eindeutiger Anstieg nach 1, 2 und 4 Stunden ( $p < 0.005$  vs. Baseline). Somit war zu den Zeitpunkten 1, 2 und 4 ( $p < 0.005$ ) Stunden eine signifikante Erhöhung des freien Testosterons unter der LHI gegenüber der NHI zu verzeichnen ( $p < 0.005$ ; zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwertwiederholung). Passend dazu zeigte auch die AUC eine deutliche Erhöhung des freien Testosterons unter der LHI ( $p < 0.005$ ) (siehe Tabelle 4).

### Sexualhormonbindendes Globulin (SHBG)

Beim SHBG war unter NHI und LHI weder im Verlauf, noch zwischen beiden Infusionen ein signifikanter Unterschied zu verzeichnen. Genauso zeigte auch die AUC keinen Unterschied zwischen beiden Infusionen ( $p = n.s.$ ) (siehe Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Androgene und SHBG im Serum

Testo[nmol/l]	0h	1h	2h	4h	AUC
Verlauf LHI	1,7±0,2	4,1±0,6##	5,2±0,6##	4,4±0,5##	1030±112
Verlauf NHI	1,8±0,2*	1,6±0,2##	1,6±0,2**	2,0±0,5**	412±61,5**
<b>DHT [pg/ml]</b>					
Verlauf LHI	190±21,3	220±21,5#	255±26,5##	265±30,0##	57771±5640
Verlauf NHI	201±19,5	194±16,4	188±16,0*	201±22,4**	46636±3974**
<b>fTesto [pmol/l]</b>					
Verlauf LHI	24,9±3,1	60,1±9,5##	77,4 ±10,0##	64,0±7,3##	
Verlauf NHI	27,1±3,6	22,8±2,7**	23,0 ±3,3**	31,5±7,9**	
<b>SHBG [nmol/l]</b>					
Verlauf LHI	51,4±5,3	50,0±4,4	49,9±4,1	50,1±3,6	12038±989
Verlauf NHI	49,1±5,3	48,1±5,4	47,5±5,1	45,8±5,5	11384±1254

MW+S.E.M; \*  $p < 0.05$  vs. Lipid/Heparin-Infusion (LHI), \*\*  $p < 0.005$  vs. Lipid/Heparin-Infusion (LHI);

#  $p < 0.05$  vs. Baseline, ##  $p < 0.005$  vs. Baseline ; DHT nach 1h LHI vs. NHI:  $p = 0,1$ .

### 3.2.3. Gestagene und Östrogene

#### Progesteron

Bei Progesteron zeigte sich unter beiden Infusionen ein ähnlicher Abfall nach 2 und 4 Stunden ( $p < 0.005$  vs. Baseline), der etwas ausgeprägter war unter der LHI, so dass sich zwar hier eine signifikante Erniedrigung von Progesteron nach zwei Stunden ( $p < 0.05$ ) LHI im Vergleich zur NHI ergab, die jedoch zu keinem signifikanten Unterschied in der zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwertwiederholung und in der AUC führte ( $p = \text{n.s.}$ ) (siehe Tabelle 5).

#### 17-Hydroxyprogesteron (17-OHP)

17-OHP fiel sowohl unter NHI als auch unter LHI ähnlich nach 2 und 4 Stunden ( $p < 0.005$  vs. Baseline) und zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Infusionen ( $p = \text{n.s.}$ ; zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwertwiederholung). Dementsprechend war auch die AUC zwischen LHI und NHI nicht unterschiedlich (siehe Tabelle 5).

#### Östron

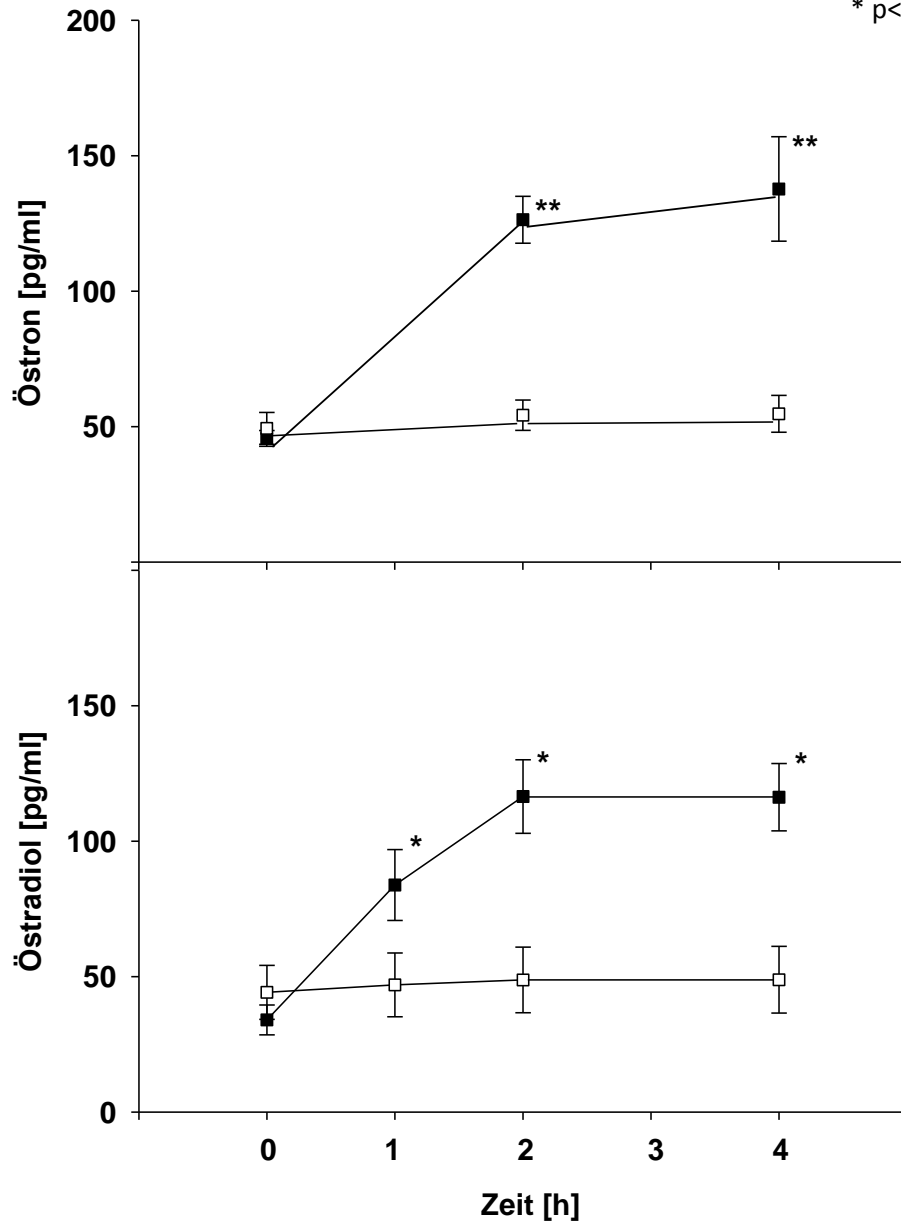
Obwohl Östron auch einen leichten Anstieg unter NHI nach 2 Stunden aufwies ( $p < 0.05$  vs. Baseline), war der Östronanstieg unter LHI nach 2 und 4 Stunden deutlich stärker ausgeprägt ( $p < 0.005$  vs. Baseline). Die stärkere Erhöhung von Östron während der LHI führte zu einem signifikanten Unterschied zwischen beiden Infusionen nach zwei und vier Stunden ( $p < 0.005$  im Paarvergleich) ( $p < 0.005$ ; zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwertwiederholung). Dementsprechend war auch die AUC unter LHI höher ( $p < 0.005$ ) (siehe Tabelle 5 und Grafik 5).

#### Östradiol

Unter der NHI konnten keine Veränderung der Östradiolwerte im Vergleich zum Basalwert festgestellt werden, während es jedoch unter der LHI zu einem starken Anstieg nach 1, 2 und 4 Stunden kam ( $p < 0.005$  vs. Baseline). Daraus ergab sich eine signifikante Erhöhung von Östradiol zu den Zeitpunkten 1 ( $p < 0.05$ ), 2 und 4 ( $p < 0.005$ ) Stunden unter LHI im Vergleich zur NHI ( $p < 0.005$ ; zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwertwiederholung). Passend dazu zeigte auch die AUC eine Erhöhung unter LHI im Vergleich zur NHI ( $p < 0.05$ ) (siehe Tabelle 5 und Grafik 5).

**Grafik 5**

Serum -Östron und -Östradiol unter LHI (schwarze Kästchen) vs. NHI (weiße Kästchen); MW+S.E.M; \* p<0.05, \*\* p<0.005 vs. NHI.



**Tabelle 5:** Gestagene und Östrogene im Serum

<b>Progesteron [ng/ml]</b>	0h	1h	2h	4h	AUC
Verlauf LHI	1,4±0,1	n.d.	0,7±0,1##	0,7±0,1##	202±18,4
Verlauf NHI	1,4±0,1	n.d.	0,8±0,1##	0,7±0,1##	225±14,2
<b>17-OHP [ng/ml]</b>					
Verlauf LHI	1,4±0,2	n.d.	0,6±0,0##	0,7±0,1##	201±16,3
Verlauf NHI	1,3±0,1	n.d.	0,8±0,1##	0,7±0,1##	216±21,9
<b>Östron [pg/ml]</b>					
Verlauf LHI	45,6±2,9	n.d.	126±8,7##	150±16,0##	27074±1819
Verlauf NHI	49,4±5,9	n.d.	54,2±5,6##**	55,3±7,4**	12869±1527**
<b>Östradiol [pmol/ml]</b>					
Verlauf LHI	125±20,3	308±48,0##	428±49,8##	427±45,6##	84400±9735
Verlauf NHI	162±36,6	172±43,2*	179±44,5**	179±45,2**	41971±10167*

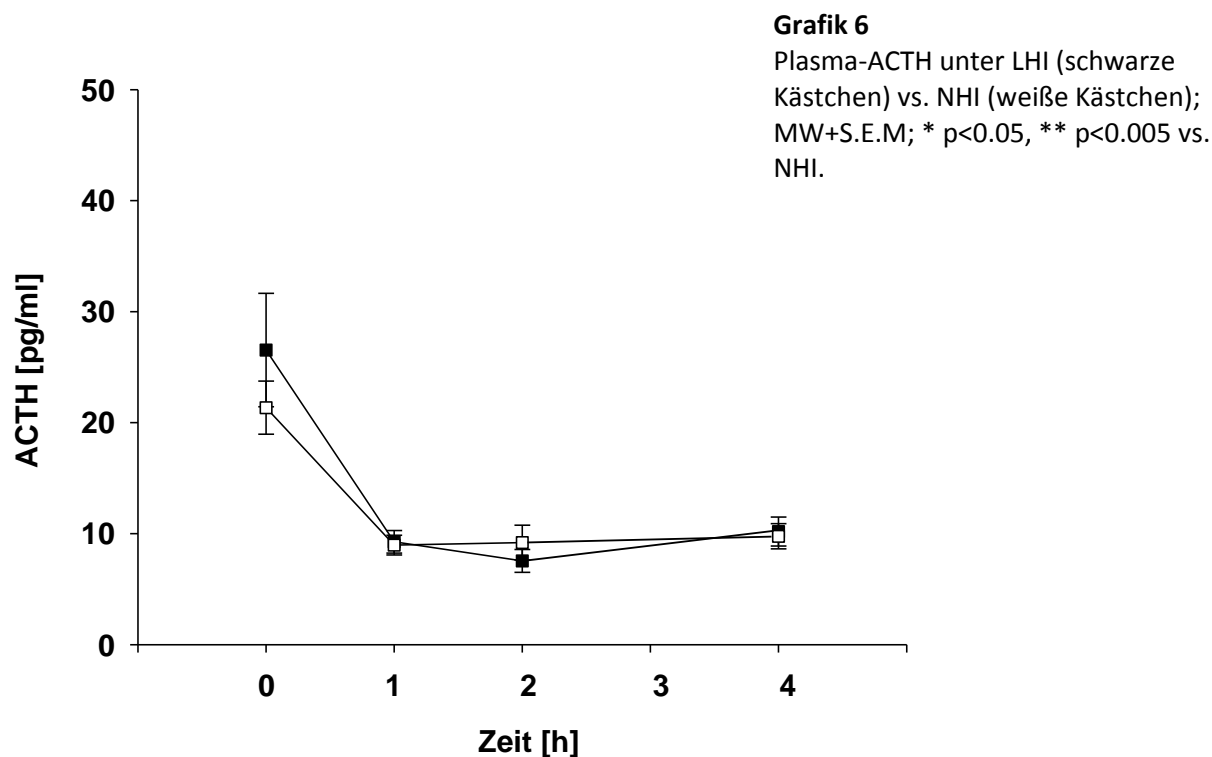
MW+S.E.M; \* p<0.05 vs. Lipid/Heparin-Infusion (LHI), \*\* p<0.005 vs. Lipid/Heparin-Infusion (LHI);

# p<0.05 vs. Baseline, ## p<0.005 vs. Baseline.

### 3.2.4. Evaluation hypophysärer Hormone

#### Adrenocorticotropes Hormon (ACTH)

ACTH fiel unter der NHI nach 1, 2 und 4 Stunden ab (p<0.005 vs. Baseline), in vergleichbarer Weise fiel auch ACTH unter der LHI nach 1 und 2 Stunden (p<0.005 vs. Baseline), so dass sich hier keine signifikanten Unterschiede zwischen LHI und NHI ergaben (p=n.s: zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwertwiederholung und AUC) (siehe Tabelle 6 und Grafik 6).



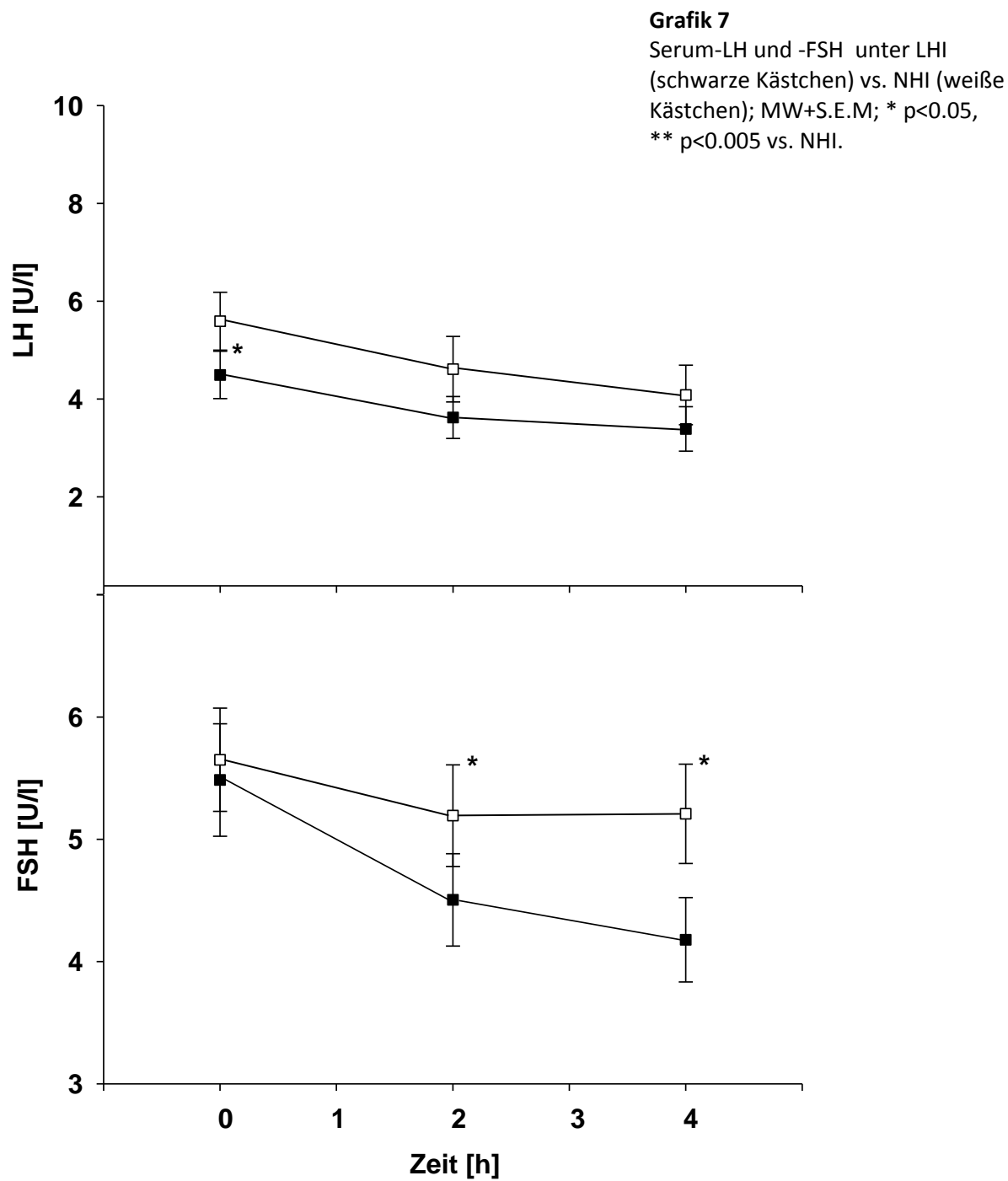
### Luteinisierendes Hormon (LH)

Die basalen LH-Spiegel waren vor Beginn der NHI geringgradig höher als vor der LHI ( $p < 0.05$ ). Unter NHI kam es zu einem progredienten Abfall der LH-Werte nach 2 ( $p < 0.05$ ) und 4 Stunden ( $p < 0.005$ ) im Vergleich zum Basalwert, der ebenfalls unter LHI zu beobachten war (2 und 4 Stunden  $p < 0.005$  vs. Baseline). Durch den vergleichbaren Verlauf bei beiden Infusionen kam es zu keinem signifikanten Unterschied zwischen LHI und NHI ( $p = \text{n.s.}$  zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwertwiederholung). Durch die anfängliche Differenz vor Beginn der Infusionen war jedoch die LH-AUC unter LHI signifikant niedriger ( $p < 0.05$ ) (siehe Tabelle 6 und Grafik 7).

### Follikelstimulierendes Hormon (FSH)

FSH zeigte unter der NHI nur einen leichten Abfall nach 2 Stunden ( $p < 0.005$ ) im Vergleich zu basal, während unter der LHI ein progredienter und stärkerer Abfall nach 2 und 4 Stunden ( $p < 0.005$  vs. Baseline) zu verzeichnen war. Daraus ergab sich eine signifikante Erniedrigung von FSH unter der LHI nach 2 ( $p < 0.05$ ) und 4 Stunden ( $p < 0.005$ ) gegenüber den FSH-Werten unter

NHI ( $p < 0.005$ ; zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwertwiederholung). Infolgedessen war auch die AUC von FSH unter LHI erniedrigt ( $p < 0.05$ ) (siehe Tabelle 6 und Grafik 7).



**Tabelle 6:** Hypophysenparameter im Serum

ACTH [pg/ml]	0h	1h	2h	4h	AUC
Verlauf LHI	26,5±5,1	9,3±1,0##	7,5±1,0##	10,2±1,3	2642±295
Verlauf NHI	21,4±2,4	9,0±0,9##	9,2±1,6##	9,8±1,1##	2592±196
LH [mU/ml]					
Verlauf LHI	4,5±0,5	n.d.	3,6±0,4##	3,4±0,5##	907±105
Verlauf NHI	5,6±0,6*	n.d.	4,6±0,7#	4,1±0,6##	1133±147*
FSH [mU/ml]					
Verlauf LHI	5,5±0,5	n.d.	4,5±0,4##	4,2±0,3##	1120±93
Verlauf NHI	5,7±0,4	n.d.	5,2±0,4##*	5,2±0,4**	1275±989*

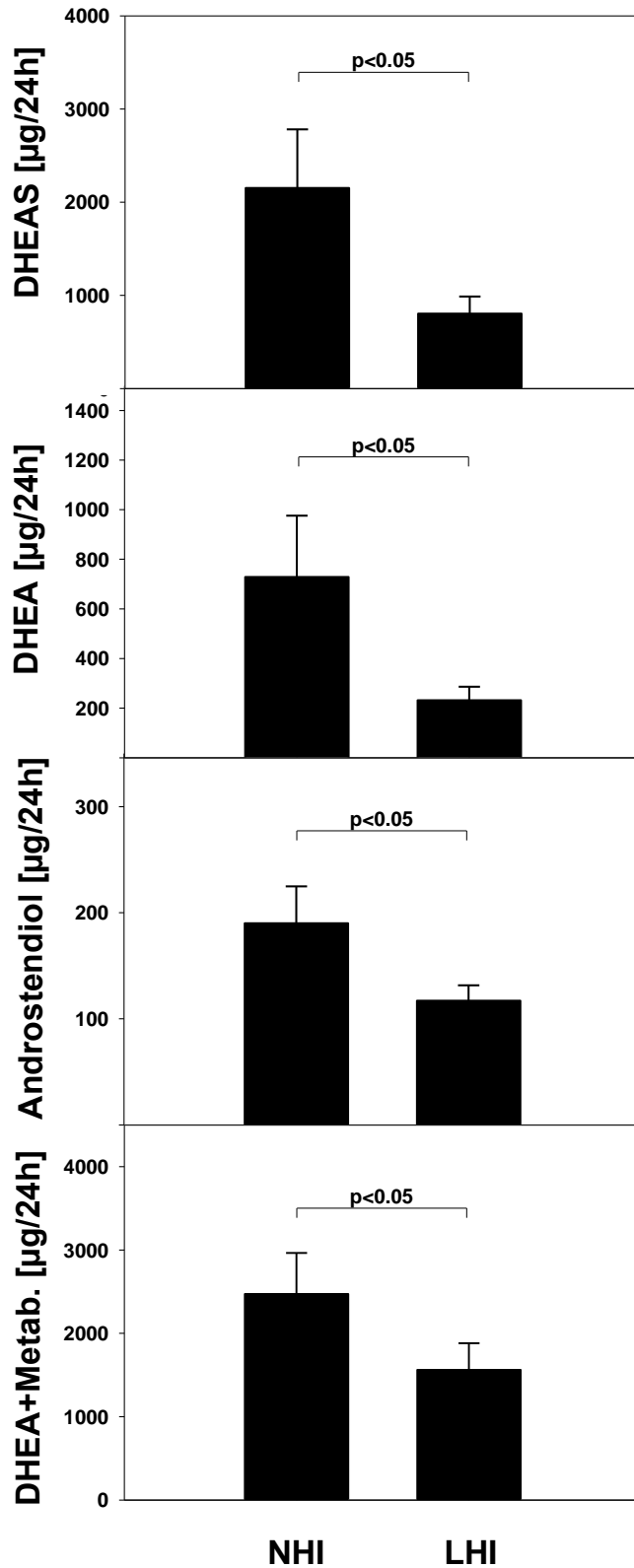
MW+S.E.M; \* p<0.05 vs. Lipid/Heparin-Infusion (LHI), \*\* p<0.005 vs. Lipid/Heparin-Infusion (LHI);

# p<0.05 vs. Baseline, ## p<0.005 vs. Baseline.

### 3.3. Urinmetabolite

Das **Urinvolumen** unterschied sich nicht signifikant zwischen LHI und NHI (p=n.s.). Sowohl die Urinausscheidung von **DHEA** als auch von **DHEAS** war unter LHI verringert (p<0.05 vs. NHI). Passend dazu wurde auch **Androstendiol**, ein direkter Metabolit von DHEA, welcher gut als Marker für das adrenal sezernierte DHEA betrachtet werden kann, vermindert unter LHI renal ausgeschieden (p<0.05 vs. NHI). Weiterhin war auch die Ausscheidung der Summe von **DHEA und seinen Metaboliten** (16 $\alpha$ -Hydroxy-DHEA und Androstentriol) und die **totale adrenale Androgenexkretion** [Adrenale Urinandrogene] (DHEA+Metabolite und Androstendiol) unter LHI vermindert (p<0.05 vs. NHI). Im Gegensatz dazu zeigte sich weder bei **Androstendion** noch bei den einzelnen Androstendionmetaboliten **An** und **Et** oder der **Summe der Androstendionmetaboliten** (An+Et) ein signifikanter Unterschied in der Ausscheidung zwischen beiden Infusionstagen (p=n.s.), jedoch war auch die renale Exkretion dieser Androgene unter LHI tendenziell niedriger im Vergleich zur Exkretion unter NHI. Ebenfalls konnte auch kein signifikanter Unterschied in der **totalen Androgensekretion** zwischen beiden Infusionstagen beobachtet werden (p=n.s.) (siehe Tabelle 7 und Grafiken 8,9 und 10).

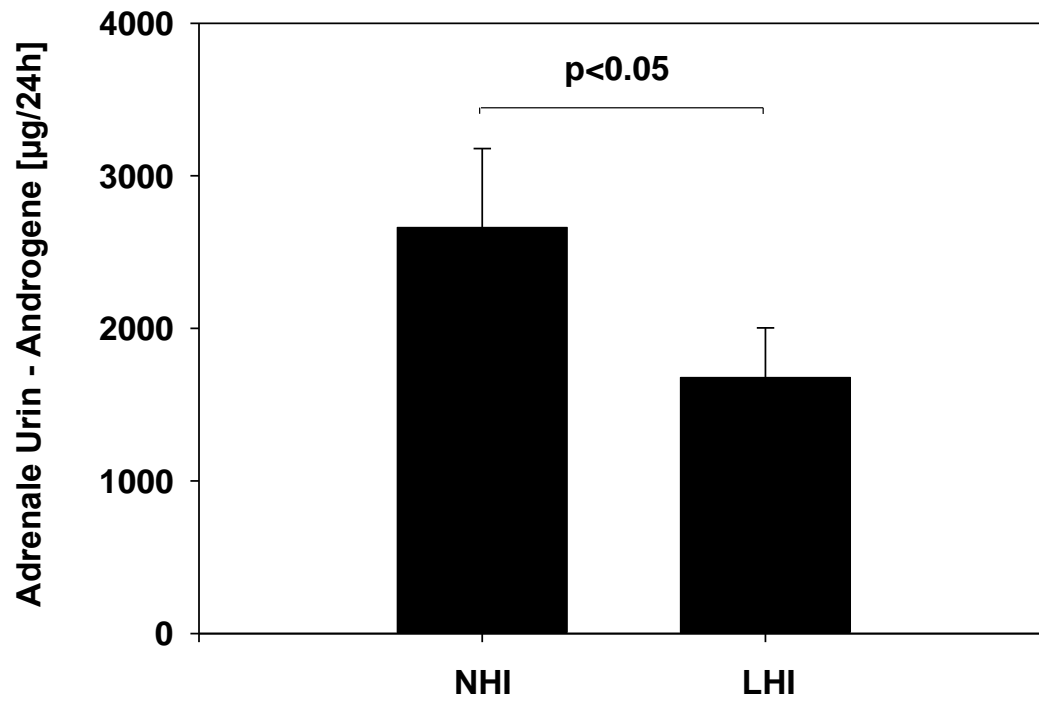


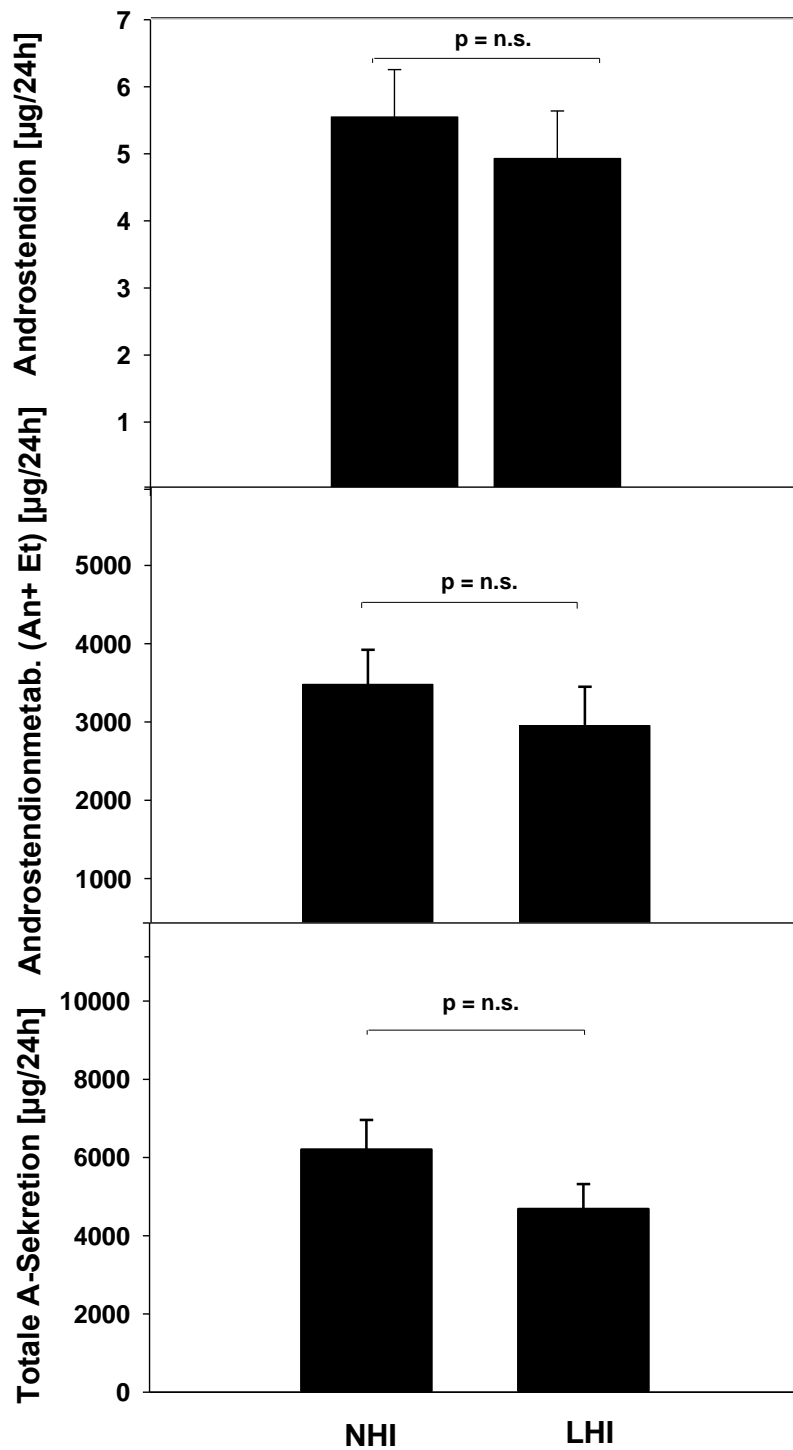
**Grafik 8**

24-h-Urinausscheidung von DHEAS, DHEA, Androstendiol und DHEA+Metabolite unter LHI und NHI; MW+S.E.M.

**Grafik 9**

24-h-Urinausscheidung adrenaler  
Androgene unter LHI und NHI;  
MW+S.E.M.



**Grafik 10**

24-h-Urinausscheidung von Androstendion, der Androstendionmetabolite (An+Et) und der totalen Androgensekretion unter LHI und NHI; MW+S.E.M.

**Tabelle 7: Urinmetabolite**

<b>DHEA im Urin [<math>\mu\text{g/d}</math>]</b>	<b>Untersuchungstag[24h]</b>
Verlauf LHI	232 $\pm$ 54,4
Verlauf NHI	729 $\pm$ 248*
<b>DHEAS im Urin [<math>\mu\text{g/d}</math>]</b>	
Verlauf LHI	805 $\pm$ 183
Verlauf NHI	2151 $\pm$ 631*
<b>Androstendiol [<math>\mu\text{g/d}</math>]</b>	
Verlauf LHI	117 $\pm$ 14,6
Verlauf NHI	190 $\pm$ 34,9*
<b>DHEA+Metaboliten[<math>\mu\text{g/d}</math>]</b>	
Verlauf LHI	1561 $\pm$ 320
Verlauf NHI	2472 $\pm$ 492*
<b>Adrenale Urinandrogene[<math>\mu\text{g/d}</math>]</b>	
Verlauf LHI	1678 $\pm$ 325
Verlauf NHI	2662 $\pm$ 517*
<b>Androstendion im Urin [<math>\mu\text{g/d}</math>]</b>	
Verlauf LHI	4,9 $\pm$ 0,7
Verlauf NHI	5,6 $\pm$ 0,7
<b>Androstendionmetab. (An+Et) [<math>\mu\text{g/d}</math>]</b>	
Verlauf LHI	2953 $\pm$ 497
Verlauf NHI	3481 $\pm$ 441
<b>Androsteron (An) [<math>\mu\text{g/d}</math>]</b>	
Verlauf LHI	1507 $\pm$ 254
Verlauf NHI	1777 $\pm$ 248
<b>Etiocholanolon (Et) [<math>\mu\text{g/d}</math>]</b>	
Verlauf LHI	1447 $\pm$ 252
Verlauf NHI	1704 $\pm$ 210
<b>Totale Androgensekretion[<math>\mu\text{g/d}</math>]</b>	
Verlauf LHI	4681 $\pm$ 639
Verlauf NHI	6202 $\pm$ 758
<b>Urinvolumen [ml]</b>	
Verlauf LHI	1761 $\pm$ 238
Verlauf NHI	1954 $\pm$ 290

MW+S.E.M; \*  $p < 0.05$  vs. Lipid/Heparin-Infusion (LHI).

## 3.4. Indizes für Enzymaktivitäten

### **DHEAS/DHEA-Ratio (Index für die hepatische Sulfotransferase)**

Die DHEAS/DHEA-Ratio stieg sowohl unter NHI als auch unter LHI vergleichbar nach 1 und 2 Stunden ( $p < 0.05$  vs. Baseline) an, wobei sich kein signifikanter Unterschied zwischen LHI und NHI ergab ( $p = \text{n.s.}$ : zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwertwiederholung und AUC) (siehe Tabelle 8).

### **Index für die 17-alpha-Hydroxylase**

Der Index für die 17-alpha-Hydroxylaseaktivität zeigte weder Veränderungen im Verlauf beider Infusionen, noch ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen beiden Infusionen ( $p = \text{n.s.}$ : zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwertwiederholung und AUC) (siehe Tabelle 8).

### **Index für die 17,20-Lyase**

Unter der NHI kam es bei dem Index für die 17,20-Lyaseaktivität zu einem leichten Anstieg nach 2 und 4 Stunden ( $p < 0.005$  vs. Baseline), unter der LHI jedoch zu einem stärkeren Anstieg nach 2 und 4 Stunden ( $p < 0.005$  vs. Baseline). Dies führte zu einer signifikanten Erhöhung des Indexes für die 17,20-Lyaseaktivität während der LHI nach 2 ( $p < 0.005$ ) und 4 ( $p < 0.05$ ) Stunden gegenüber der NHI ( $p < 0.005$ ; zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwertwiederholung). Auch die AUC war signifikant erhöht unter der LHI ( $p < 0.005$ ) (siehe Tabelle 8).

Der im Urin bestimmte **Index für die 5 $\alpha$ -Reduktaseaktivität** zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen LHI und NHI ( $p = \text{n.s.}$ ).

**Tabelle 8:** Serum-Enzymaktivitäten

DHEAS/DHEA	0h	1h	2h	4h	AUC
Verlauf LHI	130±10,9	186±14,7#	196±15,8#	156±26,5	4,7·10 <sup>8</sup> ±8,1·10 <sup>8</sup> (7)
Verlauf NHI	131±15,2	217±32,3##	191±26,1#	198±22,3	6,0·10 <sup>8</sup> ±1,7·10 <sup>8</sup>
<b>17Hydroxylase</b>					
Verlauf LHI	1,0±0,1	n.d.	1,0±0,1	1,1±0,1	246±13,3
Verlauf NHI	0,9±0,1	n.d.	1,0±0,1	1,0±0,1	219±16,4
<b>17,20-Lyase</b>					
Verlauf LHI	1,8±0,1	n.d.	3,7±0,3##	3,6±0,3##	762±36,9
Verlauf NHI	2,0±0,1	n.d.	2,4±0,1###	2,8±0,2##*	579±28,4**

MW+S.E.M.; \* p<0.05 vs. Lipid/Heparin-Infusion (LHI), \*\* p<0.005 vs. Lipid/Heparin-Infusion (LHI); # p<0.05 vs. Baseline, ## p<0.005 vs. Baseline.

### 3.5. Standardlaborwerte

Die Standardlaborwerte **Kreatinin, Harnstoff, Triglyceride, Cholesterin, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin, Protein, CRP, Natrium** und **Kalium** zeigten bis auf ein gering erhöhtes HDL-Cholesterin keinen signifikanten Unterschied vor Beginn der LHI im Vergleich zum Zeitpunkt vor NHI. Die Daten sind in Tabelle 9 gezeigt.

**Tabelle 9:** Standardlaborwerte aus dem Serum

Standardlaborwert	Lipid/Heparin-Infusion	NaCl/Heparin-Infusion
Kreatinin in µmol/l	83,3±2,2	85,3±2,4
Harnstoff in mmol/l	3,9±0,3	3,8±0,3
Triglyceride in mmol/l	0,9±0,1	0,9±0,1
Cholesterin in mmol/l	4,4±0,2	4,4±0,2
HDL-Cholesterin in mmol/l	1,6±0,1	1,5±0,0*
LDL-Cholesterin in mmol/l	2,5±0,2	2,5±0,2
Protein in g/l	72,2±1,1	72,1±1,0
CRP in mg/l	0,2±0,0	0,2±0,1
Natrium in mmol/l	139±0,5	139,7±0,4
Kalium in mmol/l	3,8±0,1	3,7±0,1

MW+S.E.M.; \* p<0.05 vs. Lipid/Heparin-Infusion (LHI).

### 3.6. Assaybeeinflussung

Um eine mögliche Interaktion hoher FFA- und Triglyceridkonzentrationen auf die Konzentrationsmessung der Hormone ausschließen zu können, die möglicherweise durch die Lipid/Heparin-Infusion in den Patientenplasmen erzeugt werden könnte, wurde ex-vivo geprüft, ob der Zusatz verschiedener Konzentrationen dieser beiden Lipidfraktionen eine Beeinflussung der Hormonmessungen verursacht. So führte der Zusatz verschiedener Mengen Lipidlösung (Lipovenös® 20%; Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany) (0, 0.5, 1.5 und 2.5 % vol/vol) zu basalen Plasmaproben zu einer gemessenen Triglyceridkonzentration von 1.28, 3.56, 8.09 und 12.69 mmol/l. Die nachfolgend gemessenen Androgen- und Östrogenwerte ergaben für DHEAS: 587, 555, 588 und 533 ng/ml; für Östradiol: 20.1, 20.0, 27.5 und 20.0 pg/ml und für Testosteron: 0.92, 1.07, 0.97 und 0.80 nmol/l. Des Weiteren wurde 6 mmol/l Ölsäure zu der 0, 0.5, 1.5 und 2.5 % vol/vol Triglyceridlösung gegeben, was zu einer vergleichbaren FFA Konzentration geführt hat, wie sie in den Plasmaproben während der Lipidinfusion erreicht wurde (5.94-7.31 mmol/l). Die darauffolgend gemessenen Werte ergaben für DHEAS: 577, 587, 578 und 485 ng/ml; für Östradiol: 22.2, 20.0, 22.3, 20.0 pg/ml und für Testosteron: 1.11, 0.91, 0.87, 0.86 nmol/l. Aufgrund dieser Ergebnisse ist nicht anzunehmen, dass die Triglycerid- oder die FFA-Konzentrationen, wie sie in vivo während der Studie erreicht wurden, zu einer wesentlichen Beeinflussung der Assaygenauigkeit mit messtechnisch bedingter Erhöhung der Hormone geführt haben könnte.

## 4. Diskussion

In dieser randomisierten, Placebo-kontrollierten Studie im Cross-over-Design konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine Hyperlipidämie, induziert durch eine Lipid/Heparin-Infusion bei jungen, gesunden und schlanken Frauen mit einem Anstieg der adrenalen Androgenvorstufen DHEA, DHEAS und Androstendion sowie der Androgene Testosteron und DHT und der Östrogene Östron und Östradiol verbunden war. In Analogie zu den aus Vorstudien bekannten Effekten einer LHI-induzierten Hyperlipidämie auf die Androgenspiegel bei gesunden jungen Männern konnte somit auch eine Regulation der Sexualhormone durch eine LHI induzierte Hyperlipidämie bei Frauen nachgewiesen werden (65). Diese Daten weisen auf einen neuen, in dieser Weise bisher noch nicht beschriebenen und näher charakterisierten Pathomechanismus hin, durch den Sexualhormone über Lipide reguliert werden könnten. Es konnte mit dieser Studie erstmalig gezeigt werden, dass für die Erhöhung der Androgene im Serum wahrscheinlich eine verminderte renale Ausscheidung von Androgenvorstufen verantwortlich war. Dieser neue Mechanismus könnte auch an der Hyperandrogenämie im Rahmen von verschiedenen endokrinen Erkrankungen beteiligt sein, wie z.B. dem PCOS. Das PCOS weist neben der Hyperandrogenämie auch metabolische Veränderungen auf, unter anderem eine Hyperlipidämie mit erhöhten freien Fettsäuren (3, 55). Somit könnten erhöhte Lipide einen wichtigen Beitrag bei der Entstehung der Hyperandrogenämie bei Patientinnen mit PCOS darstellen.

Prinzipiell sind mehrere Pathomechanismen denkbar, die zu einer Erhöhung der Androgene im Serum führen könnten. So könnten Veränderungen der zirkulierenden Androgene unter anderem induziert werden durch

- eine verminderte Ausscheidung der Androgene
- eine gesteigerte Produktion oder Sekretion (z.B. durch eine Induktion von Schlüsselenzymen der Androgenbiosynthese oder durch vermehrte zentrale Stimulation)
- eine Erhöhung der SHBG-Spiegel
- eine veränderte Bindung der Androgene an SHBG im Blut
- oder durch eine reduzierte hepatische oder periphere Metabolisierung.



Welche Mechanismen zu einer Hyperandrogenämie beitragen, kann durch Messung der beteiligten Metaboliten in der Zirkulation und im Urin abgeschätzt werden. Unter der hier experimentell induzierten Hyperlipidämie konnten deutlich erhöhte DHEA-Spiegel beobachtet werden. Diese führten nachfolgend mutmaßlich zu einer Erhöhung von Androstendion und über die weitere Metabolisierung auch zu einer Erhöhung von Testosteron und DHT. Über das erhöhte Androstendion und Testosteron könnte es dann wiederum zu einem Anstieg von Östron und Östradiol gekommen sein. Für die DHEA-Erhöhung scheint vor allem die verminderte renale Ausscheidung von DHEA verantwortlich zu sein. Da auch DHEAS vermindert unter der LHI ausgeschieden wurde, ist der Anstieg von DHEAS im Serum vermutlich zu einem Teil direkt durch die verminderte Ausscheidung bedingt und zum anderen Teil möglicherweise durch den DHEA-Anstieg im Serum mit anschließender Umwandlung durch die DHEA-Sulfotransferase erklärbar. Dafür spricht auch die unveränderte DHEA/DHEAS-Ratio. Der Anstieg von Androstendion ist demzufolge am ehesten auf den Anstieg von DHEA zurückzuführen, da sowohl Androstendion als auch die Androstendionmetaboliten An und Et nicht vermindert ausgeschieden wurden unter der LHI. Testosteron zeigte schon nach einer Stunde LHI einen sehr deutlichen Anstieg mit signifikantem Unterschied zur NHI. Im Vergleich dazu zeigte sich bei den jungen schlanken Männern aus der vorangegangenen Studie kein Unterschied während des gesamten Beobachtungszeitraumes zwischen beiden Infusionen. Das bedeutet, dass es hier bei den Frauen zu einem Anstieg der Androgene und Östrogene gekommen ist, während bei den Männern nur die Östrogene einen Anstieg zeigten. Diese Konstellation beschreibt die schon bekannte sexuelle dimorphe Konversion von DHEA zu Östrogenen bei Männern und zu Androgenen und Östrogenen bei Frauen (67,68). Dabei konnte demonstriert werden, dass die orale Gabe von DHEA bei älteren gesunden Männern vor allem zu einem Anstieg von DHEAS, Östron und Östradiol führte, während hingegen Testosteron und DHT keine Veränderungen zeigten (67). Bei Frauen führte die orale Gabe von DHEA nach Dexamethasonsuppression zu steigenden Spiegeln von DHEA, DHEAS, Androstendion, Testosteron, DHT und Östron (68).

In der vorliegenden Studie wurde erstmalig die Veränderung der renalen Exkretion von Androgenvorstufen als neuer Prozess bei der Entstehung einer Hyperandrogenämie im Rahmen einer Hyperlipidämie charakterisiert. Dabei scheint vor allem die Urinausscheidung adrenaler Androgenvorstufen (DHEA, DHEAS und deren spezifische Metabolite) reduziert zu sein,

während sich keine Veränderung in der renalen Ausscheidung von Androstendion, welches sowohl adrenal als auch gonadal sezerniert wird, zeigte. Ebenso war die Ausscheidung seiner spezifischen Metabolite Et und An nicht signifikant verändert. Da das Gesamturinvolumen während beider Infusionstage unverändert blieb, ist dies wahrscheinlich auf eine veränderte Clearance von DHEA und DHEAS während der LHI zurückzuführen. Dies stellt einen neuen Mechanismus für die Androgenerhöhung im Serum dar.

Insgesamt gibt es nur sehr wenig Literatur über den Einfluss freier Fettsäuren auf die Modulation der Serumandrogene und kaum Literatur über die Ausscheidung der Urinandrogene bei erhöhten Fettsäurespiegeln im Blut. Interessanterweise existiert eine Studie, die sich mit der Höhe der DHEA-Ausscheidung in Bezug auf die Konzentration der Serumlipide beschäftigte. So zeigten sich in der Untersuchung bei gesunden männlichen und weiblichen Blutspendern, die eine sehr niedrige DHEA-Ausscheidung aufwiesen, signifikant höhere Serumlipidkonzentrationen, auch für freie Fettsäuren, im Vergleich zu Patienten, die DHEA in größeren Mengen ausschieden (69). Passend dazu konnte auch eine sehr niedrige DHEA-Ausscheidung bei Patienten mit metabolischem Syndrom gefunden werden (69). Zudem konnte wiederholt gezeigt werden, dass es unter Fastenbedingungen, einem Zustand der typischerweise auch durch eine Erhöhung der freien Fettsäuren gekennzeichnet ist, zu einem Anstieg von DHEAS und Serumandrogenen und parallel zu einer verminderten renalen Ausscheidung von DHEA, DHEAS, An und Et kommt (70,71). Gleiches konnte auch für Cholesterin gezeigt werden. Auch hier war eine Erhöhung von Cholesterin im Serum mit einer Verminderung der DHEA Ausscheidung im Urin verbunden (72).

Im Gegensatz dazu konnte bei den schon in der Einleitung erwähnten Ernährungsanalysen gezeigt werden, dass eine fettreiche Ernährungsweise eher zu einer Erhöhung von Androgenen sowohl im Serum als auch im Urin führte, während eine fettarme Diät mit erniedrigten Serumandrogenen und mit einer verminderten Androgenausscheidung verbunden war. So war in der Studie von Wang die fettarme ballaststoffreiche Diät neben dem Abfall der Serumandrogene von einer verminderten Ausscheidung der meisten adrenalen und testikulären Urinandrogene begleitet (Epi-T, An und Et) (57). Umgekehrt führte die fettreiche und ballaststoffarme Ernährung in der Untersuchung von Dorgan zu einer Erhöhung von Testosteron im Plasma und zu einer vermehrten Ausscheidung von Testosteron im Urin (58). Gleiches zeigte sich auch in einer anderen Ernährungsstudie, wo eine vegetarische, fettarme Ernährungsweise in einer

geringeren Ausscheidung von An, Et, DHEAS und Testosteron resultierte, als eine fett- und fleischreiche Ernährung. Dementsprechend führte der Wechsel von vegetarischer zu fettreicher Ernährung zur Erhöhung der Ausscheidung von An und Et und der Wechsel von fettreicher zu vegetarischer Ernährung zur Abnahme der Ausscheidung von An, Et und DHEAS (59). Jedoch wurde bei diesen Studien vorrangig die Ausscheidung von Androstendionmetaboliten und Testosteron untersucht und weniger die Ausscheidung von DHEA und DHEAS.

Beim PCOS, das häufig mit erhöhten freien Fettsäuren einhergeht, ist die Ausscheidung der Androgene korrespondierend zu den Serumandrogenen. So findet sich neben den erhöhten Serumandrogenen auch eine erhöhte Androgenausscheidung. Es konnte bei der Urinuntersuchung schlanker PCOS-Patientinnen eine erhöhte Ausscheidung der Urinandrogene Androsteron, Etiocholanolon und den C19-Steroiden im Vergleich zu schlanken Kontrollprobandinnen nachgewiesen werden (73,7). Demzufolge deuten diese Daten auf eine erhöhte Ausscheidung von Androgenen beim PCOS hin, wobei es sich auch hier wieder nur um die Untersuchung der Androstendionmetaboliten Androsteron und Etiocholanolon handelte. Diese wurden in unserer Studie unverändert ausgeschieden. Da keine weiteren Androgenmetabolite in diesen Studien bestimmt wurden, lassen sich auch keine Aussagen zur Ausscheidung von DHEA, DHEAS und deren Metaboliten bei PCOS-Patientinnen treffen. Möglich wäre jedoch, dass auch PCOS-Patientinnen, zumindest solche mit erhöhten freien Fettsäuren im Serum, eine verminderte Ausscheidung von DHEA und DHEAS haben, was einen Anstieg von DHEA und DHEAS im Serum zur Folge haben könnte und dementsprechend zu einem Anstieg von Androstendion und Testosteron führen würde. Der Anstieg der Androgene im Serum könnte dann nachfolgend in eine vermehrte Ausscheidung der Androstendionmetabolite Androsteron und Etiocholanolon resultieren. Letztendlich wären unsere Ergebnisse aber nur dann mit einer erhöhten Ausscheidung von Androstendion und dessen Metaboliten bei PCOS vereinbar, wenn die Hyperandrogenämie beim PCOS eben nicht nur durch eine Veränderung der renalen Clearance, sondern auch noch durch Veränderung der Sekretion der entsprechenden Androgene verursacht werden würde. Dies konnte in der Tat in verschiedenen Studien auch gezeigt werden (7,29). Damit wäre die Verminderung der renalen Androgenausscheidung nur als ein Faktor der Hyperandrogenämie beim PCOS zu betrachten. Dieser würde zusätzlich zur erhöhten Androgensekretion und dadurch eher erhöhten renalen Androgenexkretion dann durch eine leichte Reduktion der gesteigerten Androgenausscheidung die Androgenspiegel im Serum additiv steigern.

Es gibt verschiedene Vermutungen über den genauen Pathomechanismus, wie freie Fettsäuren zu einer verminderten Ausscheidung von Androgenvorstufen führen könnten. Remer legte die Vermutung nahe, dass eventuell durch eine verstärkte Bindung von DHEA, DHEAS und Androstendion an Albumin, induziert durch freie Fettsäuren, die freie Hormonkonzentration dieser Hormone gesenkt werden könnte und so die metabolische Clearance rate dieser Hormone vermindert werden würde (76). Alle drei adrenalen Androgene sind im Plasma zum größten Teil an Albumin gebunden (80%) und weniger an SHBG. Albumin weist im physiologischen Zustand auch bei sehr hohen Steroidhormon-Spiegeln mehr als 99% frei verfügbare unbesetzte Hormonbindungsstellen auf (76). Zudem deuten einige Daten darauf hin, dass freie Fettsäuren auch die Bindung von anderen zirkulierenden Metaboliten und Hormonen an Albumin beeinflussen können, da freie Fettsäuren ebenfalls an Plasma-Albumin binden (76,77). So konnte eine erhöhte Affinität für das Steroidhormon Testosteron und dessen Bindung an humanes Albumin durch Erhöhung der freien Fettsäuren gezeigt werden (78). In einer ähnlichen Studie fand sich jedoch, dass freie Fettsäuren zwar die Bindung von Testosteron und Progesteron an Rinderalbumin verstärken können, nicht jedoch die Bindung dieser Hormone an Humanalbumin (79). Zudem existieren auch Daten, die eine verminderte Bindungsaffinität von Androgen an Trägerproteine durch die freien Fettsäuren nahe legen. So zeigte sich in vitro-Untersuchungen, dass freie Fettsäuren in physiologischen Konzentrationen die Bindung von Testosteron zu Albumin und SHBG und von DHT zu Albumin inhibieren können. Von freien Fettsäuren ist auch bekannt, dass sie die Bindung von Östrogenen an zirkulierende Proteine im Serum beeinträchtigen können (80). Gegen eine erhöhte Bindungsaffinität mit erniedrigten freien Hormonspiegeln sprechen auch die Ergebnisse von Reed und Mitarbeitern. Hier war die FFA-Konzentration positiv mit der freien Testosteronkonzentration bei asiatischen Frauen assoziiert (81).

Alle bisher durchgeführten Studien, unabhängig davon, ob eine erhöhte oder verminderte Bindungsaffinität nachgewiesen werden konnte, bezogen sich auf die Untersuchung von Testosteron an Albumin und SHBG. Die Bindung von DHEA und DHEAS an die Trägerproteine wurde bisher dagegen kaum untersucht. Es wäre demnach sehr wichtig auch Studien durchzuführen, die vor allem die Bindung von DHEA, DHEAS und Androstendion an Albumin unter Einfluss freier Fettsäuren untersuchen. Zusammenfassend bleibt demnach unklar, ob die Änderung der renalen Ausscheidung der adrenalen Androgenvorstufen DHEA und DHEAS

durch eine veränderte Bindung dieser Androgene an die Plasmaeiweißfraktion bedingt ist. Hierbei könnte eine Analyse der freien Androgene im Speichel unter LHI und NHI im Rahmen von zukünftigen Studien zur Klärung beitragen. In wieweit die veränderte renale Clearance durch lokale Effekte der freien Fettsäuren an der Niere bedingt sind, lässt sich momentan nur spekulieren und erfordert weitere Studien.

Als eine andere mögliche Ursache einer LHI induzierten Hyperandrogenämie kommt eine erhöhte Aktivität der Nebennierenrinde in Frage, wie diese oft bei PCOS-Patientinnen zu finden ist (31,32). Bei einer globalen Hyperaktivität würde man auch erhöhte Vorstufen von DHEA und Androstendion erwarten. Dies konnte aber in dieser Studie nicht gefunden und somit die Annahme nicht bestätigt werden, denn sowohl Progesteron als auch 17-OH-Progesteron zeigten keine nennenswerten Unterschiede zwischen und während beider Infusionen. Damit ist ein Anstieg von Androstendion über eine Erhöhung von Progesteron und 17-OH-Progesteron ausgesprochen unwahrscheinlich. Dementsprechend ist auch der Anstieg von Androstendion durch die Induktion der 17 $\alpha$ -Hydroxylase mit nachfolgender Erhöhung von 17-OH-Progesteron, was wiederum einen Anstieg von Androstendion zur Folge haben könnte, sehr unwahrscheinlich. In der Tat zeigt der hier berechnete Index zur Abschätzung der 17 $\alpha$ -Hydroxylase-Aktivität keine signifikanten Veränderungen. Die Bewertung der Aktivität der 17,20-Lyase ist hier allerdings nicht ganz eindeutig. In früheren Studien konnte eine erhöhte Aktivität der P450c17-Oxygenase im Rahmen des PCOS mit konsekutiver Erhöhung der Androgene, insbesondere des Androstendions, beobachtet werden (31,32). Zwar zeigt die Ratio Androstendion/17-OHP, als Ausdruck der 17,20-Lyase-Aktivität auch bei unseren Probanden schon nach zwei Stunden LHI eine deutlich erhöhte Aktivität, dies ist aber vor allem durch den erhöhten Androstendionspiegel im Vergleich zur NHI und im Bezug zum unverändert gebliebenen 17-OH-Progesteron bedingt. Daher ist es fraglich, ob dies wirklich eine erhöhte Aktivität der 17,20-Lyase widerspiegelt. Wahrscheinlicher scheint, dass dieses Ergebnis auf den starken Anstieg von DHEA durch die reduzierte renale Clearance mit nachfolgend deutlicher Erhöhung von Androstendion zurückzuführen ist. Dennoch kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass es zusätzlich zu der DHEA und DHEAS-Erhöhung im Serum mit sehr wahrscheinlicher nachfolgender Androstendion-Erhöhung, nicht auch durch die Induktion der 17,20-Lyase, möglicherweise durch die freien Fettsäuren, zu einem Anstieg von Androstendion gekommen ist.

Eine veränderte Sekretion der Gonadotropine (LH und FSH) oder von ACTH aus der Hypophyse könnte ebenfalls zu einer Erhöhung der gonadalen bzw. adrenalen Androgene im Serum beitragen. Es ist bekannt, dass freie Fettsäuren einen Einfluss auf die Sekretion einiger Hypophysenhormone haben. So gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass freie Fettsäuren die Hypophysenfunktion direkt beeinflussen können, indem sie die Wachstumshormon(GH)-Freisetzung nach Stimulation durch GH-RH direkt auf der Ebene der Hypophyse inhibieren (82,83). Dementsprechend konnte auch durch akute Suppression freier Fettsäuren durch Acipimox eine Erhöhung von GH nach GH-RH-Stimulation erreicht werden (84). Zudem konnte gezeigt werden, dass freie Fettsäuren auch die Hypothalamusfunktion beeinflussen können. So zeigte sich in einer in-vitro Untersuchung, dass freie Fettsäuren akut die basale Somatostatinsekretion in hypothalamischen Zellkulturen inhibieren konnten (85).

Bisher gibt es nur wenige Studien, die sich mit dem Einfluss freier Fettsäuren auf die FSH- und LH-Sekretion der Hypophyse beschäftigt haben. In der Ernährungsanalyse von Wang war der Abfall freier Fettsäuren auch von einer signifikanten Abnahme der Gonadotropine FSH und LH begleitet, was hier wiederum bedeuten würde, dass ein Anstieg freier Fettsäuren auch einen Anstieg der Gonadotropine zur Folge hätte (57). Bei einer weiteren Ernährungsanalyse mit Diät bei PCOS-Patientinnen war jedoch der signifikante Abfall freier Fettsäuren mit keiner Veränderung von FSH oder LH verbunden (86). Aufgrund dieser Daten, die eine Modulation der Sekretion von Hypophysenhormonen durch freie Fettsäuren nahe legen, bestand die Frage, in wie weit die beobachteten Unterschiede in den Androgenspiegeln eventuell durch eine Veränderung der zentralen Stimulation hervorgerufen wurden.

ACTH, das die Sekretion der adrenalen Androgenvorstufen und Androgene reguliert, zeigte hier einen ähnlichen Verlauf bei beiden Infusionen. Daher scheint eine verstärkte Stimulation der NNR über erhöhte ACTH-Spiegel eher unwahrscheinlich zu sein. Genauso zeigte LH, dass an der Regulation der gonadalen Androgensynthese und -sekretion beteiligt ist, keinen Unterschied zwischen beiden Infusionen. Zwar konnte ein FSH-Abfall unter der LHI beobachtet werden, jedoch würden reduzierte FSH-Spiegel allenfalls zu einer erniedrigten Androgenkonzentrationen im Blut führen. Zudem legen unsere Daten nahe, dass es sich primär vor allem um eine Erhöhung der adrenalen Androgene handelt, welche nicht durch LH oder FSH reguliert werden. Da es sich bei dieser Untersuchung um junge gesunde ovulatorische Frauen gehandelt hat, ist hier die Suppression von FSH am ehesten auf die ebenfalls stark angestiegenen Östrogenspiegel im Serum durch den negativen Feedbackmechanismus zurückzuführen. Eher unwahrscheinlich wäre

hier, dass die erhöhten Androgenspiegel zu einer Suppression von FSH durch den negativen Rückkopplungsmechanismus geführt haben, zumal die Androgene eher den LH-Spiegel regulieren und zudem nur eine sehr lose Verbindung zwischen Androgenanstieg und Verminderung der Gonadotropine besteht (25). Ebenfalls nicht sehr wahrscheinlich ist, dass die Abnahme von FSH unter der LHI Ausdruck einer direkten Hemmung freier Fettsäuren auf die FSH-Sekretion der Hypophyse ist. Da dies aber in unserer Studie nicht direkt untersucht wurde, lässt es sich auch nicht ganz ausschließen. Zur weiteren Klärung, welchen Einfluss freie Fettsäuren auf die LH und FSH Sekretion der Hypophyse besitzen, wären weitere Untersuchungen diesbezüglich wünschenswert. Zusammenfassend scheint hier weder FSH noch LH oder ACTH für die Veränderung der Androgenspiegel im Blut verantwortlich zu sein. In Analogie zu diesen Befunden ergab sich auch bei der zuvor durchgeführten Untersuchung mit jungen schlanken Männern kein Hinweis auf eine Beeinflussung der Ergebnisse durch eine veränderte hypophysäre Sekretion. LH, FSH und ACTH zeigten alle einen annähernd ähnlichen Verlauf bei beiden Infusionen (61).

Ein weiterer Aspekt, der zu Veränderungen der Androgenspiegel führen könnte, sind Modifikationen der SHBG-Spiegel. So würde bei erhöhten SHBG-Spiegeln vermehrt freies Testosteron gebunden werden und somit vermindert im Serum vorliegen. Dies würde eine erhöhte Produktion und Sekretion von Testosteron zur Folge haben, um den freien Testosteronspiegel im Serum konstant zu halten. Auch eine verminderte Synthese von SHBG, beispielsweise durch ansteigende Insulinspiegel, könnte eine Erhöhung der freien Androgene, insbesondere des freien Testosterons, im Serum zur Folge haben ohne dass eine wirkliche Erhöhung vorliegt (3). Dadurch würden weniger Androgene im Blut durch SHBG gebunden werden und vermehrt freie Androgene zur Verfügung stehen. In unserer Studie konnte jedoch keine Veränderung von SHBG festgestellt werden, so dass der Anstieg der Androgene im Serum durch veränderte SHBG-Spiegel weitestgehend ausgeschlossen werden konnte. Dementsprechend konnte bei der Berechnung des freien Testosterons unter Berücksichtigung der SHBG-Spiegel eine Erhöhung unter LHI demonstriert werden.

Ein weiterer wichtiger Faktor, der zur Hyperandrogenämie beitragen könnte, wäre eine verminderte Aktivität der hepatischen Sulfotransferase, welche ebenfalls einen Anstieg von DHEA im Serum bewirken könnte. In erster Linie würde es dann zunächst zu einem Anstieg von

DHEA kommen der nachfolgend über Androstendion zur Hyperandrogenämie führen würde. Aber auch die kalkulierte DHEA-Sulfotransferase-Aktivität war vergleichbar an beiden Infusionstagen. Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch in der Studie mit den jungen gesunden Männern. Daher scheint eine veränderte Aktivität der Sulfotransferase als mögliche Ursache für den erhöhten DHEA-Spiegel eher unwahrscheinlich zu sein (61).

Die Aktivität der 5 $\alpha$ -Reduktase zeigte ebenfalls keine veränderte Aktivität unter der LHI, so dass hier keine Veränderung der peripheren Metabolisierung der Androgene vorzuliegen scheint. Daher ist die Erhöhung von DHT am ehesten auf den Anstieg von Testosteron zurückzuführen und nicht durch eine erhöhte 5 $\alpha$ -Reduktaseaktivität bedingt.

Der Einfluss von Insulin auf die DHEA-Ausscheidung war bereits Gegenstand von verschiedenen Untersuchungen. Durch Erhöhung von Insulin konnte die metabolische Clearance rate von DHEA gesteigert werden. So war der Anstieg von Insulin mit einem Abfall von DHEA, DHEAS und Androstendion im Serum verbunden, während hingegen die Urinausscheidung von glucuronisiertem DHEA und DHEAS anstieg. Die Ausscheidung von unkonjugiertem DHEA im Urin blieb dabei jedoch unverändert (74,75). Das legt nahe, dass der Effekt der unter der LHI beobachtet werden konnte, durch eine begleitende Hyperinsulinämie eher abgeschwächt werden würde und daher wahrscheinlich noch stärker ist, als beschrieben. In der hier durchgeführten Studie sind die Effekte von Fettsäuren und konsekutiven metabolischen Veränderungen schwer zu trennen.

Freie Fettsäuren spielen eine bedeutende Rolle bei einer Vielzahl von metabolischen Prozessen. So können sowohl akute als auch chronische Erhöhungen der freien Fettsäuren eine periphere und hepatische Insulinresistenz erzeugen (41). Unter einer LHI kommt es sowohl zu einer Hyperinsulinämie als auch zu einer Insulinresistenz (IR) (41,87, 88). Am wahrscheinlichsten ist hierfür die Kombination aus direkten stimulatorischen Effekten der freien Fettsäuren auf die Insulinausschüttung aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas sowie die durch freie Fettsäuren induzierte IR verantwortlich (41). Dabei entsteht die periphere muskuläre Insulinresistenz durch Hemmung der insulinstimulierten Glukoseaufnahme in die Muskelzelle (41). Die hepatische Insulinresistenz dagegen entsteht zum einen durch eine Erhöhung der insulin-supprimierten endogenen Glukoseproduktion (Glukoneogenese) und zum anderen durch einen Anstieg der insulinvermittelten Suppression der Glykogenolyse (88,89). Veränderungen der



Insulinsensitivität, besonders der peripheren Insulinsensitivität, können mit dem hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp evaluiert werden. Aus Clampversuchen mit und ohne parallele Infusion einer Lipidlösung wissen wir, dass es circa 180 bis 210 Minuten nach Erhöhung der freien Fettsäuren mittels Lipid-Heparin-Infusion zu einer Abnahme der Glukoseinfusionsrate (GIR) kommt, was mit einem Abfall der Insulinsensitivität gleichzusetzen ist (60,87). Freie Fettsäuren steigern aber auch direkt die basale Insulinsekretion und potenzieren die glukosestimulierte Insulinsekretion (41). In Analogie dazu führt eine akute Suppression von im Normbereich liegenden oder erhöhten freien Fettsäuren zu einem 30-50% Abfall der Insulinsekretion bei Probandinnen mit und ohne Diabetes (41). Durch diesen insulinstimulatorischen Effekt der FFAs kann die FFA-induzierte Insulinresistenz meist vollständig kompensiert werden, so dass es bei den meisten übergewichtigen Patienten mit Insulinresistenz nicht zwangsläufig zu erhöhten Blutzuckerwerten oder zur Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 kommen muss (41). Wenn jedoch weitere Faktoren hinzukommen, die die Insulinsensitivität vermindern können, scheinen die FFAs einen wichtigen Pathomechanismus bei der Entstehung der IR und damit auch des Typ 2 Diabetes darzustellen. So kann durch Senkung erhöhter FFA-Spiegel eine Normalisierung der Insulinsensitivität bei adipösen Nichtdiabetikern und eine Verbesserung der Insulinsensitivität bei adipösen Typ 2 Diabetikern erreicht werden (41). Freie Fettsäuren im Plasma korrelieren negativ mit der Insulinsensitivität und der Glukosetoleranz bei Patientinnen mit PCOS, was eine entscheidende Bedeutung der FFAs auch bei diesem Krankheitsbild nahe legt (55).

Sowohl die Hyperinsulinämie als auch die IR, die hier durch die freien Fettsäuren erzeugt werden könnten, wären potentielle Kandidaten, die zu einer Hyperandrogenämie unter LHI beitragen könnten, da Insulin wie bereits schon erwähnt über verschiedene Mechanismen ein Anstieg der Androgene bewirken kann. Insulin stieg aber erst zwei Stunden nach Erhöhung der freien Fettsäuren, während hingegen einige Androgenvorstufen und Androgene schon eine Stunde nach Beginn der LHI signifikant erhöht waren. Somit ist es eher unwahrscheinlich, dass hier die Hyperinsulinämie zur Androgenerhöhung geführt hat. Zudem wird eine durch freie Fettsäuren induzierte periphere Insulinresistenz nicht vor drei Stunden nach Beginn der LHI beobachtet (90,60). Daher scheint auch hier die Insulinresistenz nicht auslösend für die Hyperandrogenämie unter LHI zu sein. Bei der vorangegangenen Studie mit jungen gesunden schlanken Männern im gleichen Design kam es interessanterweise zu keinem Zeitpunkt zu einem Unterschied in den

Insulinspiegeln zwischen beiden Infusionen, aber zu einem deutlichen Anstieg der Androgenvorstufen Androstendion, DHEA und DHEAS nach zwei Stunden LHI im Vergleich zur NHI (61). Somit scheint die durch LHI induzierte Erhöhung der Androgene unabhängig von einer möglichen nachfolgend induzierten peripheren Insulinresistenz oder Hyperinsulinämie zu sein. Dennoch ist eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Insulin nicht ganz auszuschließen, zudem unumstritten ist, dass Insulin eine Erhöhung der Androgene bewirken kann. Diese Effekte werden aber bekanntermaßen durch eine Steigerung der Androgensekretion induziert (35,49).

Erhöhte freie Fettsäuren finden sich neben Patienten mit Übergewicht (41,91,90) und Patienten mit Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 (92) auch bei Patientinnen mit Polyzystischem Ovarialsyndrom (PCOS) (55). Die LHI führte in dieser Studie neben der Erhöhung freier Fettsäuren auch zur Erhöhung von Triglyceriden. Beide sind in Rahmen des PCOS erhöht und somit beide pathophysiologisch relevant (55,3). Ob nun eher die freien Fettsäuren oder die Triglyceride hauptverantwortlich für die erzielten Effekte auf die Androgenspiegel sind, lässt sich nicht eindeutig unterscheiden. Die Infusion einer LHI ist aber ein etabliertes Verfahren zur Evaluation von Effekten erhöhter freier Fettsäuren (87). Ein leichter Anstieg freier Fettsäuren zeigte sich auch unter der NHI. Dies ist in erster Linie auf den durch Heparin induzierten stimulatorischen Effekt auf die Lipolyse zurückzuführen. Dabei spielt aber wahrscheinlich auch die verminderte Insulinwirkung durch die fehlende Nahrungszufuhr eine Rolle. Dadurch kommt es zum Wegfall der hemmenden Insulinwirkung auf die Lipolyse und damit zur vermehrten Freisetzung von freien Fettsäuren ins Blut. Wenn auch vor allem die freien Fettsäuren und die Triglyceride für den Androgenanstieg im Serum verantwortlich gemacht werden, kann es nicht völlig ausgeschlossen werden, dass eventuell auch andere Komponenten der LHI am Anstieg der Androgene beteiligt waren. So enthält die verwendete Lipidlösung Lipovenös® auch Lecithin und Glycerol. Letzteres stieg zudem bedingt durch die Induktion der Lipolyse durch Heparin an, was sich auch unter der NHI zeigte. So wäre es möglich, dass sowohl Lecithin als auch Glycerol direkte Effekte auf den Androgenanstieg im Serum haben könnten, allerdings existieren dazu bisher keine Daten. Zuletzt sollte festgehalten werden, dass die LHI induzierten Anstiege der Lipide sehr ausgeprägt sind und somit nicht direkt auf die Situation bei Patientinnen mit PCOS übertragen werden können.

Zusammenfassend zeigt diese randomisierte kontrollierte Studie, dass eine experimentelle Erhöhung der Lipide zu einem Anstieg von zirkulierenden Androgenen und Androgenvorstufen führt. Gleichzeitig kommt es zu einer verminderten Ausscheidung von Androgenvorstufen. Dieser Mechanismus könnte an der Entstehung der Hyperandrogenämie bei Patientinnen mit PCOS beteiligt sein.

Insgesamt könnten die hier gewonnen Ergebnisse neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen. So könnte beispielsweise durch eine medikamentöse Absenkung der FFAs und der Triglyceride, zum Beispiel durch Acipimox oder durch diätische Maßnahmen versucht werden, eine Absenkung der Androgenspiegel und damit eine Verbesserung der klinischen Symptomatik zu erreichen. Weitere Studien sind wünschenswert, zum einem um den genauen Pathomechanismus der verminderten Ausscheidung der Androgenvorstufen durch freie Fettsäuren aufzuklären und zum anderen um zu belegen, dass PCOS-Patientinnen mit erhöhten freien Fettsäuren auch von einer spezifischen FFA-senkenden Therapie profitieren.

## 5. Zusammenfassung

Mit dieser randomisierten, kontrollierten Studie konnte erstmalig bei Frauen gezeigt werden, dass der Anstieg freier Fettsäuren und Triglyceride im Serum, induziert durch eine Lipid/Heparin-Infusion (LHI), verbunden war mit einem Anstieg der Androgenvorstufen DHEA, DHEAS und Androstendion, der Androgene Testosteron und DHT und der Östrogene Östron und Östradiol. Somit konnte auch bei Frauen nachgewiesen werden, dass durch eine LHI eine Hyperandrogenämie erzeugt werden kann. Gleichzeitig konnte ein möglicher Pathomechanismus für diese Veränderungen dargestellt werden. Der Androgenanstieg im Serum war mit einer Abnahme der renalen Ausscheidung von DHEA und DHEAS und deren Metaboliten verbunden, während Androstendion und seine Metaboliten keiner veränderten Ausscheidung unterlagen. Dieser Prozess könnte wesentlich zur DHEA-Erhöhung im Serum beigetragen haben, was nachfolgend zum Anstieg der Androgen und Östrogene geführt haben dürfte. Es gibt verschiedene Hypothesen, wie es zur verminderten Androgenausscheidung gekommen sein könnte. So könnte es einerseits zu einer durch freie Fettsäuren induzierten verstärkten Bindung von DHEA und DHEAS an Albumin gekommen sein, woraus eine verminderte metabolische Clearance rate resultieren würde mit nachfolgendem Anstieg von DHEA und DHEAS im Serum. Andererseits könnte aber auch ein lokaler Effekt an den Nieren, induziert durch die freien Fettsäuren, für die verminderte Ausscheidung der Androgenvorstufen verantwortlich sein. Aber auch eine gesteigerte Sekretion der Androgene aus der NNR durch die freien Fettsäuren kann nicht ausgeschlossen werden. Eine Hyperinsulinämie oder Insulinresistenz als Ursache für die Androgenerhöhung im Serum konnte weitgehend ausgeschlossen werden, da ein Anstieg der Insulin-Spiegel erst nach dem Anstieg der meisten Androgenvorstufen und Androgene erfolgte. Eine Insulinresistenz ereignet sich bekanntermaßen erst nach drei Stunden nach Erhöhung freier Fettsäuren, wobei in dieser Studie der Androgenanstieg schon nach ein bis zwei Stunden zu detektieren war. Auch eine verstärkte zentrale Stimulation als Ursache für die Androgenerhöhung konnte weitestgehend ausgeschlossen werden, da sich nahezu keine Veränderungen bei ACTH, LH und FSH ergaben. Weiterhin konnte keine Induktion von Schlüsselenzymen für die Androgenbiosynthese, wie zum Beispiel für die 17 $\alpha$ -Hydroxylase oder für die 17,20-Lyase, festgestellt werden. Auch eine veränderte Aktivität der DHEA-Sulfotransferase, die ebenfalls zur Androgenerhöhung beitragen könnte, konnte nicht beobachtet werden. Ebenso zeigte sich keine

veränderte periphere Metabolisierung, die 5 $\alpha$ -Reduktase-Aktivität blieb weitestgehend konstant während beider Infusionen. Eine Erhöhung der Androgenspiegel durch veränderte SHBG-Spiegel ließ sich ebenfalls nicht demonstrieren. Weitere Studien sind aber notwendig um den genauen Mechanismus hinter den hier aufgezeigten Veränderungen aufzuklären.

Insgesamt stellt die verminderte Androgenausscheidung einen zuvor noch nicht beschriebenen Pathomechanismus für die Androgenerhöhung im Serum dar, der im Rahmen von Erkrankungen mit Hyperandrogenämie, wie z.B. dem Polyzystischen Ovarialsyndrom, einen wesentlichen Beitrag zur Erhöhung der Androgenspiegel leisten könnte. In der Tat sind auch bei Frauen mit einem PCOS die freien Fettsäuren oft erhöht, was eine pathophysiologische Relevanz zumindest möglich erscheinen lässt. Aufgrund dieser neuen Ergebnisse könnten sich neue Therapiekonzepte für die Behandlung der Hyperandrogenämie bei diesem Krankheitsbild ergeben.

## 6. Literaturverzeichnis

- (1) Barbieri R, Ehrmann D. Clinical manifestations of polycystic ovary syndrome in adults. UpToDate 2007 August.
- (2) Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004 January;81(1):19-25.
- (3) Schöfl C, Schill T, Geithövel F, Brabant G. Polyzystisches Ovarialsyndrom und Insulinresistenz. *Dtsch Arztebl* 2004 Februar; 101: A 346-351 [Heft 6].
- (4) Rosenfield R. Clinical features and diagnosis of polycystic ovary syndrome in adolescents. UpToDate 2007 August.
- (5) Ludwig M, Binder H, Beckmann MW, Schulte HM. Hyperandrogenämie – Teil 1. *Geburtsh Frauenheilk* 2004; 64: R 157-R 196.
- (6) Jakubowicz DJ, Nestler JE. 17 alpha-Hydroxyprogesterone responses to leuprolide and serum androgens in obese women with and without polycystic ovary syndrome offer dietary weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 February;82(2):556-60.
- (7) Fassnacht M, Schlenz N, Schneider SB et al. Beyond adrenal and ovarian androgen generation: Increased peripheral 5 alpha-reductase activity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 June;88(6):2760-6.
- (8) Burger HG. Androgen production in women. *Fertil Steril* 2002 April;77 Suppl 4:S3-S5.
- (9) Longcope C. Adrenal and gonadal androgen secretion in normal females. *Clin Endocrinol Metab* 1986 May;15(2):213-28.
- (10) Ghayee HK, Auchus RJ. Clinical implications of androgen synthesis via 5alpha-reduced precursors. *Endocr Dev* 2008;13:55-66.
- (11) Luu-The V, Ferraris C, Duche D et al. Steroid metabolism and profile of steroidogenic gene expression in Episkin: high similarity with human epidermis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007 October;107(1-2):30-6.
- (12) Kovacs W. Metabolism of adrenal steroids. UpToDate 2007 August.
- (13) Barbieri R. Steroid hormone metabolism in polycystic ovary syndrome. UpToDate 2007 August.

- (14) Schuring AN, Gromoll J, Sonntag B, Kiesel L, Nieschlag E, Greb RR. A polymorphism in the androgen-receptor gene (CAG-repeats) is associated with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Fertil Steril* 2004; 82: S4–S5.
- (15) Gueorguiev M, Prendergast K, Heras-Herzig A, Dalkin A. GNRH-Gonadotrophin Physiology and Pathology. In: <http://www.endotext.org>, Grossman A, (ed.), published by MDTEXT.COM, South Dartmouth, MA 2002.
- (16) Bell ET, Christie DW. Gonadotrophin and steroid interrelationships during the normal menstrual cycle. *Steroidologia* 1970;1(3):152-74.
- (17) Schmidt R, Lang F, Heckmann M. 2007: Physiologie des Menschen. 30. Aufl., Springer-Verlag, 1030 S.
- (18) Provencher PH, Tremblay Y, Fiet J, Belanger A. Effect of ACTH on steroidogenic enzymes in guinea pig fasciculata-glomerulosa cells: changes in activity and mRNA levels. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992 January;41(1):59-67.
- (19) Spinass G, Fischli S. 2001: Endokrinologie und Stoffwechsel. Thieme Verlag, 133 S.
- (20) Labrie F, Luu-The V, Labrie C et al. Intracrinology and the skin. *Horm Res* 2000;54(5-6):218-29.
- (21) Chen D, Reierstad S, Lu M et al. Regulation of breast cancer-associated aromatase promoters. *Cancer Lett* 2009 January 8;273(1):15-27.
- (22) Müller S. 2003: Molekulargenetische, endokrinologische und klinische Untersuchungen bei Patientinnen mit Polyzystischem Ovar Syndrom und Ovariellem Überstimulationssyndrom. Dissertation Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin, 103 S.
- (23) Schmidt-Matthiesen H, Wallwiener D. 2007: Gynäkologie und Geburtshilfe. 10 Aufl., Schattauer-Verlag, 566 S.
- (24) Zeginiadou T, Koliass S, Kouretas D, Antonoglou O. Nonlinear binding of sex steroids to albumin and sex hormone binding globulin. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1997 July;22(3):229-35.
- (25) Azziz R. Androgen excess is the key element in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2003 August;80(2):252-4.
- (26) Legro RS, Driscoll D, Strauss JF, III et al. Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 December 8;95(25):14956-60.
- (27) Nussey SS, Whitehead SA. *Endocrinology: An Integrated Approach. Transport, metabolism and actions of androgens.* BIOS Scientific Publishers, Ltd; 2001; Oxford, UK.

- (28) Nelson VL, Legro RS, Strauss JF, III, McAllister JM. Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries. *Mol Endocrinol* 1999 June;13(6):946-57.
- (29) Azziz R, Black V, Hines GA et al. Adrenal androgen excess in the polycystic ovary syndrome: sensitivity and responsivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 July;83(7):2317-23.
- (30) Azziz R, Black VY, Knochenhauer ES et al. Ovulation after glucocorticoid suppression of adrenal androgens in the polycystic ovary syndrome is not predicted by the basal dehydroepiandrosterone sulfate level. *J Clin Endocrinol Metab* 1999 March;84(3):946-50.
- (31) Gonzalez F. Adrenal involvement in polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Endocrinol* 1997 May;15(2):137-57.
- (32) Sahin Y, Kelestimur F. 17-Hydroxyprogesterone responses to gonadotrophin-releasing hormone agonist buserelin and adrenocorticotrophin in polycystic ovary syndrome: investigation of adrenal and ovarian cytochrome P450c17alpha dysregulation. *Hum Reprod* 1997 May;12(5):910-3.
- (33) Moran C, Azziz R. The role of the adrenal cortex in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2001 March;28(1):63-75.
- (34) Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 1997 December;18(6):774-800.
- (35) Baillargeon JP, Nestler JE. Commentary: polycystic ovary syndrome: a syndrome of ovarian hypersensitivity to insulin? *J Clin Endocrinol Metab* 2006 January;91(1):22-4.
- (36) Velazquez EM, Mendoza S, Hamer T et al. Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy. *Metabolism* 1994 May;43(5):647-54.
- (37) Glueck CJ, Papanna R, Wang P et al. Incidence and treatment of metabolic syndrome in newly referred women with confirmed polycystic ovarian syndrome. *Metabolism* 2003 July;52(7):908-15.
- (38) 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 April;86(4):1626-32.
- (39) Nestler JE, Barlascini CO, Matt DW et al. Suppression of serum insulin by diazoxide reduces serum testosterone levels in obese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1989 June;68(6):1027-32.



- 
- (40) Poretsky L. Commentary: Polycystic ovary syndrome--increased or preserved ovarian sensitivity to insulin? *J Clin Endocrinol Metab* 2006 August;91(8):2859-60.
- (41) Boden G. Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2003 May;111(3):121-4.
- (42) Dunaif A, Xia J, Book CB et al. Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest* 1995 August;96(2):801-10.
- (43) Morin-Papunen LC, Vauhkonen I, Koivunen RM et al. Insulin sensitivity, insulin secretion, and metabolic and hormonal parameters in healthy women and women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 2000 June;15(6):1266-74.
- (44) Poretsky L, Smith D, Seibel M et al. Specific insulin binding sites in human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1984 October;59(4):809-11.
- (45) Poretsky L, Piper B. Insulin resistance, hypersecretion of LH, and a dual-defect hypothesis for the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol* 1994 October;84(4):613-21.
- (46) Barbieri RL, Makris A, Randall RW et al. Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of ovarian stroma obtained from women with hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 1986 May;62(5):904-10.
- (47) Cara JF, Rosenfield RL. Insulin-like growth factor I and insulin potentiate luteinizing hormone-induced androgen synthesis by rat ovarian thecal-interstitial cells. *Endocrinology* 1988 August;123(2):733-9.
- (48) 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 December;82(12):4075-9.
- (49) Lanzone A, Fulghesu AM, Guido M et al. Differential androgen response to adrenocorticotrophic hormone stimulation in polycystic ovarian syndrome: relationship with insulin secretion. *Fertil Steril* 1992 August;58(2):296-301.
- (50) Arslanian SA, Lewy V, Danadian K, Saad R. Metformin therapy in obese adolescents with polycystic ovary syndrome and impaired glucose tolerance: amelioration of exaggerated adrenal response to adrenocorticotropin with reduction of insulinemia/insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 April;87(4):1555-9.
- (51) Azziz R, Ehrmann DA, Legro RS et al. Troglitazone decreases adrenal androgen levels in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2003 April;79(4):932-7.
- (52) Brennan K, Huang A, Azziz R. Dehydroepiandrosterone sulfate and insulin resistance in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2008 April 24.

- (53) Guido M, Romualdi D, Suriano R et al. Effect of pioglitazone treatment on the adrenal androgen response to corticotrophin in obese patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2004 March;19(3):534-9.
- (54) Buffington CK, Givens JR, Kitabchi AE. Enhanced adrenocortical activity as a contributing factor to diabetes in hyperandrogenic women. *Metabolism* 1994 May;43(5):584-90.
- (55) 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 October;41(4):463-71.
- (56) Abbasi F, Lima NK, Reaven GM. Relationship between changes in insulin sensitivity and associated cardiovascular disease risk factors in thiazolidinedione-treated, insulin-resistant, nondiabetic individuals: pioglitazone versus rosiglitazone. *Metabolism* 2009 March;58(3):373-8.
- (57) Wang C, Catlin DH, Starcevic B et al. Low-fat high-fiber diet decreased serum and urine androgens in men. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 June;90(6):3550-9.
- (58) 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 December;64(6):850-5.
- (59) Hill P, Wynder EL, Garbaczewski L et al. Diet and urinary steroids in black and white North American men and black South African men. *Cancer Res* 1979 December;39(12):5101-5.
- (60) Boden G, Jadali F, White J et al. Effects of fat on insulin-stimulated carbohydrate metabolism in normal men. *J Clin Invest* 1991 September;88(3):960-6.
- (61) Mai K, Bobbert T, Kullmann V et al. Free fatty acids increase androgen precursors in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 2006 April;91(4):1501-7.
- (62) Du BD, Du Bois EF. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. 1916. *Nutrition* 1989 September;5(5):303-11.
- (63) Renteria SC. Übermäßige Behaarung –nur ein ästhetisches Problem? Relevanz, Diagnostik und Therapie des Hirsutismus bei jungen Mädchen. *Pädiatrie* 2006 Januar; 26-28.
- (64) Schober O, Schicha H. 2007: Nuklearmedizin: Basiswissen und klinische Anwendung. 6. Aufl., Schattauer Verlag, 398 S.

- (65) Mai K, Bobbert T, Reinecke F et al. Intravenous lipid and heparin infusion-induced elevation in free fatty acids and triglycerides modifies circulating androgen levels in women: a randomized, controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 October;93(10):3900-6.
- (66) Remer T, Boye KR, Hartmann MF, Wudy SA. Urinary markers of adrenarche: reference values in healthy subjects, aged 3-18 years. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 April;90(4):2015-21.
- (67) 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 June;84(6):2170-6.
- (68) 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 June;83(6):1928-34.
- (69) Sonka J, Fassati M, Fassati P et al. Serum lipids and dehydroepiandrosterone excretion in normal subjects. *J Lipid Res* 1968 November;9(6):769-72.
- (70) Metcalf MG. Effect of age, obesity, starvation, and changes in adrenocortical and ovarian activity on the urinary excretion of dehydroepiandrosterone relative to androsterone plus etiocholanolone: relevance to the measurement of breast cancer discriminants in women. *Clin Biochem* 1974 June;7(2):119-30.
- (71) Hendriks A, Heyns W, De MP. Influence of a low-calorie diet and fasting on the metabolism of dehydroepiandrosterone sulfate in adult obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1968 November;28(11):1525-33.
- (72) Lopez S, Wingo C, Hebert JA. Total serum cholesterol and urinary dehydroepiandrosterone in humans. *Atherosclerosis* 1976 September;24(3):471-81.
- (73) Tsilchorozidou T, Honour JW, Conway GS. Altered cortisol metabolism in polycystic ovary syndrome: insulin enhances 5 $\alpha$ -reduction but not the elevated adrenal steroid production rates. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 December;88(12):5907-13.
- (74) Nestler JE, Kahwash Z. Sex-specific action of insulin to acutely increase the metabolic clearance rate of dehydroepiandrosterone in humans. *J Clin Invest* 1994 October;94(4):1484-9.
- (75) Nestler JE, Usiskin KS, Barlascini CO et al. Suppression of serum dehydroepiandrosterone sulfate levels by insulin: an evaluation of possible mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab* 1989 November;69(5):1040-6.

- 
- (76) Remer T. Letter re: Free Fatty Acids and Androgen Precursors in Vivo. Electronic letters published 2006 May.
- (77) Spector AA. Fatty acid binding to plasma albumin. *J Lipid Res* 1975 May;16(3):165-79.
- (78) Ryan MT, Chopra RK. The paradoxical effect of fatty acid on steroid-albumin interaction. *Biochim Biophys Acta* 1976 March 18;427(1):337-49.
- (79) Watanabe S, Sato T. Effects of free fatty acids on the binding of bovine and human serum albumin with steroid hormones. *Biochim Biophys Acta* 1996 April 17;1289(3):385-96.
- (80) Mooradian AD, Pamplona DM, Viosca SP, Korenman SG. Effect of free fatty acids on the bioavailability of plasma testosterone and dihydrotestosterone. *J Steroid Biochem* 1988 March;29(3):369-70.
- (81) Reed MJ, Dunkley SA, Singh A et al. The role of free fatty acids in regulating the tissue availability and synthesis of sex steroids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1993 January;48(1):111-6.
- (82) Casanueva FF, Villanueva L, Dieguez C et al. Free fatty acids block growth hormone (GH) releasing hormone-stimulated GH secretion in man directly at the pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* 1987 October;65(4):634-42.
- (83) Alvarez CV, Mallo F, Burguera B et al. Evidence for a direct pituitary inhibition by free fatty acids of in vivo growth hormone responses to growth hormone-releasing hormone in the rat. *Neuroendocrinology* 1991 February;53(2):185-9.
- (84) Ciampelli M, Muzj G, Leoni F et al. Metabolic and endocrine consequences of acute suppression of FFAs by acipimox in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 November;86(11):5324-9.
- (85) Senaris RM, Lewis MD, Lago F et al. Effects of free fatty acids on somatostatin secretion, content and mRNA levels in cortical and hypothalamic fetal rat neurones in monolayer culture. *J Mol Endocrinol* 1993 April;10(2):207-14.
- (86) Kasim-Karakas SE, Almario RU, Gregory L et al. Metabolic and endocrine effects of a polyunsaturated fatty acid-rich diet in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 February;89(2):615-20.
- (87) Roden M, Price TB, Perseghin G et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 1996 June 15;97(12):2859-65.
- (88) Boden G, Cheung P, Stein TP et al. FFA cause hepatic insulin resistance by inhibiting insulin suppression of glycogenolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002 July;283(1):E12-E19.

- (89) Boden G, Chen X, Ruiz J et al. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest* 1994 June;93(6):2438-46.
- (90) Boden G. Free fatty acids-the link between obesity and insulin resistance. *Endocr Pract* 2001 January;7(1):44-51.
- (91) Lam TK, Carpentier A, Lewis GF et al. Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003 May;284(5):E863-E873.
- (92) McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002 January;51(1):7-18.

---

# Danksagung

Für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit und die zuverlässige Betreuung möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. J. Spranger bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. A.F. H. Pfeiffer bedanken für die Möglichkeit der Forschungstätigkeit in seiner Abteilung für Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin Charité Campus Benjamin Franklin.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. K. Mai für die hervorragende Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft, zahlreiche Ideen und sorgfältige Überarbeitung sowie für die konzeptionelle Unterstützung dieser Doktorarbeit. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. T. Bobbert für die aufmerksame Betreuung und Unterstützung bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. rer.nat. J. Andres und bei Frau P. Exner für die umfangreiche Unterstützung bei den Laborarbeiten.

Ein sehr herzlicher Dank gilt auch meinen Eltern, meinem Bruder und Stoyan Karaivanov, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zum Schluss sind noch alle freiwilligen Probanden zu erwähnen, ohne die die Durchführung der Studie nicht möglich gewesen wäre.