

**Adrenale Steroide bei der Adrenomyeloneuropathie:  
Dehydroepiandrosteron, 17 $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron und Androstendion**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn**

**vorgelegt von: Andreas Grigull  
aus Rheinbach**

**Erscheinungsjahr: 2007**

**Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn**

**1. Gutachter: Frau Prof. Dr. med. Dipl. Biol. Birgit Stoffel-Wagner**

**2. Gutachter: Herr Priv. Doz. Dr. med. Stefan Beyenburg**

**Tag der Mündlichen Prüfung: 1.2.2007**

**Institut für Klinische Biochemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn**

**Komm. Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Lothar Siekmann**

**Diese Dissertation ist auf dem Hochschulserver der ULB Bonn**

**[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.**

**Meiner Frau Anne Katrin in Liebe  
sowie meinen Eltern  
Ursula und Oskar Grigull  
in Dankbarkeit gewidmet**



<b>Inhaltsverzeichnis</b>		<b>Seite</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>		<b>9</b>
<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>11</b>
<b>1.1</b>	<b>Historischer Hintergrund</b>	<b>11</b>
<b>1.2</b>	<b>Steroidhormone der Nebennierenrinde</b>	<b>15</b>
1.2.1	Kortisol	17
1.2.2	Dehydroepiandrosteron / Dehydroepiandrosteronsulfat	18
1.2.3	17 $\alpha$ -OH Progesteron	21
1.2.4	Androstendion	22
<b>1.3</b>	<b>Morbus Addison</b>	<b>23</b>
1.3.1	Diagnostik des M. Addison	24
1.3.2	Therapie des M. Addison	24
<b>1.4</b>	<b>Fettsäuren</b>	<b>25</b>
1.4.1	Aufbau der Fettsäuren	25
1.4.2	Überlangkettige Fettsäuren (VLCFA)	26
1.4.3	Ungesättigte Fettsäuren	27
1.4.4	Lipolyse	27
1.4.5	Bestimmung der VLCFA	28

<b>1.5</b>	<b>Adrenoleukodystrophie / Adrenomyeloneuropathie</b>	<b>29</b>
1.5.1	Genetik der ALD	29
1.5.2	Ätiologie und Pathogenese der ALD	29
1.5.3	Klinische Phänotypen	30
1.5.4	Nebenniereninsuffizienz und endokrinologische Symptomatik	32
1.5.5	Diagnostik und Therapieansätze	33
<b>1.6</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>34</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>35</b>
<b>2.1</b>	<b>Patienten</b>	<b>35</b>
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>36</b>
2.2.1	Analyseverfahren	36
2.2.1.1	<i>Radioimmunoassay (RIA)</i>	36
2.2.1.2	<i>Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay (FPIA)</i>	40
2.2.2	Kortisol	42
2.2.2.1	<i>Messprinzip</i>	42
2.2.2.2	<i>Messbereich, Empfindlichkeit, Präzision</i>	43
2.2.2.3	<i>Referenzbereich</i>	43
2.2.2.4	<i>Spezifität</i>	43
2.2.2.5	<i>Grenzen des Verfahrens</i>	44
2.2.3	Dehydroepiandrosteronsulfat	45
2.2.3.1	<i>Messprinzip</i>	45

2.2.3.2	<i>Messbereich, Empfindlichkeit, Präzision</i>	45
2.2.3.3	<i>Referenzbereich</i>	46
2.2.3.4	<i>Spezifität</i>	46
2.2.3.5	<i>Grenzen des Verfahrens</i>	47
2.2.4	17 $\alpha$ -OH Progesteron	48
2.2.4.1	<i>Messprinzip</i>	48
2.2.4.2	<i>Messbereich, Empfindlichkeit, Präzision</i>	48
2.2.4.3	<i>Referenzbereich</i>	48
2.2.4.4	<i>Spezifität</i>	49
2.2.4.5	<i>Grenzen des Verfahrens</i>	50
2.2.5	Androstendion	50
2.2.5.1	<i>Messprinzip</i>	50
2.2.5.2	<i>Messbereich, Empfindlichkeit, Präzision</i>	51
2.2.5.3	<i>Referenzbereich</i>	51
2.2.5.4	<i>Spezifität</i>	52
2.2.5.5	<i>Grenzen des Verfahrens</i>	52
<b>2.3</b>	<b>Statistik</b>	<b>53</b>
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>54</b>
<b>3.1</b>	<b>Kontrollkollektiv</b>	<b>54</b>
<b>3.2</b>	<b>AMN Patienten</b>	<b>56</b>
3.2.1	17 $\alpha$ -OH Progesteron und Androstendion	56

3.2.2	Dehydroepiandrosteronsulfat	60
4.	<b>DISKUSSION</b>	<b>66</b>
5.	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>72</b>
6.	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>73</b>



**Abkürzungsverzeichnis**

µg/dl	Mikrogramm pro Deziliter
17α-OHP	17α-Hydroxy-Progesteron
Abb	Abbildung
ABC	ATP-binding cassette
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ALD	Adrenoleukodystrophie
ALDP	ALD-Protein
AMN	Adrenomyeloneuropathie
cALD	cerebrale Form der ALD
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	und weitere
FPIA	Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay
GTE	Glycerintrierukat
GTO	Glycerintrioleat
i.v.	intravenös
l	Liter
mg/d	Milligramm pro Tag

ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomographie
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nn	nicht nachweisbar
NNR	Nebennierenrinde
RIA	Radioimmunoassay
SEM	Standard error of the mean – Standardfehler
Tab	Tabelle
VLCFA	Very long chain fatty acids – überlangkettige Fettsäuren
VLCS	überlangkettige Fettsäuren Coenzym A Synthase
X-ALD	X-chromosomale Adrenoleukodystrophie
Xq28	langer Arm q des X Chromosoms, Region 2 Bande 8
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

## **1. Einleitung**

Adrenoleukodystrophie (ALD) und die adulte Variante Adrenomyeloneuropathie (AMN) sind X-chromosomal rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankungen, die mit einem Defekt in der peroxisomalen Zersetzung der überlangkettigen gesättigten Fettsäuren (VLCFA) einhergehen, der zu einer Ansammlung dieser VLCFA im zentralen und peripheren Myelin, der Nebennierenrinde, den Hoden und im Plasma führt. Diese Akkumulation der Fettsäuren resultiert in entzündlicher Demyelinisierung im zentralen Nervensystem (ZNS), peripherer Neuropathie sowie adrenokortikaler und testikulärer Insuffizienz.

### **1.1 Historischer Hintergrund**

Die Geschichte der Adrenoleukodystrophie verlief mit vielen ungewöhnlichen Wendungen und war voller glücklicher Zufälle und Überraschungen. Möglicherweise haben Haberfeld und Speiler (1910) den ersten Patienten mit dem, was wir heute als X-chromosomale Adrenoleukodystrophie kennen, beschrieben. Bei einem bisher gesunden Jungen traten im Alter von sechs Jahren Störungen in Augenbewegung und Visus auf, er wurde apathisch und seine schulische Leistung ließ nach. Vier Monate später wurde sein Gang spastisch und bald konnte er gar nicht mehr gehen. Im Alter von sieben Jahren wurde er hospitalisiert. Eine dunkle Hautfärbung wurde bemerkt, aber nicht weiter diskutiert. Es entwickelten sich eine spastische Paraparese und eine schwere Apathie im Wechsel mit Reizbarkeit, er sprach nicht mehr und wurde inkontinent. Acht Monate später verstarb er. Ein älterer Bruder war im Alter von 8,5 Jahren an einer ähnlichen Erkrankung verstorben. Paul Schilder (1913) führte die Autopsie des Gehirns aus und berichtete davon als dem zweiten von drei Fällen, die er „Encephalitis periaxialis diffusa“ nannte. Als Merkmale beschrieb er eine diffuse Beteiligung der Gehirnhälften bei Kindern mit schwerem Myelinverlust, ähnlich wie bei Multipler Sklerose aufgrund des relativen Erhalts der Axone und der Anhäufung von Lymphozyten, fetthaltiger Phagozyten und Gliazellen (Schilder, 1912 und 1924). Die Befunde der Nebenniere wurden nicht vermerkt. Weitere Untersuchungen zeigten, dass

diese sog. Schilder-Krankheit heterogen ist und in einer Reihe von unterschiedlichen Erscheinungsbildern zusätzlich zu ALD auftritt (Poser und van Bogaert, 1956; Poser et al., 1986). Siemerling und Creutzfeld (1923) berichteten von einem Patienten mit ähnlichem klinischen Verlauf und neuropathologischen Befunden, wobei eine Beteiligung der Nebennieren dokumentiert wurde. Sie nannten diese Krankheit „Bronzekrankheit und Sklerosierende Enzephalomyelitis (diffuse Sklerose)“. Der Name Adrenoleukodystrophie wurde im Jahre 1970 von Michael Blaw ins Leben gerufen (Blaw, 1970).

In den Jahren 1923 bis 1974 wurde die Beschaffenheit der ALD rege diskutiert. Die Verbindung von Nebenniereninsuffizienz und Demyelinisation blieb jedoch ein Rätsel. Adams und Kubic (1952) stellten in einer Arbeit zur Pathologie der demyelinisierenden Krankheiten Multiple Sklerose und ALD in die gleiche Hauptkategorie, beschrieben jedoch Unterschiede, wie etwa die kontinuierliche Beteiligung von großen Teilen der Hirnhälften und die schwerwiegendere Degeneration der Axonenzylinder bei ALD. In der Diskussion der pathogenetischen Mechanismen verwiesen sie auf die Ähnlichkeiten zu experimenteller allergischer Enzephalomyelitis und vermuteten einen autoimmunen Mechanismus. Eine metabolische Störung oder eine direkte Auswirkung eines Enzyms auf das Nervensystem schlossen sie „aufgrund der nachweisbaren Infiltration von Entzündungszellen, wie sie in keinem der bekannten metabolischen Krankheitsbildern des Gehirns vorkommt“ aus. Obwohl man heute nicht mehr daran zweifelt, dass ALD das Ergebnis einer metabolischen Störung ist, zeigen neuere Studien zur Pathogenese der Entzündungsreaktion im Gehirn bei ALD, dass die autoimmunen Mechanismen, auf die sich Adams und Kubic (1952) beriefen, weiterhin angemessen erscheinen. Hoefnagel et al. (1962), Fanconi et al. (1963) und Blaw et al. (1964) beobachteten, dass alle Patienten männlich waren und, basierend auf einer Stammbaumanalyse, vermuteten sie, dass ALD ein genetisch bestimmtes Krankheitsbild mit X-gebundenem Vererbungsmodus sei.

Im Jahre 1973, 50 Jahre nachdem diese Krankheit zum ersten Mal beschrieben wurde, machten Wissenschaftler am Albert Einstein College of Medicine in New York die wichtigste Entdeckung zur Ätiologie von ALD. Es war das Ergebnis der Zusammenarbeit eines Neurologen, Herbert Schaumburg, der von E. P. Richardson am Massachusetts

General Hospital auf ALD aufmerksam gemacht worden war, und eines Endokrinologen und Pathologen, James Powers. Powers und Schaumburg (1973) entdeckten eine ungewöhnliche Streifung in den Nebennierenrindenzellen, die unter dem Elektronenmikroskop eine charakteristische Lamellenstruktur aufzeigte. Später wiesen Igarashi et al. (1976) in diesen Inklusionen Cholesterin, verestert mit gesättigten überlangkettigen Fettsäuren (VLCFA) nach. Aufgrund dieser Befunde wurde ALD als Lipidspeicherkrankheit erkannt und die Forschungsrichtung nahm eine neue Wendung.

Singh et al. (1984a, b) zeigten in Baltimore, dass bei ALD-Patienten der VLCFA Abbau vermindert ist und dass diese Reaktion normalerweise im Peroxisom stattfindet. Diese Entdeckung verwies ALD in die neu anerkannte Kategorie der peroxisomalen Erkrankungen, wie auch das Zellweger-Syndrom, das von Goldfischer et al. (1973) beschrieben worden war und zwar ebenfalls am Albert Einstein College of Medicine und im selben Jahr wie Schaumburg und Powers Schlüsselentdeckungen zu ALD. Allerdings wurde damals der Zusammenhang zwischen diesen beiden Krankheitsbildern nicht erkannt. Weiterführende Studien von Singh und seinen Mitarbeitern (Lazo et al., 1988) und von Wanders et al. (1988) in Amsterdam konnten den VLCFA Oxidationsdefekt auf die verminderte Fähigkeit der Coenzym A-Derivatbildung zurückführen und so etablierte sich die plausible Vermutung, dass das Enzym ‚überlangkettige Fettsäuren Coenzym A-Synthase‘ (VLCs) in diesem grundlegenden Defekt involviert ist. Zwischen 1978 und 1981 fand man in Baltimore und in Japan heraus, dass ALD zuverlässig durch den Nachweis ungewöhnlich hoher VLCFA Konzentrationen in kultivierten Hautfibroblasten (Moser et al., 1980), in roten Blutkörperchen (Tsuji et al., 1981b) und im Plasma (Moser et al., 1981) diagnostiziert werden kann. Mit diesen nicht invasiven Untersuchungen konnten allein im diagnostischen Programm des Kennedy Krieger Institutes mehr als 3000 Patienten identifiziert werden. Die ultrastrukturellen und biochemischen Techniken ermöglichten auch den Nachweis milderer ALD Phänotypen bei Erwachsenen, wie etwa Adrenomyeloneuropathie (AMN) durch Budka et al. im Jahre 1976 in Wien (Budka et al., 1976) und Griffin et al. am National Institute of Health im Jahre 1977 (Griffin et al., 1977). Die Ära der Ernährungstherapie wurde von Kishimoto et al. (1980) eingeläutet, die nachwies, dass die abnormalen VLCFAs im Gehirn eines ALD-Patienten zumindest teilweise ernährungsbedingt sind. Dies wurde weiter bestätigt durch die Beobachtung, dass einfach ungesättigte Fettsäuren, wie etwa Oleinsäure und

Erucasäure, ihre endogene Synthese reduzieren (Rizzo et al., 1986, 1989). Der Nachweis, dass aus dem Knochenmark stammende Zellen VLCFAs abbauen können, führte zu dem therapeutischen Experiment der Knochenmarkstransplantation (Moser et al., 1984b), die in einigen Fällen erfolgreich war (Aubourg et al., 1990, Krivit et al., 1995).

Im Jahre 1981 wurde das ALD-Gen auf Xq28, dem letzten Segment des langen Arms des X Chromosoms, lokalisiert (Migeon et al., 1981). Zwölf Jahre später konnten Mosser et al. (1993) das Gen mittels positionellem Klonen isolieren. Überraschenderweise konnte festgestellt werden, dass die genetischen Codes für ein peroxisomes Membranprotein, das sog. ALD-Protein, zur ATP- Bindungskassetten (ABC) Proteinfamilie gehören (Higgings, 1992). Es besteht kein homologer Zustand mit VLCS, das kürzlich isoliert wurde (Uchiyama et al., 1996).

## 1.2 Steroidhormone der Nebennierenrinde

Die Nebenniere sitzt kappenartig auf dem oberen Nierenpol und besteht aus endokriner Nebennierenrinde (NNR) und neurogenem Nebennierenmark, welches Ganglienzellen und Sympathikusfasern enthält. Die Nebennierenrinde macht beim Erwachsenen ca. 80-90% des Organs aus. Sie besteht aus drei Zonen: die äußere Zona glomerulosa, die mittlere Zona fasciculata und die innen liegende Zona reticularis.

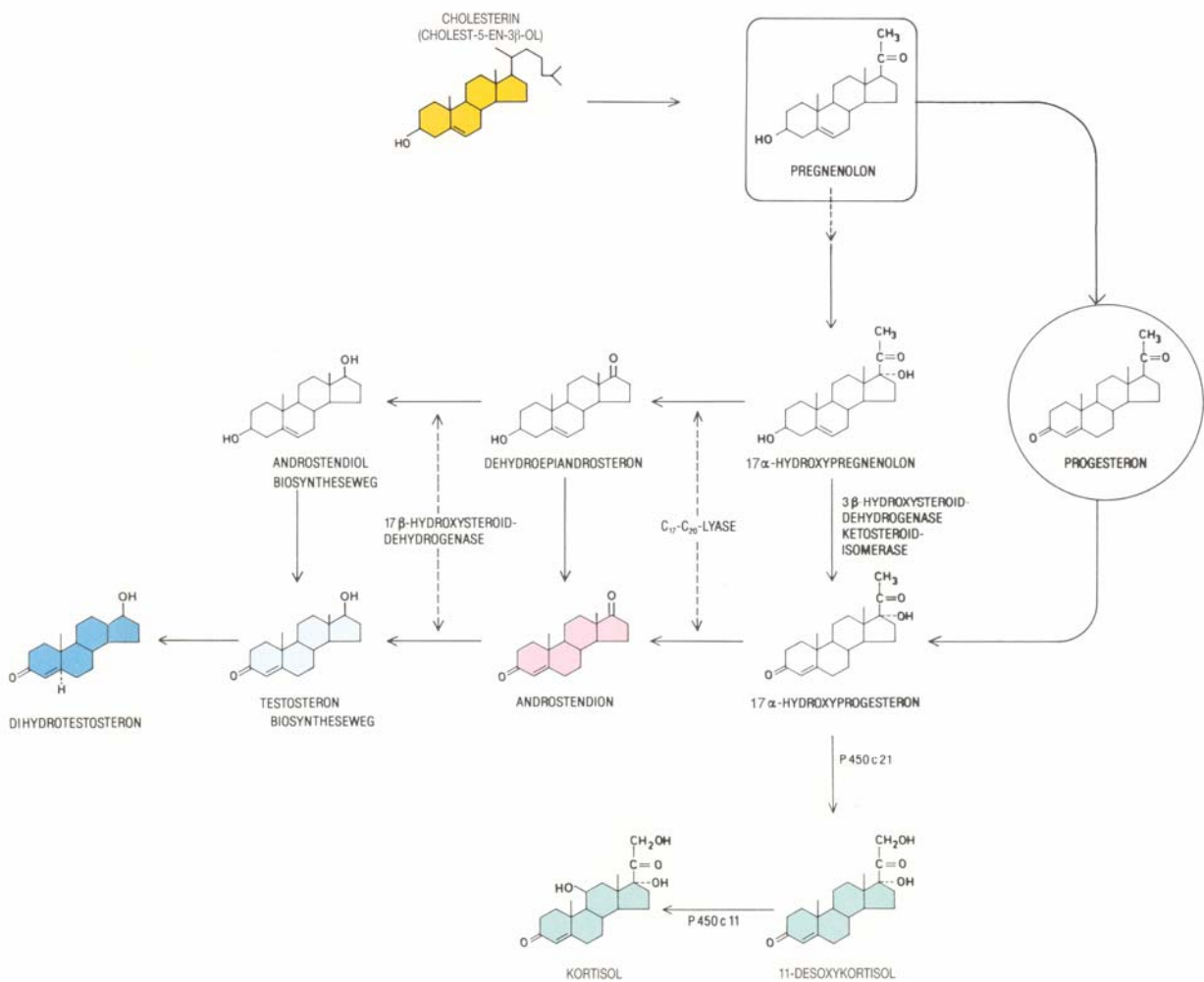
Diese strukturellen Zonen entsprechen in etwa der Biosynthese der verschiedenen chemisch eng verwandten Steroidhormone, die in der NNR produziert werden und die nach ihren Wirkungen in die Hauptgruppen Mineralokortikoide z.B. Aldosteron (Zona glomerulosa und äußere Schicht der Zona fasciculata), Glukokortikoide z.B. Kortisol (Zona fasciculata und Zona reticularis) und Sexualhormone z.B. Androstendion und Dehydroepiandrosteron (DHEA) (Zona fasciculata und Zona reticularis) unterteilt werden können.

Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) ist der wichtigste physiologische Regulator der Nebennierenrinde. Nur in seiner Gegenwart können normale Mengen von Steroidhormonen produziert und an das Blut abgegeben werden. ACTH reguliert die Sekretion der Hormone, in dem es ihre Biosynthese stimuliert, da die Nebennierenrinde nicht in der Lage ist, ihre Sekretionsprodukte zu speichern.

Der Syntheseweg der Steroidhormone beginnt beim Cholesterin: ACTH aktiviert nach Bindung an einen Zellmembranrezeptor über Zwischenschritte eine cAMP-abhängige Proteinkinase, welche durch Phosphorylierung die Cholesterinesterhydrolase aktiviert. Freies Cholesterin wird dann über ein Transportprotein in die Mitochondrien eingeschleust. Dort wird durch die 20,22-Desmolase-Aktivität des Enzymproteins P450<sub>SSC</sub> die Seitenkette abgespalten. Dies ist der erste und gleichzeitig der umsatzbestimmende Schritt der Kortisolbiosynthese. Das entstandene Pregnenolon wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) durch Dehydrogenierung der 3 $\beta$ -Hydroxylgruppe und Verlagerung der Doppelbindung von der 5- in die 4-Position zu Progesteron umgewandelt, welches anschließend in 17 $\alpha$ -Position hydroxyliert wird. Das hierfür verantwortliche Enzymprotein P450<sub>c17</sub> mit 17 $\alpha$ -Hydroxylase-Aktivität besitzt gleichzeitig eine 17,20-Lyase-Aktivität, die 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron in Androstendion überführt, ein

Schritt, der überwiegend auf die Testes beschränkt ist, jedoch bei erhöhtem Substratanfall (z.B. bei 21-Hydroxylase-Mangel) auch in der Nebennierenrinde stattfinden kann.

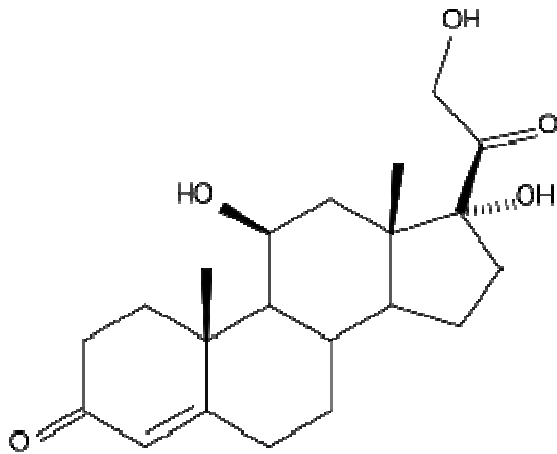
17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron wird durch das Enzym P450c21 in Position 21 zu 11-Desoxykortisol hydroxyliert, darauf findet in den Mitochondrien der vom Enzymprotein P450c11 abhängige Schritt zum Kortisol, eine 11-Hydroxylierung statt. (Abb. 1)



**Abb. 1** Adrenale Steroidbiosynthese aus Cholesterin (modifiziert nach Breckwoldt et al., 1991)



### 1.2.1 Kortisol



**Abb. 2** Strukturformel des Kortisols

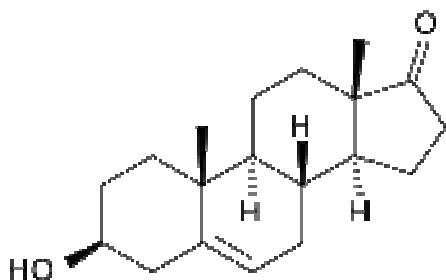
Kortisol ist das wichtigste der von der Nebennierenrinde sezernierten Glukokortikoidhormone. Es wird unter ACTH-Wirkung in der Zona fasciculata synthetisiert und freigesetzt, das ACTH wird seinerseits durch das Kortikotropin Releasing Hormon (CRH) des Hypothalamus gesteuert wird.

Bei gesunden Personen wird die Kortisol-Konzentration durch eine negative Rückkopplungsschleife reguliert: Bei erhöhten ACTH-Konzentrationen schüttet die Nebennierenrinde vermehrt Kortisol aus, was wiederum die Hypophyse veranlasst, die ACTH-Produktion zu reduzieren. Zu den physiologischen Funktionen des Kortisols gehören die Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels (Förderung der Gluconeogenese in der Leber, Hemmung der Glucoseaufnahme und -utilisation, Steigerung der Glykogensynthese) sowie die Elektrolyt- und Wasserverteilung. Unter Stress sorgt die Achse Hypothalamus – Hypophyse – Nebenniere für die Bereitstellung der benötigten Energie. Kortisol besitzt außerdem immunsuppressive und antiphlogistische Eigenschaften über die Hemmung der Phospholipase A<sub>2</sub>. Damit wird die Freisetzung von Arachidonsäure aus der Zellmembran verhindert und die Bildung von Entzündungsmediatoren, Prostaglandinen, Leukotrienen und Hydroxyperoxiden gehemmt.

Die Kortisolkonzentration im Plasma ist morgens am höchsten und sinkt bis zum Abend um etwa die Hälfte. Die pro Tag synthetisierte Kortisolmenge beträgt ca. 5-30 mg und wird auf Grund der schlechten Wasserlöslichkeit aller Steroidhormone im Plasma an  $\alpha$ -Globulin gebunden transportiert. Die Plasmakonzentration beträgt abhängig vom circadianen Rhythmus zwischen 5 und 25  $\mu\text{g/dl}$  für Erwachsene.

Die Kortisolmessungen dienen der direkten Überwachung des Nebennierenstatus und als indirektes Maß für eine Unter- bzw. Überfunktion der Hypophyse. Eine Überfunktion (Hyperkortisolismus) führt zum klinischen Bild des Morbus Cushing, eine Unterfunktion (Hypokortisolismus) zum Morbus Addison.

### 1.2.2 Dehydroepiandrosteron / Dehydroepiandrosteronsulfat



**Abb. 3** Strukturformel des DHEA

Dehydroepiandrosteron ist das wichtigste C19-Steroid der Nebenniere und wird hauptsächlich in der Zona reticularis der Nebennierenrinde gebildet. Die Sekretionsrate liegt bei 25 mg/d. DHEA liegt größtenteils als DHEAS, der sulfatierten Form des DHEA vor: Die DHEAS-Konzentration im Serum ist ungefähr 500 mal höher als die des DHEA. und sie ist wesentlich höher als die der anderen Steroidhormone. Während DHEA einer Tagesrhythmik folgt, ist DHEAS im Serum auf Grund seiner langen Halbwertszeit kaum Schwankungen unterworfen und bleibt auch langfristig bei deutlichen interindividuellen Unterschieden stabil (Thomas et. al, 1994)

DHEA ist ein biologisch schwaches Androgen, das als zirkulierendes Prohormon gesehen wird, aus dem in der Körperperipherie zahlreiche Steroidhormone wie

Testosteron, Östron und Östradiol generiert werden (Labrie F, 1991). Die orale Gabe von DHEA führt bei Frauen zu einem signifikanten Anstieg von zirkulierendem Androstendion und Testosteron. (Arlt et al., 1998). Bei Männern wurde eine Zunahme von Östron und 17- $\beta$ -Östradiol, nicht aber von Testosteron beobachtet (Arlt et al., 1999b). Seine Sekretion wird durch ACTH und möglicherweise andere hypophysäre Faktoren geregelt.

Im Serum ist das DHEAS an Albumin gebunden. Unter normalen Umständen ist seine Konzentration, bedingt durch die niedrige Clearance Rate sowie die lange Halbwertszeit konstant. Der Abbau erfolgt in den Nieren durch Bildung von wasserlöslichen Konjugaten. Die Metaboliten des DHEAS können im Urin als 17-Ketosteroide nachgewiesen werden.

Die physiologische Bedeutung des DHEA ist noch nicht ganz bekannt. Es scheint jedoch eine Rolle in der Pubertät bei der Adrenarche (Wachstum der Achsel- und Schambehaarung) zu spielen. Die höchsten Konzentrationen des DHEA werden um das 25. bis 30. Lebensjahr erreicht. Nach dem 40. Lebensjahr folgt bei Männern wie bei Frauen ein langsamer, kontinuierlicher Abfall der DHEA-Produktion bis auf 10-20% im hohen Lebensalter (Orentreich et. al. 1984). Unklar ist jedoch prinzipiell, ob der altersabhängige Abfall eine Hormonmangelsituation darstellt oder ob es sich hier um eine sinnvolle Drosselung handelt, um andere Veränderungen des Alters auszugleichen.

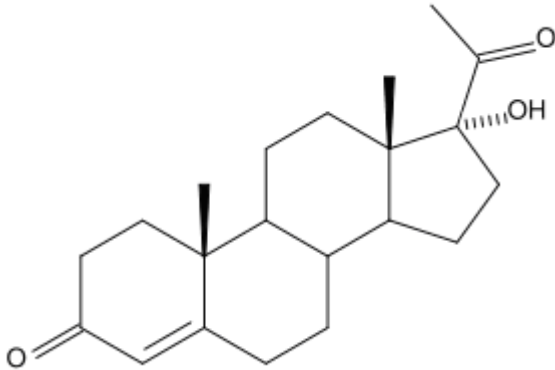
In den letzten Jahren wird in den USA in der ‚Anti-aging‘ – Medizin das DHEA als Hormon der Jugend beworben und ist dort als Nahrungsergänzungsmittel frei erhältlich. Als angebliches ‚Superhormon‘ unterstütze es die Verbrennung von Körperfett, beuge Osteoporose vor, stärke Kreislauf und Immunsystem, wirke sich positiv auf das sexuelle Erleben aus und halte den Alterungsprozess des Körpers auf. In der wissenschaftlichen Literatur sind diese Wirkungen nach wie vor umstritten. Risiken wie die Begünstigung des Wachstums hormonabhängiger Tumoren oder des Hirsutismus bei Frauen sind kaum untersucht. In Deutschland ist DHEA bisher nicht zugelassen.

Für eine DHEA-Substitutionstherapie stellen Patienten mit NNR-Insuffizienz das ideale Kollektiv für ein isoliertes Defizit dar, da ihre Standard-Substitutionstherapie zwar einen Ersatz der Gluco- und Mineralokortikoide beinhaltet, der DHEA-Mangel jedoch bis dato ignoriert wurde. Unter Verwendung von validierten psychometrischen Tests konnte

eindeutig gezeigt werden, dass eine DHEA-Substitution mit 50 mg/d über 4 Monate bei Frauen mit NNR-Insuffizienz zu einer signifikanten Verbesserung von Wohlbefinden und Stimmung führt und dabei insbesondere die Skalenwerte für Depressivität, Ängstlichkeit und deren körperliche Korrelate positiv beeinflusste (Arlt et al., 1999). Eine Besserung des Befindens durch die orale Gabe von 50 mg/d DHEA wurde auch für Männer mit NNR-Insuffizienz berichtet. (Hunt et al., 2000). Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen blieb die gleiche Dosierung über vier Monate bei gesunden älteren Männern im Alter von 50 bis 70 Jahren mit niedrigem endogenem DHEA wirkungslos (Flynn 1999). Eine positive Beeinflussung der Altersvorgänge beim Menschen bleibt derzeit spekulativ.

DHEAS ist ein ausgezeichneter Indikator der adrenalen Androgenproduktion. In Verbindung mit der Kortisolbestimmung führt seine Messung zu einer umfassenderen Beurteilung der Nebennierenrindenfunktion, so dass die Kortisolwerte Rückschlüsse auf die Funktion der Zona fasciculata und die DHEAS-Werte Rückschlüsse auf die Zona reticularis zulassen.

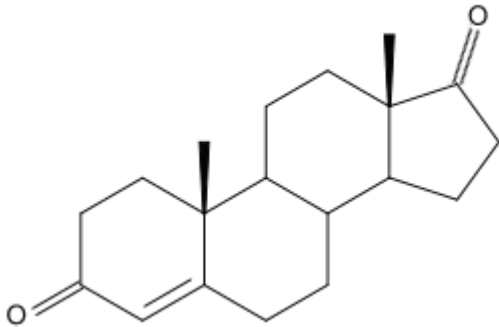
### 1.2.3 17 $\alpha$ -OH Progesteron



**Abb. 4** Strukturformel des 17 $\alpha$ -OH Progesterons

17 $\alpha$ -OH Progesteron (17 $\alpha$ -OHP) ist ein C-21 Steroid, das in der Nebennierenrinde und außerdem in den Ovarien, Hoden und der Plazenta gebildet wird. Es dient als Vorstufe bei der Biosynthese des Kortisols. Patienten mit einem Mangel an 21-Hydroxylase synthetisieren kein Kortisol und akkumulieren das 17 $\alpha$ -OH Progesteron. Seine Messung ist von Bedeutung zur Diagnose und Behandlung der kongenitalen Nebennierenhyperplasie, des Hirsutismus und der Infertilität. Die 17 $\alpha$ -OH Progesteronspiegel zeigen tageszeitliche Abhängigkeit mit höheren Werten am Morgen und niedrigen Serumspiegeln am Nachmittag. Aus diesem Grunde sollten Blutproben grundsätzlich zur gleichen Tageszeit abgenommen werden.

### 1.2.4 Androstendion



**Abb. 5** Strukturformel des Androstendions

Androstendion ist ein 17-Ketosteroid, welches beim Mann in den Leydig-Zellen des Hodens und zu geringen Teilen in der Nebennierenrinde produziert wird. Bei der Frau wird es zu gleichen Teilen in der Nebennierenrinde und in den Ovarien aus DHEA synthetisiert. Als Vorläufer in der Steroidhormonbiosynthese erfolgt physiologischerweise die Umwandlung von Androstendion in Testosteron, Estron und Estradiol. Das Androstendion selbst besitzt eine schwach androgene Wirkung. Die Serumkonzentration nimmt nach der Geburt kontinuierlich ab und während der Pubertät wieder zu. Die Androstendionkonzentration verringert sich mit zunehmendem Alter bei beiden Geschlechtern. Androstendion folgt einem circadianen Rhythmus und hat seine höchsten Werte am Morgen. Niedrige Konzentrationen von Androstendion werden bei Glukokortikoidmedikation, NNR- und Ovarialinsuffizienz beobachtet, erhöhte Konzentrationen sind bei Hirsutismus, polyzystischen Ovarien, adrenaler Hyperplasie und ACTH- oder Androgen produzierenden Tumoren zu finden. Androstendionspiegel können unter Medikamenten, die die ovarielle Androgensynthese oder die Synthese der NNR-Androgene stimulieren (z.B. Clomifen), ansteigen und unter Medikamenten, die die Funktion der beiden Organe supprimieren (z.B. Glukokortikoide oder Ovulationshemmer), abfallen.

Da Androstendion ebenfalls in der Körperperipherie in aktive Sexualsteroiden umgewandelt werden kann, könnte das Wirkprofil dem des DHEA entsprechen. Die in der Laienpresse propagierte anabole Wirkung bei Gabe von 300 mg/d konnte in Studien

nicht belegt werden (Rasmussen et al.; 2000). Aufgrund fehlender Studien ist das Nebenwirkungspotential von Androstendion unbekannt. Eine Beeinflussung hormonabhängiger Tumoren ist denkbar.

### **1.3 Morbus Addison**

Morbus Addison (M. Addison) bezeichnet die primäre chronische Nebennierenrindeninsuffizienz mit Symptomen, die durch Kortisol- und Aldosteronmangel gekennzeichnet sind. Die primäre NNR-Insuffizienz ist selten. Man rechnet mit vier Fällen auf 100.000 Einwohner (Reinwein und Benker, 1992). Folgende Symptome und Befunde, die sich meist innerhalb von Monaten bis Jahren entwickeln, sind am häufigsten zu finden: Schwäche, Müdigkeit, Gewichtsverlust und gastrointestinale Beschwerden, sowie arterielle Hypotonie und Hyperpigmentation der Haut und der Mundschleimhaut durch erhöhte Plasmakonzentrationen von ACTH und Melanozyten stimulierendes Hormon (MSH). Zum Zeitpunkt der Diagnose haben 60-70% der Patienten mit M. Addison eine Hyponatriämie, 50-60% eine Hyperkaliämie, 20% eine Hypoglykämie und 10% eine Hyperkalzämie. In etwa 50% sind Serumkreatinin und Serumharnstoff mäßig bis deutlich erhöht (May et al., 1989). Bei allen Formen des Mineralokortikoidmangels ist die Reninaktivität im Plasma erhöht.

### 1.3.1 Diagnostik des M. Addison

Bei Verdacht auf M. Addison wird ein ACTH-Kurztest durchgeführt um die Stimulierbarkeit der Nebennierenrinde zu testen. Morgens nach einer Blutentnahme zur Bestimmung des Plasmakortisols werden 250 µg <sup>1-24</sup>ACTH i.v. verabreicht (z.B. Synacthen®). Nach 60 min. erfolgt eine weitere Blutentnahme zur Kortisolbestimmung. Bei normaler Nebennierenrindenfunktion beträgt der Wert vor ACTH-Gabe zwischen 5 und 25 µg/dl und sollte 60 min nach der Stimulation mehr als 20 µg/dl betragen Dies schließt eine NNR-Insuffizienz aus. Bei M. Addison ist das Plasmakortisol niedrig-normal oder erniedrigt und wird durch ACTH nicht signifikant stimuliert (Oelkers et al., 1994).

### 1.3.2 Therapie des M. Addison

Zur Therapie des M. Addison werden Glukokortikoide (Kortison oder Hydrokortison) und Mineralokortikoide (Fludrokortison als Ersatz für Aldosteron) substituiert. Die Dosis des Kortison beträgt im Mittel 37,5 mg/d, die des Hydrokortison 20 mg/d und muss in Stresssituationen um das 2-4 fache gesteigert werden. (Allolio et al., 1990) Die Therapie lässt sich weder durch Messung der Serumkortisolspiegel noch durch ACTH-Messungen steuern. Aufgrund der kurzen Halbwertszeiten der Steroide bleibt ACTH chronisch erhöht, das Serumkortisol ist morgens nüchtern nicht messbar und unmittelbar nach Einnahme unphysiologisch hoch. Die natürliche Sekretion lässt sich nicht imitieren (Reinwein und Benker, 1992).

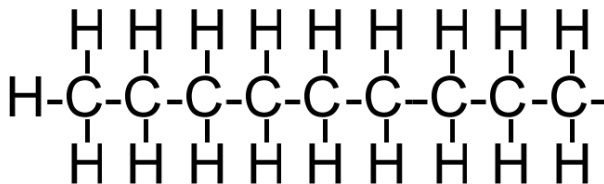
Die Dosis des Fludrokortison liegt zwischen 0,05 und 0,2 mg/d. Parameter für die ausreichende Dosierung sind Normalisierung des Blutdrucks, normale Elektrolyte und Normalisierung der Plasmareninaktivität.



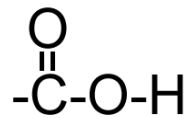
## 1.4 Fettsäuren

### 1.4.1 Aufbau der Fettsäuren

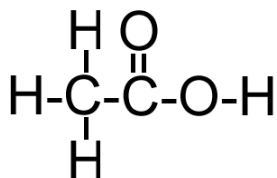
Fettsäuren bestehen aus einer Carboxylgruppe (COOH) und unterschiedlich langen Kohlenwasserstoffketten. Sie unterscheiden sich durch die Anzahl der C-Atome und durch die mögliche Anwesenheit, Anzahl und Position von Doppelbindungen. Gesättigte Fettsäure weisen keine Doppelbindungen auf, sie bilden eine so genannte homologe Reihe mit der Summenformel  $C_nH_{2n+1}COOH$ .



**Abb. 6** Beispiel einer unverzweigten Kohlenwasserstoffkette



**Abb. 7** Carboxylgruppe

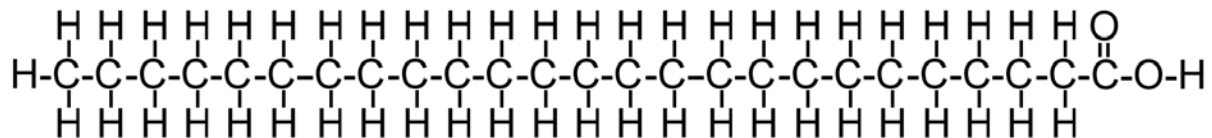


**Abb. 8** Essigsäure  $CH_3COOH$

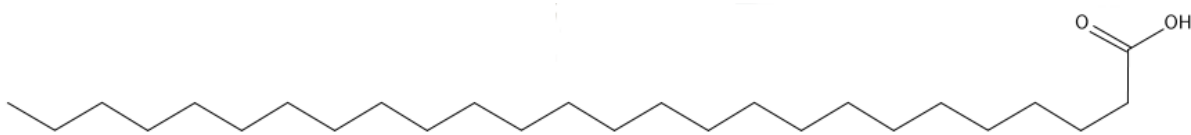
Abbildung 8 zeigt die ungesättigte Fettsäure Ethansäure (Trivialname Essigsäure)  $CH_3COOH$ , die auch in der Schreibweise C2:0 dargestellt wird (zwei C-Atome, keine Doppelbindung).

### 1.4.2 Überlangkettige Fettsäuren (VLCFA)

Überlangkettige Fettsäuren haben eine Kettenlänge von mehr als 22 Kohlenstoffatomen ( $C > 22:0$ ), zwei Vertreter sind C24:0 Tetracosansäure und C26:0 Hexacosansäure.



**Abb. 9** C24:0 Tetracosansäure (Strukturformel)



**Abb. 10** C26:0 Hexacosansäure (Strukturformel, vereinfachte Darstellung)

Die höchsten Konzentrationen gesättigter VLCFA finden sich im Myelin und in der Erythrozytenmembran. Hier beträgt ihr Anteil 1-5% der Gesamt-Fettsäuren. Der Anteil der VLCFA in Fettsäuren von Plasma und Nebennierenrinde ist sehr viel geringer (0,01%). In Geweben von ALD-Patienten sind die Konzentrationen der VLCFA erhöht. Eine Erhöhung der gesättigten Fettsäuren C24:0 und C26:0 um das zwei bis dreifache zeigt sich in Plasma, Erythrozyten und Fibroblasten. Der Anteil von VLCFA an den Cholesterinestern des Hirngewebes ist bei ALD-Patienten deutlich um das vier- bis zehnfache erhöht und zeigt sich vor allem in den Zonen der aktiven Demyelinisierung, während intakte Areale weißer Hirnsubstanz kaum betroffen sind.

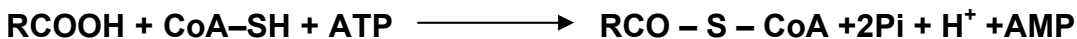
VLCFA werden sowohl mit der Nahrung zugeführt als auch im Körper synthetisiert.

### 1.4.3 Ungesättigte Fettsäuren

Im Gegensatz zu den gesättigten Fettsäuren besitzen ungesättigte Fettsäuren eine oder mehrere Doppelbindungen zwischen den Kohlenstoffatomen der Kette, z.B. die einfach ungesättigte Fettsäure Erucasäure  $C_{21}H_{41}COOH$  mit einer Doppelbindung (C22:1) oder die mehrfach ungesättigte Linolensäure  $C_{17}H_{29}COOH$  mit drei Doppelbindungen (C18:3).

### 1.4.4 Lipolyse

Fettsäuren werden als Triglyceride im Fettgewebe gespeichert. Bei Bedarf findet dort eine Lipolyse statt. Die freien Fettsäuren werden dann im Blutkreislauf zu den Energie benötigten Zellen transportiert, wo sie zuerst unter ATP-Verbrauch an Coenzym A (CoA) gebunden und so aktiviert werden. Diese Reaktion wird durch die Hydrolyse des dabei entstehenden Pyrophosphats zu zwei Phosphaten (Pi) vorangetrieben.



**Abb. 11** Darstellung der Lipolyse

Danach werden die Fettsäuren durch das Enzym Carnitin-Acyltransferase I an Carnitin gebunden und in die Matrix der Mitochondrien transportiert, wo sie durch Carnitin-Acyltransferase II wieder an CoA gebunden werden.

In der Matrix des Mitochondriums findet dann die  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren zu Acetyl-CoA statt, welches im Citratzyklus weiterverwendet werden kann, um ATP zu gewinnen.

Zusätzlich zur mitochondrialen Fettsäureoxidation findet auch in den Peroxisomen eine Verwertung von Fettsäuren durch ein eigenes Fettsäure- $\beta$ -Oxidationssystem statt, das sich von dem der Mitochondrien unterscheidet. Durch seine Substratspezifität für langkettige Fettsäuren werden die überlangkettigen Fettsäuren dort zuerst verkürzt, ehe

sie in den Mitochondrien weiterverarbeitet werden können. Die  $\beta$ -Oxidation der VLCFA findet ausschließlich in den Peroxisomen statt.

Peroxisomen sind Organellen, die im Organismus eine Reihe wichtiger metabolischer Funktionen erfüllen. Nach dem Grad des peroxisomalen Funktionsausfalls unterscheidet man drei Krankheitsgruppen: Erkrankungen mit generalisiertem Verlust peroxisomaler Funktionen, Erkrankungen mit multiplen peroxisomalen Enzymdefekten und Erkrankungen mit singulärem peroxisomalen Enzymverlust. In dieser letzten Gruppe leiden die meisten Patienten an ALD/AMN, die durch den Defekt der Acyl-CoA-Synthetase (Ligase), des ersten Enzyms der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation verursacht wird (Lazo et al., 1988, Wanders et al., 1988).

#### **1.4.5 Bestimmung der VLCFA**

Der Nachweis erhöhter überlangkettiger Fettsäuren in Blutplasma, Erythrozyten, Leukozyten und Fibroblasten ist der erste Indikator für das Vorliegen einer peroxisomalen Erkrankung. Die Bestimmung erfolgt mittels kombinierter Gaschromatographie-Massenspektrometrie (Hunneman und Hanefeld, 1988). Im Hinblick auf die Erkennung von ALD/AMN sollte eine C26:0 Bestimmung auch bei isoliertem M. Addison durchgeführt werden (Molzer et al., 1992), da in etwa 9% der Fälle von ALD/AMN die Nebennierenrindeninsuffizienz einer neurologischen Symptomatik vorausgeht und manchmal überhaupt isoliert bleibt (Moser et al., 1995a; Brennemann et al., 1996).

## **1.5 Adrenoleukodystrophie / Adrenomyeloneuropathie**

### **1.5.1 Genetik der ALD**

Im Jahre 1981 wurde festgestellt, dass sich das ALD-Gen auf dem letzten Segment des langen Arms des X Chromosoms Xq28 befindet (Migeon et al., 1981). Das resultierende Genprodukt, das ALD-Protein (ALDP) besteht aus 745 Aminosäuren und ist in der Membran von Peroxisomen lokalisiert (Mosser et al., 1993). Es gehört zu der Gruppe ATP-abhängiger ABC-Membrantransportproteine.

Bisher sind 909 Mutationen im ALD-Gen gefunden und beschrieben worden (Stand 12.2006). Seit 1999 existiert eine Datenbank, die alle bisher identifizierten Mutationen zeigt (<http://www.ALD.nl>).

### **1.5.2 Ätiologie und Pathogenese der ALD**

Die genauen pathogenetischen Mechanismen der ALD sind weitgehend unbekannt. 1988 wurde gezeigt, dass die verminderte peroxisomale  $\beta$ -Oxidation, die zur Anhäufung der überlangkettigen Fettsäuren führt, durch eine reduzierte Aktivität der Very long chain acyl-CoA-Synthetase (VLCS) bedingt ist (Lazo et al., 1988; Wanders et al., 1988). Das ursächliche Gen kodiert jedoch nicht das Enzym VLCS, sondern einen peroxisomalen Membrantransporter (ALDP). Der Zusammenhang zwischen dem Protein und der VLCS ist nicht bekannt. Die zerebralen Verlaufsformen der ALD zeigen akut entzündliche Reaktionen, die durch den Anstau der VLCFA ausgelöst zu sein scheinen. Diese fehlen den langsam progredienten Formen. Eine Korrelation zwischen der Verlaufsform und dem Ausmaß der Akkumulation der VLCFA liegt nicht vor. Ebenso konnte keine Genotyp/Phänotyp – Korrelation nachgewiesen werden.

### 1.5.3 Klinische Phänotypen

Das klinische Erscheinungsbild der ALD ist sehr unterschiedlich. Neurologische Symptome treten unabhängig von endokrinologischen Symptomen auf. Die folgende Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der klinischen Phänotypen der ALD.

**Tab. 1** Klinische Phänotypen der ALD (nach Moser et. al., 1995a).

Klinischer Phänotyp	Relative Häufigkeit	Manifestations-Alter (Jahre)	Lokalisation im Nervensystem	Progredienz
Kindlich zerebral	47 %	7,1 ( $\pm$ 1,7)	Großhirnhemisphären	rasch
Jugendlich zerebral	5 %	10 – 21	Großhirnhemisphären	rasch
Erwachsen zerebral	3 %	> 21	Großhirnhemisphären	rasch
Adrenomyeloneuropathie	25 %	27,6 ( $\pm$ 8,7)	Rückenmark und periph. Nervensystem	langsam
nur Addison-Typ	10 %			
asymptomatisch	10 %			

Die häufigste und schwerwiegendste Form ist zerebrale ALD im Kindesalter (Siemerling und Creutzfeld, 1923). Sie betrifft etwa ein Drittel der ALD-Patienten, die zwischen dem 3. und dem 10. Lebensjahr symptomatisch werden. Fortschreitende entzündliche Demyelination der weißen Hirnsubstanz führt gewöhnlich nach erstem Auftreten der Symptome wie Verhaltensauffälligkeiten, Hör- und Sehschwächen innerhalb von Monaten zu fokalen und generalisierten Anfällen, spastischen Tetraplegien und Demenz und zu einem vegetativen Zustand und Tod nach zwei bis drei Jahren (Van Geel et al., 1997). Bei etwa 80% der Patienten zeigt die Magnetresonanztomographie eine charakteristische, meist symmetrische Demyelinisierung der periventrikulären parieto-okzipitalen und temporalen weißen Hirnsubstanz und des Corpus callosum. Typischerweise wird eine okzipito-frontale Ausbreitung der Entmarkungsherde beobachtet. Die jugendlichen und die adulten zerebralen Varianten treten weniger häufig

auf (ca. 8% der Fälle) und erste Symptome sind Verhaltensauffälligkeiten, Demenz oder Schizophrenie im Zusammenhang mit neurologischen Symptomen.

Adrenomyeloneuropathie (AMN) ist eine schwächere Form von ALD, die langsamer voranschreitet und hauptsächlich das Rückenmark und die peripheren Nerven betrifft (Griffin et al., 1977). Männliche AMN Patienten haben im zweiten oder dritten Lebensjahrzehnt peripher-neuropathische Symptome und fortschreitende spastische Paraparese (mittleres Erkrankungsalter:  $27,6 \pm 8,7$  Jahre, Moser et al., 1995a). Im Vordergrund steht eine langsam progrediente Gangstörung. Störungen von Sensibilität, Blasen- und Darminkontinenz und erektiler Potenz treten im Verlauf der Erkrankung hinzu. Bei der neurologischen Untersuchung finden sich eine Spastik der unteren Extremitäten, eine Hinterstrang-Ataxie und eine Neuropathie. Nach fünf bis 15 Jahren benötigen die Patienten Gehstützen, nach zehn bis 20 Jahren kommt es zum Verlust der Gehfähigkeit. In der Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) wird häufig eine Atrophie des Rückenmarks beobachtet, die kognitiven Fähigkeiten sind nicht beeinträchtigt. Die Lebenserwartung von Patienten mit AMN ohne cerebrale Beteiligung ist kaum eingeschränkt.

40-50% der AMN-Patienten weisen cerebrale kernspintomografische und kognitive Veränderungen als Ausdruck einer cerebralen Beteiligung auf.

Bei bis zu 75% aller ALD/AMN Patienten tritt außerdem eine Nebenniereninsuffizienz unterschiedlichen Ausmaßes auf (Blevins et al., 1994). Isolierte Nebenniereninsuffizienz („nur Addison' Phänotyp) kann ein frühes Zeichen für Kindheits-ALD oder AMN vor Auftreten von neurologischen Symptomen sein (Moser et al., 1995a; Brennemann et al., 1996). Müdigkeit, Hypotonie und hyperpigmentierte Haut sind die Initialsymptome (Van Geel et al., 1997). Männliche Familienangehörige mit erhöhten VLCFA, aber ohne neurologische und endokrinologische Symptome werden bei ALD-Familienuntersuchungen gefunden. Von den männlichen Genträgern sollen 8% - 10% asymptomatisch sein (Moser et al., 1992, van Geel et al., 1994). Allerdings kann bei diesen Patienten später ein symptomatischer Phänotyp auftreten (Powers und Schaumburg, 1981).

Die Häufigkeit der ALD wird mit 1 : 50.000 (Moser et al., 1992) bis 1 : 20.000 (Mosser et al., 1993) männliche Neugeborene angegeben, wobei es sich in einem Viertel der Fälle um die AMN-Variante handelt. In einer 1994 durchgeführten Untersuchung wurden in Deutschland insgesamt 188 männliche Patienten mit einer ALD identifiziert und eine minimale Inzidenz der ALD von 1 : 40.000 männliche Neugeborene berechnet (Heim et al., 1997).

#### **1.5.4 Nebenniereninsuffizienz und endokrinologische Symptomatik**

Die primäre Nebenniereninsuffizienz ist das häufigste endokrinologische Symptom der ALD. Der M. Addison kann den neurologischen Symptomen vorausgehen, gemeinsam mit ihnen oder nach ihnen beginnen. Symptome eines M. Addison vor Beginn der neurologischen Symptomatik wurden bei 61% der AMN-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung beschrieben (Blevins et al., 1994). Das Intervall zwischen Auftreten einer Nebenniereninsuffizienz und Beginn neurologischer Symptome ist variabel und kann über 30 Jahre betragen (Moser et al., 1984a)

Bei den betroffenen Patienten erkennt man eine Nebenniereninsuffizienz durch eine Verminderung der Kortisolausscheidung und ansteigende ACTH-Konzentrationen. Gewöhnlich lässt sich Kortisol in ACTH-Stimulationstesten nicht ausreichend stimulieren (Brennemann et al., 1996). Erhöhte ACTH-Konzentrationen können außerdem auf Patienten mit eingeschränkter Nebennierenreserve hinweisen, was durch ACTH-Stimulation allein nicht unbedingt nachweisbar ist (Blevins et al., 1984).

Niedrige Konzentrationen des DHEAS bei ALD-Patienten sind in der Literatur beschrieben worden (Assies et al., 1998, Assies et al., 2003).

Der Hypogonadismus ist ein weiteres endokrinologisches Symptom der ALD bei erwachsenen Patienten (Powers und Schaumburg, 1981; Brennemann et al., 1997) und kann zusätzlich zur spinalen Symptomatik zu Potenzstörungen führen.



### 1.5.5 Diagnostik und Therapieansätze

Die Diagnose der ALD/AMN beruht primär auf der Bestimmung der Konzentration der überlangkettigen Fettsäuren größer C22:0 im Plasma. Erhöhte Konzentration von C26:0 in Kombination mit erhöhten Quotienten C24:0/C22:0 und C26:0/C22:0 gilt als beweisend (Moser et al., 1999). Die Mutationsanalyse des ALD-Gens sowie der Nachweis von ALDP mittels Immunfluoreszenz und Kopplungsanalysen mit X-chromosomalen Markern erlauben die pränatale Diagnose und dienen der Identifizierung asymptomatischer Patienten und Überträgerinnen. Die MRT gibt Aufschluss über das Stadium der Erkrankung.

Die Symptome der Nebennierenrindeninsuffizienz bei ALD werden durch Steroidsubstitution wirksam behandelt. Weitergehende Therapieverfahren der neurologischen Symptomatik sind experimentell und beinhalten Diät, Knochenmarkstransplantation und Immunsuppression. Eine diätetische Reduktion der Zufuhr von überlangkettigen Fettsäuren auf unter 3 mg/d konnte weder deren Plasmaspiegel senken noch die neurologische Progredienz aufhalten (Brown et al., 1992). Die Kombination aus Diät und täglicher Gabe von Ölsäure (Glycerintrioleat, GTO) und Erucasäure (Glycerintrierukat, GTE) wird wegen der Bemühungen des Ehepaars Odone bei der klinischen Erprobung der GTO/GTE Therapie im Mischungsverhältnis 4:1 für ihren cALD erkrankten Sohn auch als ‚Lorenzos Öl‘ bezeichnet (Moser, 1997). Die Therapie führt zu einer Normalisierung der C26:0 Plasmakonzentration war. Sie war und ist Gegenstand zahlreicher klinischer Untersuchungen der neurologischen Symptome der ALD. Die Behandlung vermag die Progredienz bestehender neurologischer Symptome nicht zu verhindern, wohl aber zu signifikant zu verzögern und die Lebenserwartung zu erhöhen (Moser et al., 1995b). Die Knochenmarkstransplantation stellt einen weiteren Therapieansatz dar. Hämatopoetische Stammzellen sollen sich im zentralen Nervensystem (ZNS) ansiedeln und dort durch ihre uneingeschränkte Fähigkeit zur  $\beta$ -Oxidation von VLCFA der Demyelinisierung entgegenwirken. Bei einem sehr frühen neurologischen Stadium durchgeführt verspricht die Knochenmarkstransplantation als einzige Therapieform permanente Heilung (Aubourg et al., 1990; Shapiro et al., 2000). Derzeit werden die Ergebnisse klinischer Studien mit

Lovastatin erwartet, das die Konzentrationen der VLCFA in vitro und in vivo zu senken vermochte (Singh et al., 1998; Pai et al., 2000)

## 1.6 Fragestellung

Die ALD ist die häufigste angeborene peroxisomale Stoffwechselerkrankung und zeigt eine große phänotypische Variabilität. Die Patienten entwickeln im Laufe ihres Lebens progrediente neurologische Symptome. In Deutschland sind zur Zeit etwa 200 Patienten mit ALD bekannt.

Die Ansammlung von VLCFA im zentralen und peripheren Myelin, der Nebennierenrinde, den Hoden und im Plasma führt neben entzündlicher Demyelinisierung im ZNS mit peripherer Neuropathie zu adrenokortikaler und testikulärer Insuffizienz. Die primäre Nebenniereninsuffizienz (M. Addison) ist das häufigste endokrinologische Symptom der ALD und ist in den meisten Fällen das Erstsymptom der ALD. Das Intervall zwischen Auftreten einer Nebenniereninsuffizienz und Beginn neurologischer Symptome ist variabel und kann über 30 Jahre betragen (Moser et al., 1984a)

Bei den betroffenen Patienten erkennt man die Nebenniereninsuffizienz durch eine Verminderung der Kortisolausscheidung und ansteigende ACTH-Konzentrationen. Niedrige Konzentrationen des Nebennierenandrogens Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) bei ALD-Patienten sind in der Literatur dokumentiert (Assies et al., 1998, Assies et al., 2003).

Wir fragten uns, ob ein möglicher zweiter sensitiver Marker für die Nebenniereninsuffizienz zu finden ist und haben zur Beantwortung dieser Frage die Steroidhormone Dehydroepiandrosteronsulfat, Androstendion und 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron bei Patienten mit AMN untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Patienten

Wir untersuchten 63 männliche AMN-Patienten. Die Ergebnisse der kernspintomographischen Untersuchungen des Gehirns waren bei allen Patienten unauffällig („reiner“ AMN-Phänotyp). 34 der Patienten ( $42,3 \pm 1,9$  Jahre [Mittelwert  $\pm$  SEM], Altersspanne: 23 - 65 Jahre; Krankheitsdauer:  $13,2 \pm 1,4$  Jahre) hatten den Phänotyp mit ausschließlich neurologischer Symptomatik (zentrales und peripheres Nervensystem) ohne Hypokortisolismus. Die restlichen 29 Patienten ( $35,5 \pm 2,2$  Jahre [Mittelwert  $\pm$  SEM], Altersspanne: 17 - 65 Jahre, Krankheitsdauer:  $13,3 \pm 1,5$  Jahre) hatten den Phänotyp neurologische Symptomatik (zentrales und peripheres Nervensystem) sowie entweder zusätzlichen Hypokortisolismus (n=24) oder ausschließlich einen Hypokortisolismus (Addison Phänotyp) (n=5).

Von einer normalen Nebennierenfunktion wurde ausgegangen, wenn entweder die Basalkonzentration des Kortisols im Serum oder die Kortisolkonzentration nach einem Kortikotropin-Stimulationstest mindestens 20  $\mu\text{g}/\text{dl}$  betrug. Kortikotropin (0,25 mg, Synacthen®, Novartis, Nürnberg) wurde vor 10 Uhr intravenös verabreicht und vor der Injektion sowie 60 Minuten danach gemessen.

Patienten mit einer primären Nebenniereninsuffizienz erhielten eine Substitutionstherapie mit 15 bis 25 mg Hydrokortison/Tag. Zusätzlich erhielten 19 dieser Patienten eine Substitutionstherapie mit Mineralokortikoiden in einer Dosis von 0,1 mg/Tag. 26 der Patienten wurden zusätzlich mit einer Ernährungstherapie von 60 ml/Tag Lorenzos Öl behandelt, während 26 Patienten aus der Gruppe ohne Hypokortisolismus nur mit 60 ml/Tag Lorenzos Öl behandelt wurden. Die Kontrollgruppe bestand aus 95 gesunden Männern ( $49,8 \pm 0,8$  Jahre [Mittelwert  $\pm$  SEM], Altersspanne: 30 - 65 Jahre).

Die Untersuchungen wurden auf der Grundlage der Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) und den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen durchgeführt.

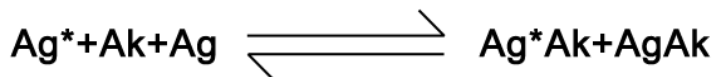
## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Analyseverfahren

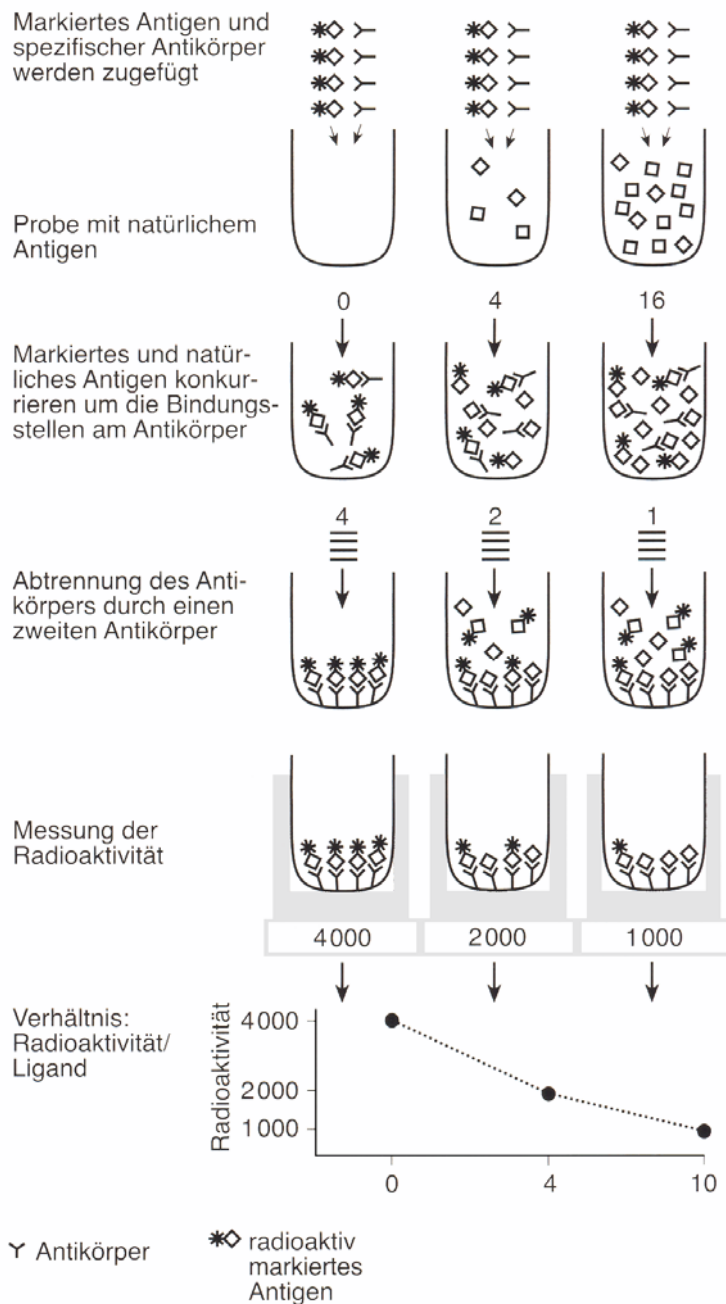
#### 2.2.1.1 Radioimmunoassay (RIA)

Beim kompetitiven (klassischen) Radioimmunoassay (RIA) finden sich nebeneinander im Ansatz: die Probe mit dem zu bestimmenden Antigen, eine konstante Menge radioaktiv markierten Antigens der gleichen Art (als Tracer bezeichnet) und eine konstante geringe Menge spezifischen Antikörpers. Die Inkubation dieser drei aufgeführten Reaktionspartner erfolgt zur Einstellung eines Gleichgewichts. In der Probe enthaltenes und radioaktiv markiertes Antigen konkurrieren um die Bindungsstellen an den Antikörpern. Nach der Inkubation entspricht das Verhältnis von unmarkiertem zu markiertem freiem Antigen demjenigen zwischen den insgesamt gebildeten und den markierten Antigen-Antikörper-Komplexen.

#### Kompetitives Bindungsprinzip

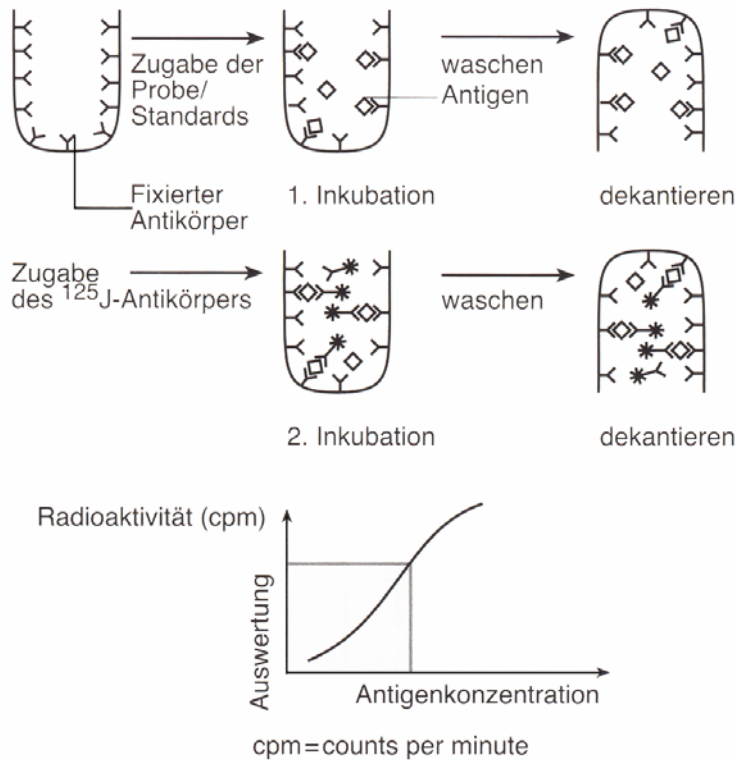


**Abb. 12** Reaktionsschema des kompetitiven Radioimmunoassays. Eine konstante Menge radioaktives Antigen ( $\text{Ag}^*$ ) und eine variable Menge Antigen der zu untersuchenden Probe ( $\text{Ag}$ ) konkurrieren um eine definierte, im Überschuss vorliegende Menge Antikörper ( $\text{Ak}$ ). Damit ist bei hohem Antigengehalt der Probe wenig markiertes Antigen an Antikörper gebunden und bei geringem Antigengehalt der Probe viel markiertes Antigen an Antikörper gebunden. Messtechnisch wird meist die Radioaktivität der Antigen-Antikörper-Komplexe ermittelt. Je höher die gemessene Radioaktivität ist, desto weniger Antigen ist in der Probe enthalten. Je niedriger die gefundene Radioaktivität ist, desto mehr Antigen liegt im zu untersuchenden Material vor. Die Auswertung erfolgt über eine Standardkurve.



**Abb. 13** Schematische Darstellung eines Radioimmunoassay. In diesem Fall konkurrieren markiertes und natürliches Antigen um die Bindungsstelle am Antikörper. Die Abtrennung dieses Antikörpers erfolgt in einem nächsten Schritt durch einen zweiten Antikörper. (modifiziert nach Bruhn et al., 1999)

Beim nichtkompetitiven Radioimmunoassay (Sandwich-Prinzip) finden sich im Ansatz folgende Reaktionspartner: In der Probe findet sich das zu bestimmende Antigen, hinzu wird ein Überschuss an spezifischen Antikörpern, die an eine feste Phase (z.B. Röhrchenwand) gebunden sind, gegeben. In einem ersten Schritt erfolgt die Inkubation zur Bindung des zu bestimmenden Antigens an den Antikörper. Anschließend erfolgt ein Waschen des Ansatzes zur Entfernung der freien Antikörper und störender Serumbestandteile. Darauf wird ein radioaktiv markierter zweiter Antikörper gleicher Spezifität, der mit einer zweiten Bindungsstelle des Antigens (das bereits in Antigen-Antikörper-Komplexen vorliegt) reagiert, hinzu gegeben. Schließlich erfolgt die Inkubation zur Bildung von Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexen (Sandwich). Dann werden die freien markierten Antikörper durch Absaugen und Waschen entfernt. Je mehr Antigen in der Probe vorhanden ist, desto mehr wird an den unmarkierten Antikörper gebunden, so dass auch entsprechend mehr radioaktiv markierter Antikörper an den gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexen fixiert werden kann. Messgröße ist die Radioaktivität des gebundenen zweiten Antikörpers. Die Auswertung erfolgt über eine Standardkurve (Bruhn et al., 1999).



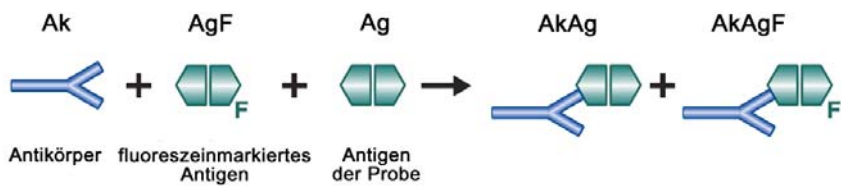
**Abb. 14** Schematische Darstellung des nichtkompetitiven Radioimmunoassays (Sandwich-Prinzip). Auf der Innenwand eines Plastikröhrchens ist ein Antikörper fixiert. Nach Zugabe der Antigenlösung (Probe, Standard) werden die Antigenmoleküle gebunden. Nun wird das Röhrchen entleert, gewaschen und mit einem zweiten, radioaktiv markierten Antikörper gegen das gleiche Antigen beschickt. Es bildet sich folgender Sandwich: fixierter Antigen-/Antikörper-markierter Antikörper. Im vorliegenden Beispiel wurde  $^{125}\text{J}$  zur Markierung verwendet. Die Radioaktivität entspricht den gebundenen Antigenmolekülen (modifiziert nach Bruhn et al., 1999).

### 2.2.1.2 Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay (FPIA)

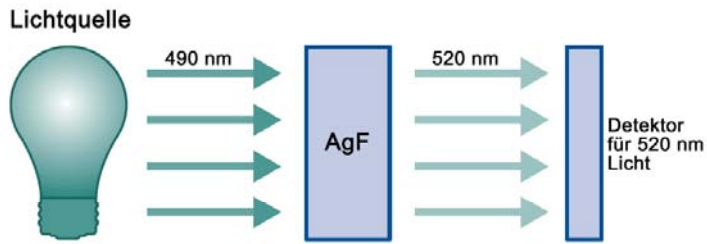
Der Fluoreszenzpolarisations-Immunoassay (FPIA) ist eine kompetitive Messung. Die Messprobe, die das zu messende Antigen enthält, wird mit dem entsprechenden Antikörper und dem Fluoreszein-markierten Antigen inkubiert. Beide Antigene konkurrieren um die Bindungsstellen am Antikörper. Ist die Probe negativ, d.h. ohne Antigen, werden die markierten Antigene vom Antikörper gebunden und dadurch in der Lösung fixiert, weil die Antikörper als große Proteinmoleküle sehr unbeweglich sind. Wird die Fluoreszenz mit polarisiertem Licht angeregt, ist das Fluoreszenzlicht ebenfalls polarisiert, weil sich das Fluoreszein-markierte Antigen durch die Bindung an den Antikörper zwischen Lichtabsorption und Ausstrahlung des Fluoreszenzlichtes nicht oder kaum bewegt.

Ist die Probe positiv, d.h. enthält natürliches Antigen, wird ein Teil der Bindungsstellen des Antikörpers von diesem abgesättigt. Daher bleibt ein Teil der Fluoreszein-markierten Antigene ungebunden, d.h. frei beweglich. Dadurch dass sich das Molekül zwischen Absorption des Anregungslichtes und Aussendung des Fluoreszenzlichtes drehen kann, geht die Polarisation des Fluoreszenzlichtes verloren, das Fluoreszenzlicht wird depolarisiert. Dieser Effekt ist umso größer, je mehr Antigen in der Probe vorhanden ist. Es besteht also eine umgekehrte Proportionalität zwischen der Antigenmenge in der Probe und dem Polarisationsgrad des Fluoreszenzlichtes. Dies ist die Messgröße, die mittels einer Kalibrationskurve, die mit der Antigenmenge in der Probe korreliert, ermittelt wird (Bruhn et al., 1999b).

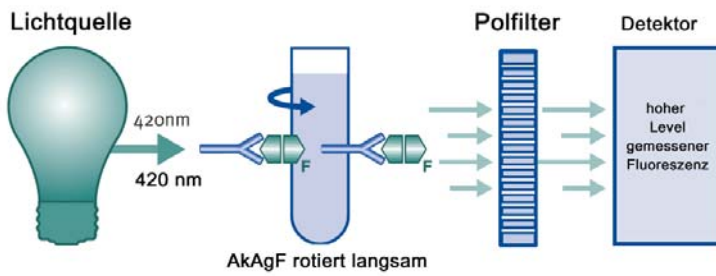




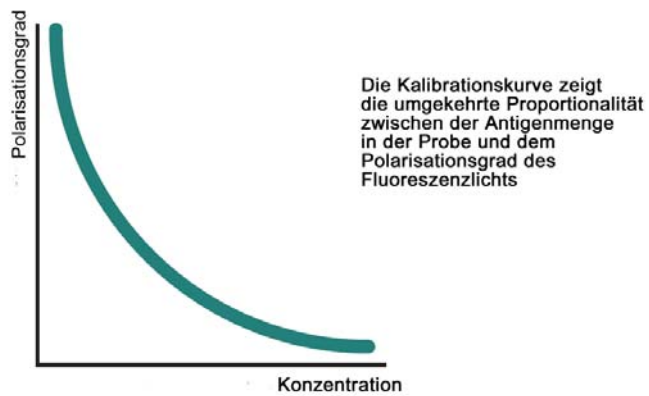
a. kompetitiver Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay



b. Fluoreszenzdetektion der fluoreszeinkmarkierten Komplexe



c. Messung großer Komplexe mittels Fluoreszenz, Rotation und polarisiertem Licht



d. Kalibrationskurve

**Abb. 15** Schematische Darstellung des kompetitiven FPIA

## **2.2.2 Kortisol**

### **2.2.2.1 Messprinzip**

Der Kortisol-Assay beruht auf der Technik des Fluoreszenzpolarisations-Immunoassays (FPIA) am TDxFLx-System (Abbott, Wiesbaden). Die Wolfram-Halogenlampe des Systems emittiert Licht verschiedener Wellenlängen oder Farben, dessen räumliche Ausrichtung rein zufällig ist. Ein vor der Lichtquelle angebrachter Interferenzfilter sorgt dafür, dass ausschließlich blaues Licht (481 – 489 nm) passieren kann. Dieses Licht wird anschließend durch einen Flüssigkristall-Polarisator geleitet, der das blaue Licht auf einer einzigen Ebene polarisiert. Das auf einer Ebene polarisierte Licht trifft auf den Tracer bzw. den Fluoreszenzfarbstoff, wodurch dieser angeregt wird. Nach dieser Anregung kehrt der Fluoreszenzfarbstoff wieder in den Normalzustand zurück, wobei er grünes Licht (525 – 550 nm) emittiert. Wird der Fluoreszenzfarbstoff an ein großes Antikörpermolekül gebunden, so kann er nicht mehr frei drehen und das emittierte grüne Licht schwingt in der gleichen Ebene wie das anregende blaue Licht, d.h. die Polarisation wird beibehalten. Ist jedoch eine freie Rotation des Fluoreszenzfarbstoffs möglich, dann schwingt das emittierte grüne Licht auf einer anderen Ebene als das anregende blaue Licht, so dass die Polarisation verloren geht. Aufgrund der Rotationseigenschaften von Molekülen in Lösung verhält sich der Polarisationsgrad direkt proportional zur Molekülgröße. Das bedeutet, dass die Polarisation mit der Molekülgröße zunimmt.

Die TDxFLx-Software berechnet eine Gleichung für die optimale Kurvenanpassung, mit deren Hilfe die Kalibrierungskurve erstellt wird. Diese Kurve wird gespeichert und dient als Grundlage für die Berechnung der Analytkonzentration in den Patientenproben anhand der für jede Probe im Assay ermittelten Polarisationswerte.

### **2.2.2.2 Messbereich, Empfindlichkeit und Präzision**

Messbereich: 0,45 – 60 µg/dl

Die Assayempfindlichkeit betrug 0,45 µg/dl, der Intraassay-Variationskoeffizient lag bei 2,9% (MW 13,8 µg/dl, n=20) und der Interassay-Variationskoeffizient lag bei 4,5% (MW 12,3 µg/dl, n=20)

### **2.2.2.3 Referenzbereich**

Der Referenzbereich für Kortisol im Serum liegt morgens um 8 Uhr für Kinder von 2 bis 15 Jahren zwischen 2,5 und 23 µg/dl, für Jugendliche von 16 bis 18 Jahren zwischen 2,4 und 29 µg/dl und für Erwachsene zwischen 5 und 25 µg/dl. (Kern, Fehm 1998)

### **2.2.2.4 Spezifität**

Die Spezifität des Assays wurde an Hand der Kreuzreaktivität mit endogenen Steroiden überprüft, deren chemische Struktur zu einer Interferenz mit dem Kortisol Assay führen könnte. Die Kreuzreaktivität einer Substanz wurde ermittelt, indem ein Puffer untersucht wurde, der auf eine der in Tab. 2 aufgeführten Konzentrationen eingestellt worden war. (TDxFLx Kortisol Abbott 2002)

Kreuzreaktivität (%) =  $100 \times (\text{gemessene Konzentration}' / \text{zugegebene Konzentration}')$

**Tab. 2** Spezifität des Kortisol-Assays

Testsubstanz	zugegebene Konzentration	gemessene Konzentration	Kreuzreaktivität (%)
11-Desoxykortisol	1000	84,6	8,5
Korticosteron	500	31,4	6,3
Kortison	1000	25,2	2,5
Tetrahydrokortisol	3000	41,7	1,4
17-OH-Progesteron	3000	11,2	0,4
11-Desoxykorticosteron	3000	34,3	1,1
6- $\beta$ -OH-Kortisol	3000	20,8	0,7
Progesteron	10000	6,9	0,07
11- $\beta$ -OH-Progesteron	10000	12,6	0,1
$\beta$ -Kortol	5000	1,9	0,04
$\beta$ -Kortolon	1000	0,9	0,1
Testosteron	10000	2,6	0,03
Kortisol-21-Glukoronid	10000	10,7	0,1

### 2.2.2.5 Grenzen des Verfahrens

Kortisol-Konzentrationen > 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$  müssen mit einem Verdünnungspuffer gemessen und das Ergebnis mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Wegen tageszyklischer Schwankungen der Kortisol-Konzentrationen im Serum sollte die Probenentnahme im Regelfall zwischen 8 und 10 Uhr morgens erfolgen.

Steroidtherapie mit Prednison oder Prednisolon können auf Grund der Kreuzreaktivität zu erhöhten Kortisolwerten führen.

### **2.2.3 Dehydroepiandrosteronsulfat**

#### **2.2.3.1 Messprinzip**

Mittels ‚Coat-A-Count‘ DHEAS – Radioimmunoassay (RIA) (DPC, Biermann, Bad Nauheim) erfolgte die in vitro Bestimmung von DHEAS im Serum nach dem Prinzip des nichtkompetitiven Festphasen-Radioimmunoassays. Hierbei konkurrieren Serum-DHEAS und <sup>125</sup>Jod-markiertes DHEAS um eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen hochspezifischer Antikörper, die auf die Innenwandung von Polypropylen-Röhrchen immobilisiert sind (solid phase). Nach Beendigung der Gleichgewichtseinstellung der Reaktion wird das freie, nicht an die Antikörper gebundene DHEAS abgeschüttelt oder abgesaugt und die Radioaktivität der Röhrchen an einem Gamma-Counter (Wallac Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc., Wellesley, MA, USA) gemessen.

#### **2.2.3.2 Messbereich, Empfindlichkeit und Präzision**

Die DHEAS Assayempfindlichkeit betrug 11,7 ng/ml, der Intraassay-Variationskoeffizient lag bei 4,4% (MW 2023 ng/ml, n=20), der Interassay-Variationskoeffizient lag bei 6,3% (MW 2179 ng/ml, n=20).

### 2.2.3.3 Referenzbereich

Der Hersteller gibt folgende altersabhängige Referenzbereiche für Erwachsene an:

**Tab. 3** Altersabhängige Normbereiche 5. – 95. Perzentile

Alter	Männer (ng/ml)	Frauen (ng/ml)
20 - 29	2800 - 6400	650 – 3800
30 - 39	1200 - 5200	450 – 2700
40 - 49	950 - 5300	320 – 2400
50 - 59	700 - 3100	260 – 2000
60 - 69	420 - 2900	130 – 1300
70 - 79	280 - 1750	170 - 900

### 2.2.3.4 Spezifität

Die Spezifität des im Assay verwendeten DHEAS-Antiserums wurde an Hand der Kreuzreaktivität mit endogenen Steroiden überprüft. Tab. 4 zeigt die vom Hersteller gemessenen Kreuzreaktivitäten:

**Tab. 4** Spezifität des DHEAS-Antiserums

Testsubstanz	zugegebene Konzentration	Kreuzreaktivität (%)
DHEA-SO <sub>4</sub>		100
Estron 3-SO <sub>4</sub>	50000	0,56
B-Estradiol-3-SO <sub>4</sub> -17-Glucuronid	50000	0,008
DHEA-Glucuronid	50000	0,08
Androsteron- Glucuronid	50000	0,02
Androsteron-SO <sub>4</sub>	50000	0,30
DHEA	10000	0,08
Androstendion	10000	0,12
Androsteron	20000	0,05
Testosteron	20000	0,10
5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron	50000	0,004
Estron	50000	0,01
Progesteron	50000	0,016
Kortisol	100000	0,01
Aldosteron	50000	0,03
Estradiol	50000	0,03
Estriol	50000	0,03
19-Hydroxyandrostendion	50000	0,02

### 2.2.3.5 Grenzen des Verfahrens

Stark lipämische Seren sind für den Einsatz im Assay nicht geeignet.

Hämolyse hat keinen störenden Einfluss auf die Bestimmung.

## **2.2.4 17 $\alpha$ -OH Progesteron**

### **2.2.4.1 Messprinzip**

Mittels ‚Coat-A-Count‘ 17 $\alpha$ -OH Progesteron – Radioimmunoassay (RIA) (DPC, Biermann, Bad Nauheim) erfolgte die Bestimmung von 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron (17 $\alpha$ -OHP) im Serum nach dem Prinzip des nichtkompetitiven Festphasen-Radioimmunoassays, bei der die Innenwand von Polypropylen-Röhrchen mit 17 $\alpha$ -OH Progesteron-spezifischen Antikörpern beschichtet ist. <sup>125</sup>Jod-markiertes 17 $\alpha$ -OH Progesteron konkurriert mit dem 17 $\alpha$ -OH Progesteron aus der Patientenprobe während einer festgelegten Inkubationszeit um die Antikörperbindungsstellen. Anschließend erfolgt die Trennung durch Dekantieren der freien Phase von der gebundenen, die in einem Gamma-Counter (Wallac Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc., Wellesley, MA, USA) gemessen wird. Das in der Patientenprobe gemessene 17 $\alpha$ -OH Progesteron wird mittels einer Standardkurve ermittelt.

### **2.2.4.2 Messbereich, Empfindlichkeit und Präzision**

Der Messbereich beträgt 0,1 – 12,5 ng/ml., die Assayempfindlichkeit beträgt 0,07 ng/ml. Intra- und Interassay VK liegen jeweils bei 5,0% (Mittelwert 1,85 ng/ml, n=20).

### **2.2.4.3 Referenzbereich**

Der Referenzbereich für Männer im Alter von 20 – 59 Jahren ist mit 0,6 – 3,42 ng/ml angegeben.



### 2.2.4.4 Spezifität

Die Spezifität des Assays wurde an Hand der Kreuzreaktivität mit endogenen Steroiden überprüft, deren chemische Struktur zu einer Interferenz mit dem 17 $\alpha$ -OH Progesteron Assay führen könnte. Tab. 5 zeigt die vom Hersteller gemessenen Kreuzreaktivitäten:

**Tab. 5** Spezifität des 17 $\alpha$ -OH Progesteron Assays

Testsubstanz	zugegebene Konzentration (ng/ml)	gemessene Konzentration (ng/ml)	Kreuzreaktivität (%)
Dihydroandrosteron	10000	nn	nn
Androsteron	10000	nn	nn
5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron	10000	0.18	0.0018%
Testosteron	10000	0.96	0.0096%
Androstendion	10000	nn	nn
DHEAS	10000	nn	nn
Ethinylestradiol	10000	nn	nn
Ethinylestradiolmethylether	10000	nn	nn
Methylestradiolmethylether	10000	nn	nn
Estron-3-SO <sub>4</sub>	10000	nn	nn
Norethindron	10000	nn	nn
Norethynodrel	10000	nn	nn
Pregnandion	4000	2.82	0.071%
Pregnantriol	10000	0.083	0.00083%
Kortikosteron	100000	2.26	0.0023%
11-Desoxykortisol	160	3.32	2.1%
Progesteron	1000	5.78	0.578%
Desoxykortikosteron	50000	70.2	0.14%
Kortisol	4000	0.97	0.024%
Pregnenolon	5000	0.96	0.019%
Pregnenolonsulfat	2000	0.53	0.027%
17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon	1000	31.5	3.2%
17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon-SO <sub>4</sub>	5000	190	3.8%

nn = nicht nachweisbar

#### **2.2.4.5 Grenzen des Verfahrens**

Lipämische Proben sollten mittels Ultrazentrifugation geklärt werden.

Die Ergebnisse von hämolytischen Proben sind mit Vorsicht zu interpretieren.

Wegen tageszeitlicher Schwankungen des  $17\alpha$ -OH Progesterons sollte die Probenentnahme im Regelfall zwischen 8 und 10 Uhr morgens erfolgen.

Bilirubin hat in Konzentrationen bis zu 200 mg/l keinen Einfluss auf die Ergebnisse, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Erythrozytenkonzentrate haben in Konzentrationen bis zu 30  $\mu$ l/ml keinen Einfluss auf die Ergebnisse, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Triglyceride haben in Konzentrationen bis 3000 mg/dl keinen Einfluss auf die Ergebnisse, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

#### **2.2.5 Androstendion**

##### **2.2.5.1 Messprinzip**

Das Verfahren DSL-4200 Androstendion (DSL, Webster, Texas, USA) ist ein kompetitiver Radioimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Androstendion, wobei  $^{125}$ Jod-markiertes Androstendion und Serum-Androstendion um eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen hochspezifischer Antikörper konkurrieren. Die Menge von  $^{125}$ Jod-markiertem Antigen, das an die Antikörper gebunden ist, ist umgekehrt proportional zur Analytkonzentration der Probe. Die Trennung von freiem und gebundenem Antigen erfolgt mittels eines Doppel-Antikörpersystems. Die nach einer Inkubationszeit an den Antikörper gebundenen Komponenten werden durch Fällung mit einer Präzipitationslösung (Gemisch aus zweitem Antikörper und Polyethylenglykol) von den freien Komponenten getrennt. Nach der Zentrifugation und dem Dekantieren des Überstands wird die Radioaktivität im Präzipitat in einem Gamma-Counter (Wallac

Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc., Wellesley, MA, USA) gemessen und das Ergebnis mittels einer Standardkurve ermittelt.

#### **2.2.5.2 Messbereich, Empfindlichkeit und Präzision**

Die Assayempfindlichkeit betrug 0,02 ng/ml, der Intraassay-VK lag bei 2,7% (Mittelwert 2,23 ng/ml, n=10) und der Interassay-VK lag 4,8% (Mittelwert 2,07 ng/ml, n=10).

#### **2.2.5.3 Referenzbereich**

Der Referenzbereich für Männer im Alter von 19 – 48 Jahren wird mit 0,57 – 2,65 ng/ml und für Frauen im Alter von 19 – 49 Jahren mit 0,47 – 2,68 ng/ml angegeben.

### 2.2.5.4 Spezifität

Das im Test verwendete Androstendion-Antiserum zeigt folgende Kreuzreaktion

**Tab. 6** Spezifität des Androstendion-Antiserums

Testsubstanz	Kreuzreaktivität (%)
4-Androsten-3,17-dion	100
Androsteron	0,33
Cholesterin	nn
Kortikosteron	0,04
Kortisol	0,04
Kortison	0,16
DHEA	0,07
DHEAS	nn
5-Dihydrotestosteron	0,08
Desoxykortison	0,09
Estradiol	nn
Estriol	nn
Estron	0,03
Etiocholanolon	0,08
17-OH-Pregnenolon	nn
17-OH-Progesteron	0,25
Isoandrosteron	0,10
Pregnenolon	0,02
Progesteron	0,06

nn = nicht nachweisbar

### 2.2.5.5 Grenzen des Verfahrens

Hämolytische und lipämische Proben können falsche Androstendion-Werte ergeben und sollten vermieden werden. Mehrmaliges Einfrieren und Auftauen der Reagenzien und Proben sollte vermieden werden.

## **2.3 Statistik**

Die Statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS 11.0. Die Ergebnisse wurden in Mittelwert  $\pm$  Standardfehler wiedergegeben (SEM). Nicht nachweisbare Hormonkonzentrationen wurden aus statistischen Gründen als nachweisbare Grenze wiedergegeben. Zum Vergleich der Gruppen wurde der Wilcoxon-Mann Whitney-U Test herangezogen. Korrelationen wurde mit Pearson's Rank Korrelation ausgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

### 3. Ergebnisse

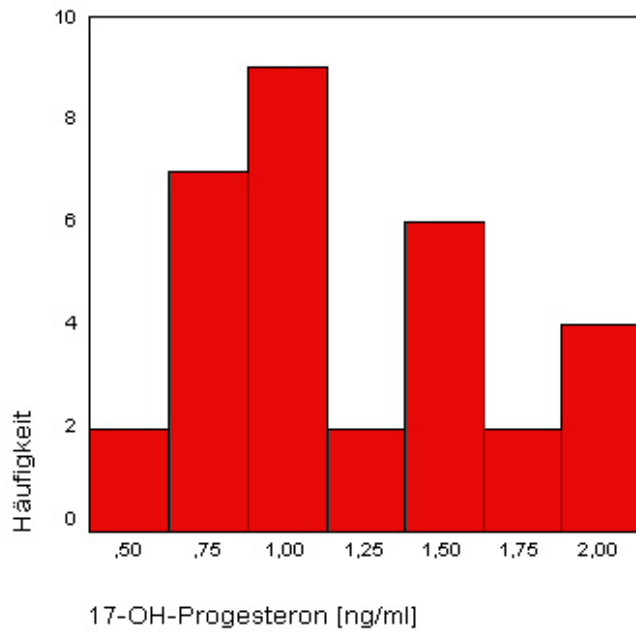
#### 3.1 Kontrollkollektiv

Das Kontrollkollektiv bestand aus 95 gesunden Männern, bei denen wir die  $17\alpha$ -OH Progesteron, Androstendion und DHEAS Serumkonzentrationen ermittelt haben (Tab. 7). Das Alter der Kontrollgruppe betrug im Mittel 33,9 Jahre (Standardabweichung 1,2 Jahre, Spannweite 30 – 65 Jahre).

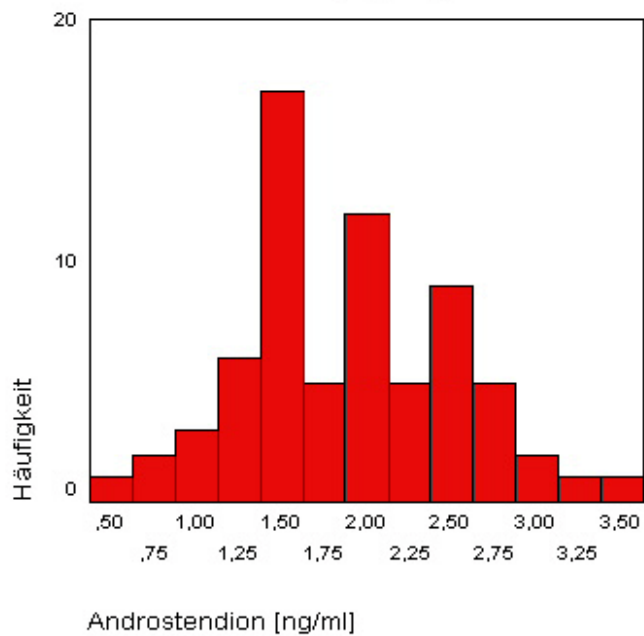
**Tab. 7** Hormonkonzentrationen im Kontrollkollektiv (n=95). Die Daten repräsentieren den Median und die 2,5. bis 97,5. Perzentile.

Hormon	Konzentration [ng/ml]
$17\alpha$ -OHP	1,1 (0,5 – 2,0)
Androstendion	1,9 (0,7 – 3,25)
DHEAS	3013 (1129 – 5750)

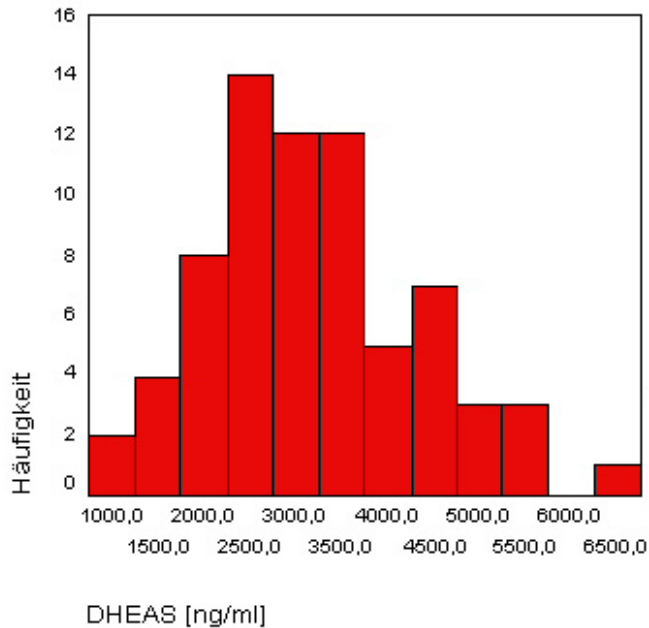
In den nachfolgenden Abbildungen 16-18 ist die Häufigkeitsverteilung der Hormonkonzentrationen im Normalkollektiv als Histogramm dargestellt.



**Abb. 16** Häufigkeitsverteilung der  $17\alpha$ -OHP Konzentration im Kontrollkollektiv



**Abb. 17** Häufigkeitsverteilung der Androstendionkonzentration im Kontrollkollektiv



**Abb. 18** Häufigkeitsverteilung der DHEAS Konzentration im Kontrollkollektiv

## 3.2 AMN-Patienten

### 3.2.1 $17\alpha$ -OH Progesteron und Androstendion

Die  $17\alpha$ -OHP Konzentrationen der AMN-Patienten mit neurologischer Symptomatik ohne Hypokortisolismus (n=34) sowie der AMN-Patienten mit Hypokortisolismus (n=28) ist in Tab. 8 dargestellt. Zwischen diesen beiden Gruppen bestand diesbezüglich kein signifikanter Unterschied. Sämtliche bei den Patienten gemessenen  $17\alpha$ -OHP Konzentrationen lagen im Referenzbereich für gesunde Männer.

Tabelle 8 zeigt die Androstendionkonzentration in den beiden AMN-Patientengruppen sowie im Kontrollkollektiv. In der Patientengruppe ohne Hypokortisolismus lagen alle Werte bis auf drei Ausnahmen im Referenzbereich gesunder Männer. In der Patientengruppe mit Hypokortisolismus war die Androstendionkonzentration signifikant

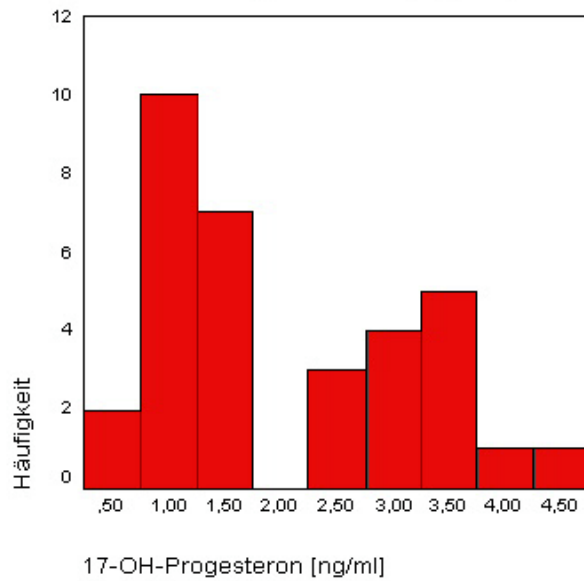


niedriger als in der Patientengruppe ohne Hypokortisolismus. ( $p < 0,01$ ). Bei 16 Patienten mit Hypokortisolismus fanden sich Androstendionkonzentrationen unterhalb des Referenzbereichs gesunder Männer.

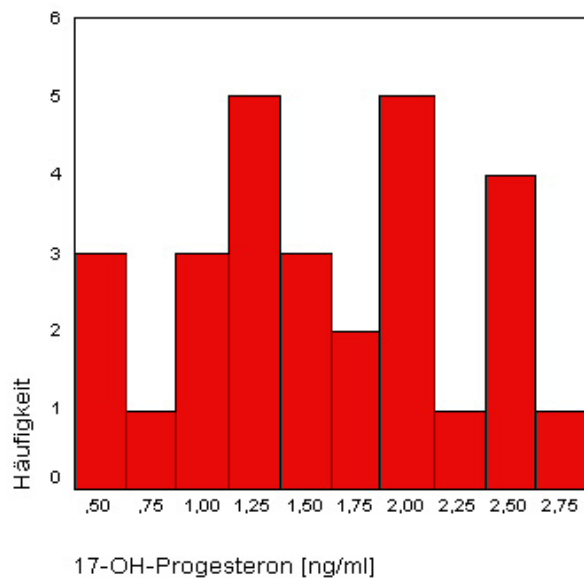
**Tab. 8** 17 $\alpha$ -OHP und Androstendion Serumkonzentrationen von AMN-Patienten mit und ohne Hypokortisolismus sowie in der Kontrollgruppe. Der Vergleich zwischen beiden Patientengruppen zeigt signifikant niedrigere Androstendionkonzentrationen bei den AMN-Patienten mit Hypokortisolismus im Vergleich zu Patienten ohne Hypokortisolismus und zur Kontrollgruppe (\*  $p < 0,01$ , Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test).

Hormon [ng/ml]	gesunde Männer (n=95)	Pat. ohne Hypokortisolismus (n=34)	Pat. mit Hypokortisolismus (n=29)
17 $\alpha$ -OHP	1,19 $\pm$ 0,08	2,0 $\pm$ 0,2	1,57 $\pm$ 0,12
Androstendion	1,87 $\pm$ 0,08	1,65 $\pm$ 0,2	0,87 $\pm$ 0,19*

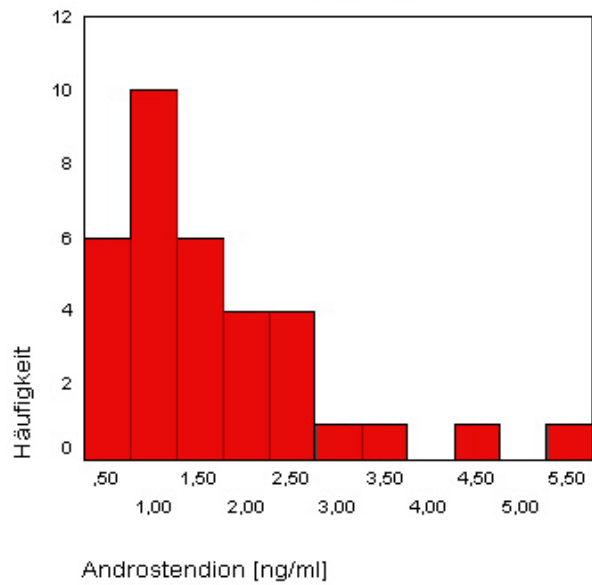
In den nachfolgenden Abbildungen 19-22 ist die Häufigkeitsverteilung der Hormonkonzentrationen bei den beiden Patientengruppen als Histogramm dargestellt.



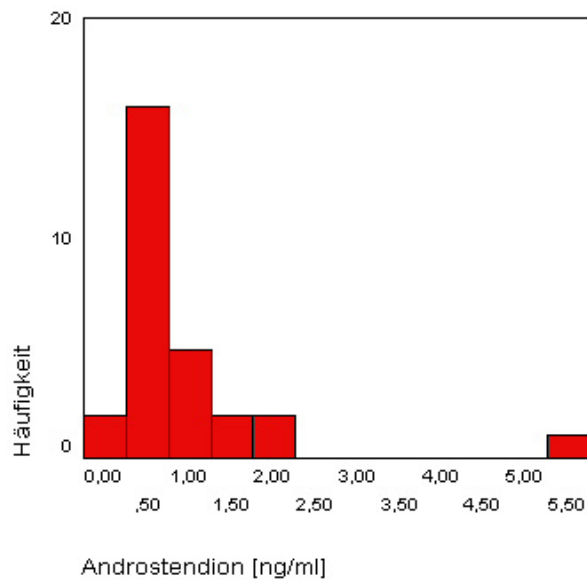
**Abb. 19** Häufigkeitsverteilung der  $17\alpha$ -OHP Konzentrationen bei Patienten ohne Hypokortisolismus (n=34)



**Abb. 20** Häufigkeitsverteilung der  $17\alpha$ -OHP Konzentrationen bei Patienten mit Hypokortisolismus (n=29)



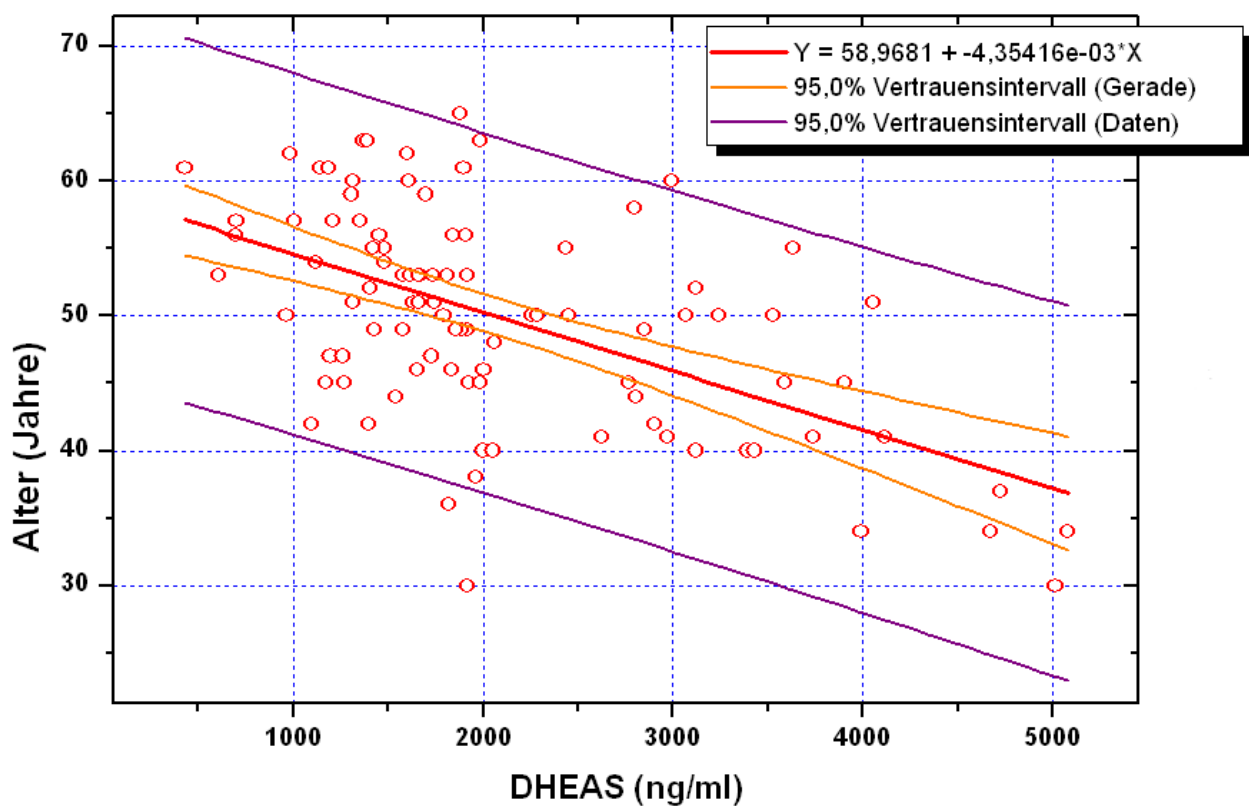
**Abb. 21** Häufigkeitsverteilung der Androstendionkonzentration bei den AMN-Patienten ohne Hypokortisolismus (n=34).



**Abb. 22** Häufigkeitsverteilung der Androstendionkonzentration bei den AMN-Patienten mit Hypokortisolismus (n=29).

### 3.2.2 Dehydroepiandrosteronsulfat

Die DHEAS Konzentrationen im Serum sind altersabhängig. Mit zunehmendem Alter nimmt die Konzentration ab. Das zeigt sich auch am Kontrollkollektiv von gesunden Männern (n=95, r=-0,54, p<0,01). Abbildung 23 zeigt die Korrelation zwischen Alter und DHEAS Konzentration.



**Abb. 23** Korrelation zwischen Alter und DHEAS Konzentration im Kontrollkollektiv gesunder Männer (n=95, r=-0,54, p<0,01)

Deshalb wurden die Patienten und die Kontrollpersonen in je zwei Untergruppen aufgeteilt (Untergruppe I: 17 - 40 Jahre, Untergruppe II: 41 - 65 Jahre).

Die DHEAS Konzentration der Kontrollgruppe betrug in Untergruppe I  $3330 \pm 355$  ng/ml (Alter  $36,4 \pm 1,0$  Jahre [MW  $\pm$  SEM], n=13) und in Untergruppe II  $1928 \pm 93$  ng/ml (Alter:  $51,9 \pm 0,7$  Jahre [MW  $\pm$  SEM], n=82) (Tabelle 9).

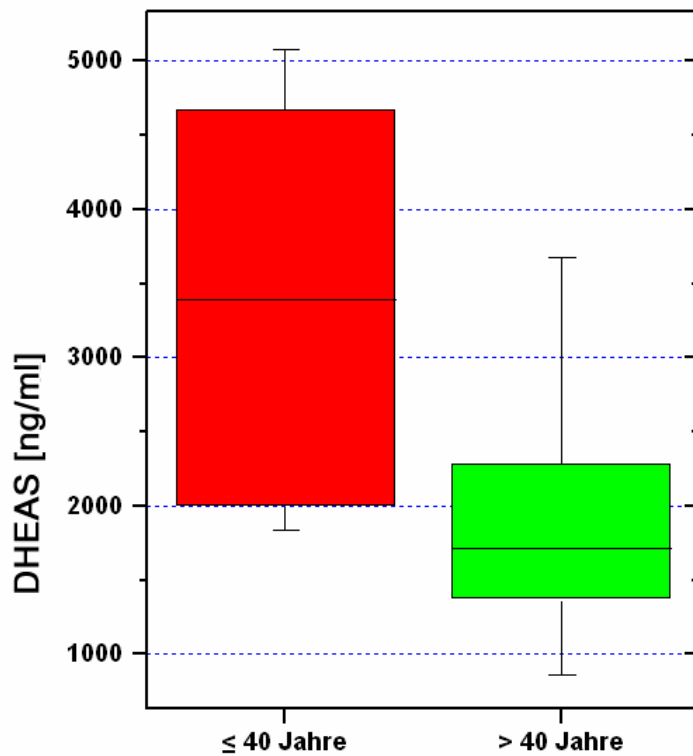
Die DHEAS Konzentrationen der AMN-Patienten ohne Hypokortikolismus betrug in Untergruppe I  $1610 \pm 307$  ng/ml (Alter:  $33 \pm 1,32$  Jahre [MW  $\pm$  SEM]; n=15) und in Untergruppe II  $796 \pm 104$  ng/ml (Alter:  $48 \pm 1,71$  Jahre [MW  $\pm$  SEM], n=19).

Bei den Patienten mit Hypokortisolismus betrug die DHEAS Konzentration in Untergruppe I  $703 \pm 211$  ng/ml (Alter:  $29,9 \pm 1,7$  Jahre [MW  $\pm$  SEM], n=21) und in Untergruppe II  $355 \pm 107$  ng/ml (Alter:  $50 \pm 3,2$  Jahre [MW  $\pm$  SEM], n=8) Die DHEAS Konzentrationen waren in beiden Untergruppen signifikant niedriger als in den Untergruppen der Kontrollgruppe ( $p < 0,01$ ) (Tabelle 9). Außerdem waren die DHEAS Konzentrationen der AMN-Patienten mit Hypokortisolismus signifikant niedriger als die der AMN-Patienten ohne Hypokortikolismus ( $p < 0,01$ ).

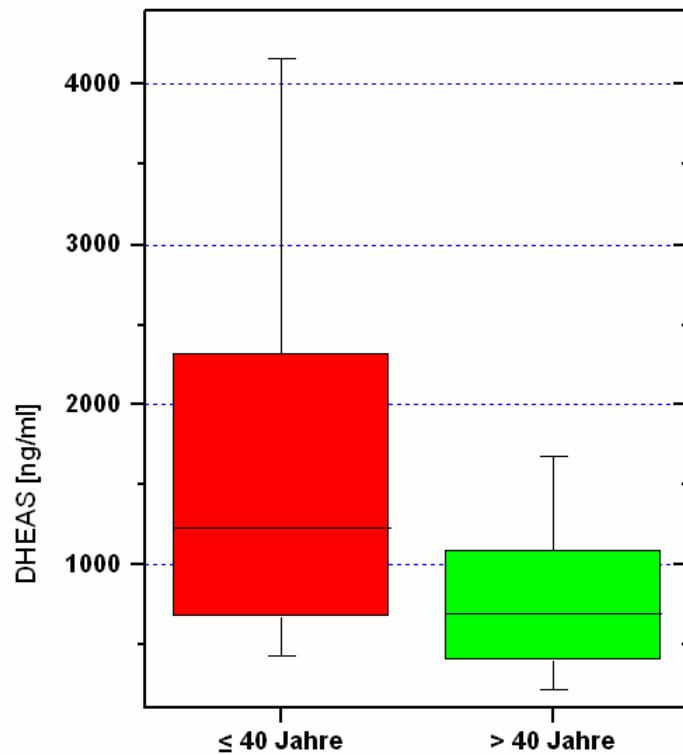
**Tab. 9** DHEAS Serumkonzentrationen von AMN-Patienten mit und ohne Hypokortisolismus und der Kontrollgruppe aus gesunden Männern. Die Gruppen wurden in zwei altersabhängige Untergruppen geteilt. Die DHEAS Konzentrationen bei den AMN-Patienten mit und ohne Hypokortisolismus waren signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (\* $p < 0,01$ , Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test). Außerdem waren die DHEAS Konzentrationen bei den Patienten mit Hypokortisolismus signifikant niedriger als bei den Patienten ohne Hypokortisolismus. (\* $p < 0,01$ , Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test).

Hormon [ng/ml]	gesunde Männer	Patienten ohne Hypokortisolismus	Patienten mit Hypokortisolismus
DHEAS ≤ 40 Jahre	3330 ± 355 (n=13)	1610 ± 307* (n=15)	703 ± 211* (n=21)
DHEAS > 40 Jahre	1928 ± 93 (n=82)	796 ± 104* (n=19)	355 ± 107* (n=8)

In den Abbildungen 24-26 sind die DHEAS Konzentrationen bei den Patienten und der Kontrollgruppe als Box- und Whisker Plot dargestellt.

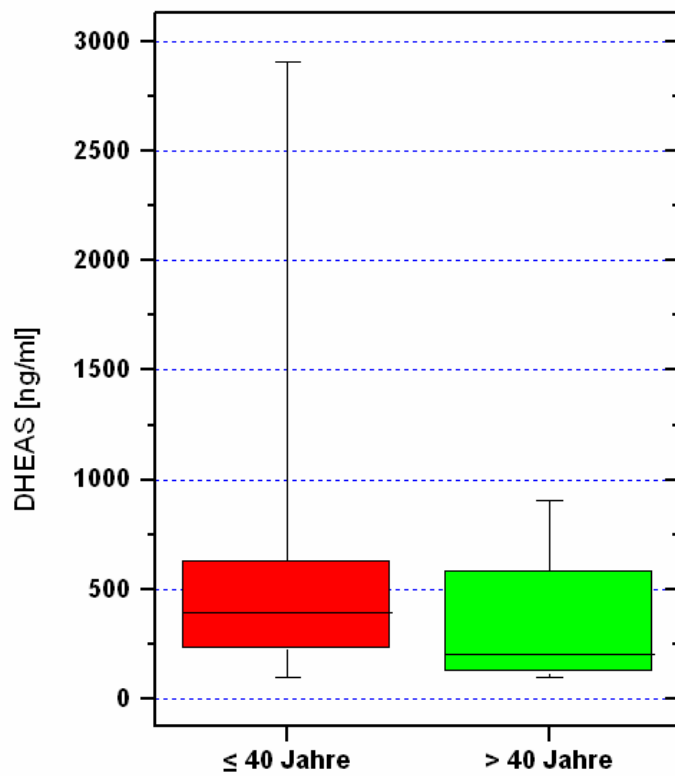


**Abb. 24** DHEAS Konzentrationen im Kontrollkollektiv von gesunden Männern, Untergruppe I  $\leq 40$  Jahre (n=13), Untergruppe II  $> 40$  Jahre (n=82). Die Werte repräsentieren den Median sowie die 25. und 75. Perzentile (Boxes) und die 5. und 95. Perzentile (Whiskers).



**Abb. 25** DHEAS Konzentrationen der AMN-Patienten ohne Hypokortisolismus, Untergruppe I  $\leq 40$  Jahre (n=15), Untergruppe II  $> 40$  Jahre (n=19). Die Werte repräsentieren den Median sowie die 25. und 75. Perzentile (Boxes) und die 5. und 95. Perzentile (Whiskers).





**Abb. 26** DHEAS Konzentrationen der AMN-Patienten mit Hypokortisolismus, Untergruppe I  $\leq 40$  Jahre (n=21), Untergruppe II  $> 40$  Jahre (n=8). Die Werte repräsentieren den Median sowie die 25. und 75. Perzentile (Boxes) und die 5. und 95. Perzentile (Whiskers).

#### 4. Diskussion

Fast zwei Drittel aller Patienten mit Adrenomyeloneuropathie leiden an einer Nebenniereninsuffizienz unterschiedlichen Ausmaßes. Klinisch imponiert ein Hypokortikolismus, der sich laborchemisch durch erhöhte ACTH-Konzentrationen diagnostizieren lässt. Weitere laborchemische Parameter der Nebennierenfunktion werden derzeit nur selten zur Diagnose hinzugezogen. Es gibt eine Fallbeschreibung zu einem 41-jährigen AMN Patienten in einem frühen Krankheitsstadium, bei dem erhöhte Konzentrationen von basalem Plasma ACTH, 11-Desoxykortisol, 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron und Progesteron festgestellt wurden (Allen et al., 1982). Später berichtete eine andere Arbeitsgruppe über subnormale DHEAS-Serumkonzentrationen bei 10 von 14 erwachsenen ALD Patienten und lieferte damit Hinweise für eine reduzierte adrenale Androgensynthese (Korenke et al., 1997). DHEAS ist beim Menschen das in der höchsten Konzentration sezernierte adrenale Steroid (Rook et al., 1994). Die Konzentration der zirkulierenden adrenalen Steroide zeigt Tab. 9.

**Tab. 9** Konzentrationen der zirkulierenden Steroide im Serum

Hormon	Konzentration [ng/ml]
DHEAS	1000 - 6000
Testosteron	3 - 10
Estradiol	0,01 – 0,4
Kortisol	80 - 250
Aldosteron	0,03 – 0,15

Einer dieser 10 Patienten hatte auch subnormale Testosteronkonzentrationen im Serum (Korenke et al., 1997).

In einer kürzlich durchgeführten Studie wurden 21 Männer mit AMN untersucht und bei allen waren die DHEAS-Konzentrationen im Serum subnormal (Assies et al., 1998). Auch bei Patienten, deren Kortisol- und ACTH Konzentrationen noch im Normalbereich lagen, fanden sich sehr niedrige DHEAS-Konzentrationen. Eine Ursache dieser niedrigen Werte ist bisher nicht bekannt.

Das ALD-Gen (ABCD1) kodiert das Adenoleukodystrophieprotein, das große Homologie mit anderen Mitgliedern der ATP-binding-Cassette-Familie von Membrantransportern aufweist (Mosser et al., 1993). Missense-Mutationen in der ATP-Bindungsfalte führen zu einer Dysfunktion der ATPase. ALD-Genmutationen verändern die peroxismale Transportfunktion und können ALD hervorrufen (Gaertner et al., 2002). Die ALDP-Expression korreliert mit den pathologischen Veränderungen, die man in der Nebenniere, den Leydig-Zellen und den Oligodendrozyten im zentralen Nervensystem findet (Dubois-Dalcq et al., 1999). Proinflammatorische Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) sind ebenfalls bei ALD-Patienten erhöht und möglicherweise an der Pathophysiologie der Krankheit beteiligt. Sie können die entzündlichen Veränderungen im zentralen Nervensystem vorantreiben (Di Biase et al., 2001) und haben wahrscheinlich direkten und differenzierten Einfluss auf die Steroidsynthese der Nebennierenrinde (Judd et al., 2000).

Die Nebennierenrinde besteht aus drei konzentrischen Zonen: Die äußere Zona glomerulosa, die mittlere Zona fasciculata und die innen liegende Zona reticularis. Diese strukturellen Zonen entsprechen in etwa der Biosynthese der verschiedenen Steroide. Die Zona glomerulosa und die äußerste Schicht der Zona fasciculata synthetisieren das wichtige Mineralokortikoid Aldosteron. Die Zona fasciculata und, weniger bedeutend, die Zona reticularis synthetisieren Kortisol. DHEA und weitere Nebennierenandrogene und Östrogene werden ebenfalls von der Zona fasciculata und der Zona reticularis synthetisiert (Orth et al., 1998). Die Sulfatierung findet ausschließlich in der Zona reticularis statt (Parker, 1999).

Während des Alterungsprozesses bei Männern treten in der Nebennierenrinde Veränderungen auf, die zu einer Verkleinerung der Zona reticularis und einer relativen Vergrößerung der äußeren kortikalen Zonen führen. Eine Reduzierung in der Masse der Zona reticularis ist möglicherweise für das kontinuierliche Sinken der DHEA- und

DHEAS-Konzentrationen nach dem 35. Lebensjahr bis hin zu den niedrigen Konzentrationen, die man im Alter bei Männern findet [Adrenopause], verantwortlich (Parker et al., 1997, Sulcova et al., 1997). Allerdings ist der Mechanismus, der zu diesen Veränderungen der DHEA- und DHEAS-Produktion führt, weiterhin unbekannt (Parker, 1999; Assies et al., 2003).

Histopathologische Untersuchungen der Nebennierenrinde von ALD-Patienten zeigen aufgeblähte adrenokortikale Zellen, Lamellenansammlungen, lamelläre Lipidprofile und feine Lipidspalten, die auf Doppelschichten der VLCFAs hinweisen (Powers et al., 1980). In der Zona fasciculata und der Zona reticularis sind die histologischen und ultrastrukturellen Läsionen deutlicher als in der Zona glomerulosa, sogar bei Patienten ohne klinischen oder laborchemischen Nachweis (einschließlich Stimulationstest mit ACTH) eines Hypokortisolismus. Allerdings geht man von einer engen Korrelation zwischen der Ansammlung von VLCFAs, den histopathologischen Veränderungen und dem klinischen oder laborchemischen Nachweis des Hypokortisolismus aus (Powers, 1985; Whitcomb et al., 1988).

In unseren Untersuchungen fanden wir bei allen AMN-Patienten mit Hypokortisolismus als Indikator der Nebenniereninsuffizienz niedrige oder subnormale Androstendionkonzentrationen im Serum. Auch die DHEAS-Konzentrationen im Serum waren signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse korrelieren mit den histopathologischen Befunden, die man bei ALD-Patienten in der Nebenniere findet. Es zeigen sich deutlichere zelluläre Schäden in der Zona reticularis und der Zona fasciculata – also den Bereichen, in denen DHEAS, Androstendion und Kortisol produziert werden.  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron, ein Androgen, das anscheinend nicht hauptsächlich in der Zona reticularis produziert wird, lag bei den Patienten im Normalbereich. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zur Produktion von  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron und Androstendion bei Patienten mit AMN/ALD gibt es unseres Wissens bisher nicht.

Bei der Biosynthese von Androstendion spielt auch der Hoden eine Rolle. In der Tat stellte man bei AMN-Patienten histopathologische Läsionen der Leydig-Zellen, des endoplasmatischen Retikulums, der Sertoli-Zellen und der Keimzellen fest (Powers und Schaumburg, 1981). Jüngere Untersuchungen zeigten bei AMN-Patienten, unabhängig

von deren adrenokortikalen Status, eine gestörte, jedoch subklinische und kompensierte Leydig-Zellfunktion und/oder eine Beeinträchtigung der Spermatogenese (Assies et al., 1997, Brennemann et al., 1997). Daraus schließen wir, dass die Androstendionverminderung bei Patienten mit Hypokortisolismus weniger auf eine testikuläre als auf eine adrenokortikale Dysfunktion zurückzuführen ist.

Bei allen AMN-Patienten, ob mit oder ohne Nebenniereninsuffizienz, waren die DHEAS-Konzentrationen im Serum niedrig. Demzufolge weisen niedrige DHEAS-Konzentrationen möglicherweise auf eine Störung der Nebennierenfunktion bei AMN-Patienten mit ansonsten normaler Kortisolsekretion hin. Physiologisch sinkt der DHEAS Spiegel mit zunehmendem Alter (Elmlinger et al., 2003), was zu der Hypothese führt, dass sinkende DHEAS-Konzentrationen altersbezogene Prozesse beeinflussen. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang, dass bei AMN Patienten eine androgene Alopezie häufiger und früher als bei gleichaltrigen Kontrollpersonen auftritt (König et al., 2000).

ALD ist eine peroxisomale Krankheit und bei Ratten löst DHEA eine peroxisomale Proliferation und die Expression von am Fettstoffwechsel beteiligten Enzymen wie auch der VLC-Acyl-CoA-Synthetase aus (Depreter et al., 2002). Damit würde DHEA zu einem möglichen Therapieansatz bei AMN/ALD. Beim sich normal entwickelnden Fötus sezerniert der adrenale Cortex hohe Konzentrationen an DHEA, wohingegen sich beim Fötus mit ALD pathologische Veränderungen wie polarisierende Einschlüsse und Aceton-unlösliche Fette zeigen (Depreter et al., 2003). Das führte zu der Hypothese, dass DHEA ein wichtiger endogener Mediator für die Entwicklung einer normal funktionierenden Peroxisomenpopulation ist. Auch wenn bei der ALD die Mutation im ALDP-Gen gefunden wurde, ist es die VLC-Acyl-CoA-Synthetase, die funktionell defekt ist. Da die VLC-Acyl-CoA-Synthetase offensichtlich durch DHEA hochreguliert werden kann, könnte diese Hochregulation die Funktion dieses Enzyms bei Patienten mit ALD verbessern. Da man bei Patienten mit ALD noch eine verbleibende residuale  $\beta$ -Oxidationskapazität von ca. 20% findet, sollte eine Hochregulation dieser Restaktivität möglich sein (Singh et al., 1984a; Singh et al., 1984b; Singh et al., 1998).

DHEA und DHEAS scheinen beim Menschen eine wichtige Bedeutung für das zentrale Nervensystem zu haben. Baulieu beobachtete, dass DHEAS in den Gliazellen von

Nagetieren synthetisiert wird (Baulieu, 1991). DHEAS wirkt in niedrigen micromolaren Konzentrationen als Gammaaminobuttersäure A ( $\text{GABA}_A$ )-Rezeptor-Antagonist und steigert die neuronale Exzitabilität (Majewska et al., 1990; Baulieu, 1999). Möglicherweise spielen DHEA und DHEAS eine wichtige Rolle in der Modulation der Sekretion von Neuropeptiden und beeinflussen kognitive Prozesse (Baulieu und Robel, 1996, Yamamoto et al., 1998; Hansen et al., 1999; Stoffel-Wagner, 2001; Stoffel-Wagner, 2003). Niedrige DHEA-Konzentrationen scheinen eine Rolle bei inflammatorischen Erkrankungen des ZNS zu spielen (Rook et al., 1994). Bei der ALD ist die Beteiligung des ZNS durch eine inflammatorische Demyelinisierung der cerebralen und cerebellären weißen Substanz charakterisiert. Zudem wurde nachgewiesen, dass DHEA die Produktion von Zytokinen wie dem Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  ( $\text{TNF}\alpha$ ) und Interleukin-6 (IL-6) in Astrozyten selektiv hemmt (Kipper-Galperin et al., 1999). Vielleicht kann DHEA die Zytokine, die an der Demyelinisierung im ZNS von ALD Patienten beteiligt sind, in ihrer Konzentration vermindern.

Einige Studien untersuchten den Nutzen einer Substitutionstherapie mit DHEA. Ihre Resultate waren uneinheitlich. Bei gesunden Probanden verbesserte eine Substitution mit 50 mg DHEAS pro Tag über einen kurzen Zeitraum von zwei Wochen weder das Wohlbefinden noch die kognitive Leistung (Wolf et al., 1997). In einer anderen Studie wurden prämenopausale Frauen mit Nebenniereninsuffizienz und nachgewiesenem Mangel an DHEA für einen Zeitraum von vier Monaten substituiert (Arlt et al., 1999). Die Autoren fanden eine signifikante Verbesserung des Wohlbefindens und des Erlebens der Sexualität. Eine andere Arbeitsgruppe substituierte perimenopausale Frauen über einen Zeitraum von drei Monaten und konnte keine Verbesserung des Wohlbefindens feststellen (Barnhart et al., 1999). Unseres Wissens existiert nur eine randomisierte Doppelblind-Studie zur DHEA-Substitution bei jungen Männern mit AMN und/oder Nebenniereninsuffizienz, die über einen Zeitraum von drei Monaten durchgeführt wurde (Assies et al., 2003). Einige dieser Patienten berichteten von einer spontanen Verbesserung im generellen Wohlbefinden und der Erinnerungsfähigkeit. Leider wurden in der Studie keine validen neuropsychologischen Tests durchgeführt, die dies objektivieren könnten. Es wurden keine Veränderungen in den gesättigten VLCFAs im Plasma und bei den Erythrozyten festgestellt, wohl aber ein signifikantes Absinken der gesättigten (C16:0 und C18:0) und einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren vom

$\omega$ -6 und  $\omega$ -9-Typ in Erythrocyten und Plasma. Das Fehlen eines signifikanten Abfalls der VLCFA-Konzentrationen erklären die Autoren damit, dass die mögliche Proliferation der Peroxisomen durch DHEA den zugrunde liegenden Defekt bei der ALD noch nicht vollständig korrigiert, da der Transport der VLCFA in die Peroxisomen zur nachfolgenden  $\beta$ -Oxidation nach wie vor gestört ist. Das signifikante Abfallen der gesättigten (C16:0 und C18:0) und einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren vom  $\omega$ -6 und  $\omega$ -9-Typ führen die Autoren auf die möglichen Effekte von DHEA auf Enzyme, die an der Synthese und Oxidation von Fettsäuren im endoplasmatischen Retikulum beteiligt sind, zurück.

Die Studien zeigen, dass bei Patientengruppen mit einem nachgewiesenen Mangel an DHEA eine Substitutionstherapie mit DHEA den neurogenerativen Prozess beeinflussen und eine heilsame Wirkung auf das Wohlbefinden haben kann.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Serumkonzentrationen von Androstendion und DHEAS sensitive Marker der Nebennierenfunktion bei Patienten mit Adrenomyeloneuropathie sind. Außerdem zeigen unsere Ergebnisse eine altersabhängige Verringerung von DHEAS im Serum von AMN Patienten ohne Nebenniereninsuffizienz, die sich signifikant von gesunden Kontrollpersonen unterscheidet. Eine Substitutionstherapie mit DHEA scheint ein hoffnungsvoller Ansatz zur Verbesserung des Wohlbefindens bei den Patienten zu sein. Allerdings sollten weitere Langzeituntersuchungen zu klinischen Auswirkungen durchgeführt werden. Dabei sollten validierte neuropsychologische Tests zum Einsatz kommen.

## 5. Zusammenfassung

Adrenoleukodystrophie (ALD) und die adulte Variante Adrenomyeloneuropathie (AMN) sind X-chromosomal gebundene Krankheitsbilder, die mit einem Defekt in der peroxisomalen Degradation der überlangkettigen gesättigten Fettsäuren (VLCFA) einhergehen. Dies führt zu einer Ansammlung dieser VLCFAs im Myelin des zentralen und peripheren Nervensystems, in der Nebennierenrinde und in den Hoden. Nebenniereninsuffizienz mit den Anzeichen eines klinischen Hypokortisolismus tritt bei etwa zwei Drittel der Patienten mit AMN auf. Wir untersuchten die zirkulierenden Nebennierenrindenhormone  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron ( $17\alpha$ -OHP), Androstendion und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) bei 63 männlichen Patienten mit AMN (Alter 17-65 Jahre). Als Kontrollgruppe dienten 95 gesunde Männer im Alter von 30 bis 65 Jahren. 34 Personen aus der Patientengruppe hatten nur eine neurologische Symptomatik ohne Hypokortisolismus. Bei 29 Patienten fanden wir den Phänotyp neurologische Symptomatik mit zusätzlichem Hypokortisolismus oder den Phänotyp Hypokortisolismus ohne neurologische Symptomatik. Bei allen Patienten lagen die  $17\alpha$ -OHP Konzentrationen im Referenzbereich gesunder Männer und es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten ohne oder mit Hypokortisolismus ( $2\pm 0,2$  ng/ml bzw.  $1,57\pm 0,12$  ng/ml). Bei den Patienten mit Hypokortisolismus war die Androstendionkonzentration signifikant niedriger als bei den Patienten ohne Hypokortisolismus ( $0,87\pm 0,19$  ng/ml vs.  $1,65\pm 0,2$  ng/ml,  $p<0,01$ ). Da die DHEAS-Serumkonzentrationen altersabhängig sind, wurden die Patientengruppen in je zwei Untergruppen (Untergruppe I: 17-40 Jahre alt, Untergruppe II: 41-65 Jahre alt) unterteilt. Die DHEAS-Konzentration der Patienten ohne Hypokortisolismus (Untergruppe I:  $1610\pm 307$  ng/ml,  $n=15$ ; Untergruppe II:  $796\pm 104$  ng/ml,  $n=19$ ;) und der Patienten mit Hypokortisolismus (Untergruppe I:  $703\pm 211$  ng/ml,  $n=21$ , Untergruppe II:  $355\pm 107$  ng/ml,  $n=8$ ) waren signifikant niedriger ( $p<0,01$ ) als in den Kontrollgruppen mit gesunden Männern (Untergruppe I:  $3330\pm 355$  ng/ml; Untergruppe II:  $1928\pm 93$  ng/ml). Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die Serumkonzentrationen von Androstendion und DHEAS bei allen Patienten mit AMN subnormal sind und damit sensitive Marker der Nebennierenfunktion bei Adrenomyeloneuropathie darstellen.



## 6. Literaturverzeichnis

Adams RD, Kubik CS, The morbid anatomy of the demyelinating diseases. Am J Med 1952, 12: 510–546

Allen JP, Kepic T, Garwacki D, Yunus M, Adrenal defect in adrenomyelodystrophy. South Med J 1982, 75: 877-879

Allolio B, Rosenthal C, Schulte HM, Überwachung der Substitutionstherapie bei Niereninsuffizienz. In: Moderne Diagnostik und therapeutische Strategien bei Nebennierenerkrankungen. Allolio B, Schulte HM (Hrsg). Stuttgart, New York: Schattauer, 1990: 236-246

Arlt W, Justl HG, Callies F, Reincke M, Hubler D, Oettel M, Ernst M, Schulte HM, Allolio B, Oral dehydroepiandrosterone for adrenal androgen replacement: pharmacokinetics and peripheral conversion to androgens and estrogens in young healthy females after dexamethasone suppression. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1998, 83: 1928–1934

Arlt W, Callies F, Van Vlijmen JC, Koehler I, Reincke M, Bidlingmaier M, Huebler D, Oettel M, Ernst M, Schulte HM, Allolio B, Dehydroepiandrosterone replacement in women with adrenal insufficiency. N Engl J Med 1999, 341: 1013-1020

Arlt W, Haas J, Callies F, Reincke M, Hubler D, Oettel M, Ernst M, Schulte HM, Allolio B, Biotransformation of oral dehydroepiandrosterone in elderly men: significant increase in circulating estrogens. J Clin Endocrinol Metab 1999b, 84: 2170–2176

Assies J, Gooren LJG, Van Geel B, Barth PG, Signs of testicular insufficiency in adrenomyeloneuropathy and neurological asymptomatic X-linked adrenoleukodystrophy: a retrospective study. *Int J Androl* 1997, 20: 315-321

Assies J, Van Geel B, Barth P, Low dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) levels in X-linked adrenoleukodystrophy. *Clin Endocrinol* 1998, 49: 691-693

Assies J, Haverkort EB, Lieverse R, Vreken P, Effect of dehydroepandrosterone supplementation on fatty acid and hormone levels in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Clin Endocrinol* 2003, 59: 459-466

Aubourg P, Blanche S, Jambaque I, Rocchiccioli F, Kalifa G, Naud-Saudreau C, Rolland MO, Debre M, Chaussain JL, Griscelli C, Reversal of early neurologic and neuroradiologic manifestations of X-linked adrenoleukodystrophy by bone marrow. *N Engl J Med* 1990, 322: 1860–1866

Barnhart KT, Freeman E, Grisso JA, Rader DJ, Sammel M, Kapoor S, Nestler JE, The effect of dehydroepiandrosterone supplementation to symptomatic perimenopausal women on serum endocrine profiles, lipid parameters, and health-related quality of life. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84: 3896-3902

Baulieu EE, Neurosteroids: a new function in the brain. *Biol Cell* 1991, 71: 3-10

Baulieu EE, Robel P, Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulphate as neuroactive neurosteroids. *J Endocrinol* 1996, 150: 221-239

Baulieu EE, Neuroactive neurosteroids: dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulphate. *Acta Paediatr Suppl* 1999, 433: 78-80

Blaw ME, Melanodermic type leucodystrophy (adrenoleukodystrophy). In: Vinken PJ, Bruyn GW, eds. Handbook of clinical neurology, Vol. 10. Amsterdam: North Holland Publishing Company 1970: 128–133

Blaw ME, Osterberg K, Kozak P, Nelson E, Sudanophilic leukodystrophy and adrenal cortical atrophy. Arch Neurol 1964, 11: 626–631

Blevins LS, Shankroff JJ, Moser HW, Landenson PW, Elevated plasma adrenocorticotropin concentration as evidence of limited adrenocortical reserve in patients with adrenomyeloneuropathy. J Clin Endocrinol Metab 1994, 78: 261-265

Breckwoldt M, Neumann F, Bräuer H, Exempla endokrinologica: Bildatlas zur Physiologie und Morphologie des endokrinen Systems. Med. Service, München 1991: 59-60

Brennemann W, Köhler W, Zierz S, Klingmüller D, Occurrence of adrenocortical insufficiency in adrenomyeloneuropathy. Neurology 1996, 47: 605

Brennemann W, Köhler W, Zierz S, Klingmüller D, Testicular dysfunction in adrenomyeloneuropathy. Eur J Endocrinol 1997, 137: 34-39

Brown FR, Van-Duyn MA, Moser AB, Schulman JD, Rizzo WB, Snyder RD, Murphy JV, Kamoshita S, Migeon CJ, Moser HW, Adrenoleukodystrophy: effects of dietary restriction of very long chain fatty acids and of administration of carnitine and clofibrate on clinical status and plasma fatty acids. The John Hopkins Medical Journal 1982, 151: 164-172

Bruhn HD, Koberstein R, Quantitative Analyseverfahren. In: Bruhn HD, Fölsch UR, Hrsg. Lehrbuch der Labormedizin. Stuttgart, New York: Schattauer 1999: 46-48

Bruhn HD, Koberstein R, Quantitative Analyseverfahren. In: Bruhn HD, Fölsch UR, Hrsg. Lehrbuch der Labormedizin. Stuttgart, New York: Schattauer 1999b: 52-54

Budka H, Sluga E, Heiss WD, Spastic paraplegia associated with Addison's disease: adult variant of adreno-leukodystrophy. *J Neurol* 1976, 213: 237–250

Depreter M, Vandesompele J, Espeel M, Speleman F, Roels F, Modulation of the peroxisomal gene expression pattern by dehydroepiandrosterone and vitamin D: therapeutic implications. *J Endocrinol* 2002, 175: 779-792

Depreter M, Espeel M, Roels F, Human peroxisomal disorders. *Microsc Res Tech* 2003, 61: 203-223

Di Biase A, Merendino N, Avellino C, Cappa M, Savati S, Th 1 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in X-linked adrenoleukodystrophy. *J Neurol Sci* 2001, 182: 161-165

Dubois-Dalcq M, Feigenbaum V, Aubourg P, The neurobiology of X-linked adrenoleukodystrophy, a demyelinating peroxisomal disorder. *Trends Neurosci* 1999, 22: 4-12

Elmlinger MW, Dengler T, Weinstock C, Kuehnel W, Endocrine alterations in the aging male. *Clin Chem Lab Med* 2003, 41: 934-941

Fanconi A, Prader A, Isler W, Luthy F, Siebenmann R, Morbus Addison mit Hirnsklerose im Kindesalter – Ein hereditäres Syndrom mit X-chromosomaler Vererbung? *Helv Paediat Acta* 1963, 18: 480–501

Flynn MA, Weaver-Osterholtz D, Sharpe-Timms KL, Dehydroepiandrosterone replacement therapy in aging humans. *The Journal of Clinical Endocrinological and Metabolism* 1999, 84: 1527–1533

Gaertner J, Dehmel T, Klusmann A, Roerig P, Functional characterization of the adrenoleukodystrophy protein (ALDP) and disease pathogenesis. *Endocr Res* 2002, 28: 741-748

Goldfischer S, Moore CL, Johnson AB, Spiro AJ, Valsamis MP, Wisniewski HK, Ritch RH, Norton WT, Rapin I, Gartner ML, Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome. *Science* 1973, 182: 62–4

Griffin JW, Goren E, Schaumburg H, Engel WK, Loraux L, Adrenomyeloneuropathy: a probable variant of adrenoleukodystrophy. I. Clinical and endocrinological aspects. *Neurology* 1977, 27: 1107-1113

Haberfeld W, Spieler F, Zur diffusen Hirn-Rückenmarksklerose im Kindesalter. *Dt Z Nervheilk* 1910, 40: 436–463

Hansen SL, Fjalland B, Jackson MB, Differential blockade of gamma-aminobutyric acid type A receptor by the neuroactive steroid dehydroepiandrosterone sulphate in posterior and intermediate pituitary. *Mol Pharmacol* 1999, 55: 489-496

Heim P, Claussen M, Hoffmann B, Conzelmann E, Gärtner J, Harzer K, Hunnemann DH, Köhler W, Kurlemann G, Kohlschütter A, Leukodystrophy incidence in Germany. *Am J Med Genet* 1997, 71: 475-478

Higgins CF, ABC transporters: from microorganisms to man. [Review]. *Annu Rev Cell Biol* 1992, 8: 67-113

Hoefnagel D, Van Den Noort S, Ingbar SH, Diffuse cerebral sclerosis with endocrine abnormalities in young males. *Brain* 1962, 85: 553–568

Hunt PJ, Gurnell EM, Huppert FA, Richards C, Prevost AT, Wass JA, Herbert J, Chatterjee VK, Improvement in mood and fatigue following DHEA replacement in a randomised double-blind trial in Addison's disease. *The Journal of Clinical Endocrinological and Metabolism* 2000, 85: 4650–4656

Hunneman DH, Hanefeld F, Diagnose von peroxisomalen Erkrankungen – Erfahrungen mit einer empfindlichen massenfragmentografischen Bestimmung der überlangkettigen Fettsäuren und der Phytansäure im Plasma. *Monatsschrift der Kinderheilkunde* 1988, 136: 529

Igarashi M, Schaumburg HH, Powers J, Kishimoto Y, Kolodny E, Suzuki K, Fatty acid abnormality in adrenoleukodystrophy. *J Neurochem* 1976, 26: 851–860

Judd AM, Call GB, Barney M, McIlmoil CJ, Balls AG, Adams A, Oliveira GK, Possible function of IL-6 and TNF as intraadrenal factors in the regulation of adrenal steroid secretion. *Ann N Y Acad Sci* 2000, 917: 628-637

Kern W, Fehm HL, Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindensystem. In: Thomas L, Hrsg. Labor und Diagnose, 5. Auflage. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft: 1998: 1087-1088

Kipper-Galperin M, Galilly R, Danenberg HD, Brenner T, Dehydroepiandrosterone selectively inhibits production of tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-6 in astrocytes. *Int J Dev Neurosci* 1999, 17: 765-775

Kishimoto Y, Moser HW, Kawamura N, Platt M, Pallante B, Fenselau C, Adrenoleukodystrophy: evidence that abnormal very long chain fatty acids of brain cholesterol esters are of exogenous origin. *Biochem Biophys Res Commun* 1980, 96: 69-76

König A, Happle R, Tichitcherina E, Schaefer JR, Sokolowski P, Köhler W, Hoffmann R, An X-linked gene involved in androgenetic alopecia: a lesson to be learned from adrenoleukodystrophy. *Dermatology* 2000, 200: 213-218

Korenke GC, Roth C, Krasemann E, Hübner M, Hunnemann DH, Hanefeld F, Variability of endocrinological dysfunction in 55 patients with x-linked adrenoleukodystrophy: clinical, laboratory and genetic findings. *Eur J Endocrinol* 1997, 137: 40-47

Krivit W, Lockman LA, Watkins PA, Hirsch J, Shapiro EG, The future for treatment by bone marrow transplantation for adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, globoid cell leukodystrophy and Hurler syndrome. *J Inherit Metab Dis* 1995, 18: 398-412

Labrie F, *Intracrinology. Molecular and Cellular Endocrinology* 1991, 78: 113-118

Lazo O, Contreras M, Hashmi M, Stanley W, Irazu C, Singh I, Peroxisomal lignoceroyl-CoA ligase deficiency in childhood adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. *Proc Natl Sci USA* 1988, 85: 7647–7651

Majewska MD, Demirgoren S, Spivak CE, London ED, The neurosteroid dehydroepiandrosterone sulphate is an allosteric antagonist of the GABA A receptor. *Brain Res* 1990, 526: 143-146

May ME, Vaughan ED, Carey RM, Adrenocortical insufficiency – clinical aspects. In: Vaughan ED, Carey RM, ED. *Adrenal disorders*, Stuttgart - New York: Thieme, 1989: 171

Migeon BR, Moser HW, Moser AB, Axelman J, Sillence D, Norum RA, Adrenoleukodystrophy: evidence for X linkage, inactivation, and selection favoring the mutant allele in heterozygous cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981, 78: 5066–5070

Molzer B, Stöckler S, Bernheimer H, Peroxisomale neurologische Erkrankungen und M. refsum: Überlangkettige Fettsäuren und Phytansäure als diagnostische Marker. *Wiener klinische Wochenschrift* 1992, 104: 665-670

Moser AB, Kreiter N, Bezman L, Lu S, Raymond GV, Naidu S, Moser HW, Plasma very long chain fatty acids in 3000 peroxisome disease patients and 29000 controls. *Annals of Neurology*. 1999, 45: 100-110

Moser HW, Moser AB, Kawamura N, Murphy J, Suzuki K, Schaumburg H, Kishimoto Y, Adrenoleukodystrophy: elevated C-26 fatty acid in cultured skin fibroblasts. *Ann Neurol* 1980, 7: 542–549



Moser HW, Moser AB, Frayer KK, Chen W, Schulman JD, O'Neill BP, Kishimoto Y, Adrenoleukodystrophy: increased plasma content of saturated very long chain fatty acids. *Neurology* 1981, 31: 1241-1249

Moser HW, Moser AE, Singh I, O'Neill BP, Adrenoleukodystrophy: Survey of 303 cases: biochemistry, diagnosis and therapy. *Ann Neurol* 1984a, 16: 628-641

Moser HW, Tutschka PJ, Brown FR 3d, Moser AE, Yeager AM, Singh I, Mark SA, Kumar AA, McDonnell JM, White CL3rd, Bone marrow transplant in adrenoleukodystrophy. *Neurology* 1984b, 34: 1410–1417

Moser HW, Moser AB, Smith KD, Bergin A, Borel J, Shankroff J, Stine OC, Merette C, Ott J, Krivit W, Shapiro E, Adrenoleukodystrophy: phenotypic variability and implications for therapy. *J Inher Metab Dis* 1992, 15: 645-664

Moser HW, Smith K, Moser AB, X-linked adrenoleukodystrophy. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of inherited disease*, 7th ed. New York, McGraw-Hill, 1995a: 2325-2349

Moser HW, Aubourg P, Comblath D, Borel J, Wu YW, Bergin N, Naidu S, Moser AB, The therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. In: Desnick RJ, ed. *Churchill Livingstone*, New York, 1995b: 111-129

Moser HW, Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain* 1997, 120: 1485-1508

Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H, Poustka AM, Mandel JL, Aubourg P, Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporter. *Nature* 1993, 361: 726-730

Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H, Poustka AM, Mandel JL, Aubourg P, Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 361: 726–30. Comment in: *Nature* 1993, 361: 682–683

Oelkers W, Diederich S, Bähr V, Diagnostik der Niereninsuffizienz In: *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 119 Jg., Nr. 15, Stuttgart - New York: Thieme, 1994: 555-559

Orentreich N, Brind JL, Rizer RL, Vogelmann JH, Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1984, 59: 551–559

Orth NO, Kovacs WJ, The adrenal cortex. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, eds. *Williams textbook of endocrinology*, 9th ed. Philadelphia, Saunders: 1998, 517-664

Pai GS, Khan M, Barbosa E, Key LL, Craver JR, Cure JK, Betros R, Singh I, Lovastatin therapy for X-linked adrenoleukodystrophy: clinical and biochemical observations on 12 patients. *Mol Gen Metab.* 2000, 69: 312-322

Parker CR, Mixon RL, Brissie RM, Grizzle WE, Aging alters zonation in the adrenal cortex of men. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82: 3898-3901

Parker CR, Dehydrepiandrosterone and dehydrepiandrosterone sulfate production in the human adrenal during development and aging. *Steroids* 1999, 64: 640-647

Poser CM, van Bogaert L, Natural history and evolution of the concept of Schilder's diffuse sclerosis. *Acta Psychiatr Neurol Scand* 1956, 31: 285–331

Poser CM, Goutieres F, Carpentier MA, Aicardi J, Schilder's myelinoclastic diffuse sclerosis. *Pediatrics* 1986, 77: 107–112

Powers JM, Schaumburg HH, The adrenal cortex in adreno-leukodystrophy. *Arch Pathol* 1973, 96: 305–10

Powers JM, Schaumburg HH, Johnson AB, Raine CS, A correlative study of the adrenal cortex in adreno-leukodystrophy - evidence for a fatal intoxication with very long chain saturated fatty acids. *Invest Cell Pathol* 1980, 3: 353-376

Powers JM, Schaumburg HH, The testis in adreno-leukodystrophy. *Am J Pathol* 1981, 102: 90-98

Powers JM, Review article: Adreno-leukodystrophy (Adreno-testiculo-leukomyelo-neuropathic-complex). *Clin Neuropathol* 1985, 4: 181-199

Rasmussen BB, Volpi E, Gore DC, Wolfe RR, Androstenedione does not stimulate muscle protein anabolism in young healthy men. *The Journal of Clinical Endocrinological and Metabolism* 2000, 85: 55–59

Reinwein D, Benker G, Nebennierenrindeninsuffizienz In: Klinische Endokrinologie und Diabetologie, Stuttgart - New York: Schattauer, 1992: 181 – 186

Rizzo WB, Watkins PA, Phillips MW, Cranin D, Campbell B, Avigan J, Adrenoleukodystrophy: oleic acid lowers fibroblast saturated C22- 26 fatty acids. Neurology 1986, 36: 357–361

Rizzo WB, Leshner RT, Odone A, Dammann AL, Craft DA, Jensen ME, Jennings SS, Davis S, Jaitly R, Sqro JA, Dietary erucic acid therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. Neurology 1989, 39: 1415-1422

Rook GA, Hernandez-Pando R, Lightman SL, Hormones peripherically activated prohormones ant the regulation of the Th1/Th2 balanace. Immunol Today, 15: 301-303

Schilder P, Zur Kenntnis der sogenannten diffusen Sklerose. Z ges Neurol Psychiat 1912, 10: 1–60

Schilder P, Zur Frage der Encephalitis Periaxialis Diffusa (Sogenannte Diffuse Sklerose). Z ges Neurol Psychiat 1913, 15: 359–376

Schilder P, Die Encephalitis periaxilis diffusa. Arch Psychiat Nervkrankh 1924, 71: 327–356

Shapiro E, Krivit W, Lockman L, Jambaque I, Peters C, Cowan M, Harris R, Blanche S, Bordigoni P, Loes d, Ziegler R, Crittenden M, Ris D, Berg B, Cox C, Moser HW, Fischer A, Aubourg P, Long term effect of bone-marrow transplantation for childhood-onset cerebral X-linked adrenoleukodystrophy. Lancet 2000, 356: 713-318

Siemerling E, Creutzfeldt HG, Bronzekrankheit und sklerosierende Encephalomyelitis. Arch Psychiat Nervkrankh 1923, 68: 217–244

Singh I, Moser AE, Moser HW, Kishimoto Y, Adrenoleukodystrophy: impaired oxidation of very long chain fatty acids in white blood cells, cultured skin fibroblasts, and amniocytes. Pediatr Res 1984a, 18: 286–290

Singh I, Moser AE, Goldfischer S, Moser HW, Lignoceric acid is oxidized in the peroxisome: implications for the Zellweger cerebrorenal syndrome and adrenoleukodystrophy. Proc Natl Acad Sci USA 1984b, 81: 4203–4207

Singh I, Pahan K, Khan M, Lovastatin and sodium phenylacetate normalize the levels of very long chain fatty acids in skin fibroblasts of X- adrenoleukodystrophy. FEBS letters 1998, 426: 342-346

Stoffel-Wagner B, Neurosteroid metabolism in the human brain. Eur J Endocrinol 2001, 145: 669-679

Stoffel-Wagner B, Neurosteroid biosynthesis in the human brain and its clinical implications. Ann NY Acad Sci 2003, 1007: 64-78

Sulcova J, Hill M, Hampl R, Starka L, Age and sex related differences in derum levels of conjugated dehydroepiandrosterone and its sulphate in normal subjects. J Endocrinol 1997, 154: 57-62

Thomas G, Frenoy N, Legrain S, Sebag-Lanoe R, Baulieu EE, Debuire B, Serum dehydroepiandrosterone sulfate levels as an individual marker. The Journal of Clinical Endocrinological and Metabolism 1994, 79: 1273–1276

Tsuji S, Suzuki T, Ariga T, Sekine M, Kuriyama M, Miyatake T, Abnormality of long-chain fatty acids in erythrocyte membrane sphingomyelin from patients with adrenoleukodystrophy. *J Neurochem* 1981, 36: 1046-1049

Uchiyama A, Aoyama T, Kamijo K, Uchida Y, Kondo N, Orii T, Hashimoto T, Molecular cloning of cDNA encoding rat very long- chain Acyl-CoA synthetase. *J Biol Chem* 1996, 271: 30360–30365

Van Geel BM, Assies J, Weverlin GJ, Barth PG, Predominance of the adrenomyeloneuropathy phenotype of X-linked adrenoleukodystrophy in the Netherlands: A survey of 30 kindreds. *Neurology* 1994, 44: 2243-2346

Van Geel BM, Assies J, Wanders RJA, Barth GP, X-linked adrenoleukodystrophy: clinical presentation, diagnosis and therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997, 63: 4-14.

Wanders RJA, van Roermund CWT, van Wijland MJA, Schutgens RBH, van den Bosch H, Schram AW, Tager JM, Direct demonstration that the deficient oxidation of very long chain fatty acids in Xlinked adrenoleukodystrophy is due to an impaired ability of peroxisomes to activate very long chain fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 1988, 153: 618–624

Whitcomb RW, Linehan WM, Knazek RA, Effects of long-chain, saturated fatty acids on membrane microviscosity and adrenocorticotropin responsiveness of human adrenocortical cells in vitro. *J Clin Invest* 1988, 81: 185-188

Wolf OT, Neumann O, Hellhammer DH, Geiben AC, Strasburger CJ, Dressendörfer RA, Pirke KM, Kirschbaum C, Effects of a two-week physiological dehydroepiandrosterone

substitution on cognitive performance and well-being in healthy elderly women and men. J Clin Endocrinol Metab 1997, 82: 2363-2367

Yamamoto T, Yamanaka T, Matsunaga T, Effects of the neurosteroid dehydroepiandrosterone sulphate on medial vestibular nucleus neurons. Acta Otolaryngol 1998, 118: 185-191