

CORTISOL EN VETWEEFSEL

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE
GENEESKUNDE

AAN DE ERASMUS UNIVERSITEIT TE ROTTERDAM

OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS

PROF. DR. P.W. KLEIN

EN VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN DEKANEN.

DE OPENBARE VERDEDIGING ZAL PLAATS VINDEN OP

WOENSDAG 26 MAART 1975 DES NAMIDDAGS

TE 4.15 UUR PRECIES

DOOR

STEVEN WILLEM JAN LAMBERTS

GEBOREN TE ROTTERDAM

1975

BRONDER-OFFSET B.V. – ROTTERDAM

Promotor : Prof. Dr. J.C. Birkenhäger
Co-referenten : Prof. Dr. W.C. Hülsmann
Dr. J. Fernandes

Voor Joke, Daniëlle
en mijn ouders

INHOUD

Hoofdstuk I	
Inleiding en Vraagstelling	11
Hoofdstuk II	
De invloed van glucocorticoïed hormoon op de lipolyse van het epididymale vetweefsel van de rat in vitro	
1. Literatuurgegevens	14
2. Vraagstelling van het onderzoek	19
3. Methodiek incubatie van geïsoleerde vetcellen	20
4. Onderzoek en bespreking van de gevolgde methoden	23
5. Resultaten inzake de invloed van een overmaat glucocorticoïed hormoon in vitro en in vivo op de basale resp. met adrenaline en/of glucagon gestimuleerde lipolyse	
A. Voorbehandeling van vetweefsel met dexamethason in vitro	36
B. Voorbehandeling van ratten met een hoge dosis cortisonacetaat subcutaan	38
C. a. Voorbehandeling van ratten met cortisol in een dosering van 4-5 mg per kg lichaamsgewicht gedurende 14 dagen	40
b. Vergelijkende studie met glucagon en adrenaline	41
6. Discussie	44
7. Conclusies	46
Hoofdstuk III	
De lokalisatie van het effect van glucocorticoïed hormoon op de lipolyse in de vetcel van de rat	
1. Inleiding	47

2. Literatuur	48
3. Vraagstelling en opzet onderzoek	50
4. A. De invloed van maximale concentraties dibutyryl-cAMP en theofylline op de lipolyse in geïsoleerde vetcellen van controle ratten en met cortisol behandelde dieren.	52
B. Oefent glucocorticoïed hormoon invloed uit op de receptoren van de vetcel voor adrenaline en glucagon en/of op het adenylaat cyclase?	
a. De "maximale" adenylaat cyclase-aktiviteit onder invloed van de combinatie van adrenaline en glucagon	56
b. De meting van de adenylaat cyclase-aktiviteit	57
C. Meting van de fosfodiësterase-aktiviteit	62
a. Meting "totale" PDE-aktiviteit	63
b. Kinetische experimenten PDE-aktiviteit	64
D. De intracellulaire concentratie cAMP	72
E. Meting van de proteïne kinase-aktiviteit	77
5. Samenvatting	83
6. Conclusies	86

Hoofdstuk IV

De invloed van cortisol op de lichaamssamenstelling en het vetcelaantal van het epididymale vetkwabje van de groeiende en jong-volwassen rat

1. Literatuurgegevens	88
2. Vraagstelling	90
3. De keuze van de methodiek voor de bepaling van het vetcelaantal	91
4. Uitvoering tellingen	93
5. Proefopstelling	96
6. Resultaten	97
A. De invloed van de toediening van cortisol (4 à 5 mg per kg lichaamsgewicht per dag) toegediend via het drinkwater gedurende 14 dagen	97
B. De invloed van de toediening van cortisonacetaat (25-30 mg per kg lichaamsgewicht per dag) subcutaan gedurende 14 dagen aan ca. 7 weken oude ratten resp. aan groepen jongere ratten	98

7. Discussie	101
8. Conclusies	104
Hoofdstuk V	
De invloed van hypercortisolisme op de lichaamssamenstelling van de mens	
1. Inleiding	105
2. Vraagstelling onderzoek	106
3. Methoden ter bepaling van de lichaamssamenstelling	107
4. Uitvoering	110
5. Resultaten en Discussie	112
6. Conclusies	121
Hoofdstuk VI	
De meting van de snelheid van de "turnover" van de plasma-FFA bij patienten met het syndroom van Cushing	
1. Inleiding en vraagstelling	123
2. Methodiek	124
3. Discussie methodiek	127
4. Theoretische achtergrond en berekening van de snelheid van de "turnover" van de plasma-FFA	129
5. Resultaten	131
6. Discussie	134
7. Conclusie	138
8. Poging tot verklaring van de gevonden verschillen in snelheid van "turnover" van de plasma-FFA bij het syndroom van Cushing en exogene vetzucht.	138
Samenvatting	142
Summary	147
Appendix	151
Literatuurlijst	157

LIJST VAN GEBRUIKTE AFKORTINGEN

ACTH	: adrenocorticotroop hormoon
ADP	: adenosine-5'-di-fosfaat
AMP	: adenosine-5'-mono-fosfaat
ATP	: adenosine-5'-tri-fosfaat
cAMP	: cyclisch adenosine-3',5'-mono-fosfaat
cGMP	: cyclisch guanosine-3',5'-mono-fosfaat
db-cAMP	: N ⁶ -O ^{2'} -dibutyryl-cAMP
dpm	: desintegraties per minuut
EDTA	: ethyleendiaminetetraazijnzuur
FFA	: free fatty acids (vrije vetzuren)
g	: relatieve centrifugale kracht
K _m	: Michaelis constante
K _(m)	: "apparent" Michaelis constante
LBM	: lean body mass (vetvrije massa)
n	: aantal experimenten
p	: waarschijnlijkheid
PDE	: fosfodiësterase
pituit. dep. syndr. v. Cushing	: pituitary dependent syndroom van Cushing (M. Cushing)
PK	: proteïne kinase
S.D.	: standaard deviatie
TG	: triglyceriden
TSH	: thyreotroop hormoon
V _{max}	: maximale snelheid van de werking van het enzym
V _(max)	: "apparent" V _{max}

HOOFDSTUK I

Inleiding en vraagstelling

Cortisol heeft invloed op het vetweefsel van de mens. Hypercortisolisme leidt tot karakteristieke veranderingen in de verdeling van het lichaamsvet: er ontstaat een zogenaamde "romp-adipositas" met afname van de omvang van de perifere vetdepots. Een verklaring van het mechanisme dat hiertoe leidt is niet bekend. Onzeker is bovendien in hoeverre er bij de patient met het syndroom van Cushing met romp-adipositas in het algemeen een toename in de absolute hoeveelheid lichaamsvet optreedt of dat er slechts sprake is van een redistributie van het vet. Eveneens is niet onderzocht of de vetmassa in en op de romp is toegenomen door een toename van het vetcelaantal (hyperplasie), een toename van de gemiddelde grootte van de vetcellen (hypertrofie), of door een combinatie van deze beide mogelijkheden.

De aanwezigheid van een normale bijnierschorsfunctie is vereist voor het normaal optreden van de lipolyse in vetweefsel. Voorbehandeling van vetweefsel van de rat in vitro met een overmaat glucocorticoïed hormoon leidt tot een toename van de produktie van vetzuur; onzeker is of dit ook gepaard gaat met een toename van de produktie van glycerol. In dezelfde proefopstelling wordt in vetweefsel na voorbehandeling met hoge doseringen glucocorticoïed hormoon de door adrenaline gestimuleerde lipolyse gepotentieerd. Het werkingsmechanisme c.q. het aangrijpingspunt van glucocorticoïed hormoon in de vetcel dat deze potentiatie bewerkstelligt, is onbekend.

Bij patienten met vetzucht werd een toename in de snelheid van

de "turnover" van de plasma-FFA gevonden, vergeleken met controles (Birkenhäger en Tjabbes, 1969). Onbekend is hoe de snelheid van de lipolyse verloopt van patienten met chronisch hypercortisolisme, die evenals patienten met vetzucht een hyperinsulinisme vertonen. Op grond van het in vitro onderzoek van ratte-vetcellen en de zogenaamde "insuline-resistentie" zoals gevonden bij vetzucht, wordt in de literatuur aangenomen dat de lipolyse bij patienten met hypercortisolisme zal zijn toegenomen, zonder dat hieromtrent gegevens voorhanden zijn.

In dit proefschrift wordt langs een aantal wegen getracht een nauwkeuriger omschrijving van de invloed van cortisol op vetweefsel te vinden.

- A. In hoofdstuk II wordt na een literatuuroverzicht over de invloed van glucocorticoïed hormoon op vetweefsel in vitro eerst aandacht besteed aan de methodiek van de incubatie van geïsoleerde vetcellen volgens Rodbell (1964). Vooral het probleem van de uitdrukkingswijze van de produktie van glycerol en vetzuur wordt nader geanalyseerd aan de hand van de meting van vetcelaantal en distributie van de vetcelgrootte in de suspensie die na collagenase-behandeling wordt geïncubeerd. De volgende vraagstellingen worden onderzocht:
1. Heeft voorbehandeling van vetweefsel in vitro met een farmacologische dosering glucocorticoïed hormoon invloed op de basale, dat wil zeggen ongestimuleerde, produktie van glycerol?
 2. Wat is de invloed van deze overmaat glucocorticoïed hormoon op de reësterificatie van vetzuur door vetweefsel?
 3. Treedt de potentiëatie van de door adrenaline gestimuleerde lipolyse na voorbehandeling met glucocorticoïed hormoon ook op bij gebruik van een ander "lipolytisch" hormoon, bijvoorbeeld glucagon?
 4. Treedt de potentiëatie van de door adrenaline gestimuleerde lipolyse in vitro ook op na voorbehandeling van de rat met een hoge dosis cortisol in vivo?
- B. In hoofdstuk III wordt het mechanisme van de speciale positieve invloed van (een overmaat) glucocorticoïed hormoon op de bijvoorbeeld door adrenaline gestimuleerde lipolyse in de ratte-vet-

cel onderzocht. In aanwezigheid van maximaal stimulerende concentraties dibutyryl-cAMP en theofylline wordt de lipolyse in vetcellen van onbehandelde en met cortisol behandelde ratten bestudeerd. Vervolgens worden de adenylaat cyclase-activiteit, de fosfodiësterase-activiteit, de intracellulaire concentratie cAMP in de vetcel en de proteïne kinase-activiteit gemeten met het doel het aangrijpingspunt van cortisol in de lipolyse-cascade in de vetcel vast te stellen.

- C. Enkele aspecten van (mogelijke) veranderingen in de lichaams-samenstelling onder invloed van chronisch hypercortisolisme worden in hoofdstuk IV bij de rat en in hoofdstuk V bij de mens onderzocht. Achtereenvolgens wordt de invloed van toegediende hoge doseringen glucocorticoïed hormoon op de lichaamsgroei, het gewicht en het vetcelaantal van het epididymale vetkwabje van zeer jonge en jong-volwassen ratten onderzocht (hoofdstuk IV). De betekenis van een aantal indirecte methoden ter bepaling van de lichaamssamenstelling bij de mens met mogelijke foutenbronnen die kunnen optreden bij toepassing bij patiënten met het syndroom van Cushing, worden besproken in hoofdstuk V. De lichaamssamenstelling wordt berekend met de ^{40}K -methode (met de "totale lichaamsteller") en met de $^3\text{H}_2\text{O}$ -verdunningsmethode. Deze bepalingen worden verricht bij enkele patiënten met chronisch hypercortisolisme vóór en na behandeling (en normalisering van de bijnierschorsfunctie), teneinde een antwoord te krijgen op de vraag: is de absolute hoeveelheid lichaamsvet bij patiënten met chronisch hypercortisolisme toegenomen?
- D. In hoofdstuk VI wordt de snelheid van de "turnover" besproken van plasma-FFA, gemeten bij een aantal patiënten met het syndroom van Cushing met een continu-infusie van aan albumine gebonden palmitinezuur- ^{14}C . Deze snelheid wordt vergeleken met die bij controle personen, patiënten met exogene vetzucht en bij een aantal patiënten na behandeling van het syndroom van Cushing.

HOOFDSTUK II

De invloed van glucocorticoïed hormoon op de lipolyse van het epididymale vetweefsel van de rat in vitro

1. Literatuurgegevens

Shafir e.a. (1960a) toonden aan dat een door adrenaline in vivo opgewekte mobilisatie van FFA slechts optreedt in aanwezigheid van een intakte bijnierschorsfunctie. Behandeling van geadrenalectomeerde honden met cortison herstelde de mobilisatie van FFA onder invloed van adrenaline geheel. Toediening van cortison aan normale honden potentiëerde en verlengde de stijging van vrije vetzuren in het plasma na intraveneuze toediening van adrenaline. De rol van de bijnierschors bij de door adrenaline opgewekte lipolyse werd door Shafir e.a. (1960b) bevestigd met behulp van incubaties in vitro van epididymale vetkwabjes van geadrenalectomeerde ratten: deze vetkwabjes vertoonden een produktie van vetzuren die slechts de helft bedroeg van die van epididymaal vetweefsel van controle ratten; de toename van de produktie van vetzuren door de vetkwabjes na toediening van adrenaline in vivo, bleek aanzienlijk geringer na adrenalectomie dan die door vetweefsel van controle ratten. Soortgelijke gegevens werden door Reshef e.a. (1960) in een enigszins andere proefopstelling gevonden: ratten werden behandeld met cortison (10 mg per dag subcutaan gedurende 1 tot 7 dagen) en vervolgens werd de produktie van vetzuren door brokjes mesenteriaal vetweefsel in vitro gemeten. De behandeling met cortison in vivo had geen effect op de basale produktie van vetzuren, maar verhoogde en verlengde de

reactie van het vetweefsel op toevoeging van adrenaline aan het incubatie-mengsel. Vetweefsel van geadrenalectomeerde ratten produceerde te verwaarlozen hoeveelheden vetzuur, maar behandeling met cortison herstelde het normale patroon.

Deze waarnemingen waarbij voor een door adrenaline opgewekte lipolyse in vetweefsel cortisol c.q. een intakte bijnierschorsfunctie aanwezig bleek te moeten zijn, werden reeds eerder gedaan voor andere reacties van de stofwisseling. Ingle (1954) spreekt in dit verband van een "permissive action" van glucocorticoiden.

Het effect van de toevoeging van glucocorticoid hormoon aan een incubatie-mengsel met brokjes epididymaal vetweefsel van de rat werd gemeten door Jeanrenaud e.a. (1960). De produktie van vetzuur bleek onder invloed van suprafysiologische concentraties glucocorticoiden significant hoger dan die van controle vetweefselfragmenten. Deze toename was zowel met 3 als met 30 μg cortisol per ml incubatie-medium aantoonbaar. Er werd geen invloed van cortisol op de glucose-oxydatie of de lipogenese uit glucose of pyrodruivenzuur aangetoond. Een dergelijke waarneming werd wel gedaan door Leboeuf e.a. (1962): zij vonden in epididymale vetweefselfragmenten die onder dezelfde omstandigheden werden geïncubeerd als beschreven door Jeanrenaud e.a. (1960), onder invloed van 30 μg cortisol per ml een significante remming van de opname en oxydatie van glucose. Gelijktijdige toevoeging van insuline (0,1 E/ml) verminderde dit remmend effect.

Het gelijktijdig effect van cortisol in vitro op het vetzuur- en het glucose-metabolisme in vetweefsel van de rat werd bevestigd door Munck e.a. (1962) en Munck (1962) met concentraties glucocorticoid hormoon, zoals die in het plasma van het normale proefdier voorkomen.

Czech e.a. (1972) stelden vast dat de remming van het glucose-metabolisme door glucocorticoid hormoon in vetweefsel een gevolg is van een remming van het transport van glucose door de celmembranen. Bernstein e.a. (1973) vonden echter dat het aangrijpingspunt van glucocorticoid hormoon in het glucose-metabolisme van de vetcel gelokaliseerd is ter plaatse van de fosforylering: er bestaan twee iso-enzymen van hexokinase; het hexokinase II is in de vetcel van de rat het belangrijkste voor de fosforylering van glucose. Toediening van een farmacologische dosering dexamethason in vivo verminderde alleen de activiteit van het hexokinase II.

Een belangrijke bijdrage aan het onderzoek naar de werking van glucocorticoïed hormoon op de lipolyse werd geleverd door het werk van Fain en medewerkers (1963 en 1964). Zij wezen op het belang van de *duur* van de incubatie met glucocorticoiden: een incubatie gedurende 4½ uur met dexamethason in lage concentraties (0,0016-0,016 µg/ml) veroorzaakte in parametrische vetweefselfragmenten van de rat een toename van de produktie van vetzuur en een remming van de opname en utilisatie van glucose. Wanneer de incubatie met dexamethason slechts 2 uur duurde, werd geen effect waargenomen. Fain e.a. wezen er ook op dat de vetzuurproduktie onder invloed van dexamethason veel lager is dan die onder invloed van adrenaline en ACTH; verder bleken deze beide laatste hormonen het glucose-metabolisme binnen korte tijd te stimuleren in tegenstelling tot het later optredende, remmende effect van dexamethason. Een ander belangrijk verschil bleek te liggen in het gesuperponeerde effect van insuline (zie ook Mahler e.a., 1963). Een betrekkelijk lage concentratie (4 mE/ml) kan de door dexamethason veroorzaakte verhoging van de produktie van vetzuur geheel voorkomen; de stimulerende werking van adrenaline en ACTH werd echter veel minder geremd door deze concentratie insuline.

De netto-produktie van vetzuur door vetweefsel kan worden beschouwd als de resultante van tenminste twee tegengestelde processen: onder invloed van hormonen als adrenaline, ACTH en glucagon wordt het hormoon-gevoelige triglyceride lipase in de vetcel gestimuleerd, hetgeen leidt tot een splitsing van triglyceriden via di- en monoglyceriden tot glycerol en vetzuur; de binnen de vetcel vrijgekomen vetzuren worden echter voor een gedeelte weer gereësterificeerd tot triglyceriden met behulp van glycerol-3-fosfaat; insuline is hiervoor de belangrijkste stimulus (Vaughan e.a., 1965, Rizack, 1965). De verhoging van de produktie van vetzuur door vetweefsel kan een gevolg zijn van de stimulatie van de lipolyse, van een remming van de reësterificatie van vetzuur (Munck, 1962, 1971) of van een combinatie van beide.

Het effect van dexamethason op de produktie van vetzuur zowel als van glycerol werd door Fain e.a. (1965) onderzocht in met collagenase (volgens Rodbell, 1964) geïsoleerde vetcellen uit het epididymale vetkwabje van de rat. Gedurende een incubatie van 4 uur in de aanwezigheid van glucose, had dexamethason (0,011 µg/ml) geen effect op de produktie van vetzuur en glycerol in deze geïso-

leerde vetcellen. Runder-groeihormoon ($0,67 \mu\text{g/ml}$) stimuleerde zowel de produktie van vetzuur als van glycerol. Toevoeging van dexamethason potentiëerde de produktie van vetzuur én glycerol onder invloed van groeihormoon aanzienlijk. Het lipolytisch effect van de combinatie van groeihormoon en dexamethason werd slechts waargenomen wanneer het vetweefsel langer dan 2 uur met beide hormonen was geïncubeerd; het effect werd totaal geblokkeerd door toevoeging vooraf van puromycine of actinomycine D. Ook het effect van groeihormoon alleen op de produktie van vetzuur werd geblokkeerd door toevoeging van actinomycine D. In het onderzoek van Fain e.a. (1965) verschilde het effect van ACTH op de lipolyse in geïsoleerde vetcellen, gemeten aan de produktie van glycerol, wezenlijk van dat van de combinatie van groeihormoon en dexamethason: de verhoging van de glycerolproduktie trad onder invloed van ACTH binnen enkele minuten op en werd niet beïnvloed door toevoeging van puromycine en actinomycine D.

Fain e.a. (1966) vonden ook een verschillend gesuperponeerd effect van insuline op de produktie van vetzuur en glycerol door vetcellen onder invloed van groeihormoon met dexamethason resp. onder invloed van ACTH: met een zeer kleine hoeveelheid insuline (1 mE/ml) kon de verhoging van de produktie van vetzuur en glycerol onder invloed van de eerstgenoemde combinatie van hormonen worden voorkomen; insuline verminderde de door ACTH opgewekte lipolyse veel minder en dan ook nog alleen in hogere concentraties.

De invloed van dexamethason op de lipolyse en op de reësterificatie werd onderzocht door Jeanrenaud (1967): de basale lipolyse in epididymaal vetweefsel van de rat, gemeten aan de produktie van glycerol, bleek gedurende een 4-uurs incubatie met $0,1 \mu\text{g}$ dexamethason per ml significant te zijn toegenomen. Met lagere concentraties dexamethason ($0,01$ en $0,001 \mu\text{g/ml}$) kon noch in vetweefsel noch in geïsoleerde vetcellen een toename van de basale lipolyse worden aangetoond. Aan vetcelsuspensies werden geen hogere concentraties dexamethason toegevoegd. De produktie van vetzuur bleek onder invloed van de diverse concentraties dexamethason zowel in vetweefsel als in geïsoleerde vetcellen significant te zijn toegenomen. "Fysiologische" en hogere concentraties dexamethason brachten een remming van de reësterificatie van vetzuur teweeg, terwijl alleen met zeer hoge concentraties dexamethason in vetweefsel ook een werkelijke toename van de lipolyse werd aangetoond. Yorke (1967) vond

in fragmenten epididymaal vetweefsel die gedurende 4 uur werden geïncubeerd met dexamethason in een concentratie van 0,004 $\mu\text{g}/\text{ml}$ geen toename van de produktie van glycerol. Ook Goodman (1970) vond geen toename van de produktie van glycerol gedurende een incubatie van 3 uur van epididymale vetweefselfragmenten met 0,016 μg dexamethason per ml incubatie-medium. Hij vond wel een potentiëring van de door adrenaline geïnduceerde toename van de produktie van glycerol door vóórincubatie met dexamethason. Een remming van de reësterificatie van vetzuur tijdens de door adrenaline geïnduceerde lipolyse in vetweefselfragmenten werd na deze vóórincubatie niet gevonden. Ook Goodman vond dat de vóórincubatie met dexamethason tenminste 2 uur diende te duren vóór het potentiërend effect op de door adrenaline gestimuleerde lipolyse aantoonbaar was.

Samenvatting literatuurgegevens

1. Een intacte bijnierschorsfunctie is noodzakelijk voor een normale reactie van de lipolyse in vetweefsel op adrenaline. Ingle (1954) noemt dit het "permissive" effect van glucocorticoïed hormoon.
2. Glucocorticoïed hormoon veroorzaakt in vitro een remming van de opname van glucose en van de lipogenese uit glucose in vetweefsel. Via een lager aanbod van glycerol-3-fosfaat leidt dit tot een remming van de reësterificatie van vetzuren en daardoor tot een hogere netto-produktie van vetzuur door vetweefsel.
3. Met zowel fysiologische als farmacologische concentraties glucocorticoïed hormoon wordt in het algemeen geen verhoging van de basale lipolyse gevonden (gemeten aan de produktie van glycerol). Jeanrenaud (1967) vond met 0,1 μg dexamethason per ml incubatie-medium wel een verhoging van de basale lipolyse in epididymale vetweefselfragmenten.
4. De door adrenaline geïnduceerde lipolyse, gemeten aan de produktie van glycerol, wordt in epididymale vetweefselfragmenten van de rat en in geïsoleerde vetcellen van dezelfde herkomst gepotentiëerd na vóórincubatie met een suprafysiologische concentratie glucocorticoïed hormoon.
5. Om dit potentiërend effect op de door adrenaline geïnduceerde lipolyse aan te tonen moet men het vetweefsel tevoren steeds

- langer dan 2 uur met glucocorticoïed hormoon incuberen; het effect van glucocorticoïed hormoon op de produktie van glycerol en vetzuur treedt niet op wanneer men gedurende de vóórincubatie een remmer van de RNA- of van de eiwit-synthese toevoegt.
6. Fysiologische concentraties insuline kunnen het direkte effect van hoge doseringen glucocorticoïed hormoon op de produktie van vetzuur en op het metabolisme van glucose in het vetweefsel in vitro te niet doen.
 7. De werking van "lipolytische" hormonen als adrenaline, ACTH en glucagon verschilt op enkele punten van die van suprafysiologische concentraties glucocorticoïed hormoon op het vetweefsel van de rat in vitro: onder invloed van de "lipolytische" hormonen wordt een snel optredende lipolyse gevonden. De produktie van glycerol onder invloed van de "lipolytische" hormonen wordt door insuline veel minder sterk geremd dan de produktie van vetzuur onder invloed van glucocorticoïed hormoon alleen. Tenslotte bleek de lipolytische werking van adrenaline niet direkt te worden beïnvloed door de toevoeging van RNA- en eiwit-synthese-remmers.

2. Vraagstelling van het onderzoek

1. Uit het voorgaande literatuuroverzicht blijkt dat niet vaststaat of de basale lipolyse van ratte-vetcellen blootgesteld aan een suprafysiologische concentratie glucocorticoïed hormoon, toeneemt; dit wordt nader onderzocht.
2. Herhaaldelijk is een potentiëring onder invloed van glucocorticoïed hormoon van de stimulatie van de lipolyse door adrenaline gevonden. Niet steeds werd daarbij gebruik gemaakt van concentraties adrenaline die de lipolyse maximaal stimuleren. Wij hebben daarom nogmaals het potentiërend effect van glucocorticoïed hormoon nagegaan, thans echter met maximaal stimulerende adrenaline-concentraties. Bovendien wordt nagegaan of de potentiëring door glucocorticoïed hormoon ook met glucagon, toegepast in maximaal stimulerende concentratie, aantoonbaar is.
3. Onbekend is of de genoemde effecten op de lipolyse na vóórincubatie van vetweefsel in vitro met glucocorticoïed hormoon ook

aantoonbaar zijn in vetweefsel van ratten die in vivo hypercortisolistisch gemaakt zijn, een situatie waarin mogelijk compensatoire effecten als een verhoging in de insuline- en glucagonconcentraties van het plasma een rol kunnen spelen.

4. Glucocorticoïed hormoon veroorzaakt in vitro een remming van de reësterificatie van vetzuren. Nagegaan wordt in hoeverre dit effect ook nog optreedt in vetweefsel van ratten met een exogeen hypercortisolisme.

3. Methodiek incubatie van geïsoleerde vetcellen

Hierbij werd de methode gevolgd die beschreven is door Rodbell (1964), met enkele kleine wijzigingen.

Als proefdieren werden mannelijke Wistarratten gebruikt van 8 à 9 weken (160 - 190 gram) uit een ingeteelde stam (TNO, Zeist). Collagenase, bereid uit *Clostridium histolyticum* werd verkregen van Worthington Biochemical Corporation; runder serum-albumine, fractie V werd verkregen van Sigma; glucagon van Lilly en Co.

Bij de bereiding der cellen en de incubaties werd steeds gebruik gemaakt van plastic vaatjes en pipetten en gesiliconeerd glaswerk.

De ratten, die normaal gevoed waren, werden gedood door een slag in de nek en geëxanguineerd. De epididymale vetkwabjes werden onmiddellijk verwijderd en gewassen in warme, isotone zoutoplossing; slechts het dunne distale helderwitte gedeelte van elk vetkwabje werd gebruikt: dit werd horizontaal afgeknipt op de plaats van de overgang van helder wit naar grijswit weefsel; deze plaats is extra gemarkeerd door enkele grote bloedvaten die het vetkwabje hier binnengaan resp. verlaten. Het afgeknipte stuk van het vetkwabje (± 500 mg) werd vervolgens in enkele (± 5) fragmenten verdeeld.

De vóórinubatie van ± 4 gram weefsel vond plaats gedurende 60 minuten in 2 ml albumine-buffer (pH 7,4) met 875 E collagenase (circa 5 mg, afhankelijk van de batch) bij 37°C in een gasfase van 95% O₂ en 5% CO₂ in een schudbad (merk: Kötterman, snelheid 90 cycli per minuut).

De albumine bevattende incubatie-buffer bestond uit Krebs-Ringer-fosfaat buffer (30 minuten gegast met 95% O₂) met 3,5% runder serumalbumine, die met loog op een pH 7,4 werd gebracht.

Het serumalbumine werd tevoren volgens een door Chen (1967) beschreven methode van nog aanwezig vetzuur ontdaan door het albumine met norit bij een pH van 3,0 te wassen en na centrifugatie te filtreren.

Na incubatie gedurende 60 minuten met collagenase werden de uit het interstitium losgemaakte cellen voorzichtig gefiltreerd door nylon (\pm 30 denier) en gewassen met albumine-buffer op 37°C . De suspensie van geïsoleerde vetcellen werd gedurende 1 minuut gecentrifugeerd ($400 \times g$) en opnieuw gewassen. De vetcellen drijven hierbij naar de oppervlakte terwijl de stroma-elementen worden gesedimenteerde. Soms verschenen er aan de oppervlakte kleine vetdruppeltjes, waarschijnlijk ten gevolge van het breken van vetcellen; zowel deze druppeltjes als het "infranatant" werden afgezogen.

Voor de incubaties werden geïsoleerde vetcellen bereid uit een "pool" van epididymaal vetweefsel van 4 tot 8 ratten. De geïsoleerde, gewassen cellen (8-10 ml) werden afhankelijk van het aantal te incuberen vaatjes verdund tot bijvoorbeeld een volume van 25 ml met albumine-buffer en voorzichtig geroerd. Bij de eerste 10 experimenten werd microscopisch in een Bürker-Türck-telkamer nagegaan of de cellen los van elkaar lagen; dit bleek steeds het geval te zijn.

In de plastic incubatie-vaatjes werd achtereenvolgens ingepipetteerd: 1,5 ml albumine-buffer (pH 7,4; eindconcentratie albumine 2,6%), 20 μl glucose 1 M (eindconcentratie 10mM) en indien aangegeven 20 μl van een adrenaline-oplossing van 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (eindconcentratie 1 μg adrenaline per ml incubatie-medium overeenkomend met 5,5 μM). De incubatie werd gestart door de toevoeging van 0,5 ml vetcellsuspensie. Eindvolume 2,04 ml. De gasfase in de vaatjes was 95% O_2 , 5% CO_2 . De vaatjes werden stevig afgesloten met een schroefdop en geïncubeerd in het schudbad bij 37°C gedurende de aangegeven tijd. De pH werd aan het eind van de incubatie gecontroleerd; deze bleek steeds gelijk gebleven te zijn.

Het vetzuurgehalte van vetcellen en medium tesamen werd na extractie met behulp van het extraktiemengsel volgens Dole (1956) spektrofotometrisch bepaald volgens Mosinger (1965).

Het glycerol-gehalte in de vetcellen en medium tesamen werd na onteiwitten met perchloorzuur (6%) en neutralisatie spektrofotometrisch bepaald na oxydatie van glycerol tot formaldehyde met behulp van een modifikatie volgens Laurell (1966).

De grootte van de produktie van vetzuur en glycerol werd

berekend uit het verschil in de concentraties gemeten op tijdstip 0 en na resp. 30 en 60 minuten incubatie. De vetzuurbepaling werd steeds in duplo in tenminste 3 vaatjes op één tijdstip verricht en de glycerolbepaling in duplo in 4 of 3 vaatjes per tijdstip. Deze triplo- en quadruplo-incubaties toonden steeds een standaarddeviatie van minder dan 5%.

De produktie van vetzuur en glycerol werd uitgedrukt in nmol vetzuur resp. nmol glycerol per minuut per mg triglyceride of per cel.

De bepaling van de triglyceriden werd verricht volgens Laurell (1966), terwijl het aantal vetcellen per ml vetcelsuspensie werd bepaald met behulp van een Coulter Counter (voor uitvoering hiervan zie punt F van paragraaf 4 en hoofdstuk IV). De reësterificatie van vetzuur werd berekend met de zogenaamde "netto-balans"-methode volgens Vaughan (1962).

Het blootstellen van het vetweefsel aan glucocorticoiden geschiedde op drie manieren:

- a. toevoeging van dexamethason aan het incubatie-mengsel in vitro. Dexamethason-di-natrium-fosfaat werd opgelost in aethanol (99%) en verdund met dubbel gedestilleerd water zó, dat 20 μ l in het incubatie-mengsel een eindconcentratie van 0,1 μ g dexamethason per ml opleverde (de eindconcentratie aethanol bedroeg dan 5%). De oplossing van dexamethason in absolute aethanol bleek slechts enkele dagen houdbaar; op grond hiervan werd vóór het begin van ieder nieuw experiment een verse dexamethason-oplossing bereid. De vóórinubatie van vetweefsel met dexamethason in vitro geschiedde volgens een door Czech e.a. (1972) beschreven methode, waarbij de in stukjes geknipte vetkwabjes gedurende 4 uur werden geïncubeerd met 0,1 μ g dexamethason per ml incubatie-medium. Na 3 uur wordt collagenase aan het incubatie-mengsel toegevoegd om aan het eind van het vierde uur geïsoleerde vetcellen te verkrijgen. Dit heeft als voordeel dat er minder met het vetweefsel gemanipuleerd hoeft te worden.
- b. vóórbehandeling van ratten met een hoge dosis cortisonacetaat subcutaan gedurende 14 dagen. Groepen van 6 à 8 ratten werden behandeld met 5 mg cortisonacetaat subcutaan per dag, een dosering die overeenkomt met ongeveer 30 mg cortisonacetaat per kg lichaamsgewicht. Een even grote groep controle ratten van hetzelfde gewicht werd gedurende deze 14 dagen behandeld met een

overeenkomstig volume (0,2 ml) 0,9% NaCl subcutaan. Het exogeen hypercortisolisme kwam tot uiting in een gewichtsdaling en hyperinsulinisme (in tegenstelling tot de controle groep) (zie hoofdstuk IV).

- c. voorbehandeling van ratten met een lagere dosering hydrocortison (= cortisol) in het drinkwater. Naar aanleiding van het proefschrift van Van der Heide (1974) werd overgegaan tot behandeling van ratten gedurende 14 dagen met hydrocortison in het drinkwater, hetgeen aanzienlijk minder bewerkelijk is dan de dagelijkse injectie als onder b. toegepast. Bereiding: 50 mg hydrocortison opgelost in 10 ml aethanol 50% wordt toegevoegd aan 1 liter drinkwater onder goed schudden; in dit mengsel heeft hydrocortison de neiging om neer te slaan; het drinkwater moet geregeld geschud worden. Deze oplossing werd elke twee dagen vers bereid. Een rat drinkt gemiddeld ongeveer 16 ml water per dag. Op grond van dit gegeven en het lichaamsgewicht kan worden berekend dat met deze methode 4 à 5 mg cortisol per kg lichaamsgewicht per dag wordt toegediend. Deze dosering benadert de grootte van de cortisol-produktiesnelheid bij het syndroom van Cushing bij de mens meer dan de onder b. vermelde hoge, parenteraal toegediende dosering cortisonacetaat. Ook met deze lagere dosering cortisol, via het drinkwater toegediend, werd een significant achterblijven in gewicht van de behandelde ratten ten opzichte van de controle ratten gevonden, terwijl ook hier hyperinsulinisme werd aangetoond (zie voor uitgewerkte gegevens hoofdstuk IV).

De invloed van glucocorticoïed hormoon werd steeds onderzocht in gepaarde experimenten, waarbij uitgegaan werd van een ingeteelde rattenstam en de dieren hetzelfde lichaamsgewicht hadden. De vetcelincubaties werden afwisselend eerst verricht met controle resp. met behandelde vetcellen. De resultaten werden statistisch geëvalueerd met Student's gepaarde t-test.

4. Onderzoek en bespreking van de gevolgde methoden

- A. voor- en nadelen van het gebruik van vetcelsuspensies met collagenase bereid volgens Rodbell

- B. de albumine-concentratie in het incubatie-medium
- C. de adrenaline-concentratie in het incubatie-medium
- D. de invloed van de toevoeging van glucose aan het incubatie-medium
- E. de berekening van de reësterificatie van vetzuur
- F. de uitdrukking van de produktie van vetzuur en glycerol per mg triglyceride resp. per cel.
- G. conclusies inzake de gevolgde methode en omstandigheden van incubatie.

4. *A. Voor- en nadelen van het gebruik van vetcellsuspensies met collagenase bereid volgens Rodbell*

Een belangrijk deel van de informatie over het metabolisme van vetweefsel is verkregen door incubaties van geïsoleerde vetcellen bereid uit het epididymale vetkwabje van de rat. De door hormonen geïnduceerde lipolyse in geïsoleerde vetcellen van de rat is vele malen groter dan die in vetweefselfragmenten (Rodbell, 1965). Dit geldt voor vetcellen van de rat, maar waarschijnlijk niet voor menselijke vetcellen (Gries e.a., 1967). Bij de rat treden de afgesplitste vetzuren sneller uit de afzonderlijke vetcellen en worden in het medium aan albumine gebonden. Intracellulaire ophoping van vetzuur zou snel tot onderdrukking van de lipolyse leiden (Angel e.a., 1971a en b). De hogere snelheid van de lipolyse in de celsuspensie in vergelijking met die in vetweefsel zou ook een gevolg kunnen zijn van een sneller optreden van het contact van de lipolytische hormonen met de receptoren op de celmembraan.

Rudman e.a. (1969) toonden aan dat de geïsoleerde vetcellen van drie diersoorten (rat, hamster en haas) eveneens een sterkere lipolyse vertoonden op lipolytische hormonen (adrenaline, glucagon, ACTH, TSH) dan vetweefselfragmenten.

Een ander voordeel van het gebruik van geïsoleerde vetcellen ten opzichte van dat van vetweefsel is, dat de onderlinge vergelijkbaarheid van de incubaten binnen één experiment in het eerste geval kan worden geacht beter te zijn.

Bij het onderzoek naar de activiteiten van verschillende enzymen in vetcellen kan het bovendien van belang zijn om het onderzoek in plaats van in homogenaat bereid uit vetweefselfragmenten,

die stromaal weefsel bevatten, in homogenaat van geïsoleerde vetcellen te verrichten: Schönhöfer e.a. (1972) vonden dat de fosfodiësterase-aktiviteit van vetweefsel 10 x hoger is dan van geïsoleerde vetcellen; pas na afsplitsing van de stromale elementen kon worden aangetoond dat vetcellen twee fosfodiësterasen bevatten met resp. een lage en een hoge K_m voor cyclisch-AMP.

Onbekend is of de behandeling van vetweefsel met collagenase aanleiding geeft tot een selectie van kleinere of grotere cellen. Rudman e.a. (1969) bestudeerden de "opbrengst" van vetcellen uit vetweefsel van de rat na 60 minuten collagenase-incubatie volgens Rodbell. Uit een triglyceride-meting vóór en na incubatie bleek, dat slechts 20 à 40% van de vetcellen vrijkwam.

Bij elektronen-microscopisch onderzoek bleek de morfologie van de geïsoleerde vetcel gelijk aan die van vetcellen in het intacte vetkwabje, behalve dat de basaalmembraan die elke cel omgeeft, na de behandeling met collagenase verdwenen is (Cushman, 1970). Dit verlies van de basaalmembraan heeft geen invloed op de receptoren op de buitenzijde van de vetcel, want zowel het effect van lipolytische hormonen als dat van insuline blijft op geïsoleerde vetcellen aanwezig. Onder invloed van andere proteolytische enzymen als trypsine wordt de insuline-receptor echter vernietigd (Kono, 1970).

4. B. de albumine-concentratie in het incubatie-medium

De aanwezigheid van een vetzuur-acceptor in het incubatiemedium is vereist om de vetzuren, die uit geïsoleerde vetcellen vrijkomen, te binden.

Volgens Rodbell (1965) treedt namelijk in geïsoleerde vetcellen sneller een remming van de lipolyse op bij intracellulaire ophoping van vetzuur dan in vetweefselfragmenten. Een opeenhoping van vetzuur in de vetcel leidt tot een aanzienlijke daling van het intracellulaire ATP-gehalte (Angel e.a., 1971a en b, Jeanrenaud e.a., 1971).

De produktie van vetzuur door de geïsoleerde ratte-vetcel stopt wanneer de molaire verhouding vetzuur/albumine in het medium is gestegen tot 6 à 7 (Rodbell, 1965). Een vergelijkbare waarneming in vetcelsuspensies van het epididymale vetkwabje van de rat is die van Hubbard e.a. (1971), waarbij de door noradrenaline gestimuleerde lipolyse met 50% werd geremd zodra de molaire verhouding vetzuur/

albumine was gestegen tot 5. Voor muize-vetcellsuspensies stelden Cushman e.a. (1973) vast dat de door adrenaline geïnduceerde lipolyse wordt geblokkeerd bij een stijging van de molaire vetzuur/albumine verhouding boven 5.

Door ons werd voor het samenstellen van het incubaat gebruik gemaakt van 1,5 ml buffer met 3,5% albumine en 0,5 ml vetcellsuspensie, voor de bereiding waarvan eveneens genoemde albumine-buffer was gebruikt: 8 à 10 ml vetcellen met buffer verdund tot een eindvolume van 25 ml. Tesamen leverde dit een totale hoeveelheid op van tenminste 0,92 μmol albumine per incubaat. In totaal werden 32 incubatie-proeven verricht waarbij de vetzuurconcentratie van medium + cellen werd gemeten. Bij de 16 proeven waarin de door adrenaline gestimuleerde lipolyse van vetcellen van onbehandelde ratten werd gemeten, bleek geen molaire vetzuur/albumine verhouding te worden bereikt boven 4. Bij de 16 incubaties van vetcellen van met glucocorticoiden behandelde ratten bleek deze verhouding 10 x kleiner dan 4 te zijn, 4 x tussen 4 en 5 en tenslotte 1 x 5,4 en 1 x 5,8.

Om na te gaan of het handhaven van een lage vetzuur/albumine verhouding de resultaten zou kunnen hebben beïnvloed, werden 3 incubaties verricht waarbij naast elkaar een albumine-buffer met 3,5% en een met 5,5% albumine werden gebruikt (Tabel I). Er werden geen significante verschillen in de netto vetzuurproductie aangetoond, ook toen op tijdstip 60 minuten met een albumine-buffer van 3,5% een molaire vetzuur/albumine verhouding van 5,0 werd gevonden (Experiment III van Tabel I).

Tabel I

De invloed van verschillende concentraties albumine in het incubatiemedium op de vetzuurproductie in 3 experimenten.

		nmol FFA gevormd per minuut per mg TG			
		vetcellen van controle ratten		vetcellen van met cortisol in drinkwater behandelde ratten	
		3,5% albumine	5,5% albumine	3,5% albumine	5,5% albumine
gevormd tussen 0 en 60 minuten	Exp. I	0,46	0,59	0,64	0,65
	Exp. II	0,98	0,92	1,36	1,41
	Exp. III	1,02	1,02	2,60	2,44

4. C. de adrenaline-concentratie in het incubatie-medium

Gezocht moest worden naar die concentratie adrenaline, die de lipolyse in de geïsoleerde vetcellen van zowel controle ratten als van de met cortison of cortisol behandelde ratten en van in vitro met dexamethason vóórbehandelde vetkwabjes maximaal stimuleert. Bovendien moest nagegaan worden in hoeverre een éénmalige toevoeging van adrenaline bij het begin van de incubatie voldoende is om gedurende 60 minuten deze maximale stimulatie te onderhouden. Goodman (1970) voegde ter voorkoming van oxydatie van adrenaline steeds 0,1 mg/ml ascorbinezuur toe aan het incubatie-medium, hetgeen leidde tot een aanzienlijke toename van de gevoeligheid van de geïsoleerde vetcellen voor adrenaline.

In de literatuur worden verschillende concentraties adrenaline opgegeven, waarmee een maximale stimulatie van de lipolyse van geïsoleerde vetcellen van de rat wordt bereikt: Rodbell (1965) vond dit effect bij een concentratie van 1 $\mu\text{g/ml}$ adrenaline, Moskowitz e.a. (1972) vonden dit bij adrenaline-concentraties tussen 0,24 en 9,2 $\mu\text{g/ml}$, terwijl Miller e.a. (1973) een bimodale dosis-werkingscurve aantoonde waarvan de eerste top bereikt werd met een adrenaline-concentratie tussen 0,55 en 1,83 $\mu\text{g/ml}$ en de tweede met een concentratie hoger dan 18 μg per ml.

In ons onderzoek werd in drie experimenten de produktie van glycerol gemeten onder invloed van vier concentraties adrenaline in 60 minuten in geïsoleerde vetcellen van controle ratten en van met 4 à 5 mg cortisol per kg lichaamsgewicht in het drinkwater behandelde ratten (tabel II). Het blijkt dat in het algemeen 0,5 μg adrenaline per ml een sub-maximale stimulatie van de lipolyse geeft, zodat 1 μg adrenaline per ml als routine werd toegepast.

Om na te gaan of de toevoeging van 1 $\mu\text{g/ml}$ adrenaline bij het begin van de incubatie voldoende was om gedurende de gehele incubatie-periode van 60 minuten een maximale stimulatie van de lipolyse te verkrijgen, werd tweemaal het effect van de toevoeging van een extra hoeveelheid van 1 μg adrenaline per ml halverwege de incubatie nagegaan (tabel III). Het bleek dat de lipolyse in de vetcellen van controle ratten hierdoor niet verder werd gestimuleerd terwijl er in de vetcellen van de met cortisol behandelde ratten een toename van de glycerol-produktie van minder dan 10% werd gevonden. Naar aanleiding van deze bevindingen werd besloten dat de

eenmalige toediening van 1 μg adrenaline per ml aan het begin van de vetcelincubatie de lipolyse gedurende het gehele uur maximaal stimuleert.

Tabel II

De invloed van de concentratie adrenaline op de lipolyse.

		nmol glycerol geproduceerd per mg TG per minuut in 60 minuten							
		vetcellen van controle ratten				vetcellen van met cortisol behandelde ratten *)			
		μg adrenaline/ml				μg adrenaline/ml			
		0,1	0,5	1	10	0,1	0,5	1	10
Exp. I		-0,04	+0,06	+0,14	+ 0,15	+0,01	+0,22	+0,23	+0,18
Exp. II		+0,02	+0,38	+0,38	+ 0,26	+0,08	+0,49	+0,48	+0,41
Exp. III		-0,01	+0,37	+0,40	+ 0,15	-0,02	+0,73	+0,73	+0,33
gemiddelde			0,27 \pm	0,31 \pm	0,19 \pm		0,48 \pm	0,48 \pm	0,31 \pm
\pm S.D.			0,18	0,15	0,06		0,25	0,24	0,11

*) 4 à 5 mg cortisol per kg lichaamsgewicht in het drinkwater gedurende 14 dagen toegediend.

Tabel III

De invloed van de extra toevoeging van 1 μg adrenaline na 30 minuten incubatie op de produktie van glycerol.

		nmol glycerol gevormd per mg TG per min. in 60 minuten	
		1 μg /ml adrenaline op tijdstip 0'	1 μg /ml adrenaline op tijdstip 0' + 1 μg /ml extra na 30 min.
Exp. I	controles	0,38	0,37
	met cortisol behandelde ratten *)	0,48	0,52
Exp. II	controles	0,42	0,40
	met cortisol behandelde ratten *)	0,71	0,77

*) zie tabel II

4. D. de invloed van de toevoeging van glucose aan het incubatie-medium

Het toevoegen van glucose aan het incubatie-medium van geïsoleerde vetcellen leidt enerzijds tot een vermindering in de produktie van vetzuur door de vetcellen, waarschijnlijk via een toegenomen herverestering (reësterificatie) door het in grotere mate ter beschikking komen van glycerol-3-fosfaat (Jungas e.a., 1963, Bally e.a. 1965, Chlouverakis, 1967), anderzijds blijkt glucose een toename van de basale en de door lipolytische hormonen gestimuleerde lipolyse te kunnen veroorzaken. Angel e.a. (1971a) stellen dat deze toename van de lipolyse het gevolg is van een stimulerende invloed van glucose op het ATP-gehalte van de vetcel, waardoor de levensvatbaarheid is verbeterd.

In tabel IV zijn de resultaten vermeld van 4 experimenten naar de invloed van de toevoeging van glucose aan het incubatie-medium van geïsoleerde vetcellen (eindconcentratie glucose: 10mM). De door adrenaline gestimuleerde lipolyse van vetcellen van controle ratten en van met cortisol behandelde ratten neemt onder invloed van glucose

Tabel IV

De invloed van de aanwezigheid van glucose (10 mM) op de door adrenaline (1 µg/ml) gestimuleerde lipolyse.

nmol glycerol geproduceerd per mg TG per minuut in 60 minuten				
vetcellen van controle ratten		vetcellen van met cortisol behandelde ratten *)		
	zonder glucose	met (10 mM) glucose	zonder glucose	met (10 mM) glucose
Exp. I	0,19	0,31	0,22	0,33
Exp. II	0,09	0,21	0,54	0,67
Exp. III	0,11	0,29	0,18	0,32
Exp. IV	0,04	0,18	0,15	0,29
gemiddelde ± S.D.	0,11 ± 0,06	0,25 ± 0,06	0,27 ± 0,18	0,40 ± 0,18
	P < 0.001		P < 0.001	

*) zie tabel II

signifikant toe ($p < 0.001$). De grootte van de stijging van de produktie van glycerol ten gevolge van de aanwezigheid van glucose in het incubatie-medium is in beide omstandigheden gelijk.

Er werd besloten om ook bij de verdere experimenten met geïsoleerde vetcellen glucose aan het incubatie-medium (eindconcentratie 10mM) toe te voegen omdat enerzijds de „fysiologische” omstandigheden aldus beter worden nagebootst, terwijl anderzijds in aanwezigheid van glucose een significant hogere lipolyse onder invloed van lipolytische hormonen gevonden wordt; dit is van belang om de potentiërende werking van glucocorticoiden op de lipolyse te onderzoeken (zie hoofdstuk III, par. 3).

4. E. de berekening van de snelheid van reësterificatie van vetzuur

De produktie van glycerol wordt gebruikt als maat voor de lipolyse. Met vetcellsuspensies van de rat is aangetoond dat de hoeveelheid per tijdseenheid gesplitste triglyceriden goed overeenkomt met de hoeveelheid vrijgekomen glycerol. Vaughan e.a. (1961, 1962 en 1965) zijn van mening dat er tijdens de metingen van de snelheid van de lipolyse soms gedurende korte tijd wel een opeenhoping van mono- en diglyceriden optreedt, maar dat dit in de ratte-vetcel kwantitatief niet van belang is. Arner e.a. (1974) toonden echter aan dat ten gevolge van een ophoping van mono- en diglyceriden de lipolyse gemeten in menselijk vetweefsel 5-20% wordt onderschat wanneer alleen de produktie van glycerol wordt gemeten.

Een vraag, die bij het meten van de snelheid van de lipolyse met behulp van de produktie van glycerol eveneens van belang is betreft de mogelijkheid tot re-utilisatie van glycerol in de vetcel, met andere woorden, kan vrij glycerol in de vetcel weer worden gefosforyleerd? De literatuur over het voorkomen en de fysiologische betekenis van glycerokinase in vetweefsel is niet eensluidend. Robinson e.a. (1967) toonden aan dat in het epididymale vetweefsel van de rat glycerokinase aanwezig is; over de kwantitatieve betekenis wordt zeer uiteenlopend geoordeeld (Herrera e.a., 1970, 1972, Reardon e.a., 1973). Met name wijzen de laatstgenoemde auteurs erop dat de fout die gemaakt wordt bij het berekenen van de lipolyse met behulp van de produktie van glycerol bij hormonale stimulatie, te verwaarlozen is.

De snelheid van de reësterificatie van vetzuur kan worden berekend volgens de zogenaamde "netto-balans"-methode volgens Vaughan (1962); deze methode is gebaseerd op de veronderstelling dat de produktie van glycerol in vetcelsuspensies een goede maat is voor de totale lipolyse en dat steeds per mol glycerol 3 molen vetzuur vrijkomen. Het verschil tussen het theoretisch te produceren aantal molen vetzuur (= molen glycerol x 3) en het in de betreffende tijd in werkelijkheid geproduceerde aantal molen vetzuur wordt beschouwd als intussen weer te zijn herveresterd.

Deze berekeningsmethode is echter alleen korrekt, wanneer aan een aantal voorwaarden wordt voldaan: naast de reeds genoemde minimale glycerokinase-aktiviteit en de eis dat bij de hydrolyse van triglyceriden de splitsing van mono- en diglyceriden niet snelheidsbepalend is, mag tijdens de periode waarover de snelheid van de reësterificatie wordt gemeten ook geen belangrijke hoeveelheid vetzuur worden geoxydeerd of de novo gesynthetiseerd (Vaughan e.a., 1965). Het is niet zeker of aan deze laatste twee voorwaarden steeds wordt voldaan.

4. F. de berekening van de produktie van vetzuren en glycerol per mg triglyceride resp. per cel

De basis waarop de metabole aktiviteiten van vetweefsel moeten worden berekend is een van de meest controversiële punten in dit gebied. In het verleden is gebruik gemaakt van vele referentie-systemen: de produktie van vetzuur en glycerol is onder andere uitgedrukt per gram vers weefselgewicht, per gram vet-vrij drooggewicht, per mg stikstof, per mg DNA en per mg triglyceride.

Rakow (1973) onderzocht een aantal van deze methoden en wees op een belangrijke foutenbron die bij gebruik van de eerste vier genoemde uitdrukkingswijzen ontstaat door het sterk wisselende en niet onaanzienlijke aandeel dat door het bindweefselstroma van het vetweefsel aan deze referentie-grootheden wordt geleverd. Deze vier uitdrukkingswijzen zijn dan ook vrijwel verlaten.

Uit het onderzoek van Goldrick (1967), Salans e.a. (1968) en Hirsch e.a. (1969) bleek het belang van het correleren van metabole aktiviteiten van vetweefsel c.q. vetcelsuspensies aan de grootte en het aantal van de vetcellen. In deze publikaties wordt onder meer de

produktie van vetzuur en glycerol uitgedrukt per vetcel.

De hoeveelheid triglyceride in het geïncubeerde vetweefsel of de geïncubeerde vetcelsuspensie kan slechts als maat gebruikt worden wanneer is aangetoond, dat zij een goede correlatie vertoont met het vetcelaantal en de gemiddelde vetcelgrootte in de met elkaar te vergelijken vetcelsuspensies of vetweefselfragmenten.

Zoals in hoofdstuk IV nader zal worden uiteengezet leveren de diverse methodieken ter bepaling van de grootte en het aantal vetcellen in vetweefsel uiteenlopende resultaten. Nog moeilijker wordt het wanneer men deze gegevens wil verkrijgen voor vetcelsuspensies. In het laatste geval moet men tellingen doen in de suspensie zelf en niet in het oorspronkelijke weefsel, omdat er geen gegevens zijn over het aantal en de grootte van de vetcellen die tijdens het losmaken uit het stroma met behulp van collagenase en tijdens het daarop volgende filtreren, wassen en incuberen van de vetcellen verloren gaan. Onbekend is met name of er selectief verlies optreedt van grote en kleine cellen.

In dit onderzoek, waarbij door voorbehandeling van ratten met cortison en cortisol verschillen zouden kunnen ontstaan in de gemiddelde grootte en het aantal vetcellen per vetkwabje, was het bovendien van belang een indruk te krijgen van de grootte-distributie naast het aantal vetcellen in de vetcelpopulaties die geïncubeerd werden. Hiertoe werd op het moment van de incubatie met behulp van een Coulter Counter een onderzoek naar vetcelaantal en de verdeling van de grootte van de vetcellen in de vetcelsuspensies gedaan. Voor bijzonderheden inzake het principe en het gebruik van de Coulter Counter wordt verwezen naar hoofdstuk IV. Enkele praktische aspecten van belang voor de telling van vetcelsuspensies zullen nu worden behandeld.

De tellingen werden verricht in een verdunning van 1 op 21 (1 ml vetcelsuspensie verdund met 20 ml Isoton, een commerciële isotone NaCl-oplossing die vrijwel partikelvrij is en een lage stroomweerstand bezit). De cellen werden met behulp van een roermotor met een gesiliconeerde roerstaaf in een plastic vaatje in suspensie gehouden. Aangezien de vetcellen aanzienlijk lichter zijn dan de genoemde telvloeistof hebben ze de neiging op de vloeistof te drijven. Om hierdoor ontstane fouten zoveel mogelijk te beperken, werd het celaantal verscheidene malen (minimaal driemaal) achtereen gemeten tot de telvloeistof geheel afgezogen was. Het totaal aantal vetcellen

werd berekend uit het gemiddelde van de gevonden plateaus (zie hoofdstuk IV; standaarddeviatie steeds lager dan 10% van het gemiddelde) en gecorrigeerd voor het toevalselverlies. De tellingen werden verricht in een Coulter Counter (model B) met behulp van een 100 μ telbuis met een manometervolume van 0,5 ml bij "stroom-openingsregeling" 4 en versterking 64. Naast de bepaling van het vetcelaantal werd met behulp van een Coulter "automatic particle size distribution analyzer" (model J) de verdeling in vetcelgrootte van de te incuberen vetcelsuspensie gemeten.

In figuur I zijn tegen elkaar uitgezet het aantal vetcellen per ml vetcelsuspensie en het triglyceride-gehalte per ml van dezelfde vetcel-

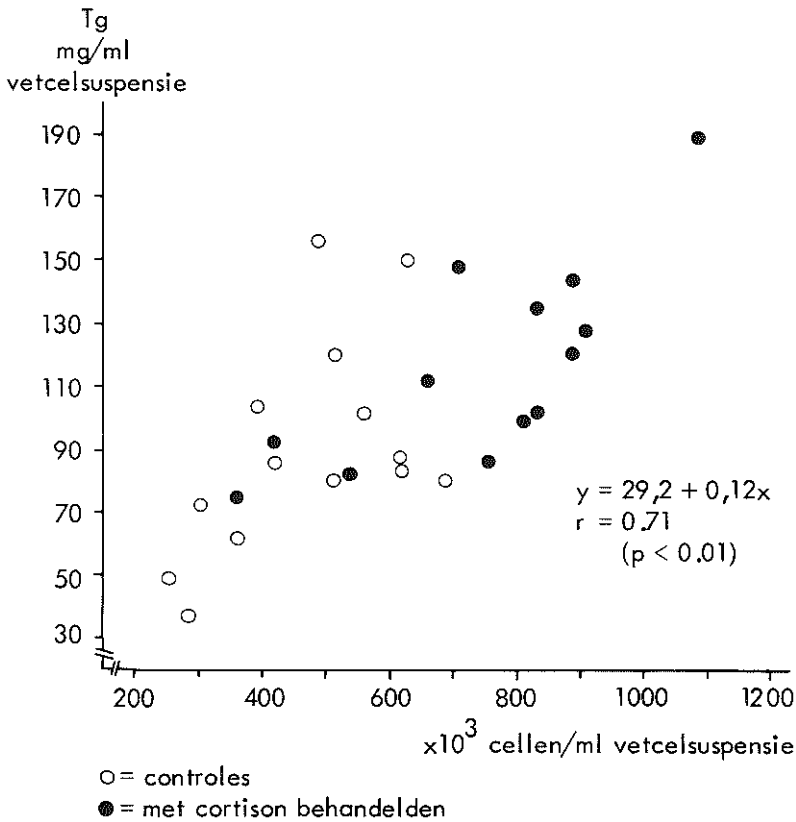


Fig. 1. De relatie tussen het triglyceride-gehalte en het aantal vetcellen per ml vetcelsuspensie van epididymale vetkwabjes van controle ratten en van met cortisonacetaat behandelde ratten.

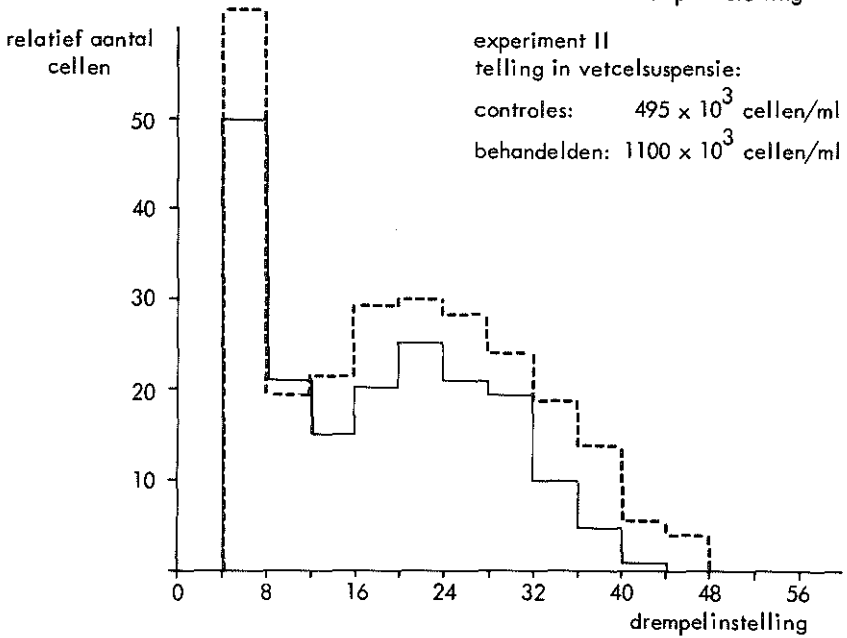
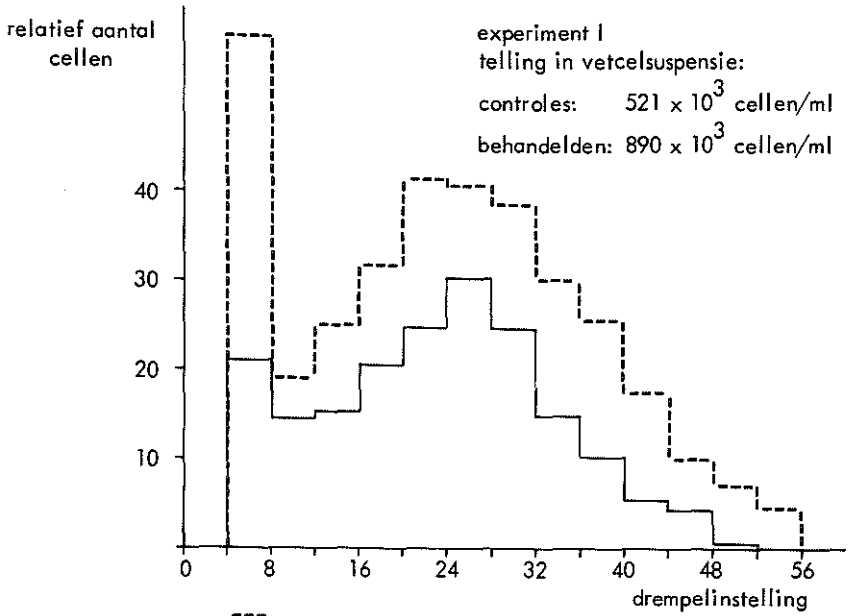


Fig. 2. De relatieve verdeling van de vetcelvolumina in vetcelsuspensies van controle ratten (—) en van met cortisonacetaat geïnjecteerde ratten (---).

suspensie. Er blijkt een significante correlatie ($r = 0,71$, $p < 0,01$) te bestaan tussen de beide parameters. De indruk was dat er meer vetcellen van met cortison behandelde ratten de collagenase-methode "overleven", dan vetcellen van controle ratten. De grootte verschild echter niet significant: de vetcellen van de controle ratten bevatten gemiddeld $0,19 \pm 0,06 \mu\text{g TG/cel}$ (gemiddelde \pm S.D.) en die van de met cortison behandelde ratten: $0,16 \pm 0,04 \mu\text{g TG/cel}$.

In figuur 2 worden twee voorbeelden gegeven van de verdeling van de vetcelgrootte van de geïncubeerde vetcellsuspensie van controle ratten en cortisonacetaat geïnjiceerde ratten. Het is duidelijk dat de grootte-verdeling een overeenkomstig patroon vertoont en dat er geen selectie van grote of kleine cellen door de behandeling met cortison is opgetreden.

4. *G. conclusies inzake de gevolgde methode en omstandigheden van incubatie*

Op grond van literatuurgegevens en eigen aanvullend onderzoek kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

1. de zogenaamde collagenase-methode volgens Rodbell (1964) ter bereiding van suspensies van vetcellen is aantrekkelijk om te gebruiken in verband met de mogelijkheid van "pooling" van vetcellen met betere onderlinge vergelijkbaarheid van incubaten dan bij gebruik van weefselfragmenten.
2. een gehalte van 3,5% albumine in de incubatie-buffer bleek voldoende capaciteit als vetzuur-acceptor te hebben voor incubaties gedurende 60 minuten.
3. met $1 \mu\text{g}$ adrenaline per ml medium wordt een maximale stimulatie van de lipolyse verkregen, zowel in vetcellen van onbehandelde ratten als in vetcellen van met glucocorticoïed hormoon behandelde ratten. De éénmalige toevoeging van adrenaline (eindconcentratie $1 \mu\text{g/ml}$) aan het incubatie-mengsel aan het begin van de incubatie is voldoende om gedurende 60 minuten een maximale stimulatie van de lipolyse te geven.
4. er werd steeds glucose (eindconcentratie 10 mM) aan het incubatie-medium toegevoegd, hetgeen wellicht een beter energie-metabolisme in de geïsoleerde vetcel ten gevolge heeft en leidt tot een maximale met adrenaline gestimuleerde lipolyse.

5. aan een berekening van de snelheid van reësterificatie van vetzuur met de zogenaamde "netto-balans"-methode kleven theoretisch diverse bezwaren.
6. in dit onderzoek is de uitdrukking van de snelheid van de productie van glycerol en vetzuur per mg TG in de vetcelsuspensies alleszins acceptabel. Door bepaling met behulp van de Coulter Counter van het vetcelaantal en de celgrootte-verdeling in de geïncubeerde vetcelpopulaties kon worden vastgesteld, dat het triglyceride-gehalte een redelijke correlatie vertoont met het vetcelaantal in de betreffende celsuspensie, terwijl de gemiddelde celgrootte en de celgrootte-distributie in de vetcelpopulaties van onbehandelde en met cortison behandelde ratten niet verschilt.

5. Resultaten inzake de invloed van een overmaat glucocorticoïed hormoon in vitro en in vivo op de basale resp. met adrenaline en/of glucagon gestimuleerde lipolyse

5. A. Voorbehandeling van vetweefsel met dexamethason in vitro

Zoals in de paragraaf Methoden is uiteengezet werd epididymaal vetweefsel gedurende 4 uur voorgeïncubeerd met 0,1 $\mu\text{g/ml}$ dexamethason terwijl in het laatste uur collagenase werd toegevoegd om geïsoleerde vetcellen te verkrijgen.

In tabel V worden de gegevens vermeld van drie experimenten waarbij in controle vetcellen en in cellen afkomstig van met dexamethason voorgeïncubeerd vetweefsel gedurende 60 minuten de basale, dat wil zeggen ongestimuleerde snelheid van productie van glycerol is gemeten. In 5 van de 6 incubaties blijkt de productie van glycerol minder dan 5% van de uitgangswaarde te bedragen. Geconcludeerd kan worden, dat er in deze proefopstelling geen toename van de basale lipolyse wordt waargenomen in vetcellen afkomstig van met een hoge dosis dexamethason (0,1 $\mu\text{g/ml}$) voorbehandeld epididymaal vetweefsel van de rat.

De gegevens inzake de door adrenaline (1 $\mu\text{g/ml}$) gestimuleerde lipolyse van onbehandelde vetcellen resp. van vetcellen afkomstig van met dexamethason voorbehandeld epididymaal vetweefsel zijn weergegeven in tabel VI (De eerste 3 experimenten betreffen dezelfde vetcelsuspensies als gebruikt in de proeven van tabel V). De conclusie

Tabel V

De invloed van dexamethason in vitro op de basale lipolyse van vetcelsuspensies.

	controle		dexamethason	
	glycerol per incubaat nmol/mg TG		glycerol per incubaat nmol/mg TG	
	op tijdstip 0'	op tijdstip 60'	op tijdstip 0'	op tijdstip 60'
Exp. I	0,055 ± 0,002*)	0,057 ± 0,002	0,040 ± 0,003	0,039 ± 0,002
Exp. II	0,019 ± 0,001	0,019 ± 0,001	0,026 ± 0,001	0,027 ± 0,001
Exp. III	0,008 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,009 ± 0,001

*) gemiddelde ± S.D. van 4 vaatjes

Epididymaal vetweefsel werd gedurende 4 uur voorgeïncubeerd met en zonder 0,1 µg/ml dexamethason. Daarna vond incubatie plaats gedurende 60 minuten voor meting basale lipolyse. Elk getal representeert een "pool" van 3 - 4 ratten.

Tabel VI

De invloed van dexamethason in vitro op de met adrenaline gestimuleerde lipolyse van vetcelsuspensies.

	glycerolproduktie nmol/mg TG/min.	
	controle	dexamethason
Exp. I	0,43	0,50
Exp. II	0,27	0,44
Exp. III	0,46	0,56
Exp. IV	0,44	0,50
Exp. V	0,15	0,20
gemiddelde ± S.D.	0,35 ± 0,14	0,44 ± 0,14
	p < 0.025	

Lipolyse-meting gedurende 60 minuten. Concentratie dexamethason 0,1 µg per ml tijdens voorincubatie (4 uur). Adrenaline 1 µg per ml incubatie-medium. Elk getal representeert een "pool" van 3 - 4 ratten.

is dat onder invloed van voorbehandeling met dexamethason in hoge dosering (0,1 µg/ml) een significante potentiatie ($p < 0.025$) van de stimulering van de lipolyse door adrenaline optreedt.

5. B. Voorbehandeling van ratten met een hoge dosis cortisonacetaat subcutaan

De invloed van behandeling gedurende 14 dagen met een dagelijkse toediening van 5 mg cortisonacetaat subcutaan per rat (± 30 mg per kg lichaamsgewicht) op het lichaamsgewicht en seruminsuline wordt besproken in hoofdstuk IV.

De door adrenaline opgewekte maximale stimulatie van de lipolyse tussen 0 en 60 minuten in geïsoleerde vetcellen uit het epididymale vetkwabje, was na vóórbehandeling in vivo met deze farmacologische dosering cortison significant hoger dan in vetcellen van controle ratten: zowel voor de produktie van vetzuur ($p < 0.001$, fig. 3A) als voor de glycerolproduktie ($p < 0.01$, fig. 3B).

Behalve op de tijdstippen 0 en 60 minuten werd ook na 30 minuten de concentratie glycerol en vetzuur gemeten. De vetzuurproduktie verliep in deze periode als volgt (fig. 4A): in de vetcellen van de controle ratten verschilde de produktie in de eerste 30 minuten incubatie niet van die van de tweede 30 minuten, terwijl in

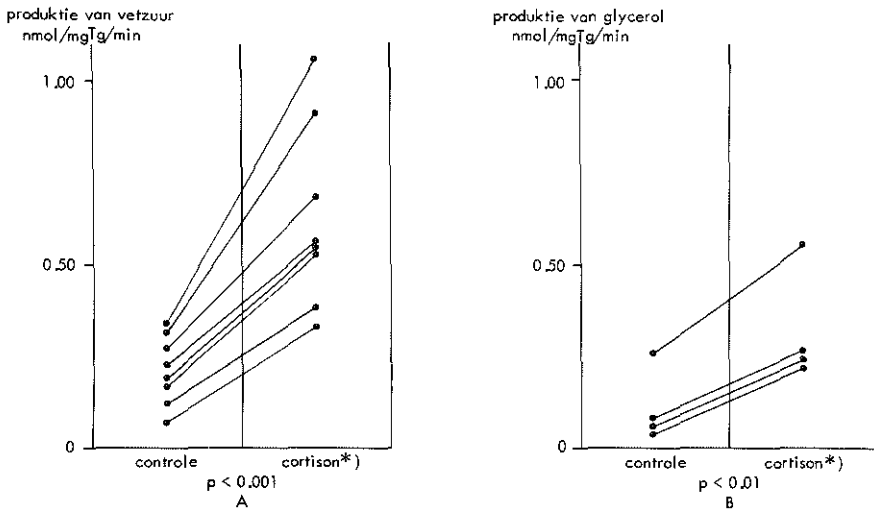


Fig. 3. De invloed van behandeling met cortisonacetaat in vivo op de lipolyse. Lipolyse onder invloed van adrenaline ($1 \mu\text{g/ml}$) in vetcellsuspensies gemeten gedurende 60 minuten. Elk punt representeert een "pool" van epididymaal vetweefsel afkomstig van 6 à 8 ratten.

*) ± 30 mg cortisonacetaat per kg subcutaan gedurende 14 dagen.

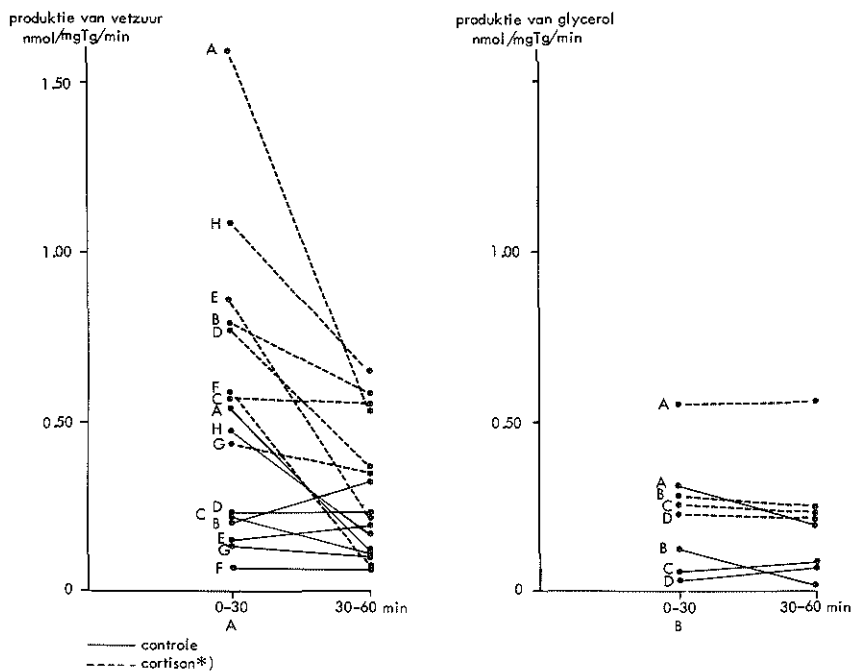


Fig. 4. De invloed van behandeling met cortisonacetaat in vivo op de lipolyse. Zie bijschrift figuur 3. De gepaarde experimenten zijn met letters (A-H) aangegeven.

de vetcellen van de met cortisonacetaat behandelde ratten de vetzuurproductie onder invloed van adrenaline in de eerste 30 minuten significant hoger was dan die in de tweede 30 minuten ($p < 0.01$). Desondanks bleek de produktie van vetzuur tussen 30 en 60 minuten door de vetcellen van de met cortison behandelde ratten nog steeds significant hoger te zijn dan die door de vetcellen van de controle ratten ($p < 0.01$). De produktie van glycerol per minuut in de periode tussen 0 en 30 minuten en van 30 tot 60 minuten verschilde niet, zowel in de vetcellen van controle ratten als in de vetcellen van met cortisonacetaat behandelde ratten (fig. 4B).

De verhouding tussen het aantal molen vetzuur en glycerol, door de vetcellen onder invloed van adrenaline geproduceerd, uit welk getal volgens de "netto-balans"-methode volgens Vaughan de snelheid van de reësterificatie gemeten kan worden, leverde de volgende waarden:

tijdsinterval:	0-30 min.	30-60 min.	0-60 min.
controles (n = 4)	1,85 : 1	1,80 : 1	1,82 : 1
cortison (n = 4)	2,55 : 1	1,31 : 1	1,95 : 1

De snelheid van reësterificatie van vetzuur bleef in de vetcellen van de controle ratten gedurende het gehele uur constant. Van de met hoge doseringen cortison behandelde ratten bleken de vetcellen in het eerste half uur van de incubatie met adrenaline een remming van de reësterificatie te vertonen, terwijl de herverestering van vetzuur in het tweede half uur groter was dan in de controle vetcellen. Over het gehele uur gerekend bleek de molaire verhouding van geproduceerd vetzuur/glycerol voor controle en met cortison behandelde ratten nauwelijks te verschillen.

5. C. a. *Voorbehandeling van ratten met cortisol in een dosering van 4-5 mg per kg lichaamsgewicht gedurende 14 dagen.*

De basale lipolyse werd gedurende 60 minuten gemeten in controle vetcellen en in vetcellen van met hydrocortison (= cortisol) in het drinkwater behandelde ratten (tabel VII). De uiterst geringe of afwezige glycerolproductie gemeten in 8 experimenten verschilde niet significant voor beide groepen.

Tabel VII

De invloed van behandeling met cortisol op de basale lipolyse van vetcellsuspensies uit het epididymale vetkwabje.

	glycerolproductie (nmol/mg TG/min)	
	controle	cortisol
Exp. I	-0,0083	+ 0,0048
Exp. II	-0,1033	-0,0216
Exp. III	+ 0,0283	+ 0,0516
Exp. IV	+ 0,0850	+ 0,1500
Exp. V	+ 0,0183	-0,0066
Exp. VI	+ 0,0116	-0,0183
Exp. VII	+ 0,0000	-0,0116
	verschil: n.s. (gepaarde t-test)	

De door adrenaline gestimuleerde produktie van vetzuur bleek na de toediening van cortisol verhoogd te zijn. Deze verhoging is significant, zowel wanneer de produktie van vetzuur wordt uitgedrukt per mg triglyceride (fig. 5A) als bij uitdrukking per cel (fig. 6A). De produktie van vetzuur was na voorbehandeling met cortisol in het eerste half uur van de incubatie ook hoger dan in het tweede half uur maar dit verschil bleek niet significant in tegenstelling tot de bevindingen na gebruik van een hogere dosering cortisol (par. 5B).

De door adrenaline maximaal gestimuleerde lipolyse, gemeten aan de produktie van glycerol, bleek eveneens na voorbehandeling met de genoemde dosering cortisol significant hoger dan in de vetcellen van controle ratten (fig. 5B; fig. 6B).

De verhouding van het aantal molen geproduceerd vetzuur over het aantal molen geproduceerd glycerol liet wel dezelfde tendens zien als na de hogere dosis cortisol, maar verschilde nogal in grootte (vgl. par. 5B):

tijdsinterval:	0-30 min.	30-60 min.	0-60 min.
controles (n = 7)	2,76 : 1	2,78 : 1	2,77 : 1
hydrocortison (n = 7)	4,08 : 1	2,08 : 1	2,63 : 1

Ook hier wordt een constante snelheid van reësterificatie gevonden gedurende 60 minuten incubatie bij de controle groep; na voorbehandeling met deze dosering cortisol werd opnieuw een duidelijke remming van de reësterificatie gezien in het eerste half uur van de incubatie, terwijl de her-verestering van vetzuur in het tweede half uur ten opzichte van de controle ratten opnieuw iets hoger bleek. Over de gehele incubatie-duur gerekend was er geen verschil.

5. C. b. *Vergelijkende studie met glucagon en adrenaline*

Vervolgens werd nagegaan in hoeverre het potentiërend effect van glucocorticoïed hormoon op de door adrenaline maximaal gestimuleerde lipolyse óók aantoonbaar is met een ander lipolytisch hormoon, nl. glucagon. In een dosis-werkings curve met vier concentraties glucagon (0,5; 1; 5 en 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) werd aangetoond dat met een concentratie van 1 μg glucagon per ml medium de lipolyse in het hier gebruikte systeem maximaal gestimuleerd wordt.

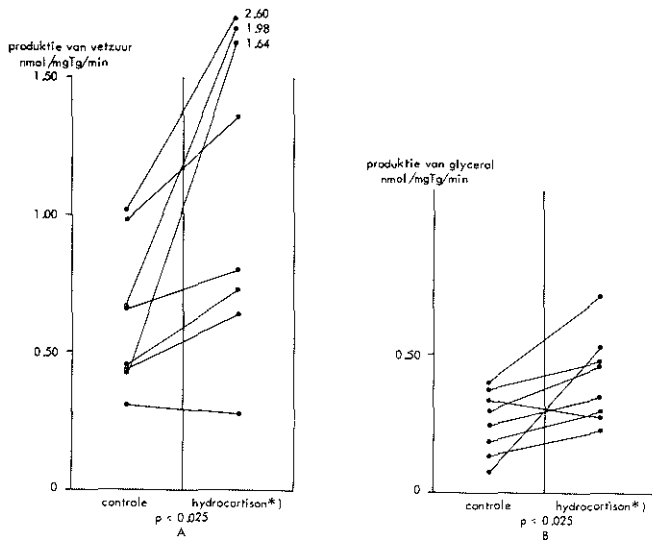


Fig. 5. De invloed van behandeling met cortisol in vivo op de lipolyse. Lipolyse onder invloed van adrenaline ($1 \mu\text{g/ml}$) in vetcellsuspensies gemeten gedurende 60 minuten. Elk punt representeert een "pool" van epididymaal vetweefsel van 6 à 8 ratten. *) 4 - 5 mg hydrocortison per kg per os gedurende 14 dagen.

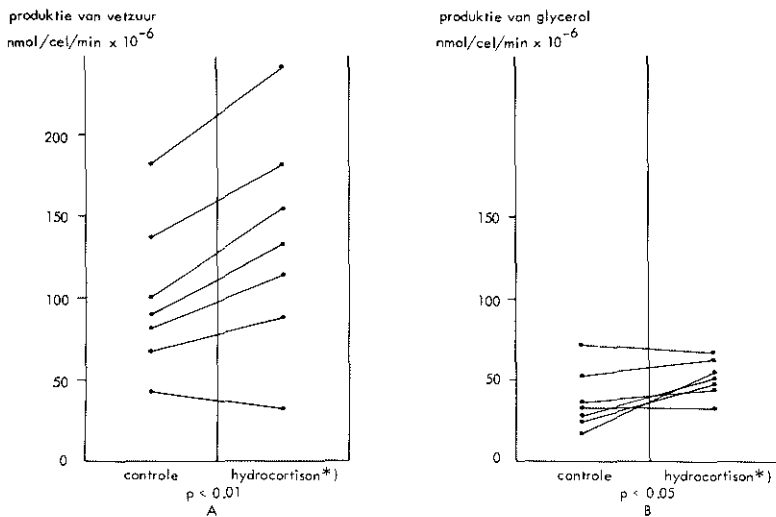


Fig. 6. De invloed van behandeling met cortisol in vivo op de lipolyse. Zie bijschrift figuur 5.

In tabel VIII zijn de resultaten vermeld van 6 experimenten. Het blijkt dat de door glucagon maximaal gestimuleerde productie van glycerol in vetcellen van de cortisol groep significant hoger is dan in vetcellen van controle ratten. Deze invloed van de toediening van cortisol blijft ook aanwezig wanneer de lipolyse wordt gestimuleerd door een combinatie van de ieder op zich maximaal stimulerende concentraties van adrenaline en glucagon. Het effect van beide hormonen op de productie van glycerol blijkt noch in de controle noch in de cortisol groep gesummeerd te zijn.

Tabel VIII

De potentiëatie van de stimulering van de lipolyse onder invloed van adrenaline resp. glucagon door behandeling met cortisol in vivo.

	Glycerolproductie (nmol/mg TG/min)					
	adrenaline 1 µg/ml		glucagon 1 µg/ml		adrenaline 1 µg/ml + glucagon 1 µg/ml	
	controle	cortisol	controle	cortisol	controle	cortisol
Exp. I	0,31	0,33	0,21	0,28	0,43	0,56
Exp. II	0,21	0,67	0,30	0,42	0,38	0,97
Exp. III	0,29	0,32	0,31	0,37	0,41	0,54
Exp. IV	0,18	0,29	0,36	0,38	0,39	0,45
Exp. V			0,29	0,36	0,37	0,58
Exp. VI			0,40	0,70	0,61	0,83
gem. ± S.D.	0,25 ± 0,06	0,40 ± 0,18	0,31 ± 0,06	0,42 ± 0,15	0,43 ± 0,09	0,66 ± 0,20
	N.S.		p < 0,05		p < 0,05	

De lipolyse gedurende 60 minuten in vetcelsuspensies van controle ratten resp. van ratten die gedurende 14 dagen werden behandeld met cortisol 4 - 5 mg/kg per os.

De potentiëatie van de door adrenaline gestimuleerde lipolyse is in deze 4 experimenten niet significant, zoals dat in fig. 5B wel het geval is (zie ook hoofdstuk III, tabel IX, X en XVIII).

6. Discussie

De *basale* lipolyse gemeten aan de produktie van glycerol door ratte-vetweefsel in vitro werd door Jeanrenaud (1967) beschreven als gestimuleerd door hoge concentraties glucocorticoïed hormoon: hij vond in epididymaal vetweefsel na 4 uur vóórinubatie met 0,1 μg dexamethason per ml een significante toename van de produktie van glycerol. Met geïsoleerde vetcellen vond hij onder invloed van 0,01 μg dexamethason per ml echter geen verhoogde lipolyse. Yorke (1967) en Goodman (1970) vonden in vetcelsuspensies na vóórinubatie met dexamethason geen toename van de basale lipolyse.

In dit onderzoek werd de basale produktie van glycerol in vetcelsuspensies gemeten zowel na vóórinubatie gedurende 4 uur met 0,1 μg dexamethason per ml (tabel V), als na vóórbehandeling van de rat met cortisol in vivo (tabel VII). De gevonden basale produktie van glycerol was in alle gevallen zeer laag. Ook Rodbell (1965) en Mosinger (1967) vonden dergelijke lage produkties van glycerol door niet hormonaal gestimuleerde vetcelsuspensies. Wij konden geen toename van de basale lipolyse aantonen in vetcelsuspensies, die waren vóórgeïncubeerd met een hoge concentratie dexamethason (overeenkomend met circa 250 μg cortisol per 100 ml) òf die verkregen waren van ratten die gedurende 14 dagen waren behandeld met een dosering van 4-5 mg cortisol per kg lichaamsgevocht per dag in het drinkwater. De waarneming van Jeanrenaud (1967) met vetweefselfragmenten, geïncubeerd met dezelfde concentratie dexamethason, blijft dan ook alleenstaand.

De vetcelsuspensie, bereid uit epididymaal vetweefsel dat gedurende 4 uur met 0,1 μg dexamethason per ml was voorgeïncubeerd, vertoonde tijdens incubatie met 1 μg adrenaline per ml steeds een significant hogere produktie van glycerol. Dit kan men een *potentiërend* effect van het glucocorticoïed hormoon ten opzichte van de werking van adrenaline op de lipolyse noemen.

Vervolgens werden waarnemingen gedaan over de invloed van exogeen hypercortisolisme op de door adrenaline gestimuleerde lipolyse en de reësterificatie van vetzuur. Zowel de produktie van glycerol als die van vetzuur onder invloed van adrenaline blijkt na behandeling van het proefdier met glucocorticoïed hormoon significant hoger dan in de controle groep. Dit potentiërend effect van glucocorticoïed hormoon op de produktie van glycerol is onafhankelijk

van het al of niet aanwezig zijn van glucose in het incubatie-medium (tabel IV).

Bij de met de hoogste van de twee doseringen glucocorticoïed hormoon behandelde ratten bleek de vetzuurproductie door de epididymale vetcellen in de eerste 30 minuten significant hoger te zijn dan gedurende de tweede 30 minuten. Omstandigheden in de gevolgde methoden die aanleiding zouden kunnen geven tot een dergelijk verschil in de productie van vetzuur zijn niet aan te wijzen: de albumine-concentratie in het incubatie-medium is voldoende hoog om het tijdens de incubatie gevormde vetzuur te binden (tabel I), terwijl een onvoldoende stimulatie door adrenaline gedurende de tweede 30 minuten bijvoorbeeld als gevolg van oxydatie van het hormoon, onwaarschijnlijk is: de productie van glycerol tijdens deze beide perioden is constant (zie tabel III en fig. 4B).

Er treedt "ongeveer" in de eerste 30 minuten een extra productie van vetzuur op die berust op een remming van de reësterificatie. Dit zou kunnen berusten op een verminderd aanbod van glycerol-3-fosfaat door remming van de opname van glucose door de vetcel (Munck, 1971). Een andere oorzaak zou ook kunnen zijn een tijdelijke, partiële hydrolyse van de triglyceriden met ophoping van de mono- en diglyceriden. In het tweede half uur van de incubatie lijkt een insuline-effekt de overhand te krijgen gezien de dan gemeten toename van de her-verestering van vetzuur. Over het gehele uur gerekend bleek de reësterificatie in de controle en de (beide) cortisol groepen ongeveer gelijk.

Jeanrenaud (1960) en Fain e.a. (1963) vonden een toename van de basale productie van vetzuur door vetweefsel na vóórincubatie met glucocorticoiden. Dit is, op grond van de in dit onderzoek gevonden onveranderde basale productie van glycerol waarschijnlijk een gevolg van de remming van de reësterificatie en/of ophoping van partieel gesplitste triglyceriden (mono- en diglyceriden).

De potentiërende door glucocorticoïed hormoon van de door adrenaline gestimuleerde lipolyse is niet beperkt tot het adrenergische systeem, maar werd ook gevonden bij een maximale stimulatie van de lipolyse door glucagon (tabel VIII). Ook bij gelijktijdige stimulatie met een maximaal stimulerende concentratie adrenaline en glucagon blijkt het potentiërende effect van glucocorticoïed hormoon behouden te zijn gebleven. Voor de implicaties van dit laatste gegeven ten aanzien van de eventuele lokalisatie van het effect van glucocorti-

coïed hormoon in het lipolytische systeem van de vetcel van de rat wordt verwezen naar hoofdstuk III.

7. Conclusies

1. Vóórbehandeling van epididymaal vetweefsel van de rat in vivo of in vitro met suprafysiologische doses resp. concentraties glucocorticoïed hormoon heeft geen invloed op de basale lipolyse gemeten aan de produktie van glycerol.
2. De door adrenaline maximaal gestimuleerde lipolyse in vetcellen uit epididymaal vetweefsel dat gedurende 4 uur werd vóórgeïncubeerd met een suprafysiologische concentratie dexamethason, wordt gepotentiëerd.
3. Dit potentiërend effect van glucocorticoïed hormoon is ook aantoonbaar bij een maximale stimulatie van de lipolyse door glucagon.
4. Ook in een opstelling waarin bij de rat in vivo hypercortisolisme wordt opgewekt is het daarna mogelijk in vitro de potentiatie van de door adrenaline gestimuleerde lipolyse in geïsoleerde vetcellen aan te tonen.
5. Vóórbehandeling met glucocorticoïed hormoon in vivo remt de reësterificatie van de door adrenaline gestimuleerde produktie van vetzuur.

HOOFDSTUK III

De lokalisatie van het effect van glucocorticoïed hormoon op de lipolyse van de vetcel van de rat

1. Inleiding

Er bestaat een nauwe correlatie tussen de cAMP-concentratie in het epididymale vetkwabje en de snelheid van de produktie van vetzuren in het incubatie-medium tijdens stimulatie met adrenaline (Butcher e.a., 1965). De intermediaire rol van cAMP bij de door hormoon gestimuleerde lipolyse in vetweefsel werd onder andere bevestigd door onderzoeken naar de tijdsrelatie tussen de stijging van de intracellulaire cAMP-concentratie en de produktie van vetzuur, de invloed van de toevoeging van beta-blokkerende stoffen op beide parameters tijdens stimulatie met adrenaline, de synergistische invloed van methylxanthines en catecholamines op de lipolyse en de effecten van exogene cyclische nucleotiden op de lipolyse (Butcher e.a., 1966, 1968; Robison e.a., 1971).

De lipolytische hormonen doen de intracellulaire cAMP-concentratie in de vetcel toenemen door aktivatie van het adenylaat cyclase in de vetcelmembraan: het adenylaat cyclase is verbonden met een aantal receptoren die ieder op zich in staat zijn verschillende hormonen te binden. Het adenylaat cyclase in de vetcel van de rat kan door tenminste 5 verschillende hormonen geaktiveerd worden: adrenaline, glucagon, ACTH, secretine en vasopressine (Birnbaumer e.a., 1970).

De intracellulaire cAMP-concentratie in de vetcel is het resultaat van de aktiviteit van tenminste twee elkaar tegenwerkende enzymssystemen: de vorming van cAMP geschiedt door adenylaat cyclase uit

ATP, terwijl de afbraak van cAMP tot 5'-AMP wordt geregeld door tenminste twee op verschillende plaatsen in de vetcel gelokaliseerde fosfodiësterasen. De activiteit van deze fosfodiësterasen is aanzienlijk groter dan die van adenylaat cyclase (Cheung, 1970).

De uiteindelijke mobilisatie van glycerol en vetzuren uit vetweefsel geschiedt door het hormoon-gevoelige triglyceride lipase (Vaughan e.a., 1964). De activering van dit lipase in homogenaten van vetweefsel is afhankelijk van de toevoeging van cAMP en ATP (Rizack, 1964). De aanwezigheid van een cAMP-afhankelijk proteïne kinase in vetcellen werd aangetoond door Corbin e.a. (1969b); de fysiologische betekenis van dit proteïne kinase voor het stimulerend effect van cAMP op het hormoon-gevoelige triglyceride lipase via de fosforylering van een eiwit werd daarna bewezen (Corbin e.a., 1970 en 1972; Huttunen e.a., 1970 en 1971).

Het proces van de hormoon gestimuleerde lipolyse in ratte-vetcellen kan worden gekarakteriseerd als een "cascade", analoog aan bijvoorbeeld het systeem van de bloedstolling (Steinberg e.a., 1973), waarbij via een receptor-stimulatie cAMP uit ATP gevormd wordt door adenylaat cyclase; het cAMP activeert het in de vetcel aanwezige proteïne kinase, waarna het actieve proteïne kinase het hormoon-gevoelige triglyceride lipase fosforyleert, hetgeen leidt tot hydrolyse van de in de vetcel opgeslagen triglyceriden, waardoor glycerol en vetzuur vrijkomen. Aldus kan een versterking van het effect van een geringe primaire prikkel worden verkregen. Galton (1974) berekende dat het signaal van een hormoon in het bloed bij de mens in een concentratie van ongeveer $10^{-8}M$ resulteert in de produktie van een vetzuurspiegel van ongeveer $10^{-3}M$, een versterkingsfactor van 10^5 . Dit cascade-systeem funktioneert ook in de vetcel van de mens (Khoo e.a., 1973).

2. Literatuurgegevens

Er zijn betrekkelijk weinig onderzoeken gedaan naar het aangrijpingspunt van glucocorticoïed hormoon op de lipolyse. Er bestaat geen eensluidende opvatting over de plaats in de lipolyse-cascade waar cortisol aangrijpt.

Uit het werk van Braun e.a. (1970) blijkt dat de gevoeligheid van de receptor voor ACTH in de ratte-vetcel wordt gereguleerd door

glucocorticoïed hormoon. Deze regulatie bleek echter selectief te zijn voor de ACTH-receptor: de gevoeligheid van de receptoren voor adrenaline en glucagon wordt niet beïnvloed door toediening van dexamethason aan normale ratten of door adrenalectomie. Schönhöfer e.a. (1969) maten een gelijke activiteit van het adenylaat cyclase, het totale fosfodiësterase en het hormoon-gevoelige triglyceride lipase in homogenaten van geïsoleerde vetcellen van geadrenalectomeerde ratten met en zonder vóórbehandeling gedurende 4 uur met cortison. Zij concludeerden uit dit onderzoek, dat de biochemische laesie in de lipolyse-cascade die ontstaat door adrenalectomie moet zijn gelokaliseerd ter plaatse van of vóór de aktivatie van adenylaat cyclase.

Een eventuele beïnvloeding van de intracellulaire cAMP-concentratie binnen de vetcel werd onderzocht door Fain (1968), Moskowitz e.a. (1970) en Fain e.a. (1971). Vetcellen in suspensie die gedurende 3 uur met dexamethason (0,016 μg per ml) waren vóórgeïncubeerd, vertoonden dezelfde stijging van de concentratie cAMP onder invloed van adrenaline met theofylline als de controle vetcellen-suspensie. Zij maten het verloop van de cAMP-concentratie in de vetcel tijdens adrenaline-stimulatie echter niet zonder remming van de fosfodiësterase-aktiviteit door theofylline.

Door drie groepen onderzoekers werden gegevens verkregen, waarbij een verandering van de fosfodiësterase-aktiviteit als verklaring voor de veranderingen in de lipolyse onder invloed van glucocorticoïed hormoon werd vermoed of gevonden: Allen e.a. (1972) vonden dat adrenalectomie geen effect had op de basale, resp. door adrenaline, natriumfluoride en ACTH gestimuleerde adenylaat cyclase-aktiviteit in homogenaten van geïsoleerde vetcellen. De basale concentratie cAMP in het vetweefsel veranderde niet onder invloed van adrenalectomie, maar de stijging van de cAMP-concentratie na toediening van adrenaline was verminderd. Deze auteurs suggereren de mogelijkheid van een toename van de fosfodiësterase-aktiviteit na adrenalectomie en remming van PDE als aangrijpingspunt van glucocorticoïed hormoon in de vetcel. Senft e.a. (1968) maten een vermindering van de totale fosfodiësterase-aktiviteit in homogenaten van vetweefsel van ratten die behandeld waren met glucocorticoïed hormoon. Adrenalectomie verhoogde de fosfodiësterase-aktiviteit, waarna onderdrukking van deze aktiviteit aantoonbaar was nadat minimaal 15 uur tevoren 1 mg 6-methylprednisolon per kg aan de ratten

was toegediend. Ook Manganiello e.a. (1972) wezen het fosfodiësterase aan als aangrijpingspunt van glucocorticoïed hormoon in de vetcel: incubatie van hepatoma-cellen van de rat met dexamethason ($1 \mu\text{M}$) gedurende 36 uur, veroorzaakt een vermindering in de fosfodiësterase-activiteit, terwijl in cellen in weefselkweek die gedurende 72 uur met dexamethason waren geïncubeerd onder invloed van de combinatie adrenaline met theofylline een significant hogere toename in de concentratie cAMP werd gevonden dan zonder vóórin-cubatie met dexamethason. Manganiello e.a. (1973) behandelden vervolgens normale ratten met een eenmalige injectie dexamethason (0,5 mg s.c.) en maten de PDE-activiteit in homogenaten van geïsoleerde vetcellen: deze activiteit bleek verminderd, maar het effect was slechts aantoonbaar wanneer de bepalingen werden uitgevoerd met minder dan $10 \mu\text{M}$ cAMP. Het effect was ongeveer 20 uur na de toediening van glucocorticoïed hormoon zichtbaar en bleek vooral op te treden in het PDE met een hoge affiniteit (lage K_m) voor cAMP.

Naast de vermelde onderzoeken waarin achtereenvolgens als het aangrijpingspunt van cortisol in de vetcel werden aangewezen: regeling van de gevoeligheid van receptoren op de vetcelmembraan, de aktivatie van het adenylaat cyclase en een remming van de fosfodiësterase-activiteit, is het werk van Corbin e.a. (1969a) van belang. Na adrenalectomie werd door hen in epididymale vetkwabjes van de rat een verminderde produktie van glycerol gevonden onder invloed van de combinatie van adrenaline en cafeïne; de stijging van de concentratie cAMP die optrad onder invloed van deze beide stoffen verschilde echter niet. Deze auteurs suggereerden dat glucocorticoïed hormoon de werking van adrenaline op de lipolyse in de vetcel beïnvloedt door de gevoeligheid van het hormoon-gevoelige triglyceride lipase voor aktivering te verhogen.

3. Vraagstelling en opzet van het onderzoek

Uit de literatuurgegevens blijkt dat er geenszins overeenstemming bestaat over de lokalisatie van het aangrijpingspunt van glucocorticoïed hormoon in de lipolyse-cascade.

Op grond van de in de Inleiding van dit hoofdstuk vermelde gegevens zijn er de volgende mogelijke plaatsen waarop glucocorticoïed hormoon zou kunnen aangrijpen:

1. via verhoging van de gevoeligheid van de receptoren voor lipolytische hormonen op de membraan van de vetcel.
2. via verhoging van de activiteit van het adenylaat cyclase.
3. via verlaging van de activiteit van één of beide fosfodiësterase(n).
4. via verhoging van de proteïne kinase-activiteit.
5. via verhoging van de hormoon-gevoelige triglyceride lipase-activiteit.
6. via een combinatie van 2 of meer van de hierboven genoemde mogelijkheden.

Wij stelden de vraag welk van de bovengenoemde mogelijkheden het feitelijke aangrijpingspunt is van (een overmaat) glucocorticoïed hormoon op de lipolyse.

- A. De invloed van maximaal werkzame concentraties db-cAMP en theofylline op de lipolyse in vetcelsuspensies van met cortisol behandelde en onbehandelde ratten werd nagegaan, om hieruit inlichtingen te verkrijgen over de invloed van een sterke remming van de fosfodiësterase (PDE)-activiteit in de vetcel op het glucocorticoïed effect.
- B. Een mogelijke invloed van glucocorticoïed hormoon op de receptoren van de lipolytische hormonen en/of de adenylaat cyclase-activiteit is onderzocht door:
 - a. het glucocorticoïed effect na te gaan in aanwezigheid van de combinatie van maximaal stimulerende concentraties adrenaline en glucagon op de produktie van glycerol.
 - b. de adenylaat cyclase-activiteit te meten aan de hand van de snelheid van de stijging van de concentratie cAMP onder invloed van adrenaline in homogenaten van vetcelsuspensies van met cortisol behandelde en onbehandelde ratten.
- C. De PDE-activiteit werd op twee manieren gemeten in homogenaten van vetcelsuspensies:
 - a. de totale PDE-activiteit is gemeten aan de hand van de snelheid van verdwijning van toegevoegd cAMP in homogenaten, bij concentraties cAMP van 10 en 1 μM .
 - b. de aktiviteiten van PDE met resp. een lage en een hoge K_m (ca. 3 en 120 μM) zijn afzonderlijk bestudeerd aan de hand van de snelheid van verschijning van radioaktiviteit in 5' - AMP tijdens incubatie met diverse concentraties ^3H -cAMP.
- D. De basale concentraties cAMP in de gesuspenderde vetcellen zijn gemeten enerzijds na voorbehandeling van vetweefsel met dexa-

- methason gedurende 4 uur en anderzijds na behandeling van de ratten met cortisol gedurende 14 dagen. De snelheid van stijging van de intracellulaire cAMP-concentratie onder invloed van adrenaline is bestudeerd tijdens incubaties onder de omstandigheden waaronder ook de lipolyse werd onderzocht.
- E. Tenslotte is de proteïne kinase-activiteit onderzocht aan de hand van de snelheid van incorporatie van ^{32}P (uit $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$) in histon in homogenaten van vetcelsuspensies van in vitro met glucocorticoïed hormoon voorbehandeld epididymaal vetweefsel en van vetweefsel afkomstig van ratten, behandeld met cortisol.
4. A. De invloed van de maximale concentraties dibutyryl-cAMP en theofylline op de lipolyse in geïsoleerde vetcellen van controle ratten en met cortisol behandelde dieren.

Inleiding

Een aantal farmaca remmen de PDE-activiteit van vele weefsels in vitro: bekend zijn de methylxanthines en papaverine. In vetweefsel werd de PDE-remmende activiteit van methylxanthine voor het eerst aangetoond door Butcher e.a. (1962). De toevoeging van PDE-remmers verhoogt de ophoping van cAMP in de vetcel door catecholamines aanzienlijk (Butcher e.a., 1965). Er bestaat een nauwe correlatie tussen de activiteit van een xanthine-derivaat als lipolytische stof en de mate van remming van de PDE-activiteit in vetweefsel: in ratte-vetcelsuspensies werd echter aangetoond dat met een maximale concentratie theofylline nooit een remming van meer dan 70% van de PDE-activiteit kon worden bereikt (Beavo e.a., 1970, 1971).

Er lijkt een voortdurende synthese van cAMP plaats te vinden door adenylaat cyclase van de vetcel, waardoor de lipolyse ook in de afwezigheid van hormonale beïnvloeding wordt gehandhaafd. Theofylline en de andere methylxanthines veroorzaken een verhoging van deze basale lipolyse (Hynie e.a., 1966).

Indien cAMP een belangrijke schakel vormt intracellulair voor het tot stand komen van de lipolyse onder invloed van bijvoorbeeld catecholamines, zou men door toediening van cAMP aan vetweefsel de lipolyse ook moeten kunnen stimuleren. Dit is echter niet het geval, daar cAMP tot een concentratie van 2,5 mM de lipolyse van

vetcellsuspensies niet stimuleert (Butcher e.a., 1965). Dit werd aanvankelijk toegeschreven aan een snelle afbraak van cAMP of een onvermogen van dit nucleotide om de celmembraan van de vetcel te passeren. Voor de bestudering van effecten van cAMP werd daarna gebruik gemaakt van synthetische derivaten van cAMP met name het N⁶-O^{2'}-dibutyryl-cAMP (db-cAMP). De gebleken activiteit hiervan werd toegeschreven aan een groter vermogen om de celmembraan te penetreren dan van cAMP zelf (Henion e.a., 1967), of aan een grotere weerstand tegen afbraak door het PDE (Solomon, 1972). Okuda e.a. (1974) vonden echter geen verschil in de mate van naar binnen dringen van ³H-cAMP en ³H-db-cAMP in vetcellen. Db-cAMP blijkt evenals theofylline in vetcellen van de rat PDE te remmen (Jarett e.a., 1972), en wel competitief en reversibel. Aldus komt een aanzienlijke toename van de concentratie endogeen cAMP tot stand: deze toename zou veel groter zijn dan die onder invloed van theofylline (Jarett e.a., 1974).

Methodes

Met behulp van dosis-werkings-curves werden de concentraties db-cAMP en theofylline bepaald waarmee een maximale stimulatie van de lipolyse in geïsoleerde vetcellen wordt bereikt tijdens een incubatie gedurende 60 minuten onder de omstandigheden als in de paragraaf Methodes van Hoofdstuk II beschreven:

- a. bij eindconcentraties van 0,25 / 0,5 / 1 en 2,5 mM db-cAMP was de glycerolproductie-snelheid resp. 0,12 / 0,22 / 0,53 en 0,53 nmol per mg TG per minuut. Voor het verdere onderzoek is een concentratie db-cAMP van 1 mM toegepast.
- b. bij eindconcentraties van 0,5 / 1 / 2,5 en 5 mg theofylline per ml incubatie-medium werden de volgende snelheden van productie van glycerol gemeten: resp. 0,50 / 0,55 / 0,46 en 0,32 nmol glycerol per mg TG per minuut. De concentratie waarmee de lipolyse maximaal gestimuleerd werd is 1 mg theofylline per ml incubatie-medium.

Resultaten

In tabel IX zijn de resultaten van de invloed van een maximaal stimulerende concentratie db-cAMP op de lipolyse door vetcelsuspensies van controle ratten en met cortisol behandelde ratten vermeld. De maximale snelheid van lipolyse onder invloed van db-cAMP blijkt na behandeling met cortisol nog te worden verhoogd. De combinatie van een maximaal stimulerende concentratie adrenaline en db-cAMP had geen toename van de snelheid van lipolyse tot gevolg in vergelijking met elk van deze stoffen afzonderlijk. Soortgelijke resultaten werden verkregen met een maximaal stimulerende concentratie theofylline (tabel X). Het effect van de combinatie van db-cAMP en theofylline is niet onderzocht.

Tabel IX

De invloed van een maximaal werkzame concentratie db-cAMP en/of adrenaline en voorbehandeling van de rat met cortisol op de lipolyse van epididymale vetcelsuspensies ⁺).

	produktie glycerol (nmol/mg TG/min.)					
	db-cAMP (1 mM)		adrenaline (1 µg/ml)		db-cAMP + adrenaline	
	controles	cortisol*)	controles	cortisol*)	controles	cortisol*)
Exp. I	0,14	0,27	0,10	0,25	0,23	0,33
Exp. II	0,27	0,43	0,36	0,47	0,35	0,44
Exp. III	0,22	0,26	0,23	0,29	0,23	0,29
Exp. IV	0,23	0,64	0,21	0,33	0,22	0,40
Exp. V	0,19	0,34				
gem. ± S.D.	0,21 ± 0,05	0,39 ± 0,16	0,23 ± 0,11	0,34 ± 0,10	0,26 ± 0,06	0,37 ± 0,07
	p < 0.05		p < 0.01		p < 0.025	

+) Produktie van glycerol gemeten in vetcelsuspensies (en medium) gedurende 60 minuten.
Per experiment werden de vetkwabjes van 3 ratten gebruikt.

*) Cortisol 4 - 5 mg per kg lichaamsgewicht in het drinkwater gedurende 14 dagen.

Tabel X

De invloed van een maximaal werkzame concentratie theofylline en/of adrenaline en voorbehandeling van de rat met cortisol op de lipolyse van epididymale vetcelsuspensies +).

	produktie glycerol (nmol/mg TG/min.)					
	theofylline (1 mg/ml)		adrenaline (1 µg/ml)		theofylline + adrenaline	
	controles	cortisol*)	controles	cortisol*)	controles	cortisol*)
Exp. I	0,53	0,62	0,59	0,70	0,64	0,65
Exp. II	0,41	0,62	0,30	0,47	0,33	0,42
Exp. III	0,53	0,59	0,49	0,59	0,50	0,56
Exp. IV	0,32	0,38	0,32	0,40	0,36	0,48
Exp. V	0,32	0,58	0,36	0,60	0,36	0,53
gem. ± S.D.	0,42 ± 0,11	0,56 ± 0,10	0,41 ± 0,12	0,55 ± 0,12	0,44 ± 0,13	0,53 ± 0,09
	p < 0.05		p < 0.01		p < 0.05	

+) Produktie van glycerol gemeten in vetcelsuspensies (en medium) gedurende 60 minuten. Per experiment werden de vetkwabjes van 3 ratten gebruikt.

*) Cortisol 4 - 5 mg per lichaamsgewicht in het drinkwater gedurende 14 dagen.

Discussie

Het lipolytische effect van cortisol is ook aantoonbaar in vetcelsuspensies waarin de lipolyse wordt gestimuleerd met twee stoffen die een remming van de PDE-activiteit in de vetcel veroorzaken. Op grond van de in de inleiding genoemde argumenten omtrent een zo groot mogelijke remming van de PDE-activiteit in de vetcel door db-cAMP resp. theofylline en het feit dat het potentiërend effect van cortisol op de lipolyse ook in deze omstandigheden nog aantoonbaar blijft, lijkt het minder waarschijnlijk dat het aangrijpingspunt van cortisol in de lipolyse-cascade een vermindering van de PDE-activiteit zou zijn. Uitgesloten is dit echter met deze experimenten allerminst.

4. B. Oefent glucocorticoïed hormoon invloed uit op de receptoren van de vetcel voor adrenaline en glucagon en/of op het adenylaat cyclase?

Door een benadering langs twee wegen is getracht uit te sluiten dat het aangrijpingspunt van cortisol in de lipolyse-cascade gelokaliseerd is ter plaatse van de receptoren voor adrenaline en glucagon en/of het adenylaat cyclase:

- a. het effect is nagegaan van de combinatie van maximaal stimulerende concentraties adrenaline en glucagon op de produktie van glycerol door vetcelsuspensies al of niet na behandeling met cortisol, aannemende dat de aldus verkregen snelheid van de lipolyse de maximale aktiviteit van het adenylaat cyclase weer spiegelt.
- b. de aktiviteit van adenylaat cyclase is gemeten door de stijging van de concentratie cAMP onder invloed van adrenaline na te gaan in homogenaten van vetcelsuspensies van met cortisol behandelde en onbehandelde ratten.

4. B. a. *De "maximale" adenylaat cyclase-aktiviteit onder invloed van de combinatie van adrenaline en glucagon.*

Het adenylaat cyclase van vetweefsel van de rat kan door talrijke hormonen worden geactiveerd, waarbij de diverse hormonen, hoewel reagerende met verschillende groepen receptoren, alle hetzelfde enzym-complex aktiveren (Birnbaumer e.a., 1969a en b). Toepassing van de combinatie van maximaal stimulerende concentraties catecholamine en ACTH resulteerde in een grotere toename van cAMP dan werd gezien met elk hormoon afzonderlijk (Butcher e.a., 1965). Dergelijke effecten werden ook gezien bij de aktivatie van adenylaat cyclase in vetcel "ghosts" (Birnbaumer e.a. 1969b): bij toepassing van twee of meer hormonen in maximaal werkzame (of hogere) concentraties treedt geen volledige summatie van de effecten op de aktiviteit van adenylaat cyclase op. Men zou dit effect van maximale concentraties van twee of meer hormonen als een "capaciteitsmeting" van het adenylaat cyclase-enzym kunnen beschouwen.

Op grond van deze overwegingen hebben wij, nadat aangetoond was dat met ieder op zich maximaal stimulerende concentraties

adrenaline en glucagon het potentiërend effect van cortisol op de lipolyse aantoonbaar was, nagegaan of dit ook nog het geval was wanneer de lipolyse gestimuleerd werd door een combinatie van adrenaline en glucagon in de genoemde concentraties. In tabel VIII van het vorige hoofdstuk is te zien dat er onder invloed van deze combinatie van hormonen een stijging zonder volledige summatie van de lipolyse optreedt, maar dat ook in deze omstandigheden onder invloed van voorbehandeling met cortisol een versnelling van de lipolyse aantoonbaar is.

4. B. b. De meting van de adenylaat cyclase-activiteit.

Inleiding

In alle tot nu toe bestudeerde zoogdiercellen is adenylaat cyclase een membraan-gebonden enzym (Birnbaumer, 1973). Uit de meeste weefsels is dit enzym nog niet gezuiverd verkregen omdat het onstabiel is. De activiteit van adenylaat cyclase wordt dan ook meestal gemeten in ongezuiverde weefsel-homogenaten of in (voorzichtig) gewassen membraan-frakties (Perkins, 1973). Er bestaan bij deze activiteitsmeting een aantal moeilijkheden (Bär e.a., 1969a, Perkins, 1973, Birnbaumer, 1973).

Doordat gebruik gemaakt moet worden van weinig gezuiverde preparaten ontstaan storingen door de aanwezigheid van een aantal andere enzymen, die een activiteit kunnen hebben die vaak hoger is dan die van het adenylaat cyclase: belangrijk zijn het ATP-ase, de fosfodiësterasen en verder verscheidene fosfatasen en deaminasen.

De PDE-activiteit in de meeste weefselhomogenaten is, indien uitgedrukt in μ molen omgezet per tijdseenheid per mg homogenaat-eiwit, zoveel hoger dan de adenylaat cyclase-activiteit dat er van een nauwkeurige meting van de accumulatie van gevormd cAMP geen sprake kan zijn wanneer de PDE-activiteit niet geremd wordt. Daartoe worden steeds methylxanthine-preparaten, bijvoorbeeld theofylline, aan het test-mengsel toegevoegd. Zelfs bij zeer hoge concentraties theofylline (5-20 mM) wordt de PDE-activiteit in homogenaten niet compleet geremd (Drummond e.a., 1970), terwijl bovendien werd aangetoond dat de toevoeging van theofylline in sommige gevallen ook een remming van de adenylaat cyclase-activiteit tot

gevolg heeft (Sheppard e.a., 1970). Robison e.a. (1971) geven aan dat methylxanthines de adenylaat cyclase-activiteit inderdaad enigszins remmen maar dat dit effect kwantitatief overschaduwd wordt door een veel grotere remming van de PDE-activiteit; zij zijn van mening dat men bij de meting van de adenylaat cyclase-activiteit in de meeste weefselpreparaten wel PDE-remmers *moet* toevoegen.

Meting van de activiteit van het adenylaat cyclase wordt veelal bemoeilijkt door een hoge ATP-ase activiteit in het test-mengsel zodat de ATP-concentratie snel daalt tot beneden de concentratie die nodig is om de adenylaat cyclase-activiteit te verzadigen. Men moet dan hetzij ATP in zeer hoge concentratie toevoegen, hetzij een ATP-regenererend systeem in het testmengsel gebruiken (Birnbaumer e.a., 1969a). Daarnaast wordt de incubatie-temperatuur veelal op 30°C gehouden omdat de ATP-asen hierbij aanzienlijk minder actief zijn.

Adenylaat cyclase kan slechts functioneren in de aanwezigheid van magnesium. Birnbaumer e.a. (1969a) en Drummond e.a. (1970) maakten voor vet- resp. hartspierweefsel waarschijnlijk dat het werkelijke substraat voor het adenylaat cyclase een Mg-ATP complex is, terwijl een overmaat Mg^{++} -ionen de enzym-activiteit nog verder doet toenemen. Vrij ATP heeft echter een remmende invloed. De reactie heeft een breed pH optimum (7,0-8,5).

Het gebruik van radioactief gemerkt ATP bij het meten van de adenylaat cyclase-activiteit in weefsel-homogenaten heeft geen voordeel (Bär e.a., 1969b): naast de onzuiverheden in de meeste radioactieve ATP-preparaten die vaak dezelfde elektroforetische mobiliteits-eigenschappen hebben, ontstaan er tijdens de incubatie radioactieve bijproducten die niet gemakkelijk te scheiden zijn van het cAMP.

Methode

Zoveel mogelijk rekening houdend met bovengenoemde punten werd gekozen voor een meting van de adenylaat cyclase-activiteit in homogenaten van gesuspenderde vetcellen volgens een door Schönhöfer e.a. (1971) beschreven methode waarbij de hoeveelheid gevormd cAMP wordt gemeten; wij maakten echter geen gebruik van radioactief gemerkt ATP (bijvoorbeeld 3H -ATP), maar maten de vorming van ongelabeld cAMP tijdens incubatie met adrenaline.

cAMP is gemeten met behulp van een competitieve eiwit-bindingsmethode volgens Brown e.a. (1970, 1971 en 1972). Deze methode heeft naast een hoge gevoeligheid en specificiteit, als voordeel dat de bereiding van het specifiek bindende eiwit uit runderbijneren gemakkelijk en weinig tijdrovend is, terwijl de scheiding van gebonden en vrij cAMP met behulp van norit eenvoudig is. In figuur 7 zijn twee voorbeelden van standaardcurves voor de cAMP-bepaling afgebeeld welke verkregen zijn met verschillende eiwitverduunningen.

Schönhöfer e.a. (1971) toonden aan dat met de hier gebruikte concentratie theofylline een maximale accumulatie van cAMP wordt bereikt terwijl de hier gebruikte Mg/ATP verhouding voor de adenylaat cyclase-activiteit optimaal is.

Vetcellen (geïsoleerd volgens Rodbell) werden gehomogeniseerd in 4 volume-eenheden van een buffer bevattende 80 mM Tris-HCl (pH 7,4), 6,6 mM MgSO₄ en 2 mM theofylline.

Bij 0,5 ml van dit homogenaat werd 0,1 ml van een ATP-oplos-

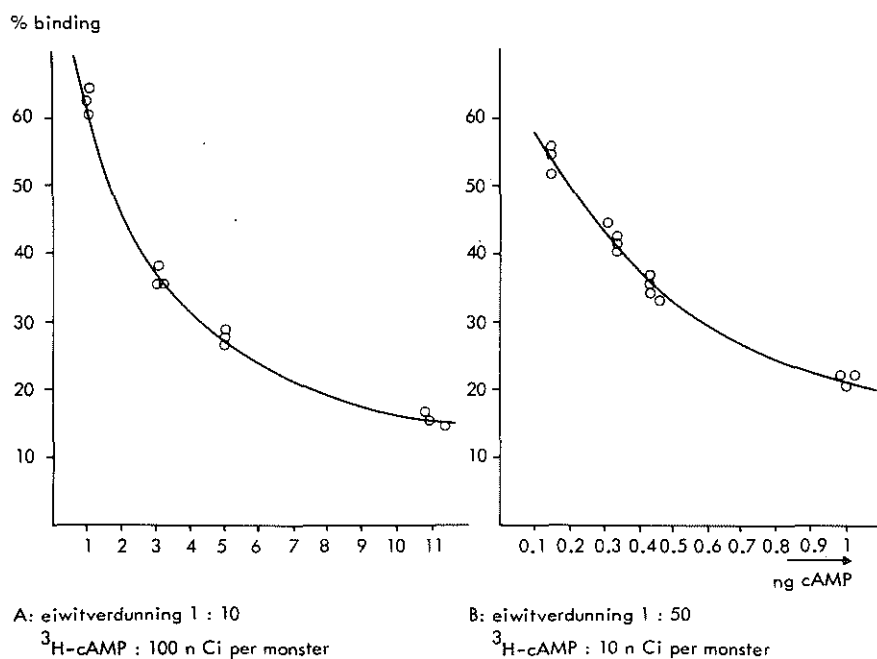


Fig. 7. Twee standaard-curves voor de cAMP-bepaling, verkregen met verschillende eiwitverduunningen.

sing en 0,1 ml van een adrenaline-oplossing gevoegd tot een eindvolume van 0,7 ml met eindconcentraties: 45,7 mM Tris-HCl, 3,77 mM MgSO₄, 1,1 mM theofylline, 1,7 mM ATP en 0,1 mM adrenaline.

De incubatie vond plaats in een schuddend waterbad bij 30°C. cAMP-producties werden in duplo gemeten door op de tijdstippen 0,4 en 8 minuten de reactie te stoppen door toevoeging van 50 µl 40% trichloorazijnzuur. Hierna werden de incubatie-media gecentrifugeerd. Voor de cAMP-bepaling werd een monster (500 µl) van het heldere infranatant (volgens Krishna e.a., 1968) gechromatografeerd over een Dowex (AG 50 W-X-8, 200-400 mesh, H⁺-vorm) – kolom van 3 x 0,5 cm: bij deze procedure worden onder meer ATP en 5'-AMP gescheiden van cAMP geëluëerd, terwijl adenosine en theofylline in de kolom blijven. De Dowex-kolom werd daartoe voorgewassen met dubbel gedistilleerd water, waarna 500 µl van het te onderzoeken monster wordt opgebracht en het cAMP geëluëerd. Het bleek dat in de eerste 2,5 ml het ATP en ADP aanwezig is, dat tussen de 2,5 en 7,5 ml vrijwel alle cAMP wordt geëluëerd, terwijl daarna het 5'-AMP verschijnt. Uit de 2,5 tot 7,5 ml fraktie werd 50 µl genomen voor de bepaling van het cAMP-gehalte. De recovery van de kolom werd in drie verschillende experimenten bepaald en bedroeg: 73,6%, 85,3% en 82,0%.

De adenylaat cyclase-activiteit werd uitgedrukt per mg homogenaat-eiwit (Lowry e.a., 1951).

Resultaten

In de eerste 4 minuten is de hoeveelheid cAMP (ng per mg eiwit) die per minuut gevormd wordt in de preparaten van de onbehandelde dieren significant hoger, dan in die van de met cortisol behandelde. Dit verschil is tussen 4 en 8 minuten incubatie niet, maar berekend over de hele periode van 0 tot 8 minuten wel significant aanwezig (tabel XI).

Discussie

Het blijkt dat de adenylaat cyclase-activiteit van 0 tot 8 minuten onder invloed van adrenaline in deze proef niet geheel lineair met

Tabel XI
Adenylaat cyclase-activiteit in vetcelhomogenaten.

	cAMP gevormd (ng/mg eiwit/minuut)					
	tussen 0 en 4 min.		tussen 4 en 8 min.		tussen 0 en 8 min.	
	controles	cortisol*)	controles	cortisol*)	controles	cortisol*)
Exp. I	2,15	1,55	2,03	0,75	2,09	1,15
Exp. II	2,25	1,45	1,60	2,00	1,92	1,72
Exp. III	3,18	2,58	2,98	1,73	3,08	2,15
Exp. IV	0,87	0,45	0,77	0,20	0,82	0,32
gem. ± S.D.	2,11 ± 0,95	1,51 ± 0,87	1,85 ± 0,92	1,17 ± 0,84	1,98 ± 0,93	1,34 ± 0,79
	p < 0,005		n.s.		p < 0,05	

*) Homogenaten van gesuspenderde vetcellen van ratten die gedurende 14 dagen met 4 - 5 mg cortisol per kg in het drinkwater werden behandeld.

de tijd verloopt. Dit is mogelijk een gevolg van een onvoldoende remming van de PDE-activiteit en/of van een gebrek aan ATP. Wij hebben geen gebruik gemaakt van een ATP-regenererend systeem.

De bevinding dat de activiteit van het adenylaat cyclase in homogenaten van vetcelsuspensies van met cortisol behandelde ratten significant lager is dan bij controles, is op het eerste gezicht verrassend en lijkt de versnelling met cortisol van de door adrenaline gestimuleerde lipolyse in geen geval te kunnen verklaren. Bitensky e.a. (1970) maten de adenylaat cyclase-activiteit onder invloed van adrenaline en glucagon van leverweefsel en toonden aan dat voorbehandeling van normale ratten met 6 mg prednisolon subcutaan gedurende 9 dagen de door adrenaline gestimuleerde adenylaat cyclase-activiteit significant verminderde; 14 dagen na adrenalectomie was deze activiteit verhoogd terwijl dit effect van adrenalectomie kon worden voorkomen door toediening van prednisolon. Ongeveer identieke resultaten werden gevonden door Leray e.a. (1973) in een meting van het adenylaat cyclase in meer gezuiverde levercel-membranen.

Een verklaring voor de vermindering van de door adrenaline gestimuleerde adenylaat cyclase-activiteit na toediening van glucocorticoïed hormoon aan het proefdier zou gevonden kunnen worden in

de waarneming van Bitensky e.a. (1972) dat insuline het adenylaat cyclase in aanwezigheid van adrenaline bij de normale rat bleek te kunnen remmen, terwijl de toediening van prednisolon aan diabetische ratten geen vermindering in de activiteit van het enzym tot gevolg had.

Het is dan ook zeer waarschijnlijk dat de hier gevonden remming van het adenylaat cyclase in aanwezigheid van adrenaline en onder invloed van een overmaat glucocorticoïed hormoon in vivo het gevolg is van hyperinsulinisme. Dit hyperinsulinisme is bij onze proefopstelling ook aangetoond (zie hoofdstuk IV). Opgemerkt moet worden dat metingen van adenylaat cyclase na voorincubatie van vetcellen met dexamethason door ons niet zijn verricht (Hiermede had het "interfererend" effect van insuline kunnen worden uitgeschakeld). Aangezien in dezelfde proefopstelling met geïsoleerde vetcellen van de op bovengenoemde manier hypercortisolistisch gemaakte ratten wel een verhoging van de door adrenaline en glucagon maximaal gestimuleerde lipolytische activiteit aantoonbaar bleek (hoofdstuk II, tabel VIII), is het zeer onwaarschijnlijk dat het effect van een overmaat glucocorticoïed hormoon op de lipolyse ontstaat door een hogere activiteit van het adenylaat cyclase of een verhoging van de gevoeligheid van de receptoren voor de gebruikte lipolytische hormonen.

4. C. Meting van de fosfodiësterase (PDE)-activiteit

De regulatie van de cAMP-concentratie in de cel is een functie van zowel de snelheid van de synthese als de snelheid van de afbraak van cAMP. De totale capaciteit van fosfodiësterase (dat cAMP hydrolyseert tot 5'-AMP) is in alle onderzochte weefsels vele malen hoger dan die van adenylaat cyclase (Robison e.a., 1971).

In vele weefsels bestaan tenminste twee duidelijk te onderscheiden fosfodiësterase-activiteiten die verschillen in kinetisch gedrag, relatieve affiniteit voor cAMP en cGMP en in moleculair gewicht (Thompson e.a., 1971, Sakai e.a., 1974). In vetweefsel zijn mogelijk zelfs drie en in hersenweefsel vier verschillende fosfodiësterasen aangetoond (Klotz e.a., 1972, Weiss e.a., 1974).

Voor de bepaling van de PDE-activiteiten in homogenaten van (vet)weefsel zijn vele methoden ontwikkeld die op verschillende

principes berusten; een belangrijk probleem hierbij is een zodanig lage substraat-concentratie te gebruiken dat de proefopstelling wat dit betreft de situatie in vivo benadert (Appleman e.a., 1973, Rutten e.a. 1973a).

In dit onderzoek naar de vraag, in hoeverre het potentiërend effect van glucocorticoïed hormoon op de lipolyse te wijten zou kunnen zijn aan veranderde PDE-aktiviteit, werden twee verschillende methoden gebruikt:

- a. meting van de "totale" PDE-aktiviteit in vetcel-homogenaat van onbehandelde en met cortisol behandelde ratten.
- b. kinetische experimenten waarbij een eventuele invloed van glucocorticoïed hormoon gemeten kan worden op zowel het PDE-enzym met een lage als met een hoge K_m voor cAMP.

In beide methoden werd gebruik gemaakt van homogenaten van geïsoleerde vetcellen. Schönhöfer e.a. (1972) toonden aan dat de PDE-aktiviteit in vetweefsel 10 x hoger is dan in geïsoleerde vetcellen.

4. C. a. *Meting van de "totale" PDE-aktiviteit*

Deze methode is gebaseerd op het meten van de verdwijning van cAMP. Voor en na 20 minuten incubatie wordt de concentratie cAMP gemeten en aan de hand van de daling van deze concentratie wordt de PDE-aktiviteit berekend als ng cAMP gehydrolyseerd per minuut per mg homogenaat-eiwit.

De basale intracellulaire cAMP-concentratie in de vetcel van de rat bedraagt tussen 1 en 10 μM (Fain, 1973). Op grond hiervan werd de "totale" PDE-aktiviteit gemeten bij twee substraat-concentraties nl. 10 en 1 μM . Het is hierbij niet mogelijk een onderscheid te maken tussen eventuele beïnvloeding van de fosfodiësterasen met een lage resp. een hoge K_m voor cAMP.

Methodie

Er werd gebruik gemaakt van een door Schönhöfer e.a. (1972) beschreven bepaling, waarbij wij echter geen ^3H -cAMP gebruikten maar de cAMP-bepaling volgens Brown e.a. (1970).

Geïsoleerde vetcellen, bereid volgens Rodbell (zie hoofdstuk II) worden 1 op 4 verdund met een oplossing van 80 mM Tris-HCl-buffer (pH 7,4) en 20 mM MgSO₄. Na homogenisatie (Potter type RM 18) en centrifugering gedurende 20 minuten (2000 x g) wordt de vetcake van het oppervlak verwijderd met een spatel en het heldere "infranatant" gebruikt voor de meting van de PDE-aktiviteit (Pösch e.a., 1971). De reactie wordt gestart door aan 0,5 ml van het infranatant 0,1 ml cAMP-oplossing toe te voegen (cAMP eindconcentratie 10 resp. 1 μ M). De incubatie vindt in triplo plaats in een schuddend waterbad bij 37°C en de reactie wordt op de tijdstippen 0 en 20 minuten beëindigd met 50 μ l trichloorazijnzuur (40%) gevolgd door onmiddellijke centrifugering gedurende 20 minuten (1000 x g). 500 μ l van dit mengsel wordt vervolgens op de in paragraaf 4. B. beschreven wijze gebracht op een Dowex-kolom. In het eluaat van 2,5 tot 7,5 ml werd de cAMP-concentratie bepaald.

Resultaten

De totale PDE-aktiviteit gemeten volgens deze methode blijkt door behandeling met cortisol in vivo niet significant te worden beïnvloed (tabel XII A en B). Dit geldt voor de beide gebruikte concentraties cAMP, waarbij moet worden aangetekend dat met de concentratie cAMP van 1 μ M de meting door substraatgebrek niet langer dan 10 minuten kan worden voortgezet, hetgeen de waarde van dit deel van de resultaten sterk vermindert. In de vetcellen die werden gebruikt voor de bereiding van de homogenaten voor deze PDE-aktiviteitsmetingen, werd wel een potentiatie van de door adrenaline gestimuleerde lipolyse onder invloed van glucocorticoïed hormoon gevonden.

4. C. b. Kinetische experimenten PDE-aktiviteit

Hiervoor werd de door Loten en Sneyd (1970) beschreven methode gekozen waarbij de PDE-aktiviteit in vetcelhomogenaat wordt gemeten met verschillende concentraties cAMP die optimaal geacht kunnen worden voor het enzym met de lage, resp. de hoge K_m. De PDE-aktiviteit wordt bepaald aan de hand van de produktie

Tabel XII

Totale fosfodiësterase-aktiviteit in vetcelhomogenaten van onbehandelde en met cortisol behandelde ratten *).

A. cAMP 10 μ M

	ng cAMP gehydrolyseerd per minuut per mg eiwit tussen 0 en 20 minuten	
	controle	cortisol *)
Exp. I	18,00	20,95
Exp. II	27,95	27,50
Exp. III	14,95	13,75
Exp. IV	12,95	15,25
Exp. V	10,20	8,25
Exp. VI	18,15	7,70
gem. \pm S.D.	17,03 \pm 6,15	n.s. 15,56 \pm 7,80

B. cAMP 1 μ M

	ng cAMP gehydrolyseerd per minuut per mg eiwit tussen 0 en 10 minuten	
	controle	cortisol *)
Exp. I	13,40	15,80
Exp. II	10,70	5,60

*) Ratten behandeld gedurende 14 dagen met 4 - 5 mg cortisol per kg lichaamsgewicht in het drinkwater.

van ^3H -adenosine via ^3H -5'-AMP uit ^3H -cAMP.

Deze meting kan volgens Rutten e.a. (1973a) niet zonder meer worden toegepast op homogenaten en andere ongezuiverde enzympreparaten: hierin zijn meestal enzymen aanwezig die 5'-AMP verder omzetten tot andere produkten zoals inosine, adenine en hypoxanthine. Daar deze afbraakprodukten volgens de door Loten en Sneyd beschreven methode niet worden geëluëerd van de gebruikte kolom treedt een aanzienlijke onderschatting van de PDE-aktiviteit op (Rutten e.a., 1973a). Dit is door laatstgenoemde auteurs ondervangen door elutie met NaHCO_3 .

Methode

Uit vetcellsuspensies, bereid volgens Rodbell (zie hoofdstuk II) werden met een Potter homogenisator (type RM 18) in 15 seconden homogenaten gemaakt na verdunning met een gelijk volume 0,5 M mannitol.

De bepaling werd uitgevoerd in eindconcentraties van 0,05 M kaliumfosfaatbuffer (pH 7,5) en 0,01 M $MgCl_2$ met 50 μl homogenaat en verschillende hoeveelheden 3H -cAMP; het eindvolume bedroeg 0,5 ml. Dit incubatie-mengsel werd voor de toevoeging van 3H -cAMP gedurende 5 minuten voorgeïncubeerd bij 37°C.

De periode waarover de reactie werd gemeten begon bij de toevoeging van de 3H -cAMP-oplossing. Als hoeveelheden substraat werden gebruikt: 20 en 50 μl van een oplossing van 10 μM 3H -cAMP (spec. akt.: 20,2 $\mu Ci/\mu mol$) en 5, 10, 20 en 50 μl van een oplossing van 0,2 mM 3H -cAMP (spec. akt.: 24,9 $\mu Ci/\mu mol$) en 5, 10, 20 en 50 μl van een oplossing van 5,2 mM 3H -cAMP (spec. akt.: 0,960 $\mu Ci/\mu mol$). Dit kwam overeen met de volgende 10 eindconcentraties cAMP: 0,4 - 1 - 2 - 4 - 8 - 20 - 52 - 104 - 208 en 520 μM . Bij ieder van deze bepalingen werd steeds een blanco incubatie verricht waarbij de 3H -cAMP-oplossing werd toegevoegd na destructie van het enzym door koken.

Na 20 minuten werd de incubatie beëindigd door 3 minuten koken bij 100°C. Na afkoelen tot 37°C in een waterbad werd vervolgens 30 minuten bij 37°C geïncubeerd met 50 μl van een nucleotidase-oplossing (0,5 mg/ml slangegif, v-7000, Sigma), teneinde alle tijdens de incubatie gevormd 3H -5'-AMP om te zetten in 3H -adenosine. Deze incubatie werd afgebroken door toevoeging van 50 μl 50 mM niet-radioactief adenosine. cAMP werd gescheiden van de produkten door het totale incubaat op een Dowex AG-1-x2 anionenwisselaar (200-400 mesh, Cl^- -vorm) te brengen en door middel van elutie met 10 ml 0,1 M $NaHCO_3$ de nucleosiden te eluëren (het cAMP blijft op de kolom achter). Vervolgens werd de radioactiviteit van 2 ml van het eluaat in Instagel gemeten in een Packard Tricarb scintillatie-teller.

Resultaten

Het bleek dat de hydrolyse van cAMP in het gebruikte enzym-preparaat lineair met de tijd verliep, tenminste tot en met 30 minuten (figuur 8a). Er is voorts een lineair verband tussen activiteit en hoeveelheid toegevoegd eiwit tenminste tot 50 μ l van een 1 : 1 verdund homogenaat van geïsoleerde vetcellen (figuur 8b).

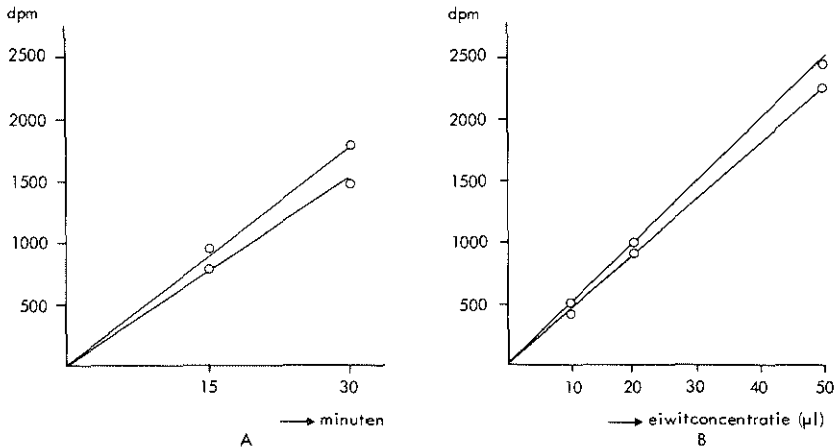


Fig. 8. A. Het verloop van de hydrolyse van cAMP in de tijd. Gegevens van twee experimenten. Eindconcentratie cAMP: 3 μ M; enzymconcentratie 25 μ l van een 50% homogenaat.
B. De relatie tussen de hydrolyse van cAMP en de enzymconcentratie (μ l van een 50% homogenaat), gegevens van twee experimenten. Eindconcentratie cAMP 3 μ M; duur van de reactie 30 minuten.

In figuur 9 is de fosfodiësterase-activiteit volgens Lineweaver-Burk uitgezet tegen de concentratie cAMP. Gezien de onzuiverheid van het gebruikte enzym-preparaat lijkt het niet gerechtvaardigd om van K_m en V_{max} te spreken: beter lijkt het dit resp. de "apparent" K_m (verder $K_{(m)}$) en de "apparent" V_{max} (verder $V_{(max)}$) te noemen. Bij lage substraat-concentraties wordt een rechte lijn gevonden en bij extrapolatie wordt een $K_{(m)}$ voor cAMP van 2.78 μ M en een $V_{(max)}$ van 0,6095 berekend. Bij substraat-concentraties boven 4 μ M wijkt de curve van lineair af, hetgeen de aanwezigheid van een tweede enzym met een hogere K_m suggereert.

Spears, Loten en Sneyd publiceerden in 1971 een methode om met behulp van een computerprogramma een goede benadering van

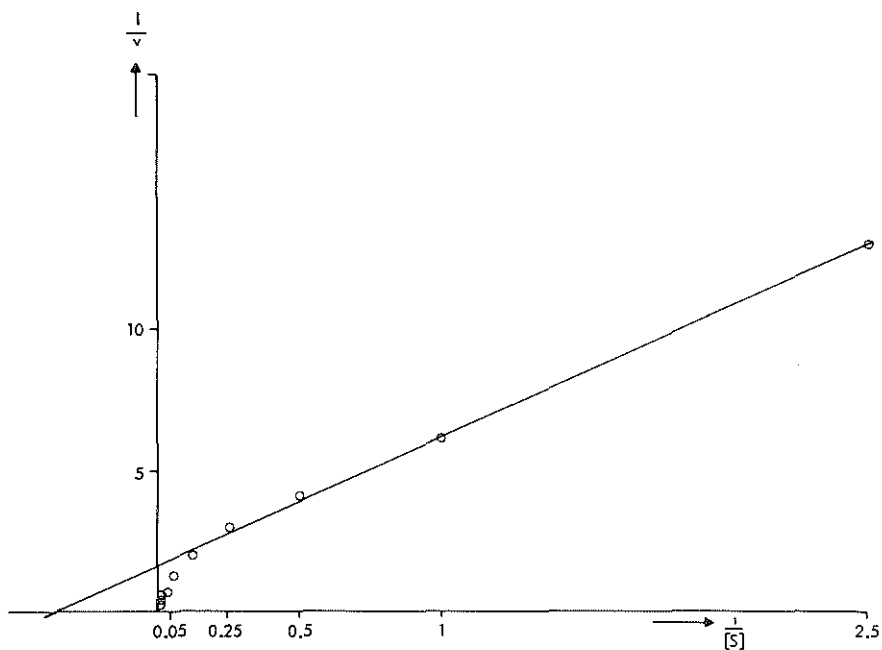


Fig. 9. De fosfodiësterase-activiteit volgens Lineweaver-Burk uitgezet tegen de concentratie cAMP in een experiment met een homogenaat van geïsoleerde vetcellen.

de waarde van deze kinetische parameters te verkrijgen. Zij berekenden dat in een mengsel van twee enzymen als hier gevonden, het enzym met de relatief hoge K_m voor 38% aan de gevonden reaktiesnelheid bijdraagt bij een substraat-concentratie van $1 \mu\text{M}$. Bij gebruik van $50 \mu\text{M}$ cAMP draagt het enzym met de lage K_m voor 11,3% bij tot de gevonden snelheid. In dit onderzoek werd gebruik gemaakt van een door Rutten e.a. (1973b) beschreven methode van kruiscorrectie waarbij de activiteit bij hoge substraat-concentraties wordt gecorrigeerd voor de bijdrage van het enzym met de lage K_m . Wanneer de K_m - en V_{max} -waarde van de twee enzymen aldus benaderd zijn, kan de activiteit bij een lage substraat-concentratie ook weer gecorrigeerd worden voor de bijdrage van het enzym met de hoge K_m . Deze kruiscorrectie kan steeds worden herhaald met het doel zo exakt mogelijke waarden voor de kinetische parameters van beide enzymen te verkrijgen. In tabel XIII zijn dergelijke correcties uitgevoerd voor het experiment van figuur 9. Vier achtereenvolgende correcties (twee voor ieder enzym) bleken voldoende om getallen voor

Tabel XIII

Meervoudige kruiscorrectie volgens Rutten e.a. (1973b) van $K_{(m)}$ en $V_{(max)}$ van fosfodiësterasen in vetcelhomogenaten (dit zijn gegevens van het experiment, afgebeeld in figuur 9).

	Lage K_m enzym		Hoge K_m enzym	
	$K_{(m)}$ (μM)	$V_{(max)}$ ($\mu mol/min./mg$ eiwit)	$K_{(m)}$ (μM)	$V_{(max)}$ ($\mu mol/min./mg$ eiwit)
Afgelezen uit fig. 9	2,78	0,6095		
na 1e correctie			326	8,08
na 2e correctie	1,85	0,3775		
na 3e correctie			252	7,71
na 4e correctie	1,62	0,3293		
na 5e correctie			239	7,62
na 6e correctie	1,57	0,3190		
na 7e correctie			237	7,65
na 8e correctie	1,57	0,3190		

$V_{(max)}$ en $K_{(m)}$ van beide enzymen te verkrijgen die niet meer door elkaar werden beïnvloed. Voortgaande correctie leverde 5% of minder verandering op. De enzym-activiteit varieerde enigszins van het ene vetcelhomogenaat tot het andere; om deze reden werd de eventuele invloed van overmaat glucocorticoïed hormoon steeds onderzocht in gepaarde experimenten. De toediening in vivo van een hoge dosis cortisol bleek zowel de $K_{(m)}$ als de $V_{(max)}$ van het fosfodiësterase met de lage K_m voor cAMP in homogenaten van geïsoleerde vetcellen significant te verlagen resp. te remmen (tabel XIV). Er werden geen significante veranderingen gevonden in de kinetische eigenschappen van het enzym met de hoge K_m .

Discussie

De totale PDE-activiteit werd gemeten bij een substraat-concentratie van $10 \mu M$ cAMP en bleek onder die omstandigheden niet significant verschillend bij dieren die met cortisol waren behandeld en bij onbehandelde dieren. De gebruikte concentratie cAMP ligt aan de bovengrens van de fysiologische spreiding van het cAMP-gehalte van

Tabel XIV

Kinetische parameters van twee fosfodiësterasen in vetcel-homogenaten van controle ratten en met cortisol behandelde ratten *)

	PDE enzym met lage K_m				PDE enzym met hoge K_m			
	K_m (μM)		$V_{(max)}$ ($\mu mol/min/mg$ eiwit)		K_m (μM)		$V_{(max)}$ ($\mu mol/min/mg$ eiwit)	
	controle	cortisol	controle	cortisol	controle	cortisol	controle	cortisol
Exp. I	1,81	1,06	0,303	0,201	149	147	4,13	4,00
Exp. II	3,62	1,96	0,394	0,214	81	115	5,67	4,26
Exp. III	4,54	2,96	0,610	0,612	73	159	2,20	3,35
Exp. IV	3,00	1,54	0,487	0,207	176	344	5,42	5,99
Exp. V	1,78	1,62	0,432	0,329	120	252	3,88	7,71
gem. \pm S.D.	2,95 \pm 1,19	1,83 \pm 0,71	0,445 \pm 0,114	0,313 \pm 0,176	119,8 \pm 43,9	203,4 \pm 93,7	4,26 \pm 1,39	5,06 \pm 1,77
	p < 0,025		p < 0,05		n.s.		n.s.	

*) Ratten gedurende 14 dagen behandeld met 4-5 mg cortisol per kg in het drinkwater. De getallen in deze tabel zijn verkregen na 4 correcties, als aangegeven in de tekst en in tabel XIII.

de vetcel (Fain, 1973). Met 1 μM cAMP bleek het substraat echter na 20 minuten verbruikt te zijn. Vervolgens werden de $V_{(\text{max})}$ en $K_{(\text{m})}$ van beide fosfodiësterasen uit de vetcel zo nauwkeurig mogelijk bepaald volgens de door Loten en Sneyd (1970) beschreven methode waarbij de verschijning van radioactiviteit in 5^3-AMP en daaruit gevormde nucleosiden uit $^3\text{H-cAMP}$ wordt gebruikt als maat voor de PDE-aktiviteit, met recent beschreven verbeteringen van deze methodiek bij de scheiding en met de correctie van de kinetische parameters van de enzymen met de hoge resp. de lage K_{m} volgens Rutten e.a. (1973a en b).

De door ons gevonden $K_{(\text{m})}$ -waarden: 3,0 resp. 120 μM komen goed overeen met die vermeld in de literatuur: Appleman e.a. (1973) berekenden uit de publikaties van Hepp e.a. (1969), Loten e.a. (1970) Solomon (1970), Klotz e.a. (1972), Schönhöfer e.a. (1972) en Blecher e.a. (1968) een waarde voor de lage K_{m} voor cAMP tussen 0,9 tot 3 μM en voor de hoge K_{m} tussen 38 en 500 μM in ratte-vetcellen.

In de meeste weefsels, waaronder vetweefsel, is het fosfodiësteraase met de lage K_{m} voor cAMP waarschijnlijk in de membraan-fractie gelokaliseerd en het minder specifieke enzym met de lagere affiniteit voor cAMP in de oplosbare fractie (Appleman e.a., 1973).

Onze bevindingen zijn niet in strijd met die van Senft e.a. (1968) en Manganiello e.a. (1972 en 1973). Senft en medewerkers rapporteerden dat behandeling van geadrenalectomeerde ratten met 6-methyl-prednisolon de toegenomen PDE-aktiviteit van homogenaten van epididymaal vetweefsel weer verminderde. De afname in de PDE-aktiviteit van vetweefsel trad echter pas 15 uur na een enkele subcutane injectie van prednisolon op. Volgens Manganiello e.a. (1972) trad bij incubatie van hepatoma-cellen in kweek met dexamethason gedurende 36 uur een significante afname in de PDE-aktiviteit op. Dezelfde onderzoekers vonden dat behandeling van ratten met dexamethason (in de vorm van een éénmalige subcutane injectie van 0,5 mg) de PDE-aktiviteit van homogenaten van geïsoleerde vetcellen vermindert (Manganiello e.a., 1973). Dit effect dat slechts aantoonbaar was bij cAMP-concentraties lager dan 10 μM trad bovendien pas op 20 uur na de injectie van dexamethason; het effect was het meest uitgesproken in een celmembraan-fractie. Deze auteurs vermeldden verder dat ze er niet in geslaagd zijn om een dergelijk effect van dexamethason aan te tonen in vetcellen die in *vitro* met dexame-

thason waren vóórgeïncubeerd, mogelijk als gevolg van het feit dat hiervoor een veel langere incubatie-periode vereist is.

Conclusie

1. De "totale" PDE-activiteit in vetcel-homogenaten van onbehandelde en met cortisol behandelde ratten verschilt niet wanneer een substraat-concentratie van $10 \mu\text{M}$ cAMP wordt gebruikt. Dit is aan de bovengrens van de fysiologische concentratie. Met een lagere concentratie cAMP ($1 \mu\text{M}$) is het in deze proefopstelling in feite niet goed mogelijk de "totale" PDE-activiteit te meten, omdat 10 minuten na het begin van de incubatie het cAMP vrijwel niet meer aantoonbaar is.
2. Wanneer de PDE-activiteit wordt gemeten volgens een methode waarbij de kinetische eigenschappen van zowel het lage als het hoge K_m -enzym berekend kunnen worden, wordt onder invloed van cortisol een significante daling van de K_m en van de $V_{(\text{max})}$ alleen van het enzym met de lage K_m gevonden. Deze gegevens stemmen overeen met die van Senft e.a. (1968) en Manganiello e.a. (1972 en 1973).
3. Voor de bespreking van de consequenties van deze bevindingen wordt verwezen naar de algemene discussie van dit hoofdstuk.

4. D. De intracellulaire concentratie cAMP

Inleiding

Het waarnemen van een verandering van de intracellulaire cAMP-concentratie in geïsoleerde vetcellen onder invloed van adrenaline zonder bijvoeging van een PDE-remmende stof is technisch moeilijk (Butcher e.a., 1968). Tesamen met bijvoorbeeld theofylline doet adrenaline de cAMP-concentratie binnen 30 seconden stijgen tot een maximum na 6 minuten: de stijging kan meer dan tienmaal de uitgangswaarde bedragen; zonder toevoeging van theofylline maten Butcher e.a. (1965) onder invloed van adrenaline slechts een geringe maximale stijging van cAMP van 180 tot 290 pmol cAMP per gram vetweefsel bij een gelijktijdige maximale stimulatie van de lipolyse.

Na de toevoeging van adrenaline zonder theofylline aan de vetcelluspensie is het cAMP-gehalte in geïsoleerde vetcellen reeds binnen 1 minuut verhoogd; het maximum wordt bereikt na 4 tot 7 minuten, waarna een daling volgt tot de concentratie na 10 tot 15 minuten slechts weinig boven de uitgangswaarde ligt (Manganiello e.a., 1971). De lipolyse blijft echter in aanwezigheid van adrenaline ondanks de daling in de cAMP-concentratie geactiveerd. De zeer hoge stijging in de intracellulaire cAMP-concentratie onder invloed van adrenaline die in de aanwezigheid van bijvoorbeeld theofylline gevonden wordt, is waarschijnlijk van geringe fysiologische betekenis: voor maximale stimulatie van de lipolyse is slechts een geringe, kortdurende stijging van de cAMP-concentratie nodig (Fain, 1973). Het voornaamste probleem bij de bepaling van de stijging van de cAMP-concentratie is, dat de toename van cAMP onder invloed van lipolytische hormonen, noodzakelijk voor maximale stimulatie van de lipolyse, zo gering is dat zij moeilijk met voldoende betrouwbaarheid is te meten, vooral ook door de hoge basale waarde van het totale cAMP, terwijl toevoeging van PDE-remmers een zeer sterke en dus veel gemakkelijker meetbare stijging in de cAMP-concentratie veroorzaakt die echter niet dezelfde betekenis heeft als de concentratie-verhoging na adrenaline alleen.

Methodie

Keuze methodiek

1. De cAMP-concentratie wordt gemeten in een monster van weefsel met medium. De grootste accumulatie van cAMP onder invloed van adrenaline vindt niet plaats in geïncubeerde vetcellen maar in het incubatie-medium (Moskowitz e.a., 1970); ook Schönhöfer e.a. (1971) vonden dat 40% van het onder invloed van adrenaline gevormde cAMP in vetcellen, binnen 10 minuten de cellen verlaat. Onafhankelijk van de aard van het stimulerend hormoon bleek het extra-cellulair gevonden cAMP steeds ten minste 1/3 van het totale cAMP-gehalte van het vetcelincubatie-mengsel te bedragen (Jarett e.a., 1972).
2. Voor de bepaling van het cAMP-gehalte op een bepaald tijdstip moet de fixatie van het weefsel snel en afdoende geschieden,

aangezien de omzettingssnelheid van cAMP in het weefsel hoog is. Bepaalde weefsels zoals het epididymale vetweefsel en de bijnier van de rat kunnen zonder belangrijk verlies van cAMP direkt in HCl worden gehomogeniseerd (Butcher e.a., 1968, Grahame-Smith e.a., 1967).

3. De bepaling van cAMP kan direkt worden verricht in het heldere infranatant van vetcellen met medium zonder dat tevoren een scheiding over Dowex-kolommen noodzakelijk is. De uitkomsten van cAMP-bepalingen in extracten van vetcellsuspensies worden door chromatografie over Dowex-kolommen niet beïnvloed (Fain e.a., 1972).

Uitvoering

Geïsoleerde vetcellen werden enerzijds bereid uit epididymale vetweefselfragmenten die gedurende 4 uur waren vóóргеïncubeerd zonder/met 0,1 μ g dexamethason per ml incubatie-medium (1e serie), anderzijds uit epididymale vetweefsel-fragmenten van onbehandelde of gedurende 14 dagen met 4-5 mg cortisol per kg lichaamsgewicht in het drinkwater behandelde ratten (2e serie). Voor details omtrent deze methoden wordt verwezen naar hoofdstuk II. Op tijdstip 0 en bovendien bij de tweede serie experimenten na 3 en 6 minuten incubatie met 1 μ g adrenaline per ml incubatie-medium, werd de cAMP-concentratie in vetcellen met medium bepaald. De incubaties werden afgebroken door toevoeging van 1 ml 1N HCl. Na homogenisatie (Potter) in HCl werden de incubaten gedurende 10 minuten gekookt bij 100°C, afgekoeld en gecentrifugeerd (3000 x g). Uit het heldere infranatant werden monsters van 0,5 ml genomen voor de bepaling van cAMP.

Resultaten

De basale cAMP-concentratie in gesuspenderde vetcellen veranderde onder invloed van voorbehandeling van het vetweefsel met dexamethason niet (tabel XV). In dezelfde vetcellsuspensies was onder invloed van dexamethason een toename van de door adrenaline gestimuleerde lipolyse aantoonbaar (gegevens niet geïllustreerd).

Tabel XV

De invloed van vóórincubatie met dexamethason op de basale cAMP-concentratie in gesuspendeerde vetcellen *).

	cAMP concentratie (pmol/mg TG)	
	controle	dexamethason
Exp. I	0,318	0,331
Exp. II	0,329	0,322
Exp. III	0,229	0,258
gem. \pm S.D.	0,292 \pm 0,055	0,304 \pm 0,040

*) Fragmenten van epididymale vetkwabjes werden gedurende 4 uur geïncubeerd met en zonder dexamethason (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). In het vierde uur van de incubatie werd collagenase toegevoegd.

Onder invloed van een overmaat glucocorticoïed hormoon in vivo, nl. na een voorbehandeling met cortisol gedurende 14 dagen bleek de basale cAMP-concentratie significant hoger te zijn dan in gesuspendeerde vetcellen van onbehandelde ratten (tabel XVI).

De stijging van de cAMP-concentratie gedurende incubatie met adrenaline was voor de cellen van de onbehandelde en de met cortisol behandelde ratten echter niet verschillend: tussen 0 en 3 minuten was de stijging 0,066 resp. 0,058 pmol/mg TG. Tussen 3 en 6 minuten incubatie werd alleen bij de vetcellen van de onbehandelde ratten nog een geringe stijging van de concentratie cAMP gemeten.

Discussie

De hier gevonden basale concentratie van cAMP in vetcellen van onbehandelde ratten komt overeen met de in de literatuur opgegeven waarden: 500 pmol/gram geïsoleerde vetcellen (Manganiello e.a., 1971), 460 pmol/gram drooggewicht (Butcher e.a., 1968) en 500 pmol/gram drooggewicht (Allen e.a., 1972). De hier vermelde basale cAMP waarden komen bij een schatting van een percentage intracellulair water in vetcellen van 5% van het celgewicht neer op een basale intracellulaire cAMP-concentratie in de vetcel van ca. 10 μM (volgens Fain (1973): 1-10 μM).

Tabel XVI

De invloed van behandeling met cortisol op de cAMP concentratie tijdens incubatie van vetcellsuspensies met adrenaline.

	cAMP concentratie (pmol/mg TG)					
	CONTROLE			CORTISOL *)		
	0'	3'	6'	0'	3'	6'
Exp. I	0,588	0,700	0,697	0,916	0,980	0,968
Exp. II	0,778	0,810	0,893	0,986	1,063	0,899
Exp. III	0,758	0,784	0,793	1,196	1,308	1,222
Exp. IV	0,954	1,009	1,061	1,565	1,738	1,395
Exp. V	0,294	0,478	0,525	0,323	0,392	0,334
Exp. VI	0,525	0,516	0,536	1,014	0,911	0,870
Exp. VII	0,294	0,355	0,280	0,323	0,377	0,336
gem. ± S.D.	0,599 ^a ± 0,250	0,665 ± 0,277	0,684 ± 0,261	0,903 ^a ± 0,450	0,961 ± 0,492	0,865 ± 0,398

^a) $p < 0.025$

*) Epididymaal vetweefsel van gedurende 14 dagen met 4-5 mg cortisol per kg in het drinkwater behandelde ratten. Bereiding geïsoleerde vetcellen en incubatiemethoden met een maximale op de lipolyse werkzame concentratie adrenaline (1 µg/ml): zie paragraaf methoden, hoofdstuk II.

Conclusies:

1. de basale concentratie cAMP is in geïsoleerde vetcellen uit epididymale vetweefselfragmenten die met en zonder dexamethason (0,1 $\mu\text{g/ml}$) werden voorgeïncubeerd gelijk. In vetcellen, op overeenkomstige wijze voorgeïncubeerd met dexamethason, is wel een versnelling van de door adrenaline gestimuleerde lipolyse aantoonbaar.
 2. Na voorbehandeling van de rat met cortisol is de basale concentratie cAMP in vetcellen hoger dan in vetcellen van onbehandelde ratten.
 3. Gedurende de eerste drie minuten incubatie met adrenaline is de stijging van de concentratie cAMP in geïsoleerde vetcellen van onbehandelde en met cortisol behandelde ratten gelijk.
4. E. Meting van de proteïne kinase-activiteit

Inleiding

De aktivatie van proteïne kinase (PK) lijkt het belangrijkste zoal niet het enige mechanisme te zijn waarlangs cAMP zijn functie als tweede boodschapper bij de overdracht van hormonale stimuli vervult (Langan, 1973). cAMP-afhankelijke proteïne kinasen zijn in alle onderzochte dierlijke weefsels aangetroffen (Kuo e.a., 1970). De enzymen katalyseren de fosforylering van eiwitsubstraten door het overdragen van de γ -fosfaat-groep van ATP op eindstandige serine-residuen in de peptide-ketens van het substraat.

Het proteïne kinase bestaat uit een regulerende subeenheid en een katalytische subeenheid, die indien in een complex gebonden inactief zijn. In de aanwezigheid van cAMP wordt de regulerende subeenheid gebonden, waardoor de katalytische subeenheid in een actieve vorm vrijkomt (Brostrom e.a., 1971, Miyamoto e.a., 1973 en Soderling e.a., 1973).

Er doen zich bij de nu gebruikelijke PK-bepalingen een aantal problemen ten aanzien van de interpretatie voor:

1. Keuze van het substraat. Langan (1968) legde de basis voor de

meest gebruikte PK-bepalingen, toen hij vond dat cAMP in homogenaten van leverweefsel de fosforylering van histonen katalyseert. In de in de literatuur beschreven methoden wordt vrijwel steeds histon als substraat bij de PK-bepalingen gebruikt. Het cAMP-afhankelijke PK heeft een lage specificiteit en is geïsoleerd in verschillende weefsels werkzaam. Als substraat kunnen naast histon, ook protamine, caseïne, het hormoon-gevoelige triglyceride-lipase, het glycogeen synthase I en het glycogeen fosforylase b kinase dienen (Walsh e.a., 1973).

2. Bij de bereiding van het homogenaat voor de PK-bepaling moet men een verschuiving van het evenwicht tussen het complex van regulerende en katalytische subeenheden van het proteïne kinase enerzijds en de gedissocieerde eenheden anderzijds, trachten te voorkomen. De volgende factoren lijken hierbij van belang:
 - a. de proteïne kinase remmer. Deze fysiologisch voorkomende hitte-stabiele remmer werkt op de katalytische subeenheid nadat de regulatoire door cAMP van het enzymcomplex is losgemaakt (Walsh, 1973).
 - b. de ATP-concentratie en de ATP-ase activiteit. Voorincubatie van proteïne kinase met ATP resulteert in een verminderde binding van cAMP aan het PK en veroorzaakt tegelijkertijd een toename van de behoefte aan cAMP om het enzym te activeren. ATP-ase stoort de bepaling van PK doordat het met PK een competitie voert voor het ATP. Het effect van het ATP-ase in een vetweefselhomogenaat op de PK assay wordt aanzienlijk verminderd door toevoeging van natriumfluoride (Corbin e.a., 1973).
 - c. Het is ongewenst dat de concentratie vrij cAMP zoals die in het te onderzoeken weefsel aanwezig is verandert tijdens de bereiding van het homogenaat. Om afbraak van cAMP door PDE tijdens de homogenisatie van vetweefsel c.q. vetcellen te verminderen wordt theofylline toegevoegd. De hydrolyse van cAMP wordt vrijwel geheel voorkomen door bovendien EDTA toe te voegen (Corbin e.a., 1973).
 - d. Vrijwel alle cAMP-afhankelijke PK-activiteit is in vetcellen in de cytosol gelokaliseerd. Het is bij de bepaling van PK van groot belang om een zo laag mogelijke homogenaat-concentratie te gebruiken om goed initiële snelheden te kunnen

- meten. Bij hogere concentraties produkt zullen de fosfatasen, die ook in het reactie-mengsel aanwezig zijn, het fosfaat dat reeds in het substraat geïncorporeerd is relatief snel kunnen verwijderen (persoonlijke mededeling B.A. Cooke).
- e. Ook het toegevoegde substraat dat als acceptor van het fosfaat van ATP dienst moet doen blijkt in het homogenaat het genoemde evenwicht van het PK te kunnen beïnvloeden. Miyamoto e.a. (1971 en 1973) toonden in runderhersen aan dat het cAMP-afhankelijke PK in afwezigheid van cAMP onder invloed van de toevoeging van histon in de beide sub-eenheden dissociëren kan.
 - f. Een belangrijke oorzaak voor een verandering in het evenwicht van het PK-enzym is de tijdens de bereiding van het enzym-mengsel onvermijdelijke verdunning. Het bleek echter mogelijk om een aanzienlijke graad van stabiliteit van het enzym te verkrijgen door NaCl toe te voegen tijdens de homogenisatie van het vetweefsel. Na toevoeging van NaCl bleek de PK-aktiviteit over een groot verdunnings-traject constant (Corbin e.a., 1973). Opgemerkt moet worden dat er volgens de waarnemingen van Walaas e.a. (1973) in spierweefsel en van B.A. Cooke (persoonlijke mededeling) in testweefsel, onder invloed van toevoeging van NaCl juist een dissociatie van het enzym-complex optreedt.

Methodie

De proteïne kinase-aktiviteit van geïsoleerde vetcellen werd bepaald aan de hand van de snelheid van histon-³²P-fosforylering al of niet in aanwezigheid van cAMP volgens de methode van Miyamoto e.a. (1969) met enkele wijzigingen volgens Corbin e.a. (1973).

1 ml vetcelsuspensie (zie hoofdstuk II) wordt gehomogeniseerd (Potter, type RM 18) in 3 ml van een oplossing van 10 mM kaliumfosfaat-buffer (pH 6,5), 10 mM EDTA, 2 mM theofylline en 0,5 M NaCl. Het homogenaat werd gedurende 5 minuten bij 4°C gecentrifugeerd (12.000 x g) en het "infranatant" gebruikt voor de bepaling.

Het bepalingmengsel (eindvolume van 0,1 ml) bevatte: 10 μmol kaliumfosfaat (pH 6,5), 2 μmol NaF, 3 μmol Mg-acetaat, 0,5 mg histon (kalfsthy-mushiston type II, Sigma) en 2 nmol (γ-³²P)-ATP

(Amersham; overeenkomend met ongeveer 500.000 cpm) en, indien toegevoegd 1 nmol cAMP.

De reactie werd gestart door toevoeging van 10 μ l enzymoplossing; de incubaties (in triplo) werden gedurende 5 minuten uitgevoerd in een schuddend waterbad bij 30°C. De reactie werd afgebroken door toevoeging van 2 ml 10% trichloorazijnzuur; vervolgens werd 50 μ l 1% runder serumalbumine toegevoegd en werd het mengsel gedurende 10 minuten op 0°C gehouden. Vervolgens vond centrifugatie plaats (5 minuten 2000 x g bij 0°C) en werd de neergeslagen pellet 5 x gewassen met dubbel gedestilleerd water, waarna het precipitaat werd opgelost met 0,1 ml NaOH (1 N). De radioactiviteit van het in histon geïncorporeerde 32 P werd gemeten in een Packard Tricarb scintillatie-teller na oplossing van het monster in methoxyethanol in scintillatie-vloeistof.

De proteïne kinase-activiteit werd uitgedrukt in picomolen fosfaat per 5 minuten per mg homogenaat-eiwit geïncorporeerd.

Resultaten

Begonnen werd met het meten van de PK-activiteit in homogenaten van vetweefsel. Het gebruik van homogenaat van vetcelsuspensies bleek echter een hogere incorporatie van fosfaat met cAMP ten opzichte van die zonder cAMP op te leveren. Deze waarneming stemt overeen met die van Corbin e.a. (1969b). Vervolgens werd een optimale concentratie enzym gezocht.

De concentratie cAMP, die een maximale activiteit van het proteïne kinase veroorzaakte, werd in een dosis-werkingscurve nagegaan; met achtereenvolgens eindconcentraties van 0,25 / 0,5 / 1 en 10 x 10⁻⁶M cAMP werd een fosfaat-incorporatie van resp. 3,22 / 4,74 / 6,17 en 12,02 pmol per 5 minuten per mg eiwit gevonden. Op grond hiervan werd steeds 1 nmol cAMP aan het eindvolume van 0,1 ml toegevoegd hetgeen overeenkomt met een eindconcentratie van 10 μ M.

De invloed van de incubatie-duur werd in een apart experiment nagegaan (in *vetweefsel*-homogenaat): tussen 0 en 1,5 min. werd 0,37, tussen 1,5 en 3 min. 0,34, tussen 3 en 5 min. 0,22, tussen 5 en 10 min. 0,13 en tussen 10 en 30 min. 0,07 pmol fosfaat per minuut per mg eiwit geïncorporeerd in de aanwezigheid van cAMP. Dit leid-

de tot de keuze van een incubatietijd van 5 minuten.

In tabel XVII zijn de gegevens vermeld van de van cAMP afhankelijke PK-activiteit in homogenaten van vetcelsuspensies van epididymale vetweefselfragmenten die gedurende 4 uur werden vóórgeïncubeerd met dexamethason (0,1 µg/ml). In het homogenaat van die vetcelsuspensies, waarvan de door adrenaline gestimuleerde lipolyse door het glucocorticoïed hormoon werd verhoogd, bleek de activiteit van het proteïne kinase zonder toevoeging van cAMP onveranderd, terwijl die in aanwezigheid van cAMP significant was toegenomen.

Een overeenkomstig beeld wordt verkregen wanneer de PK-activiteit met en zonder cAMP wordt onderzocht in homogenaat van vetcelsuspensies van met cortisol voorbehandelde ratten (tabel XVIII).

Tabel XVII

Effekt van preincubatie van epididymaal vetweefsel met dexamethason op de door adrenaline gestimuleerde lipolyse van vetcelsuspensies en op de proteïne kinase-activiteit van vetcelhomogenaten.

	lipolyse (glycerolproductie) nmol/min/mg TG		proteïne kinase (pmol P geïncorporeerd/5 min/mg eiwit)			
	controle vetcellen	met dexamethason behandelde vetcellen	controle vetcellen		met dexamethason behandelde vetcellen	
			zonder cAMP	met cAMP	zonder cAMP	met cAMP
Exp. I			12,7	26,7	4,8	33,8
Exp. II			9,8	25,2	3,4	29,6
Exp. III			29,4	62,9	28,4	82,8
Exp. IV	0,27	0,44	3,7	10,8	4,6	13,3
Exp. V	0,46	0,56	11,4	47,2	10,9	52,4
Exp. VI	0,44	0,50	25,9	36,9	16,4	45,6
Exp. VII	0,15	0,20	11,8	14,2	10,0	29,3
gem. ± S.D.	0,33 ± 0,15 ^x	0,43 ± 0,16 ^x	15,0 ± 9,2 ^o	32,0 ± 18,5*	11,2 ± 8,9 ^o	41,0 ± 14,8*

x p < 0.05

o n.s.

* p < 0.01

Dexamethasonconcentratie 0.1 µg per ml; incubatieduur: 4 uur.

Tabel XVIII

Effekt van de behandeling met cortisol in vivo op de door adrenaline gestimuleerde lipolyse van vetcelsuspensies en op de proteïne kinase-activiteit van vetcelhomogenaten.

	lipolyse (glycerolproduktie) nmol/min/mg TG		proteïne kinase (pmol P geïncorporeerd/5 min/mg eiwit)			
	controle vetcellen	met cortisol behandelde vetcellen	controle vetcellen		met cortisol behandelde vetcellen	
			zonder cAMP	met cAMP	zonder cAMP	met cAMP
Exp. I	0,35	0,47	10,4	23,1	23,3	36,4
Exp. II	0,18	0,56	8,7	14,6	13,2	26,2
Exp. III	0,65	1,48	11,6	27,9	10,3	24,1
Exp. IV	0,29	1,00	22,4	31,7	20,6	43,7
Exp. V	0,45	1,41	6,4	18,9	10,6	28,9
Exp. VI	0,07	0,32	1,5	4,1	3,2	6,8
gem. ± S.D.	0,33 ± 0,20 ^x	0,87 ± 0,50 ^x	10,2 ± 7,0 ^o	20,0 ± 9,9 [*]	13,6 ± 7,4 ^o	27,7 ± 12,5 [*]

x $p < 0.025$

o n.s.

* $p < 0.05$

Ratten behandeld gedurende 14 dagen met 4 - 5 mg cortisol per kg in het drinkwater.

Discussie

Zoals in de inleiding vermeld, stuit men bij de interpretatie van de bevindingen bij cAMP-afhankelijke proteïne kinase-activiteitsmetingen in extracten van weefsels op moeilijkheden ten aanzien van de situatie in vivo. De mate van verschuiving van het evenwicht van het enzymcomplex in de richting van dissociatie die op kan treden tijdens de extractie-procedure is niet goed vast te stellen. Door toevoeging van NaCl aan het homogenisatie-mengsel zoals door ons volgens Corbin e.a. (1973) toegepast, kan een verschuiving in de richting van het enzymcomplex optreden die eveneens een deviatie van de werkelijke toestand in de cel kan betekenen (Walaas e.a.,

1973, B.A. Cooke, persoonlijke mededeling).

De in dit onderzoek gevonden cAMP-onafhankelijke PK-activiteit bleek relatief hoog. Dit kan enerzijds mede een gevolg zijn geweest van dissociatie van het enzymcomplex door het als substraat toegevoegd histon (Miyamoto e.a., 1971); anderzijds kan hierbij de waarneming van Walaas e.a. (1973) van betekenis zijn dat tijdens zuivering van het enzym in spier meer dan 80% van de cAMP-onafhankelijke PK-activiteit verloren gaat: dit suggereert dat alleen de bepaling van de cAMP-afhankelijke PK-activiteit (van een meer gezuiverd enzym) in feite een beeld geeft van de hoeveelheid subeenheden in complexvorm van het proteïne kinase in het weefsel.

De hier gevonden waarneming dat de van cAMP-afhankelijke activiteit van het proteïne kinase onder invloed van voorbehandeling met een overmaat glucocorticoïed hormoon is toegenomen stemt overeen met twee recente waarnemingen in de literatuur: Zapf e.a. (1973) vonden in vetweefsel van geadrenalectomeerde ratten afname van de proteïne kinase-activiteit met 30%, terwijl Gorin e.a. (1974) in vetweefsel van gehypofysectomeerde ratten die dus naast een verminderde cortisol-produktie ook een verminderde secretie van groeihormoon, ACTH en TSH hadden, een afname van zowel de cAMP-afhankelijke als -onafhankelijke proteïne kinase-activiteit.

Conclusie

Zowel na voorbehandeling met een overmaat glucocorticoïed hormoon in vitro als na voorbehandeling in vivo bleek de van cAMP afhankelijke proteïne kinase-activiteit in homogenaat van epididymale vetcellen van de rat verhoogd.

5. Samenvatting

De aanwezigheid van cortisol is noodzakelijk voor het normaal optreden van de lipolyse in vetweefsel. De aanwezigheid van een overmaat glucocorticoïed hormoon geeft geen verandering in de basale lipolyse, maar werkt versnellend op de door adrenaline of door glucagon gestimuleerde lipolyse.

Het aangrijpingspunt van glucocorticoïed hormoon kan theore-

tisch gelokaliseerd zijn ter plaatse van de receptoren van de lipolytische hormonen op de membraan van de vetcel, ter plaatse van het adenylaat cyclase, het fosfodiësterase, het proteïne kinase of het hormoon-gevoelige triglyceride lipase, terwijl een combinatie van enkele van deze lokalisaties eveneens mogelijk is.

Het effect van maximaal werkzame concentraties dibutyryl-cAMP resp. theofylline op de lipolyse van vetcellsuspensies van met cortisol behandelde en onbehandelde dieren liet zien dat het potentiërend effect van een hoge dosis cortisol ook op de door remming van fosfodiësterase (met maximaal werkzame concentraties van dibutyryl-cAMP resp. theofylline) gestimuleerde lipolyse aantoonbaar is. Dit pleit tegen een lokalisatie ter plaatse van het fosfodiësterase, maar sluit het niet uit.

De adenylaat cyclase-activiteit in homogenaten van vetcellsuspensies van met cortisol behandelde ratten bleek verlaagd vergeleken met die van vetcellen van onbehandelde ratten. Op grond hiervan leek het zeer onwaarschijnlijk dat het aangrijpingspunt van cortisol zou liggen bij de synthese of de activering van het adenylaat cyclase. Met vetcellsuspensies van ratten die met een overmaat cortisol behandeld waren, werd de lipolyse in aanwezigheid van de combinatie van een maximaal werkzame concentratie adrenaline én glucagon nog steeds gepotentieerd. Waar gebleken was dat de adenylaat cyclase-activiteit in deze cellen (mogelijk onder invloed van het compensatoir hyperinsulinisme) verlaagd is, kan geconcludeerd worden dat het aangrijpingspunt van cortisol in de lipolyse-cascade voorbij de receptoren voor adrenaline en glucagon op de vetcelmembraan en het adenylaat cyclase moet liggen.

De volgende mogelijkheid voor een aangrijpingspunt van cortisol in de lipolyse-cascade zou de remming van de fosfodiësterase-activiteit kunnen zijn. Bij meting van de "totale" PDE-activiteit in homogenaten van vetcellsuspensies bij een overigens hoog-fysiologische substraat-concentratie (van $10 \mu\text{M}$ cAMP), werd geen invloed van hoge doses cortisol in vivo gevonden. Aangezien deze methode bij een lagere substraat-concentratie cAMP niet bruikbaar bleek, werd ook een andere methode voor het meten van de PDE-activiteit gebruikt waarbij de kinetische parameters van zowel PDE met een lage als die met een hoge K_m in de vetcel kunnen worden bepaald.

Er werd een verlaging van de $K_{(m)}$ van de PDE met de laagste van de twee constanten gevonden na behandeling met cortisol in vivo

gedurende 14 dagen. Ook de $V_{(max)}$ van het enzym met de laagste K_m bleek geremd.

De interpretatie van deze gegevens werd bemoeilijkt doordat bleek dat de basale cAMP-concentratie van vetcelsuspensies van ratten die gedurende 14 dagen met cortisol waren behandeld *wél*, maar die van vetcelsuspensies bereid uit vetweefsel, gedurende 4 uur geïncubeerd met dexamethason, *niet* was verhoogd. Manganiello e.a. (1973) konden de verlaging van de PDE-aktiviteit ook pas vele uren na de in vivo toepassing van glucocorticoïed hormoon aantonen en niet na incubatie met dexamethason. Aangezien het potentiërend effect van cortisol op de door adrenaline gestimuleerde lipolyse na voorbehandeling van vetweefsel in vitro gedurende 2 tot 4 uur reeds aantoonbaar was en het bovendien volgens de literatuurgegevens niet optreedt in aanwezigheid van stoffen die de synthese van RNA resp. eiwit remmen, is het onwaarschijnlijk dat het effect van cortisol slechts gelegen is in (de bevordering van) de synthese van een stof die het PDE met lage K_m remt. Ook het gegeven dat bij zo groot mogelijke remming van de PDE-aktiviteit met theofylline resp. db-cAMP het potentiërend effect van glucocorticoïed hormoon op de door adrenaline gestimuleerde lipolyse nog aantoonbaar is pleit hiertegen.

Een volgend mogelijk aangrijpingspunt in de lipolyse-cascade is het proteïne kinase. Inderdaad bleek de van cAMP afhankelijke PK-aktiviteit in homogenaten van vetcelsuspensies van met cortisol behandelde ratten significant toegenomen te zijn. Vooral het feit dat na 4 uur voorincubatie met dexamethason in overmaat, tegelijkertijd een potentiëring van de lipolyse en een verhoging van de van cAMP afhankelijke PK-aktiviteit werd gevonden, bij een onveranderde basale cAMP-concentratie, pleit er voor dat de speciale vorm van stimulerende invloed van cortisol op het lipolytische systeem gelegen is in inductie van hogere PK-aktiviteit.

Het is niet waarschijnlijk dat het effect van cortisol op de aktiviteit van proteïne kinase optreedt via remming van de fysiologische remstof van PK, aangezien men dan ter verklaring van de neutraliserende invloed van gelijktijdige incubatie met een remstof van de RNA- of de eiwitsynthese ook het bestaan van een aktivator van deze PK-remmer zou moeten postuleren.

6. Conclusies

Op grond van de in dit hoofdstuk gevonden resultaten is het waarschijnlijk dat een belangrijk aangrijpingspunt van cortisol in het lipolytische systeem van de vetcel is gelegen in het proteïne kinase (Lamberts, Timmermans, Kramer-Blankestijn en Birkenhäger, 1974 en 1975): ook onder fysiologische omstandigheden heeft cortisol waarschijnlijk een invloed op de synthese van dit enzym. Verhoging van de cortisol-spiegel levert via de novo synthese meer complexen van sub-eenheden van dit enzym. Dit beïnvloedt de basale lipolyse niet. Wordt het lipolytische systeem echter door adrenaline of glucagon gestimuleerd, dan vindt versterking van deze stimulatie plaats. In de vetcel treedt echter bij voortduring van de inwerking van een hoge concentratie glucocorticoïed hormoon na minimaal 10-15 uur nog een tweede effect op, namelijk op de activiteit van het PDE met de laagste K_m : de K_m en de V_{max} blijken gedaald resp. geremd. Theoretisch zou dit kunnen berusten op een aantal oorzaken: de synthese van een remstof, verandering in de structuur van het enzym of veranderingen in het membraan waarbij bijvoorbeeld het PDE met de laagste K_m in bereikbaarheid voor cAMP verandert. Een aantal onderzoekers heeft aangetoond dat PK ook membraaneiwitten kan fosforyleren, leidend tot andere membraan-eigenschappen zoals ionentransport (Morkin e.a., 1974, LaRaia e.a., 1974). Of dit in de vetcel een verklaring zou kunnen zijn voor de gevonden veranderingen in de PDE-activiteit valt te betwijfelen, aangezien deze laatste veranderingen pas na geruime tijd aantoonbaar zijn.

De bevinding dat de intracellulaire werking van cortisol op de lipolyse niet primair verloopt via cAMP, is in overeenstemming met een aantal literatuurgegevens over de invloed van cortisol in andere weefsels bij andere metabole gebeurtenissen. Door Thompson e.a. (1974) worden een aantal onderzoeken samengevat waaruit blijkt dat cAMP niet als tweede boodschapper vereist is voor de inductie van enzymen door glucocorticoïed hormoon, waarbij de duidelijkste voorbeelden worden gevonden in leverweefsel en hepatomen.

Na adrenalectomie zijn de door glucagon gestimuleerde gluconeogenese en glycogenolyse in de ratte-lever (Friedmann e.a., 1967, Exton e.a., 1970), en de glycogenolyse in skeletspier (Schaeffer e.a., 1969) en in ratte-hart (Miller e.a., 1971), ondanks een normale toename van de cAMP-concentratie in deze weefsels gestoord. Deze "on-

voldoende" overdracht van het hormonale effect na adrenalectomie kon steeds worden gecorrigeerd door de toediening van glucocorticoïed hormoon in vivo of in vitro. Deze waarnemingen bij de gluconeogenese en de glycogenolyse passen bij de in dit Hoofdstuk gedane waarneming, dat het effect van cortisol in de ratte-vetcel primair verloopt via inductie van het cAMP-afhankelijke proteïne kinase waardoor de overdracht van de effecten van cAMP wordt mogelijk gemaakt c.q. versterkt.

HOOFDSTUK IV

De invloed van cortisol op de lichaamssamenstelling en het vetcelaantal van het epididymale vetkwabje van de groeiende en jong- volwassen rat

1. Literatuurgegevens

De invloed van een overmaat exogeen glucocorticoïed hormoon op lichaamsgroei, lichaamsgewicht en lichaamssamenstelling is bij verschillende diersoorten onderzocht.

Bij muizen veroorzaakte de intramusculaire implantatie van ACTH-secernerende hypofyse-tumoren een verandering in de lichaamssamenstelling: bij een gelijkblijvend lichaamsgewicht nam het totale vetgehalte c.q. de hoeveelheid vetweefsel in het lichaam ten opzichte van controle dieren aanzienlijk toe (Zomzely e.a., 1956, Hausberger e.a., 1959); dit vetweefsel had een normale samenstelling. Het effect van de subcutane implantatie van "pellets" met 11-dehydrocorticosteron (compound A) werd bij muizen onderzocht door Hollifield e.a. (1959): bij een geleidelijke afname van de lichaamsbeweging en de hoeveelheid opgenomen voedsel werd een toegenomen hoeveelheid karkasvet gevonden, terwijl het lichaamsgewicht gelijk bleef. Hausberger e.a. (1959, zie boven) vonden een hypertrofie, een hyperplasie en een degranulatie van de beta-cellen van het pancreas van hun hypercortisolistische muizen. Wanneer deze muizen bovendien gedurende 6 weken aan een calorie-restrictie werden onderworpen ontstond toch een totaal vetgehalte van het karkas dat bijna tweemaal zo hoog was als bij controle muizen met hetzelfde gewicht (Hausberger, 1961).

Caviae die gedurende enkele weken met een farmacologische dosis cortisol subcutaan werden behandeld ontwikkelden bij een onbeperkte voedselopname in korte tijd manifeste diabetes mellitus; daarnaast trad een verminderde stijging van het lichaamsgewicht, een sterk toegenomen voedselgebruik, een matige vetzucht en een verhoogd stikstofverlies op (Hausberger e.a., 1955). Baum e.a. (1960) vonden een aanzienlijk toegenomen hoeveelheid karkasvet bij twee weken oude kuikens die gedurende zeven dagen waren behandeld met een hoge dosis cortisol of corticosteron.

Veel onderzoek werd gedaan naar de invloed van glucocorticoïed hormoon op de lichaamssamenstelling van de rat. Winter e.a. (1950) behandelden jong-volwassen ratten gedurende enige weken met 15 mg cortisonacetaat per kg lichaamsgewicht subcutaan: er trad een remming in de groei op (gemeten aan de lichaamslengte en het lichaamsgewicht), terwijl er een toename van het gewicht van het epididymale vetkwabje met 50% gevonden werd.

Hausberger e.a. (1958) vroegen zich af, in hoeverre de beschreven effecten van de toediening van een overmaat glucocorticoïed hormoon een gevolg zijn van een compensatoir hyperinsulinisme dat de lipogenese doet toenemen. Gelijktijdige toediening van insuline (12 E/dag) naast 20 mg cortisonacetaat per kg lichaamsgewicht subcutaan gaf geen verandering ten opzichte van het door cortisonacetaat alléén bewerkte achterblijven van de toename van het lichaamseiwit, maar deed de totale hoeveelheid lichaamsvet verder in absolute stijgen. De hoeveelheid lichaamsvet die bij deze laatste groep ratten werd gevonden was te vergelijken met die hoeveelheid die gevonden wordt bij ratten die alléén met insuline werden behandeld.

Een overmaat glucocorticoïed hormoon beïnvloedt ook het bruine vetweefsel. Lachance e.a. (1953) vonden onder invloed van de toediening van 15 mg cortisonacetaat per kg subcutaan gedurende drie dagen aan jonge ratten een duidelijke toename van het gewicht van het bruine vetweefsel. Een enkele intramusculaire injectie van 50 mg cortisonacetaat per kg aan 9 dagen oude ratten veroorzaakte binnen 24 uur een significante toename van het gewicht van het bruine vetweefsel, door toename in het lipide-gehalte van het vetweefsel (Skala e.a., 1971).

Conclusies literatuuroverzicht

Uit de genoemde onderzoeken naar de eventuele invloed van een overmaat glucocorticoïed hormoon op het lichaamsgewicht, de lichaamsgroei en de grootte van de vetmassa van verschillende soorten proefdieren blijkt:

1. Er treedt een remming van de groei en van de stijging van het lichaamsgewicht van jonge dieren op, terwijl er bij volwassen proefdieren een vermindering van het lichaamsgewicht kan worden waargenomen.
2. De totale hoeveelheid lichaamsvet neemt steeds relatief en vaak ook absoluut toe, terwijl enkele malen een vermindering van de totale hoeveelheid lichaamseiwit werd vastgesteld.
3. Er bestonden soms aanwijzingen voor het bestaan van hyperinsulinisme. Naast hyperglycaemie en glucosurie werden hyperplasie, hypertrofie en degranulatie van de beta-cellen van het pancreas gevonden.
4. De toename van de totale hoeveelheid lichaamsvet vertoonde als regel geen correlatie met het calorie-verbruik van het proefdier; soms werd een daling van de eetlust waargenomen.
5. Ten aanzien van de wijze waarop glucocorticoïed hormoon in farmacologische dosering de bovenstaande effecten teweegbrengt wordt de hypothese van Hausberger vrijwel algemeen aanvaard: glucocorticoïed hormoon veroorzaakt een verhoging van de lipogenese via hyperglycaemie en een toename van de secretie van insuline. Een rechtstreeks effect van glucocorticoïed hormoon op vetweefsel wordt meestal niet aangenomen.

2. Vraagstelling

De veranderde vetverdeling zoals die bij de mens met chronisch hypercortisolisme wordt gevonden doet vermoeden, dat glucocorticoïed hormoon althans bij de mens een direkt effect op het metabolisme van sommige vetcellen kan hebben naast het indirecte effect via een compensatoir hyperinsulinisme (Rudman e.a., 1971).

De laatste jaren is steeds duidelijker geworden, dat men met exogene manipulaties in de voeding en met de toediening van hormonen de grootte van het vetweefseldepot van proefdieren kan

veranderen. De regulatie van de totale vetmassa wordt bepaald door verandering van het aantal en de grootte van de vetcellen.

De totale hoeveelheid lichaamsvet neemt onder invloed van de toediening van glucocorticoïed hormoon steeds relatief en soms ook absoluut toe. Onbekend is of dit een gevolg is van een toename van het aantal of de grootte van vetcellen of van beide.

De vraagstelling van dit gedeelte van het onderzoek luidt dan ook: is het mogelijk om met een farmacologische dosering glucocorticoïed hormoon, toegediend aan zeer jonge en jong-volwassen ratten het aantal vetcellen te doen toenemen? Om technische redenen hebben wij ons moeten beperken tot metingen van het vetcelaantal in het epididymale vetkwabje. Als methode werd gekozen de zogenaamde "osmium tetroxyde-methode" volgens Hirsch en Gallian (1968). Vooraf zullen de waarde en de interpretatie van deze en enkele andere methoden ter bepaling van vetcel-aantal en -grootte worden besproken.

3. De keuze van de methodiek voor de bepaling van het vetcelaantal

Tot voor kort waren alle technieken die werden gebruikt voor de bepaling van vetcelaantal en vetcelgrootte histologisch. Bjurulf (1959) introduceerde een methode waarbij vetweefsel zodanig gefixeerd wordt dat er vrijwel geen schrompeling en vervorming van het preparaat optreedt. De bepaling van vetcel-aantal en -grootte met een gekalibreerde microscoop is echter zeer tijdrovend. Goldrick (1967) beschreef een methode, waarbij de gemiddelde vetcelgrootte wordt berekend via de bepaling van het totaal vetgehalte van een brokje vetweefsel en de semi-automatische bepaling van vetceldiameters aan de hand van foto's van vetweefselbrokjes gemaakt met behulp van een projectie-microscoop. Ook deze methode is tijdrovend. Sjöström e.a. (1971) beschreven een methode waarbij vriescoupes van korte tijd in formaline gefixeerd vetweefsel worden gesneden met een microtoom; daarna worden directe metingen verricht met behulp van een microscoop. Een methode waarmee de gemiddelde vetcelgrootte en het vetcelaantal kunnen worden bepaald met behulp van een directe microscopische bepaling van de diameter van met collagenase geïsoleerde vetcellen werd ontwikkeld door di Girolamo e.a. (1972a). Onzekerheid bestaat omtrent de vraag, in hoeverre er tijdens de

isolatie met collagenase sprake is van het "selektief breken" van vetcellen van bepaalde diameter. Dit wordt door di Girolamo ontkend maar door Abraham (1973) wel degelijk aangetoond.

Een principieel andere methode is die, geïntroduceerd door Hirsch en Gallian (1968). Hierbij wordt de vetdruppel in elke vetcel gefixeerd met osmium tetroxyde, waarna de gefixeerde cellen zich gemakkelijk van het bindweefselstroma laten scheiden. De verdeling naar celgrootte en het vetcelaantal worden verkregen door telling in een Coulter Counter. Deze methode zou met voldoende precisie toepasbaar zijn op zowel menselijk als dierlijk vetweefsel.

Ondanks de aanzienlijke methodologische vooruitgang bij de bepalingen van vetcel-aantal en -grootte blijven er ook bij de nu gebruikelijke, genoemde technieken een groot aantal foutenbronnen aanwezig die vrijwel niet zijn uit te schakelen, zoals de verschillen tussen de diverse lokalisaties van het vetweefsel en tussen individuen, de artefacten die ontstaan bij het verkrijgen van het vet, de schrompeling die bij de meeste fixatie-technieken optreedt en de mogelijk wisselende toename van de grootte van de vetcel die bij de fixatie met osmium tetroxyde optreedt (in feite wordt de in het cytoplasma van de vetcel gelegen vetbol gefixeerd en — van het omgevende weefsel gescheiden — geteld in de Coulter Counter). Bij de microscopische methoden is het risico van verschillen in diameterbepalingen tussen verschillende onderzoekers niet denkbeeldig. Selectie van bepaalde vetcelgrootte tijdens de isolatie met collagenase wordt beschreven. Een belangrijke beperking bij de interpretatie van de bepaling van vetcelaantal en gemiddelde vetcelgrootte volgens zowel de morfologische methoden als de zgn. "osmium tetroxyde-methode" is, dat er geen vetcellen geteld worden die geen vet bevatten, terwijl ook vetcellen die minder dan $0,01 \mu\text{g}$ vet bevatten bij de "osmium tetroxyde-methode" ongeteld blijven (Widdowson e.a., 1973). Het gemiddelde vetgehalte van de vetcel bij de volwassen mens bedraagt $0,5-0,8 \mu\text{g}$.

Voor ons onderzoek werd de door Hirsch en Gallian (1968) beschreven osmium tetroxyde-methode gekozen die wij op grond van bovenstaande gegevens thans als de meest betrouwbare en bruikbare methode beschouwen.

4. Uitvoering tellingen

De epididymale vetkwabjes werden afgeknipt op dezelfde methode als beschreven bij het stofwisselingsonderzoek (hoofdstuk II): op de grens van het helderwitte en het meer grijze gedeelte van het weefsel waar enkele grote bloedvaten het kwabje verlaten c.q. binnengaan, wordt het distale gedeelte van het kwabje afgeknipt en gewogen. Vervolgens wordt dit deel in kleine stukjes van 100-150 mg geknipt. Op de door Hirsch en Gallian (1968) beschreven wijze worden enkele stukjes gewassen en gewogen. Vervolgens wordt dit weefsel in een plastic vaatje met 30 ml 2% osmium tetroxyde in 0,05 M collidine-HCl buffer (pH 7,4) gedurende 72 uur geïncubeerd bij 37°C. Na deze fixatie-periode wordt het weefsel uitgebreid gewassen en voorzichtig gewreven met gedistilleerd water op een nylonzeefje (poriënwijdte 250 μ). Hierbij komen de gefixeerde osmium tetroxyde bevattende vetbolletje vrij uit het omgevende stroma. Het filtraat bevat deze cellen die als kleine zwarte bolletjes zichtbaar zijn. Vervolgens wordt dit filtraat nogmaals gewassen op een nylonzeefje, nu met een veel geringere poriënwijdte (25 μ); de op dit zeefje verzamelde cellen worden dan met water gewassen en in een voorgewogen glazen beker van 300 ml gespoeld met een isotone NaCl oplossing. Daarna wordt deze beker opnieuw gewogen zodat het gewicht van de celsuspensie bekend is. De vetcelgrootte en het aantal vetcellen per ml suspensie kunnen dan bepaald worden met behulp van een Coulter Counter (model B).

4. a. *Principe en instelling Coulter Counter*

De vloeistof waarin de vetcellen zijn gesuspenderd wordt door een nauwe capillair met een vaste diameter gezogen. Aan beide kanten van deze capillair is een elektrode opgehangen. Wanneer er een cel, gesuspenderd in een goed stroom-geleidende vloeistof door dit gat gezogen wordt, verandert de weerstand tussen de elektroden. Dit resulteert in een voltage-daling die wordt versterkt en geregistreerd. De grootte van de voltage-daling is afhankelijk van de grootte van de gepasseerde cel. Alle impulsen worden opgeteld en kunnen bovendien op een oscilloscoop worden waargenomen. Het beeld op deze oscilloscoop geeft informatie over de grootte-verdeling van de cellen.

Alvorens een celsuspensie te kunnen tellen moet men het apparaat als volgt instellen: er wordt een zodanige stroomregeling op de opening ("aperture current") en stroomversterking ("amplification") over de capillair-opening gekozen dat alle impulsen van passerende cellen op de oscilloscoop duidelijk boven de nullijn liggen, zonder dat de grootste impulsen de bovenzijde van het scherm naderen. Hoe hoger de stroom en de versterking op de capillair, hoe gevoeliger het systeem. Wanneer eenmaal de juiste instelling voor een te tellen suspensie

is vastgesteld kunnen vergelijkende celtellingen worden verricht wanneer de Coulter Counter steeds op dezelfde manier is ingesteld.

Bij de telling van met osmium gefixeerde vetcellen uit de epididymale vetkwabjes van ratten tot de leeftijd van 14 weken werd een capillair-opening met een diameter van $400\ \mu$ gebruikt met een stroomopeningsregeling 1 en versterking 8. De tellingen werden steeds verricht met een manometervolume van 2 ml.

4. b. Bepaling vetcelaantal

Met een drempelregelaar is het mogelijk om alleen impulsen van een bepaalde hoogte te registreren zodat kleinere cellen niet meer geteld worden. Bij een laagste drempel van 0 worden alle cellen geteld; door nu bij langzaam oplopende drempelstanden te tellen krijgt men een curve waarin de cellen naar volume verdeeld zijn. Uit de hoogte van het gedeelte waar deze curve horizontaal loopt ("plateau"), dat wil zeggen het gebied waar bij toenemende drempelwaarde het aantal getelde cellen niet verandert, kan het totaal aantal cellen per ml suspensie worden berekend (zie figuur 10).

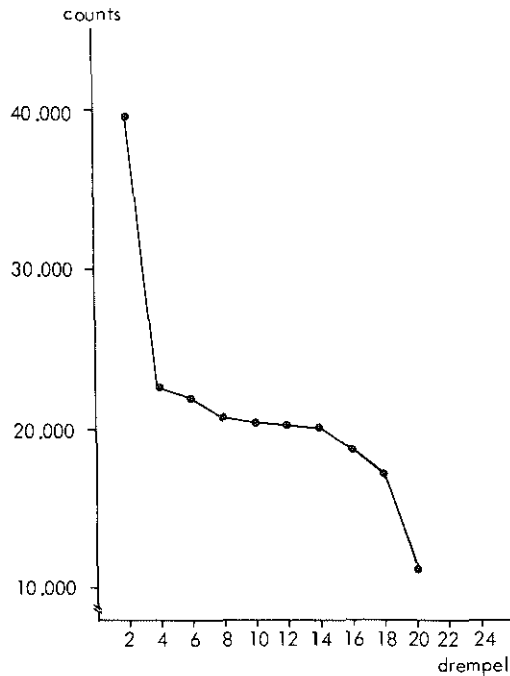


Fig. 10. Voorbeeld van een zogenaamde "totaal-curve" verkregen bij het tellen van een vetsuspensie met behulp van de Coulter Counter. Het "plateau" waaruit het totaal aantal cellen wordt berekend loopt van drempel 10 tot 14.

4. c. *Uitvoering telling en voorwaarden*

Het bleek in de praktijk moeilijk om de zware met osmium tetroxyde gefixeerde cellen tijdens de gehele telling in suspensie te houden. De telling werd begonnen, nadat de vetcellen met een door een roermotor voortgedreven roerstaaf gelijkmatig in suspensie leken te zijn gebracht. In de glazen telbeker kan de toestand van de verdeling der cellen gevolgd worden en er werd steeds voor gezorgd dat er zich tijdens de telling geen vetcellen op de bodem bevonden. Een telling werd alleen geaccepteerd als:

- a. de vetcellen gelijkmatig door de vloeistof waren verdeeld,
- b. er geen luchtbellen in het bekeerglas of in de telbuis aanwezig waren,
- c. er een goed oscilloscopisch beeld aanwezig was (storing hierin betekent meestal een (gedeeltelijke) verstopping van de capillair-opening),
- d. er tijdens de telling geen verandering in de "clicking rate" van het apparaat optrad (meestal veroorzaakt door een (gedeeltelijke) verstopping van de capillair-opening). Bij twijfel werd de capillair-opening microscopisch gecontroleerd.

De totaal-curve van elke te tellen vetcel-suspensie werd steeds 2 à 3 x gemaakt om te voorkomen dat grote verschillen in dichtheid van het aantal in suspensie zwevende vetcellen boven en onder in de glazen beker het uiteindelijk berekende totaal aantal cellen zou beïnvloeden. Van de aldus gevonden plateaus werd het gemiddelde berekend voor de bepaling van het totaal aantal vetcellen per ml suspensie. Hierbij bedroeg het verschil tussen het hoogst en het laagst gevonden plateau steeds minder dan 10% van het eerste. Deze extra veiligheidsmaatregel bracht zoveel verbruik van het telmonster met zich mee dat het niet mogelijk was bij deze bepalingen grootte-distributie-curven te maken zoals bij de tellingen van geïsoleerde niet-gefixeerde vetcellen is gedaan (zie hoofdstuk II).

4. d. *Toevalsverlies*

Een factor waarvoor steeds gecorrigeerd moet worden is het toevalsverlies ("coincidence loss"), veroorzaakt door het als één (grote) cel registreren van twee of meer tegelijk door de capillair passerende cellen. De grootte van dit celverlies is onder andere afhankelijk van de concentratie cellen in de suspensie en de diameter van de capillair.

Het toevalsverlies bij de telling kan worden berekend en de uitkomst van een telling kan worden gecorrigeerd volgens de vergelijking van Edmunson (1967):

$$N = n + 10^{-6}pn^2$$

waarbij N = het gecorrigeerde celaantal
n = het getelde aantal
p = een "coincidence" faktor
waarvoor geldt: $1,25 \times 10^{-3}D^3/V$
waarbij D = de diameter van de capillair (in microns)
V = het manometervolume (in microliters)

Het is ook mogelijk om een correctie-curve voor het toevalsverlies te maken waarbij het effect van steeds verder opgevoerde verdunning van een oplossing met een bekend aantal partikels (bijvoorbeeld stuifmeelkorrels) in de gebruikte Coulterbuis gemeten kan worden. Door ons werd het toevalsverlies met de door Edmunson (1967) vermelde formule berekend. De gevonden correcties kwamen nauwkeurig overeen met de door Hirsch en Gallian (1968) gevonden correcties in een correctie-curve voor een buis met een diameter van de capillair-opening van 400μ .

5. Proefopstelling

De invloed van een overmaat glucocorticoïed hormoon op het lichaamsgewicht van de rat en het gewicht en vetcelaantal van het epididymale vetkwabje werd bij twee graden van exogeen hypercortisolisme bij de rat onderzocht:

- A. jong-volwassen ratten (± 9 weken) werden behandeld met cortisol in het drinkwater in een dosering van 4 à 5 mg per kg lichaamsgewicht gedurende 14 dagen.
- B. groepen jonge ratten, in leeftijd variërend van 4 tot 12 weken werden behandeld met een dosering van 25-30 mg cortisonaceaata subcutaan per kg lichaamsgewicht gedurende 14 dagen.

Als maat voor de totale hoeveelheid lichaamsvet werd het gewicht van het epididymale vetkwabje genomen. Schiffer e.a. (1947) hebben aangetoond dat veranderingen in het gewicht van het epididymale vetkwabje parallel verlopen aan veranderingen in het gehalte neutraal vet in het karkas van de rat. Grewal e.a. (1973) wezen eveneens op de waarde van de meting van het gewicht van één vetdepot als maat voor het totale lichaamsvet in proefdieren. Met behulp van multi-pele regressie-analyse bleek dat het gewicht van het epididymale vetkwabje goed kan dienen als maat voor het totale lichaamsvet.

Het bleek in de praktijk zeer moeilijk om op reproduceerbare wijze andere vetdepots dan het epididymale vetkwabje kwantitatief te verwijderen en te wegen. Subcutaan vet is bij jonge ratten in geringe hoeveelheid aanwezig en leek onder invloed van de toediening van glucocorticoïed hormoon niet toe te nemen. Ook het perirenale vetdepot bleek moeilijk reproduceerbaar uit te prepareren. Op grond hiervan werd volstaan met een onderzoek naar het epididymale vetkwabje.

De bevindingen van Hausberger e.a. (1958) die uiteenlopende effecten van de toediening van een overmaat glucocorticoïed hormoon op het lichaamsgewicht vonden door het optreden van infecties, werden niet bevestigd. Door ons werden geen infecties en/of abscessen bij de proefdieren waargenomen; de ratten werden tijdens de behandeling met glucocorticoïed hormoon in speciale filterkooien gehouden, terwijl bovendien de hand werd gehouden aan het gebruik van steriele spuit en injectie-naalden.

Het seruminsuline van de ratten werd radio-immunologisch bepaald, echter met varkens-insuline als standaard. Aan de absolute waarden kan hierdoor niet veel waarde worden gehecht, wel aan de verschillen tussen de insuline-concentratie in het serum van controle ratten en met glucocorticoïed hormoon behandelde ratten.

6. Resultaten

6. A. *De invloed van de toediening van cortisol (4 à 5 mg per kg lichaamsgewicht per dag) toegediend via het drinkwater gedurende 14 dagen.*

LICHAAMSGEWICHT. Het gewicht van de circa 7 weken oude ratten in de controle groep steeg in de periode van 14 dagen van gemiddeld 174 ± 2 gram naar 216 ± 7 gram; dit is een stijging van 42 gram (8 groepen van 8 ratten). Het gewicht van de met cortisol behandelde ratten bleef duidelijk achter: er was een stijging van 174 ± 2 naar 202 ± 5 gram; dit is een stijging van 28 gram (8 groepen van 8 ratten). Het achterblijven van de toename van het lichaamsgewicht onder invloed van de toediening van cortisol vergeleken met de controle ratten is statistisch significant ($p < 0.005$, Student's gepaarde t-test).

GEWICHT EPIDIDYMALE VETKWABJE. Het gewicht van de vetkwabjes bedroeg bij de controle ratten 496 ± 55 mg per kwabje ($n = 9$) en na behandeling met cortisol 506 ± 68 mg per kwabje ($n = 9$). Dit verschil is niet significant.

AANTAL VETCELLEN PER KWABJE. Steeds werden uit een groep van 8 ratten, waarvan de epididymale vetkwabjes ook gebruikt werden voor metabool onderzoek (hoofdstuk II), 2 linker en 2 rechter vetkwabjes van 4 verschillende ratten gewogen waarna een aantal weefselbrokjes (tesamen ca. 250 mg vers gewicht) werden gefixeerd volgens de osmium tetroxyde-methode. In tabel XIX zijn de volgens deze methode bepaalde aantallen vetcellen per epididymaal vetkwabje vermeld. Er wordt geen verschil gevonden in het aantal vetcellen per vetkwabje van controle ratten en van met cortisol behandelde dieren.

Tabel XIX

Aantal vetcellen per vetkwabje berekend met de osmium tetroxyde-methode.

	lichaamsgewicht (gram)		aantal vetcellen per vetkwabje (in 10^6)	
	controles	cortisol*)	controles	cortisol*)
Exp. I	225	212	2,45	1,79
Exp. II	209	194	2,19	2,39
Exp. III	210	196	2,18	2,30
Exp. IV	204	196	1,80	2,00
Exp. V	215	207	2,29	2,18
	gemiddelde \pm S.D.		2,18 \pm 0,24	2,13 \pm 0,24
	spreiding		1,80 - 2,45	1,79 - 2,39

Per experiment werden 2 groepen van 4 ratten gebruikt (zie tekst)

*) Cortisol toegediend via het drinkwater gedurende 14 dagen in een dosering van 4 - 5 mg per kg lichaamsgewicht.

SERUMINSULINE. In bloed van groepen (niet-nuchtere) ratten werd het serum-insuline bepaald: controle ratten $17 \pm 10 \mu\text{E/ml}$ ($n = 8$ groepen) en na behandeling met cortisol $29 \pm 10 \mu\text{E/ml}$ ($n = 8$ groepen). Dit verschil is, berekend met Student's gepaarde t-test statistisch significant ($p < 0.001$).

6. B. *De invloed van de toediening van cortisonacetaat (25-30 mg per kg lichaamsgewicht per dag) subcutaan gedurende 14 dagen aan ca. 7 weken oude ratten resp. aan groepen jonge ratten.*

LICHAAMSGEWICHT. Het gewicht van de bij het begin van het experiment 7 weken oude controle ratten (die gedurende 14 dagen werden behandeld met 0,2 ml 0,9% NaCl subcutaan) steeg van gemiddeld 176 ± 3 gram naar 213 ± 13 gram (= + 36 gram). De met cortisonacetaat behandelde ratten vielen tijdens de 14 daagse periode sterk af in gewicht: van 176 ± 2 gram naar 153 ± 7 gram (= -26 gram). Het verschil in het lichaamsgewicht tussen 9 groepen behan-

delde ratten was statistisch significant ($p < 0.001$; Student's gepaarde t-test).

Op grond van de onder A gevonden resultaten, waarbij was aangetoond dat het aantal vetcellen in het epididymale vetkwabje bij negen weken oude ratten die behandeld werden met cortisol in het drinkwater gelijk is aan dat van controle ratten, werd nagegaan of het mogelijk is dit vetcelaantal vroeger in de groei met een hoge dosis glucocorticoïed hormoon te beïnvloeden. In figuur 11 is het effect hiervan op het lichaamsgewicht te zien in verschillende stadia van de groei: aanvankelijk vermindert de groei, terwijl vanaf de zesde levensweek een daling in het lichaamsgewicht wordt gezien.

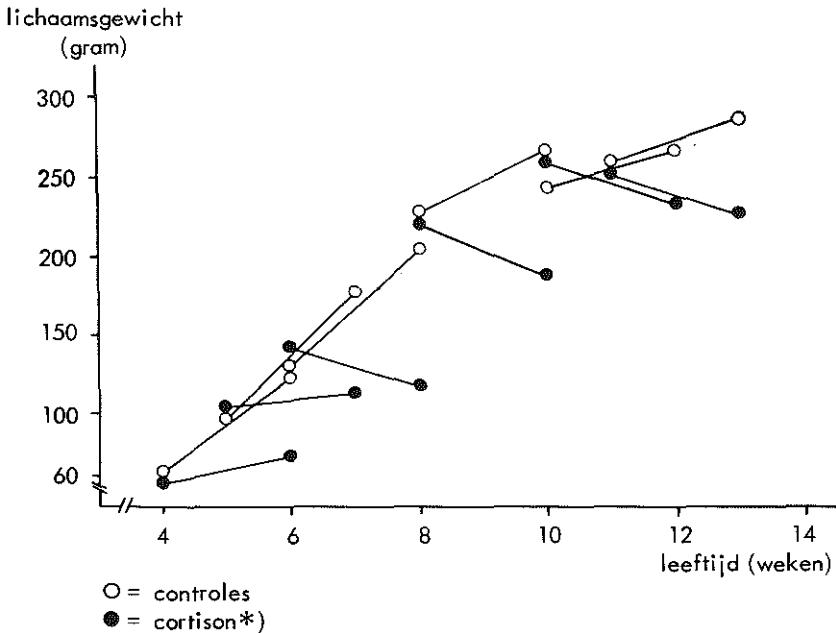


Fig. 11. Het effect van de toediening van cortisonacetaat (2,5 mg per 100 gram lichaamsgewicht subcutaan gedurende 14 dagen) op het lichaamsgewicht. Elk punt is het gemiddelde van een groep van 3 ratten.

GEWICHT EPIDIDYMALE VETKWABJE. Figuur 12 toont het verloop van het gewicht van het epididymale vetkwabje tijdens de groei: terwijl het lichaamsgewicht onder invloed van de overmaat glucocorticoïed hormoon sterk achterblijft, is het vetkwabjesgewicht ongeveer

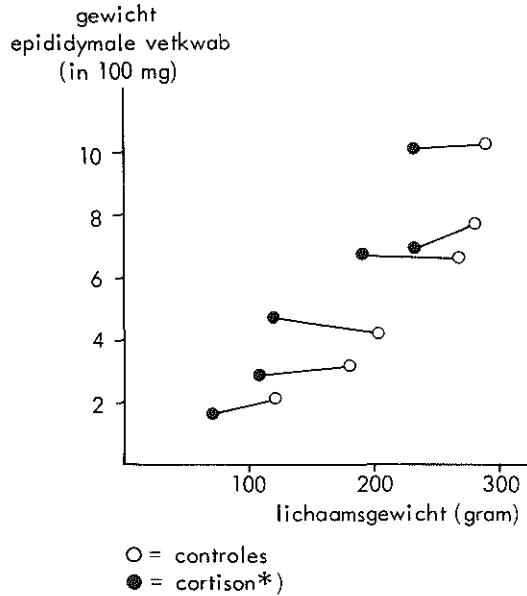


Fig. 12. Het effect van de toediening van cortisonacetaat (zie fig. 11) op het gewicht van het epididymale vetkwabje. De gewichten van de vetkwabjes van de ratten van dezelfde leeftijd zijn met elkaar verbonden.

gelijk bij normaal groeiende ratten en met glucocorticoïed hormoon behandelde ratten. Bij een achterblijven van de toename van het lichaamsgewicht onder invloed van de toediening van glucocorticoïed hormoon blijkt de hoeveelheid buikvet, afgeleid uit het gewicht van het epididymale vetkwabje, relatief toegenomen. Zo is het gewicht van het vetkwabje van een met cortisonacetaat behandelde rat van 120 gram meer dan tweemaal zo hoog als dat van een onbehandelde (jongere) controle rat van hetzelfde gewicht (fig. 12).

AANTAL VETCELLEN PER KWABJE. Het verloop van het vetcel-aantal per kwabje tijdens de groei van controle en behandelde ratten is weergegeven in figuur 13. Er is geen extra proliferatie van vetcellen in het epididymale vetweefsel van de rat onder invloed van de toediening van een overmaat glucocorticoïed hormoon, als verklaring van het relatief toegenomen gewicht van het vetkwabje. Vanaf de achtste levensweek is het vetcelaantal geheel gelijk; daarvoor is het aantal van de met de osmium tetroxyde-methode getelde cellen per

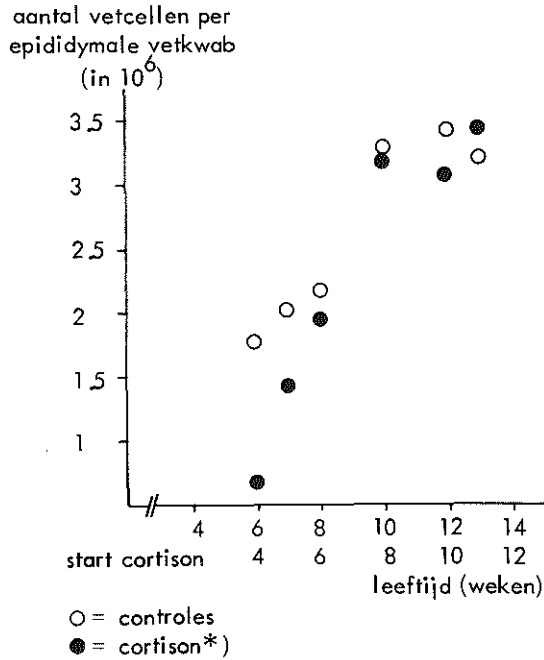


Fig. 13. Het effect van de toediening van cortisonacetaat (zie fig. 11) op het aantal vetcellen van het epididymale vetkwabje.

vetkwabje van de behandelde ratten zelfs geringer. In hoeverre dit een gevolg is van een werkelijke remming in de proliferatie van vetcellen onder invloed van een overmaat glucocorticoïed hormoon of mogelijk doordat met de osmium tetroxyde-methode kleine, weinig met vet gevulde cellen niet worden geteld, werd niet onderzocht.

SERUMINSULINE. Het seruminsuline in bloed van 7 groepen ratten was als volgt: controle ratten $22 \pm 5 \mu\text{E/ml}$ en na de hoge dosering cortisonacetaat $118 \pm 62 \mu\text{E/ml}$. Ook dit verschil is significant ($p < 0.005$, Student's gepaarde t-test).

7. Discussie

In dit Hoofdstuk worden een aantal reeds bekende gevolgen van de toediening van een overmaat glucocorticoïed hormoon op de

lichaamsgroei en de hoeveelheid lichaamsvet van de rat bevestigd: er treedt in de eerste 6 levensweken onder invloed van glucocorticoiden een remming van de normale stijging van het lichaamsgewicht op, terwijl daarna zelfs een daling in het lichaamsgewicht wordt gezien; het gewicht van het epididymale vetkwabje — als maat van de totale hoeveelheid lichaamsvet — is na behandeling van de rat met glucocorticoïed hormoon echter gelijk aan dat van de controle ratten van dezelfde leeftijd; dit duidt op handhaving van het gewicht van het lichaamsvet bij de gevonden daling van het lichaamsgewicht. De mate van hyperinsulinisme onder invloed van de toediening van cortison is aanzienlijk.

Bij de bepaling van het vetcelaantal in het epididymale vetkwabje met de osmium tetroxyde-methode, werd in vijf achtereenvolgende experimenten een nauwe spreiding van het vetcelaantal per kwabje gevonden (tabel XIX).

Met betrekking tot de beantwoording van de vraag: is het mogelijk om met een hoge dosis glucocorticoïed hormoon het aantal vetcellen te doen toenemen, doen zich enkele deels methodologische problemen voor:

- a. is het mogelijk om met de osmium tetroxyde-methode een verandering in het aantal vetcellen waar te nemen?

In de literatuur zijn enkele onderzoeken bij de rat bekend waar onder invloed van exogene stimuli veranderingen in het vetcelaantal werden gevonden. Steeds werd epididymaal vetweefsel gebruikt. Voedselrestrictie leidt tot een significant achterblijven van het aantal (gevulde) vetcellen van ratten van 5 weken en ouder (Knittle e.a., 1968). Gedwongen lichaamsbeweging leidde eveneens tot een significant lager aantal vetcellen (Oscari e.a., 1972). Salans e.a. (1972) zagen geen effect op het epididymale vetcelaantal van de toediening van insuline (tweemaal per dag 0,025 E per gram lichaamsgewicht subcutaan gedurende 3, 5, 8 en 15 weken na de geboorte). Kazdova e.a. (1974) vonden daarentegen na de toediening van 500 μ E insuline per rat tweemaal per dag gedurende 48-72 uur aan ratten van 8 weken een toename van het aantal vetcellen. Mogelijk speelt bij deze discrepantie de methodologie een rol. Kazdova e.a. gebruikten een histologische telmethode en vonden bovendien een verhoogde mitotische activiteit in het vetweefsel. De intraperitoneale toediening van 1 mg groeihormoon per dag gedurende 15 dagen aan ratten van 150 gram leidde tot een vermindering van het

gewicht van het epididymale vetkwabje, terwijl het aantal vetcellen ongewijzigd bleef (Batchelor e.a., 1973). De conclusie uit deze literatuurgegevens is, dat het aantal getelde vetcellen na manipulaties met dieet en/of na toediening van hormonen kan veranderen; dit wil echter nog niet zeggen dat een toename van het gevonden aantal vetcellen bij gebruik van de osmium tetroxyde-methode volgens Hirsch en Gallian (1968) ook betekent dat dit nieuw gevormde cellen zijn: het is mogelijk dat prae-existente "lege" cellen zich vullen.

b. ligt het totaal aantal vetcellen na enige tijd vast en

c. is het epididymale vetkwabje representatief voor het gehele lichaamsvet?

Door Hirsch e.a. (1969) werd gevonden dat het aantal vetcellen in het epididymale vetkwabje op de leeftijd van 10-14 weken het niveau van de volwassen rat bereikt en dat dit weefsel daarna nog slechts groeit door toename van de grootte van de vetcellen. Dit werd bevestigd door di Girolamo (1969b) en Johnson e.a. (1971). Deze laatste auteurs toonden echter aan dat het aantal vetcellen in het *subcutane* vetdepot van de rat nog bleef stijgen tot de 26e levensweek.

Lemonnier (1972) introduceerde een histologische methode ter bepaling van het vetcelaantal waarbij ook de relatieve bijdrage van niet met zichtbaar vet gevulde cellen aan het orgaangewicht kan worden berekend, terwijl ook zeer kleine vetcellen kunnen worden geteld; ook hij vond, dat het aantal vetcellen in het epididymale vetkwabje slechts tot de vierde levensmaand toeneemt en daarna constant blijft. Hij vond daarentegen dat het perirenale vetweefsel van de rat tot de leeftijd van 18 maanden toeneemt in gewicht door zowel toename van het aantal vetcellen (hyperplasie) als een toename in de grootte van de vetcellen (hypertrofie). De celgrootte en het celaantal in een bepaald vetdepot behoeft echter niet representatief te zijn voor andere vetdepots (Lemonnier e.a. 1974).

Voor beantwoording van de vraag of het aantal vetcellen op volwassen leeftijd constant blijft is het werk van Ng e.a. (1971) en Poznanski e.a. (1974) met weefsel-cultures van groot belang: zij vonden dat stromale cellen verkregen uit subcutaan vetweefsel van de volwassen mens, *in vitro* het vermogen bezitten om zich te transformeren tot vetcellen.

8. Conclusies

1. De toediening van een overmaat glucocorticoïed hormoon tijdens de groei veroorzaakt bij de rat een remming van de normale toename van het lichaamsgewicht tot zelfs daling van het lichaamsgewicht terwijl er, mogelijk tengevolge van het reactieve hyperinsulinisme een conserverend effect is op de massa van het epididymale vetkwabje.
2. De relatieve toename van het gewicht van het onderzochte vetweefsel berust vermoedelijk niet op een toename van het vetcel-aantal in het epididymale vetkwabje.

HOOFDSTUK V

De invloed van hypercortisolisme op de lichaamssamenstelling bij de mens

1. Inleiding

Tot de meest opvallende gevolgen van chronisch hypercortisolisme op de lichaamssamenstelling van de mens behoren de abnormale vetverdeling en de spieratrofie. De afwijkende vetverdeling over het lichaam waarbij er een verschil opvalt tussen de relatief slanke extremiteiten en de veel dikkere buik en borst met verstreken supraclaviculaire groeven en een "buffalo hump", wordt rompadipositas genoemd. De spieratrofie valt vooral op aan de extremiteiten, hiermee bijdragend tot de indruk van een tegenstelling tussen de omvang van romp en extremiteiten. Daarnaast worden als tekenen van eiwitdepletie gevonden: een dunne, atrofische huid met striae en het frequent optreden van osteoporose. Dit laatste ontstaat waarschijnlijk door toename van de snelheid van botafbraak, die niet of niet voldoende wordt tegengegaan door toename van de snelheid van botaanmaak (Van der Sluys Veer, 1968).

De mate waarin de hier beschreven veranderingen in de lichaamssamenstelling optreden vertoont een sterke variatie van patient tot patient. Vooral de vetzucht wisselt bij patienten met hypercortisolisme zowel in absolute als ook in de verdeling over het lichaam. Kyle e.a. (1963b) vermoeden dat deze variatie onder andere beïnvloed wordt door de psychische veranderingen bij deze patienten en de daarmee verbonden veranderingen in calorie-opname en energie-verbruik.

2. Vraagstelling onderzoek

In het kader van de algemene vraagstelling "wat is de invloed van cortisol op vetweefsel" werd besloten met enkele methoden een onderzoek in te stellen naar de lichaamssamenstelling bij patiënten met het syndroom van Cushing vóór en na behandeling.

Hierbij is een belangrijke vraag, die tot op heden niet met zekerheid werd beantwoord: ontstaat er onder invloed van een chronisch hypercortisolisme bij de mens een toename in de totale hoeveelheid lichaamsvet of treedt alleen redistributie van de bestaande hoeveelheid vet op?

Van enkele methoden ter bepaling van de lichaamssamenstelling is de toepasbaarheid bij patienten met het syndroom van Cushing onderzocht.

3. Methoden ter bepaling van de lichaamssamenstelling

In principe verschaft een directe bepaling van de lichaamssamenstelling door chemische analyse van het karkas de meest nauwkeurige inlichtingen over de samenstelling van het menselijk lichaam (Widdowson, 1967).

Behnke e.a. (1942) hebben het concept geïntroduceerd van de verdeling van het menselijk lichaam in twee delen: het vetvrije compartiment (de "lean body mass") en het compartiment van het vet (chemisch gedefinieerd). De meeste indirecte methoden ter bepaling van de lichaamssamenstelling die sedertdien werden ontwikkeld, zijn gebaseerd op het principe dat uit de bepaling van één compartiment van het lichaam het andere compartiment kan worden berekend met behulp van het totale lichaamsgewicht. De nu gangbare methoden om langs indirecte weg deze compartimenten te bepalen worden ten aanzien van de geldigheid van de uitkomsten veelal beperkt, doordat er een aantal veronderstellingen moeten worden gemaakt over de constante samenstelling van minstens één der compartimenten van het menselijk lichaam.

Een beschrijving volgt van de vier meest gebruikte methoden voor de bepaling van de lichaamssamenstelling en de theoretische toepassingsmogelijkheden bij patienten met het syndroom van Cushing tegen de achtergrond van de zichtbare uiterlijke en andere weefsel-veranderingen bij deze patienten.

A. De ^{40}K -methode

Deze methode berust op de meting van een in het menselijk lichaam natuurlijk voorkomend radioactief K-isotoop ^{40}K . Dit isotoop vervalst met een zeer lange half-waardetijd ($1,27 \times 10^9$ jaar) met een gamma-straling (1,46 MeV) en het komt in een constant percentage in het totale lichaamskalium voor (0,0118). Onder toepassing van afscherming van de kosmische straling kan men deze gamma-straling in een zogenaamde "totale lichaamsteller" meten en via ijking met een bekende hoeveelheid kalium en rekening houdend met de geometrie, de totale voorraad kalium in het lichaam berekenen (Ackers e.a., 1968).

Het meeste kalium is gelokaliseerd in de intracellulaire vloeistof; in het vetcompartiment (dat wil zeggen het vet chemisch gedefinieerd) is geen kalium aanwezig: kalium is dus per definitie alleen aanwezig in de vetvrije massa. Een sleutelgegeven bij de in vivo bepaling van de vetvrije massa met behulp van de zogenaamde "totale lichaamsteller" is, dat deze gemiddeld 68,1 meq kalium per kg bevat (Forbes e.a., 1968).

Bij patiënten met het syndroom van Cushing moet er ernstig rekening mee gehouden worden dat het kaliumgehalte van de vetvrije massa (met name van de spiermassa) bij deze aandoening verlaagd is. Het gebruik van het standaard-gehalte van gemiddeld 68,1 meq kalium per kg vetvrije massa zal dan ook hoogstwaarschijnlijk leiden tot een overschatting van de hoeveelheid totaal lichaamsvet bij patiënten met hypercortisolisme.

B. Verdunningsmethoden

Deze methoden zijn voor het merendeel gebaseerd op de bepaling van het watergehalte van het vetvrije compartiment van het lichaam. Na equilibratie van een zich in het totaal lichaamswater verspreidende stof (getritieerd water, zwaar water, antipyrine en dergelijke), wordt uit de dilutie de totale hoeveelheid lichaamswater berekend.

De vetvrije massa kan dan worden berekend op basis van de veronderstelling dat het watergehalte constant is, namelijk $72,4 \pm 2,1\%$ bij guinese biggetjes en $73,2\%$ met een spreiding van 69,9 tot

77,3% bij 5 andere diersoorten (Pace e.a. 1945). Keys e.a. (1953) geven $72 \pm 3\%$ op als normaal-waarde voor de volwassen mens. In overeenstemming hiermee, namen wij 72% aan als normaal hydratatie-percentage van de vetvrije massa bij de gezonde volwassene. Bij patiënten met hypercortisolisme zal men ten gevolge van hypertensie, oedeem en elektrolyt-verschuivingen, die waarschijnlijk gepaard gaan met een toename van de hydratatie-graad van de vetvrije massa, bij een berekening op basis van 72% hydratatie de totale hoeveelheid lichaamsvet mogelijk onderschatten.

Een andere verdunningsmethode is die waarbij gebruik gemaakt wordt van vetoplosbare gassen die worden ingeademd (Hytten e.a., 1966).

C. Densitometrische methoden

Er bestaat een verschil in soortelijk gewicht tussen het lichaamsvet en de andere componenten van het lichaam. Wanneer het soortelijk gewicht van het lichaam van een te onderzoeken patient bekend is (door wegen onder water of met behulp van heliumdilutie), kan men via een aantal formules en correcties de hoeveelheid vet in het lichaam berekenen.

Over de toepassing van deze methoden bij de bepaling van de lichaamssamenstelling van patiënten met het syndroom van Cushing kan men op voorhand zeggen, dat er een aantal moeilijkheden zullen ontstaan bij de berekening door zonder meer de standaard-soortelijke gewichten van het vetvrije- en vetcompartiment te gebruiken: immers, er bestaan geen gegevens in de literatuur over de vraag of het soortelijk gewicht van de vetvrije massa bij patiënten met hypercortisolisme bijvoorbeeld ten gevolge van spieratrofie, huidatrofie en osteoporose enerzijds en ten gevolge van een verhoogde hydratatie anderzijds, niet aanzienlijk verschilt van het standaard-getal voor het soortelijk gewicht van de vetvrije massa van de normale volwassene.

D. Antropometrische methoden

Er wordt bij deze methoden met behulp van de meting van huidplooidikten getracht om een indruk te krijgen van de verhouding

van het vetvrije en het vet-compartment. Er kan ook gebruik worden gemaakt van onder andere ultrasone geluidsgolven en "zachte" röntgenstralen.

Op basis van extrapolatie van deze gegevens, de lichaamslengte en het gewicht wordt een voorspelling gedaan omtrent de totale hoeveelheid lichaamsvet van de onderzochte patient. Belangrijke veronderstellingen bij deze methoden zijn onder andere, dat de dikte van de vetlaag op de plaatsen waar gemeten wordt representatief is voor alle subcutane vetweefsel, terwijl bovendien het subcutane vet een constante relatie moet hebben met het totale lichaamsvet.

Het is duidelijk dat deze methoden, bijvoorbeeld de bepaling van de huidploidikte boven triceps, subscapulaire en elders, bij de patient met het syndroom van Cushing bij wie een redistributie van het vet heeft plaatsgevonden ten gunste van de romp, onbruikbaar zijn.

Elk van de hier beschreven groepen van methoden om langs indirecte weg de lichaamssamenstelling te bepalen heeft zijn eigen moeilijkheden en reproduceerbaarheidsproblemen (zie de overzichten van Keys e.a., 1953 en Brozek, 1965). Ook uitkomsten van verschillende methoden bij dezelfde individuen tonen niet zelden aanzienlijke verschillen (Steinkamp e.a. 1965a en b, Myhre e.a. 1966, Krzywicki e.a., 1967a en b).

Als conclusie over de toepassingsmogelijkheden van de verschillende genoemde methoden ter bepaling van de lichaamssamenstelling kan gesteld worden, dat er voor gezonde individuen mogelijkheden bestaan om de lichaamssamenstelling langs indirecte weg met redelijk reproduceerbare methoden te onderzoeken, maar dat deze methoden bij pathologie op basis van de bij deze methoden gebruikte veronderstellingen kunnen leiden tot fouten.

Bij bestudering van de literatuur over de lichaamssamenstelling bij de mens valt op dat slechts één groep (Kyle e.a., 1963a en b) met enkele van de beschreven methoden een onderzoek naar lichaamssamenstelling bij hypercortisolisme heeft ingesteld. Bij 4 patienten werd de lichaamssamenstelling tegelijkertijd onderzocht vóór en na behandeling van het Cushingsyndroom met een densitometrische en een verdunningsmethode ter bepaling van het totale lichaamswater (met behulp van antipyrine en zwaar water). Bij het uitwerken van de gegevens van deze patienten ontstonden flinke theoretische moeilijkheden: na therapie trad een daling van het lichaamsgewicht op met

tegelijkertijd een sterke toename van de totale hoeveelheid lichaamswater en van het soortelijk gewicht van het lichaam. Getracht werd om door middel van de constructie van het begrip "reconstituted body" correctie-factoren in te voeren voor het verlies van eiwitten en mineralen, dat verondersteld werd onder invloed van hypercortisolisme te zijn opgetreden. De conclusies uit het onderzoek van deze 4 patiënten waren dat er een overhydratatie bestond, terwijl de toename van de totale hoeveelheid lichaamsvet vóór behandeling sterk uiteenliep afhankelijk van een positieve of negatieve calorïënbalans.

Wij onderzochten de lichaamssamenstelling van een aantal patiënten met het syndroom van Cushing met behulp van de ^{40}K -methode vóór en na behandeling van het syndroom van Cushing terwijl bij enkele patiënten voor behandeling ook het totale lichaamswater kon worden bepaald met behulp van getritieerd water.

4. Uitvoering

A. De ^{40}K -methode

De tellingen bij de patiënten werden verricht in de Whole Body Counter van het Academisch Ziekenhuis te Leiden (Hoofd drs. K.J. van Damme). Deze installatie beschikt over vier scintillatie-detectors (kristallen van natriumjodide met een diameter van 12 cm en 10 cm hoog) die in één lijn zijn opgesteld, waarmee de gammastraling afkomstig uit het menselijk lichaam wordt gemeten (Barnhoorn e.a., 1971). De resultaten worden opgegeven in grammen kalium met een standaarddeviatie van 3,6 tot 7,3%. De vetvrije massa wordt berekend met behulp van het door Forbes e.a. (1961) opgegeven gehalte van 68,1 meq kalium per kg. Voor nadere gegevens omtrent de geometrie en de ijking voor de telling van het totale lichaamskalium wordt verwezen naar Ackers e.a. (1968).

B. De verdunningsmethode met $^3\text{H}_2\text{O}$

De bepaling van de lichaamssamenstelling met getritieerd water is op grote schaal toegepast na het theoretische werk van Prentice e.a. (1952) en de ontwikkeling van de meting van de radioactiviteit van

^3H met vloeistof-scintillatietelling. Volgens Siri (1956) is het getritiëerde water de meest ideale test-substantie voor het bepalen van het totale lichaamswater, aangezien de diffusie van de toegediende tracer door het lichaam geschiedt met een snelheid die niet verschilt van die van water. Er ontstaat in korte tijd een evenwicht van $^3\text{H}_2\text{O}$ in het lichaamswater zonder selectieve opslag of omzetting van het getritiëerde water.

Bij een niet-nuchtere proefpersoon wordt $100 \mu\text{Ci } ^3\text{H}_2\text{O}$ in een volume van 1 ml intraveneus ingespoten. Om de nauwkeurigheid van de toegediende dosis te verhogen worden injectie-spuit en -naald vóór en na de injectie gewogen. 1 ml 100 x verdund getritiëerd water vormt de standaard. Na de intraveneuze toediening van de tracer mag de proefpersoon niets meer drinken tot na de afname van het bloed.

De tijd die noodzakelijk is om bij de gezonde mens een volledige menging te bereiken tussen de intraveneus toegediende tracer en het lichaamswater bedraagt volgens Robelin (1973) 105 minuten (spreiding: 60-150 minuten). Prentice e.a. (1952) vonden bij 2 patienten met levercirrhose en ascites, dat de tritium-concentratie tussen 2 en 4 uur na de toediening van de tracer constant wordt als teken van een complete menging met het totale lichaamswater. Omdat de hydratatie-toestand bij patienten met het syndroom van Cushing mogelijk veranderd is (bij de onderzochte patienten was overigens geen manifest oedeem aanwezig), werd besloten om zowel bij de controles met exogene adipositas als bij de patienten een tijd van 4 uur voor het bereiken van een evenwicht na de intraveneuze toediening aan te houden vóórdát bloed werd afgenomen. Na de afname van 8 ml bloed in een buis met droge heparine, werd deze onmiddellijk afgesloten en gecentrifugeerd. Het serum werd in een luchtdicht afgesloten buisje bewaard bij -25°C totdat de telling werd verricht. De telling van 1 ml serum + 9 ml Instagel vond plaats in een vloeistof-scintillatie-teller (Packard, model Tricarb). De resultaten werden met behulp van de zogenaamde AES-ratio gecorrigeerd voor "quenching". De efficiëntie van de telling varieerde van 12,2 tot 19,5%. Het totale lichaamswater werd als volgt berekend:

$$\text{totaal lichaamswater (liters)} = \frac{\text{a.d.s.}}{1000.p}$$

- waarbij a = toegediende volume $^3\text{H}_2\text{O}$
 d = dilutie-faktor van de standaard
 s = d.p.m. per ml van de standaard
 p = d.p.m. per ml van het plasma-water-sample

Er werd geen correctie toegepast voor eventueel tijdens de "evenwichtsperiode" geloosde urine, daar de hoeveelheid getritieerd water die met een hogere concentratie dan die na het tot stand komen van het evenwicht met de urine wordt uitgescheiden, zeer klein is.

Door het gevonden aantal liters totaal lichaamswater te delen door 0,72 wordt vervolgens het aantal kg vetvrije massa berekend.

5. Resultaten en discussie

Van 15 patienten met het syndroom van Cushing van verschillende etiologie werd vóór behandeling de lichaamssamenstelling met behulp van de ^{40}K -methode onderzocht. Bij 7 van deze patienten kon dit onderzoek herhaald worden nadat ze na behandeling, die meestal bestond uit éézijdige adrenalectomie en hypofysebestraling, gedurende minstens 3 maanden een normale productiesnelheid van cortisol hadden vertoond.

In tabel XX zijn de gegevens van deze patienten vermeld; het totale lichaamskalium wordt in grammen opgegeven met de standaarddeviatie van de bepaling. De vetvrije massa werd berekend met behulp van het gegeven dat deze gemiddeld 68,1 meq kalium per kg bevat (Forbes e.a., 1961). In figuur 14 is het totale lichaamskalium van de onderzochte patienten uitgezet tegen het lichaamsgewicht. Bij 6 van de 7 patienten is na de adequate behandeling van het Cushing syndroom het totale lichaamskalium aanzienlijk toegenomen; de 7e patient die dit beeld niet vertoont, is een patiente met een bijnierschorscarcinoom: deze oudere dame (70 jaar) verkeerde zowel vóór als na de operatieve verwijdering van het carcinoom in een vrij matige voedingstoestand en had vrijwel geen lichaamsbeweging. De toename van het totale lichaamskalium bij de eerste 6 patienten tenminste 3 maanden na herstel van een normale bijnierschorsfunctie, ging gepaard met een relatief geringe verandering (meestal daling) van het lichaamsgewicht. Wanneer men het bovengenoemde getal van 68,1 meq kalium per kg vetvrije massa hierop toepast, zou dit betekenen

Tabel XX

Gegevens over de patienten met het syndroom van Cushing voor en na behandeling.

Patient	diagnose (vóór/na behandeling)		leeftijd	geslacht	lengte (cm)	gewicht (kg)	totaal-lichaamskalium		gram K per kg. lich.gew.	LBM (kg)	vet	
							gram	S.D.			(kg)	%
Br-vH	pituit. dep. Cushing	vóór	44	V	172	72,9	85,8		1,17	32,2	40,7	56
		na	45		172	68,0	110,8	5,3%	1,63	41,7	26,3	39
B	pituit. dep. Cushing	vóór	44	M	163	70,5	99,6	6,0%	1,41	37,5	33,0	47
		na	44		163	67,8	102,6	4,4%	1,51	38,6	29,2	43
St	pituit. dep. Cushing	vóór	41	V	173	90,0	110,6	5,5%	1,23	41,6	48,4	54
		na	42		173	87,8	126,9	3,7%	1,45	47,7	40,1	46
Te	pituit. dep. Cushing.	vóór	38	V	176	69,5	97,4	6,0%	1,40	36,7	32,8	47
		na	39		176	69,9	105,4	4,6%	1,51	39,7	30,2	43
de J-B	pituit. dep. Cushing	vóór	30	V	168	80,4	76,2	7,3%	0,95	28,7	51,7	64
		na	31		167	74,9	110,0	4,1%	1,47	41,4	33,5	45
Bu	ectopische CRF*)- prod. door medullair schildkliercarcinoom	vóór	45	V	160,5	61,5	73,6	6,1%	1,20	27,7	33,8	55
		na	45		160,5	58,4	87,5	4,9%	1,50	32,9	25,5	44
La	bijnierschors- carcinoom	vóór	69	V	162	64,7	93,5	4,7%	1,45	35,2	29,5	46
		na	70		163	58,9	82,0	5,5%	1,39	30,8	28,1	48
Kr	pituit. dep. Cushing	vóór	58	V	166	90,5	101,9	4,8%	1,13	38,3	52,5	58
v. Kl	pituit. dep. Cushing	vóór	48	V	159	73,5	112,9	4,1%	1,54	42,4	31,1	42
Me	iatrogene Cushing	vóór	53	V	165	83,7	89,2	5,3%	1,07	33,6	50,1	60
Gr	pituit. dep. Cushing	vóór	41	V	164,5	73,7	106,1	4,3%	1,44	39,9	33,8	46
v.d. K	pituit. dep. Cushing	vóór	28	M	168	82,1	112,4	4,2%	1,40	42,3	39,8	48
de Gr	pituit. dep. Cushing	vóór	54	V	168	76,5	92,9	4,9%	1,21	34,9	41,6	54
Ba	pituit. dep. Cushing	vóór	26	V	173	65,7	108,4	4,2%	1,65	40,8	24,9	38
Ve	pituit. dep. Cushing	vóór	32	V	156	52,4	74,9	5,6%	1,43	28,2	24,2	46

*) CRF = Corticotropin Releasing Factor

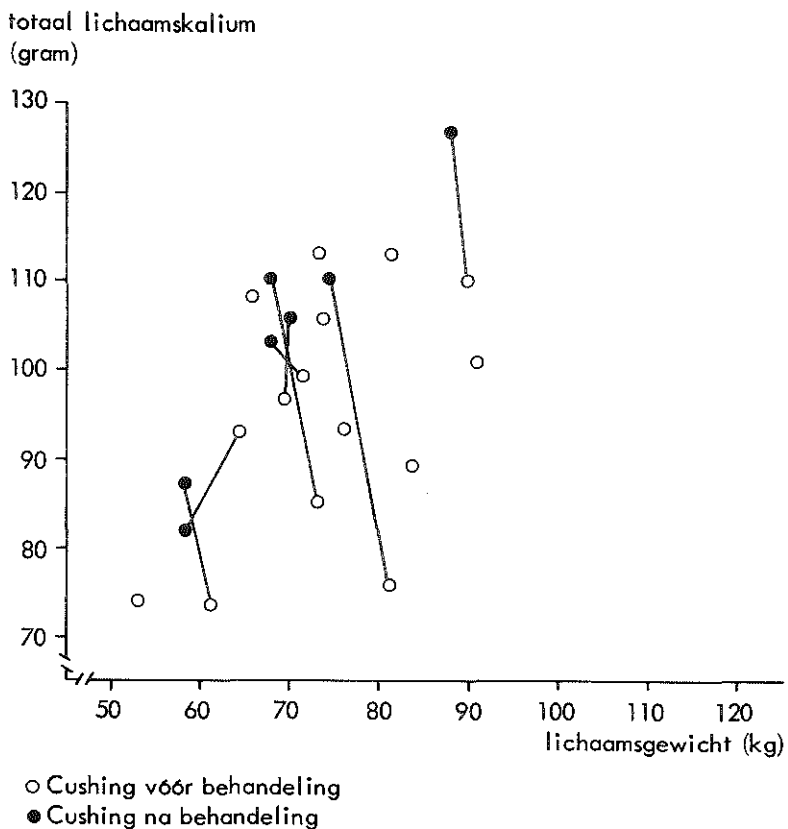


Fig. 14. De relatie tussen het toaal lichaamskalium en het lichaamsgewicht van 15 patienten met het syndroom van Cushing. 7 patienten werden minimaal 3 maanden na behandeling opnieuw onderzocht.

dat er zich bij deze patienten na de behandeling een niet onbelangrijke wijziging in de lichaamssamenstelling moet hebben voorgedaan: er treedt een toename van de vetvrije massa en een afname van de totale hoeveelheid vet op. Voor de 7 onderzochte patienten zou deze verandering als volgt zijn na de behandeling:

	lichaamsgewicht (kg)	LBM (kg)	vet (kg)
1. Br.v.H.	- 4,9	+ 9,4	- 14,3
2. B.	- 2,7	+ 1,1	- 3,8
3. St.	- 2,2	+ 6,1	- 8,3
4. Te.	+ 0,4	+ 3,0	- 2,6
5. de J.-B.	- 5,5	+ 12,7	- 18,2
6. Bu.	- 3,1	+ 5,2	- 8,3
7. La.	- 5,8	- 4,3	- 1,5

Mede omdat enkele van deze verschuivingen aanzienlijk zijn menen wij de volgende vragen te moeten stellen:

1. Wat zijn de resultaten van de bepaling van de lichaamssamenstelling bij patiënten met hypercortisolisme wanneer gebruik wordt gemaakt van een principiële andere methode, namelijk de verdunningsmethode met getritieerd water?
2. Welke waarde heeft het gegeven dat de vetvrije massa bij alle gezonde individuen 68,1 meq kalium per kg bevat en is dit getal ook toepasbaar bij patiënten met hypercortisolisme?

ad 1. Bij 3 patiënten met een nog onbehandeld syndroom van Cushing en 2 jonge vrouwen met een exogene adipositas kon de lichaamssamenstelling gelijktijdig met de $^3\text{H}_2\text{O}$ - en ^{40}K -methode worden onderzocht. (De bepaling van het totale lichaamswater met de $^3\text{H}_2\text{O}$ -verdunningsmethode werd steeds verricht na toestemming van de over de aard van het onderzoek voorgelichte proefpersoon). De gevonden waarden voor het totale lichaamsvet zijn bij het hanteren van de ^{40}K -methode aanzienlijk hoger (tabel XXI). Deze verschillen zijn bij het syndroom van Cushing significant hoger dan bij exogene adipositas. Ter verklaring noemen wij de volgende mogelijkheden:

- a. gebruik van de ^{40}K -methode leidt bij patiënten met hypercortisolisme tot een overschatting van de totale hoeveelheid lichaamsvet, in vergelijking tot bij normalen of bij exogene adipositas aangezien er een lager kaliumgehalte van de vetvrije massa is door kaliumdepletie en spieratrofie.
- b. bij gebruik van de $^3\text{H}_2\text{O}$ -methode treedt bij patiënten met het syndroom van Cushing een onderschatting van het totale lichaamsvet op, omdat bij de berekening van de vetvrije massa uit het totale lichaamswater gebruik gemaakt wordt van een water-

Tabel XXI

Vergelijking van twee methoden ter bepaling van de lichaamssamenstelling bij 3 patienten met onbehandeld hypercortisolisme en 2 gezonde vrouwen met exogene adipositas.

	lichaamsgewicht kg	totaal lichaamsvet ^{o)} ³ H ₂ O-methode	(kg) 40K-methode	Vershil*) %	
A. Cushing-syndroom					
1. Ve (v)	52,4	16,8	24,2	+ 44%] p < 0.01
2. Gr (v)	73,7	22,9	33,8	+ 47%	
3. v.d. K (m)	82,9	27,9	42,3	+ 52%	
B. Exogene adipositas					
I. V (30 jr)	62,0	20,4	27,0	+ 32%] p < 0.01
II. V (35 jr)	75,8	23,6	31,0	+ 31%	

o) chemisch gedefinieerd

*) % van de waarde berekend met de ³H₂O-methode

percentage van 72%, terwijl dit mogelijk bij Cushing-patienten hoger is.

Bij deze methoden ter bepaling van de lichaamssamenstelling vindt derhalve waarschijnlijk enerzijds bij de ⁴⁰K-methode een overschatting en anderzijds bij de ³H₂O-methode een onderschatting van de massa lichaamsvet plaats. De ware hoeveelheid vet ligt waarschijnlijk tussen deze waarden in. Het is voor de hier onderzochte patienten met het syndroom van Cushing derhalve mogelijk deze waarden voor de massa vet als uiterste grenzen naar boven resp. naar beneden te beschouwen.

Om toch een exakter antwoord te kunnen geven op de vraag of de totale hoeveelheid lichaamsvet bij de meeste patienten met het syndroom van Cushing is toegenomen, werd een onderzoek ingesteld naar de lichaamssamenstelling van 23 gezonde, adipeuze vrouwen (leeftijd 20-35 jaar). De lichaamssamenstelling werd onderzocht met de verdunningsmethode met ³H₂O. Bij 5 vrouwen werd dit onderzoek herhaald nadat ze enkele kilogrammen waren afgevallen. In figuur 15 zijn de gegevens van deze patienten weergegeven. In dezelfde figuur zijn ook gegevens opgenomen, die verkregen werden

met de ^{40}K -methode bij patienten met het syndroom van Cushing vóór en na behandeling, en die van de 3 patienten met dit syndroom en de 2 vrouwelijke patienten met exogene adipositas bij wie beide methoden werden toegepast. Het feit, dat de met de $^3\text{H}_2\text{O}$ -methode berekende waarden voor de totale hoeveelheid lichaamsvet bij de 4 aldus onderzochte patienten met hypercortisolisme in hetzelfde gebied blijken te vallen als de overeenkomstige waarden voor de 23 vrouwen met een exogene adipositas, gevoegd bij het bovengestelde dat deze waarde vermoedelijk een onderschatting is van de totale hoeveelheid lichaamsvet bij patienten met hypercortisolisme, kan de conclusie rechtvaardigen dat de totale hoeveelheid lichaamsvet bij patienten met het syndroom van Cushing in het algemeen is toegenomen.

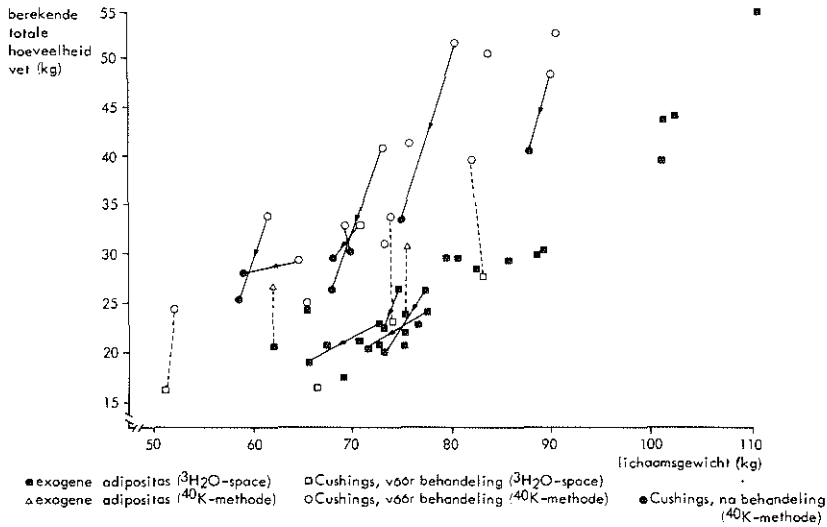


Fig. 15. De relatie tussen de berekende totale hoeveelheid lichaamsvet en het lichaamsgewicht bij 15 patienten met het syndroom van Cushing en 23 vrouwen met exogene adipositas. Bij 7 patienten werd het onderzoek tenminste 3 maanden na normalisering van de bijnierschorsfunctie herhaald (waarde vóór en na behandeling verbonden door een ononderbroken lijn); bij 5 vrouwen met exogene adipositas werd het onderzoek tijdens vermagering herhaald (gegevens vóór en tijdens behandeling verbonden door een ononderbroken lijn). Bij 3 onbehandelde patienten met een syndroom van Cushing en 2 vrouwen met exogene adipositas werd tegelijkertijd de lichaamssamenstelling onderzocht met de ^{40}K - en de $^3\text{H}_2\text{O}$ -methode. Deze gegevens zijn verbonden door onderbroken lijnen.

ad 2. Het gevonden verschil in de hoeveelheid lichaamsvet berekend met de $^3\text{H}_2\text{O}$ - resp. de ^{40}K -methode bij exogene adipositas (tabel XXI), berust blijkens recente literatuurgegevens (Burkinshaw e.a., 1973, Boddy e.a., 1973, Delwaide e.a., 1973) waarschijnlijk mede op het gebruik van een gemiddeld kaliumgehalte van de vetvrije massa van 68,1 meq per kg.

Dit getal werd zoals vermeld, door Forbes e.a. (1961 en 1963) berekend uit het gemiddelde van vier kadaveranalyses (twee door hemzelf en twee door anderen verricht) van drie mannen van 46 en 60 jaar en één van onbekende leeftijd en van een vrouw van 42 jaar. De vrouw had het hoogste K-gehalte per kg vetvrije massa: 72,6 meq en de mannen resp. 66,5, 66,6 en 66,8 meq per kg. Naderhand voerde Forbes correctie-factoren in op basis van lichaamslengte, waarna een goede overeenkomst werd gevonden tussen de gegevens van de lichaamssamenstelling berekend met de ^{40}K - resp. de $^3\text{H}_2\text{O}$ -methode (Forbes, 1968 en 1972).

Een aantal auteurs echter (zie Burkinshaw e.a., 1973, Boddy e.a., 1973, Delwaide e.a., 1973), benaderden het vraagstuk van het werkelijke K-gehalte van de vetvrije massa en de variatie daarvan, door de resultaten van één of meer andere methoden ter bepaling van de lichaamssamenstelling te betrekken op de waarden verkregen met de ^{40}K -methode of met de ^{42}K -dilutie-methode.

In tabel XXII zijn de gevonden waarden van een aantal onderzoeken vermeld. De gegevens uit de eerste 12 literatuurverwijzingen werden overgenomen van Boddy e.a. (1973) en zijn berekend uitgaande van de veronderstelling dat het uitwisselbare kalium gelijk is aan $0,95 \times$ het totale lichaamskalium. Deze gegevens werden nog aangevuld met die afkomstig van 5 meer recente onderzoeken. Het gemiddelde van deze berekende kaliumgetallen per kg vetvrije massa blijkt belangrijk lager dan dat door Forbes werd berekend, nl.:

voor mannen: $63,4 \pm 4,0$ meq kalium per kg (gemid. \pm S.D.)

voor vrouwen: $57,0 \pm 3,9$ meq kalium per kg (gemid. \pm S.D.)

Een verklaring voor het gevonden verschil in het kaliumgehalte per kg vetvrije massa bij mannen en vrouwen zou kunnen zijn (Womersley e.a., 1972), dat het skelet dat een relatief laag kaliumgehalte heeft (± 20 meq/kg volgens Woodbury, 1956) bij de vrouw naast de geringere spiermassa (kaliumgehalte 99 meq/kg volgens Woodbury, 1956), een relatief grotere bijdrage levert tot de vetvrije massa dan bij de man.

Tabel XXII

De berekening van het kalium-gehalte van de vet-vrije massa (LBM)
uit een aantal onderzoeken in de literatuur.

Auteurs	Mannen				Vrouwen			
	aantal	leeftijd		meq K/ kg LBM	aantal	leeftijd		meq K/ kg LBM
		gemidd.	spreiding			gemidd.	spreiding	
1. Uit Boddy e.a. (1973):								
– Allen e.a. (1960)	28	32	22 - 41	65,5	10	32	16 - 51	58,5
– von Döbeln (1962)	154	–	–	69,9	73	–	–	59,3
– Oberhauser (1965)	–	20	–	67,1	–	–	–	–
	–	–	25 - 60	61,3	–	–	–	–
– Boddy e.a. (1972)	49	35	20 - 77	67,8	54	36	18 - 72	59,3
– Edelman e.a. (1959)	32	–	18 - 33	62,0	26	–	18 - 33	58,2
	10	–	34 - 50	63,3	6	–	34 - 50	48,4
– Muldowney e.a. (1957)	9	–	22 - 59	62,4	8	–	18 - 81	50,5
– Ikkos e.a. (1965)	13	30	21 - 54	65,1	19	27	20 - 52	58,5
– Moore e.a. (1963)	10	–	23 - 54	67,8	10	–	23 - 51	62,5
	7	–	72 - 84	67,2	7	–	60 - 74	59,9
– Deuxchaines (1961)	24	30	–	55,5	24	29	–	50,6
– Talso e.a. (1960)	23	–	23 - 38	65,8	–	–	–	–
– Corsa e.a. (1950)	27	–	21 - 30	58,4	–	–	–	–
– Boling e.a. (1962)	21	30	20 - 56	66,4	–	–	–	–
2. Steinkamp e.a. (1965a+b)	44	–	25 - 44	59,5	24	–	25 - 44	55,8
3. Hughes e.a. (1967)	22	53	31 - 75	55,7	–	–	–	–
4. Womersley e.a. (1972)	10	24	17 - 30	66,4	10	28	16 - 54	59,7
5. Delwaide e.a. (1973)	53	20	–	62,6	59	20	–	56,9
	135	20	–	62,8	161	20	–	56,7
6. Burkinshaw e.a. (1973)	20	26	–	58,8	23	24	–	58,2
	11	26	–	64,3	13	19	–	58,3
		gemiddeld ± S.D.		63,4 ± 4,0				57,0 ± 3,9

In tabel XXIII worden de gegevens over de lichaamssamenstelling van 7 patienten met het syndroom van Cushing na adequate behandeling vermeld, waarbij naast elkaar de getallen van 68,1 meq kalium en 63,4 resp. 57,0 meq kalium per kg vetvrije massa zijn vermeld. De met deze laatste getallen gevonden waarden voor de totale hoeveelheid lichaamsvet bij patienten met een op dat moment weer normale bijnierschorsfunctie, liggen (met een spreiding van 18,3 tot 30,9) ongeveer in de "range" van de patienten met een exogene adipositas (zie figuur 15).

Tabel XXIII

Berekening met de ^{40}K -methode van het totale lichaamsvet van 7 patienten met syndroom van Cushing minimaal 3 maanden na adequate behandeling.
De vetvrije massa wordt berekend uit het totale lichaamskalium met behulp van twee getallen (zie tekst).

	geslacht	lichaamsgewicht (kg)	berekening op basis van 68,1 meq K/kg LBM		Berekening op basis van mannen 63,4 meq K/kg LBM vrouwen 57,0 meq K/kg LBM	
			kg LBM	kg vet	kg LBM	kg vet
1. Br.v.H.	v	68,0	41,7	26,3	49,7	18,3
2. B.	m	67,8	38,6	29,2	41,4	26,4
3. St.	v	87,8	47,7	40,1	56,9	30,9
4. Te.	v	69,9	39,7	30,2	47,3	22,6
5. de J.B.	v	74,9	41,4	33,5	49,4	25,5
6. Bu.	v	58,4	32,9	25,5	39,3	19,1
7. La.	v	58,9	30,8	28,1	36,8	22,1

In tabel XXIV worden tenslotte voor de eerder vermelde 3 patienten met het onbehandelde syndroom van Cushing en de 2 vrouwen met exogene adipositas bij wie de ^{40}K - en de $^3\text{H}_2\text{O}$ -methoden naast elkaar werden toegepast, opnieuw de hoeveelheden totaal lichaamsvet opgegeven, berekend met behulp van de verschillende gehanteerde kaliumgehalten van de vetvrije massa en op basis van een hydratatie-percentages van de vetvrije massa van 72%. Ook op basis van de "nieuwe" kaliumgehalten per kg vetvrije massa blijkt de gevonden waarde voor het totale lichaamsvet bij de 3 onderzochte patienten met het syndroom van Cushing nog steeds hoger dan op basis van de $^3\text{H}_2\text{O}$ -verdunningsmethode. Zoals eerder gesuggereerd is

dit waarschijnlijk het gevolg van het feit, dat ook deze "nieuwe" kaliumgehalten van de vetvrije massa te hoog zijn voor patiënten met hypercortisolisme in verband met spieratrofie en kaliumdepletie.

Tabel XXIV

De totale hoeveelheid lichaamsvet van 3 patiënten met onbehandeld hypercortisolisme en 2 vrouwen met exogene adipositas bij wie de bepaling werd verricht met zowel de ^{40}K - als de $^3\text{H}_2\text{O}$ -methode. Er wordt gebruik gemaakt van twee getallen voor het kaliumgehalte van de vetvrije massa; voor verklaring zie tekst.

	Totale hoeveelheid lichaamsvet (kg)		
	^{40}K -methode		$^3\text{H}_2\text{O}$ -methode
	op basis van 68,1 meq kalium per kg LBM	op basis van 57,0 (vrouwen) 63,4 (mannen) meq kalium/kg	op basis van hydratatie percentage LBM 72%
A. Cushing-syndroom			
1. Ve. (v)	24,2	20,8	16,8
2. Gr. (v)	33,8	26,1	22,9
3. v.d. Kr. (m)	42,3	37,6	27,9
B. Exogene adipositas			
I. (v, 30 jr)	27,0	20,2	20,4
II. (v, 25 jr)	31,0	22,3	23,6

6. Conclusies

Uit de in dit hoofdstuk gevonden resultaten van de toepassing van twee van elkaar onafhankelijke methoden voor de bepaling van de lichaamssamenstelling bij patiënten met het syndroom van Cushing kan worden geconcludeerd, dat men zeer behoedzaam moet zijn bij de interpretatie van de uitkomsten van dit type onderzoeken. Aan deze zogenaamde indirecte methoden ter bepaling van de lichaamssamenstelling liggen ten grondslag enerzijds de conceptie van een verdeling van het menselijk lichaam in twee compartimenten, de vetvrije massa en de massa (chemisch) vet, en anderzijds enkele veronderstellingen over een constante samenstelling van één van deze compartimenten (soortelijk gewicht, hydratatie-percentage en ka-

liumgehalte van de vetvrije massa). Bij het syndroom van Cushing kunnen deze uitgangspunten niet van toepassing blijken te zijn: het lijkt aannemelijk dat er onder de omstandigheden van een chronisch hypercortisolisme aanzienlijke veranderingen zijn opgetreden in de samenstelling en omvang van vele weefsels: hoeveelheid vet, kaliumgehalte, soortelijk gewicht en hydratatie-percentages van de vetvrije massa, botmassa.

Wanneer men gebruik maakt van twee van elkaar onafhankelijke methoden ter bepaling van de lichaamssamenstelling, stemmen de resultaten als regel niet overeen.

Uit het hier verrichte onderzoek kunnen we concluderen:

1. Met behulp van de totale lichaamstelling van ^{40}K resp. met de bepaling van de waterruimte met behulp van $^3\text{H}_2\text{O}$ kunnen wij bij patienten met het syndroom van Cushing boven- resp. onder-grenzen voor de totale vetmassa aangeven. Uit vergelijking van de laatstgenoemde categorie van gegevens voor de patienten met het syndroom van Cushing enerzijds, en die van de patienten met exogene adipositas anderzijds, blijkt dat bij de meeste patienten met hypercortisolisme de absolute hoeveelheid lichaamsvet in omvang is toegenomen. De zogenaamde "romp-adipositas" berust dus niet op redistributie van het vet alleen.
2. Bij 5 van de 7 patienten met het syndroom van Cushing die na adequate behandeling van deze aandoening werden onderzocht, bleek de totale hoeveelheid kalium te zijn toegenomen, hetgeen ten dele geïnterpreteerd zou kunnen worden als een toename van de vetvrije massa. Dit betrof 4 vrouwelijke patienten met het "pituitary dependent" syndroom van Cushing en 1 patiente met een ectopische CRF-productie (Corticotropin Releasing Factor). Bij 1 mannelijke patient met het "pituitary dependent" syndroom van Cushing bleek de totale hoeveelheid kalium na behandeling maar weinig te zijn toegenomen en alleen bij 1 patiente met een funktionerend bijnierschorscarcinoom bleek de kaliumvoorraad na behandeling te zijn afgenomen.

HOOFDSTUK VI

De meting van de snelheid van de "turnover" van de plasma-FFA bij patienten met het syndroom van Cushing

1. Inleiding en vraagstelling

De implicaties van de gegevens over de lipolyse in geïsoleerde vetcellen van de rat met een exogeen hypercortisolisme zijn niet zonder meer van toepassing op patienten met het syndroom van Cushing. In de eerste plaats zijn er verschillen in gevoeligheid voor hormonen van vetweefsel van verschillende lokalisaties van de mens resp. rat (Rudman e.a., 1967), terwijl gegevens omtrent de vraag of de metabole en endocriene veranderingen die bij het experimentele "Cushing-model" van ratten die gedurende 14 dagen met farmacologische doses cortison of cortisol zijn behandeld, overeenkomen met die bij patienten met het syndroom van Cushing, ontbreken.

Theoretisch is het meten van de snelheid van de "turnover" van glycerol de beste maat voor het volgen van de grootte van de lipolyse. De snelheid van de "turnover" van FFA is echter fysiologisch van meer belang, aangezien vetzuren een zeer belangrijke metabole brandstof voor weefsels als hart en spier vormen in de nuchtere toestand en bij arbeid. De gelijktijdige meting van de snelheid van de "turnover" van FFA en glycerol heeft nog een extra voordeel, omdat hierbij bovendien de hoeveelheid vetzuur die ter plaatse onmiddellijk wordt gereësterificeerd kan worden gemeten. Havel e.a. introduceerden in 1963 (a) een methode waarbij tegelijkertijd ^{14}C -palmitinezuur en ^3H -glycerol worden geïnfundeerd. Deze methode, waarbij langs zeer ingewikkelde weg een scheiding van radioactiviteit van deze beide

stoffen in plasma-monsters wordt verkregen, bleek in onze handen slechts mogelijk met een laag percentage recovery voor het ^3H -glycerol. Een tweede methode (Björntorp e.a., 1969a), waarbij na een constante infusie van met albumine gecomplexeerd 1- ^{14}C -palmitinezuur en ^3H -glycerol, scheiding van glycerol met dunne laag chromatografie wordt verricht, leverde eveneens een lage "recovery" (30-60%) van de radioactiviteit op. Op grond hiervan hebben wij volstaan met de meting van de snelheid van de "turnover" van de plasma-FFA volgens een door Havel e.a. (1963b) beschreven continu-infusietechniek van aan albumine gebonden palmitinezuur-1- ^{14}C , waarbij dan alleen een maat wordt verkregen van de "overall"-lipolyse, dat wil zeggen de resultante van het totaal vrijgekomen vetzuur minus het onmiddellijk in het vetweefsel gereësterificeerde vetzuur.

Patienten met exogene adipositas vertonen een significant hogere snelheid van de "turnover" van plasma-FFA dan normale individuen. Dit verschil verdwijnt wanneer de snelheid van de "turnover" wordt uitgedrukt per kg. lichaamsgewicht (Birkenhäger e.a., 1969). Patienten met hypercortisolisme hebben een aantal kenmerken gemeen met individuen die aan vetzucht lijden: een toegenomen hoeveelheid vet (zie hoofdstuk V), het bestaan (van een zekere mate) van insuline-resistentie en hyperinsulinisme. 16 patienten met het syndroom van Cushing, meest van het "pituitary dependent" type, werden vóór behandeling met behulp van deze door Havel beschreven techniek onderzocht en bij 7 van deze 16 patienten werd het onderzoek minimaal 3 maanden na herstel van een normale bijnierschorsfunctie herhaald.

2. Methodiek

A. Uitvoering

Alle patienten werden 's ochtends liggend onderzocht na 16 uur vasten. In één arm werd een Cournandnaald in de arteria brachialis gebracht voor de afname van bloed. In een diepe vene van de andere arm werd een wijde "Intracath"-katheter (type Bardic, large, 1614 K) ingebracht en aangesloten op een infusie-pompje (L.K.B., type varioperpex, "peristaltic pump"), waardoor een fysiologische zoutoplossing werd gepompt. Het infusie-pompje werd tesamen met

de bijbehorende slangen nauwkeurig gecalibreerd, door de hoeveelheid fysiologisch zout die per minuut wordt doorgepompt voor en na het onderzoek door weging te meten.

Twintig minuten nadat het beschreven infusie-systeem en de naald voor bloedafname waren ingebracht, werd begonnen met de continu-infusie van de palmitaat-1-¹⁴C-oplossing. Na een dosis van 2,0 ml palmitaat-oplossing gedurende 1 minuut (overeenkomende met 0,72-1,0 μ Ci palmitaat-1-¹⁴C), werd de infusie gedurende 90 minuten voortgezet met een constante snelheid van 0,360-0,375 ml per minuut, hetgeen resulteerde in een dosis van 0,13 tot 0,19 μ Ci per minuut.

Via de Cournandnaald in de arteria brachialis werd om de 10 minuten een bloedmonster afgenomen. Het bloed werd opgevangen in buisjes met heparine en gecentrifugeerd waarna het plasma onmiddellijk werd geëxtraheerd.

Het aantal dpm dat per minuut is geïnfundeerd werd bij elke patient zo exakt mogelijk bepaald door de radioactiviteit van een kleine hoeveelheid van de gebruikte infusievloeistof te tellen, de tel-efficiëntie met een interne standaard van ¹⁴C-tolueen te bepalen en het aantal dpm per ml te vermenigvuldigen met de hoeveelheid ml die per minuut werden geïnfundeerd.

B. Bereiding palmitinezuur-albumine complex

Dit geschiedde met een door Fredrickson e.a. (1958) en Havel e.a. (1963b) beschreven methode. Palmitinezuur-1-¹⁴C (specifieke activiteit 44,3 - 55,2 mCi/mmol) werd verkregen van Amersham (Engeland). Het benzeen waarin het palmitinezuur-1-¹⁴C is opgelost, werd verdampt door kortstondige verhitting bij ongeveer 60°C onder een stroom door steriele watten geleide stikstof. Het palmitinezuur werd vervolgens opgelost in 2 ml aethanol 99% per (nominaal) 50 μ Ci palmitinezuur-1-¹⁴C, waarna een molair equivalente hoeveelheid van een steriele 4% (w/v) K₂CO₃-oplossing werd toegevoegd; het radioactieve palmitinezuur werd vervolgens gebonden aan menselijk serumalbumine (verkregen van het Centraal Laboratorium voor de Bloedtransfusiedienst in Amsterdam) door toevoeging van 16-18 ml van een 20% oplossing per nominaal 50 μ Ci palmitinezuur-1-¹⁴C. Voor het gebruik volgde nog een verdunning met fysiologisch zout tot de

gewenste concentratie radioactiviteit. In een eindvolume van 50 ml was tenslotte tussen 18 en 25 μCi palmitinezuur-1- ^{14}C aanwezig. Hiervan werd steeds maximaal 75%, dat wil zeggen 12,5-17,5 μCi per experiment geïnfundeerd.

Minimaal 4 dagen voor het gebruik van de oplossing werd een klein monster afgenomen voor bacteriologische controle.

C. Analytische methoden

Monsters plasma van 2 ml werden genomen voor de extractie van FFA met 10 ml Dole's mengsel (Dole, 1956). De FFA worden vervolgens getitreerd volgens een door Trout e.a. (1960) geïntroduceerde modificatie; deze microtitratie van 3 ml van het gezuiverde extract wordt uitgevoerd met 0,1 N NaOH-oplossing met thymolblauw als indicator. Bij deze microtitratie worden de FFA van de triglyceriden gescheiden voor bepaling van de radioactiviteit in deze lipiden-frakties. Na de titratie wordt nog een overmaat 0,02 N NaOH-oplossing toegevoegd van hetzelfde volume als werd gebruikt bij de titratie. De twee hierbij ontstane fasen worden vervolgens gecentrifugeerd gedurende 5 minuten (2500 x g). In de onderste, waterige laag bevinden zich dan de FFA- en in de bovenste organische fase de triglyceriden-fractie. De bovenste fase wordt verwijderd met een Pasteurse pipet en de onderste, waterige fase geëxtraheerd met 3 ml heptaan.

De beide triglyceriden bevattende extracten worden bij elkaar gevoegd en ingedampt. Het droge residu wordt opgelost in 10 ml scintillatie-vloeistof (tolueen dat per liter 5 gram 2,5-diphenyloxazol (PPO) en 0,3 gram 1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyl oxazolyl) benzol (POPOP) bevat) en geteld met een efficiëntie van 80-89%. Aan de waterige fase worden 2,0 ml aethanol (99%), enkele druppels hyamine en 10 ml van de genoemde telvloeistof toegevoegd en de radioactiviteit van de FFA bepaald (efficiëntie 60-68%).

De concentratie FFA in het plasma wordt bepaald volgens Mosinger (1965). Deze methode leverde beter reproduceerbare getallen dan die volgens Trout (1960).

3. Discussie methodiek

A. Uitvoering

In de literatuur wordt bij de bepaling van de snelheid van de "turnover" van de plasma-FFA met behulp van de continu-infusie-techniek van aan albumine gebonden radioactief gemerkt vetzuur niet steeds gebruik gemaakt van arteriële bloedmonsters. Uit het werk van Zierler (1961) en Rabinowitz e.a. (1962a en b), waarbij metabole onderzoeken werden verricht van de weefsels van de onderarm door gelijktijdige katheterisatie van de arteria brachialis en een diepe en een oppervlakkig gelegen armvene, is gebleken dat de snelheid van het verbruik van vetzuur en van de produktie van vetzuur, gemeten aan concentratie-verschillen op de genoemde lokalisaties, kunnen variëren; zij maakten aannemelijk dat diepe venen hoofdzakelijk de onderarmmusculatuur draineren en de oppervlakkige venen voornamelijk de subcutane vetdepots en de huid. Door de bloedmonsters tijdens de ^{14}C -palmitinezuur-infusie via de arteria brachialis af te nemen, wordt een eventuele beïnvloeding van de concentratie FFA door perifere vetdepots of door het verbruik van FFA door spier voorkomen. Dit is in ons onderzoek des te meer noodzakelijk aangezien patiënten met het syndroom van Cushing, bij wie de perifere vetdepots vermoedelijk in omvang zijn afgenomen, worden vergeleken met normale individuen en patiënten met exogene adipositas.

B. Bereiding palmitinezuur-albumine complex en de keuze van radioactief gemerkt palmitinezuur voor de bepaling van de snelheid van de "turnover" van de plasma-FFA

Het infunderen van een onveresterd, radioactief gemerkt vetzuur gebonden aan menselijk serumalbumine werd gekozen om zoveel mogelijk de omstandigheden in het plasma van de mens na te booten. Kessler e.a. (1967) vonden, dat de snelheid van de verdwijning van radioactief gemerkt FFA uit het plasma kan worden beïnvloed door de bereidingsmethode van het FFA-albumine complex; zij zijn van mening, dat verschillen in de structuur van de vetzuurmoleculen de interactie met de bindingsplaatsen van albumine beïnvloeden en dat de metabole verschillen, die gevonden worden tussen op verschil-

lende wijzen bereide complexen direkt gerelateerd zijn met het gemak waarmee het vetzuur van het albumine over kan gaan naar de receptoren van de weefsels. De aard van de binding tussen de vetzuur-anionen en het serumalbumine is niet geheel bekend. Spector e.a. (1969) analyseerden de binding van verscheidene vetzuren aan runder- en menselijk albumine; zij vonden dat er ten aanzien van de affiniteit 3 primaire, 3 secundaire en ongeveer 63 tertiaire bindingsplaatsen aan het albumine-molecuul aanwezig zijn. Volgens Nikkilä (1971) bestaat geen twijfel aan de fysiologische juistheid van de kinetische gegevens die worden verkregen met infusie van in vitro bereid albumine-radioactief gemerkt vetzuur-complex: er ontstaan steeds lage molaire FFA/albumine ratio's en de bindingsplaatsen zijn geenszins verzadigd.

In de meeste onderzoeken naar het mechanisme van mobilisatie en utilisatie van vetzuur wordt gebruik gemaakt van één enkel radioactief gemerkt vetzuur, meestal palmitinezuur. Dit vetzuur wordt gekozen omdat er radioactief gemerkte preparaten van hoge zuiverheid van verkrijgbaar zijn, terwijl deze preparaten aanmerkelijk stabiel zijn dan die van radioactief gemerkt olie- en linolzuur (Spector, 1971).

De vraag of men de (gemeten) snelheid van de "turnover" van één vetzuur (palmitinezuur) gelijk mag stellen aan de snelheid van de "turnover" van de vetzuren in het algemeen bij de mens, is niet met zekerheid te beantwoorden: Fredrickson e.a. (1958) vonden geen verschil in de snelheid van de "turnover" van resp. palmitine-, olie- en linolzuur, maar volgens Nestel (1965) verloopt de "turnover" van radioactief gemerkt linolzuur bij de mens sneller dan die van palmitinezuur. Spector e.a. (1967) toonden aan dat de belangrijke vetzuren: palmitine-, stearine-, olie- en linolzuur op een gelijke wijze worden gemetaboliseerd en met vergelijkbare snelheden.

C. Analytische methoden

Nagegaan werd in hoeverre met de beschreven analytische methode een voldoende scheiding van de FFA- en de triglyceride-fraktie bereikt wordt: 0,1 ml infusievloeistof (met aan albumine gebonden palmitinezuur-1-¹⁴C) werd toegevoegd aan 6 ml plasma. Na extractie, titratie van vetzuur en scheiding van de fasen als eerder

beschreven, bleek de waterige, vetzuur-houdende fase 101% van de toegevoegde hoeveelheid radioactiviteit te bevatten.

4. Theoretische achtergrond en berekening van de snelheid van de "turnover" van de plasma-FFA

Een belangrijk kenmerk van het metabolisme van vetzuren is de hoge snelheid van uitwisseling tussen de FFA van het plasma en de intracellulaire vrije en veresterde vetzuren. De plasma-FFA hebben een halfwaardetijd van 1 à 2 minuten met een omzettingssnelheid tot 30-60% per minuut van de voorraad in het betreffende compartiment. Dit werd door Laurell (1957) en Fredrickson e.a. (1958) bij 9 resp. 21 normale individuen berekend uit de curve van de radioactiviteit (en de specifieke radioactiviteit) in de FFA-fractie in het plasma tegen de tijd, na één enkele intraveneuze injectie van bijvoorbeeld radioactief gemerkt palmitine- of olie-zuur. De niet logaritmisch tegen de tijd uitgezette curve is slechts in de eerste minuten lineair, waarna er een steeds groter wordende vertraging in de afname van de gemeten radioactiviteit optreedt. Deze deviatie is een gevolg van een continue "recycling" van vetzuurmoleculen terug in het plasma-compartiment.

De kinetica van de "turnover" van de plasma-FFA is bestudeerd met behulp van de vergelijking van de gevonden gegevens met een computersimulatie met hypothetische modellen bij de rat (Baker e.a., 1967) en bij de mens (Eaton e.a., 1969). Het volume waarover de aan albumine gebonden vetzuren zich in eerste instantie verdelen blijkt ongeveer 30% groter te zijn dan het plasma-volume. In de paragraaf "Inleiding en vraagstelling" van dit hoofdstuk werd vermeld dat de snelheid van de "turnover" van plasma-FFA werd gemeten bij drie groepen mensen: controles, patienten met exogene adipositas en patienten met hypercortisolisme vóór en na de behandeling. In hoofdstuk V is de mogelijkheid ter sprake gekomen, dat het volume van de extra-cellulaire vloeistofruimte en de hydratatie van de vet-vrije massa onder invloed van chronisch hypercortisolisme kan zijn toegenomen. Hoewel bij een aantal patienten de $^3\text{H}_2\text{O}$ -waterruimte is gemeten, kunnen we geen juiste maat voor deze hydratatietoestand geven (zie discussie, hoofdstuk V). Ook de bepaling van het plasma-volume geeft hier slechts beperkte informatie. Het betrekken

van de snelheid van de "turnover" van de plasma-FFA op de vetvrije massa, berekend met de ^{40}K -methode lijkt hier eveneens onjuist, aangezien de grootte hiervan bij patienten met een syndroom van Cushing niet nauwkeurig kan worden berekend (zie discussie, hoofdstuk V).

Een mogelijkheid om deze problemen bij het uitdrukken van de snelheid van de "turnover" van plasma-FFA per liter plasma, per kg vet of per kg vetvrije massa te omzeilen, wordt door Havel e.a. (1963b) geboden; zij maken aannemelijk dat de berekening van de snelheid van de "turnover" van de plasma-FFA onafhankelijk is van het volume van het compartiment waarin het isotoop verdeeld is, wanneer met behulp van de continu-infusie een constante specifieke radioactiviteit van de FFA in het plasma bereikt wordt; onder deze laatste omstandigheden geldt:

$$K = \frac{i}{q} \quad \text{waarbij} \quad \begin{array}{l} K = \text{de omzettingssnelheid van de FFA per} \\ \text{minuut} \\ i = \text{de infusie-snelheid (d.p.m. per minuut)} \\ q = \text{de totale radioactiviteit in het plasma} \\ \text{(d.p.m. per liter, vermenigvuldigd met het} \\ \text{plasma-volume in liters = d.p.m.)} \end{array}$$

in deze steady-state is echter ook:

$$K = \frac{I}{Q} \quad \text{waarbij} \quad \begin{array}{l} I = \text{de snelheid van "influx" van FFA in het} \\ \text{plasma } (\mu\text{eq per minuut}) \\ Q = \text{de totale hoeveelheid FFA in het plasma} \\ \text{(}\mu\text{eq per liter, vermenigvuldigd met het} \\ \text{plasma-volume in liters = } \mu\text{eq).} \end{array}$$

hieruit volgt:

$$I = \frac{i}{q/Q} = \frac{i}{P} \quad \text{waarbij } P = \text{de specifieke aktiviteit van de plasma-} \\ \text{FFA (d.p.m. per } \mu\text{eq).}$$

Wanneer de snelheid van de "influx" van FFA in het plasma (die in nuchtere toestand alleen vanuit de vetdepots optreedt), gelijk is aan die van de "efflux" (voor oxydatie in onder meer skeletspier en voor opslag in spier- en vetweefsel), kan men spreken van de

snelheid van de "turnover" van de FFA in het plasma.

Het bleek dat de specifieke radio-activiteit van plasma-FFA bij de gebruikte continu-infusie van aan albumine gekoppeld palmitinezuur- $1-^{14}\text{C}$ reeds na 10 à 20 minuten constant wordt (met een afwijking ten opzichte van het gemiddelde tijdens het verdere beloop tot 90 minuten van maximaal 10%). Uit praktische overwegingen werd besloten om van alle waarnemingen van de specifieke activiteit van plasma-FFA, die bij iedere patient gedaan werden tijdens de infusie ná 20 minuten, het gemiddelde te gebruiken voor de berekening van de snelheid van de "turnover" van de FFA (zie appendix). De snelheid van de infusie van het radioactief gemerkte FFA over de periode tussen 30 en 90 minuten (in d.p.m./min) wordt hiertoe gedeeld door de gemiddelde specifieke activiteit (d.p.m./ μeq).

5. Resultaten

De snelheid van de "turnover" van de plasma-FFA werd bepaald bij 6 gezonde controle personen, 7 patienten met exogene adipositas en 16 patienten met hypercortisolisme. Bij 7 van deze 16 patienten werd het onderzoek herhaald nadat het hypercortisolisme behandeld was en de snelheid van de cortisol-secretie gedurende minstens 3 maanden genormaliseerd was. Voor nadere gegevens over het geslacht, leeftijd, lichaamsgewicht, oorzaak van het syndroom van Cushing en de mate van hypercortisolisme wordt verwezen naar Appendix, tabel Ia-d. De resultaten van het onderzoek bij de normale proefpersonen en de patienten met exogene vetzucht zijn reeds eerder beschreven (Birkenhäger en Tjabbes, 1969).

Als statistische methode voor de vergelijking van de "turnover" van de plasma-FFA bij de patienten en normale individuen van de verschillende groepen, werd gebruik gemaakt van de door Snedecor e.a. (1967) beschreven "one-way classification of analysis of variance". Een voordeel van deze methode is dat hierbij door het gebruik van alle waarden voor de specifieke (radio)activiteit van de plasma-FFA van 30 tot 90 minuten verkregen tijdens de infusie, meer informatie wordt verwerkt bij de vergelijking van de verschillende groepen onderzochte patienten, dan bij gebruik van de gemiddelde waarden voor de specifieke activiteit van de plasma-FFA per patient zoals bij de toepassing van Student's ongepaarde t-test.

In figuur 16 en 17 zijn de snelheden van de FFA-"turnover" in $\mu\text{eq}/\text{min}$ en $\mu\text{eq}/\text{min}/\text{kg}$ lichaamsgewicht weergegeven. De gemiddelde waarden met standaarddeviaties bedragen in de controlegroep $556 \pm 94 \mu\text{eq}/\text{min}$ resp. $8,19 \pm 1,46 \mu\text{eq}/\text{min}/\text{kg}$, bij patiënten met vetzucht $868 \pm 133 \mu\text{eq}/\text{min}$ resp. $8,11 \pm 1,84 \mu\text{eq}/\text{min}/\text{kg}$, bij de patiënten met hypercortisolisme vóór behandeling $408 \pm 121 \mu\text{eq}/\text{min}$ resp. $5,49 \pm 1,52 \mu\text{eq}/\text{min}/\text{kg}$ en na behandeling $554 \pm 111 \mu\text{eq}/\text{min}$ resp. $7,90 \pm 1,49 \mu\text{eq}/\text{min}/\text{kg}$. In tabel XXV zijn significanties berekend van de verschillen van de "turnover" van de plasma-FFA bij de verschillende groepen patiënten: bij de patiënten met vetzucht is de snelheid van de FFA-"turnover" in $\mu\text{eq}/\text{min}$ significant hoger dan bij de normalen en de patiënten met hypercortisolisme zowel vóór als na behandeling; deze snelheid blijkt echter bij de controles ook significant sneller te zijn, dan bij de onderzochte patiënten met het syndroom van Cushing, terwijl dit verschil na adequate behandeling van het hypercortisolisme verdwijnt. Wanneer de snelheid van de FFA-"turnover" echter wordt uitgedrukt in $\mu\text{eq}/\text{min}$ per kg lichaamsgewicht verandert het beeld: het verschil tussen de controles en patiënten met vetzucht verdwijnt, maar de waargenomen verschillen in snelheid van de FFA-"turnover" tussen personen uit de controle groep en patiënten met hypercortisolisme en

Tabel XXV

De snelheid van de "turnover" van de plasma-FFA

Vergeleken Groepen	$\mu\text{eq} / \text{minuut}$			$\mu\text{eq}/\text{minuut}/\text{kg}$ lichaamsgewicht		
	size of diff. of the means	S.E.M. *)	p	size of diff. of the means	S.E.M. *)	p
1. Normalen-Cushing (vóór behandeling)	148,4	14,40	<0.001	2,96	0,136	<0.001
2. Normalen-vetzucht	311,7	11,42	<0.001	0,08	0,160	>0.5
3. Normalen-Cushing (na behandeling)	2,3	12,78	>0.5	0,29	0,152	0.064
4. Vetzucht-Cushing (vóór behandeling)	460,1	11,01	<0.001	2,62	0,132	<0.001
5. Vetzucht-Cushing (na behandeling)	314,0	12,31	<0.001	0,21	0,150	>0.1
6. Cushing vóór-na behandeling	146,1	10,32	<0.001	2,41	0,124	<0.001

Methode: "one-way classification of analysis of variance"; Snedecor e.a. 1967, p. 258
Zie Appendix, Tabel III en IV.

*) S.E.M. = Standard Error of the Mean.

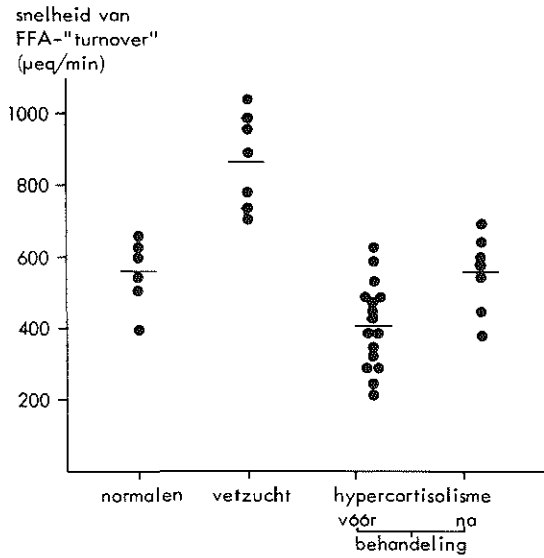


Fig. 16. De snelheid van de "turnover" van plasma-FFA van de patienten en de normalen.

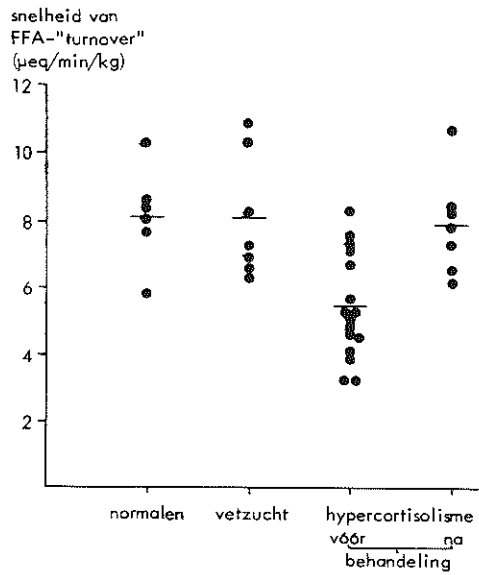


Fig. 17. De snelheid van de "turnover" van plasma-FFA per kg lichaamsgewicht van de patienten en de normalen.

tussen patienten met hypercortisolisme vóór resp. na behandeling blijven aanwezig. De statistische vergelijking van deze groepen is ook uitgevoerd met behulp van Student's ongepaarde t-test. In tabel V van de Appendix zijn de hierbij gevonden p waarden opgegeven. Zij vertonen in essentie geen verschillen met de resultaten van de hier gebruikte variantie-analyse.

Vervolgens werd berekend in hoeverre er ook een statistisch significant verschil bestaat tussen de nuchtere plasma-FFA concentraties bij de onderzochte groepen patienten (de afzonderlijke getallen staan vermeld in de Appendix, tabel I). Er bleken geen significante verschillen tussen de groepen te bestaan. Wel bleek er een correlatie tussen het plasma-FFA-gehalte in nuchtere toestand en de snelheid van de "turnover" van de plasma-FFA (figuur 18A en B).

In hoofdstuk V zijn de gegevens over de lichaamssamenstelling bij het syndroom van Cushing behandeld. Deze gegevens waren grotendeels verkregen met de totale lichaamstelling van ^{40}K . Er is op gewezen dat er problemen bestaan bij de interpretatie van de met de ^{40}K -telling verkregen gegevens bij patienten met chronisch hypercortisolisme. Hoewel derhalve de absolute waarde van deze resultaten discutabel is, werd door ons nagegaan of de snelheid van de "turnover" van de plasma-FFA bij patienten met het syndroom van Cushing gecorreleerd zou zijn met de hoeveelheid lichaamsvet. Er werd geen correlatie gevonden (figuur 19A en B).

De basale waarden van het insuline-gehalte van het plasma van patienten met hypercortisolisme vertoont evenmin correlatie met de hoogte van de snelheid van de FFA-"turnover" (figuur 20).

6. Discussie

De belangrijkste bron van de FFA van het plasma is het vetweefsel. Bij vasten neemt het aandeel dat het vetweefsel bij deze FFA-"influx" heeft verder toe tot vrijwel 100% (Nikkilä, 1971).

De bij normalen gevonden gemiddelde waarden voor de snelheid van de "turnover" van de plasma-FFA komen goed overeen met de in de literatuur opgegeven waarden: Csorba e.a. (1966): $7,8 \mu\text{eq}/\text{min}/\text{kg}$, Lewis e.a. (1966): $6,6 \mu\text{eq}/\text{min}/\text{kg}$, Sandhofer e.a. (1966): $7,0 \mu\text{eq}/\text{min}/\text{kg}$, Nestel (1968): $459 \mu\text{eq}/\text{min}$ resp. $6,5 \mu\text{eq}/\text{min}/\text{kg}$ en Björntörp e.a. (1969b): $505 \mu\text{eq}/\text{min}$ resp. $6,9 \mu\text{eq}/\text{min}/\text{kg}$. De corre-

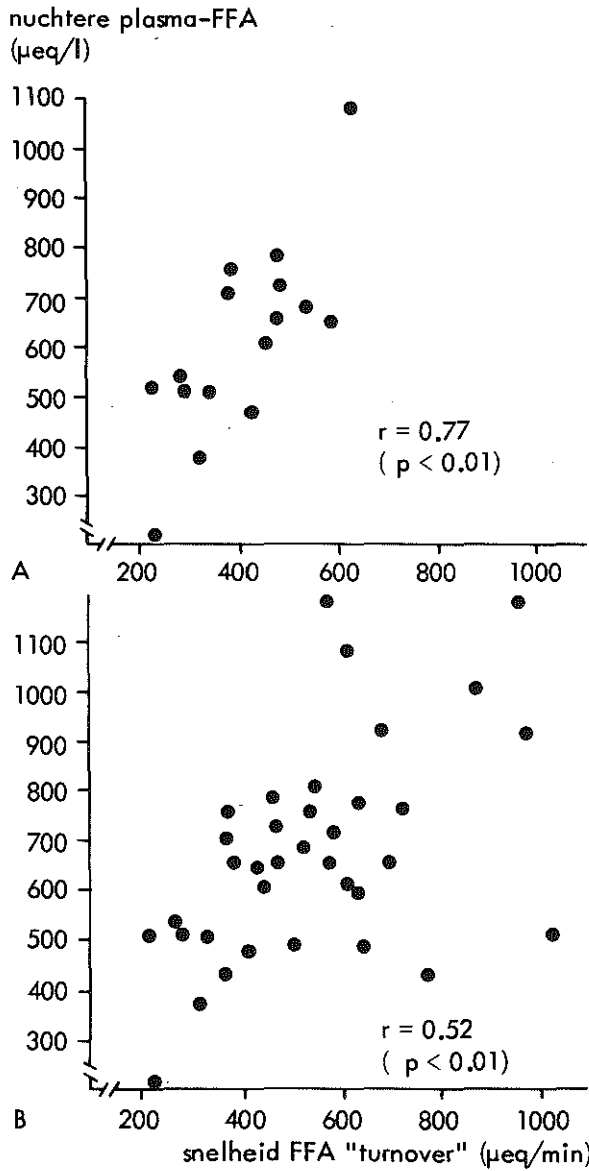


Fig. 18. De relatie tussen het nuchtere FFA-gehalte van het plasma en de snelheid van de FFA-"turnover"

- A. voor patiënten met een onbehandeld hypercortisolisme
- B. voor alle personen uit de controle groep en alle onderzochte patiënten.

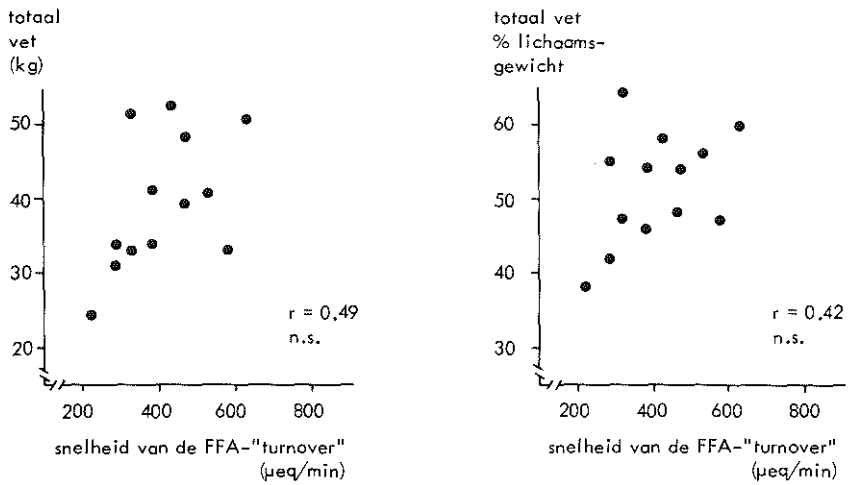


Fig. 19. De relatie tussen het totaal aantal kg lichaamsvet resp. het % vet en de snelheid van de FFA-"turnover" bij onbehandelde patiënten met hypercortisolisme.

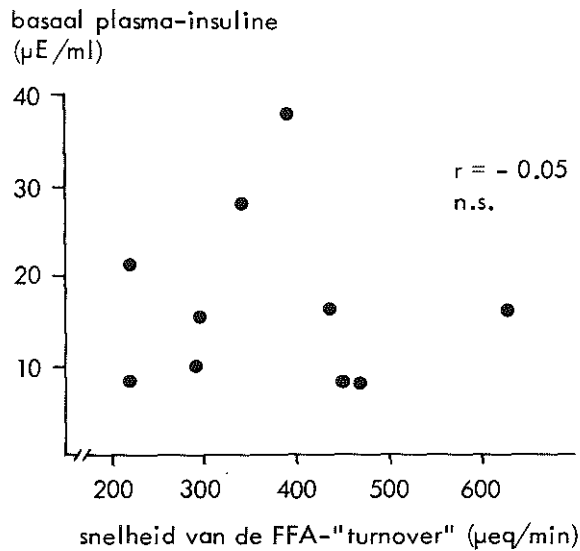


Fig. 20. De relatie tussen de basale insuline-concentratie in het plasma en de snelheid van de FFA-"turnover" bij onbehandelde patiënten met hypercortisolisme.

latie tussen de nuchtere waarde van de FFA-concentratie in het plasma en de snelheid van de "turnover" van de plasma-FFA is reeds eerder aangetoond, zij het dat voor de laatste verschillende expressies zijn gebruikt (Nestel e.a., 1965, Issekutz e.a., 1967, Birkenhäger en Tjabbes, 1969).

De verhoogde snelheid van de "turnover" van de plasma-FFA bij patienten met exogene adipositas werd reeds door Nestel e.a. (1968) en Birkenhäger en Tjabbes (1969) beschreven. Wanneer deze snelheid echter wordt uitgedrukt per kg lichaamsgewicht verdwijnt het verschil met de waarden gevonden in de controle groep. Aangezien de "turnover"-snelheid, indien uitgedrukt per kg lichaamsvet, bij vetzuchtigen zelfs lager blijkt te zijn dan normaal moet men aannemen dat de gevonden verhoogde absolute snelheid van de FFA-"turnover" bij een toegenomen vetmassa niet een gevolg is van een verhoogde afgifte van vetzuur per vetcel, maar dat zij kan samenhangen met een groter aantal in dit opzicht normaal funktionerende vetcellen.

Betrekkelijk onverwacht is de waarneming dat de snelheid van de "turnover" van de plasma-FFA bij patienten met het syndroom van Cushing zowel per minuut als per minuut per kg lichaamsgewicht significant lager is dan bij de personen uit de controle groep. Na behandeling van het hypercortisolisme bleek de snelheid van de "turnover" weer tot in het normale gebied te zijn teruggekeerd.

Bij het in vitro onderzoek naar de invloed van cortisol op vetweefsel (hoofdstuk II), is bij het meten van de vetzuur-productie door geïsoleerde vetcellen die waren bereid uit vetweefsel dat in vivo of in vitro was voorbehandeld met glucocorticoïed hormoon in overmaat, het tegengestelde gevonden, althans wanneer de lipolyse van de vetcellen wordt gestimuleerd met adrenaline. De basale productie van glycerol werd niet beïnvloed, maar uit de literatuur blijkt dat uit vetcellen die zijn vóóргеïncubeerd met glucocorticoïed hormoon basaal méér vetzuur vrijkomt (zie het werk van Fain, 1963, 1964 en 1965). Deze auteur toonde echter ook aan, dat deze toegenomen productie van vetzuur die optreedt onder invloed van farmacologische doseringen of concentraties glucocorticoïed hormoon, reeds met lage concentraties insuline teniet gedaan kan worden.

Ook de snelheid van de "turnover" van de plasma-FFA kan worden verlaagd met behulp van infusie van fysiologische hoeveelheden insuline (Nestel, 1967). Wij hebben geen onderzoek verricht

naar een eventuele invloed van het plasma-insuline-gehalte op de snelheid van de FFA-"turnover" bij patienten met het syndroom van Cushing (met name niet van de insulinespiegels bij provocatie met glucose-belasting). Het insuline-gehalte van het plasma in nuchtere toestand werd een aantal malen gemeten en bleek niet te correleren met de snelheid van de FFA-"turnover".

7. Conclusie

Bij een aantal patienten met hypercortisolisme is een significant verlaagde snelheid van de "turnover" van de plasma-FFA gevonden vergeleken met deze snelheid bij normalen en bij een groep patienten met vetzucht. Uit de gegevens vermeld in hoofdstuk V, aangaande de lichaamssamenstelling van de patienten met hypercortisolisme, blijkt dat de hoeveelheid lichaamsvet bij de onderzochte patienten absoluut is toegenomen. Verder is uit de literatuur bekend (Perley e.a., 1966, Wise e.a., 1973a en b en Owen e.a., 1973) dat bij patienten met het syndroom van Cushing en bij normale proefpersonen die enkele dagen met hoge doses glucocorticoïed hormoon worden behandeld een verhoogde basale insuline-spiegel van het plasma gevonden wordt, mogelijk als gevolg van insuline-resistentie van skeletspier- en vetweefsel.

Bij vergelijking van de twee groepen patienten met vetzucht resp. een chronisch hypercortisolisme die een absolute toename van de hoeveelheid vet, het bestaan van hyperinsulinisme en van insuline-resistentie van skeletspier- en vetweefsel met elkaar gemeen hebben, wordt in dit onderzoek een discrepantie gevonden in de snelheid van de "turnover" van de plasma-FFA, die bij vetzucht verhoogd en hypercortisolisme verlaagd bleek te zijn.

8. Poging tot verklaring van de gevonden verschillen in snelheid van de "turnover" van de plasma-FFA bij het syndroom van Cushing en bij exogene vetzucht

De intraveneuze toediening van cortisol in een dosering van de orde van grootte van 100 mg veroorzaakt een significante stijging van de FFA in het plasma, die na twee uur maximaal is (Dreiling e.a.,

1962, Nayak e.a., 1962). De afgifte van FFA door het vetweefsel in de onderarm van gezonde, nuchtere proefpersonen neemt onder invloed van een infusie met cortisol tot een plasma-concentratie van 0,5 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ na één uur toe (Jenkins e.a., 1964). Mischke e.a. (1974) dienden aan gezonde proefpersonen over een periode van twee uur intraveneus cortisol toe in een dosering van 1 mg/kg lichaamsgewicht: er trad een significante toename in de FFA-concentratie van het plasma op. Deze stijging in de plasma-FFA-concentratie onder invloed van de acute toediening van een farmacologische dosering cortisol kan worden voorkomen door gelijktijdige toediening van lage doses insuline (Jenkins e.a., 1964; Mischke e.a., 1974).

Een verhoogde secretie van cortisol heeft voornamelijk invloed op de eiwitstofwisseling. Er zijn weinig kwantitatieve gegevens over het acute effect van hoge doseringen glucocorticoïed hormoon op de eiwitstofwisseling, maar de gevolgen van chronisch hypercortisolisme zijn in de regel duidelijk: de katabole werking uit zich in spieratrofie, zwakte, atrofie van de huid, slechte wondgenezing en osteoporose. Hypercortisolisme gaat gepaard met een toename van de concentratie alanine in het plasma, terwijl de concentraties van andere aminozuren ongewijzigd blijven (Wise e.a., 1973a). Insuline verlaagt bij gezonde proefpersonen de concentratie van alle aminozuren in het plasma, behalve alanine (Pozefski e.a., 1969). Het lijkt of de secretie van het anabool werkzame insuline die in fysiologische omstandigheden voldoende is om onder meer de voorraad eiwit in het spierweefsel in stand te houden, bij chronisch hypercortisolisme te kort schiet, hetgeen leidt tot weefselafbraak, aminozuurmobilisatie c.q. een verhoogde concentratie alanine in het plasma. Daarnaast wordt, waarschijnlijk eveneens door het verhoogde aanbod van substraat zoals van alanine, de secretie van glucagon gestimuleerd met als gevolg stimulatie van de gluconeogenese (Felig, 1973). Deze veranderingen lijken analoog te zijn aan die na een eiwitrijke maaltijd. Het is aangetoond dat toediening van een overmaat glucocorticoïed hormoon aanleiding geeft tot secretie van glucagon (Marco e.a., 1973). Deze effecten resulteren in een verhoogde produktie van glucose door de lever hetgeen tesamen met de in vitro waargenomen remming van de opname van glucose door spier- en vetweefsel (Munck, 1962, 1971) zal leiden tot verhoging van de glucose-concentratie in het plasma.

Bij patienten met het syndroom van Cushing blijkt deze hyperglycaemie echter in de regel gering en vaak voorbijgaand te zijn,

wanneer er een voldoende reserve van de insuline-secretie door het pancreas beschikbaar is (Karam e.a., 1965, Liddle, 1967, Hulsmans e.a., 1967 en Owen e.a., 1973). Het is bekend dat de toediening van hoge doses of langdurige hypersecretie van glucocorticoïed hormoon bij de mens een verhoging van de basale insuline-spiegel in het plasma en een versterking van de secretie van insuline in reactie op prikkels zoals de orale toediening van glucose tot gevolg heeft (Perley e.a., 1966, Wise e.a., 1973a en b, Owen e.a., 1973).

Reeds lang was het een onopgeloste vraag of glucagon dat bij de rat in vitro een krachtig lipolytisch hormoon is, ook bij de mens lipolytische activiteit bezit. Liljenquist e.a. (1974) toonden aan dat glucagon, toegediend in hoge doses aan patienten met een insuline-deficiëntie, inderdaad een toename van de lipolyse veroorzaakt. Bij normale personen treedt de secretie van insuline onder invloed van het toegediende glucagon echter zó snel op, dat het lipolytische effect van glucagon bij de gezonde mens niet waarneembaar is: per mol heeft insuline een veel sterkere antilipolytische activiteit dan glucagon lipolytische activiteit bezit. De glucagon/insuline ratio bepaalt ook de netto-vorming van glucose door de lever; hier heeft glucagon echter op molaire basis een sterker effect dan insuline (Unger, 1971; Cahill, 1973 en Liljenquist e.a., 1974).

Een mogelijke verklaring voor de discrepantie in de snelheid van de "turnover" van de plasma-FFA bij patienten met het syndroom van Cushing en bij patienten met exogene adipositas zou kunnen zijn, dat bij hypercortisolisme de ratio glucagon/insuline in feite nauwelijks of niet verandert doordat zowel de glucagon- als de insuline concentratie in het plasma stijgen. Bij patienten met exogene adipositas daarentegen, is deze ratio waarschijnlijk lager dan normaal tengevolge van enerzijds het hyperinsulinisme en anderzijds een verlaagde (Wise e.a., 1973b) of normale (Gossain e.a., 1974) glucagonspiegel in het plasma. Hierdoor kan bij de patient met hypercortisolisme een normale gevoeligheid van het vetweefsel voor insuline aanwezig blijven en bij vetzucht een insuline-resistentie van het vetweefsel ontstaan. Een andere faktor die een rol kan spelen bij de verlaging van de snelheid van "turnover" van de plasma-FFA bij hypercortisolisme is de sterke afname in de spiermassa die bij het syndroom van Cushing in het spel is. Dit zou in totaal een lagere opname van vrije vetzuren in het spierweefsel tot gevolg kunnen hebben, zulks in tegenstelling tot de situatie bij exogene adipositas waar de omvang van de

spiermassa vaak is toegenomen.

Een verklaring voor de typische vetverdeling bij het syndroom van Cushing met een afname van de omvang van de perifere vetdepots en een zogenaamde "rompadipositas" kunnen wij niet geven. Er zijn weinig resultaten bekend van vergelijkend onderzoek van het vetzuurmetabolisme van normaal menselijk vetweefsel afkomstig van verschillende lokalisaties.

Een rol bij de uiteenlopende reacties van de perifere en centrale vetdepots bij het syndroom van Cushing, zou gezocht kunnen worden in een beïnvloeding van het aantal insuline-receptoren op de membraan van de vetcellen, bloeddorstrooming van het spierweefsel, innervatie of in de relatie met de spiermassa ter plaatse. Duidelijke aanwijzingen over het mechanisme van het ontstaan ontbreken echter.

SAMENVATTING

In dit proefschrift wordt een poging ondernomen om de werking van cortisol op de vetcel nader te onderzoeken, onder meer tegen de achtergrond van de karakteristieke vetverdeling in de vorm van de zogenaamde rompadipositas zoals die bij vele patienten met het syndroom van Cushing gevonden wordt.

A. Onderzoek invloed cortisol op de lipolyse van vetcellen in vitro

In hoofdstuk II is met behulp van incubatie van geïsoleerde vetcellen de invloed van glucocorticoïed hormoon op de lipolyse onderzocht. Uit de literatuur is bekend, dat de aanwezigheid van een normale bijnierschorsfunctie is vereist voor het normaal optreden van de lipolyse in vetweefsel in vivo. Vóórbehandeling van vetweefsel van de rat in vitro met een overmaat glucocorticoïed hormoon leidt tot een toename van de produktie van vetzuur, terwijl er onzekerheid bestond over de vraag of ook de produktie van glycerol was toegenomen. Allereerst werd aangetoond dat de basale lipolyse van epididymale vetcellen, gemeten aan de produktie van glycerol niet verandert door voorincubatie gedurende 4 uur met een hoge concentratie dexamethason. De verhoogde produktie van vetzuur in deze gelijke omstandigheden berust dus waarschijnlijk op een remming in de reësterificatie. Vervolgens werd ook een remming in de reësterificatie door cortisol aangetoond tijdens de door adrenaline gestimuleerde lipolyse. De door adrenaline maximaal gestimuleerde lipolyse in vetcellensuspensies uit epididymaal vetweefsel dat gedurende 4 uur werd voorgeïncubeerd met een hoge concentratie dexamethason wordt wel verder verhoogd. In hoofdstuk II wordt verder beschreven dat deze

potentiatie ook aantoonbaar is in vetcellen van ratten die in vivo werden voorbehandeld met hoge doseringen cortisol, terwijl het effect ook aantoonbaar bleek op de door glucagon maximaal gestimuleerde lipolyse. Speciale aandacht werd besteed aan de uitdrukingswijze van de produktie van vetzuur en glycerol: het aantal vetcellen en de grootte-distributie van de te incuberen vetcellen in de suspensie werden bepaald met behulp van een Coulter Counter.

B. Het aangrijpingspunt van cortisol in de lipolyse

In hoofdstuk III wordt het onderzoek naar het mechanisme van de door cortisol veroorzaakte verhoging van de door adrenaline of andere "lipolytische" hormonen gestimuleerde lipolyse in de rattevetcel besproken.

Achtereenvolgens worden de theoretisch mogelijke aangrijpingspunten van cortisol in de lipolyse-cascade onderzocht:

- het effect van maximaal werkzame concentraties theofylline resp. dibutyryl-cAMP op de lipolyse van vetcellsuspensies van met cortisol behandelde en onbehandelde dieren liet zien, dat het potentiërend effect van hoge doses cortisol ook op de door een zo groot mogelijke remming van fosfodiësterase gestimuleerde lipolyse nog aantoonbaar is.
- de adenylaat cyclase-aktiviteit in homogenaten van vetcellsuspensies van met cortisol behandelde ratten bleek lager dan die van onbehandelde ratten, terwijl anderzijds de lipolyse gemeten in aanwezigheid van maximaal werkzame concentraties adrenaline en glucagon tesamen nog steeds verhoogd bleek te worden, hetgeen er op wijst dat bij maximale adenylaat cyclase-aktiviteit glucocorticoïed hormoon werkzaam blijft. Dit maakte invloed van cortisol op de receptoren op de celmembraan voor adrenaline en glucagon als mechanisme van werking van cortisol op de lipolyse onwaarschijnlijk.
- de fosfodiësterase-aktiviteit werd in vetcelhomogenaten eerst gemeten aan de hand van de verdwijning van cAMP bij een substraat-concentratie van 10 μM . Er bleek geen verschil in de totale fosfodiësterase-aktiviteit aantoonbaar onder invloed van behandeling met hoge doses cortisol. Aan de hand van een andere methode waarbij als maat voor de fosfodiësterase-aktiviteit werd

gebruikt de snelheid van verschijning van ^3H -AMP uit ^3H -cAMP was het mogelijk om de kinetische eigenschappen van zowel het PDE met hoge als die met een lage K_m in vetcellen apart te onderzoeken na behandeling van de rat met cortisol. Onder deze omstandigheden bleken van het PDE met de laagste K_m $V_{(max)}$ geremd en $K_{(m)}$ gedaald.

- de basale cAMP-concentratie van vetcellen die gedurende 4 uur waren voorbehandeld met een hoge concentratie dexamethason verschilde niet van die van onbehandelde vetcellen, hoewel in deze vetcellen wel weer verhoging door cortisol van de door adrenaline gestimuleerde lipolyse aantoonbaar bleek. Na voorbehandeling van ratten gedurende 14 dagen met hoge doseringen cortisol was de basale cAMP-concentratie echter significant hoger dan in controle vetcellen.
- de van cAMP-afhankelijke proteïne kinase-activiteit is na voorbehandeling in vitro met dexamethason en na voorbehandeling in vivo met cortisol in homogenaten van vetcellsuspensies significant hoger dan in controle vetcellen.

Op grond van deze resultaten is het waarschijnlijk dat voor de speciale stimulerende invloed van een overmaat cortisol op het lipolytisch systeem van de vetcel als geheel, een stimulatie van het proteïne kinase verantwoordelijk is: immers voorbehandeling van vetweefsel gedurende 4 uur met een hoge concentratie dexamethason heeft geen invloed op de basale produktie van glycerol en op de basale concentratie cAMP, terwijl wel de door adrenaline of glucagon maximaal gestimuleerde lipolyse is gepotentieerd en de van cAMP-afhankelijke proteïne kinase-activiteit significant is toegenomen. In de proefopstelling waarbij de rat gedurende 14 dagen wordt voorbehandeld met een hoge dosis cortisol is de basale produktie van glycerol niet veranderd, is de basale cAMP-concentratie toegenomen, is de PDE-activiteit verminderd ($V_{(max)}$ van het lage K_m -enzym geremd), en treedt zowel de potentiatie van de lipolyse als de stimulatie van de cAMP-afhankelijke proteïne kinase-activiteit op. De (laat intredende) invloed op de PDE-activiteit lijkt dus niet verantwoordelijk voor het speciale effect van overmaat glucocorticoïed hormoon op de "over-all"-lipolyse. Mogelijk is de verlaging van de $V_{(max)}$ (en van de $K_{(m)}$) van het PDE met lage K_m een gevolg van de verhoogde activiteit van het proteïne kinase.

C. De invloed van hypercortisolisme op de lichaamssamenstelling

In hoofdstuk IV wordt beschreven dat de toediening van een overmaat glucocorticoïed hormoon aan de groeiende rat een remming van de normale toename van het lichaamsgewicht veroorzaakt tot zelfs een daling, terwijl er een conserverend effect is op de massa van het epididymale vetkwabje. De resultaten van vetceltellingen met behulp van de osmium tetroxyde fixatie en de Coulter Counter wijzen er op, dat de relatieve toename van het gewicht van het onderzochte epididymale vetweefsel niet kan worden verklaard door een toename van het vetcelaantal.

In hoofdstuk V worden een aantal indirecte methoden ter bepaling van de lichaamssamenstelling van de mens tesamen met de eigen resultaten verkregen met twee van deze methoden besproken. De beide gebruikte methoden zijn echter gebaseerd op veronderstellingen die bij patienten met hypercortisolisme waarschijnlijk niet geheel opgaan. Bij gebruik van de ^{40}K -methode met behulp van de totale lichaamsteller treedt zeer waarschijnlijk een overschatting van de hoeveelheid lichaamsvet bij patienten met het syndroom van Cushing op, terwijl bij gebruik van de $^3\text{H}_2\text{O}$ -waterruimte deze hoeveelheid vet waarschijnlijk wordt onderschat. Op grond hiervan kunnen slechts grenzen worden aangegeven, waartussen de hoeveelheid vet en de vetvrije massa bij patienten met het syndroom van Cushing per patient moeten liggen. In ieder geval kan uit dit onderzoek wel geconcludeerd worden dat de absolute hoeveelheid lichaamsvet bij de patienten met hypercortisolisme groter is dan normaal.

D. De "overall"-lipolyse bij patienten met hypercortisolisme

Aan de hand van de meting van de snelheid van de "turnover" van plasma-FFA met behulp van de continu-infusie van aan albumine gebonden palmitinezuur- $1\text{-}^{14}\text{C}$ wordt in hoofdstuk VI de "overall"-lipolyse bij patienten met het syndroom van Cushing besproken. De aldus gemeten lipolyse blijkt deze categorie patienten significant lager te zijn dan bij normale proefpersonen en (vooral) bij patienten met vetzucht. Na herstel van een normale cortisolsecretie keert de "overall"-lipolyse tot binnen de normale grenzen terug. Deze bevindingen suggereren dat het vetweefsel als totaal bij hypercortisolisme

minder insuline-resistent is dan bij vetzucht. Tot slot worden de mogelijke oorzaken voor het verschil in "overall"-lipolyse bij hypercortisolisme en exogene vetzucht besproken.

SUMMARY

In these investigations concerning the biochemical action of cortisol the fat cell has been chosen as a target, because of the very characteristic gross influence of excess glucocorticoid hormone on the human adipose tissue on one hand and because of the known enhancing action of this hormone on lipolysis in adipose tissue in vitro on the other hand.

A. The influence of cortisol on the lipolysis of fat cells in vitro.

The incubation of isolated fat cells is used to assess the influence of glucocorticoid hormone on lipolysis (Chapter II). According to the literature a normal functioning of the adrenal cortex is essential for normal lipolysis in adipose tissue in vivo.

Rat epididymal adipose tissue, pretreated in vitro with excess glucocorticoid hormone (dexamethasone), exhibits an increase of the production of fatty acid, but it has not been shown with certainty whether the production of glycerol is stimulated too.

In Chapter II is reported that the basal lipolysis of the epididymal fat cell, as reflected by the production of glycerol, does not change by preincubation with a high concentration of dexamethasone during 4 hours. Thus the increased production of fatty acid that occurs under these circumstances might be the result of inhibition of reesterification. Furthermore, an inhibition of the reesterification by cortisol was demonstrated when the application of this hormone was combined with epinephrine. Under these circumstances glycerol production is enhanced too when compared to the action of epinephrine

alone. In Chapter II is further described that this potentiating action of excess glucocorticoid hormone on the epinephrine induced lipolysis of the rat epididymal fat cell can also be demonstrated in rats pretreated in vivo with high doses of cortisol. This effect was also shown when epinephrine was replaced by glucagon as stimulator of lipolysis.

Special attention has been given to the mode of expression of the production of fatty acid and glycerol. In this connection the number of fat cells as determined with the Coulter Counter and the amount of triglyceride present in the fat cell suspensions have been compared as bases of reference of the activity of the processes.

B. The localisation of the action of cortisol in the lipolytic system.

In Chapter III the mechanism of action of cortisol on the epinephrine or glucagon induced lipolysis is discussed. Subsequently the theoretically possible points of action of cortisol in the lipolytic cascade have been investigated.

- the effect of excess cortisol on lipolysis of fat cells is still visible when applied together with maximally PDE-inhibiting concentrations of dibutyryl-cAMP or theophylline.
- the adenylate cyclase activity of homogenates of fat cells from cortisol treated rats appear to be decreased when compared to that of cells from untreated rats. The fact that in the presence of the combination of maximally stimulating concentrations epinephrine and glucagon the cells from cortisol pretreated rats still exhibited their promoted lipolysis, indicates that cortisol doesn't exert its action at the level of the cell membrane receptors for epinephrine and glucagon.
- phosphodiesterase (PDE) activity was first measured by following the cAMP disappearance in fat cell homogenates at a substrate concentration of $10 \mu\text{M}$. This total PDE activity was not changed after cortisol treatment of the rat. By the measurement of the rate of appearance of ^3H -AMP (from ^3H -cAMP) the kinetic properties of the high and low (apparent) $K_{(m)}$ PDE have been studied separately. Hypercortisolism appeared to decrease the $V_{(max)}$ and the $K_{(m)}$ of the low K_m PDE.
- basal cAMP concentration in fat cells that had been preincubated

for 4 hours with a high concentration (0,1 μg per ml) of dexamethasone, did not differ from the control level, whereas lipolysis in the presence of epinephrine was increased further by the preincubation of the cells with dexamethasone. However, after pretreatment of the rats with cortisol the basal level of cAMP in the fat cells appeared to be elevated.

- cAMP dependent protein kinase activity of the rat epididymal fat cells was shown to be stimulated by preincubation of the cells with dexamethasone or by treatment of the rat with cortisol.

Very probably the influence of preincubation of adipose tissue with excess glucocorticoid hormone on overall lipolysis of the fat cell, i.e. no influence on basal lipolysis (and on basal cAMP concentration) and potentiation of the epinephrine or glucagon stimulated lipolysis, is exerted by stimulation of protein kinase. After pretreatment of the rat with cortisol for 14 days basal glycerol production of the fat cells is also unchanged, however basal cAMP concentration is increased and $V_{(\text{max})}$ of the low K_m PDE is decreased, while potentiation of lipolysis and stimulation of cAMP dependent protein kinase is again seen. Therefore, the inhibition of PDE activity that becomes evident rather late does not appear to be responsible for the special type of influence of excess glucocorticoid hormone on overall lipolysis.

C. The influence of hypercortisolism on body composition

In Chapter IV the inhibition of the normal increase in body weight in the young rat caused by the administration of a high dose of cortisol during 14 days is described. Even a decrease of the body weight may occur, while the amount of epididymal fat remains unchanged.

The results of the fat cell counts with the use of osmium tetroxide fixation and the Coulter Counter indicate that the relative increase in the weight of the epididymal fat pads cannot be explained by an increase in the number of fat cells.

In Chapter V several indirect methods for the determination of the body composition of man and the results of own studies with two of these methods are discussed. However the methods used are

based on assumptions that probably are not completely valid in patients with hypercortisolism.

With whole body counting of ^{40}K the amount of body fat in patients with hypercortisolism is probably overestimated, while the use of the $^3\text{H}_2\text{O}$ -space probably leads to an underestimation of the amount of fat in this condition. It is therefore possible only to indicate upper and lower limits of the amount of fat and LBM in patients with Cushing's syndrome. Nonetheless, it may be concluded from this work that the absolute amount of body fat is increased in patients with hypercortisolism.

D. The overall lipolysis in patients with hypercortisolism

The study of overall lipolysis in patients with hypercortisolism, as measured by the turnover rate of plasma FFA using a continuous infusion of 1- ^{14}C -palmitic acid, complexed to human serum albumin, is described in Chapter VI.

We observed a subnormal overall lipolysis in these patients (in contrast lipolysis is increased in simple obesity). The overall lipolysis normalises after correction of the hypercortisolism. These results suggest that adipose tissue as a whole in chronic hypercortisolism is less insulin resistant than in obesity. The discrepancy between the overall lipolysis in hypercortisolism and simple obesity is discussed.

APPENDIX

Tabel I

Verzamelde gegevens van de patienten en personen bij wie een bepaling van de snelheid van "turnover" van de plasma-FFA werd verricht.

Naam	M/V	leeftijd	Gewicht (kg)	Nuchter insuline $\mu\text{E/ml}$	Nuchter FFA (Mosinger) $\mu\text{eq/L}$	dosisberekening dpm/min.	spec. akt. FFA dpm/ μeq FFA op tijdstip:						
							30	40	50	60	70	80	90 min.
a. Controles													
1. B	M	36	76,0	12	618	271252	398	502	430	376	471	492	459
2. T	M	33	80,3		600	220496	328	338	374	368	372	371	340
3. vG	V	60	64,5		769	391151	624	704	736	777	778		
4. deK	V	27	62,9		493	92896	145	157	136	128	136	148	151
5. B	M	25	68,0	8.5	662	369532	1157	1242	1022	837	818	821	785
6. F	M	26	58,8		491	421745	893	857	880	788	754		
b. Vetzucht													
1. K	V	46	92,8		1193	373213		393	359	415			
2. H	M	26	94,7		513	406692	448	344	393	382	418		
3. deB	M	20	106,8		1010	378277	391	408	477	451	353	527	
4. N	V	31	100,7		660	104708	130	159	165	149			
5. E	V	32	114,4		774	171547	211	232	252	227	240	253	238
6. S	M	48	117,8		435	166891	287	248	225	197	180		187
7. Kr	M	18	135,4		920	224084	211	206	223	223	249	223	271

c. Cushing patienten vóór behandeling

													CSR mg/24 uur	
1. Sl	V	19	66,4		728	167866	310	340		364	379	371	60	
2. B	M	43	65,0		387	421745	1285	1220	1424	1287		1372	1285	99
3. Te	V	37	70,0		654	402145	712		647	654	675	727	729	42
4. Bu	V	45	61,5	10	515	239660	748	811	767	806	766	1000	953	65
5. Br.vH	V	43	72,9		682	224084		391		387	431	433	452	70
6. St	V	30	90,6		652	372478	748		762	768		801	848	74
7. deJ-B	V	30	80,8	28	507	381447	949	1040	1153	1119	1262	1284	1214	77
8. Kr	V	58	90,5	16	475	338803	692	753	746	723	801	834	902	149
9. Me	V	53	83,7	16	1093	319754	437	470	501	515	514	565	586	2½ mg dex.
10. Sch	M	46	67,0	10	611	375115	852	890	835		872	745		45 mg predn.
11. Ro	V	25	66,3	21	515	279080	1093		1239	1323	1323	1237	1296	2½ mg dex.
12. deGr	V	45	76,5	38	760	429939	904	987	1125	1142	1157	1289	1190	–
13. Gr	V	41	73,7		709	412929	997	1043	1142	1136	1085	1024		86
14. Kl	V	48	73,4	16	530	302464	893	1043	1265		957	1095	1006	44
15. Ba	V	25	65,7	10	186	284066	1029	1181	1529	1421		1293	1387	–
16. vdKr	M	28	82,1	8	790	442804	862	909		952		991	1065	–

Diagnose Cushingsyndroom:

- a. pituitary dependent syndroom v. Cushing: no. 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 14, 15, 16
- b. iatrogeen syndroom v. Cushing no. 9, 10, 11
- c. ectopische productie van CRF in medullair schildklier carcinoom: no. 4

d. Cushing patienten 3 maanden na normalisering CSR.

1. Sl	V	19	60,4		439	290600	795	908	806	816	797	667	678	13
2. B	M	44	67,8		649	347768	661	630	856	883	849	984	767	28
3. Te	V	38	69,9	12	1187	334071	508	509	572	613	628	632	619	33
4. Bu	V	45	60,0	8,5	780	255473	339	382	466	431	409	382	399	15
5. BrvH	V	44	71,0		720	421745	659	719	692	752	743	715		31
6. St	V	31	87,8	12	926	338609	549	564	453	455	456	495	473	29
7. deJ-B	V	31	75,0	17	812	266942	426	494	520	448	453	537	534	21

Tabel II
Berekening FFA-''turnover'' ($\mu\text{eq}/\text{min.}$)

	dosis/specifieke activiteit FFA (zie tab. I)							gemiddelde FFA turnover $\mu\text{eq}/\text{min.}$
	30	40	50	60	70	80	90 min.	
a. Controles								
1. B	682	540	631	721	576	551	591	613
2. T	672	652	590	599	593	594	649	621
3. vG	627	556	531	503	503			544
4. deK	641	592	683	726	683	628	615	653
5. B	319	298	362	441	452	450	471	399
6. F	472	492	479	535	559			507
b. Vetzucht								
1. K		950	1040	899				963
2. H	908	1182	1035	1065	973			1033
3. deB	967	927	793	839	1072	718		886
4. N	805	659	635	703				701
5. E	813	739	681	756	715	678	721	729
6. S	582	673	742	847	927		892	777
7. Kr	1062	1088	1005	1005	900	1005	827	985
c. Cushing (vóór behandeling)								
1. Sl	542	494		461		443	452	478
2. B	328	346	296	328		307	328	322
3. Te	565		622	615	596	553	552	584
4. Bu	320	296	312	297	313	240	251	290
5. Br-vH		573		579	520	518	496	537
6. St	498		489	485		465	439	475
7. deJ-B	402	367	331	341	302	297	314	336
8. Kr	490	450	454	469	423	406	376	438
9. Me	732	680	638	621	622	566	546	629
10. Sch	440	421	449		430	504		449
11. Ro	255		225	211	210	226	215	224
12. deGr	476	436	382	376	372	334	361	391
13. Gr	414	396	362	363	381	403		387
14. Kl	339	290	239		316	276	301	294
15. Ba	276	241	186	200		220	205	221
16. vdKr	514	487		465		447	416	466

d. Cushing (ná behandeling)

1. Sl	366	320	361	356	368	436	428	376
2. B	526	552	406	394	410	353	453	442
3. Te	658	656	584	545	532	529	540	578
4. Bu	754	669	548	593	625	669	640	643
5. BrvH	640	587	609	561	568	590		593
6. St	617	600	747	744	734	684	716	692
7. de J-B	627	540	513	596	589	497	500	552

Tabel III

Variantie-analyse bij berekening FFA turnover in $\mu\text{eq FFA}/\text{min}$.

Bron van variatie	D.F.	S.S.	Mean S.S.
tussen patienten	35	8889780.60	253993.7
per patient	189	638772.0	3379.7
totaal	225	9528552.642	

D.F. = degrees of freedom

S.S. = sum of squares

Tabel IV

Variantie-analyse bij berekening FFA turnover in $\mu\text{eq FFA}/\text{min}/100 \text{ kg}$ lichaamsgewicht.

Bron van variatie	D.F.	S.S.	Mean S.S.
tussen patienten	35	8243222.4	228978.4
per patient	189	919557.0	4865.4
totaal	225	9162779.4	

Tabel V

Statistische bewerking van de vergelijking van de snelheid van de plasma-FFA-²turnover² van de verschillende onderzochte groepen met Student's ongepaarde t-test.

snelheid van de plasma-FFA-²turnover²

Vergeleken groepen	$\mu\text{eq}/\text{min.}$		$\mu\text{eq}/\text{min}/\text{kg. lich.gew.}$	
	t	p	t	p
1. controle - Cushing (vóór behandeling)	2.697	<0.025	3.738	<0.005
2. controle - adipositas	4.798	<0.001	0.080	<0.5
3. controle - Cushing (na behandeling)	0.043	>0.5	0.347	>0.5
4. adipositas - Cushing (vóór behandeling)	8.142	<0.001	3.572	<0.005
5. adipositas - Cushing (na behandeling)	4.809	<0.001	0.235	>0.5
6. Cushing vóór - na behandeling	2.812	<0.025	3.383	<0.005

LITERATUURLIJST

- ABRAHAM, R.R., 1973. Some cellular characteristics of the epididymal adipose tissue in Lean and obese – hyperglycaemic mice. *Diabetologia* 9, 303.
- ACKERS, J.G. and STOUTE, J.R.D., 1968. Kaliumbepaling met behulp van de totale lichaamsteller. In Haak e.a. (ed). *De samenstelling van het menselijk-lichaam*, p. 36.
- ALLEN, D.O. and BECK, R.R., 1972. Alterations in lipolysis, adenylate cyclase and adenosine 3', 5' – monophosphate levels in isolated fat cells following adrenalectomy. *Endocrinology* 91, 504.
- ALLEN, T.H., ANDERSON, E.C. and LANGHAM, W.H., 1960. Total body potassium and gross body composition in relation to age. *J. of Gerontology* 15, 348.
- ANGEL, A., DESAI, K. and HALPERIN, M.L., 1971a. Free fatty acid and ATP levels in adipocytes during lipolysis. *Metabolism* 20, 87.
- ANGEL, A., DESAI, K.S. and HALPERIN, M.L., 1971b. Intracellular accumulation of free fatty acids in isolated white adipose cells. *J. Lipid Res.* 12, 104.
- APPLEMAN, M.M., THOMPSON, W.J. and RUSSELL, T.R., 1973. Cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Adv. in Cycl. Nucleot. Res.* 3, 65.
- ARNER, P. and OSTMAN, J., 1974. The metabolism of partial glycerides in human adipose tissue. Abstract no. 47, 8th Annual Meeting European Society for Clinical Investigation Rotterdam 1974.
- BAKER, N. and SCHOTZ, M.C., 1967. Quantitative aspects of free fatty acid metabolism in the fasted rat. *J. Lipid Res.* 8, 646.
- BALLY, P.R., KAPPELER, H., FROESCH, E.R. and LABHART, A., 1965. Effect of glucose on spontaneous limitation of lipolysis in isolated adipose tissue: a potential regulatory mechanism. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 131, 143.
- BAR, H.P. and HECHTER, O., 1969a. Adenyl cyclase and hormone action, I. Effects of ACTH, glucagon and epinephrine on the plasma membrane of rat fat cells. *Proc. Nat. Acad. of Sci. (USA)* 63, 350.
- BAR, H.P. and HECHTER, O., 1969b. Adenyl cyclase assay in fat cell ghosts. *Anal. Biochem.* 29, 476.
- BARNHOORN, A., van DAMME, K.J. and JANSEN van WIGMONT, J.W., 1971. Beknopte beschrijving van de "Whole – Body – Counter" in gebruik te Leiden en een diagnostische toepassing ervan. *Ned. T. Geneesk.* 115, 1111.
- BARTER, P.J. and NESTEL, P.J., 1972. Plasma free fatty acid transport during prolonged glucose consumption and its relationship to plasma triglyceride fatty acids in man. *J. Lipid Res.* 13, 483.
- BARTER, P.J. and NESTEL, P.J., 1973. Precursors of plasma triglyceride fatty acids in obesity. *Metabolism* 22, 779.

- BATCHELOR, B.R. and STERN, J.S., 1973. The effect of growth hormone upon glucose metabolism and cellularity in rat adipose tissue. *Horm. Metab. Res.* 5, 37.
- BAUM, G.J. and MEYER, R.K., 1960. Effect of adrenal steroids and diethylstilbestrol on growth and fat content of cockerels. *Am. J. Physiol.* 198 (6), 1263.
- BEAVO, J.A., ROGERS, N.L., CROFFORD, O.B., e.a. 1970. Effects of xanthine derivatives on lipolysis and on adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activity. *Mol. Pharmacol.* 6, 597.
- BEAVO, J.A., ROGERS, N.L., CROFFORD, O.B., e.a., 1971. Effects of phosphodiesterase inhibitors on cyclic AMP levels and on lipolysis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 185, 129.
- BEHNKE, A.R., FEEN, B.G. and WELHAM, W.C., 1942. The specific gravity of healthy men. *J.A.M.A.* 118, 495.
- BERNSTEIN, R.S. and KIPNIS, D.M., 1973. Regulation of rat hexokinase isoenzymes. II Effects of growth hormone and dexamethasone. *Diabetes* 22, 923.
- BIRKENHAGER, J.C. and TJABBES, T., 1969. Turnover Rate of Plasma FFA and Rate of Esterification of Plasma FFA to Plasma Triglycerides in Obese Humans before and after weight reduction. *Metabolism* 18, 18.
- BIRNBAUMER, L., POHL, S.L. and RODBELL, M., 1969a. Adenyl cyclase in fat cells. I. Properties and the effects of adrenocorticotropin and fluoride. *J. Biol. Chem.* 224, 3468.
- BIRNBAUMER, L. and RODBELL, M., 1969b. Adenyl cyclase in fat cells. II. Hormone receptors. *J. Biol. Chem.* 244, 3477.
- BIRNBAUMER, L., POHL, S.L., KRANS, M.H.J. and RODBELL, M., 1970. The actions of hormones on the adenyl cyclase system. *Adv. Biochem. Psychopharm.* 3, 185.
- BIRNBAUMER, L., 1973. Hormone-sensitive adenyl cyclases: useful models for studying hormone receptor functions in cell-free systems. *Biochim. Biophys. Acta* 300, 129.
- BITENSKY, M.W., RUSSELL, V. and BLANCO, M., 1970. Independent variation of glucagon and epinephrine responsive components of hepatic adenyl cyclase as a function of age, sex and steroid hormones. *Endocrinology* 86, 154.
- BITENSKY, M.W., GORMAN, R.E. and NEUFELD, A.M., 1972. Selective effects of insulin on hepatic epinephrine responsive adenyl cyclase activity. *Endocrinology* 90, 1331.
- BJORNTORP, P., BERGMAN, H., VARNAUSKAS, E., e.a., 1969a. Lipid Mobilization in relation to body composition in Man. *Metabolism* 18, 841.
- BJORNTORP, P., BERGMAN, H. and VARNAUSKAS, E., 1969b. Plasma free fatty acid turnover rate in obesity. *Acta Med. Scand.* 185, 351.
- BJURULF, P., 1959. Atherosclerosis and body build. *Acta Med. Scand. Suppl.* 349, 5.
- BLECHER, M., MERLINO, N.S. and RO'ANNE, J.T., 1968. Control of the metabolism and lipolytic effects of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in adipose tissue by insulin, methyl xanthines, and nicotinic acid. *J. Biol. Chem.* 243, 3973.
- BODDY, K., KING, P.C., HUME, R., e.a., 1972. The regulation of total body potassium to height, weight and age in normal adults. *J. Clin. Path.* 25, 512.
- BODDY, K., KING, P.C., WOMERSLEY, J., e.a., 1973. Body potassium and fat-free mass. *Clin. Sci.* 44, 622.
- BOLING, E.A., TAYLOR, W.L., ENTENMAN, C., e.a., 1962. Total exchangeable potassium and chloride and total body water in healthy men of varying fat content. *J. Clin. Invest.* 41, 1840.
- BRAUN, T. and HECHTER, O., 1970. Glucocorticoid regulation of ACTH sensitivity of adenyl cyclase in rat fat cell membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 66, 995.
- BROSTROM, C.O., CORBIN, J.D., KING, C.A. and KREBS, E.G., 1971. Interaction of the subunits of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate dependent protein kinase of muscle. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 68, 2444.

- BROWN, B.L., EKINS, R.P. and TAMPION, W., 1970. The assay of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate by saturation analysis. *Biochem. J.* 120, 8p.
- BROWN, B.L., ALBANO, J.D.M., EKINS, R.P. and SGHERZI, A.M., 1971. A simple and sensitive saturation assay method for the measurement of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Biochem. J.* 121, 561.
- BROWN, B.L., EKINS, R.P. and ALBANO, J.D.M., 1972. Saturation assay for cyclic AMP using endogenous binding protein. *Adv. in Cycl. Nucleot. Res.* 2, 25.
- BROZEK, J., 1965. *Human Body Composition: Approaches and Applications.* PERGAMON PRESS.
- BURSKINSHAW, L. and COTES, J.E., 1973. Body potassium and fat-free mass. *Clin. Sci.* 44, 621.
- BUTCHER, R.W. and SUTHERLAND, E.W., 1962. Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *J. Biol. Chem.* 237, 1244.
- BUTCHER, R.W., HO, R.J., MENG, H.C. and SUTHERLAND, E.W., 1965. Adenosine 3',5'-monophosphate in biological materials. II. The measurement of adenosine 3',5'-monophosphate in tissues and the role of the cyclic nucleotide in the lipolytic response of fat to epinephrine. *J. Biol. Chem.* 240, 4515.
- BUTCHER, R.W., SNEYD, J.G.T., PARK, C.R. and SUTHERLAND, E.W., 1966. Effect of insulin on adenosine 3',5'-monophosphate in the rat epididymal fat pad. *J. Biol. Chem.* 241, 1651.
- BUTCHER, R.W., BAIRD, C.E. and SUTHERLAND, E.W., 1968. Effects of lipolytic and antilipolytic substances on adenosine 3',5'-monophosphate levels in isolated fat cells. *J. Biol. Chem.* 243, 1705.
- CAHILL, G.F., 1973. Glucagon. *New Engl. J. Med.* 288, 157.
- CHEN, R.F., 1967. Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. *J. Biol. Chem.* 242, 173.
- CHEUNG, W.Y., 1970. Cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Adv. Biochem. Psychopharm.* 3, 51.
- CHLOUVERAKIS, C., 1967. The action of glucose on lipolysis. *Metabolism* 16, 469.
- CORBIN, J.D. and PARK, C.R., 1969a. Permissive effects of glucocorticoids on lipolysis in adipose tissue. *Fed. Proc.* 29, 702.
- CORBIN, J.D. and KREBS, E.G., 1969b. A cyclic AMP-stimulated protein kinase in adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36, 328.
- CORBIN, J.D., REIMANN, E.M., WALSH, D.A. and KREBS, E.G., 1970. Activation of adipose tissue lipase by skeletal muscle cyclic adenosine 3',5'-monophosphate - stimulated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 245, 4849.
- CORBIN, J.D., BROSTROM, C.O., ALEXANDER, R.L. and KREBS, E.G., 1972. Adenosine 3',5'-monophosphate - dependent protein kinase from adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 247, 3736.
- CORBIN, J.D., SODERLING, T.R. and PARK, C.R., 1973. Regulation of adenosine 3',5'-monophosphate - dependent protein kinase. I. Preliminary characterization of the adipose tissue enzyme in crude extracts. *J. Biol. Chem.* 248, 1813.
- CORSA, L., OLNEY, J.M., STEENBURG, R., e.a., 1950. The measurement of exchangeable potassium in man by isotope dilution. *J. Clin. Invest.* 29, 1280.
- CSORBA, T.R., MATSUDA, J. and KALANT, N., 1966. Effects of insulin and diabetes on flux rates of plasma glucose and free fatty acids. *Metabolism* 15, 262.
- CUSHMAN, S.W., 1970. Pinocytic activity in the isolated adipose cell. In "Adipose Tissue", Suppl. 2 van Hormone and Metabolic Research; e.d. JEANRENAUD en HEPP, 162.

- CUSHMAN, S.W., HEINDEL, J.J. and JEANRENAUD, B., 1973. Cell-associated nonesterified fatty acid levels and their alteration during lipolysis in the isolated mouse adipose cell. *J. Lipid Res.* 14, 632.
- CZECH, M.P. and FAIN, J.N., 1972. Antagonism of insulin action on glucose metabolism in white fat cells by dexamethasone. *Endocrinology* 91, 518.
- DELWAIDE, P.A. and CRENIER, E.J., 1973. Body potassiums as related to lean body mass measured by total water determination and by anthropometric method. *Human Biology* 45, 509.
- DEUXCHAISNES, C.N., COLLETT, R.A., BUSSET, R., e.a., 1961. Exchangeable potassium in waisting amyotrophy, heart-disease and cirrhosis of the liver. *Lancet* 1, 681.
- DOBELN, W. v., 1962. Discussion V.6. in *Proceedings on Whole-Body Counting*. International Atomic Energy Agency, Vienna, 351.
- DOLE, V.P., 1956. A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *J. Clin. Invest.* 35, 150.
- DREILING, D.A., BIERMAN, E.L., DEBONS, A.F., e.a., 1962. Effect of ACTH, Hydrocortisone, and Glucagon on Plasma Nonesterified Fatty Acid Concentration (NEFA) in normal subjects and in Patients with liver Disease. *Metabolism* 11, 572.
- DRUMMOND, G.I. and DUNCAN, L., 1970. Adenyl Cyclase in Cardiac Tissue. *J. Biol. Chem.* 245, 976.
- EATON, R.P., BERMAN, M. and STEINBERG, D., 1969. Kinetic Studies of Plasma Free Fatty Acid and Triglyceride Metabolism in Man. *J. Clin. Invest.* 48, 1560.
- EDELMAN, I.S. and LEIBMAN, J., 1959. Anatomy of body water and electrolytes. *Am. J. Med.* 27, 256.
- EDMUNSON, I.C., 1967. Particle-size analysis. *Adv. Pharmaceut. Sciences* 2, 95.
- EXTON, J.H., MALLETTE, L.E., JEFFERSON, L.S., e.a., 1970. The hormonal control of hepatic gluconeogenesis. *Recent Progr. Horm.* 26, 411.
- FAIN, J.N., 1964. Effects of dexamethasone and 2-Deoxy-D-glucose on fructose and glucose Metabolism by Incubated Tissue. *J. Biol. Chem.* 239, 958.
- FAIN, J.N., 1968. Effects of dibutyl -3',5'-AMP, theophylline and norepinephrine on lipolytic action of growth hormone and glucocorticoid in white fat cells. *Endocrinology* 82, 825.
- FAIN, J.N., 1973. Biochemical aspects of drug and hormone action on adipose tissue. *Pharmacol. Reviews* 25, 67.
- FAIN, J.N., SCOW, R.O. and CHERNICK, S.S., 1963. Effects of glucocorticoids on metabolism of adipose tissue in vitro. *J. Biol. Chem.* 238, 54.
- FAIN, J.N., KOVACEV, V.P. and SCOW, R.O., 1965. Effect of growth hormone and dexamethasone on lipolysis and metabolism in isolated fat cells of the rat. *J. Biol. Chem.* 240, 3522.
- FAIN, J.N., KOVACEV, V.P. and SCOW, R.O., 1966. Antilipolytic effect of insulin in isolated fat cells of the rat. *Endocrinology* 78, 773.
- FAIN, J.N., DODD, A. and NOVAK, L., 1971. Relationship of protein synthesis and cyclic AMP to lipolytic action of growth hormone and glucocorticoids. *Metabolism* 20, 109.
- FAIN, J.N., POINTER, R.H. and WARD, W.F., 1972. Effects of adenosine nucleotides on adenylate cyclase, phosphodiesterase, cyclic adenosine monophosphate accumulation, and lipolysis in fat cells. *J. Biol. Chem.* 247, 6866.
- FELIG, P., 1973. The Glucose-Alanine Cycle. *Metabolism* 22, 179.
- FORBES, G.B., 1972. Growth of the lean body mass in man. *Growth* 36, 325.
- FORBES, G.B., GALLUP, J. and HURSCH, J.B., 1961. Estimation of total body fat from potassium-40 content. *Science* 133, 101.
- FORBES, G.B. and HURSCH, J.B., 1963. Age and sex trends in lean body mass calculated

- from K40 measurements: with a note on the theoretical basis for the procedure. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 110, 255.
- FORBES, G.B., SCHULTZ, F., CAFARELLI, C., e.a., 1968. Effects of body size on Potassium-40 measurement in the whole body counter. *Health Physics* 15, 435.
- FREDRICKSON, D.S., GORDON, R.S., e.a., 1958. The Metabolism of Albumin – Bound C14-labeled unesterified fatty acids in Normal Human Subjects. *J. Clin. Inv.* 37, 1504.
- FRIEDBERG, S.J., KLEIN, R.F., TROUT, D.L., e.a., 1961. The incorporation of plasma free fatty acids into plasma triglycerides in man. *J. Clin. Invest.* 40, 1846.
- FRIEDMANN, N., EXTON, J.H. and PARK, C.R., 1967. Interaction of adrenal steroids and glucagon on gluconeogenesis in perfused rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29, 113.
- GALTON, D.J., 1974. Hormonal control of lipolysis. *Proc. Roy. Soc. Med.* 67, 17.
- GIROLAMO, M. di, MENDLINGER, S. and FERTIG, J.W., 1971a. A simple method to determine fat cell size and number in four mammalian species. *Am. J. Physiol.* 221 (3), 850.
- GIROLAMO, M. di and MENDLINGER, S., 1971b. Role of fat cell size and number in enlargement of epididymal fat pads in three species. *Am. J. Physiol.* 221 (3), 850.
- GOLDRICK, R.B., 1967. Morphological changes in the adipocyte during fat deposition and mobilization. *Am. J. Physiol.* 212 (4), 777.
- GOODMAN, H.M., 1970. Permissive effects of hormones on lipolysis. *Endocrinology* 86, 1064.
- GORIN, E. and GOODMAN, H.M., 1974. Protein kinase in adipose tissue: effect of hypophysectomy. *Horm. Metab. Res.* 6, 146.
- GOSSIN, V.V., MATUTE, M.L., KALKHOFF, R.K., 1974. Relative influence of obesity and diabetes on plasma alpha-cell Glucagon. *J. Clin. Endocr. Met.* 38, 238.
- GRAHAME-SMITH, D.G., BUTCHER, R.W., NEY, R.L. and SUTHERLAND, E.W., 1967. Adenosine 3',5'-monophosphate as the intracellular mediator of the action of adrenocorticotrophic hormone on the adrenal cortex. *J. Biol. Chem.* 242, 5535.
- GREWAL, T., SCHEMEL, R., CRESS, C.E. and MICKELSEN, O., 1973. Prediction of total body fat in rats individual fat depot weights. *Growth* 37, 111.
- GRIES, F.A. and STEINKE, J., 1967. Comparative effects of insulin on adipose tissue segments and isolated fat cells of rat and man. *J. Clin. Invest.* 46, 1413.
- HAUSBERGER, F.X. and RAMSAY, A.J., 1955. Steroid diabetes in guinea pigs. *Endocrinology* 56, 533.
- HAUSBERGER, F.X. and HAUSBERGER, B.C., 1958. Effect of insulin and cortisone on weight gain, protein and fat content of rats. *Am. J. Physiol.* 193, 455.
- HAUSBERGER, F.X. and RAMSAY, A.J., 1959. Islet hypertrophy in obesity of mice bearing ACTH-secreting tumors. *Endocrinology* 65, 165.
- HAUSBERGER, F.X., 1961. Effect of food restriction on body composition and islet hypertrophy of mice bearing corticotrophin – secreting tumours. *Acta Endocrinol.* 37, 336.
- HAVEL, R.J. and CARLSON, L.A., 1963a. Comparative turnover rates of free fatty acids and glycerol in blood of dogs under various conditions. *Life Sci.* 9, 651.
- HAVEL, R.J., NAIMARK, A. and BORCHGREVINK, C.F., 1963b. Turnover rate and oxidation of free fatty acids of blood plasma in man during exercise: studies during continuous infusion of palmitate-1-C14. *J. Clin. Invest.* 42, 1054.
- HEIDE, D. van der, 1974. Hormonale regulaties van MUP, een geslachtsafhankelijk eiwit bij ratten. Proefschrift, Leiden.

- HENION, W.F., SUTHERLAND, E.W. and POSTERNAK, Th., 1967. Effects of derivatives of adenosine 3',5'-phosphate on liver slices and intact animals. *Biochim. Biophys. Acta* 148, 106.
- HEPP, K.D., MENAHAN, L.A., WIELAND, O. and WILLIAMS, R.H., 1971. Studies on the action of insulin in isolated adipose tissue cells. II. 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and antilipolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 184, 554.
- HERRERA, E. and LAMAS, L., 1970. Utilization of glycerol by rat adipose tissue in vitro. *Biochem. J.* 120, 433.
- HERRERA, E. and AYANS, A., 1972. Calculation of lipolysis and esterification from glycerol metabolism in rat adipose tissue. *J. Lipid. Res.* 13, 802.
- HIRSCH, J. and GALLIAN, E., 1968. Methods for the determination of adipose cell size in man and animals. *J. Lipid. Res.* 9, 110.
- HIRSCH, J. and HAN, P.W., 1969. Cellularity of rat adipose tissue effects of growth, starvation and obesity. *J. Lipid. Res.* 10, 77.
- HOLLIFIELD, G. and PARSON, W., 1959. Body composition and in vitro synthesis of lipids by adipose tissue of 11 - dehydrocorticosterone - treated mice. *Am. J. Physiol.* 1971 (1), 105.
- HUBBARD, R.W. and MATTHEW, W.T., 1971. Inhibition of fat cell lipolysis by low FFA to albumin ratios. *Lipids* 6, 274.
- HUGHES, D., WILLIAMS, R.E. and SMITH, A.H., 1967. Clinical Studies on Wholebody Potassium content measured by gamma-ray spectrometry in health and disease. *Clin. Sci.* 32, 503.
- HULSMANS, H.A.M., VINK, R. and TERPSTRA, J., 1967. Insulin and insulin antagonism. *Fol. Med. Neerl.* 10, 16.
- HUTTUNEN, J.K., STEINBERG, D. and MAYER, S.E., 1970. ATP-dependent and cyclic AMP-dependent activation of rat adipose tissue lipase by protein kinase from rabbit skeletal muscle. *Proc. Nat. Acad. Sc. (USA)* 67, 290.
- HUTTUNEN, J.K. and SYEINBERG, D., 1971. Activation and phosphorylation of purified adipose tissue hormone-sensitive lipase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 239, 411.
- HYNIE, S., KRISHNA, G. and BRODIE, B.B., 1966. Theophylline as a tool in studies of the role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in hormone-induced lipolysis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 153, 90.
- HYTEN, F.E., TAYLOR, K. and TAGGART, N., 1966. Measurement of total body fat in man by absorption of 85Kr. *Clin. Sci.* 31, 111.
- IKKOS, D., LJUNGGREN, H. and LUFT, R., 1965. The relation between extracellular and intracellular water in acromegaly. *Acta Endocrinol.* 21, 211.
- INGLE, D.J., 1954. Permissibility of Hormone Action. A review. *Acta Endocrinol.* 17, 172.
- ISSEKUTZ, B., BORTZ, W.M., e.a., 1967. Turnover rate of plasma FFA in humans and in dogs. *Metabolism* 16, 1001.
- JARETT, L., STEINER, A.L., SMITH, R.M. and KIPNIS, D.M., 1972. The involvement of cyclic AMP in the hormonal regulation of protein synthesis in rat adipocytes. *Endocrinology* 90, 1277.
- JARETT, L. and SMITH, R.M., 1974. Mode of action of N⁶-O²-dibutyryl cyclic 3',5' AMP on fat cell metabolism. *Diabetes* 23, 29.
- JEANRENAUD, B. and RENOLD, A.E., 1960. Studies on rat adipose tissue in vitro. VII. Effects adrenal cortical hormones. *J. Biol. Chem.* 235, 2217.
- JEANRENAUD, B., 1967. Effects of glucocorticoid hormones on fatty acid mobilization and reesterification in rat adipose tissue. *Biochem. J.* 103, 627.
- JEANRENAUD, B., 1971. Adipocytes, available energy and endocrine pancreas. *Diabetologia* 7, 209.

- JENKINS, J.S., LOWE, R.D. and TITTERINGTON, E., 1964. Effect of Adrenocortical Hormones on release of Free Fatty Acids and uptake of Glucose in human peripheral tissues. *Clin. Sci.* 26, 421.
- JOHNSON, P.R., ZUCKER, L.M., CRUCE, J.A.F. and HIRSCH, J., 1971. Cellularity of Adipose depots in the genetically obese Zucker rat. *J. Lip. Res.* 12, 706.
- JUNGAS, R.L. and BALL, E.G., 1963. Studies on the metabolism of adipose tissue. The effects of insulin and epinephrine on free-fatty acid and glycerol production in the presence and absence of glucose. *Biochemistry* 2, 383.
- KARAM, J.H., GRODSKY, G.M. and FORSHAM, P.H., 1965. The relationship of obesity and growth hormone to serum insulin levels. *Ann. N.Y. Ac. Sci.* 131, 374.
- KAZDOVA, L., FABRY, P. and VRANA, A., 1974. Effect of small doses of insulin in vivo on the proliferation and cellularity of adipose tissue. *Diabetologia* 10, 77.
- KESSLER, J.I., DEMENY, M. and SOBOTKA, H., 1967. Rates of tissue uptake of palmitic acid-1-¹⁴C complexed with albumin by two different procedures. *J. Lipid Res.* 8, 185.
- KEYS, A. and BROZEK, J., 1953. Body Fat in Adult Man. *Physiol. Rev.* 33, 245.
- KHOO, J.C. and STEINBERG, D., 1973. The mechanism of activation of hormone-sensitive lipase in human adipose tissue. *Clin. Res.* 21, 629.
- KLOTZ, U., BERNDT, S. and STOCK, K., 1972. Characterization of multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities of rat adipose tissue. *Life Sci.* 11 (II), 7.
- KNITTLE, J.L. and HIRSCH, J., 1968. Effect of early nutrition on the development of rat epididymal fat pads: cellularity and metabolism. *J. Clin. Invest.* 47, 2091.
- KONO, T., 1970. Insulin effector system of fat cells: its destruction with trypsin and subsequent restoration. In "Adipose Tissue". Suppl. 2 of *Hormone and Metabolic research*; ed. Jeanrenaud and Hepp, 108.
- KRISHNA, G., WEISS, B. and BRODIE, B.B., 1968. A simple, sensitive method for the assay of adenylyl cyclase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 163, 379.
- KRZYWICKI, H.J. and CHINN, K.S.K., 1967a. Human body density and fat of an adult male population as measured by water displacement. *Am. J. Clin. Nutr.* 20, 305.
- KRZYWICKI, H.J. and CHINN, K.S.K., 1967b. Body composition of a military population Fort Carson 1963. *Am. J. Clin. Nutr.* 20, 708.
- KUO, J.F., KRUEGER, B.K., SANES, J.R. and GREENGARD, P., 1970. Cyclic nucleotide-dependent protein kinase. V. Preparation and properties of adenosine 3', 5' mono-phosphate-dependent protein kinase from various bovine tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 212, 79.
- KYLE, L.H., WERDEIN, E.J. and CANARY, J.J., 1963a. Nitrogen balance and total body water in the measurement of change in body fat. *Ann. N.Y. Ac. Sci.* 110, 55.
- KYLE, L.H., WERDEIN, E.J. and CANARY, J.J., e.a., 1963b. Body composition before and after surgical correction of Cushing's syndrome. *Ann. N.Y. Ac. Sci.* 110, 1009.
- LACHANCE, J.P. and PAGE, E., 1953. Hormonal factors influencing fat deposition in the interscapular brown adipose tissue of the white rat. *Endocrinology* 52, 57.
- LAMBERTS, S.W.J., TIMMERMANS, H.A.T., KRAMER-BLANKESTIJN, M., BIRKENHAGER, J.C., 1974. The mechanism of the potentiating effect of glucocorticoids on epinephrine-induced lipolysis. *Europ. J. Clin. Invest.* 4, 354.
- LAMBERTS, S.W.J., TIMMERMANS, H.A.T., KRAMER-BLANKESTIJN, M., BIRKENHAGER, J.C., 1975. The mechanism of the potentiating effect of glucocorticoids on epinephrine-induced lipolysis. *Metabolism, in druk.*
- LANGAN, T.A., 1968. Histone phosphorylation: stimulation by adenosine 3',5'-mono-phosphate. *Science* 162, 579.
- LANGAN, T.A., 1973. Protein kinase and protein kinase substrates. *Adv. in Cycl. Nucleot. Res.* 3, 99.

- LARAIA, P.J. and MORKIN, E. (1974). Adenosine 3',5'-monophosphate-dependent membrane phosphorylation. *Circul. Res.* 35, 298.
- LAURELL, S., 1957. Turnover rate of unesterified fatty acids in human plasma. *Acta Physiol. Scand.* 41, 158.
- LAURELL, S., 1966. A method for routine determination of plasma triglycerides. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 18, 668.
- LEBOEUF, B., RENOLD, A.E. and CAHILL, G.F., 1962. Studies on rat adipose tissue in vitro. IX. Further effects of cortisol on glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 237, 988.
- LEMONNIER, D., 1972. Effect of age, sex and site on the cellularity of the adipose tissue in mice and rats rendered obese by a high-fat diet. *J. Clin. Invest.* 51, 2907.
- LEMONNIER, D. and ALEXIU, A., 1974. Nutritional, genetic and hormonal aspects of adipose tissue cellularity. In: *The regulation of the adipose tissue mass*, Excerpta Medica, Amsterdam, 158.
- LERAY, F., CHAMBAUT, A.M., PERRENOUD, M.L. and HANOUNE, J., 1973. Adenylate cyclase activity of rat-liver plasma membranes. Hormonal stimulation and effect of adrenalectomy. *Eur. J. Biochem.* 38, 185.
- LEWIS, B., WITTMAN, W., KRUT, L.H., e.a., 1966. Free fatty acid flux through plasma in protein mal-nutrition of infants. *Clin. Sci.* 30, 371.
- LIDDLE, G.W., 1967. Cushing's syndrome. In: *Adrenal Cortex* ed. by Eisenstein, A.B. Little and Brown, 523.
- LILJENQUIST, J.E., BOMBOY, J.E., LEWIS, S.B., e.a., 1974. Effects of Glucagon on Lipolysis and Ketogenesis in normal and diabetic men. *J. Clin. Invest.* 53, 190.
- LOTEN, E.G. and SNEYD, J.G.T., 1970. An effect of insulin on adipose-tissue adenosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase. *Biochem. J.* 120, 187.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- MAHLER, R.F. and STAFFORD, W.L., 1963. The lipolytic effect of glucocorticoids. in: *The control of Lipid Metabolism*, ed. GRANT, New York, Acad. Press, 155.
- MANGANIELLO, V.C., MURAD, F. and VAUGHAN, M., 1971. Effects of lipolytic and antilipolytic agents on cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in fat cells. *J. Biol. chem.* 246, 2195.
- MANGANIELLO, V. and VAUGHAN, M., 1972. An effect of dexamethasone on adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activity of cultured hepatoma cells. *J. Clin. Invest.* 51, 2763.
- MANGANIELLO, V. and VAUGHAN, M., 1973. An effect of insulin on cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activity in fat cells. *J. Biol. Chem.* 248, 7164.
- MARCO, J., CALLE, C., ROMAN, D., e.a., 1973. Hyperglucagonism induced by glucocorticoid treatment in man. *New Engl. J. Med.* 288, 128.
- MILLER, H.I., 1967. Plasma Free Fatty Acid Appearance in plasma Triglycerides. *Metabolism* 16, 1096.
- MILLER, E.A. and ALLEN, D.O., 1973. Hormone-stimulated lipolysis in isolated fat cells from "young" and "old" rats. *J. Lipid. Res.* 14, 331.
- MILLER, T.B., EXTON, J.H. and PARK, C.R., 1971. A block in epinephrine induced glycogenolysis in hearts of adrenalectomized rats. *J. Biol. Chem.* 246, 3672.
- MISCHKE, W.J. EBERS, S., BOISCH, K.H., e.a., 1974. The influence of intravenously administered cortisol on various parameters of fat and carbohydrate metabolism in blood plasma of human beings. *Acta Endocrinol.* 75, suppl. 286.
- MIYAMOTO, E., KUO, J.F. and GREENGARD, P., 1969. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. III. Purification and properties of adenosine 3',5'-monophosphate-

- dependent protein kinase from bovine brain. *J. Biol. Chem.* 242, 6395.
- MIYAMOTO, E., PETZOLD, G.L., HARRIS, J.S. and GREENGARD, P., 1971. Dissociation and concomitant activation of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase by histone. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 44, 305.
- MIYAMOTO, E., PETZOLD, G.L., KUO, J.F. and GREENGARD, P., 1973. Dissociation and activation of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent and guanosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases by cyclic nucleotides and by substrate proteins. *J. Biol. Chem.* 248, 179.
- MOORE, F.D., OKSEN, K.H., McMURRAY, J.D., e.a., 1963. In *The Body Cell Mass and its supporting environment*. Saunders.
- MORKIN, E. and LARAIA, P.J. (1974). Biochemical studies on the regulation of myocardial contractility. *New Engl. J. Med.* 288, 445.
- MOSINGER, F., 1965. Photometric adaptation of Dole's microdetermination of free fatty acids. *J. Lipid. Res.* 6, 157.
- MOSKOWITZ, J. and FAIN, J.N., 1970. Stimulation by growth hormone and dexamethasone of labeled cyclic adenosine 3',5'-monophosphate accumulation by white fat cells. *J. Biol. Chem.* 245, 1101.
- MULDOWNEY, F.R., CROOKES, J. and BLUHM, M.M., 1957. The relationship of total exchangeable potassium and chloride to lean body mass and creatinine excretion in man. *J. Clin. Invest.* 36, 1375.
- MUNCK, A., 1962. Studies on the mode of action of glucocorticoids in rats. II. The effects in vivo and in vitro on net glucose uptake by isolated adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 57, 318.
- MUNCK, A. and KORRITZ, S.B., 1962. Studies on the mode of action of glucocorticoids in rats. I. Early effects of cortisol on blood glucose and glucose entry into muscle, liver and adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 57, 310.
- MUNCK, A., 1971. Glucocorticoids inhibition of glucose uptake by peripheral tissues: old and new evidence, molecular mechanisms and physiological significance. *Perspect. Biol. Med.* 14, 265.
- MYHRE, L.G. and KESSLER, W.V., 1966. Body density and potassium 40 measurements of body composition as related to age. *J. Appl. Physiol.* 21, 1251.
- NAYAK, R.V., BOSSAK FELDMAN, E. and CARTER, A.C., 1962. Adipokinetic Effect of Intravenous Cortisol in Human Subjects. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111, 682.
- NESTEL, P.J., 1965. Metabolism of linoleate and palmitate in patients with hypertriglyceridemia and heart disease. *Metabolism* 14, 1.
- NESTEL, P.J., 1967. Relationship between FFA flux and TGFA influx in plasma before and during the infusion of insulin. *Metabolism* 16, 1123.
- NESTEL, P.J. and WHYTE, H.M., 1968. Plasma Free Fatty Acid and Triglyceride Turnover in Obesity. *Metabolism* 17, 1122.
- NG, C.W., POZNANSKI, W.J., BOROWIECKI, M. and REIMER, G., 1971. Studies on growth of adipose cell from normal and obese patients in vitro. *Nature* 231, 5303.
- NIKKILA, E.A., 1971. Transport of Free Fatty Acids. *Progr. Biochem. Pharmacol.* 6, 102.
- OSBERHAUSEN, F. and ONSTEAD, C.O., 1965. Relationship of potassium content of man with age and sex. In: *Radioactivity in Man*. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, 179.
- OKUDA, H., SAITO, Y., MATSUOKA, N. and FUJII, S., 1974. Mechanism of adrenaline-induced lipolysis in adipose tissue. *J. Biochem.* 75, 131.
- OSCAI, L.B., SPIRAKIS, C.N., WOLFF, C.A. and BECK, R.J., 1972. Effects of exercise and of food restriction on adipose tissue cellularity. *J. Lip. Res.* 13, 588.
- OWEN, O.E. and CAHILL, G.E., 1973. Metabolic effects of Exogenous Glucocorticoids in

- Fasted Man. *J. Clin. Invest.* 52, 2596.
- PACR, N. and RATBUN, E.N., 1945. Studies on body composition. III. The body water and chemically combined nitrogen content in relation to fat content. *J. Biol. Chem.* 158, 685.
- PERKINS, J.P., 1973. Adenyl Cyclase. *Adv. in Cyclic Nucleot. Res.* 3, 1.
- PERLEY, M. and KIPNIS, D.M., 1966. Effect of glucocorticoids on plasma insulin. *New Engl. J. Med.* 274, 1237.
- POCH, G., 1971. Assay of phosphodiesterase with radioactivity labeled cyclic 3',5'-AMP as substrate. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* 268, 272.
- POZEFSKY, T., FELIG, P., TOBIN, J.D., e.a., 1969. Amino acid balance across tissues of the forearm in postabsorptive man. Effects of insulin at two dose levels. *J. Clin. Invest.* 48, 2273.
- POZNANSKI, W.J., RUSHTON, J. and WAHEED, I., 1974. The origin and metamorphosis of the human fat cell. In: *The regulation of the adipose tissue mass, Excerpta Medica, Amsterdam*, 145.
- PRENTICE, T.C., SIRI, W., BERLIN, N.I., e.a., 1952. Studies of total body water with tritium. *J. Clin. Inv.* 31, 412.
- RABINOWITZ, D. and ZIERLER, K.L., 1962a. Forearm metabolism in obesity and its response to intra-arterial insulin. Characterization of insulin resistance and evidence for adaptive hyperinsulinism. *J. Clin. Invest.* 41, 2173.
- RABINOWITZ, D. and ZIERLER, K.L., 1962b. Role of Free Fatty Acids in forearm metabolism in man, quantitated by use of insulin. *J. Clin. Inv.* 41, 2191.
- RAKOW, L., 1974. Cellularity of the different cell compartments in white adipose tissue of mice in chronic starvation, refeeding and in two types of obesity. In: *The regulation of the adipose tissue mass. Excerpta Medica, Amsterdam*, 140.
- REARDON, M.F., GOLDRICK, R.B. and FIDGE, N.H., 1973. Dependence of rates of lipolysis, esterification and free fatty acid release in isolated cells on age, cell size, and nutritional state. *J. Lipid Res.* 14, 319.
- RESHEF, L. and SHAPIRO, B., 1960. Effect of epinephrine, cortisone and growth hormone on release of unesterified fatty acids by adipose tissue in vitro. *Metabolism* 9, 551.
- RIZACK, M.A., 1964. Activation of an epinephrine-sensitive lipolytic activity from adipose tissue by adenosine 3',5'-phosphate. *J. Biol. Chem.* 239, 392.
- RIZACK, M.A., 1965. Hormone-sensitive lipolytic activity of adipose tissue. In: Renold, A.E. and Cahill, G.F. (eds) *Handbook of Physiology Section 5. Adipose Tissue. Washington D.C. American Physiologic Society*, 309.
- ROBELIN, J., 1973. Estimation de la composition corporelle des animaux a partir des espaces de diffusion de l'eau marquée. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* 13, 285.
- ROBISON, G.A., BUTCHER, R.W. and SUTHERLAND, E.W., 1971. *Cyclic AMP. Academic Press.*
- ROBINSON, J. and NEWSHOLME, E.A., 1967. Glycerol kinase activities in rat heart and adipose tissue. *Biochem. J.* 104, 2c.
- RODBELL, M., 1964. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* 239, 375.
- RODBELL, M., 1965. Modulation of lipolysis in adipose tissue by fatty acid concentration in fat cell. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 131, 302.
- RUDMAN, D. and GIROLAMO, M. Di, 1967. Comparative Studies on the physiology of adipose tissue. *Advances in Lipid Research* 5, 35.
- RUDMAN, D. and DEL RIO, A.E., 1969. Responsiveness lipolytic hormones and inactivation of ACTH, by adipose tissue slices and free fat cells from different mammalian species. *Endocrinology* 85, 209.

- RUDMAN, D. and GIROLAMO, M. Di, 1971. Effect of adrenal cortical steroids on lipid metabolism. In: *The Human Adrenal Cortex*, ed. N.P. Christy, Harper and Row, 241.
- RUTTEN, W.J., SCHOOT, B.M., DE PONT, J.J.H.H.M., 1973a. Adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase assay in tissue homogenates. *Biochim. Biophys. Acta* 315, 378.
- RUTTEN, W.J., SCHOOT, B.M., De PONT, J.J.H.H.M. and BONTING, S.L., 1973b. Adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase in rat pancreas. *Biochim. Biophys. Acta* 315, 384.
- RYAN, W.G. and SCHWARTZ, T.B., 1965. Dynamics of Plasma Triglyceride Turnover in Man. *Metabolism* 14, 1243.
- SAKAI, T., THOMPSON, W.J., LAVIS, V.R. and WILLIAMS, R.H., 1974. Cyclic nucleotide phosphodiesterase; activities from isolated fat cells: correlation of subcellular distribution with effects of nucleotides and insulin. *Arch. Biochem. Biophys.* 162, 331.
- SALANS, L.B., KNITTLE, J.L. and HIRSCH, J., 1968. The role of adipose cell size and adipose tissue insulin sensitivity in the carbohydrate intolerance of human obesity. *J. Clin. Invest.* 47, 153.
- SALANS, L.B., ZARNOWSKI, M.J. and SEGAL, R., 1972. Effect of insulin the cellular character of rat adipose tissue. *J. Lip. Res.* 13, 616.
- SANDHOFER, F., SAILER, S. and BRAUNSTEINER, H., 1966. Fettsäure – und triglyceridumsatz bei patienten mit leberzirrhose. *Wien. Klin. Wochenstr.* 78, 731.
- SCHAEFFER, L.D., CHENOWETH, M. and DUNN, A., 1969. Adrenal corticosteroid involvement in the control of phosphorylase in muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 192, 304.
- SCHIFFER, F. and WERTHEIMER, E., 1947. Leanness in adrenalectomized rats. *J. Endocrinol.* 5, 147.
- SCHONHOFER, P., SKIDMORE, I.F., KRISHNA, G. and BRODIE, B.B., 1969. Lipolysis, adenylyl cyclase and cAMP phosphodiesterase in fat cells from adrenalectomized rats. *Fed. Proc.* 29, 474.
- SCHONHOFER, P.S. and SKIDMORE, J.F., 1971. Studies on the conditions for cyclic AMP formation in homogenised and intact fat cells by use of 3H-ATP and 3H-Adenine. *Pharmacology* 6, 109.
- SCHONHOFER, P.S., SKIDMORE, I.F., BOURNE, H.R. and KRISHNA, G., 1972. Cyclic 3',5'-AMP phosphodiesterase in isolated fat cells. *Pharmacology* 7, 65.
- SENFT, G., SCHULTZ, G., MUNSKKE, K. and HOFFMAN, M., 1968. Effects of glucocorticoids and insulin on 3',5'-AMP phosphodiesterase activity in adrenalectomized rats. *Diabetologia* 4, 330.
- SHAFRIR, E., and STEINBERG, D., 1960a. The essential role of the adrenal cortex in the response of plasma free fatty acids, cholesterol, and phospholipids to epinephrine injection. *J. Clin. Invest.* 39, 310.
- SHAFRIR, E., SUSSMAN, K.E. and STEINBERG, D., 1960b. Role of the pituitary and the adrenal in the mobilization of free fatty acids and lipoproteins. *J. Lipid Res.* 1, 459.
- SHEPPARD, H., 1970. Inhibition of norepinephrine stimulated adenylyl cyclase by theophylline. *Science* 228, 567.
- SIRI, W.E., 1956. The gross composition of the body. *Adv. in Biol. and Med. Phys.* 4, 239.
- SJOSTROM, L., BJORNTRORP, P. and VRANA, J., 1971. Microscopic fat cell size measurements on frozen-cut adipose tissue in comparison with automatic determinations of osmium-fixed fat cells. *J. Lip. Res.* 12, 521.
- SKALA, J. and HAHN, P., 1971. Effects of single cortisone injections on brown adipose tissue of developing rats. *Can. J. Phys. Pharm.* 49, 501.
- SLUYS VEER, J. van der, 1968. Een onderzoek over osteoporose bij het syndroom van

- Cushing met behulp van tetracycline en radioactief calcium. Proefschrift, Leiden 1968.
- SNEDECOR, G.W. and COCHRAN, W.G., 1967. Statistical Methods. The Iowa State University Press, 258.
- SODERLING, T.R., CORBIN, J.D. and PARK, C.R., 1973. Regulation of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase. II. Hormonal regulation of the adipose tissue enzyme. *J. Biol. Chem.* 248, 1822.
- SOLOMON, S.S., 1972. Phosphodiesterase activity of rat and human adipose tissue. *J. Lab. Clin. Med.* 79, 598.
- SPEARS, G., SNEYD, J.G.T. and LOTEN, E.G., 1971. A method for deriving kinetic constants for two enzymes acting on the same substrate. *Biochem. J.* 125, 1149.
- SPECTOR, A., 1971. Metabolism of free fatty acids. *Progr. biochem. Pharmacol.* 6, 130.
- SPECTOR, A.A. and STEINBERG, D., 1967. Turnover and utilization of esterified fatty acids in Ehrlich ascites tumor cells. *J. Biol. Chem.* 242, 3057.
- SPECTOR, A.A., JOHN, K. and FLETCHER, J.E., 1969. Binding of longchain fatty acids to bovine serum albumin. *J. Lipid Res.* 10, 56.
- STEINBERG, D., 1973. Hormonally regulated enzymes in adipose tissue linked to cyclic AMP-dependent protein kinase. In: *Protein Phosphorylation in Control Mechanisms*, edited by Huijing and Lee, Academic Press, New York, 47.
- STEINKAMP, R.C., COHEN, N.L., SIRI, W.E., e.a., 1965a. Measures of body fat and related factors in normal adults. I. *J. chron. Dis.* 18, 1279.
- STEINKAMP, R.C., COHEN, N.L., GAFFEY, W.R., e.a., 1965b. Measures of body fat and related factors in normal adults II. *J. chron. Dis.* 18, 1291.
- TALSO, P.J., MILLER, C.E., CARBALLO, A.J., e.a., 1960. Exchangeable potassium as a parameter of body composition. *Metabolism* 9, 456.
- THOMPSON, W.J. and APPLEMAN, M.M., 1971. Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase of rat tissues. *J. Biol. Chem.* 246, 3145.
- THOMPSON, E.B. and LIPPMANN, M.E., 1974. Mechanism of action of glucocorticoids. *Metabolism* 23, 159.
- TROUT, D.L., ESTES, E.H. and FRIEDBERG, S.J., 1960. Titration of free fatty acids of plasma: a study of current methods and a new modification. *J. Lip. Res.* 1, 199.
- UNGER, R.H., 1971. Glucagon physiology and pathophysiology. *New Engl. J. Med.* 285, 443.
- VAUGHAN, M., 1961. The metabolism of adipose tissue in vitro. *J. Lipid Res.* 2, 293.
- VAUGHAN, M., 1962. The production and release of glycerol by adipose tissue incubated in vitro. *J. Biol. Chem.* 237, 3354.
- VAUGHAN, M., BERGER, J.E. and STEINBERG, D., 1964. Hormone-sensitive lipase and monoglyceride lipase activities in adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 239, 401.
- VAUGHAN, M. and STEINBERG, D., 1965. Glyceride biosynthesis, glyceride breakdown and glycogen breakdown in adipose tissue: mechanisms and regulation. In: *RENOLD, A.E. and CAHILL, G.D. (eds). Handbook of Physiology Section 5 Adipose tissue.* Washington.D.C. American Physiologic Society, 239.
- WALAAS, O., WALAAS, E. and GRONNEROD, D., 1973. Hormonal regulation of cyclic AMP-protein kinase of rat diaphragm by epinephrine and insulin. *Eur. J. Biochem.* 40, 465.
- WALSH, D.A. and KREBS, E.G., 1973. Protein kinases. In: *The enzymes*, 3rd ed, edited by P.D. Boyer, Academic Press, New York, 555.
- WEISS, B., FERTEL, R., FIGLIN, R. and UZUNOV, P., 1974. Selective alterations of the activity of the multiple forms of adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase of rat cerebrum. *Mol. Pharmacol.* 10, 615.

- WIDDOWSON, E.M., 1967. Karkasanalyse. In: Haak e.a. (ed). De samenstelling van het menselijk lichaam, 36.
- WIDDOWSON, E.M. and SHAW, W.T., 1973. Full and empty fat cells. *Lancet* II, 905.
- WINTER, C.A., SILBER, R.H. and STOERK, H.C., 1950. Production of reversible hyperadrenocorticism in rats by prolonged administration of cortisone. *Endocrinology* 47, 60.
- WISE, J.K., HENDLER, R. and FELIG, P., 1973a. Evaluation of alpha-cell function by infusion of alanine in normal, diabetic and obese subjects. *New Engl. J. Med.* 288, 487.
- WISE, J.K., HENDLER, R. and FELIG, P., 1973b. Influence of glucocorticoids on glucagon secretion and plasma amino acid concentrations in man. *J. Clin. Inv.* 52, 2774.
- WOMERSLEY, J., BODDY, K., KING, P.C., e.a., 1972. A comparison of the fat-free mass of young adults estimated by anthropometry, body density and total body potassium content. *Clin. Sci.* 43, 469.
- WOODBURRY, D.M., 1956. Effect of acute hyponatraemia on distribution of water and electrolytes in various tissues of the rat. *Am. J. Phys.* 185, 281.
- YORKE, R.E., 1967. The influence of dexamethasone on adipose tissue metabolism in vitro. *J. Endocrinol.* 39, 329.
- ZAPF, J., WALDVOGEL, M. and FROESCH, E.R., 1973. Protein kinase and cyclic AMP-binding activities in liver and adipose tissue of normal, streptozotocin-diabetic and adrenalectomized rats. *FEBS-letters* 36, 253.
- ZIERLER, K.L., 1961. Theory of the use of arteriovenous concentration differences for measuring metabolism in steady and non-steady states. *J. Clin. Invest.* 40, 2111.
- ZOMZELY, C. and MAYER, J., 1956. Fat metabolism in experimental obesitas. *Am. J. Physiol.* 187, 365.

VERANTWOORDING

Dit proefschrift werd bewerkt in het laboratorium van de afdeling Interne III (Endocrinologie en Stofwisselingsziekten) van het Academisch Ziekenhuis Dijkzigt onder de bezielende leiding van Prof. Dr. J.C. Birkenhäger. Zijn enthousiasme werkte aanstekelijk.

Veel dank ben ik verschuldigd aan Henka Timmermans en Marjan Kramer-Blankenstijn die mij voortdurend bijstonden bij experimenten en die samen met Corien Tops en Marrie Breedveld mijn verblijf op het laboratorium bijzonder plezierig hebben gemaakt.

Dr. B.A. Cooke verleende hulp bij het opzetten van de cyclisch AMP-bepaling en de bepaling van de proteïne kinase-aktiviteit. Drs. H.R. de Jonge hielp ons bij de fosfodiësterase-meting.

Het werken met de Coulter Counter werd ons geleerd door Drs. W.A. Buurman. Veel dank gaat uit naar hem en de andere "gebruikers" op de afdeling Celbiologie en Histologie die slechts zacht morden over de verontreiniging van het apparaat door onze met osmium gevulde vetcellen.

De bij dit onderzoek gebruikte ratten werden zorgvuldig behandeld met cortisol door de heren K. van Doorn, R.G.C. Hoogendoorn, D.J. Kok en L.J.J. van der Kooy van het Centraal Proefdierbedrijf.

Dank gaat verder uit naar de heer H. van Dijk voor het maken van de voorpagina-foto, de tekenaars en tekenaressen van de Audiovisuele Dienst, Mej. A. van der Kemp, Roel Docter en Hans van Zijl en Ientje Gevers Leuven die dit proefschrift uittikte.

Dit onderzoek werd verricht met steun van FUNGO.

CURRICULUM VITAE

De schrijver van dit proefschrift werd op 20 september 1944 te Rotterdam geboren. In 1962 behaalde hij het diploma Gymnasium β aan het Charlois Lyceum te Rotterdam.

In 1967 legde hij het Doctoraal Examen Geneeskunde af aan de Rijksuniversiteit te Utrecht, waarna hij zijn coassistentschappen doorliep bij het Klinisch Hoger Onderwijs te Rotterdam. Artsexamen 1970.

Op 1 juni 1970 ving hij zijn specialisatie in de Interne Geneeskunde aan op de afdeling Interne III (Hoofd: Prof. Dr. J.C. Birkenhäger) van het Academisch Ziekenhuis Dijkzigt te Rotterdam.

