

## PDF hosted at the Radboud Repository of the Radboud University Nijmegen

The following full text is a publisher's version.

For additional information about this publication click this link.

<http://hdl.handle.net/2066/107376>

Please be advised that this information was generated on 2017-12-06 and may be subject to change.

DE SECRETIESNELHEID  
VAN CORTICOSTERON BIJ DE MENS

A.F.CASPARIE



# DE SECRETIESNELHEID VAN CORTICOSTERON BIJ DE MENS

PROMOTOR: PROF. DR. C.L.H. MAJOR

**DE SECRETIESNELHEID  
VAN CORTICOSTERON BIJ DE MENS**

**PROEFSCHRIFT**

TER VERKRIJGING VANDE GRAAD VANDOCTOR  
IN DE GENEESKUNDE  
AAN DE KATHOLIEKE UNIVERSITEIT TE NIJMEGEN,  
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS  
DR. A.Th.L.M. MERTENS,  
HOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE,  
VOLGENS BESLUIT VAN DE SENAAT  
IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN  
OP VRIJDAG 21 JUNI 1968  
DES NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

**ANTON FRANS CASPARIE**

GEBOREN TE SNEEK

1968

THOBLN OF FSET NIJMEGLN  
DRUKKERIJ - UITGLVLRIJ

Dit proefschrift werd bewerkt in de Universiteitskliniek voor Inwendige Ziekten van het St. Radboud Ziekenhuis te Nijmegen onder leiding van Dr. Th.J. Benraad en Dr. P.W.C. Kloppenborg.

De Nederlandse Organisatie voor Zuiver-Wetenschappelijk Onderzoek (Z.W.O.) verleende subsidie voor dit onderzoek.

# Inhoud

	blz.
INLEIDING . . . . .	9
HOOFDSTUK 1:	
DE BIOLOGISCHE ACTIVITEIT, DE BIOSYNTHESE ENDE STOF- WISSELING VAN CORTICOSTERON . . . . .	11
§ 1. De biologische activiteit van corticosteron . . . . .	11
§ 2. Enkele aspecten van de biosynthese van corticosteron en de plaats van dit hormon als voorloper in de biosynthese van andere steröiden . . . . .	16
§ 3. De stofwisseling van corticosteron . . . . .	19
HOOFDSTUK 2:	
DE METING VAN DE SECRETIESNELHEID VAN CORTICOSTE- RON MET BEHULP VAN EEN DUBBEL-ISOTOOPVERDUNNINGS METHODE . . . . .	27
§ 1. Inleiding . . . . .	27
§ 2. Literatuurgegevens betreffende methoden ter bepaling van de secretiesnelheid van corticosteron. . . . .	28
§ 3. Beschrijving van de eigen methode. . . . .	30
3.1. Inleiding . . . . .	30
3.2. Reagentia, materialen en apparatuur. . . . .	31
3.3. Uitvoering van de bepaling . . . . .	33
	5



§ 4. Toetsing van de methode . . . . .	38
4.1. De specificiteit van de methode. . . . .	38
4.1.1. Verantwoording van de gebruikte chromatografiesystemen . . . . .	38
4.1.2. De $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio als criterium voor de specificiteit . . . . .	40
4.1.3. De hydrolyse als criterium voor de specificiteit	43
4.2. De gevoeligheid van de methode. . . . .	45
4.3. Opbrengst van diverse stappen van de methode. . . . .	46
4.4. De nauwkeurigheid van de methode. . . . .	46
§ 5. De secretiesnelheid van corticosteron bij gehospitaliseerde patiënten . . . . .	51
§ 6. Overige methoden. . . . .	56

HOOFDSTUK 3:

DE SECRETIESNELHEID VAN CORTICOSTERON ONDER EXPERIMENTELE OMSTANDIGHEDEN . . . . .	57
§ 1. Inleiding . . . . .	57
§ 2. De invloed van ACTH op de secretiesnelheid van corticosteron. . . . .	57
2.1. Literatuurgegevens. . . . .	57
2.2. Eigen waarnemingen en commentaar . . . . .	59
§ 3. De invloed van angiotensine en van verstoringen van de natriumbalans op de secretiesnelheid van corticosteron . . . . .	62
3.1. Literatuurgegevens. . . . .	62
3.2. Eigen waarnemingen en commentaar . . . . .	68
§ 4. De invloed van verstoringen van de kaliumbalans op de secretiesnelheid van corticosteron . . . . .	72
4.1. Literatuurgegevens. . . . .	72
4.2. Eigen waarnemingen en commentaar . . . . .	74
§ 5. Samenvatting . . . . .	75

HOOFDSTUK 4:

DE SECRETIESNELHEID VAN CORTICOSTERON ONDER INVLOED VAN HEPARINE EN HEPARINOÏD . . . . .	77
§ 1. Het effect van heparine op de productie van bijnierschors-hormonen. Literatuuroverzicht . . . . .	77

1.1.	Heparine en de produktie van aldosteron door de bijnier	77
1.2.	Heparine en het renine-angiotensine-systeem . . .	78
1.3.	Het effect van heparine in vitro . . . . .	79
1.4.	Heparine en de uitscheiding van 17-hydroxycorticosteroiden en 17-ketosteroiden . . . . .	80
1.5.	Heparine en de produktie van corticosteron . . . .	81
1.6.	Effecten van kortdurende toediening van heparine . .	82
§ 2.	Eigen onderzoek en commentaar . . . . .	83
2.1.	De opzet van het onderzoek . . . . .	83
2.2.	Het effect van langdurige toediening van heparine en heparinoïd . . . . .	83
2.3.	Het effect van toediening van heparine gedurende 24 uur	90
§ 3.	Samenvatting en beschouwing . . . . .	94

HOOFDSTUK 5:

DE SECRETIESNELHEID VAN CORTICOSTERON BIJ HET SYNDROOM VAN CUSHING EN BIJ PRIMAIR HYPERALDOSTERONISME . . . . .		99
§ 1.	De secretiesnelheid van corticosteron bij het syndroom van Cushing . . . . .	99
1.1.	Inleiding . . . . .	99
1.2.	De secretiesnelheid van corticosteron bij het ectopische ACTH-syndroom . . . . .	100
1.2.1.	Literatuurgegevens . . . . .	100
1.2.2.	Eigen waarnemingen . . . . .	101
1.2.3.	De secretiesnelheid van corticosteron na acute en chronische stimulering door ACTH . . .	109
1.2.4.	Samenvatting . . . . .	112
1.3.	De secretiesnelheid van corticosteron bij het bijniercarcinoom . . . . .	112
1.3.1.	Inleiding . . . . .	112
1.3.2.	Eigen waarnemingen . . . . .	112
1.3.3.	Commentaar . . . . .	116
§ 2.	De secretiesnelheid van corticosteron bij primair hyperaldosteronisme . . . . .	118
2.1.	Literatuurgegevens . . . . .	118
2.2.	Eigen waarnemingen en commentaar . . . . .	119

SAMENVATTING . . . . .	125
SUMMARY. . . . .	129
LITERATUUR. . . . .	133

# Inleiding

Nadat in 1957 Majoor en medewerkers het natriuretische effect van heparine hadden beschreven, bleek uit nader onderzoek dat deze natriurese wordt veroorzaakt door een remming van de produktie van aldosteron. Daar vervolgens gegevens bekend werden, die het aannemelijk maakten dat heparine zijn werking uitoefent door een direct effect op de bijnier, leek het aangewezen om na te gaan of de produktie van corticosteron, de voorloper in de biosynthese van aldosteron, eveneens door heparine wordt beïnvloed. Met de voor dit onderzoek ontwikkelde dubbel-isotoopverdunningsmethode ter bepaling van de secretiesnelheid van corticosteron werd tevens onderzoek verricht naar de produktie van dit hormoon bij de mens onder verschillende experimentele omstandigheden.

Een overzicht van de literatuurgegevens wordt gevolgd door de beschrijving en verantwoording van de gebruikte methode. Vervolgens worden de regelmechanismen van de produktie van corticosteron aan de hand van de door ons verrichte waarnemingen besproken. Na vermelding van het effect van heparine op de secretiesnelheid van corticosteron volgen tenslotte de resultaten van de metingen verricht bij enkele patiënten met uiteenlopende vormen van hypercorticisme en met primair hyperaldosteronisme.



# I. De biologische activiteit, de biosynthese en de stofwisseling van corticosteron

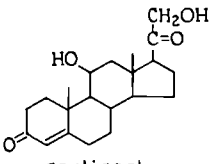
## § 1. DE BIOLOGISCHE ACTIVITEIT VAN CORTICOSTERON

Corticosteron is het eerste, biologisch actieve, bijnierschorshormon, dat in zuivere vorm uit extracten van de bijnierschors werd geïsoleerd. Reichstein en medewerkers (de Fremery c.s.-1937) beschreven de isolering ervan uit runderbijnierweefsel in 1937. Kort daarna werd door de groep van Kendall (Kendall c.s.-1937a) vermeld dat een eerder door hen beschreven stof 'compound B' (Mason c.s.-1936) niet zuiver was, maar dat de biologisch-actieve fractie identiek bleek te zijn met het corticosteron van Reichstein. De structuur van corticosteron werd in hetzelfde jaar door Kendall en medewerkers (Kendall c.s.-1937b) en door Reichstein (Reichstein-1937) opgehelderd. De structuurformule en enkele gegevens betreffende corticosteron zijn in tabel I bijeengezet.

Hoewel corticosteron het eerst geïsoleerde, biologisch actieve, corticosteroid is, heeft het weinig toepassing gevonden bij de behandeling van patiënten met bijnierinsufficiëntie. Een veel gemakkelijker te synthetiseren steroid, het desoxycorticosteron, bleek bijzonder werkzaam te zijn bij deze aandoening, zoals reeds in 1938 bleek uit waarnemingen van Simpson.

Onze kennis betreffende de biologische activiteit van het hormon is voornamelijk uit dierexperimentele onderzoeken verkregen. De meeste van deze onderzoeken, waarin de biologische activiteit werd

T a b e l 1  
Enkele gegevens betreffende corticosteron

1. Structuur	 <p style="text-align: center;">corticosteron</p>
	<p>Brutoformule <math>C_{21}H_{30}O_4</math></p> <p>Moleculair gewicht 346,49</p>
2. Synoniemen	
	<p>Corticosteron</p> <p>Compound B</p> <p>B</p> <p><math>11\beta</math>,21-dihydroxy-pregn-4-een-3,20-dion</p> <p><math>\Delta^4</math>-pregneen- <math>11\beta</math>,21-diol-3,20-dion</p>

vergeleken met die van andere corticosteroïden als cortison, desoxycorticosteron en later ook met die van aldosteron, zijn verricht bij de rat. Nu onderscheidt dit dier zich van een aantal andere diersoorten en met name ook van de mens doordat het niet in staat is cortisol te produceren. Het hiervoor noodzakelijke enzymstelsel, gewoonlijk als 17-hydroxylase aangeduid, mist de rat. Wanneer men corticosteroïden ijkt met behulp van de rat zal men zich het ontbreken van endogeen cortisol moeten realiseren. Met dit voorbehoud dient tabel 2 te worden bekeken. Het blijkt dat corticosteron een aanzienlijke glucocorticoïde activiteit bezit, echter duidelijk zwakker dan cortison. De mineralocorticoïde activiteit daarentegen is in vergelijking met die van desoxycorticosteron en zeker met die van aldosteron gering. Voor een uitvoerige bespreking van de methodieken die in tabel 2 zijn genoemd zij verwezen naar het overzicht van Dorfman (1962).

Bij de mens heeft men in enkele klinisch-experimentele onderzoeken metabole effecten van corticosteron bestudeerd. Thorn en medewerkers gaven in 1940 voor de eerste maal corticosteron in een hoeveelheid van 85 mg in één injectie aan een patiënt met bijnierinsuffi-

Glucocorticoïde activiteit	Methode:	stapeling van glycogeen		werk- capaciteit	remming van ontsteking	involutie van de thymus		eosino- penie		remming van de ACTH- productie	reactie op op stress door koude
		(1)	(8)	(1)	(2)	(2)	(9)	(6)	(7)	(4)	(5)
cortison		100		100	100	100		100		100	100
corticosteron		50		63	30	49		25		25	9
desoxycorticosteron		1		16		0		1		13	8
aldosteron		30						25			

Mineralocorticoïde activiteit	Methode:	Na/K-verhouding in urine		Everse-de Fremery test	overlevingsduur na adrenalectomie
		(6)	(7)	(6)	(6)
cortison			4	3,5	10
corticosteron			14,3	8	17
desoxycorticosteron			100	100	100
aldosteron			12000		



cientie. Op deze dag bleek het glucosegehalte van het bloed na 22 uur vasten hoger te zijn dan op de dagen zonder enige medicatie. Ferrebee (1940), uit de groep van Loeb, zag na toediening van 20 mg corticosteron per dag gedurende vijf dagen wel natriumretentie maar géén stijging van het glucosegehalte van het bloed. Ook werden geen andere tekenen van glucocorticoïde activiteit, zoals verhoogde eiwitafbraak waargenomen.

In 1951 werden door Conn en medewerkers (Conn c.s.-1951a en b) de resultaten vermeld van de behandeling van patiënten met bijnierinsufficiëntie met een onderhoudsdosering van 25 mg corticosteron per dag, intramusculair toegediend. Zij zagen met deze dosering behalve natriumretentie met verhoogde kaliumuitscheiding ook glucocorticoïde effecten zoals een verhoging van het glucosegehalte van het bloed na vasten en een hoger oplopen van de intraveneuze glucosebelastingcurve. Ook bleek tijdens toediening van corticosteron een verhoogde uitscheiding van stikstofhoudende stoffen met de urine op te treden. Het natriumretinerende effect van het toegediende corticosteron was bij de patiënten die door Conn werden onderzocht ongeveer tien maal minder krachtig als dat van desoxycorticosteron, het was echter meer uitgesproken dan dat van cortison. Merkwaardig was dat een relatief hoge dosering van corticosteron - 200 mg per dag gedurende enkele dagen - noch bij patiënten met bijnierinsufficiëntie noch bij normale proefpersonen een daling van het aantal circulerende eosinofiele leucocyten teweegbracht. Patiënten met bijnierinsufficiëntie konden met corticosteron in een dosering van 25 mg per dag als enige substitutietherapie in leven worden gehouden, ook wanneer de voeding weinig zout bevatte.

In 1953 deelden Thorn en medewerkers mede dat ook zij tijdens toediening van corticosteron aan patiënten met bijnierinsufficiëntie natriumretentie zagen, het desoxycorticosteron toonde in deze studie een vijftig maal zo sterk effect. Thorn c.s. bevestigden bovendien de waarneming van Conn dat corticosteron geen invloed had op het aantal circulerende eosinofiele segmentkernigen. De twee door Thorn en medewerkers behandelde patiënten met bijnierinsufficiëntie waardeerden subjectief 25 mg cortison gelijk aan 100 mg corticosteron.

In deze dosering zag Thorn echter met cortison wel, maar met corticosteron géén verbetering optreden van het wateruitscheidend vermogen. Waarschijnlijk is, achteraf gezien, deze waarneming door

Perera in 1946 reeds gedaan. Het betrof hier een patient met een hypofysaire insufficiëntie die, in aansluiting aan een infectie, een hyponatriëmie had gekregen en alleen met desoxycorticosteron werd behandeld. Uit de vermelde gegevens kan worden afgeleid dat toediening van corticosteron in een dosering van 40 mg per dag geen stijging van de natriumconcentratie van plasma teweeg bracht. Toch moet als oorzaak van deze verdunnings-hyponatriëmie een tekort aan glucocorticoiden aangenomen worden (van 't Laar-1967).

Een ander 'glucocorticoid' effect is de remming van de ACTH-afgifte door de hypofyse. Uit de waarnemingen van Wilkins en medewerkers (Wilkins c.s.-1952, Crigler c.s.-1952) mag geconcludeerd worden dat ook corticosteron in staat is deze remming te bewerkstelligen. Bij een patientje met congenitale bijnierhyperplasie werd door deze onderzoekers met 25 mg corticosteron een even sterke daling van de uitscheiding van 17-ketosteroiden gezien als met 5 mg cortison. In tegenstelling hiermee zijn de bevindingen van Conn c.s. (1951a) die tijdens toediening van 200 mg corticosteron per dag aan twee normale proefpersonen géén daling van de uitscheiding van 17-ketosteroiden vaststelden. De opvatting van Wilkins wordt echter gesteund door enkele recente waarnemingen. Zowel Biglieri c.s. (1966) als Goldsmith c.s. (1967) beschreven een patiente met een deficientie van het 17-hydroxylase-enzymstelsel, waarbij nagenoeg géén cortisol wordt geproduceerd. De patiente van Biglieri produceerde per dag 120 mg corticosteron. Ondanks het vrijwel ontbreken van cortisol was de ACTH-spiegel in het plasma normaal. De patiente van Goldsmith had een corticosteronproductie van 44 mg per dag, hierbij was de ACTH-spiegel in het plasma slechts weinig verhoogd. Deze hoeveelheden corticosteron lijken dus, in de afwezigheid van cortisol, in staat te zijn om de ACTH-afgifte door de hypofyse te beperken.

Tot slot mogen nog de waarnemingen van Robinson (1951) en Sprague (1953) vermeld worden, waarbij geen effect van 200 mg corticosteron per dag op het klinische beeld van chronische reumatoïde artritis werd gezien, terwijl 100 mg cortison per dag wel effectief was.

Op grond van deze waarnemingen mag men bij de mens van het corticosteron, indien het in geringere hoeveelheden dan 20 mg wordt gesecerneerd, noch glucocorticoiden noch mineralocorticoiden effecten van

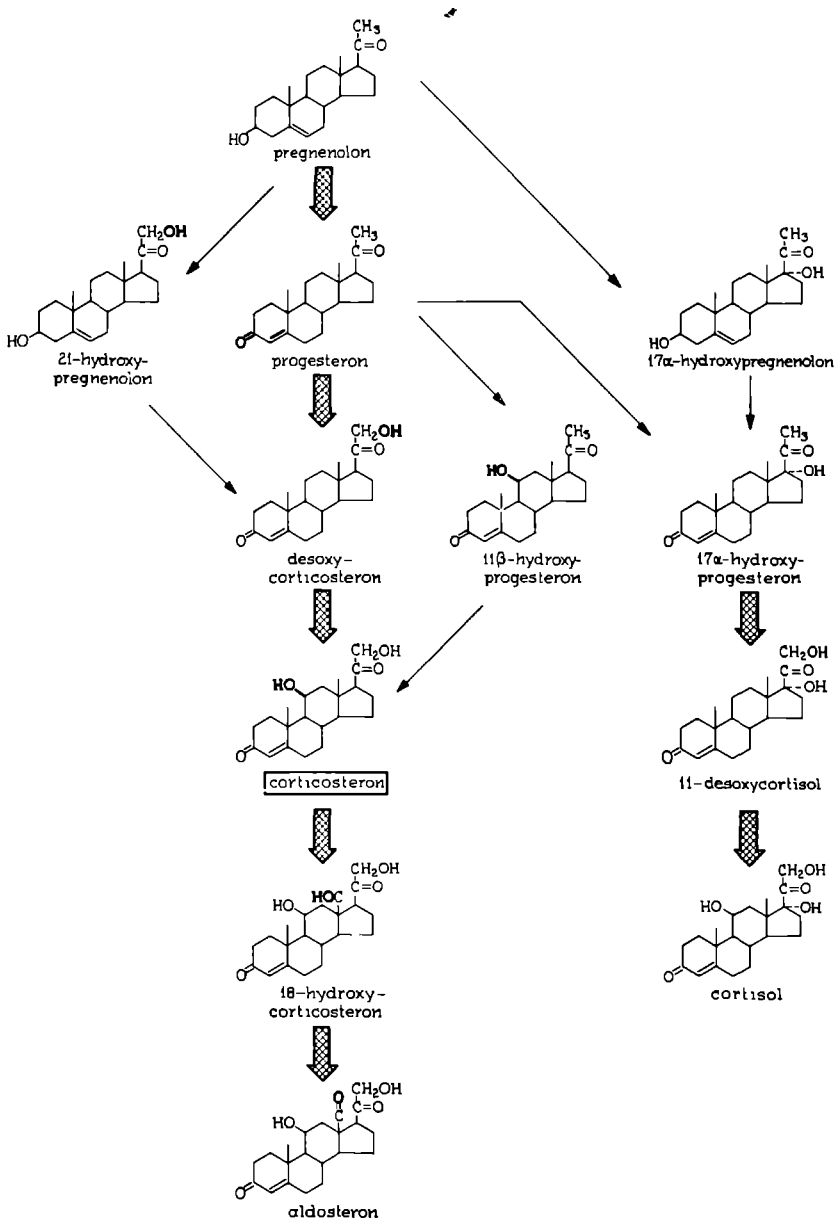
enige betekenis verwachten. Het is bovendien zeer twijfelachtig of bij deze secretiesnelheden het corticosteron een aandeel zal hebben in het terugkoppelingsmechanisme dat de ACTH-afgifte reguleert. Dit zou tot de conclusie leiden dat van corticosteron onder omstandigheden van een normale bijnierfunctie geen thans bekende biologische effecten verwacht mogen worden. De rol die aan corticosteron bij de mens toekomt lijkt derhalve beperkt tot die van voorloper van het veel sterker mineralcorticoïde aldosteron.

## § 2. ENKELE ASPECTEN VAN DE BIOSYNTHESE VAN CORTICOSTERON EN DE PLAATS VAN DIT HORMON ALS VOORLOPER IN DE BIOSYNTHESE VAN ANDERE STEROÏDEN

De opeenvolgende stappen in de biosynthese van corticosteron zijn met vrij grote zekerheid bekend. Een volledige bespreking van de literatuurgegevens omtrent de biosynthese van het, in de corticosteroïdproductie centraal staande, pregnenolon blijft hier achterwege. Voor een overzicht daarvan kan verwezen worden naar een studie van Dorfman (1965).

Door Levi en medewerkers (1950) werd aangetoond dat pregnenolon een belangrijke rol speelt in de biosynthese van diverse steroïden. Uit hun 'in vitro' waarnemingen (Hechter c.s. -1951) bleek dat het pregnenolon als voorloper beschouwd moet worden van zowel progesteron,  $11\beta$ -hydroxyprogesteron, corticosteron als van cortisol. Voorts stelden Plager en Samuels (1952) vast dat progesteron door bijnierweefsel in vitro wordt omgezet in  $11$ -desoxycorticosteron, een omzetting waarbij slechts het C-21 atoom wordt gehydroxyleerd. Reeds eerder was uit een onderzoek van Hechter c.s. (1949a) gebleken dat door bijnierweefsel het C-11 atoom van desoxycorticosteron kan worden gehydroxyleerd. De gehele synthetische weg van pregnenolon tot corticosteron was dus reeds in 1952 bekend.

In figuur 1 is de voornaamste weg waarlangs corticosteron gevormd wordt gemarkeerd door de dikgetrokken lijnen. Uit de studie van Eichhorn en Hechter (1958) bleek dat nog een alternatieve weg bestaat. Deze onderzoekers constateerden dat bij incubatie van runderbijnierhomogenaten, toegevoegd  $^{14}\text{C}$ -gemerkt  $11\beta$ -hydroxyprogesteron wordt



Figuur 1. De biosynthese van corticosteron uit pregnenolon en de plaats van dit hormoon in de biosynthese van andere corticosteroiden. De vetgedrukte pijlen geven de belangrijkste stappen aan en de vetgedrukte delen in de formules de wijzigingen welke bij de omzetting van de voorloper zijn aangebracht.

omgezet in  $^{14}\text{C}$ -corticosteron. De opbrengst van deze omzetting was echter gering wanneer men deze vergelijkt met de opbrengst die wordt verkregen na toevoeging van progesteron of desoxycorticosteron als voorloper. Dit biosynthetische pad lijkt voornamelijk van weinig belang. Tenslotte is er nog een derde weg. In 1959 toonden Stachenko en Giroud (1959) aan dat bij incubatie van runderbijnierweefsel de corticosteronproductie toeneemt wanneer aan het incubatiemedium 21-hydroxypregnenolon wordt toegevoegd. Pasqualini c.s. (1964a) leverden door middel van in vitro studies het directe bewijs dat bijnierweefsel van de rat en het konijn in staat is pregnenolon om te zetten in 21-hydroxypregnenolon. Vervolgens namen deze onderzoekers waar dat hyperplastisch bijnierweefsel van de mens bij incubatie 21-hydroxypregnenolon omzet in desoxycorticosteron en corticosteron. Ook deze weg via 21-hydroxypregnenolon naar corticosteron is kwantitatief van weinig betekenis.

In figuur 1 zijn ook de wegen aangegeven waarlangs cortisol wordt gevormd. De synthese via 17-hydroxypregnenolon is door Weliky en Engel (1962) aannemelijk gemaakt. Ook andere onderzoekers (Eichhorn en Hechter-1957, Mulrow en Cohn-1961c, Lipsett en Hökfelt-1961, Klein en Giroud-1967) komen tot de conclusie dat deze weg belangrijker is dan die via progesteron. De biosynthese van cortisol en corticosteron zal dus reeds vóór de vorming van progesteron gescheiden kunnen verlopen. Eichhorn en Hechter (1957) stelden reeds vast dat hydroxylering van het koolstofatoom C-17 niet kan plaats vinden wanneer het C-11 atoom reeds een hydroxylgroep draagt. Indien deze waarneming juist is betekent dit dat corticosteron niet kan fungeren als directe voorloper van cortisol.

Het is wel zeker dat corticosteron als de voorloper van aldosteron moet worden beschouwd. De eerste stap is een hydroxylering van het C-18 koolstofatoom, waarbij het 18-hydroxycorticosteron ontstaat. De oxydatie van de hydroxylgroep tot de aldehydegroep van aldosteron is weliswaar een zeer waarschijnlijke volgende stap, maar het directe bewijs dat 18-hydroxycorticosteron in aldosteron wordt omgezet is tot op heden nog niet met zekerheid geleverd (Ulick en Vetter-1962 en 1964, Raman c.s.-1964 en 1966, Pasqualini-1964c).

Uit talrijke onderzoeken is gebleken dat corticosteron niet, zoals cortisol en aldosteron, selectief in een bepaalde zone van de bijnier wordt gemaakt. Reeds in 1956 werd door Ayres en medewerkers uit in vitro onderzoeken geconstateerd dat per gram weefsel door de zona glomerulosa van runderen evenveel corticosteron wordt gevormd als door de zona fasciculata. Ook Giroud c.s. (1958) kwamen tot deze conclusie en vonden dat dit zowel voor bijnierweefsel van het rund als van de rat geldt. Ook voor bijnierweefsel van de mens is aangetoond dat corticosteron in beide zones wordt gevormd (Ayres c.s.-1958).

De verhouding tussen de hoeveelheden door de bijnier geproduceerd cortisol en corticosteron is niet voor iedere diersoort gelijk. Knaagdieren als de rat en de muis produceren geen cortisol en ook bij amfibieën blijkt geen 17-hydroxylase enzym in de bijnier aanwezig te zijn (Carstensen c.s.-1961). Bij runderen is de zogenaamde cortisol/corticosteron (F/B) verhouding 1 (gemeten in perifere bloed), bij katten 4, bij schapen 10 en bij apen 20 (Bush-1953). Peterson (1957b) vond dat in het plasma van de mens het cortisolgehalte 13 maal zo hoog is als het corticosterongehalte. Ook op indirecte wijze werd deze F/B-ratio bij de mens vastgesteld. Cost (1960) mat de metaboliëten van cortisol en corticosteron in urine en berekende een F/B-ratio van 6,9. Deze waarde blijkt goed overeen te komen met de verhouding der secretiesnelheden van cortisol en corticosteron die door Van der Straeten c. s. (1963) gelijktijdig werden bepaald: Bij 15 gezonde personen varieerde de F/B-ratio van 4,2 - 9,9 (gemiddeld 6,7). Karl en Raith (1965) vonden in een overeenkomstig onderzoek bij 24 normale proefpersonen een gemiddelde F/B-ratio van 7,1.

### § 3. DE STOFWISSELING VAN CORTICOSTERON

#### Gegevens over de omzetting van corticosteron in het lichaam

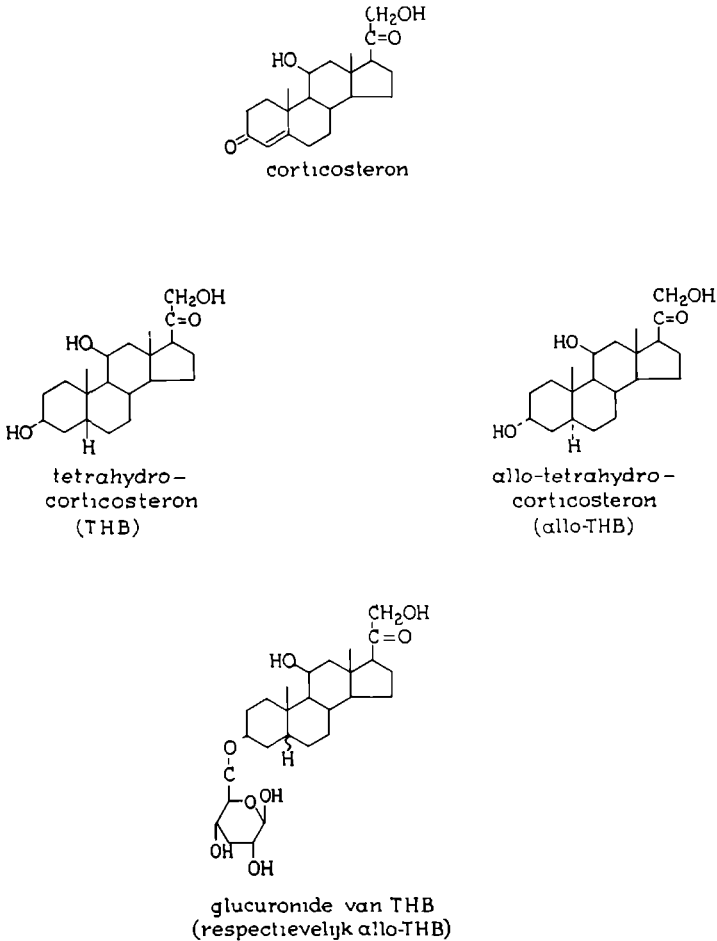
Deze zijn verkregen zowel in experimenten waarbij farmacologische hoeveelheden van het hormoon werden toegediend als in proeven waarin slechts een spurdosis radioactief corticosteron werd geïnjecteerd van

hoge specifieke activiteit. Op laatstgenoemde wijze is het mogelijk een zo kleine hoeveelheid van het hormoon toe te dienen, dat voor veranderingen van de stofwisseling door belasting met exogeen toegediend corticosteron niet behoeft te worden gevreesd.

De eerste gegevens zijn van Migeon en medewerkers, in 1956 verkregen met  $^{14}\text{C}$ -corticosteron, toegediend aan twee gezonde personen. De verdwijning van het radioactief gemerkte corticosteron uit het plasma bleek sneller te zijn dan die van cortisol. Uit de gegevens kan een halfwaardetijd worden berekend van respectievelijk 65 en 80 minuten. Ayres en medewerkers stelden in 1957 bij één gezonde man een halfwaardetijd vast van 60 minuten. Ook uit een onderzoek van Peterson (Peterson-1959, Peterson en Pierce-1960) bij 17 gezonde personen blijkt dat corticosteron sneller uit het plasma verdwijnt dan cortisol. Na intraveneuze toediening van 100 mg corticosteron bleek de halfwaardetijd, berekend uit de verdwijning van corticosteron uit het plasma, 60-90 (gemiddeld 76) minuten te zijn. Met een speurdosis radioactief gemerkt corticosteron werden waarden variërend van 54 tot 84 (gemiddeld 65) minuten verkregen. De halfwaardetijd van cortisol bedroeg in het vergelijkbare farmacologische experiment 110 minuten. Het exogeen toegediende corticosteron mengt zich in het lichaam met de daar aanwezige hoeveelheid hormoon door Peterson 'miscible pool' genoemd. Deze 'pool' bedraagt 0,2 - 0,4 mg, waarvan blijkens zijn berekening per uur 70% wordt omgezet. Uit deze gegevens kan men de secretiesnelheid van corticosteron berekenen. Indien de 'pool' 0,3 mg bedraagt, wordt per uur 0,21 mg gestofwisseld. Geen rekening houdend met de ritmische fluctuaties in de produktie van corticosteron, komt men door berekening dan tot een secretiesnelheid van 5 mg per dag.

In 1957 stelde Peterson met een isotoop-verdunningsmethode bij 20 normale proefpersonen vast dat de corticosteronconcentratie van het plasma 0,5 - 2,0 (gemiddeld 1,1)  $\mu\text{g}$  per 100 ml bedroeg. Bij deze concentratie is nagenoeg de gehele hoeveelheid corticosteron in het plasma aan een  $\alpha$ -globuline gebonden. Dit globuline is door de groep van Slaunwhite transcortine genoemd (Slaunwhite en Sandberg-1959) en door Daughady en medewerkers corticosteroid-binding-globulin (Daughady-1958a en b). Dit eiwit heeft voor cortisol en corticosteron een grotere affiniteit dan voor andere steroïden (Slaunwhite c.s.-1959). Kort na de ontdekking van het transcortine werd aan deze eiwitbinding voornamelijk

een transportfunctie toegekend. Een modernere opvatting is dat dit eiwit-steroid complex: (i) als reservoir dient van intravasculair corticosteroid (ii) het steroid beschermt tegen afbraak (iii) de weefsels beschermt wanneer de bijnier relatief hoge concentraties aan corticosteroiden secerneert (Sandberg c.s.-1967).



Figuur 2. Structuurformule van corticosteron en de twee belangrijkste metabolieten ervan. Bovendien is de formule weergegeven van (allo-)THB-glucuronide zoals het met de urine wordt uitgescheiden.



## Gegevens over de uitscheiding van corticosteron en zijn metaboliëten

Deze zijn eveneens verkregen in experimenten waarbij farmacologische hoeveelheden of een speurdosis van corticosteron werd toegediend. Steroïden en hun metaboliëten worden voornamelijk als geconjugeerde verbindingen met de urine uitgescheiden. Conjugering tot glucuronide of tot zwavelzure-esters, hetgeen hoofdzakelijk in de lever plaats vindt, maakt de steroïden gemakkelijk in water oplosbaar. Het corticosteron wordt door de lever omgezet in een groot aantal metaboliëten. De belangrijkste hiervan zijn tetrahydrocorticosteron (THB) en allo-tetrahydrocorticosteron (allo-THB), die beide praktisch volledig als glucuronide met de urine worden uitgescheiden. De structuur van deze verbindingen is opgenomen in figuur 2. Het glucuronzuur is gekoppeld aan de hydroxylgroep van C-3 van het steroïdskelet. Deze stereo-isomeren verschillen slechts in de positie van de A en de B ring ten opzichte van elkaar.

Touchstone c.s. (1954) isoleerden als eersten deze tetrahydro-derivaten uit de urine. Het bewijs dat THB en allo-THB inderdaad afkomstig zijn van corticosteron werd in 1955 door Richardson c.s. en Engel c.s. geleverd. Zij isoleerden deze metaboliëten uit de urine zowel van patiënten zonder bijnierfunctie als van normale proefpersonen aan wie farmacologische hoeveelheden corticosteron werden toegediend. Zowel corticosteron als de tetrahydro-derivaten kunnen nog verder worden omgezet in een aantal stofwisselingsprodukten, die in tabel 3 bijeengezet zijn. Uit deze tabel blijkt dat deze metaboliëten niet uitsluitend als esters van glucuronzuur worden uitgescheiden. Kleine hoeveelheden komen als vrij steroïd voor en daarnaast worden ook nog zwavelzure-esters van de steroïden in de urine aangetroffen. Het zwavelzuur is gebonden aan de hydroxylgroep van C-21 (Pasqualini-1960, Pasqualini en Jayle-1961).

Peterson en Pierce (1960) bestudeerden de excretie van radioactieve produkten met de urine na injectie van corticosteron gemerkt met  $^{14}\text{C}$  op de plaats van het vierde koolstofatoom. Van de geïnjecteerde hoeveelheid radioactiviteit werd gemiddeld 64% in de eerste 24 uur uitgescheiden, gemiddeld 76% werd in de eerste 72 uur na de injectie in de urine

Tabel 3

Samenvatting van gegevens uit de literatuur over de stofwisselingsproducten van corticosteron in de urine

Metabolieten	Wijze van uitscheiding	Auteur
<p><math>\Delta^4</math>-3-Keto-derivaten ontstaan door omzetting van corticosteron zonder voorafgaande reductie van de =O groep aan C-3</p> <p>4-pregneen-11<math>\beta</math>,21-diol-3,20-dion corticosteron</p> <p>4-pregneen-21-ol-3,11,20-trion 11-dehydrocorticosteron</p> <p>4-pregneen-6<math>\beta</math>,11<math>\beta</math>,21-triol-3,20-dion 6<math>\beta</math>-hydroxycorticosteron</p> <p>4-pregneen-20<math>\beta</math>,21,11<math>\beta</math>-triol-3-on</p> <p>4-pregneen-20<math>\alpha</math>,21,11<math>\beta</math>-triol-3-on</p> <p>4-pregneen-20<math>\beta</math>,21-diol-3-11-dion</p>	<p>sulfaat-ester en glucuronide</p> <p>vrij en sulfaat-ester</p>	<p>Pasqualini -1958</p> <p>Richardson c.s.-1962</p> <p>Nowaczynski c.s.-1962</p> <p>Pasqualini -1964b</p> <p>Richardson c.s.-1958</p> <p>Southcott c.s.-1958</p> <p>Bulaschenko c.s.-1960</p> <p>Bulaschenko c.s.-1960</p>
<p>tetrahydro-derivaten ontstaan door omzetting na voorafgaande reductie van de =O-groep aan C-3</p> <p>5<math>\beta</math>-pregnaan-3<math>\alpha</math>,11<math>\beta</math>,21-triol-20-on tetrahydrocorticosteron (THB)</p> <p>5<math>\alpha</math>-pregnaan-3<math>\alpha</math>,11<math>\beta</math>,21-triol-20-on allo-tetrahydrocorticosteron (allo-THB)</p> <p>5<math>\beta</math>-pregnaan-3<math>\alpha</math>,21-diol-11,20-dion tetrahydro-11-dehydrocorticosteron (THA)</p> <p>5<math>\beta</math>-pregnaan-3<math>\alpha</math>-ol-11,20-dion</p> <p>5<math>\beta</math>-pregnaan-3<math>\alpha</math>,11<math>\beta</math>-diol-20-on</p> <p>5<math>\beta</math>-pregnaan-3<math>\alpha</math>,20<math>\alpha</math>-diol-11-on</p> <p>5<math>\beta</math>-pregnaan-3<math>\alpha</math>,11<math>\beta</math>,20<math>\alpha</math>-triol</p> <p>5<math>\beta</math>-pregnaan-3<math>\alpha</math>,20<math>\alpha</math>-diol-11-on</p> <p>5<math>\beta</math>-pregnaan-3<math>\alpha</math>,11<math>\beta</math>,20<math>\beta</math>,21-tetrol</p> <p>5<math>\alpha</math>-pregnaan-3<math>\alpha</math>,11<math>\beta</math>,20<math>\beta</math>,21-tetrol</p>	<p>glucuronide en sulfaat-ester</p> <p>glucuronide *)</p> <p>glucuronide en sulfaat-ester</p>	<p>Touchstone c.s.-1954</p> <p>Fukushima c.s.-1954</p> <p>Mason c.s.-1948</p> <p>Fukushima c.s.-1954</p> <p>Engel c.s.-1955</p> <p>Exley -1965</p>

\*) sulfaat-ester niet met zekerheid aangetoond

teruggevonden. In de eerste 24-uurs urine werd van de geïnjecteerde hoeveelheid radioactiviteit gemiddeld 32% in de glucuronide-fractie en slechts 2% in de vrije steroid-fractie aangetroffen. Het corticosteron-gehalte van deze laatste fractie bedroeg slechts 25%, zodat van de geïnjecteerde hoeveelheid corticosteron slechts  $\frac{1}{2}$ % als vrij corticosteron wordt uitgescheiden. In de reeds vermelde studie van Migeon en medewerkers was de radioactiviteit van de glucuronide-fractie 28% van de toegediende hoeveelheid speurdosis. In hoofdstuk 2 zal blijken dat de uitkomsten van onze studie zeer wel met deze bevindingen overeenkomen. De glucuronide-fractie bestaat voornamelijk uit THB en allo-THB, de onderlinge verhouding van de uitgescheiden hoeveelheden van deze twee metabolieten is 1 : 1 $\frac{1}{2}$  (Richardson c.s.-1955, Engel c.s.-1955, Peterson en Pierce-1960, Pasqualini en Jayle-1964d).

In tabel 4 zijn de hoeveelheden van een aantal metabolieten bijeengezet die in 24 uur na orale toediening van 200 mg corticosteron met de urine worden uitgescheiden. De gegevens zijn ontleend aan een studie van Pasqualini en Jayle (1964d). Deze onderzoekers vermelden in hun

T a b e l 4  
Uitscheiding van enkele metabolieten met de urine  
na toediening van corticosteron \*)

Metaboliët	Uitgescheiden hoeveelheid in 24 uur na toediening van 200 mg corticosteron		Uitgescheiden hoeveelheid in 24 uur na toediening van <sup>3</sup> H-corticosteron (% van ingespoten hoeveelheid)
	in mg	in %	
tetrahydrocorticosteron-glucuronide	18.000	9,0	12,0
allo-tetrahydrocorticosteron-glucuronide	21.000	10,5	16,0
corticosteron-glucuronide	0.100	0,05	0,1
tetrahydrocorticosteron-sulfaat-ester	0.400	0,2	0,3
allo-tetrahydrocorticosteron-sulfaat-ester	spoor		< 0,01
corticosteron-sulfaat-ester	0.700	0,35	0,4
tetrahydrocorticosteron	0.500	0,25	0,4
allo-tetrahydrocorticosteron	0.250	0,13	0,45
corticosteron	0.003	0,002	< 0,01

\*) vrij naar Pasqualini en Jayle (1964d)

studie ook gegevens over de uitscheiding van radioactieve metabolieten met de urine in een periode van 24 uur na intraveneuze injectie van een spurdosis getritieerd corticosteron bij normale proefpersonen. De percentages van de ingespoten hoeveelheden radioactiviteit, aanwezig in elk van deze metabolieten zijn eveneens in tabel 4 bijeengezet. Er blijkt een bevredigende overeenkomst tussen de percentages van elk van de metabolieten in beide experimenten te bestaan. Bovendien blijkt dat allo-THB en THB de belangrijkste metabolieten in de glucuronide-fractie zijn en dat bijna 30% van de toegediende hoeveelheid radioactiviteit als deze twee metabolieten wordt uitgescheiden.

Alvorens dit korte overzicht over de stofwisseling van corticosteron af te sluiten, moet een ogenblik aandacht worden geschonken aan de vraag of metingen van de secretiesnelheid van corticosteron, verricht door bepaling van de specifieke activiteit van de beide tetrahydrocorticosteron-metabolieten, verantwoord zijn. In de laatste jaren is bekend geworden dat corticosteron zelf kan worden geconjugeerd tot een zwavelzure-ester. Door Pasqualini werd in 1964 (Pasqualini en Jayle-1964d) gevonden dat in levers van ratten corticosteron kan worden omgezet in een sulfaat-ester. Dit zou op zich de secretiemeting niet beïnvloeden, immers hetzelfde lot zou het exogeen toegediende corticosteron ook ondergaan. Uit onderzoek van Adams (1964) en Boström c.s. (1964) is evenwel gebleken dat ook menselijk bijnierweefsel sulfokinase-activiteit bezit. Wanneer de bijnier corticosteronsulfaat zou secernereren in relatief grote hoeveelheden, dan zou dit de secretiesnelheidmeting wel kunnen beïnvloeden. Het is wederom de Franse onderzoeker Pasqualini die ook dit vraagstuk in een fraaie studie heeft benaderd (Pasqualini-1967). Na injectie van een mengsel van  $^3\text{H}$ -corticosteronsulfaat en  $^{14}\text{C}$ -corticosteron bij drie normale proefpersonen mat hij de  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit in een aantal metabolieten, waaronder de beide tetrahydro-metabolieten. De hoeveelheid  $^3\text{H}$ -corticosteronsulfaat die als allo-THB-glucuronide of allo-THB-sulfaat-esters werd uitgescheiden was onmeetbaar laag. De hoeveelheid radioactiviteit, afkomstig van  $^3\text{H}$ -corticosteronsulfaat, die als THB-glucuronide werd uitgescheiden was 0,3%, en die als THB-sulfaat-ester werd uitgescheiden was 1,6%. De tetrahydro-derivaten die afkomstig zijn van het in het lichaam geproduceerde corticosteronsulfaat zullen dus een verwaarloosbaar klein

deel uitmaken van de totale hoeveelheid tetrahydro-derivaten, waaraan de secretiesnelheid wordt gemeten. Uit de literatuur is één waarneming bij een normale proefpersoon bekend (Kielmann c.s.-1966) waarbij na injectie van  $^3\text{H}$ -corticosteronsulfaat een produktie van dit steroid kon worden berekend van 270  $\mu\text{g}$  per dag. Het blijft echter de vraag welk gedeelte hiervan door de lever wordt gevormd en welk gedeelte door de bijnier wordt gesecerneerd. Groter dan 10% van de gesecerneerde hoeveelheid corticosteron is de secretie van corticosteronsulfaat door de bijnier echter blijkens deze studie niet.

## 2. De meting van de secretiesnelheid van corticosteron met behulp van een dubbel-isotoopverduunningsmethode

### § 1. INLEIDING

Voor een uitvoerige bespreking van de meting van de secretiesnelheid van een hormoon met behulp van isotoopverduunning, en voor een analyse van de voorwaarden waaraan hierbij moet worden voldaan, kan verwezen worden naar de dissertatie van Kloppenborg (1966). In het kort samengevat is de werkwijze bij de meting als volgt: men injecteert een, met tritium gemerkt, hormoon intraveneus en verzamelt de urine over de daarop volgende 24 uur. Uit de urine wordt een metabooliet van het hormoon geïsoleerd, en hiervan wordt de hoeveelheid tritium per gewichtshoeveelheid, dus de specifieke activiteit, bepaald. Naarmate de bijnier meer van het hormoon secreteert, zal de specifieke activiteit van de geïsoleerde metabooliet lager zijn.

De betrouwbaarheid van een dergelijke meting hangt voornamelijk af van de graad van zuiverheid waarmee de metabooliet wordt geïsoleerd. Voor het bereiken van een voldoende zuiverheid is het noodzakelijk diverse achtereenvolgende chromatografische scheidingen toe te passen. De uiteindelijke kwantitatieve meting van de geïsoleerde metabooliet dient, in verband met de relatief zeer geringe hoeveelheid hiervan, zeer gevoelig te zijn. Met vrucht kan men daarbij gebruik maken van een radioactief gemerkt reagens, bijvoorbeeld  $^{14}\text{C}$ -gemerkt azijnzuuranhydride, waarmee het steroid wordt omgezet in een  $^{14}\text{C}$ -gemerkt acetaat. Metingen die op dit principe zijn gebaseerd en dus van twee

radioactieve isotopen gebruik maken, worden dubbel-isotoopverduunningsmethoden genoemd. De meting van de secretiesnelheid komt dan neer op de bepaling van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -verhouding aanwezig in het geïsoleerde metaboliet-acetaat.

Op basis van de methode beschreven door Peterson en Pierce (1960) werd een bepaling ontwikkeld, waarin dunnelaagchromatografie is geïntroduceerd en waarvan op diverse wijzen de betrouwbaarheid is getoetst. Na een globaal overzicht van de in de literatuur vermelde methoden ter bepaling van de secretiesnelheid van corticosteron volgt in dit hoofdstuk een beschrijving van de eigen methode en de toetsing van de betrouwbaarheid ervan. In de laatste paragraaf zijn metingen van de corticosteronsecretiesnelheid opgenomen, verricht bij gehospitaliseerde personen. Deze waarden zijn vergeleken met die van andere onderzoekers.

## § 2. LITERATURGEGEVENS BETREFFENDE METHODEN TER BEPALING VAN DE SECRETIESNELHEID VAN CORTICOSTERON

In hoofdstuk 1 werd reeds vermeld dat de twee belangrijkste metabolieten van corticosteron die met de urine worden uitgescheiden tetrahydro-derivaten zijn, in dit geschrift aangeduid met THB en allo-THB.

In de bepalingmethoden van de secretiesnelheid van corticosteron die in de literatuur zijn beschreven wordt uitsluitend van deze metabolieten gebruik gemaakt. In enkele daarvan wordt de isotoopverduunning aan één afzonderlijke metaboliet gemeten; in andere worden minder strenge eisen aan de bepaling gesteld en wordt de specifieke activiteit gemeten van THB en allo-THB tezamen.

Er zijn enkele methoden beschreven waarin de metaboliet colorimetrisch gemeten wordt met behulp van het zogenaamde tetrazoliumblauw. Aan deze werkwijze kleeft het ernstige bezwaar dat men geen enkele controle heeft op de bij elke afzonderlijke bepaling bereikte zuiverheid. Bovendien is deze kleurreactie aspecifiek, hetgeen met hoge blancowaarden gepaard gaat, terwijl de gevoeligheid gering is. Voorbeelden van deze methoden zijn die volgens Biglieri en medewerkers (1963), Van der Straeten en medewerkers (1963) en Karl en Raith (1965a).

Enigszins uitvoeriger dient stilgestaan te worden bij de dubbelisotoopverdunningsmethode volgens Peterson en Pierce (1960). Bij deze werkwijze wordt, na enzymatische hydrolyse van een gedeelte van de 24-uurs urine, geëxtraheerd met dichloormethaan en het ruwe extract door vloeistof/vloeistof verdeling gezuiverd. Het extract wordt daarna op papier gechromatografeerd in een systeem van het Bush-type. In dit systeem, dat ook in onze methode is opgenomen, worden THB en allo-THB gescheiden. Van deze metabolieten wordt er één geacetyleerd met  $^{14}\text{C}$ -gemerkt azijnzuuranhydride, waarbij een diacetaat ontstaat. Dit diacetaat wordt gezuiverd in twee opeenvolgende papierchromatografische systemen en vervolgens geoxydeerd met chroomtrioxyde tot een monoacetaat. Dit monoacetaat wordt tenslotte nogmaals gechromatografeerd op papier. Deze methode biedt de mogelijkheid om elke individuele bepaling op betrouwbaarheid te toetsen, immers na de diverse chromatografische stappen kan de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio worden gemeten. Heeft een chromatografische stap geen verandering meer teweeggebracht in deze  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio, dan is het waarschijnlijk dat storende verontreinigingen zijn geëlimineerd. Peterson en Pierce vermelden weliswaar geen gegevens over het constant blijven van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio, de betrouwbaarheid van de bepaling blijkt echter uit de resultaten van een viertal secretiemetingen waarbij de specifieke activiteit van zowel THB als van allo-THB werd bepaald. Het verschil tussen beide specifieke activiteiten blijkt maximaal 6%. Een bezwaar van deze bepalingsmethode is de voor de zuivering noodzakelijke oxydatie met chroomtrioxyde. De opbrengst van deze reactie is wisselvallig en bovendien wordt één van de voor de meting beschikbare acetaatgroepen afgesplitst, waardoor de gevoeligheid met een factor twee vermindert.

In de methode volgens Bledsoe c.s. (1964) wordt niet met chroomtrioxyde geoxydeerd; de toch al tijdrovende chromatografische procedure is hier echter met nog twee papierchromatogrammen uitgebreid: De vrije steroïden worden in twee systemen op papier gechromatografeerd en na acetylering wordt het diacetaat wederom op twee papierchromatogrammen gezuiverd. Het diacetaat wordt daarna gehydrolyseerd tot het monoacetaat dat op zijn beurt in twee overeenkomstige systemen wordt gezuiverd. Ook deze auteurs verstrekken geen gegevens over de radiochemische zuiverheid van de geïsoleerde acetaten. Wel



blijkt uit de vermelde resultaten dat lage secretiesnelheden worden gemeten, wanneer de ACTH-productie door dexamethason wordt onderdrukt, waarmee is vastgesteld dat de gevoeligheid van de methode toereikend is.

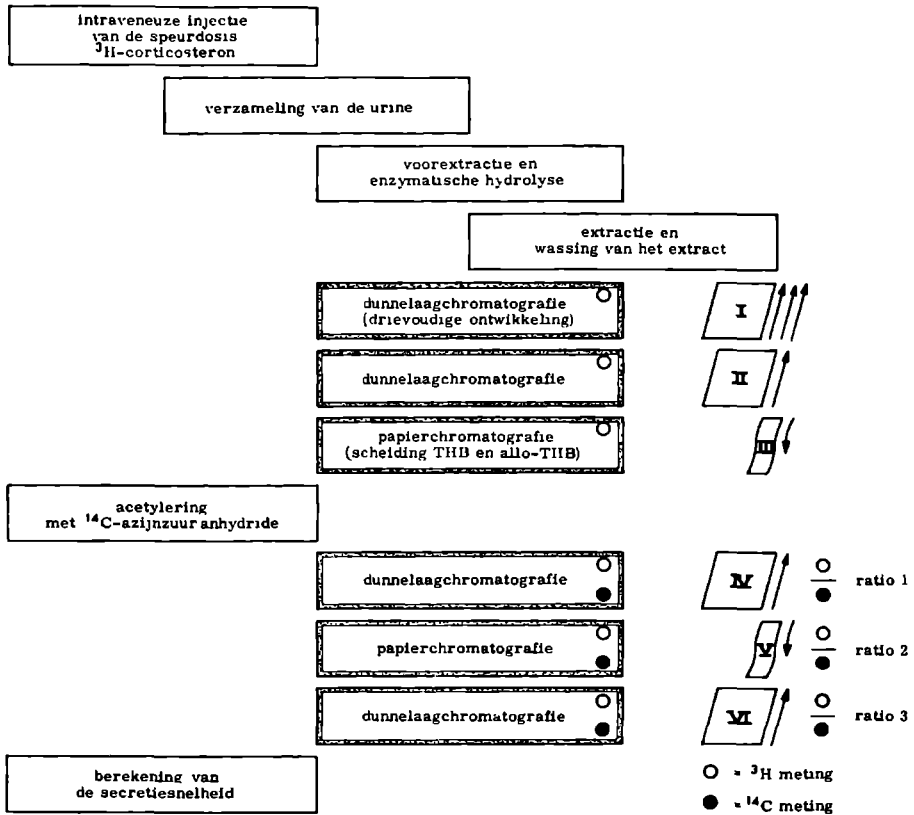
## § 3. BESCHRIJVING VAN DE EIGEN METHODE

### 3.1. Inleiding

De methode wijkt van de tot nu toe beschreven procedures af door het gebruik van dunnelaagchromatografie. Met deze meer recent ontwikkelde en steeds meer toegepaste chromatografische techniek, kan op zeer snelle wijze veelal een uitstekende scheiding tussen structureel nauw samenhangende stoffen worden verkregen. Bovendien is de capaciteit van silicagellagen groot, waardoor relatief grote hoeveelheden van sterk verontreinigde extracten kunnen worden gezuiverd. Door de gekozen combinatie van adsorptiechromatografie op silicagellagen en verdelingschromatografie op papier werd een zo efficiënte zuivering verkregen dat de vorming van een tweede derivaat, die in de eerder beschreven methoden noodzakelijk is, overbodig werd. Dit geeft de mogelijkheid om in gevallen waarin dit gewenst is vorming van een monoacetaat als toets voor de specificiteit van een bepaling toe te voegen.

De methode is schematisch weergegeven in figuur 3. In het kort is de werkwijze van de meting van de secretiesnelheid van corticosteron als volgt:

Getritieerd corticosteron wordt intraveneus toegediend. Na enzymatische behandeling van een gedeelte van de daaropvolgende 24-uurs urine wordt het extract van de urine door wassingen en vloeistof/vloeistofverdeling gezuiverd. Na deze bewerkingen wordt het extract opeenvolgend gechromatografeerd op twee silicagellagen. THB en allo-THB worden daarna gescheiden door papierchromatografie. Eén van deze metaboliëten wordt geacetyleerd met  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride, waarna het diacetaat achtereenvolgens wordt gechromatografeerd op een silica-gellaag, op papier en op een laatste silicagellaag. De plaats van de

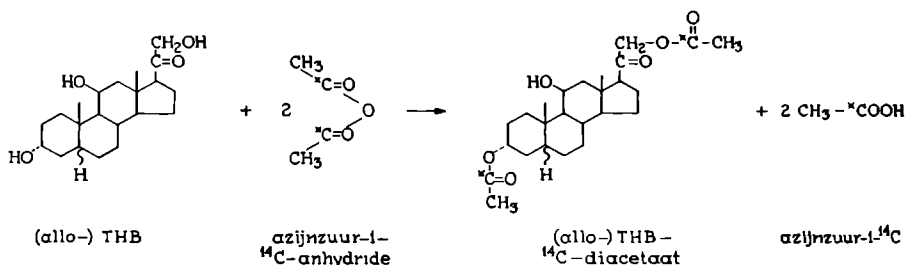


Figuur 3. Schematische weergave van de gebruikte dubbel-isotoop methode ter bepaling van de secretiesnelheid van corticosteron.

radioactieve metaboliet op de chromatogrammen wordt vastgesteld door de radioactiviteit op de papierstrook of de silicagellaag te registreren door middel van een scan-apparaat. Van het diacetaat wordt na de drie verschillende chromatografische stappen de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -verhouding gemeten, waaruit blijkt of de zuiverheid van de metaboliet aanvaardbaar is. De vorming van het diacetaat is in figuur 4 weergegeven.

### 3.2. Reagentia, materialen en apparatuur

Voor een uitvoerige beschrijving van de reagentia, het materiaal en de gebruikte apparatuur zij verwezen naar de dissertatie van Benraad (1966).



Figuur 4. Reactievergelijking bij de bepaling van de specifieke activiteit van de metaboliet.

1,2-<sup>3</sup>H-corticosteron werd betrokken van New England Nuclear Corporation. De specifieke activiteit van de gebruikte preparaten was volgens opgave 33,9 mC/mmol. Aan de inhoud van de ampullen werd absolute ethanol toegevoegd. De zo verkregen stam-oplossing bevatte ongeveer  $20 \times 10^6$  dpm <sup>3</sup>H/ml. Het preparaat werd bij -4°C bewaard en maandelijks op zuiverheid gecontroleerd. Daartoe werd het gechromatografeerd op papier in het systeem cyclohexaan-benzeen-methanol-water, 5 : 10 : 10 : 4. Van het chromatogram werd een radioactiviteits-scan vervaardigd, waarmee werd nagegaan of ontleding had plaats gevonden. Er werd steeds een enkelvoudige piek verkregen op de plaats van corticosteron met een verwaarloosbare hoeveelheid radioactiviteit daarnaast (minder dan 2%).

<sup>14</sup>C-azijnzuuranhydride (azijnzuur-1-<sup>14</sup>C-anhydride) werd eveneens betrokken van New England Nuclear Corporation. De specifieke activiteit van het preparaat was volgens opgave 10 mC/mmol (20% in benzeen). De inhoud van de ampul werd verdund met ongemerkt azijnzuuranhydride (20% v/v in benzeen) tot oplossingen met een specifieke activiteit van 0,2 en 0,02 mC/mmol. Deze werd op de gebruikelijke wijze gecontroleerd (Benraad 1966).

β-glucuronidase - Suc d'Helix Pomatia - werd betrokken van de Industrie Biologique Française S.A. De activiteit van het preparaat is volgens de producent 100.000 E/ml aan β-glucuronidase en 50.000 E/ml aan sulfatase.

### 3.3. Uitvoering van de bepaling

#### Injectie van de speurdosis $^3\text{H}$ -corticosteron

Van de alcoholische stam-oplossing van  $^3\text{H}$ -corticosteron wordt ongeveer 1 ml in een weefglesje gebracht en nauwkeurig gewogen. Vervolgens wordt deze oplossing in een injectiespuit opgetrokken en gemengd met de reeds hierin aanwezige 10 ml 5% glucose-oplossing. Het weefglesje wordt daarna weer gewogen. De inhoud van de injectiespuit wordt langzaam intraveneus geïnjecteerd over een periode van enkele minuten. De injectiespuit wordt vervolgens met dichloormethaan gespoeld, waarna het dichloormethaan wordt afgedampt en de radioactiviteit van het residu wordt gemeten. Uit de twee wegingen kan, met correctie van de in de injectiespuit achtergebleven  $^3\text{H}$ -radioactiviteit, de hoeveelheid  $^3\text{H}$ -corticosteron die werd toegediend, worden berekend. Wanneer het gewenst is over dezelfde periode de secretiesnelheid van aldosteron te meten dan kan tezamen met de speurdosis  $^3\text{H}$ -corticosteron een speurdosis  $^3\text{H}$ -aldosteron geïnjecteerd worden.

#### Verzameling van de urine

De speurdosis  $^3\text{H}$ -corticosteron wordt aan het begin van de meting om 8.30 uur in de ochtend toegediend. Vóór de injectie wordt de proefpersoon verzocht de blaas te ledigen. Na deze injectie wordt de urine over een periode van 24 uur (eventueel 48 uur) verzameld. Het volume van de urine wordt gemeten en de volledigheid van de verzameling wordt gecontroleerd door bepaling van de kreatinineuitscheiding. Gedurende de periode van verzameling van de urine houdt de proefpersoon volledige bedrust. Indien de urine niet direct wordt opgewerkt, dan wordt deze op pH 4,5 gebracht en bij  $-20^{\circ}\text{C}$  weggezet.

#### Vóórextractie en enzymatische hydrolyse

Van de 24-uurs urine wordt 1/25 deel genomen dat tweemaal met een gelijk volume dichloormethaan wordt geëxtraheerd. Vervolgens wordt deze vóórgeëxtraheerde urine met geconcentreerd azijnzuur op pH 4,5 gebracht met behulp van een pH-meter. Na toevoeging van  $\beta$ -glucuronidase tot een concentratie van 1000 E/ml urine, wordt de urine 48 uur bij  $37^{\circ}\text{C}$  buiten het licht weggezet. Na deze hydrolyseperiode wordt de pH van de urine opnieuw gecontroleerd.

### Extractie, wassing en vloeistof/vloeistof verdeling

De urine wordt éénmaal geëxtraheerd met het tienvoudige volume dichloormethaan, waarbij gedurende enkele minuten krachtig wordt geschud. Het dichloormethaanextract wordt afgescheiden en gewassen met éénmaal 0,1 volumedeel 1N NaOH, tweemaal 0,1 volumedeel 0,1 N NaOH en vervolgens gedestilleerd water. Dit gewassen extract wordt watervrij gemaakt met anhydrisch natriumsulfaat. Na filtratie wordt het oplosmiddel verdampt bij 30°C met behulp van een roterende vacuümverdamer. Het residu wordt opgelost in 8 ml 70% methanol en vervolgens tweemaal krachtig geschud met 2 ml van een mengsel petroleumether-tolueen, 1 : 1 (v/v), waarna de bovenlaag door aspiratie wordt verwijderd. Het waterig-methanolisch extract wordt drooggedampt waarna aan het residu 3 ml gedestilleerd water wordt toegevoegd. Vervolgens wordt het waterig extract driemaal met 4 ml dichloormethaan geëxtraheerd. De samengevoegde dichloormethaan-oplossingen worden verdampt en het residu wordt wederom in een bekende hoeveelheid dichloormethaan opgelost. Een gedeelte van dit dichloormethaan-extract wordt gebruikt voor een meting van de <sup>3</sup>H-radioactiviteit. De rest wordt gechromatografeerd.

### Chromatogram I (dlc)

Het extract wordt in een smalle band van 2½ cm lengte op de basislijn opgebracht met aan weerszijden het referentiesteroïd aldosteron. Men heeft aldosteron als referentiesteroïd nodig omdat het in tegenstelling tot tetrahydro-steroïden door zijn  $\Delta^4$ -3-keto-groep gedetecteerd kan worden in U.V.-licht. De silicagelplaat wordt twee keer gechromatografeerd in systeem 1 en vervolgens eenmaal in systeem 2. Tabel 5 vermeldt de gebruikte systemen en de Rf-waarde van het referentiesteroïd. Na de chromatografie wordt de plaats van het referentiesteroïd aldosteron onder U.V.-belichting vastgesteld. Vervolgens wordt de radioactiviteitsverdeling over het chromatogram geregistreerd. De zone die het radioactieve THB en allo-THB bevat wordt in het elutie-apparaat afgezogen en geëluëerd met 10 ml ethanol. Van dit eluaat wordt 2½% gebruikt voor het meten van de <sup>3</sup>H-radioactiviteit.

### Chromatogram II (dlc)

Het geconcentreerde eluaat wordt, na opbrengen in een smal bandje

T a b e l 5

Overzicht van de gebruikte chromatografiesystemen en van de Rf-waarden van TIIB, allo-THB en enkele referentiesteroïden

chromatogram	sys- teem	loopvloeistof	Rf-waarde
I dlc *)	1	chloroform-ethanol 99:1 (v/v)	aldosteron 0,43
	1	chloroform-ethanol 99:1 (v/v)	cortisol 0,25
	2	chloroform-methanol-water 94:6:0,5 (v/v)	THB 0,40 allo-THB 0,41
II dlc *)	3	chloroform-aceton-water 60:40:0,5 (v/v)	aldosteron 0,30
			cortisol 0,43
			THB 0,35
			allo-TIIB 0,35
III pc **)	4	cyclohexaan-benzeen-methanol- water 100:100:100:50 (v/v)	THB 0,53
			allo-THB 0,65
IV dlc *)	5	chloroform-aceton 98:2 (v/v)	THB 0,02
			TIIB-monoacetaat 0,10
			aldosteron-diacetaat 0,23
			TIIB-diacetaat 0,35
			allo-THB-diacetaat 0,35
V pc **)	6	cyclohexaan-benzeen-methanol- water 100:25:100:10 (v/v)	THB-diacetaat 0,82
			allo-THB-diacetaat 0,80
			TIIB-monoacetaat 0,50
			allo-THB-monoacetaat 0,50
VI dlc *)	7	chloroform-aceton 95:5 (v/v)	aldosteron-diacetaat 0,31
			THB-diacetaat 0,46
			allo-THB-diacetaat 0,46

\*) dlc: dunnelaagchromatografie; \*\*) pc: papierchromatografie

van 1 cm lengte, op een dunnelaag gechromatografeerd in systeem 3. Aan weerszijden wordt als referentiesteroïd weer aldosteron opgebracht. Na chromatografie wordt de plaat 'gescanned' en de zone overeenkomend met de radioactiviteitspiek wordt na vergelijking met de loopafstand van het referentiesteroïd geëluëerd, zoals boven beschreven. Van het eluaat wordt 5% genomen voor radioactiviteitstelling.

#### Chromatogram III (pc)

Het eluaat van het dunnelaagchromatogram II wordt in een smal bandje met een lengte van 1 cm op de startlijn van een papierchromato-

gram gebracht. Na chromatografie in systeem 4 wordt de radioactiviteitsverdeling over de papierstrook geregistreerd, met behulp van de papierchromatogram-scanner. De zones van de twee onderscheiden radioactiviteitspieken, welke overeenkomen met respectievelijk THB en allo-THB, worden met 10 ml ethanol geelueerd. Van deze eluaten wordt 5% genomen voor de telling van de  $^3\text{H}$ -radioactiviteit. De metaboliet met de grootste opbrengst wordt geacetylerd in een daartoe bestemde acetyleringsbuis. Om de laatste waterresten te verwijderen wordt deze buis direct vóór acetylering gedurende 3 uur in vacuo gedroogd boven calciumchloride.

### Acetylering

In de punt van de acetyleringsbuis wordt 0,035 ml pyridine en 0,025 ml  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride\*) gebracht, en de inhoud goed gemengd met behulp van een Vortex-mixer. Dit mengsel wordt gedurende 20 uur bij  $37^\circ\text{C}$  geïncubeerd. Na de acetylering wordt 5 ml tetrachloorkoolstof en 1 ml 20% ethanol toegevoegd. Het mengsel wordt geschud en de waterig-alcoholische bovenlaag wordt verwijderd. Deze wassing van de tetrachloorkoolstof waarmee de overmaat azijnzuuranhydride wordt verwijderd wordt éénmaal herhaald en de zuivering afgesloten met 2 wassingen met 1 ml gedestilleerd water.

### Chromatogram IV (dlc)

Het gezuiverde acetyleringsproduct wordt op een silicagellaag gechromatografeerd in systeem 5. Als referentiesteroïd wordt nu aldosterondiacetaat gebruikt. Na chromatografie wordt de radioactiviteitsverdeling over de plaat geregistreerd. Het diacetaat van THB en van allo-THB heeft in dit systeem een R-aldosterondiacetaat-waarde van 1,5. De zone van de piek, met een R-aldosterondiacetaat van 1,5 wordt geelueerd. Van het eluaat wordt 10% gebruikt voor meting van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -verhouding.

---

\*) Afhankelijk van de te verwachten waarde van de secretiesnelheid wordt geacetylerd met de hoge (0,2 mC/mmol) of met de lage (0,02 mC/mmol) specifieke activiteit.

### Chromatogram V (pc)

Het ingedampde eluaat van het dunnelaagchromatogram wordt op de startlijn van een papierchromatogram gebracht. Na chromatografie in systeem 6 wordt de papierstrook 'gescanned'. De zone overeenkomende met de piek van de radioactiviteit wordt met 10 ml ethanol geëluëerd. Van dit eluaat wordt 20% gebruikt voor de bepaling van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -verhouding.

### Chromatogram VI (dlc)

Het eluaat van het chromatogram wordt ingedampt en op de dunnelaag gechromatografeerd in systeem 7. De verdeling van de radioactiviteit over de plaat wordt geregistreerd en de zone van de piek geëluëerd. Van dit eluaat wordt 50% genomen voor de meting van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -verhouding.

Hydrolyse van  $^3\text{H}$ -(allo-) $\Gamma$ HB- $^{14}\text{C}$ -diacetaat tot  $^3\text{H}$ -(allo-)THB- $^{14}\text{C}$ -monoacetaat

Mocht bij een bepaling geen constante  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio worden gevonden dan is het mogelijk door hydrolyse van het diacetaat tot het monoacetaat en daaropvolgende chromatografie een zeer efficiënte zuiveringsstap aan de procedure toe te voegen. In dit geval wordt het restant van het eluaat van het laatste dunnelaagchromatogram drooggedampt, waarna 1 ml 0,5%  $\text{KHCO}_3$  in methanol wordt toegevoegd. Na 8 uur hydrolyse bij  $20^\circ\text{C}$ , wordt het gevormde monoacetaat geëxtraheerd met 10 ml dichloormethaan. Het extract wordt op een papierchromatogram gebracht en gechromatografeerd in systeem 6. De plaats van het monoacetaat wordt na chromatografie bepaald met behulp van de 'scan'-apparatuur. Na elutie wordt het gehele eluaat gebruikt voor de meting van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -verhouding.

### Berekening van de secretiesnelheid van corticosteron

De secretiesnelheid wordt berekend uit de specifieke activiteit van de metaboliet en uit de toegediende dosis gemerkt corticosteron.

Secretiesnelheid van corticosteron in  $\mu\text{g}/24$  uur =  $\frac{a}{s} \times \frac{1}{R} \times M$  (xf)

a = aantal dpm  $^3\text{H}$ -corticosteron geïnjecteerd

s = specifieke activiteit van het azijnzuuranhydride dpm/ $\mu\text{mol}$ .

R = specifieke activiteit van de metaboliet,  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio (dpm  $^3\text{H}/\text{dpm}^{14}\text{C}$ )

M = moleculaire gewicht van corticosteron

(f = mol.gew. corticosteron : mol.gew. tetrahydrometaboliet =  $\frac{346.47}{350.49} = 0,99$ ; deze factor is in onze berekeningen niet opgenomen).



Voor de berekening van de specifieke activiteit van de geïsoleerde metabooliet wordt het gemiddelde genomen van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio's die gemeten zijn na het voorlaatste en na het laatste chromatogram.

#### § 4. TOETSING VAN DE METHODE

In deze paragraaf worden gegevens vermeld, waarmee de betrouwbaarheid en de bruikbaarheid van de methode werden vastgesteld.

##### 4.1. De specificiteit van de methode

###### 4.1.1. *Verantwoording van de gebruikte chromatografiesystemen*

Naarmate de metabooliet verder is gezuiverd vóór de acetylering, zal ná acetylering de zuiveringsprocedure eenvoudiger kunnen zijn. Bovendien is een scheiding tussen vrije steroïden gemakkelijker te realiseren dan tussen acetaten van steroïden die in polariteit minder van elkaar verschillen. Vandaar dat in deze methode drie achtereenvolgende chromatogrammen vóór acetylering zijn geïntroduceerd.

Op de eerste silicagelplaat is na twee 'runs' in het systeem chloroform-ethanol, 99:1 (v/v) een aantal chromogenen en U.V.-licht absorberende stoffen reeds gescheiden van de corticosteroïden die zich nog op de opbrengplaats bevinden. Een scheiding tussen THB en allo-THB van de tetrahydro-metaboolieten van cortisol en cortison werd verkregen door dezelfde plaat vervolgens te ontwikkelen in het systeem chloroform-methanol-water, 94:6:0,5 (v/v). Het scheidend vermogen van deze drie 'runs' gezamenlijk werd nagegaan door de loopsnelheid van de belangrijkste in de urine voorkomende steroïden te vergelijken met die van THB en allo-THB. De  $R_{\text{THB}}$ -waarden zijn opgegeven in tabel 6. THB en allo-THB zijn van het merendeel van de onderzochte steroïden gezuiverd, maar worden onderling in dit chromatografie-systeem niet gescheiden. Bij inspectie van de plaat na chromatografie onder U.V.-licht bleek diverse keren, dat in het gebied overeenkomend met de plaats van THB en allo-THB nog U.V.-licht absorberende stoffen aanwezig waren. Het eluaat van dit eerste chromatogram werd daarom op een tweede silicagelplaat gechromatografeerd in systeem 3 (chloroform-aceton-water, 60:40:0,5). Voor de scheiding van THB en allo-


5β-pregnaan-3α,11β,21-triol-20-on	tetrahydrocorticosteron	THB *)	1,00
5α-pregnaan-3α,11β,21-triol-20-on	allo-tetrahydrocorticosteron	allo-THB	1,03
5β-pregnaan-3α,21-diol-11-20-dion	tetrahydro-11-dehydrocorticosteron	THA	1,25
5β-pregnaan-3β,11β,21-triol-20-on	compound R		1,07
5β-pregnaan-3α,17α,11β,21-tetrol-20-on	tetrahydrocortisol	THF	0,29
5β-pregnaan-3α,17α,21-triol-11-20-dion	tetrahydrocortison	THIC	0,33
5α-pregnaan-3α,17α,11β,21-tetrol-20-on	allo-tetrahydrocortisol	allo-THF	0,35
5β-pregnaan-3α,11β,21-triol-18,20-dion	tetrahydroaldosteron	TH-aldosteron	0,53
5β-pregnaan-3α,17α,21-triol-20-on	tetrahydrodesoxycortisol	THS	1,20
5β-pregnaan-3α,21-diol-20-on	tetrahydrodesoxycorticosteron	THDOC	1,91
5α-pregnaan-17α,21,11β-triol-3,20-dion	dihydrocortisol-5α		0,88
5β-pregnaan-17α,21-diol-3,11,20-trion	dihydrocortison-5β		1,32
5α-pregnaan-17α,21-diol-3,11,20-trion	dihydrocortison-5α		1,44
5β-pregnaan-3α,11β,17α,20β,21-pentol	β-cortol		0,10
5β-pregnaan-3α,17α,20α,21,11β-pentol	α-cortol		0,13
5β-pregnaan-3α,17α,20β,21-tetrol-11-on	β-cortolon		0,19
5β-pregnaan-3α,17α,20α,21-tetrol-11-on	α-cortolon		0,21
4 -pregneen-11β,17α,21-triol-3,20-dion	cortisol	F	0,62
4 -pregneen-11β,21-diol-3,18,20-trion	aldosteron		1,00
4 -pregneen-17α,21-diol-3,11,20-trion	cortison	E	1,17
4 -pregneen-6β,21-diol-3,11,20-trion	6β-hydroxy-11-dehydrocorticosteron	6β-hydroxy-A	1,33
4 -pregneen-17α,21-diol-3,20-dion	desoxycortisol	S	1,57
4 -pregneen-11β,21-diol-3,20-dion	corticosteron	B	1,87
4 -pregneen-21-ol-3,11,20-trion	11-dehydrocorticosteron	A	1,97
4 -pregneen-21-ol-3,20-dion	desoxycorticosteron	DOC	2,44
1,3,5(10)-estratrieen-3,16α,17β-triol	oestriol		0,51
1,3,5(10)-estratrieen-3,17β-diol	oestradiol-17β		1,92
1,3,5(10)-estratrieen-3-ol-17-on	oestron		2,47
5β-pregnaan-3α,20α-diol	pregnaandiol		1,92
5β-pregnaan-3α,17α,20α-triol	pregnaantriol		0,73
5β-androstaan-3α-ol-17-on	etiocolanolon		2,03
5α-androstaan-3α-ol-17-on	androsteron		2,87
5 -androsteen-3β-ol-17-on	dehydroepiandrosteron		2,50

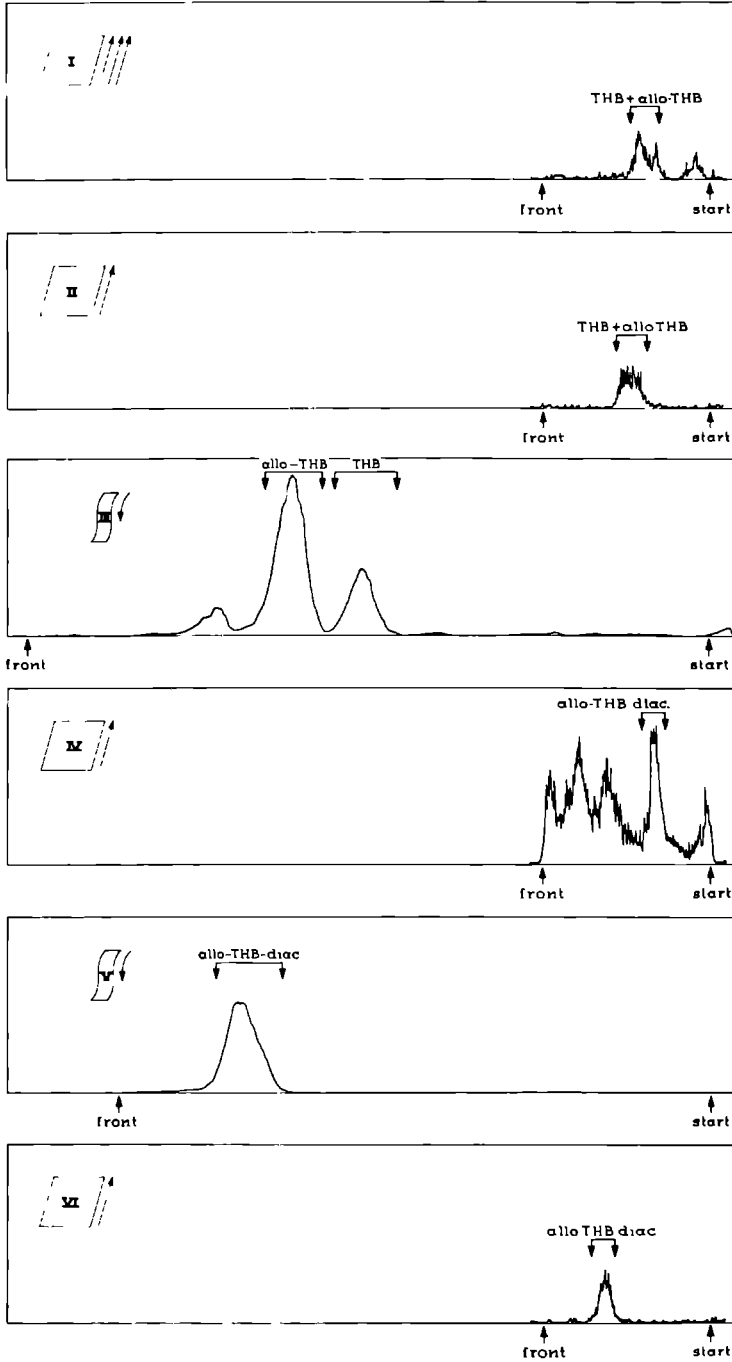
THB werd het eluaat van het dunnelaagchromatogram op papier in het systeem: benzeen-cyclohexaan-methanol-water 60:60:60:30 (v/v) gechromatografeerd. In dit systeem werd een duidelijke scheiding verkregen tussen beide metabolieten. De  $R_{\text{THB}}$ -waarde van allo-THB was gemiddeld 1,23. Ook bij de zuivering van het acetyleringsproduct wordt adsorptiechromatografie op silicagellagen afgewisseld met een verdelingschromatogram op papier. Na acetylering wordt het acetyleringsproduct eerst gechromatografeerd op een silicagellaag. In dit systeem wordt het diacetaat gescheiden van het monoacetaat en van de eventueel niet geacetylerde metaboliet. Ondanks een uitvoerige zuivering vóór de acetylering en een uitgebreide wasprocedure nadien is het diacetaat nog met een relatief grote hoeveelheid aspecifiek, met  $^{14}\text{C}$ -gemerkt, materiaal gecontamineerd. Dit moge blijken uit de radioactiviteits-scan van figuur 5. De scan van het daaropvolgende papierchromatogram toont reeds een enkelvoudige piek, hetgeen een aanwijzing is voor radiochemische zuiverheid. Deze wordt nog getoetst met behulp van het laatste dunnelaagchromatogram.

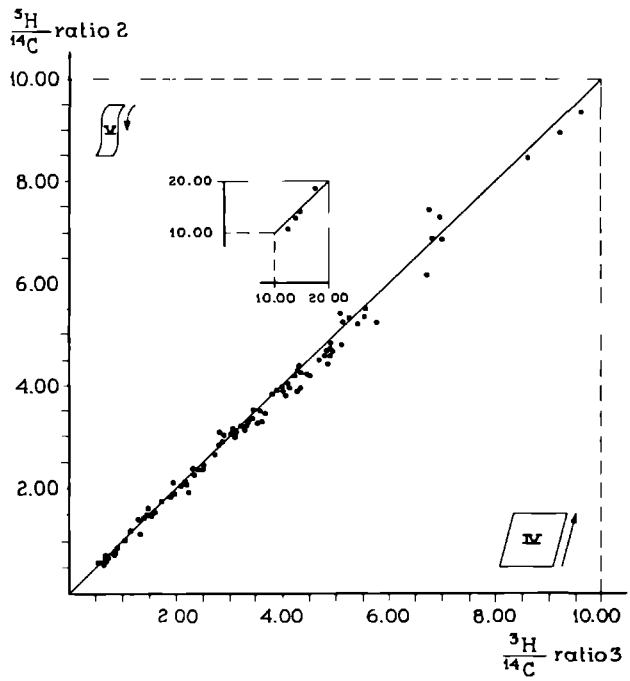
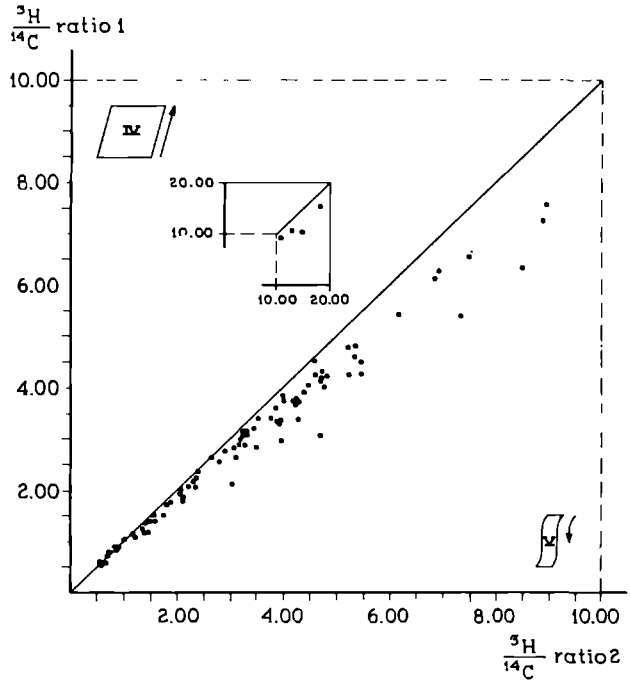
#### 4.1.2. De $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio als criterium voor de specificiteit

Indien het diacetaat zuiver is, zal de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio na voortgezette chromatografie constant moeten blijven. De  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio's die in een 90-tal bepalingen werden verkregen na de drie opeenvolgende chromatogrammen zijn in figuur 6 weergegeven. In de bovenste helft is op de ordinaat de ratio vóór papierchromatografie (ratio 1) en op de abscis de ratio na papierchromatografie (ratio 2) uitgezet. Bij hoge ratio's, dus wanneer de secretiesnelheid laag is, treedt tijdens de papierchromatografie nog een aanmerkelijke zuivering van het diacetaat op. In de onderste helft van de figuur is de tweede ratio op de ordinaat en de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio na de laatste dunnelaagchromatografie (ratio 3) op de abscis uitgezet. Zowel bij hoge als bij lage ratio's blijkt een nagenoeg constante  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -verhouding te zijn bereikt.

---

Figuur 5. Radioactiviteits-scans van dunnelaag- en papierchromatogrammen welke in de methode achtereenvolgens worden toegepast. 





#### 4.1.3. De hydrolyse van $^3\text{H}$ -(allo-)THB- $^{14}\text{C}$ -diacetaat tot $^3\text{H}$ -(allo-)THB- $^{14}\text{C}$ -monoacetaat als criterium voor de specificiteit

Naast het constant blijven van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio bij voortgezette chromatografie als aanwijzing voor een verregaande zuiverheid van het geïsoleerde diacetaat kan nog een ander zuiverheidscriterium worden gehanteerd. Indien door hydrolyse van het diacetaat één van de  $^{14}\text{C}$ -acetaat-groepen wordt afgesplitst zal de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio van het gevormde monoacetaat het dubbele moeten bedragen van de ratio van het diacetaat waarvan werd uitgegaan. Door hydrolyse met  $\text{KHCO}_3$  in methanol, zoals in § 3 is beschreven, wordt selectief de  $^{14}\text{C}$ -acetaat groep aan koolstofatoom 21 afgesplitst. Als gemiddelde opbrengst van de hydrolyse en de daarop volgende papierchromatografische zuivering werd ongeveer 60% gevonden. De Rf-waarde van beide monoacetaten in het chromatografisch systeem V (pc) was 0,50. De vorming van het allo-THB-monoacetaat of THB-monoacetaat als zuiverheidscriterium werd toegepast in 30 bepalingen. De resultaten hiervan zijn weergegeven in tabel 7. In de tabel zijn twee zuiverheidscriteria opgenomen. In de eerste kolom staat het verschil tussen de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio's van het diacetaat na het laatste en het voorlaatste chromatogram, uitgedrukt in procenten van de voorlaatste ratio, als  $\Delta$ -ratio vermeld. In deze 30 waarnemingen werd een gemiddelde  $\Delta$ -ratio gevonden van + 2,1%, met een standaard-deviatie van 4,6. Dit gegeven duidt erop dat het diacetaat vóór de laatste chromatografie verregaand zuiver is. In de laatste kolom staat de factor waarmee de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio is toegenomen ten gevolge van de hydrolyse van het diacetaat. Theoretisch moet deze factor 2 bedragen. Voor de 30 bepalingen bedroeg deze hydrolyse-factor gemiddeld 2,02 met een standaard-deviatie van 0,09. De gemeten waarde van de hydrolysefactor bevestigt dat het zuiverheidscriterium, gebaseerd op een constante ratio, gefundeerd is.

Deze hydrolyseprocedure kan met vrucht gebruikt worden in die

---

◀ Figuur 6. Het constant blijven van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio als criterium van de specificiteit. In het bovenste deel van de figuur is de relatie weergegeven tussen  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio's 1 en 2, respectievelijk voor en na papierchromatografie. In het onderste deel van de figuur is de relatie weergegeven tussen  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio's 2 en 3, respectievelijk voor en na het laatste dunnelaagchromatogram. Elk punt heeft betrekking op één van de in totaal 90 bepalingen.

T a b e l 7

De  $\Delta$ -ratio en de hydrolyse-factor als criteria voor de specificiteit

Waarneming no.	$\Delta$ -ratio in % )	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio		Hydrolyse- factor
		diacetaat	monoacetaat	
1	6,2	0,61	1,22	2,00
2	- 2,8	0,69	1,41	2,04
3	- 5,1	0,70	1,43	2,04
4	7,3	0,89	1,76	1,98
5	5,5	0,89	1,75	1,97
6	0	0,90	1,79	1,99
7	3,8	1,05	2,13	2,03
8	- 6,9	1,48	3,04	2,05
9	3,2	1,52	3,20	2,10
10	- 1,6	1,72	3,38	1,96
11	0,4	1,95	3,87	1,98
12	- 7,5	2,11	4,30	2,02
13	6,4	2,20	5,11	2,32
14	5,0	2,35	4,41	1,88
15	5,6	2,51	5,07	2,02
16	1,7	2,83	5,73	2,03
17	- 3,1	3,08	5,93	1,92
18	2,1	3,27	6,65	2,03
19	2,5	3,37	6,95	2,06
20	8,4	3,56	7,08	1,99
21	5,0	3,66	7,70	2,10
22	1,8	4,11	8,46	2,05
23	1,2	4,23	8,98	2,12
24	4,9	4,46	8,49	1,87
25	4,9	4,70	9,09	1,93
26	4,1	5,00	9,32	1,86
27	3,5	5,55	10,45	1,89
28	- 1,0	6,83	14,12	2,07
29	2,4	7,00	15,33	2,19
30	6,3	13,46	27,96	2,08
Gemiddelde	+ 2,1			2,02
SD	4,6			0,09

In deze tabel zijn die waarnemingen opgenomen, waarbij de secretiesnelheid is berekend met de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio van het diacetaat, maar waarbij tevens hydrolyse van dit diacetaat werd verricht.

\*)  $\Delta$ -ratio is het verschil tussen de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio's van het diacetaat na de voorlaatste en de laatste chromatografie, uitgedrukt in procenten van de eerstgenoemde ratio.

gevallen wanneer mocht blijken dat tijdens de bepaling geen constante  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio wordt verkregen. De ratio van het diacetaat na de laatste chromatografie kan worden vergeleken met de ratio van het monoacetaat.

## 4.2. De gevoeligheid van de methode

Bij een gegeven specifieke activiteit van het azijnzuuranhydride hangt de gevoeligheid van de bepaling af van de blancowaarde. De blancowaarde wordt gerepresenteerd door de hoeveelheid  $^{14}\text{C}$ -gemerkt specifiek materiaal waarmee het  $^{14}\text{C}$ -diacetaat is verontreinigd. Een zeer belangrijk voordeel van dubbel-isotoop methoden boven andere technieken is, dat bij iedere afzonderlijke bepaling kan worden vastgesteld in hoeverre de blanco de meting beïnvloedt. Onder 'specificiteit' werd beschreven op welke wijze de radiochemische zuiverheid van het steroïdacetaat kan worden getoetst. Een constante  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio en een juiste hydrolysefactor zullen niet gevonden worden wanneer te veel specifiek  $^{14}\text{C}$ -gemerkt materiaal aanwezig is.

In welke orde van grootte de blancowaarde minimaal zal liggen, werd nagegaan in experimenten waarin gedestilleerd water respectievelijk urine van een patiënt zonder bijniere door de bepaling werd gevoerd. In tabel 8 is het aantal dpm  $^{14}\text{C}$  weergegeven dat werd gemeten in het eluaat van het voorlaatste chromatogram (chromatogram V (pc)). Het gemiddelde van de waarden is 314 dpm  $^{14}\text{C}$ . Het aantal dpm  $^{14}\text{C}$  dat bij de diverse secretiemetingen in het overeenkomstig papiereluaat werd geteld was op zijn minst 10 maal zo groot en gemiddeld 20 maal zo

T a b e l 8

Blancowaarden van de bepaling, gemeten aan water, respectievelijk aan urine van een patiënt zonder bijniere

Experiment	Activiteit van $^{14}\text{C}$ op de diacetaatplaats van het papierchromatogram in dpm $^{14}\text{C}$
water 1	122
2	210
3	215
4	250
5	298
6	480
urine 1	450
2	485



groot. Vergelijken wij deze waarden dan kan de blanco waarde ruwweg geschat worden op 5% van de gemiddelde secretiewaarde.

In bovengeschetste experimenten werd  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride gebruikt van een specifieke activiteit van 0,2 mC/mmol. In die gevallen waarin lagere secretiesnelheden werden verwacht dan 1,5 mg per 24 uur werd azijnzuuranhydride gebruikt met een specifieke activiteit van 2 mC/mmol. Bij een overeenkomstig onderzoek waarin water door de bepaling werd gevoerd, en waarin azijnzuuranhydride werd gebruikt met een specifieke activiteit van 2 mC/mmol, bleek de blanco waarde eveneens lager te zijn dan 10% van de radioactiviteit van het  $^{14}\text{C}$ -gemerkt diacetaat.

#### 4.3. Opbrengst van diverse stappen van de methode

De opbrengst van  $^3\text{H}$ -THB dat aan de urine vóór hydrolyse werd toegevoegd, was tot aan de acetyleringsstap in twee experimenten 42% en 48%.

De opbrengsten van de acetylering in een 24-tal bepalingen zijn weergegeven in tabel 9. Gemiddeld bedroeg de opbrengst 57%. Ook vindt men in deze tabel de opbrengsten die werden verkregen tijdens papier- en dunnelaagchromatografie met gemiddelden van respectievelijk 92% en 89%. Deze waarden zijn in overeenstemming met die welke door andere onderzoekers met vergelijkbare methoden worden opgegeven (Kliman en Peterson-1960, Benraad-1966). Uit deze gegevens kan worden berekend dat de opbrengst van de gehele procedure ruim 20% bedraagt. Hierbij mag worden opgemerkt dat isotoop-verdunningsmethoden juist daarom bruikbaar zijn omdat de uiteindelijke opbrengst die met deze bepalingstechnieken wordt verkregen geen belangrijke rol speelt bij de berekening van het resultaat.

#### 4.4. De nauwkeurigheid van de methode

Slechts wanneer de specificiteit van een methode gewaarborgd is kan een bevredigende nauwkeurigheid worden verwacht. Omtrent de specificiteit van de methode werd in de vorige paragraaf verantwoording afgelegd. Een aantal experimenten werd verricht om de nauwkeurigheid van de methode nader te toetsen.

T a b e l 9

Opbrengst van de metaboliet na acetylering  
en van de daarop volgende chromatografische stappen als percentage  
van de vóór elke stap aanwezige  $^3\text{H}$ -radioactiviteit

Persoon	Acetylering en eerste dunnelaag- chromatogram	Papier- chromatogram	Dunnelaag- chromatogram
	gemiddeld	gemiddeld	gemiddeld
1	68 45 56 49 42 55 53	94 97 95 93 92 95 94	83 93 98 91 92 95 92
2	80 97 84 80 72 40 77	93 87 91 92 98 96 93	102 78 91 88 97 85 90
3	63 55 54 58	84 91 88 88	92 89 89 90
4	59 61 55 58	89 94 91 91	89 87 92 89
5	34 38 33 35	91 95 84 90	83 83 94 87
6	48 44 43 45	97 92 90 93	82 86 85 84
Gemiddeld	57	92	89

Voor de meting van de secretiesnelheid van corticosteron kan zowel van THB als van allo-TIIB gebruik worden gemaakt. Er werd nagegaan

T a b e l 10  
 Vergelijking van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio's  
 verkregen door opwerking van twee metabolieten uit één urinemonster

Waarneming no.	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio		$\frac{\text{THB-allo-THB}}{\text{THB}} \times 100$
	THB- diacetaat	allo-THB- diacetaat	
1	0,69	0,66	4,3
2	1,14	1,03	10,0
3	1,20	1,20	0
4	1,60	1,51	5,7
5	2,10	1,94	7,6
6	3,97	4,06	- 2,2
7	4,14	4,11	0,7
8	4,14	4,23	- 2,2
9	4,30	4,34	- 1,0
10	4,59	4,74	- 3,2
11	5,14	4,97	3,3
12	8,14	8,95	- 10,0
13	14,22	13,04	8,2
		Gemiddelde	1,6
		SD	5,6

of meting van de specifieke activiteit van deze afzonderlijke metabolieten overeenkomstige resultaten oplevert. Bij 13 proefpersonen werden deze specifieke activiteiten beide bepaald. In tabel 10 zijn de resultaten samengevat van de metingen van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio's van THB en allo-THB. Er blijkt een treffende overeenkomst tussen deze ratio's te bestaan; maximaal bedroeg het verschil 10%, gemiddeld 1,6%. Gemeten aan de beide afzonderlijke metabolieten zal de grootste afwijking van de secretiesnelheid nooit veel groter dan 10% zijn.

Een andere controle op de nauwkeurigheid werd gevonden in het volgende experiment. Bij een patiënt waarbij beide bijniereen operatief waren verwijderd en die als onderhoudstherapie cortison en  $9\alpha$ -fluorohydrocortison gebruikte, werd een mengsel van  $^3\text{H}$ -corticosteron en niet-gemerkt corticosteron toegediend. De specifieke activiteit van het ge-

injeceerde corticosteron was  $1,23 \times 10^6$  dpm  $^3\text{H}/\text{mg}$ . De secretiesnelheidsmeting werd op de gebruikelijke wijze verricht en ook in dit geval werd de specifieke activiteit van beide metaboliëten bepaald. De specifieke activiteit van het geïsoleerde THB-diacetaat bedroeg  $1,22 \times 10^6$  dpm  $^3\text{H}/\text{mg}$ , die van het allo-THB-diacetaat bedroeg  $1,35 \times 10^6$  dpm  $^3\text{H}/\text{mg}$ . Dit resultaat is opnieuw een goede illustratie van de nauwkeurigheid van de gebruikte methode.

T a b e l 11  
De uitkomst van de bepaling van de secretiesnelheid  
van corticosteron  
bij gebruik van verschillende enzym-preparaten

Urinemonsters	Secretiesnelheid van corticosteron mg/24 uur	
	Helix-pomatia	Glucuronidase (bacterieel)
1	6,9	7,1
2	7,6	7,0
3	2,3	2,6

In de in dit hoofdstuk besproken methodiek wordt voor de hydrolyse gebruik gemaakt van het enzympreparaat uit Helix Pomatia dat behalve  $\beta$ -glucuronidase ook sulfatase bevat. Onze methode wijkt op dit punt af van de meeste andere bepalingmethoden waarin een zuiver glucuronidasepreparaat wordt gebruikt. In hoeverre dit verschil de bepaling beïnvloedt werd nagegaan bij een drietal secretiemetingen. De voorgezuiverde urines werden zowel met het door ons gebruikte enzympreparaat als met zuiver  $\beta$ -glucuronidase gehydrolyseerd. De daaropvolgende behandeling van het hydrolysaat was identiek. Het resultaat van deze duplo-metingen is samengevat in tabel 11. Er blijkt een zeer goede overeenkomst tussen deze metingen te bestaan.

Een factor die de nauwkeurigheid van de meting wel beïnvloedt is de snelheid van uitscheiding van de metaboliëet waaraan de secretie wordt gemeten. Na injectie van de speurdosis blijkt de uitscheiding van de radioactiviteit zich niet tot de eerste dag te beperken (zie hoofdstuk 1).

T a b e l 12  
 Uitscheiding van de  $^3\text{H}$ -radioactiviteit  
 gemeten in de glucuronidase-extracten  
 in de eerste en tweede 24-uurs periode na injectie van de speurdosis  
 uitgedrukt in procenten  
 van de ingespoten hoeveelheid dpm  $^3\text{H}$ -corticosteron

Waarneming	Eerste 24-uurs periode	Tweede 24-uurs periode	$\Delta$ -waarde *)
1	42	7,7	15
2	42	8,4	16
3	33	8,9	22
4	30	5,8	16
5	23	4,4	16
6	33	5,9	15

\*) De  $\Delta$ -waarde betekent hier de uitscheiding gedurende de tweede 24-uurs periode als percentage van de hoeveelheid die over 48 uur wordt uitgescheiden.

In een onderzoek waarbij werd nagegaan hoe de uitscheiding van getri-  
 tiëerde tetrahydro-metaboliëten over de dagen na injectie is verdeeld,  
 werd geconstateerd dat gemiddeld 17% van de uitgescheiden hoevee-  
 lheid, in de urine van de tweede dag wordt aangetroffen. De specifieke  
 activiteit van de op de eerste dag uitgescheiden metaboliëten zal dien-  
 tengevolge ten minste 17% te laag worden bevonden waardoor de secre-  
 tiesnelheid 17% te hoog wordt gemeten. De resultaten van dit onderzoek  
 zijn in tabel 12 opgenomen.

Ter nadere verificatie werd in een viertal waarnemingen de secretie-  
 snelheid van corticosteron bepaald met behulp van de specifieke acti-  
 viteit van de metaboliëten uit de eerste 24-uurs urine en uit de urine van  
 48 uur. Tabel 13 laat zien dat inderdaad de systematische fout aanwezig  
 is en wel in de orde van grootte van gemiddeld 15%. In de door ons  
 beschreven metingen werd zonder uitzondering gebruik gemaakt van  
 de verzameling van de metaboliëten over de eerste 24 uur. Aangezien  
 de personen waarbij wij onze waarnemingen hebben verricht allen een  
 normale glomerulusfiltratie hadden hebben wij deze systematische fout  
 geaccepteerd en volgden daarin vrijwel alle andere onderzoekers  
 (Peterson en Pierce-1960, Biglieri c.s.-1963 en Bledsoe c.s.-1964).

T a b e l 13

Vergelijking van de secretiesnelheid van corticosteron berekend uit de specifieke activiteit van de metaboliet in de urine van de eerste 24 uur en in de urine van de eerste 48 uur na injectie van de speurdosis  $^3\text{H}$ -corticosteron \*\*)

Waarneming	Secretiesnelheid corticosteron mg/24 uur		$\Delta$ -waarde *)
	24-uurs urine	48-uurs urine	
1	5,2	4,8	8
2	3,3	2,2	33
3	5,2	5,0	4
4	2,8	2,4	15

\*) De  $\Delta$ -waarde is in de tabel het verschil tussen de secretiesnelheden berekend over 48 respectievelijk 24 uur en uitgedrukt in procenten van de laatstgenoemde waarde.

\*\*) De glomerulusfiltratie was bij de personen bij wie deze waarnemingen werden verricht, geheel normaal.

De belangrijkste reden hiervoor was dat in een groot aantal waarnemingen, beschreven in de volgende hoofdstukken, effecten van ACTH, angiotensine en heparine werden bestudeerd in opstellingen waarin deze medicamenten gedurende 24 uur werden toegediend. In deze omstandigheden zou bepaling van de secretiesnelheid over 48 uur geen juiste weergave zijn van het, in de te onderzoeken 24 uur, waarneembare effect. Bovendien heeft de verzameling van de 48-uurs urine het bezwaar dat voor de detectie van de radioactieve metabolieten op de achtereenvolgende chromatogrammen een grotere hoeveelheid urine moet worden opgewerkt.

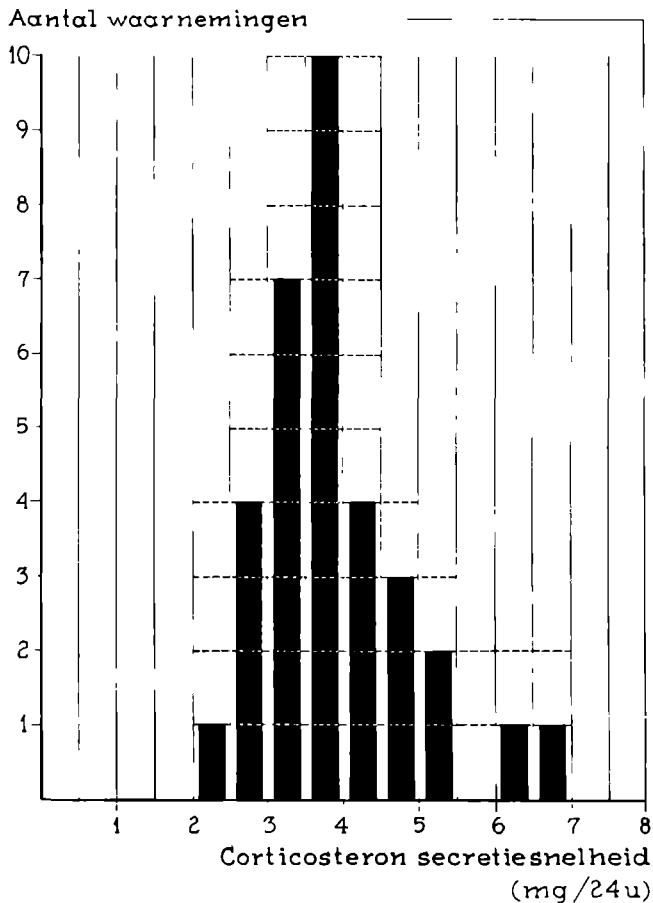
## § 5. DE SECRETIESNELHEID VAN CORTICOSTERON BIJ GEHOSPITALISEERDE PATIENTEN

Bij 20 opgenomen patienten, variërend in leeftijd van 19 tot 64 jaar, van wie mocht worden aangenomen dat zij niet leden aan enige aandoening die met stoornissen in de produktie en de stofwisseling van corticosteron gepaard zouden gaan, werden in totaal 41 metingen van de secretiesnelheid van dit hormoon verricht. Een aantal van deze

No. Geslacht Leeftijd	Klinische diagnose	Secretie- snelheid van corticosteron mg/24 uur	Secretie- snelheid van aldosteron*) µg/24 uur	Uitscheiding van 17-hydro- xycorticoste- roiden mg/24 uur
1 ♂62 jr	observatie wegens vermagering en diarree geen afwijkingen gevonden	2,3		9,0
2 ♀42 jr	observatie wegens kortademigheid en statisch oedeem: geen afwijkingen gevonden	2,8 2,8 3,0		5,5
3 ♂52 jr	observatie wegens buikklachten geen afwijkingen gevonden	2,8 3,1	370	12,0
4 ♂40 jr	ulcus duodeni	2,9 3,1	576	9,8
5 ♀17 jr	juvenile reumatoïde artritis	3,0 3,0	382	8,7
6 ♂60 jr	ulcus ventriculi	3,6 4,4		9,1
7 ♀35 jr	resttoestand virale myocarditis	3,7		11,8
8 ♂42 jr	ulcus duodeni	3,8 3,9		
9 ♀40 jr	chronische reumatoïde artritis	3,8 3,0 3,7 3,1	545	4,0
10 ♀62 jr	ulcus ventriculi	3,8 4,3		
11 ♂52 jr	ulcus duodeni	4,2	400	11,8
12 ♂28 jr	observatie wegens buikklachten na appendectomie	4,7 3,9 4,5	481	14,0
13 ♀44 jr	observatie wegens adipositas	4,9 3,8 4,3	379	12,5
14 ♂35 jr	observatie wegens aanvallen van hartkloppingen geen afwijkingen gevonden	5,1 3,5	272	9,5
15 ♂41 jr	observatie wegens diarree geen afwijkingen gevonden	5,2	331	10,2
16 ♂22 jr	spontane linkszijdige pneumothorax	5,2	799	19,2
17 ♂19 jr	ganglioneuroma achter de linker longtop	6,2 6,5	278	19,2
18 ♂28 jr	banale spondylitis	6,9 7,2	665	19,3
19 ♂44 jr	chronische reumatoïde artritis	7,6 7,1	638	15,2
20 ♂54 jr	ulcus duodeni	8,6 8,4 9,1	1010	23,1

metingen werd verricht tijdens het gebruik van een natriumhoudend dieet, in de overige gevallen was het dieet natriumarm. Uit hoofdstuk 3 zal blijken dat dergelijke dieetveranderingen geen significante wijzigingen in de secretiesnelheid van corticosteron veroorzaken. Bij enkele personen werd de meting verricht tijdens een 24 uur lopend infuus met een 5% glucose-oplossing.

In tabel 14 zijn de resultaten van de metingen bijeengezet dikwijls met gegevens over de uitscheiding van de 17-hydroxycorticosteroïden met de urine en de secretiesnelheid van aldosteron. Deze laatste bepalingen werden in deze serie alleen gedaan als de patiënten een



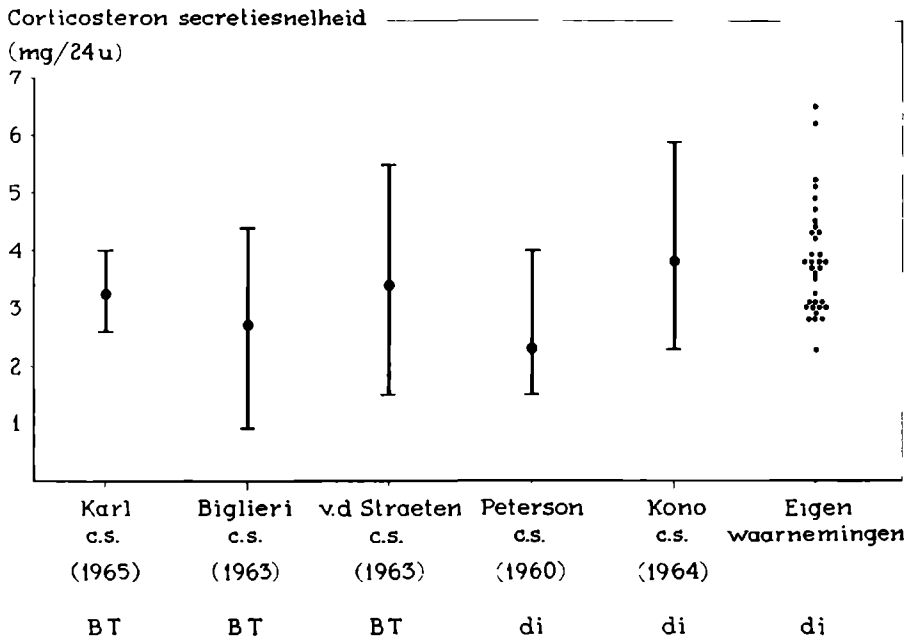
Figuur 7. Frekwentiediagram van 33 waarnemingen van de secretiesnelheid van corticosteron bij 16 gehospitaliseerde patiënten.



natriumarm dieet hielden. In de tabel zijn tevens de diagnoses vermeld die bij deze patiënten zijn gesteld. Om de spreiding van onze normale uitkomsten vast te kunnen leggen, werden alle metingen uitgesloten die werden verkregen bij patiënten bij wie de secretiesnelheid van aldosteron hoger bleek te zijn dan 600  $\mu\text{g}$  per 24 uur (patiënten met de nummers 16, 18, 19 en 20). Deze grens werd gelegd omdat Benraad en Kloppenborg bij gezonde mensen op een natriumarm dieet met dezelfde techniek als die welke bij dit onderzoek werd gebruikt secretiesnelheden voor aldosteron hebben gevonden van gemiddeld 366  $\mu\text{g}$  per 24 uur met een standaardafwijking van 84  $\mu\text{g}$ .

Onze uitkomsten variëren van 2,3 tot 6,5 mg per 24 uur met een gemiddelde van 3,8 mg per 24 uur (SD 1,0). Op grond van dit resultaat werd - enigszins arbitrair - 6,0 mg per 24 uur beschouwd als de uiterste waarde voor de secretiesnelheid van corticosteron bij normale personen. In figuur 7 is een frekwentiediagram van deze metingen uitgezet.

In figuur 8 zijn deze waarden gezet naast die van andere onderzoe-



Figuur 8. De secretiesnelheid van corticosteron bij gehospitaliseerde patiënten. De waarden zijn vergeleken met die uit de literatuur bij normale proefpersonen.

\*) BT = blauw-tetrazolium reactie, di = dubbel-isotoopverduunningsmethode

kers. Het blijkt, dat een groot deel van de uitkomsten, verkregen bij onze patiënten, vallen binnen de grenzen die door andere onderzoekers bij gezonde proefpersonen zijn gevonden. Nader onderzoek zal noodzakelijk zijn om de oorzaak aan te kunnen wijzen waarom enkele van de door ons onderzochte patiënten méér corticosteron produceren dan deze normale proefpersonen. Enkele gegevens van deze patiënten zijn hier vermeld.

#### KORTE ZIEKTEGESCHIEDENISSEN VAN PATIËNTEN 16, 18, 19 EN 20 UIT TABEL 14.

No. 16. Man, leeftijd 22 jaar.

Sedert een week opgenomen wegens een spontane linkszijdige pneumothorax. Lichaamslengte 174 cm, lichaamsgewicht 65 kg. Bloeddruk 125/70 mmHg. Bij het fysisch-diagnostisch onderzoek geen bijzonderheden. Laboratoriumonderzoek: bezinkingssnelheid van de erythrocyten 1 mm na een uur. Hemoglobinegehalte van het bloed 16,3 g per 100 ml. Endogene kreatinineklaring 110 ml per minuut. Plasmaconcentratie van natrium 140 meq/l, kalium 3,8 meq/l, chloride 99 meq/l en bicarbonaat 29,8 meq/l. Alkalische fosfataseactiviteit van het serum 2,5 mmol E. Medicatie: geen.

No. 18. Man, leeftijd 28 jaar.

Opgenomen wegens een spondylitis van de tweede lumbale wervel in aansluiting aan een half jaar tevoren doorgemaakte stafylococcensepsis ten gevolge van een panaritium. Lichaamslengte 175 cm, lichaamsgewicht 84 kg. Bloeddruk 125/85 mmHg. Behalve een gefixeerd gehouden lumbale wervelkolom bij het fysisch-diagnostisch onderzoek geen bijzonderheden. Laboratoriumonderzoek: bezinkingssnelheid van de erythrocyten 9 mm na een uur. Hemoglobinegehalte van het bloed 13,8 g per 100 ml. Endogene kreatinineklaring 118 ml per minuut. Plasmaconcentratie van natrium 145 meq/l, kalium 3,9 meq/l, chloride 105 meq/l en bicarbonaat 29,8 meq/l. Alkalische fosfataseactiviteit van het serum 2,9 mmol E. Medicatie: 4 maal per dag 500 mg cephalorin<sup>R</sup> (Glaxo).

No. 19. Man, leeftijd 44 jaar.

Opgenomen voor klinische behandeling van chronische reumatoïde artritis. Lichaamslengte 180 cm, lichaamsgewicht 75 kg. Bloeddruk 130/80 mmHg. Ontstekingsverschijnselen aan de gewrichten van polsen, vingers en enkels. Laboratoriumonderzoek: bezinkingssnelheid van de erythrocyten 71 mm na een uur. Hemoglobinegehalte van het bloed 12,4 g per 100 ml. Endogene kreatinineklaring 106 ml per minuut. Plasmaconcentratie van natrium 140 meq/l, kalium 3,5 meq/l, chloride 101 meq/l en bicarbonaat 27,8 meq/l. Alkalische fosfataseactiviteit van het serum 5,4 mmol E. Medicatie: 4 maal per dag 500 mg pyramidon en twee maal per week 100 mg auromyose.

No. 20. Man, leeftijd 54 jaar.

Opgenomen voor een klinische rust- en dieetkuur wegens recidiverende ulcera duodeni. Lichaamslengte 175 cm, lichaamsgewicht 76 kg, Bloeddruk 115/80 mmHg. Bij het fysisch-diagnostisch onderzoek geen bijzonderheden. Laboratoriumonderzoek bezinkingssnelheid van de erythrocyten 4 mm na een uur. Hemoglobinegehalte van het bloed 14,2 g per 100 ml. Endogene kreatinineklaring 96 ml per minuut. Plasmaconcentratie van natrium 138 meq/l, kalium 4,1 meq/l, chloride 102 meq/l en bicarbonaat 27,3 meq/l. Alkalische fosfataseactiviteit van het serum 2,4 mmol E. Medicatie 4 maal per dag 500 mg chloramfenicol.

## § 6. OVERIGE METHODEN

In de volgende hoofdstukken worden meetresultaten van de secretiesnelheid van corticosteron geplaatst tegen de achtergrond van andere gegevens over de functie van de bijnierschors en tegen de achtergrond van klinische waarnemingen, waarbij een aantal klinisch-chemische bepalingen werden verricht.

De totale 17-hydroxycorticosteroiden in de urine werden bepaald met de methode van Appleby c.s. (1955), de 17-ketosteroiden met de methode van Callow c.s. (1938). De 11-hydroxycorticosteroiden in de urine werden bepaald met de methode van Mattingly (1962) en in het plasma met de methode van de Moor c.s. (1960). De secretiesnelheid van aldosteron werd bepaald met de methode van Benraad en Kloppenborg (1965). De renine-activiteit van het plasma werd bepaald met een gewijzigde methode van Boucher c.s. (1964). Deze werd gewijzigd door de zuiveringsprocedure uit te breiden met een tweevoudige vlocistof/vloeistof partitie (Benraad, niet-gepubliceerde resultaten).

Natrium en kalium werden in plasma en urine vlamfotometrisch bepaald, bicarbonaat met de volumetrische methode van Van Slyke en chloride door elektrometrische titratie. Kreatinine werd in de urine bepaald met de alkalische pikraatmethode. Glucose werd in het bloed bepaald met kaliumferricyanide (colorimetrisch) met Auto Analyzer, hemoglobine met een alkalische hematinemethode en totaal eiwit van serum met de biureetmethode. Voor de uitvoering van deze methoden wordt verwezen naar de handboeken van klinische chemie van Gorter en De Graaff (1955) en Henry (1964).

### 3. De secretiesnelheid van corticosteron onder experimentele omstandigheden

#### § 1. INLEIDING

Over de secretiesnelheid van corticosteron bij de mens zijn weinig gegevens bekend. Mede daarom zal in dit hoofdstuk aandacht worden besteed aan gegevens die uit dierexperimenten zijn verkregen.

Achtereenvolgens worden literatuurgegevens en eigen waarnemingen besproken en van commentaar voorzien over de invloed van:

- a. het adrenocorticotrope hormoon (ACTH)
- b. het renine-angiotensine-systeem en verstoringen van de natriumbalans
- c. verstoringen van de kaliumbalans

#### § 2. DE INVLOED VAN ACTH OP DE SECRETIESNELHEID VAN CORTICOSTERON

##### 2.1. Literatuurgegevens

Hechter (1949b) toonde als eerste aan dat ACTH de produktie van corticosteroiden door bijnierweefsel van het rund in vitro stimuleert. Bush c.s. (1953) concludeerden dat ook de produktie van corticosteron bij de mens tijdens toediening van ACTH toeneemt. Peterson (1957a en b) stelde vast dat de concentratie van corticosteron in het plasma tijdens

ACTH-toediening tot tienmaal de uitgangswaarde stijgt. Stachenko en Giroud (1959b) en Kaplan en Bartter (1962) werkten met runderbijnierweefsel in vitro en zagen dat ACTH zowel in de zona glomerulosa als in de zona fasciculata de produktie van corticosteron stimuleert.

De wijze waarop ACTH de produktie van bijnierschorssteroiden doet toenemen, is niet met zekerheid bekend. Stone en Hechter (1954) maakten aannemelijk dat ACTH de omzetting van cholesterol in pregnenolon bevordert. Een aantal onderzoekers (Stachenko en Giroud-1959b, Lommer en Wolff-1966a) hebben deze waarneming later bevestigd. In 1957 werd door Haynes c.s. vastgesteld dat ACTH de fosforylase-activiteit van runderbijnierweefsel in vitro stimuleert. In 1958 deelde deze onderzoeker (Haynes-1958) mede dat bij incubatie van bijnierslices met ACTH, de weefselconcentratie van het cyclische adenosine-3'-5'-monofosfaat (cyclisch AMP) toeneemt. Bovendien werd in deze studie aangetoond dat ook bij incubatie met cyclisch AMP de fosforylase-activiteit stijgt. Haynes c.s. (1959) namen tevens waar dat cyclisch AMP de produktie van corticosteroiden stimuleert zoals ACTH. Indien zowel ACTH als cyclisch AMP aan het incubatie-medium werd toegevoegd, bleek het effect van beide stimulatoren niet cumulatief te zijn (Haynes c.s.-1959). Cyclisch AMP speelt dus een rol in de keten van reacties die verlopen bij de stimulering van de produktie van corticosteroiden door ACTH. De groep van Sutherland (Grahame-Smith c.s.-1967) hebben delen van dit onderzoek met bijnierweefsel van ratten herhaald en een aantal nieuwe argumenten verzameld die de rol van cyclisch AMP als intermediair van ACTH in de bijniercel benadrukken. Allereerst stelden zij vast dat de stijging van de weefselconcentratie van cyclisch AMP onder invloed van ACTH in de tijd duidelijk voorafgaat aan de stimulering van de corticoïdvorming. Stijgende concentraties ACTH veroorzaken toenemende concentraties cyclisch AMP. Zolang de verhoogde corticosteronproduktie na een gift van ACTH bleef aanhouden, was ook de concentratie van cyclisch AMP verhoogd. De biologische activiteit van structuurverwante analoga van ACTH liep parallel met hun vermogen de weefselconcentratie van cyclisch AMP te doen toenemen.

Op welke wijze cyclisch AMP de steroidensynthese in de cel bevordert is thans nog niet duidelijk. Aangenomen wordt dat door activering van

het fosforylase-enzymstelsel meer glycogeen afgebroken wordt tot glucose-6-fosfaat en dat door dehydrogenering van deze verbinding de hoeveelheid gereduceerd nicotinamide-adenine dinucleotide-fosfaat (NADPH of TPNH) wordt verhoogd. Het was al lang bekend (Grant c.s.-1955, Sweat c.s.-1955) dat NADPH een aantal hydroxyleringsreacties in de steroïdsynthese versnelt. Indien men zich nu voorstelt dat ACTH één cyclisch AMP via verhoogde vorming van NADPH de productie van corticosteroiden stimuleert, dan zou de logische gevolgtrekking van deze overweging zijn dat deze stimulators alle NADPH-afhankelijke stappen in de steroïdsynthese bevorderen. Tot nu toe evenwel is in vitro alleen maar een duidelijk stimulerend effect van ACTH en cyclisch AMP aangetoond op de omzetting van cholesterol in pregnenolon.

Slechts enkele van de verkregen gegevens over het werkingsmechanisme van ACTH zijn besproken. Voor een uitvoeriger discussie kan naar enkele recente overzichten worden verwezen (Hechter c.s.-1964, Hilf-1965, Sutherland c.s.-1965).

## 2.2. Eigen waarnemingen en commentaar

T a b e l 15

Effect van ACTH \*) op de secretiesnelheid van corticosteron en op de uitscheiding van 17-hydroxycorticosteroiden met de urine tijdens gebruik van een natriumarm dieet

Patiënt No. **) Geslacht Leeftijd	Secretiesnelheid van corticosteron mg/24 uur		Uitscheiding van 17-hydroxycorticosteroiden in urine mg/24 uur	
	vóór ACTH	tijdens ACTH	vóór ACTH	tijdens ACTH
6 ♂ 59 jr	4,4	50	9,3	19,4
11 ♂ 62 jr	4,2	49		
15 ♂ 41 jr	5,2	51	10,2	42,9
16 ♂ 22 jr	5,2	104	19,0	87,9

\*) 120 E, intraveneus in een 24 uur lopend infuus van 1000 ml 5% glucose-oplossing

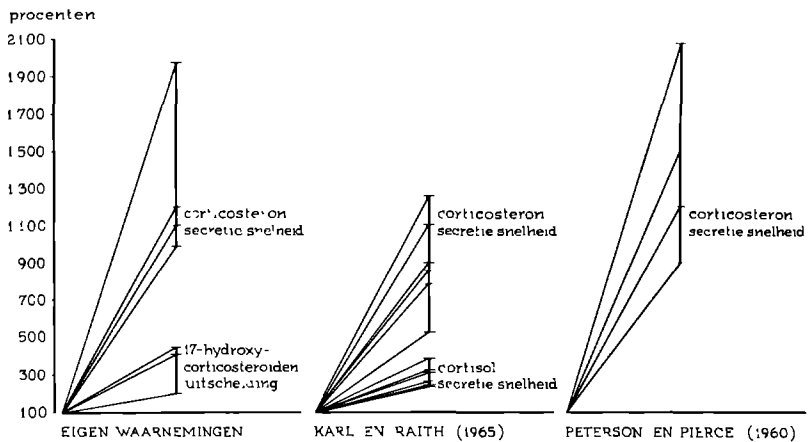
\*\*) De nummers van de patiënten in deze en de volgende tabellen komen overeen met die in tabel 14 in hoofdstuk 2.

Bij vier gezonde volwassenen werd het effect van ACTH op de secretiesnelheid van corticosteron bestudeerd. Gedurende de studieperiode gebruikten zij een ziekenhuisdieet dat 10 meq natrium en een constante hoeveelheid kalium (variërend in de vier studies van 80 tot 90 meq) bevatte. Op de dagen van de secretiemetingen hielden zij bedrust. Gedurende de observatieperiode werd dagelijks urine verzameld. De hoeveelheid ervan en de concentraties van natrium, kalium en kreatinine werden dagelijks gemeten. ACTH werd toegediend in een hoeveelheid van 120 E. Deze hoeveelheid werd in 1000 ml 5% glucose opgelost en in een 24 uur lopend infuus intraveneus toegediend. Op de controledag werd de secretiesnelheid van corticosteron onder identieke omstandigheden bepaald met dit verschil dat geen ACTH aan de glucoseoplossing werd toegevoegd. Tabel 15 vat de verkregen meetresultaten samen. Uit de tabel blijkt dat ACTH in deze waarnemingen de secretiesnelheid van corticosteron doet toenemen tot respectievelijk 11, 12, 10 en 20 maal de uitgangswaarde.

Peterson en Pierce (1960) vonden met een vergelijkbare hoeveelheid ACTH (4 E per uur intraveneus vanaf 12 uur vóór het begin van de 24-uurs meting) een toeneming van de secretiesnelheid van corticosteron in vier waarnemingen tot 20, 8, 15 en 12 maal de controlewaarde. Zij vermeldden geen gegevens over het dieet van hun normale vrijwilligers, zodat aangenomen moet worden dat geen natriumbeperving werd opgelegd, zoals in ons onderzoek werd gedaan. Eveneens in overeenstemming met de gegevens uit tabel 15 zijn de waarnemingen van Karl en Raith (1966) bij zes normale volwassenen, bij wie de secretiesnelheid toenam tot gemiddeld 9 maal de uitgangswaarde. Deze onderzoekers gaven 25 E ACTH intraveneus over een periode van 8 uur. Ook zij vermeldden geen gegevens over het dieet van hun proefpersonen.

Uit enkele literatuurgegevens blijkt ACTH tenminste op de eerste dag van toediening, de produktie van corticosteron méér te stimuleren dan die van cortisol. Peterson (1957b) vond de verhouding van cortisol tot corticosteron in het plasma, tijdens intraveneuze toediening van ACTH, dalen van 14:1 naar 4:1. Cost (1960) zag op de eerste dag van ACTH-toediening een daling van de zogenaamde F:B-ratio (d.w.z. de verhouding tussen de hoeveelheden uitgescheiden metaboliëten van cortisol en corticosteron) in de urine optreden. In de waarnemingen

van Karl en Raith (1966) werd op de dag van ACTH-toediening een toeneming van de cortisolsecretiesnelheid gezien tot slechts drie maal de uitgangswaarde. Daar wij niet over een methodiek beschikten ter bepaling van de secretiesnelheid van cortisol hebben wij in tabel 15 de uitscheiding van de 17-hydroxycorticosteroiden met de urine opgenomen als maat voor de cortisolproductie. In figuur 9 zijn de door ons verkregen waarden samen met de gegevens uit de literatuur grafisch uitgezet. Ook onze bevindingen wijzen erop dat de corticosteronproductie op de eerste dag van ACTH-toediening meer wordt gestimuleerd dan de productie van cortisol.



Figuur 9. Toeneming van de secretiesnelheid van corticosteron en cortisol en van de uitscheiding van 17-hydroxycorticosteroiden in de urine na toediening van ACTH. De uitgangswaarde is op 100% gesteld.

Nog op een tweede wijze werd getracht de betekenis van ACTH voor de regeling van de secretie van corticosteron door de bijnier na te gaan. Het is bekend dat dexamethason, een synthetisch glucocorticoid, in een dosering van vier maal daags 0,5 mg oraal gedurende twee dagen, de ACTH-secretie door de hypofyse tot zeer lage waarden terugbrengt (Liddle-1960, Liddle c.s.-1962). Men mag verwachten dat de secretiesnelheid van corticosteron, voor zover deze ACTH-afhankelijk is, tijdens dexamethason-suppressie daalt. Aan twee gezonde volwassenen werd gedurende een aantal dagen om de 6 uur 0,5 mg dexamethason toegediend. Beide personen gebruikten een natriumarm (10 meq natrium daags) dieet. Bij één van hen werd de secretiesnelheid tweemaal ge-



meten, respectievelijk op de vierde en de achtste dag van dexamethason-gebruik. Deze waarden waren 648 en 770  $\mu\text{g}$  per 24 uur. Bij de tweede persoon werd de meting verricht op de achtste dag. De uitkomst was ditmaal 577  $\mu\text{g}$  per 24 uur.

Wanneer men deze resultaten vergelijkt met die uit tabel 14 in hoofdstuk 2 dan blijkt dat tijdens onderdrukking van de endogene ACTH-afgifte de secretiesnelheid van corticosteron van normale mensen tijdens gebruik van een natriumarm dieet daalt tot ruim 15% van onze controleuitkomsten.

Bledsoe c.s. (1966) vonden bij zeven normale volwassenen tijdens dexamethason-suppressie een gemiddelde waarde van de secretiesnelheid van 0,700 mg per 24 uur. De individuele waarden varieerden van 0,340 tot 1,170 mg per 24 uur. Ook deze personen gebruikten een natriumarm dieet. Helaas werden in deze studie de resultaten van controlewaarnemingen niet vermeld. Wel vermeldden deze auteurs in de discussie van hun studie dat dexamethason-suppressie de secretiesnelheid van corticosteron onderdrukte tot gemiddeld 10% van de uitgangswaarde tijdens gebruik van een natriumhoudend dieet.

Samenvattend blijkt bij maximale ACTH-stimulering de secretiesnelheid van corticosteron toe te nemen tot minimaal 10 en maximaal 20 maal de uitgangswaarde. Tijdens onderdrukking van de endogene ACTH-productie neemt de secretiesnelheid van corticosteron bij gebruik van een natriumarm dieet af tot ongeveer 15% van de uitgangswaarde.

### § 3. DE INVLOED VAN ANGIOTENSINE EN VAN VERSTORINGEN VAN DE NATRIUMBALANS OP DE SECRETIESNELHEID VAN CORTICOSTERON

#### 3.1. Literatuurgegevens

In dierexperimenten waarbij men door verbloeding of door toediening van nierextracten of angiotensine een stijging van de aldosteronproductie trachtte te bewerkstelligen, zag men onder bepaalde omstandigheden tevens een verhoogde productie van corticosteron optreden. Aanvankelijk werden deze experimenten verricht bij dieren met intacte hypofyse.

De interpretatie van de resultaten was moeilijk omdat aspecifieke prikkels via veranderingen van de ACTH-afgifte zowel de productie van aldosteron als die van corticosteron kunnen beïnvloeden. Sedert 1960 heeft men in experimenten op dit terrein gebruik gemaakt van gehypofysectomeerde dieren. Davis c.s. (1961a) concludeerden uit experimenten waarin bij gehypofysectomeerde honden een aantal organen achtereenvolgens werden uitgeschakeld, dat de nier de bron moest zijn van de stimulans van de aldosteronproductie na een bloeding. Ook de corticosteronsecretie bleek na aderlating toe te nemen, en ook deze stijging werd voorkomen indien tevoren nefrectomie was verricht. Ook Mulrow en Ganong (Mulrow c.s.-1960, 1961a, Ganong c.s.-1962) zagen de corticosteronproductie van hypofyselozе honden na een bloeding toenemen, terwijl zowel de aldosteron- als de corticosteronsecretie weer daalde na hërtransfunderen. Niet alleen aderlating, maar ook andere situaties met verhoogde activiteit van het renine-angiotensine-systeem, als constrictie van de vena cava inferior en natriumdepletie, bleken niet alleen de productie van aldosteron maar ook die van corticosteron te doen stijgen en ook deze vormen van secundair 'hypercorticosteronisme' verdwenen na nefrectomie (Davis c.s.-1961a).

De groep van Bartter (Bartter c.s.-1961, Slater c.s.-1961, 1963) stelde vast, dat toediening van renine of angiotensine aan hypofyselozе en genefrectomeerde honden niet alleen de productie van aldosteron en corticosteron, maar ook die van cortisol deed stijgen. De cortisol- en corticosteronproductie nam procentueel zelfs meer toe dan die van aldosteron. In sommige van hun experimenten vonden deze auteurs (Bartter c.s.-1961) zelfs stijgingen van de secretie van 17-hydroxycorticosteroiden door hoeveelheden angiotensine die noch de bloeddruk verhoogden, noch de productie van aldosteron deden toenemen. Davis en medewerkers (Carpenter c.s.-1961) konden deze bevindingen niet bevestigen. Wel stelden zij vast dat renine en angiotensine de corticosteronproductie deden stijgen, maar slechts tot 10% van de productie van intacte honden tijdens stress, terwijl de secretie van aldosteron in deze experimenten steeg tot het niveau tijdens stress. Mulrow c.s. (1961b, 1962b) vonden in vergelijkbare experimenten, dat de aldosteronproductie meer toenam dan die van de 17-hydroxycorticosteroiden. Bovendien wezen deze auteurs (Mulrow c.s.-1962a) er op dat renine en angiotensine de corticosteronproductie slechts voorbijgaand stimule-

ren, terwijl de aldosteronsecretie later toeneemt, maar tijdens toediening van renine of angiotensine hoog blijft.

Kaplan en Bartter (1962) waren de eerste onderzoekers die een effect beschreven van angiotensine op de biosynthese van corticosteroiden in vitro. Bij toevoeging van angiotensine in een dosering van 40  $\mu\text{g}$  (!) per gram weefsel zagen deze auteurs een stimulering van de synthese van corticosteron, cortisol en aldosteron door bijnierweefsel van runderen. In dezelfde studie werd het effect van angiotensine nagegaan in de aanwezigheid van diverse voorlopers zoals cholesterol, progesteron en corticosteron. Angiotensine in doseringen van 0,5 en 5  $\mu\text{g}$  per gram weefsel deed de aldosteronproductie significant toenemen wanneer werd uitgegaan van cholesterol als voorloper. Het octapeptide had geen effect in de aanwezigheid van corticosteron en progesteron. Uit de verkregen resultaten concludeerden deze onderzoekers dat angiotensine de omzetting van cholesterol in corticosteroiden bevordert. Kaplan (1965) beschreef in een meer recente publikatie een uitbreiding van dit onderzoek. Ook lagere doseringen van angiotensine, 0,1  $\mu\text{g}$  per gram weefsel bleken in staat de synthese van aldosteron en corticosteron te stimuleren, en wel in sterkere mate dan die van cortisol.

Ook Lommer en Wolff (1966b) bestudeerden de stimulering van de in vitro synthese van corticosteroiden door angiotensine II. Als radioactief gemerkte voorlopers gebruikten zij  $^{14}\text{C}$ -Na-acetaat,  $^{14}\text{C}$ -cholesterol en  $^{14}\text{C}$ -progesteron en voegden aan het incubatie-medium 10  $\mu\text{g}$  angiotensine toe per gram weefsel en herhaalden deze toevoeging om de tien minuten. Zelfs bij deze enorme concentraties werd geen effect waargenomen op de omzetting van  $^{14}\text{C}$ -progesteron en  $^{14}\text{C}$ -cholesterol in  $^{14}\text{C}$ -corticosteroiden. Wel werd een stimulering gezien van de synthese van  $^{14}\text{C}$ -corticosteroiden (waaronder corticosteron) in die experimenten waarbij radioactief acetaat werd gebruikt. Uit de verstrekte gegevens blijkt echter dat de incorporatie van het acetaat in de diverse steroïden extreem laag was (voor aldosteron 0,0005%), bovendien was de stimulering van de corticosteronsynthese duidelijk groter dan die van aldosteron. Uit deze waarnemingen menen de auteurs te mogen concluderen dat angiotensine de steroïdsynthese stimuleert vóór cholesterol. Dit effect van zeer grote hoeveelheden angiotensine verklaart natuurlijk niet op welke wijze fysiologische hoeveelheden van

dit octapeptide in vivo wel de produktie van aldosteron maar niet die van cortisol stimuleren.

Bij gebruik van bijnierweefsel van de rat daarentegen kon geen stimulering van de corticosteronsynthese door angiotensine worden aangetoond (Gláz en Sugár-1962, Kaplan en Barter-1962, Müller-1965, Spat c.s.-1966). Melby c.s. (1965) bestudeerden het effect van angiotensine op bijnierweefsel van de mens en stelden vast, dat de aldosteronproduktie wél gestimuleerd wordt in weefsel van een aldosteronoom, maar niet in normaal bijnierweefsel. Gegevens over de produktie van corticosteron ontbreken in deze studie.

Inmiddels was in waarnemingen bij mensen door de groep van Genest (Biron c.s.-1961) vastgesteld dat angiotensine in hoeveelheden van 18 tot 70 ng per minuut per kilogram lichaamsgewicht naast vermeerderde excretie van aldosteron slechts een geringe toeneming van de uitscheiding van cortisolmetabolieten veroorzaakte. De groep van Laragh (Ames c.s.-1965) heeft de specificiteit van het adrenocorticotrope effect van angiotensine later uitvoeriger bestudeerd. Zij zagen toeneming van de secretiesnelheid van cortisol door angiotensine slechts optreden wanneer meer dan 25 ng per minuut per kilogram lichaamsgewicht werd toegediend. De secretiesnelheid van aldosteron werd reeds gestimuleerd door 3 ng per minuut, terwijl 15 ng de aldosteronsecretie maximaal deed toenemen. Metingen van de secretiesnelheid van corticosteron werden door deze auteurs niet verricht. Fraser c.s. (1965) stelden bij twee normale volwassenen vast dat tijdens een twee uur lopend infuus van angiotensine in een hoeveelheid van 7 ng per minuut per kilogram lichaamsgewicht wel de plasmaconcentratie van aldosteron, maar niet die van corticosteron en cortisol toenam. Ook krachtig ontzouten door middel van frusemide bleek alleen effect te hebben op de aldosteronconcentratie van het plasma. Deze onderzoekers concludeerden daarom dat angiotensine bij de mens een specifieke prikkel van de produktie van aldosteron is.

Een aantal waarnemingen suggereerden dat bij natriumdepletie, behalve het renine-angiotensine-systeem, nog een ander mechanisme in werking treedt dat een toeneming van de aldosteronproduktie zou kunnen teweeg brengen. Blair-West en medewerkers (1963, 1964) vonden bij

schapen dat na nefrectomie de aldosteronproduktie niet daalde, wanneer deze dieren tevoren in een toestand van natriumdepletie waren gebracht. Bij honden werd deze waarneming door Ganong c.s. (1966) bevestigd. Uit de waarnemingen van Blair-West c.s. (1964) bleek dat deze verhoging van de produktie van aldosteron niet het gevolg was van veranderingen in het natrium- of kaliumgehalte van het plasma. De groep van Bartter (Davis c.s.-1966, Bartter c.s.-1967) zag in een goed opgezette proefopstelling dat natriumdepletie *in vivo* bij gehypofysectomeerde honden tot een toeneming niet alleen van de aldosteronproduktie maar ook van de corticosteronproduktie aanleiding gaf, maar dat de bijnieren van deze dieren *in vitro* wél meer aldosteron, maar minder corticosteron produceerden. De omzetting van radioactief gemerkt corticosteron in aldosteron verliep in de bijnieren van deze 'ontzoute' honden ook sneller dan in het weefsel van de controledieren zonder natriumdepletie.

Vooral bij de rat blijkt versnelde omzetting van corticosteron in aldosteron van belang te zijn voor de toeneming van de produktie van aldosteron die ook bij deze diersoort optreedt tijdens zoutdepletie. De bijnier van de rat is niet alleen *in vitro* zoals boven werd aangegeven weinig of niet gevoelig voor angiotensine, maar ook *in vivo* geeft toediening van angiotensine geen duidelijke toeneming van de aldosteronproduktie (Eilers en Peterson-1964, Singer c.s.-1964, Marieb en Mulrow-1965). Een aantal onderzoekers (Eisenstein c.s.-1961, Müller-1965, Cade c.s.-1965) stelden vast dat ratten tijdens natriumdepletie minder corticosteron secernerden dan in normale omstandigheden. Laplante en Stachenko (1966) deelden mede dat bijnierweefsel van ratten, die natriumarm gevoed waren, *in vitro* gedurende langere tijd aldosteron bleef produceren dan dat van dieren, die normaal gevoed waren. De produktie van corticosteron verschilde in deze proeven niet. Marusic en Mulrow (1967) bestudeerden de omzetting van corticosteron in aldosteron door mitochondriën van de zona glomerulosa van ratten. Wanneer de ratten gedurende één dag zoutarm gevoed waren, was de omzetting van corticosteron in aldosteron 62%, na 2 en 4 dagen zoutarme voeding respectievelijk 139 en 142% hoger dan de omzetting bij controledieren die normaal gevoed waren. Na een kritische beschouwing van hun resultaten, kwamen deze onderzoekers tot de conclusie dat de natriumdepletie niet tot deze intensivering van de omzetting van cortico-

steron in aldosteron had geleid door factoren als hyperplasie of hypertrofie van zona glomerulosa-weefsel maar via een onbekend mechanisme dat de betreffende enzym-activiteit stimuleert. De geïnteresseerde lezer zij naar deze boeiende studie verwezen.

Tenslotte werd ook bij de mens een waarneming gedaan die er op wijst dat de produktie van aldosteron zonder tussenkomst van het renine-angiotensine-systeem kan toenemen. Sanders c.s. (1966) deelden mee dat de produktie van aldosteron bij drie patiënten zonder nieren, door beperking van het natriumgehalte in de voeding, steeg. De secretiesnelheid van corticosteron werd in deze studie helaas niet bepaald.

Als besluit van dit korte overzicht van een aantal uit experimenten verkregen gegevens over de invloed van het renine-angiotensine-systeem en verstoringen van de natriumbalans op de produktie van corticosteron nog een korte bespreking van enkele klinische waarnemingen. Fraser c.s. (1966) zagen bij een patiënt met een 'salt-losing kidney' na drie dagen natriumbeperving een toeneming van de renine-activiteit, terwijl én de concentratie van aldosteron én die van corticosteron in plasma steeg. De cortisolconcentratie van het plasma veranderde niet. Ulick en medewerkers (1964) bestudeerden een patiënt die waarschijnlijk door een enzymdefect in de bijnier (18-dehydrogenase-deficiëntie?) niet in staat was corticosteron in aldosteron om te zetten. Tijdens natriumbeperving in het dieet nam de produktie van corticosteron bij deze patiënt toe. Visser c.s. (1967) vonden bij twee patiënten met renale hypokaliëmie en verhoogde activiteit van het renine-angiotensine-systeem (het zogenaamde syndroom van Bartter), dat natriumbeperving ook hier de renine-activiteit van het plasma deed stijgen, alsmede de secretiesnelheid van corticosteron en aldosteron.

Raiti en medewerkers (1966) zagen in een viertal waarnemingen geen toeneming optreden van de secretiesnelheid van corticosteron bij beperking van het natriumgehalte in de voeding. Het bezwaar tegen deze studie is, dat in de periode tussen de controlewaarneming bij zouthoudend dieet en de meting tijdens gebruik van een natriumarm dieet, gedurende vier dagen grote hoeveelheden ACTH werden toegediend. Deze opzet van het protocol bemoeilijkt de beoordeling van deze gegevens. Bledsoe van de groep van Liddle (1966) heeft bij drie normale volwassenen het effect van veranderingen van de opneming van natrium

op de corticosteronproductie nagegaan, tijdens onderdrukking van de ACTH-afgifte door dexamethason. Onder deze omstandigheden bleek, bij beperking van het natriumgehalte in de voeding een toeneming van de secretiesnelheid op te treden van 190 tot 890  $\mu\text{g}$  corticosteron per 24 uur. Toeneming van de cortisolproductie werd niet gezien (Bledsoe c.s.-1966, Fishman c.s.-1966).

Samenvattend geeft de literatuur dus een aantal aanwijzingen, die de stelling zouden kunnen steunen dat de secretiesnelheid van corticosteron bij de mens door natriumgebrek op twee wijzen kan worden beïnvloed:

1. door verhoogde activiteit van het renine-angiotensine-systeem, waarvan aannemelijk is gemaakt dat het vroeg in de corticoïd-synthese aangrijpt (Kaplan-1965, Lommer en Wolff-1966b) en
2. door intensivering van de omzetting van corticosteron in aldosteron, onafhankelijk van angiotensine.

Door het eerste mechanisme verwacht men bij overgang van natriumhoudend naar natriumarme voeding een toeneming van de secretiesnelheid van corticosteron, door het tweede eendaling ervan. Op grond hiervan lijkt het niet goed voorspelbaar hoe de secretiesnelheid van corticosteron van de mens zal reageren op zoutbeperking. Enkele eigen waarnemingen worden in de volgende paragraaf besproken. Omdat het effect van exogeen toegediend angiotensine op de secretiesnelheid van corticosteron bij de mens, voor zover ons bekend, nooit gemeten is, werden ook hierover enkele waarnemingen verricht.

### 3.2. Eigen waarnemingen en commentaar

Bij zeven volwassenen in leeftijd variërend van 28 tot 62 jaar werden metingen van de secretiesnelheid verricht tijdens het gebruik van een natriumhoudend dieet en na enkele dagen natriumbeperving. Tabel 16 vermeldt de resultaten van deze metingen tezamen met gegevens over de natriumuitscheiding met de urine op de dag van de secretiemeting. Het gemiddelde van de waarden verkregen tijdens een natriumhoudend dieet bij deze zeven personen was dus 4,5 mg per 24 uur, terwijl bij dezelfde personen tijdens natriumbeperving een gemiddelde waarde van 4,6 mg per 24 uur werd verkregen.

T a b e l 16  
Effect van natriumbeperving in het dieet  
op de secretiesnelheid van corticosteron

Patiënt No. *) Geslacht Leeftijd	Natriumhoudend		Natriumarm		Aantal dagen na- triumarm dieet
	Secretie- snelheid van corti- costeron mg/24 uur	Natrium in urine meq/24 uur	Secretie- snelheid van corti- costeron mg/24 uur	Natrium in urine meq/24 uur	
13 ♀ 44 jr	4,3	126	4,9	16	7
8 ♂ 52 jr	3,9	123	3,8	6	6
10 ♀ 62 jr	4,3	102	3,8	9	11
20 ♂ 55 jr	8,4	125	8,6	1	12
14 ♂ 35 jr	3,5	188	5,1	16	5
12 ♂ 28 jr	3,9	61	5,0	9	11
9 ♀ 44 jr	3,1	320	3,8	9	6
			3,0	26	8
			3,7	15	16
Gemiddeld	4,5	149	4,6	12	

\*) Zie tabel 14 in hoofdstuk 2.

T a b e l 17  
Effect van angiotensine \*) op de secretiesnelheid van corticosteron

Patiënt No. **) Geslacht Leeftijd	Secretiesnelheid van corticosteron mg/24 uur			Voeding
	vóór angiotensine	tijdens angiotensine	na angiotensine	
6 ♂ 59 jr	4,4	4,4	3,6	natriumarm
4 ♂ 41 jr	2,9	3,5	3,1	natriumarm
8 ♂ 52 jr	3,8	4,6		natriumarm
	3,9	3,8		natriumhoudend

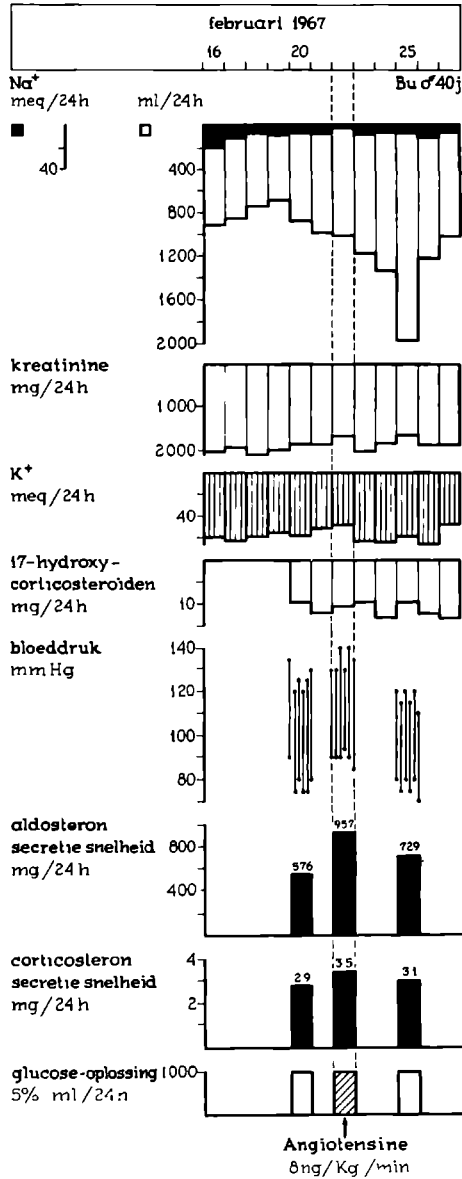
\*) 5-8 ng per minuut per kilogram lichaamsgewicht, intraveneus in een 24 uur lopend infuus van 1000 ml 5% glucose-oplossing

\*\*) Zie tabel 14 in hoofdstuk 2.



Het effect van angiotensine, intraveneus toegediend in een hoeveelheid van 5-8 ng per minuut per kilogram lichaamsgewicht in een 24 uur lopend infuus van 1000 ml 5% glucose-oplossing, werd bij drie volwassenen in vier waarnemingen nagegaan. Bij één proefpersoon werd angiotensine toegediend zowel tijdens gebruik van een natriumhoudend als een natriumarm dieet. Deze angiotensine-dosering werd gekozen, omdat hierbij, zoals reeds vermeld, geen effect op de cortisolproductie, maar wel een stimulerend effect op de aldosteronproductie was gezien (Ames c.s.-1965, Kloppenborg-1966). In tabel 17 zijn de resultaten opgenomen. De secretiesnelheid van corticosteron tijdens angiotensine-toediening in deze vier waarnemingen is gemiddeld 4,1 mg per 24 uur. Vóór en ná angiotensine-toediening is deze waarde gemiddeld 3,6 mg per 24 uur. Ter illustratie van de wijze, waarop dit effect werd bestudeerd wordt in figuur 10 één van deze waarnemingen weergegeven. Evenmin als natriumbeperking blijkt dus angiotensine een duidelijke stijging van de secretiesnelheid van corticosteron teweeg te brengen, onder omstandigheden waaronder de aldosteronproductie duidelijk toeneemt (figuur 10).

Vervolgens werd nagegaan of tijdens dexamethason-suppressie angiotensine wél een duidelijke stijging van de secretiesnelheid van corticosteron veroorzaakt. Deze waarneming leek daarom van betekenis omdat, zoals boven werd vermeld, Bledsoe c.s. (1966) door natriumbeperking onder deze omstandigheden een duidelijke stijging van de secretiesnelheid van corticosteron hadden gevonden. Aan twee proefpersonen werd dexamethason voorgeschreven in een hoeveelheid van 0,5 mg om de 6 uur. Het dieet was natriumarm en de hoeveelheid kalium was gestandaardiseerd. Tabel 18 vermeldt de gegevens betreffende de secretiesnelheid van aldosteron en corticosteron verkregen voor, tijdens en na een 24 uur lopend infuus met angiotensine in een hoeveelheid van 7 ng per minuut per kilogram lichaamsgewicht. Onder deze omstandigheden blijkt de toeneming van de secretiesnelheid van corticosteron tijdens angiotensine-toediening vergelijkbaar te zijn met de toeneming van de aldosteronproductie.



Figuur 10. Vergelijking van het effect van angiotensine-toediening op de secretiesnelheid van aldosteron en corticosteron bij een volwassen man, tijdens gebruik van een natriumarm dieet (patiënt 4 uit tabel 14). Angiotensine veroorzaakt een geringe natriumretentie, terwijl ook het bloeddrukverhogend effect aanwezig is. De toename van de secretiesnelheid van aldosteron is, procentueel, veel groter dan de toename van de secretiesnelheid van corticosteron tijdens toediening van angiotensine.

T a b e l 18

Effect van angiotensine \*) op de secretiesnelheid  
van corticosteron en aldosteron tijdens dexamethason-suppressie \*\*)  
tijdens gebruik van een natriumarm dieet

Persoon No. Geslacht Leeftijd	Secretie- snelheid van: ( $\mu\text{g}/24$ uur)	vóór angiotensine	tijdens angiotensine	na angiotensine
1 ♀ 28 jr	aldosteron	424	757	588
	corticosteron	648	809	770
2 ♀ 35 jr	aldosteron	508	1180	585
	corticosteron		1170	577

\*) 7 ng per minuut per kg lichaamsgewicht, intraveneus in een 24 uur lopend infuus van 1000 ml 5% glucose-oplossing

\*\*) dexamethason 0,5 mg om de 6 uur

Samenvattend blijkt dat de secretiesnelheid van corticosteron door natriumbeperving in het dieet of door toediening van kleine hoeveelheden angiotensine geen duidelijke toeneming toont. Bij uitschakelen van de ACTH-afgifte door dexamethason is de toeneming van de secretiesnelheid van corticosteron onder invloed van angiotensine evenwel van dezelfde grootte-orde als die van aldosteron.

#### § 4. DE INVLOED VAN VERSTORINGEN VAN DE KALIUMBALANS OP DE SECRETIESNELHEID VAN CORTICOSTERON

##### 4.1. Literatuurgegevens

Singer en Stack-Dunne (1955) zagen bij ratten dat kaliumarme voeding wel een daling van de produktie van aldosteron gaf, maar geen verandering in de corticosteronproduktie. Met veel betere bepalingstechnieken werden deze bevindingen in 1964 door Eilers en Peterson, ook bij ratten, bevestigd. Davis c.s. (1963) zagen bij gehypofysectomeerde honden na toediening van een kaliumchloride-oplossing intraveneus, waarbij de kaliumconcentratie van het plasma van 3 tot 7 meq/l steeg,

een toeneming zowel van de aldosteron- als van de corticosteron-  
produktie. Een verhoogde kaliumconcentratie lokaal in de arterie van  
een door transplantatie geïsoleerde bijnier had echter slechts een  
enkele maal een stimulerend effect op de produktie van corticosteron.  
Blair-West (1962) bevestigden deze laatste bevindingen bij schapen.  
Bartter en medewerkers (Bartter c.s.-1964, Bartter-1967) daarentegen  
stelden bij hypofyselose en genefrectomeerde honden vast dat toene-  
ming van de kaliumconcentratie in de arterie van een getransplanteerde  
bijnier zowel de secretie van aldosteron als die van corticosteron en  
cortisol deed toenemen. In een recent overzicht vermeldt Davis (1967)  
dat hij bij honden met behouden hypofyse en een blijvend aanwezige  
catheter in de bijniervene tijdens toeneming van de kaliumconcentratie  
in het plasma tot boven 6 meq/l een verhoogde produktie van aldosteron,  
corticosteron en cortisol zag ontstaan.

De opvatting dat het kalium-ion een direct effect uitoefent op de  
produktie van corticosteroiden, zonder tussenkomst van de hypofyse  
en het renine-angiotensine-systeem wordt gesteund door waarnemingen  
in vitro. Giroud c.s. (1956) zagen een geringe stijging van de aldo-  
steronproduktie in bijnierweefsel van ratten optreden, wanneer de  
kaliumconcentratie in het incubatie-medium van 5,9 tot 8,6 meq/l werd  
verhoogd. Bartter c.s. (1964) vonden dat ook de produktie van cortico-  
steron door bijnierweefsel van ratten in vitro steeg bij verhoging van  
de kaliumconcentratie van 3,9 tot 6,1 meq/l. Kaplan (1965) stelde vast  
dat verhoging van de kaliumconcentratie in het incubatie-medium van  
runderbijnieren zowel een toeneming van de produktie van aldosteron  
als van die van corticosteron veroorzaakte. De cortisolproduktie nam,  
bij stijgende kaliumconcentratie van het medium tot 14 meq/l, niet toe.  
Müller (1965) werkte met bijnierweefsel van ratten en vond bij ver-  
hoging van de kaliumconcentratie in het incubatie-medium van 3,4 tot  
8,4 meq/l slechts een geringe toeneming van de corticosteronproduktie.  
De omzetting van corticosteron in aldosteron werd niet beïnvloed.  
Deze bevinding werd in 1967 door Marusic en Mulrow bevestigd.

Hoewel toediening van extra kalium bij de mens een tijdelijke toe-  
neming in de natriumuitscheiding geeft (Bunge-1873), blijkt de stijging  
van de secretiesnelheid van aldosteron welke onder deze omstandig-  
heden optreedt niet door het renine-angiotensine-systeem tot stand te  
komen. De groep van Laragh (Bull c.s.-1966, Cannon c.s.-1966) zag bij

kaliumbelasting geen duidelijke verandering in de renine-activiteit van het plasma optreden, terwijl Veyrat c.s. (1966, 1967) en Driessen en Benraad (niet gepubliceerde waarnemingen 1967) zelfs een vermindering van de renine-activiteit tijdens toediening van kaliumchloride vaststelden.

Hieraan mag nog worden toegevoegd dat Johnson c.s. in 1957 reeds hadden vastgesteld dat veranderingen in de kaliumbalans bij de mens geen invloed hadden op de uitscheiding van 17-hydroxycorticosteroiden met de urine.

#### 4.2. Eigen waarnemingen en commentaar

Bij drie normale volwassenen en bij twee patiënten met primair hyperaldosteronisme (patiënten Lo. en Ba. uit hoofdstuk 5) werd het effect van grote hoeveelheden kaliumchloride op de secretiesnelheid van corticosteron nagegaan. Het controledieet was natriumarm en bevatte 60-80 meq kalium. Aan dit gestandaardiseerde dieet werd 9 g kaliumchloride per dag toegevoegd. Op de vierde dag van kaliumbelasting werd de secretiesnelheid van corticosteron gemeten. Tabel 19 vermeldt de verkregen gegevens en geeft een overzicht van de opneming en uitscheiding van kalium en natrium bij de vijf onderzochte personen. De verhoging van de kalium-opneming blijkt dus geen invloed te hebben op de secretiesnelheid van corticosteron, terwijl de aldosteronsecreties duidelijk stegen.

Samenvattend kon het stimulerend effect van extra kalium op de corticosteronproductie, dat in vitro in bijnieren van ratten (Bartter-1964, Müller-1965), runderen (Kaplan-1965) en honden (Bartter-1964) en in vivo in honden (Davis c.s.-1963, Bartter-1964, Davis-1967) is aangetoond, door ons niet bij de mens worden vastgesteld.

T a b e l 19  
Effect van verhoging van de kaliumopneming met de voeding op de secretiesnelheid  
van corticosteron en aldosteron

Patiënt No. *) Geslacht Leeftijd	Secretiesnelheid van				Kalium dieet meq/24 uur berekend	Kalium in urine meq/24 uur	Natrium dieet meq/24 uur berekend	Natrium in urine meq/24 uur
	corticosteron mg/24 uur		aldosteron µg/24 uur					
	natrium- arm dieet	natrium- rijk dieet	natrium- arm dieet	natrium- rijk dieet				
13 ♀ 44 jr	4,9	3,8	379	510	65 182	39 139	9 9	16 10
12 ♂ 28 jr	5,0	4,5	481	1371	78 195	22 104	12 12	9 8
17 ♂ 19 jr	6,2	6,5	278	584	45 162	43 158	9 9	14 21
***) ♀ 47 jr	3,8	3,6	707	838	100 178	70 124	10 10	21 36
***) ♀ 37 jr	3,4 2,8	3,4	1960	3849	52 52 160	38 56 67	112 112 11	143 143 40
Gemiddeld	4,3	4,4			68 175	62 118		

\*) Zie tabel 14 in hoofdstuk 2.

\*\*\*) patiënte met primair hyperaldosteronisme

## § 5. SAMENVATTING

In dit hoofdstuk werden de resultaten van waarnemingen besproken, die enig inzicht geven in de factoren die de secretiesnelheid van corticosteron bij gezonde volwassen mensen kunnen beïnvloeden. In overeenstemming met gegevens uit de literatuur bleek ACTH de secretiesnelheid sterk te doen toenemen. Omgekeerd bleek onderdrukking van de endogene ACTH-afgifte door toediening van een synthetisch glucocorticoïd de secretiesnelheid sterk te doen dalen, hetgeen eveneens met de literatuurgegevens overeenkomt. Zoutbeperking in het dieet leidt evenmin als toediening van geringe hoeveelheden angiotensine tot significante stijging van de secretiesnelheid.

Beide prikkels doen de secretiesnelheid van aldosteron toenemen.

Tijdens suppressie van de endogene ACTH-productie bleek angiotensine de secretiesnelheid van corticosteron duidelijk te doen toenemen. De toeneming was van dezelfde orde van grootte als die van aldosteron.

Wanneer men deze waarneming plaatst naast die van Bledsoe c.s. die vaststelden dat natriumbeperving in het dieet tijdens dexamethason-toediening de secretiesnelheid deed stijgen tot waarden die vergelijkbaar zijn met de onze tijdens angiotensine-toediening, dan lijkt de conclusie gerechtvaardigd, dat stijging van de activiteit van het renine-angiotensine-systeem, die tijdens zoutbeperking is waargenomen, verantwoordelijk is voor dit effect van zoutbeperking in het dieet.

Hiermee lijkt waarschijnlijk te zijn gemaakt dat ook bij de mens het renine-angiotensine-systeem een regulerende functie op de secretie van corticosteron kan hebben. De grootte-orde van de stijging van de secretiesnelheid van corticosteron tijdens dexamethason-suppressie door toediening van angiotensine (160 en 600  $\mu\text{g}$  per 24 uur) of door natriumbeperving (gemiddeld 700  $\mu\text{g}$  per 24 uur, zoals door Bledsoe c.s. is aangetoond), verklaart achteraf wel waarom *nóch* zoutbeperking *nóch* angiotensine onder omstandigheden met normale ACTH-productie een duidelijke toeneming van de secretiesnelheid van corticosteron aan het licht *kon* brengen. Onder deze omstandigheden worden immers enkele duizenden microgrammen corticosteron geproduceerd. Tenslotte werd aangetoond dat toediening van extra kalium met het dieet de secretiesnelheid van corticosteron bij de mens niet doet stijgen.

## 4. De secretiesnelheid van corticosteron onder invloed van heparine en heparinoïd

### § 1. HET EFFECT VAN HEPARINE OP DE PRODUKTIE VAN BIJNIERSCHORS-HORMONEN. LITERATUUROVERZICHT

#### 1.1. Heparine en de produktie van aldosteron door de bijnier

De natriuretische werking van heparine werd in 1957 door Majoor en medewerkers (Majoor c.s.-1957) beschreven. De toeneming van de uitscheiding van natrium en chloride trad pas op de tweede of derde dag van de behandeling van de patiënten met heparine op. Bij één van de waarnemingen waarbij ook de kaliumuitscheiding werd gemeten, bleek tijdens de laatste dagen van de heparine-toediening een geringe kaliumretentie op te treden, terwijl na het beëindigen van de heparine-toediening de geretineerde hoeveelheid kalium weer werd uitgescheiden. Op grond van dit uitscheidingspatroon spraken Majoor en medewerkers de veronderstelling uit dat heparine zijn werking uitoefent door onderdrukking van de functie van de bijnierschors. Het natriuretische effect van heparine bleek te worden gedeeld door verwante, half-synthetische, gesulfateerde polysacchariden (heparinoïden) (Schlatmann c.s.-1960, 1964).

In overeenstemming met de bovengenoemde veronderstelling werd door Cejka c.s. (1960) en Majoor c.s. (1960) een daling van de aldosteron-excretie vastgesteld bij patiënten met secundair hyperaldosteronisme,



die behandeld werden met het heparinoïd N-formylchitosan-polysulfaat (Rol-8307). Als indirect argument voor een adrenaal effect zou kunnen gelden de waarneming dat toegediend aldosteron tijdens deze behandeling wél in staat was natriumretentie te bewerkstelligen (Cejka c.s.-1962, Majoor c.s.-1962a). In de eerste studies waarbij de aldosteronexcretie werd gemeten tijdens toediening van heparine of Rol-8307 bij gebruik van een zoutarm dieet, daalde deze excretie soms tot, voor de toen gebruikelijke methodiek, onmeetbaar lage waarden (Cejka c.s.-1960). Nader onderzoek (Majoor c.s.-1962a, Schlatmann c.s.-1964), vooral indien gebruik gemaakt kan worden van meer specifieke bepalingmethoden (Veyrat c.s.-1962) heeft echter geleerd dat de excretie van aldosteron tijdens kortdurende toediening van heparine en heparinoïden slechts daalt tot uitkomsten die gewoonlijk worden gevonden tijdens het gebruik van een natriumhoudend dieet. Het feit dat tijdens behandeling met heparine of een heparinoïd nog een meetbare hoeveelheid aldosteron kan worden gevormd, kan verklaren dat aldosteron-antagonisten als spiro lacton tijdens de toediening van heparine en heparinoïden nog een duidelijke supplementaire natriuretische werking kunnen ontplooiën (Cejka c.s.-1960 en 1962a en b, Majoor c.s.-1962a).

Nadat de groep van Müller (Veyrat c.s.-1962) in 1962, met behulp van een dubbel-isotoopmethode een daling van de *excretie* van aldosteron tijdens toediening van heparinoïd vastgesteld had, deelde dezelfde groep (Veyrat c.s.-1963) in 1963 mee dat bij twee gezonde proefpersonen met een fysiologisch hyperaldosteronisme tijdens toediening van dit middel ook de *secretie*-snelheid van aldosteron daalde. Bij pathologisch hyperaldosteronisme bleek een enkele maal wel een vermindering van de aldosteronproductie te ontstaan, zonder een begeleidende natriurese (Majoor c.s.-1960, fig. 15, Veyrat c.s.-1963, fig. 7, Kloppenborg-1966, fig. 19 en 20).

## 1.2. Heparine en het renine-angiotensine-systeem

Nadat was vastgesteld dat heparine een natriuretisch effect bewerkstelligt door een vermindering van de aldosteronproductie werd een tweetal mogelijkheden geopperd ter verklaring van de wijze waarop heparine deze vermindering zou kunnen veroorzaken. De aldosteronproductie zou beïnvloed kunnen worden door interactie met het renine-

angiotensine-systeem, of heparine zou de biosynthese van het hormoon in de bijnier op een directe wijze kunnen remmen.

Een aantal waarnemingen steunen de eerstgenoemde hypothese. Jaques c.s. (1960) stelden vast dat heparinezuur en angiotensine zich in vitro binden tot een niet dialyseerbaar complex. De groep van Laragh (Sealey c.s.-1967) zag bij incubatie van serum een hogere opbrengst van angiotensine dan wanneer gehepariniseerd plasma werd gebruikt. Vervolgens bleek heparine in vitro renine-substraat competitief te antagoneren. De concentratie van heparine in deze proefopstelling was echter hoog, namelijk 10 E/ml, overeenkomend met de concentratie welke in vitro wordt gebruikt om bloed onstolbaar te maken. Het aantrekkelijke van de renine-angiotensine hypothese was dat deze een ongedwongen verklaring gaf van het feit dat tijdens behandeling met heparine de aldosteronsecretie - behorend bij een zoutloos dieet - daalt tot waarden die tijdens een zouthoudend dieet worden gevonden.

Een belangrijk argument voor de opvatting dat heparine een directe werking in de bijnierschors heeft, werd in 1964 door Conn en medewerkers verkregen. Bij drie patiënten met primair hyperaldosteronisme, bij wie zelfs tijdens natriumarm dieet en in staande houding doorgaans geen renine-activiteit in het plasma kan worden aangetoond, bleek Rol-8307 toch een verlaging van de excretie- (Conn c.s.-1964a) en de secretiesnelheid (Conn c.s.-1966) van aldosteron te veroorzaken. Deze waarneming bij primair hyperaldosteronisme werd door Abbott c.s. in 1965 ook voor heparinoïd en door Ford en Bailey in 1965 en 1966 en door Felt in 1966 voor heparine bevestigd. De waarneming van Kloppenborg en medewerkers (Kloppenborg c.s.-1965, Kloppenborg-1966) dat tijdens behandeling met heparine angiotensine wél zijn pressor-activiteit en zijn natriumretinerende effect behoudt, maar geen toename van de aldosteronproductie teweegbracht, past eveneens in de opvatting dat heparine niet via interactie met het renine-angiotensine-systeem zijn werking uitoefent. Meer argumenten voor een direct effect op de bijnier werden verkregen uit in vitro onderzoek.

### 1.3. Het effect van heparine in vitro

Nadat het effect van heparine op de excretie en secretie van aldosteron was vastgesteld, werden ook uit experimenten bij dieren en uit in vitro

onderzoek een aantal gegevens verkregen die van belang lijken voor een inzicht in de wijze waarop het heparine-effect tot stand komt. Gláz (1960), Gláz en Sugár (1964) namen evenals Fachel c.s. (1962) waar dat de produktie van aldosteron door rattebijnieren in vitro verminderd was, wanneer aan deze dieren tevoren hoge doses heparine of heparinoïden waren toegediend. Merkwaardigerwijze werd dit effect door Gláz en Sugár (1964) niet gevonden wanneer heparine direct aan het incubatie-medium werd toegevoegd.

De groep van Dorfman (Sharma c.s.-1966) zag dat bij incubatie van een aldosteron-producerende bijnier tumor, toevoeging van heparine een remming gaf van de omzetting van corticosteron naar 18-hydroxycorticosteron en aldosteron. In een recente mededeling vermeldde dezelfde groep (Sharma c.s.-1967) dat deze omzetting ook in de mitochondriënfractie van kikkerbijnierweefsel door heparine wordt geremd, mits geen calcium in het medium aanwezig was. Toevoeging van calcium bleek het heparine-effect tot verdwijnen te brengen.

#### 1.4. Heparine en de uitscheiding van 17-hydroxycorticosteroïden en 17-ketosteroïden

Majoor c.s. (1960, 1962a) hebben er bij herhaling op gewezen dat heparine en heparinoïden wél de uitscheiding van aldosteron verminderen, maar geen duidelijke invloed hebben op de uitscheiding van 17-hydroxycorticosteroïden met de urine. Deze negatieve bevindingen werden door andere onderzoekers bevestigd (Veyrat c.s.-1963, Abbott c.s.-1966a en b). Later werd bovendien vastgesteld dat ook de uitscheiding van 11-hydroxycorticosteroïden door behandeling met deze stoffen niet verandert (Kloppenborg-1966).

Majoor en medewerkers (1962a) merkten op dat de uitscheiding van 17-ketosteroïden bij langdurige behandeling met heparine bij twee patiënten geleidelijk leek te dalen. Vallent c.s. (1965a) en Abbott c.s. (1966a) deden soortgelijke waarnemingen. Toch werd dit effect niet in elke studie gevonden: Abbott c.s. (1966b) vermeldden in een volgende publikatie dat 'no consistent influence on 17-KS' werd waargenomen. In dit verband zij ook de waarneming van Wilson en Goetz (1964) vermeld, die bij een patiënt die jarenlang met 200 mg heparine per dag intramusculair was behandeld een selectief hypoadosteronisme dia-

gnosticeerden met een laag-normale uitscheiding van 17-ketosteroiden (9,2 mg per 24 uur), terwijl de uitscheiding van de 17-hydroxycorticosteroiden licht verhoogd bleek te zijn. Bij obductie van deze patiënt werd een verregaand geatrofieerde zona glomerulosa gevonden. Aangenomen mag worden dat heparine voor deze atrofie verantwoordelijk is geweest.

### 1.5. Heparine en de produktie van corticosteron

Fachet c.s. (1962) stelden tevens vast dat ook de in vitro produktie van corticosteron daalt, wanneer de ratten tevoren met heparine werden behandeld. Gláz en Sugár (1964) daarentegen zagen geen verandering van de produktie van dit steroid.

Nadat Conn en medewerkers in 1964 aannemelijk hadden gemaakt dat heparine en heparinoïden een direct effect op de bijnierschors uitoefenen, hebben deze onderzoekers trachten na te gaan op welke plaats heparine in de biosynthese van aldosteron aangrijpt. Bij de door hen onderzochte patiënten met primair hyperaldosteronisme werd geen daling in de uitscheiding van tetrahydrocorticosteron gezien. Mede omdat bij één patiënt wel een verminderde excretie van de belangrijkste metabooliet van 18-hydroxycorticosteron tijdens behandeling met heparinoïd werd gevonden, namen Conn c.s. aan dat heparine de omzetting van corticosteron naar 18-hydroxycorticosteron zou remmen (Conn c.s.-1966). In 1965 was reeds door de groep van Laidlaw (Abbott c.s.-1965, 1966) een daling van de secretiesnelheid van 18-hydroxycorticosteron tijdens behandeling met Rol-8307 vastgesteld.

Tegen de conclusies van Conn c.s. zijn echter een aantal bezwaren aan te voeren. De meting van de uitscheiding van tetrahydrocorticosteron was weinig specifiek. Deze werd verricht met een chemische reactie nadat slechts twee papierchromatografie-systemen waren gebruikt om de metabooliet uit het urine-extract te zuiveren. De gevonden uitscheiding bij de drie patiënten is opvallend hoog, ook al kan men hierbij in aanmerking nemen dat bij primair hyperaldosteronisme een verhoogde produktie van corticosteron kán voorkomen (hoofdstuk 5). Bij de eerste patiënt bedraagt de excretie van tetrahydrocorticosteron echter zeven maal de door Conn c.s. opgegeven normale waarde. Bij de tweede patiënt was de uitscheiding ondanks behandeling met 50 mg cortison

per dag, drie maal de normale waarde. Bij de derde en laatste patiënt blijkt de uitscheiding van tetrahydrocorticosteron tijdens behandeling met heparinoïd tot de helft van de uitgangswaarde te dalen. Zekere conclusies zijn niet te trekken uit deze bevindingen van Conn en medewerkers (zie ook par. 3).

#### 1.6. Effecten van kortdurende toediening van heparine

Schlatmann en medewerkers merkten in 1964 op dat op de eerste dag van heparine-toediening aan patiënten die een zoutarm dieet gebruikten, de toch al geringe renale natriumuitscheiding nog iets afnam. Deze toeneming van de natriumretentie op de eerste dag bleek duidelijk significant te zijn, terwijl de kaliumuitscheiding, zij het minder constant, groter leek te zijn. Deze bevindingen werden door Abbott c.s. (1966b) bevestigd. Bij retrospectief onderzoek van de - tot nu toe - gepubliceerde waarnemingen blijkt de produktie van aldosteron op de eerste dag van toediening van heparine te kunnen toenemen maar ook te kunnen dalen. Een *daling* van de aldosteronexcretie is te vinden in studies van Cejka c.s. (1962a, fig. 1), Cejka (1962b, fig. 2 en 4), Veyrat c.s. (1962, fig. 2), Schlatmann c.s. (1964, fig. 5 en 6), Ford en Bailey (1966, tabel 1) en een vermindering van de aldosteronsecretie in een studie van Abbott c.s. (1966b, fig. 8). Een *toeneming* van de excretie van aldosteron werd gevonden in een waarneming van Cejka c.s. (1960, fig. 3), een toeneming van de secretiesnelheid in twee waarnemingen van Abbott c.s. (1966b, fig. 3 en 18). Kloppenborg (1966) verrichtte in twee waarnemingen onderzoek naar het effect van heparinoïd op de secretiesnelheid van aldosteron gedurende de eerste twaalf uur van toediening. Bij beide proefpersonen bleek de secretiesnelheid in de eerste twaalf uur toe te nemen, maar bij één van hen werd reeds in de tweede 12-uurs periode een daling gevonden. Zowel Abbott c.s. (1966) als Kloppenborg (1966) concludeerden reeds dat de bijna nooit ontbrekende natriumretentie en de zo nu en dan toegenomen kaliumuitscheiding op de eerste dag van heparine-toediening zeer waarschijnlijk niet het gevolg zijn van een op de eerste dag toegenomen aldosteronsecretie.

Wellicht moeten deze bevindingen over de natrium- en kaliumuitscheiding van de mens op de eerste dag van heparine-toediening in verband gebracht worden met bevindingen van Muldowney c.s. (1960),

die bij de hond vaststelden dat ook wanneer de bijnieren verwijderd waren, toediening van heparine een kortdurende kaliurese veroorzaakte. Majoor c.s. (1962b) en Schlatmann c.s. (1962 en 1964) vonden ook dikwijls op de eerste dag van toediening van heparinoïden bij honden een verhoogde kaliumuitscheiding, vooral indien heparinoïden werden ingespoten die bij deze proefdieren toxische verschijnselen deden ontstaan.

Bij een nauwkeurige bestudering van de waarnemingen van Majoor c.s. (1960a, fig. 9), Schlatmann c.s. (1964, fig. 7) ende reeds genoemde waarnemingen van Kloppenborg (1966, fig. 23) valt het op dat een vertraagde natriurese optrad ook wanneer heparinoïd slechts één dag werd gegeven. Tot nu toe waren er op de dagen na een één dag durende toediening van heparinoïd nog geen aldosteronsecreties gemeten.

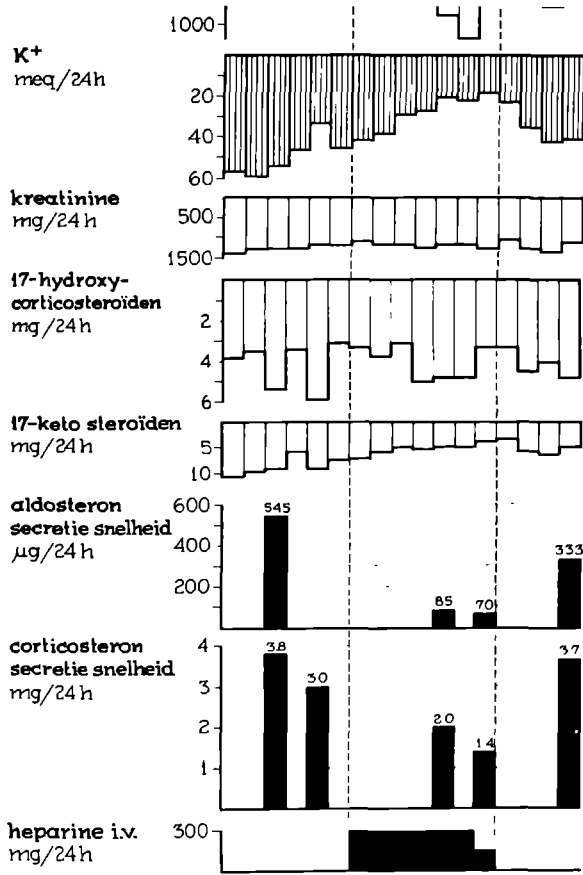
## § 2. EIGEN ONDERZOEK EN COMMENTAAR

### 2.1. De opzet van het onderzoek

Zoals uit de bespreking van de literatuurgegevens is gebleken is de plaats - of de eventuele plaatsen - in de biosynthese van aldosteron waarop heparine en heparinoïd werken onvoldoende bekend. De naar alle waarschijnlijkheid meest directe voorloper van aldosteron, het 18-hydroxycorticosteron wordt geremd in zijn produktie. Gegevens over de invloed op de produktie van het in deze synthese voorafgaande corticosteron zijn niet bekend. Het doel van het onderzoek was de invloed van heparine en heparinoïd op de secretiesnelheid van het laatstgenoemde steroïd na te gaan. Tevens werden enkele waarnemingen verricht over de invloed van een één dag durende toediening van heparine op de secretiesnelheid van aldosteron en corticosteron, zowel op de dag van toediening als op de daaropvolgende dagen.

### 2.2. Het effect van langdurige toediening van heparine en heparinoïd

Bij drie volwassenen (Sa., v.Ha., en Ar.), die geen afwijking hadden welke met stoornissen van de regeling van de secretiesnelheid van corticosteron kan samengaan, werd het effect van heparine op deze



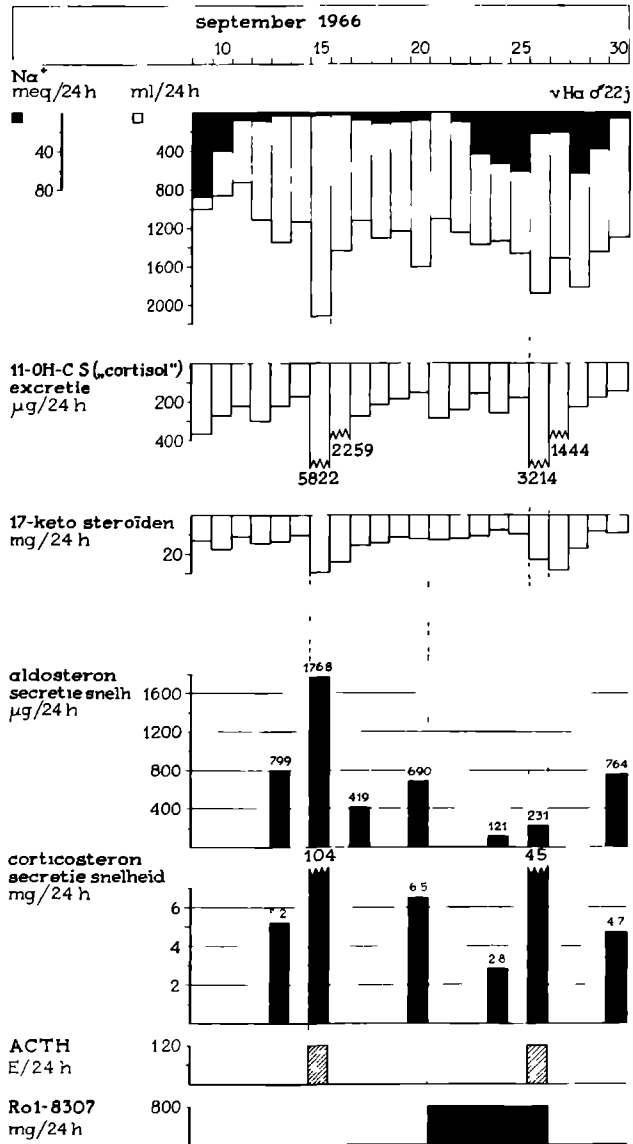
Figuur 11. De vermindering van de secretiesnelheid van aldosteron en corticosteron onder invloed van heparine bij een volwassen vrouw (patiënte 9 uit tabel 14) tijdens gebruik van een natriumarm dieet (20 meq per dag). Ook de uitscheiding van 17-ketosteroiden blijkt geleidelijk te dalen. De uitscheiding van 17-hydroxycorticosteroiden wordt door heparine niet beïnvloed. Op de derde dag van heparine-toediening komt een natriurese op gang en treedt gelijktijdig kaliumretentie op.

secretiesnelheid onderzocht. Op de dagen van de metingen werd volledige bedrust voorgeschreven, gedurende de gehele studie werd de lichamelijke activiteit van de proefpersonen zoveel mogelijk beperkt. Zij gebruikten een natriumarm dieet, terwijl de opname ook wat betreft kalium gestandaardiseerd was. De urine werd in perioden van 24 uur verzameld. Van elke 24-uurs portie werd de hoeveelheid gemeten en de concentratie van natrium, kalium en kreatinine bepaald.

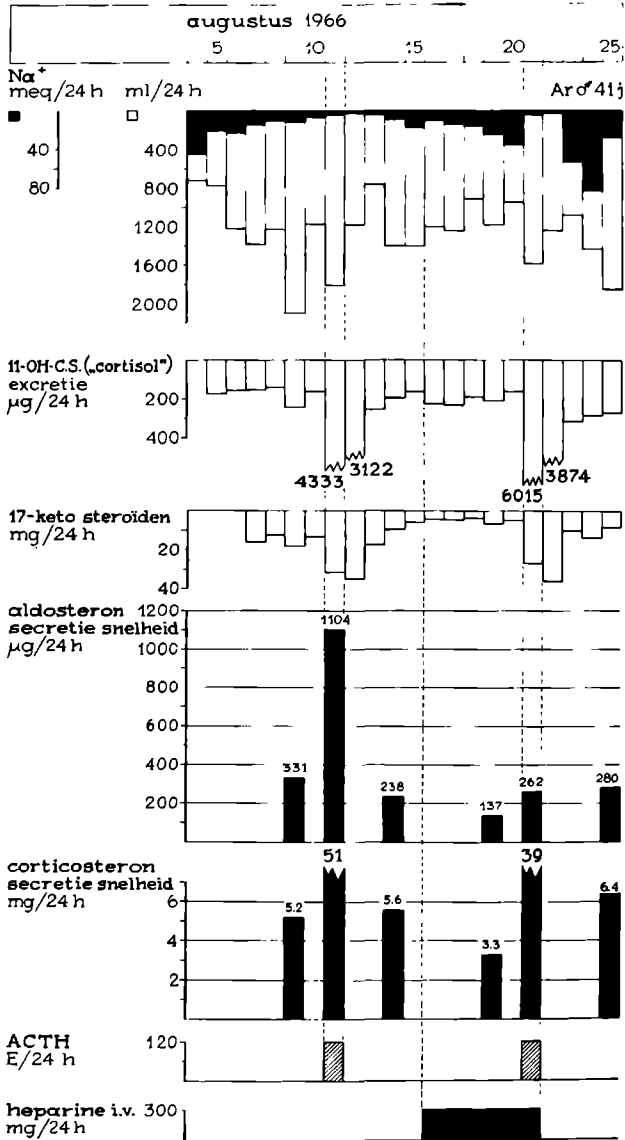
Figuur 11 toont de resultaten van het onderzoek bij patiënte Sa. Heparine werd gedurende 7 dagen intraveneus toegediend in een hoeveelheid van 300 mg daags, verdeeld over 4 injecties. Op de eerste dag van de heparine-behandeling werd natrium misschien iets versterkt door de nieren gereteneerd. Gedurende de volgende dagen nam de uitscheiding van natrium geleidelijk toe, terwijl de kaliumuitscheiding verminderde. De langzame toeneming van de natriumuitscheiding tijdens de eerste dagen van het onderzoek moet wel geweten worden aan het feit dat het dieet op 20 december van streng natriumarm gewijzigd werd in een gestandaardiseerd dieet met 20 meq natrium per dag. Toediening van heparine deed de secretiesnelheid van aldosteron dalen van 545  $\mu\text{g}$  per 24 uur tot 85  $\mu\text{g}$  op de vijfde en 70  $\mu\text{g}$  op de zevende dag. Kort na het beëindigen van de heparine-toediening bleek de secretiesnelheid van aldosteron weer te zijn gestegen tot 333  $\mu\text{g}$  per 24 uur. De secretiesnelheid van corticosteron bleek parallel met die van aldosteron te veranderen. De uitkomsten vóór heparine-toediening waren 3,8 en 3,0 mg per 24 uur, op de vijfde dag van de toediening was de secretiesnelheid van corticosteron gedaald tot 2,0 mg en op de zevende dag tot 1,4 mg per 24 uur. Vier dagen na het beëindigen van de heparine-toediening was de secretiesnelheid weer in dezelfde orde van grootte als tevoren: 3,7 mg per 24 uur. Bovendien blijkt dat de uitscheiding van 17-hydroxycorticosteroiden niet verandert, terwijl een geringe maar onmiskenbare daling in de uitscheiding van 17-ketosteroiden uit de figuur kan worden afgelezen.

Samenvattend laat deze studie zien dat, behalve de reeds bekende fenomenen - natriurese met kaliumretentie, daling van de secretiesnelheid van aldosteron en geleidelijke vermindering van de 17-ketosteroidenuitscheiding met gelijk blijven van de uitscheiding van 17-hydroxycorticosteroiden - ook de *secretiesnelheid van corticosteron* tijdens heparine-toediening *daalt*.





Figuur 12. De vermindering van de secretiesnelheid van aldosteron en corticosteron onder invloed van Ro1-8307 bij een gezonde volwassen man (patiënt 16 uit tabel 14). Op de zesde dag van heparinoid-toediening blijkt ACTH de secretiesnelheid van aldosteron en corticosteron minder te stimuleren dan voor de toediening. Het effect op de uitscheiding van 17-ketosteroiden door heparinoid is bij deze persoon niet duidelijk aanwezig. De uitscheiding van 11-hydroxycorticosteroiden wordt door heparinoid niet beïnvloed.



Figuur 13. De vermindering van de secretiesnelheid van aldosteron en corticosteron onder invloed van heparine bij een gezonde volwassen man (patiënt 15 uit tabel 14). ACTH, toegediend vóór heparine, stimuleert de secretiesnelheid van aldosteron en corticosteron meer dan tijdens heparine-behandeling. Bij deze persoon lijkt wel een daling van de uitscheiding van 17-ketosteroiden op te treden. De uitscheiding van 11-hydroxycorticosteroiden wordt door heparine niet beïnvloed.

Een overeenkomstig resultaat werd verkregen in twee andere studies die hierna nog uitvoerig worden besproken. Om het effect van heparine op de secretiesnelheid van aldosteron en corticosteron te kunnen vergelijken zijn de procentuele remmingspercentages in tabel 20 bijeengezet.

In de twee volgende studies (figuur 12 en 13) werd bovendien het effect van ACTH op de secretiesnelheid van corticosteron en aldosteron zowel vóór als tijdens toediening van Rol-8307 en heparine bestudeerd. Aan patiënt Ar. (figuur 13) werd op alle dagen waarin secretiemetingen werden verricht 1000 ml van een glucose-oplossing van 5% in een 24 uur lopend infuus intraveneus toegediend; bij patiënt v.Ha. was dit alleen het geval tijdens de dagen waarop ACTH werd geïnfundeerd. De secretiesnelheid van corticosteron was tijdens een natriumarm dieet bij beide personen (Ar. en v.Ha.) vóór heparine-toediening 5,2 mg per 24 uur. Op de vierde dag van de toediening van Rol-8307 of heparine bleek deze secretiesnelheid te zijn gedaald tot 2,8 respectievelijk 3,3 mg per 24 uur. Ook in deze twee studies bleek de secretiesnelheid van corticosteron op de vierde dag na het staken van de behandeling weer van dezelfde orde van grootte te zijn als op de controledagen vóór de behandeling. De daling van de secretiesnelheid van aldosteron tijdens toediening van heparine of Rol-8307 wordt ook in deze twee studies geïllustreerd: bij Ar. neemt de secretiesnelheid van aldosteron

T a b e l 20

Procentuele remming van de secretiesnelheid van corticosteron en aldosteron door toediening van heparine of Rol-8307

Patiënt	% Remming van de secretiesnelheid van		Toediening
	corticosteron	aldosteron	
Sa.	47	84	heparine (5)
Sa.	63	87	heparine (7)
Ar.	39	52	heparine (4)
v.Ha.	40	84	Rol-8307 (4)
Gemiddeld	47	77	

Tussen haakjes is het aantal dagen van toediening vermeld.

af van 331 tot 137  $\mu\text{g}$  per 24 uur en bij v.Ha. van 799 tot 121  $\mu\text{g}$  per 24 uur. De uitscheiding van 17-ketosteroiden werd bij v.Ha. niet duidelijk door Rol-8307 beïnvloed. Bij Ar. is de uitscheiding tijdens toediening van heparine moeilijk te evalueren, daar de uitgangswaarde (misschien door de voorafgaande ACTH-toediening?) reeds op een laag niveau lag. De uitscheiding van 11-hydroxycorticosteroiden blijkt door heparine niet te worden beïnvloed. Vooral in de studie die werd verricht

T a b e l 21

Uitscheiding van 17-hydroxycorticosteroiden met de urine  
in de waarnemingen bij patiënten v.Ha. en Ar.

Dag	Persoon	
	Ar. mg/24 uur	v.Ha. mg/24 uur
1	8,8	
2	7,3	19,0
3	10,2	11,3
4	9,2	87,9 *)
5	42,9 *)	69,0
6	50,4	27,3
7	16,5	18,2
8	11,8	14,4
9	8,7	13,2
10	11,4 **)	17,4 **)
11	10,0	15,6
12	7,6	14,4
13	13,3	16,7
14	7,8	15,0
15	62,7 *)	81,2 *)
16	80,1	85,7
17	26,5	19,4
18	12,2	15,8
19	11,5	16,6

\*) tijdens toediening van 120 E ACTH, intraveneus, in een 24 uur lopend infuus

\*\*) tijdens toediening van heparine, 300 mg daags intraveneus, of Rol-8307, 800 mg daags intraveneus, gedurende zes dagen

bij proefpersoon v.Ha. is op de eerste dag van de heparine-toediening een duidelijke natriumretentie te zien. Dit verschijnsel is ook bij Ar. even aangeduid. Bij beiden ontstond later een matige maar onmiskenbare natriurese.

Toegediend ACTH, 120 E, intraveneus in een 24 uur lopend infuus van 1000 ml van een glucose-oplossing van 5%, deed de secretiesnelheid bij Ar. stijgen tot 51 mg per 24 uur, bij v.Ha. tot 104 mg per 24 uur. Op de zesde dag van de heparine- of heparinoïd-toediening bleek de secretie van corticosteron onder invloed van dezelfde hoeveelheid ACTH slechts te stijgen tot respectievelijk 39 en 45 mg per 24 uur. Bij nadere beschouwing blijkt echter dat de procentuele stijging tijdens de toediening van ACTH zowel vóór als gedurende de heparine-behandeling van dezelfde orde van grootte was. Hierbij moet worden opgemerkt dat 120 E ACTH, over 24 uur toegediend, een maximale prikkel vormt voor de produktie van bijnierschors hormonen.

Toediening van ACTH deed bij beide personen ook de secretiesnelheid van aldosteron stijgen, bij Ar. van 331 tot 1104  $\mu\text{g}$  per 24 uur en bij v.Ha. van 799 tot 1768  $\mu\text{g}$  per 24 uur. Onder invloed van heparine is de toename van de aldosteronsecretie tijdens ACTH-toediening ook geringer, bij patiënt Ar. van 137 tot 262  $\mu\text{g}$  per 24 uur en bij patiënt v.Ha. van 121 tot 231  $\mu\text{g}$  per 24 uur. Maar ook voor aldosteron geldt dat de procentuele toename van de secretiesnelheid door ACTH tijdens toediening van heparine of Rol-8307 niet duidelijk verminderd is. ACTH-toediening bleek de uitscheiding van 17-ketosteroiden en 11-hydroxycorticosteroiden tijdens toediening van heparine of Rol-8307 te doen stijgen tot waarden, vergelijkbaar met die vóór behandeling met deze stoffen. Tabel 21 laat zien dat dezelfde conclusie voor de uitscheiding van 17-hydroxycorticosteroiden gerechtvaardigd is. Tenslotte werd tijdens ACTH-toediening in beide studies een duidelijke natriumretentie gezien, die de door heparine en heparinoïd veroorzaakte natriurese volledig doorbrák.

### 2.3. Het effect van toediening van heparine gedurende 24 uur

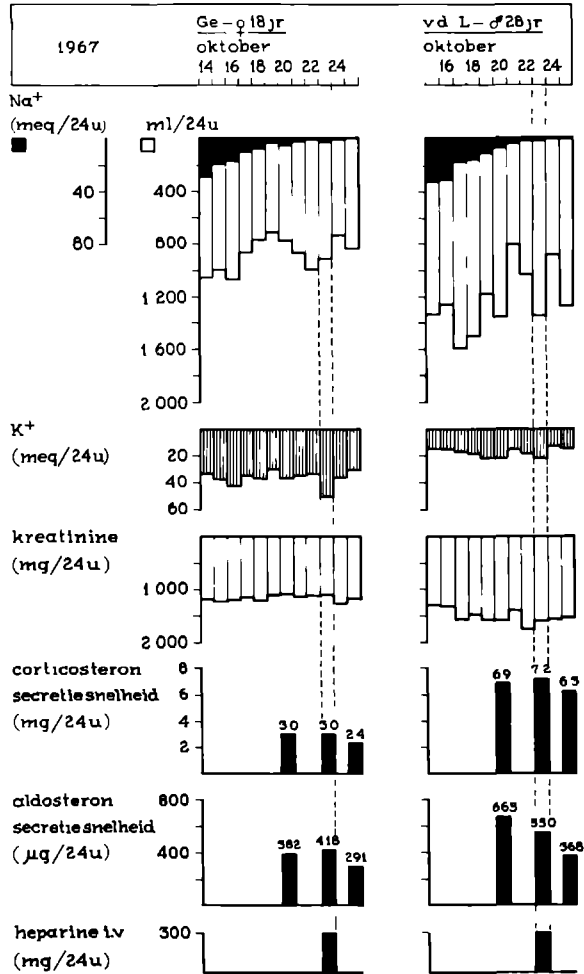
In een viertal waarnemingen werd het effect van een kortdurende toediening van heparine op de secretiesnelheid van aldosteron en

corticosteron nagegaan. De vier patiënten (Ge., v.d.L., R., en Ko.) gebruikten een natriumarm dieet, terwijl de opneming ook wat betreft kalium gestandaardiseerd was. De secretiesnelheid van beide steroïden werd gemeten vóór, tijdens en 2 dagen ná toediening van heparine gedurende 24 uur. Op deze dagen was bedrust voorgeschreven. De figuren 14 en 15 geven de resultaten van deze waarnemingen. Opvallend is dat geen van deze diagrammen een natriumretentie toont op de dag van toediening van heparine. Wel lijkt, behalve bij patiënt Ko. (rechterhelft, figuur 15), een geringe toeneming in de uitscheiding van kalium te ontstaan. Na toediening van heparine wordt alleen bij patiënt Ko. een geringe vertraagde natriurese gezien.

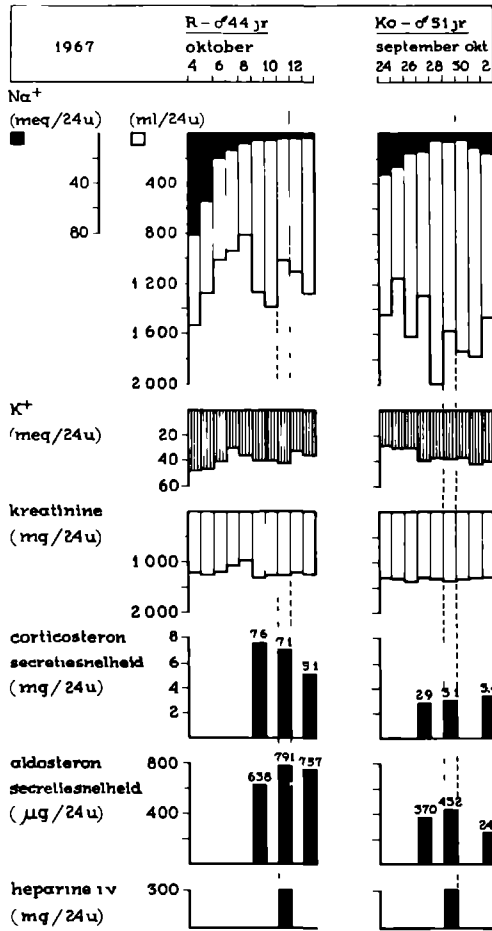
De secretiesnelheid van aldosteron werd op de eerste dag van toediening van heparine een weinig hoger gevonden dan op de controledag bij de patiënten R. en Ko., terwijl bij v.d.L. een lagere en bij Ge. een vrijwel gelijke uitkomst werd verkregen. De secretiesnelheid vóór heparine is gemiddeld 514  $\mu\text{g}$  per 24 uur en tijdens de toediening van heparine 548  $\mu\text{g}$  per 24 uur. De secretiesnelheid van corticosteron was op de dag dat heparine werd toegediend niet duidelijk anders dan op de controledag. Zowel vóór als tijdens de heparine-toediening was de secretiesnelheid van corticosteron gemiddeld 5,1 mg per 24 uur.

Twee dagen na de, één dag durende, toediening van heparine (drie dagen bij patiënt Ko.) is in drie waarnemingen de secretiesnelheid van aldosteron vrij duidelijk gedaald, maar weinig veranderd bij patiënt R. Vóór toediening van heparine was de secretiesnelheid gemiddeld 548  $\mu\text{g}$  per 24 uur en na toediening 391  $\mu\text{g}$  per 24 uur. De secretiesnelheid van corticosteron daalde in drie waarnemingen eveneens, zij het in geringe mate. Bij Ko. werd een te verwaarlozen stijging gevonden. De secretiesnelheid van corticosteron was gemiddeld vóór (zowel als tijdens) heparine-toediening 5,1 mg per 24 uur en ná toediening 4,3 mg.

Samenvattend bleek dat toediening van heparine gedurende slechts 24 uur de secretiesnelheid van aldosteron en corticosteron op de dag van toediening niet duidelijk veranderde. Twee dagen nadien evenwel was de secretiesnelheid van aldosteron lager. Een dergelijk vertraagd effect van een één dag durende heparine-toediening werd voor de secretiesnelheid van corticosteron niet duidelijk vastgesteld.



Figuur 14. Het effect van toediening van heparine gedurende 24 uur op de secretiesnelheid van aldosteron en corticosteron bij twee proefpersonen (patienten 5 en 18 uit tabel 14). Op de dag van toediening is het effect wisselend, maar in de periode van 24 tot 48 uur na de beëindiging van deze één-daagse behandeling is zowel bij Ge. (links) als bij v.d.L. (rechts) de secretiesnelheid van aldosteron en corticosteron lager dan vóór toediening. Op de dag van heparine-toediening wordt geen natriumretentie waargenomen, wel lijkt de kaliumuitscheiding groter te zijn.



Figuur 15. Het effect van toediening van heparine gedurende 24 uur op de secretiesnelheid van aldosteron en corticosteron bij twee volwassenen (patienten 19 en 3 uit tabel 14). Bij Ko. (rechts) is in de periode van 48 tot 72 uur na de beëindiging van de heparine-toediening wel de secretiesnelheid van aldosteron lager, maar de secretiesnelheid van corticosteron is toegenomen. Bij R. (links) is de corticosteron-secretiesnelheid in deze periode wel lager dan vóór de heparine-toediening. Ook in deze waarnemingen wordt geen natriumretentie op de dag van de heparine-toediening gezien. Bij Ko. lijkt in de dagen na deze toediening een geringe natriurese op te treden.



### § 3. SAMENVATTING EN BESCHOUWING

De in dit hoofdstuk beschreven waarnemingen over het effect van heparine en Rol-8307 op de secretiesnelheid van corticosteron kunnen als volgt worden samengevat:

1. Heparine en het heparinoïd Rol-8307 doen de secretiesnelheid van corticosteron bij de mens in enkele dagen dalen tot ongeveer 50% van de uitgangswaarde.
2. Deze remming van de functie van de bijnierschors bleek op de vierde dag na het staken van heparine of het heparinoïd te zijn verdwenen.
3. Uit de gelijktijdig gemeten secretiesnelheid van corticosteron en aldosteron vóór, tijdens en ná behandeling werd een gemiddelde remming van 47% van corticosteron en van 77% van aldosteron berekend.
4. Bij maximale stimulering van de bijnierschors door ACTH stijgt de secretiesnelheid tijdens behandeling met heparine of Rol-8307 procentueel tot dezelfde waarden als vóór de behandeling.
5. Toediening van heparine gedurende één dag verandert de secretiesnelheid van aldosteron noch van corticosteron op de dag van toediening duidelijk. Toch lijkt een effect op de bijnierschors te zijn opgetreden want twee dagen na de toediening van heparine werd een daling van de secretiesnelheid van aldosteron vastgesteld bij een dubieus effect op de produktie van corticosteron.

Onze bevinding dat niet alleen de secretiesnelheid van aldosteron, maar ook die van corticosteron door heparine en Rol-8307 wordt verminderd, weerspreekt duidelijk de hypothese van Conn. Deze onderzoeker veronderstelde, dat deze stoffen selectief enzymen zouden remmen die het C-18 atoom van corticosteron hydroxyleren.

Nu kan niet ontkend worden dat heparine en Rol-8307 de 18-hydroxylering kunnen remmen. Ook waarnemingen betreffende het effect van heparine op de omzetting van corticosteron in aldosteron door bijnierweefsel in vitro door de groep van Dorfman, zoals reeds vermeld in 1.3. wijzen in deze richting. Het leek daarom van belang na te gaan of heparine ook invloed heeft op de omzetting van corticosteron uit diens voorlopers.

In het laboratorium van de afdeling Medische Biologie werd door Benraad en medewerkers bijnierweefsel van diverse herkomst geïncubeerd in aanwezigheid van heparine.

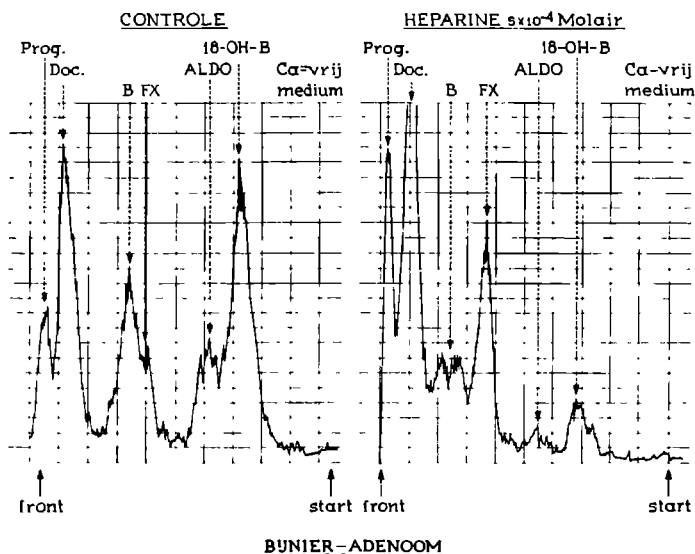
Ter illustratie moge de volgende waarneming vermeld worden Weefsel van een, bij operatie verwijderd, aldosteron-producerend bijnieradenoom (afkomstig van patiente Lo, wier ziektegeschiedenis uitvoerig is vermeld in hoofdstuk 5) werd in delen geïncubeerd in een calcium-vrij Krebs-Ringer-buffer medium. Bij de helft van de incubatievaatjes werd, gelijktijdig met het bijnierweefsel, heparine in een concentratie van  $5 \times 10^{-4}$  molaar toegevoegd. Na één uur incubatie werd  $^{14}\text{C}$ -progesteron als voorloper toegevoegd, waarna de incubatie nog twee uur werd voortgezet. Vervolgens werd het medium met dichloormethaan geëxtraheerd, waarna het gevormde steroidmengsel chromatografisch werd gescheiden. De identificatie van de corticosteroiden geschiedde door vergelijking van de chromatografische loopsnelheid na acetylering,  $\text{CrO}_3$ -oxydatie, hydrolyse en behandeling met perijoodzuur (Benraad c.s.-1968). De  $^{14}\text{C}$ -activiteit van het gevormde corticosteron is een maat voor de omzetting van progesteron in corticosteron.

Figuur 16 toont de verdeling van de radioactiviteit over de silica-gellaag waarop het geëxtraheerde steroidmengsel voor de eerste maal werd gechromatografeerd. De  $^{14}\text{C}$ -activiteit van zowel corticosteron, 18-hydroxycorticosteron als aldosteron blijkt in de aanwezigheid van heparine veel lager te zijn dan in de controlewaarnemingen.

Op grond van een groot aantal proeven bleek heparine de inbouw in aldosteron met 63%, in 18-hydroxycorticosteron met 64% en in corticosteron met 47% te verminderen. De radioactiviteit van het gevormde desoxycorticosteron was echter met 53% toegenomen. Hetzelfde patroon, waarbij desoxycorticosteron dus minder wordt omgezet in 11-hydroxycorticosteroiden in aanwezigheid van heparine is ook bij bijnierweefsel van runderen en ratten vastgesteld (Benraad c.s.-1968). Opvallend was steeds, evenals in bovengenoemde waarneming, dat de omzetting van progesteron in 18-hydroxycorticosteron en aldosteron méér geremd werd dan de omzetting in corticosteron.

Indien deze waarnemingen gesteld worden naast die van Sharma en medewerkers, en van het verschil in proefopstelling wordt afgezien, lijken zij te passen bij onze klinische waarnemingen die immers aan het licht brachten dat de remming van de secretiesnelheid van aldosteron sterker is dan die van corticosteron.

ACTH kan tijdens toediening van heparine of Rol-8307 de secretiesnelheid van corticosteron nog duidelijk doen toenemen: de procentuele toeneming is zelfs van dezelfde orde van grootte als vóór de behandeling. In de twee studies die in de figuren 12 en 13 zijn geïllustreerd steeg ook de secretiesnelheid van aldosteron toen tijdens de heparine-toe-



Figuur 16. Verdeling van de radioactiviteit over de dunnelaag na chromatografie van extracten van het incubatie-medium van een aldosteronproducerend bijnieradenoom. Als radioactieve precursor was  $^{14}\text{C}$ -progesteron toegevoegd. In het rechter deel van de figuur staat de waarneming, waarbij heparine aan het incubatie-medium was toegevoegd. De radioactiviteitspieken van deze scan, welke corresponderen met het gebied van aldosteron, 18-hydroxycorticosteron en corticosteron, zijn lager dan in de controlewaarneming (linker deel van de figuur). De radioactiviteitspieken van desoxycorticosteron en progesteron zijn echter hoger in de aanwezigheid van heparine. De piek van radioactiviteit die is aangeduid met FX (de plaats van cortisol) bleek bij nader chromatografisch onderzoek niet overeen te komen met cortisol. Het onderhavige steroid kon nog niet worden geïdentificeerd.

diening ACTH werd geïnfundeerd. Deze stijging was nagenoeg gelijk aan die welke werd gevonden bij normale proefpersonen aan wie geen zoutbeperking met het dieet was opgelegd (Kloppenborg-1966). Uit deze overweging moet men de conclusie trekken dat heparine en Rol-8307 de gevoeligheid van de bijnier voor ACTH niet veranderen. Ook het effect van ACTH op de excretie van 17-hydroxycorticosteroiden en 17-ketosteroiden, die tot dezelfde waarden stijgen zowel vóór als tijdens behandeling met heparine of Rol-8307, geeft steun aan deze conclusie. Daarentegen bleek in de waarnemingen van Kloppenborg (1966), dat heparine de gevoeligheid van de zona glomerulosa voor angiotensine, gemeten aan het effect op de secretiesnelheid van aldosteron, wel verlaagt.

De verklaring voor de waarnemingen dat heparine en Rol-8307 zowel een selectieve ongevoeligheid voor angiotensine veroorzaken als intra-adrenale effecten op de biosynthese van corticosteron en aldosteron, is met de thans bekende gegevens niet te geven.

Het ontbreken van een effect van heparine op de uitscheiding van 17-hydroxycorticosteroiden, terwijl in bijnierweefsel in vitro wel remming optreedt van de 11-hydroxylering en in vivo van de corticosteronproductie zou kunnen passen bij de opvatting dat heparine voornamelijk zijn werking op de zona glomerulosa uitoefent.



# 5. De secretiesnelheid van corticosteron bij het syndroom van Cushing en bij primair hyperaldosteronisme

## § 1. DE SECRETIESNELHEID VAN CORTICOSTERON BIJ HET SYNDROOM VAN CUSHING

### 1.1. Inleiding

Het is wellicht zinvol bij onze huidige stand van kennis het syndroom van Cushing nog eens te definiëren als de combinatie van klinische en metabole afwijkingen, die het gevolg zijn van een chronische overmaat van cortisol, hetzij in het lichaam geproduceerd, hetzij als medicament toegediend (cortisol of een half-synthetische analoog).

Men kan de verschillende vormen van het syndroom van Cushing grofweg in twee groepen verdelen:

1. het syndroom van Cushing door overproductie van ACTH, waarbij men onderscheid dient te maken tussen:
  - a. de 'klassieke' ziekte van Cushing, waarbij de hypofyse teveel ACTH produceert en
  - b. het zogenaamde 'ectopische ACTH-syndroom' als gevolg van een productie van ACTH buiten de hypofyse en voorzover wij thans weten door verschillende tumoren.
2. het syndroom van Cushing ten gevolge van overproductie van corticosteroiden door bijnertumoren zoals adenomen en carcinomen.

Er zijn verspreid in de literatuur weliswaar enkele waarnemingen

vermeld over de secretiesnelheid van corticosteron (Biglieri c.s.-1963, Van der Straeten c.s.-1963, Karl en Raith-1965c), maar in deze studies ontbreken klinische gegevens van de onderzochte patiënten zodat conclusies over de relatie tussen het klinische beeld en de secretiesnelheid van corticosteron en eventueel andere parameters van de bijnierschorsfunctie niet mogelijk zijn. Er moet echter één uitzondering gemaakt worden: onze landgenoot Cost (1960, 1963) mat bij een groot aantal patiënten met bijnierziekten het patroon van uitscheiding van een aantal metaboliëten van corticosteroiden met de urine. In zijn waarnemingen valt op dat alleen bij één patiënt met bijnierhyperplasie door een vermoedelijk ACTH-producerend bronchuscarcinoom, de uitscheiding van corticosteron-metaboliëten duidelijk verhoogd was.

Wij waren in de gelegenheid bij drie patiënten met het ectopische ACTH-syndroom, en bij twee patiënten met een bijnierschorscarcinoom, de secretiesnelheid van corticosteron, in correlatie met het klinische beeld en de uitscheiding van 17-hydroxycorticosteroiden en 11-hydroxycorticosteroiden, te meten. Deze waarnemingen worden in de volgende twee paragrafen besproken; hieraan vooraf gaat een korte schets van de literatuur.

## 1.2. De secretiesnelheid van corticosteron bij het ectopische ACTH-syndroom

### 1.2.1. Literatuurgegevens

In de laatste jaren is steeds duidelijker aan het licht gekomen dat tumoren vaak oorzaak van bijnierhyperplasie door ACTH-overproductie zijn en wellicht zelfs frekwenter dan de hypofyse, welk orgaan in de klassieke beschrijving van Cushing centraal werd gesteld. In 1928 verscheen de eerste mededeling over het samengaan van hypercorticisme met tumoren van niet-endocrien weefsel (Brown-1928). Dat een causaal verband moest worden aangenomen bleek pas veel later toen bij deze patiënten uit het plasma (Christy-1961) en uit de tumor (Meador c.s.-1962) een substantie kon worden geïsoleerd met een zelfde biologische activiteit als ACTH. Het bronchuscarcinoom, het thymoom en het pancreascarcinoom nemen als tumoren die ACTH kunnen produceren de eerste plaats in (O'Riordan c.s.-1966).

Het ectopische ACTH-syndroom verschilt wezenlijk van het hypofysaire ACTH-syndroom omdat bij het eerste ziektebeeld geen terugkop-

peling van de ACTH-productie, zelfs niet door grote hoeveelheden endo-geen geproduceerde of exogeen toegediende glucocorticoiden mogelijk blijkt. Daarom zijn vaak zowel de ACTH-spiegels in het circulerende bloed als de overproductie van corticoiden bij het ectopische ACTH-syndroom hoger dan bij de hypofysaire vorm (Liddle c.s.-1965, Liddle-1967). Dit is wellicht de reden waarom symptomen zoals opvallende spier-atrofie, hypokaliëmisches alkalose en oedemen meestal sterker uitgesproken zijn dan bij de klassieke ziekte van Cushing. Uiteraard moet men zich realiseren dat kwaadaardige tumorgroei zelf, eventueel bevorderd door een complicerende ontsteking, ook tot cachexie met spierversval, en tot hypoproteïnemie met oedemen aanleiding geven kan.

Er zijn ons geen metingen van de secretiesnelheid van corticosteron bekend bij het ectopische ACTH-syndroom. Wel werd door Meador van de groep van Liddle (Meador c.s.-1962) bij twee patiënten de uitscheiding van THB met de urine bepaald. Deze was extreem hoog en bedroeg respectievelijk 14 en 15 mg per 24 uur. Indien men aanneemt dat bij de door hen gebruikte bepalingstechniek ongeveer 10% van de gesecerneerde hoeveelheid corticosteron als deze metaboliet wordt gemeten, dan moet aangenomen worden dat deze patiënten ongeveer 150 mg corticosteron per 24 uur hebben geproduceerd. Men moet echter wel bedenken dat bij deze vormen van hypercorticisme door de extreem hoge cortisolproductie aan de chromatografische zuiveringsprocedures ter isolering van afzonderlijke metabolieten uit de urine hoge eisen worden gesteld. Uit de studie van deze onderzoekers blijkt niet dat hun methodiek aan deze hoge eisen voldeed. Zoals vermeld stelde Cost (1963) bij één patiënt met dit ziektebeeld een uitscheiding van corticosteron-metabolieten met de urine vast, die het tienvoud bedroeg van de uitscheiding bij gezonde volwassenen.

### *1.2.2. Eigen waarnemingen*

Bij drie patiënten met het ectopische ACTH-syndroom wier ziektegeschiedenissen in deze paragraaf worden besproken werden metingen van de secretiesnelheid van corticosteron verricht tijdens het gebruik van een gestandaardiseerd natriumarm dieet. Op de dagen van de metingen werd bedrust voorgeschreven. Enkele klinische gegevens en laboratoriumuitkomsten van meer algemene aard zijn in tabel 22 bijeengezet. Tabel 23 bevat de gegevens van het bijnierfunctieonderzoek.



T a b e l 22

Enkele klinische gegevens en laboratoriumuitkomsten van meer algemene aard  
betreffende drie patiënten met het ectopische ACTH-syndroom

Patiënt Geslacht Leeftijd	Tumor	Klinische gegevens						Algemeen: laboratoriumgegevens					
		Volle- maans- ge- zicht	Bloed- druk mmHg	Subcu- tane bloed- dingen	Oe- deem	Spier- atrofie	Psy- chi- sche veran- dering	Plasma- mineralen meq/l			Plasma- glucose- gehalte mg/100 ml		
							Na	K	Cl	HCO <sub>3</sub>	nuch- ter	11.00 uur	
Ja. ♂ 58 jr	oatcell- carcinoom	+	160/90	+	++	+	+	145	3,5	101	29,4	68	203
Da. ♂ 20 jr	thymoma	+	170/115- 220/150	+	-	++	++	134	2,9	103	36,0	130	
St. ♂ 67 jr	niet gedifferen- tieerd kleincellig longcarcinoom	-	140/85	-	++	+	+	149	2,5	103	33,0	217	

T a b e l 23

Gegevens over het bijnierfunctie-onderzoek bij drie patiënten met het ectopische ACTH-syndroom

Patiënt Geslacht Leeftijd	Uitscheiding 17-hydroxy- corticosteroiden in urine mg/24 uur		Uitscheiding 11-hydroxy- corticosteroiden in urine µg/24 uur		Uitscheiding 17-ketosteroiden in urine mg/24 uur		Plasma 11-hydroxy- cortico- steroiden µg/100 ml		Secretiesnelheid van corticosteron mg/24 uur	
	spon- taan	na dexa- methason *)	spon- taan	na dexa- methason *)	spon- taan	na dexa- methason *)	8.00 uur	20.00 uur	spon- taan	na dexa- methason *)
Ja. ♂58 jr	69	97	2787	5070	24	26	41	39	28,6	24,9
Da. ♂20 jr	141	620	8205	38576	62	155	52	44	27,0	191
St. ♂67 jr	45		2436		36		41	40	11,9	
	80	69	7660	8300	37	38	94			

\*) dexamethason werd gedurende twee dagen toegediend in een hoeveelheid van 2 mg om de 6 uur

## ZIEKTEGESCHIEDENISSEN:

Patiënt Ja., geboren 1909.

*Voorgeschiedenis:* Patiënt werd op 13 oktober 1967 in de Dr. van Spanjekliniek te Groesbeek (Hoofd: Dr. A.M.W. Hekking) opgenomen omdat hij sedert juli 1967 klachten had over kortademigheid en hoesten. Tevens had hij last gekregen van dikke enkels en was hij de laatste paar maanden 7 kg in gewicht aangekomen. De eetlust was toegenomen en volgens zijn omgeving zag patiënt er opvallend goed uit. Hij rookte sedert jaren 25 sigaretten per dag. Bij onderzoek viel op dat het gezicht wat opgezet was. Er was oedeem rond de enkels. De bloeddruk bedroeg 160/100 mmHg. De centrale veneuze druk was niet verhoogd. Het ademgeruis was boven het bovenveld van de rechter long verzwakt. Er werden geen pathologische lymfomen gevoeld. De lever was niet vergroot. Bij röntgenologisch onderzoek van de borstorganen werd een beschaduwing gezien in het bovengebied van de rechter long. Bij bronchografie werd geen vulling verkregen van de rechter bovenkwabsbronchus. Bij mediastinoscopie werden enkele kleine kliertjes verwijderd, waarop de diagnose: 'metastase van een oatcell-carcinoom' (Dr. P.M. Arkenbout, St. Canisius Ziekenhuis te Nijmegen) werd gesteld. Het gehalte van de 11-hydroxycorticosteroiden in plasma, 's morgens om 9 uur, was tot 39 µg per 100 ml verhoogd, terwijl deze waarde niet daalde na toediening van dexamethason. Ter verificatie van de waarschijnlijkheidsdiagnose ectopisch ACTH-syndroom en voor eventuele behandeling werd patiënt op 15 november 1967 naar onze kliniek overgeplaatst.

*Lichaamsonderzoek.* Patiënt maakte een emotioneel-labiele indruk. Het gelaat was opgezet. Er was nog duidelijk oedeem rond de enkels. De bloeddruk bedroeg 160/90 mmHg. De onderarmen en bovenbenen toonden geringe spieratrofie. Er waren geen striae. De huid was niet abnormaal gepigmenteerd en toonde geen acne.

*Laboratoriumonderzoek:* De bezinkingssnelheid van de erythrocyten bedroeg 64 mm na een uur. Het hemoglobinegehalte was 152 g per liter. Het aantal leukocyten was 6400 per mm<sup>3</sup>. Hiervan waren 2% staafkernigen, 74% segmentkernigen, 20% lymfocyten en 4% monocyten. Bij herhaling werden geen eosinofielen gezien. De gehalten van mineralen in het plasma waren: natrium 145 meq/l, kalium 3,5 meq/l, chloride 101 meq/l en bicarbonaat 29,4 meq/l. Er bestond dus een hypokaliëmische

alkalose. De pH van het capillaire bloed was 7,506. De glucosebelastings-curve had een diabetisch beloop: nuchter 68 mg%, na  $\frac{1}{2}$  uur 116 mg%, na 1 uur 175 mg%, na 2 uur 203 mg% en na drie uur 141 mg%. Het totale serumeiwitgehalte was 62,8 g per liter met een albuminegehalte van 40,7 g per liter.

Het gehalte van de 11-hydroxycorticosteroiden in plasma was verhoogd en het normale 24-uurs ritme ontbrak: de acht over 24 uur gemeten uitkomsten varieerden slechts van 38 tot 41  $\mu$ g per 100 ml plasma. De uitscheiding van de totale 17-hydroxycorticosteroiden met de urine was verhoogd tot 69 mg per 24 uur. De uitscheiding van de 11-hydroxycorticosteroiden bedroeg 2787  $\mu$ g per 24 uur. Ook de uitscheiding van de 17-ketosteroiden was verhoogd: 24 mg per 24 uur. De *secretiesnelheid van corticosteron* was sterk verhoogd en bedroeg 28,6 mg per 24 uur. Die van aldosteron was, gemeten tijdens gebruik van een natrium-arm dieet, slechts 32  $\mu$ g per 24 uur.

Na toediening van dexamethason in een hoge dosering, 2 mg om de 6 uur gedurende 2 dagen werd geen daling van de produktie van steroiden gezien. De *secretiesnelheid van corticosteron* was op de tweede dag nog 24,9 mg per 24 uur. Ook de uitscheiding van 17-hydroxycorticosteroiden daalde niet, maar steeg zelfs tot 97 mg per 24 uur, evenals die van de 11-hydroxycorticosteroiden (tabel 23).

*Beloop:* Na overleg met medewerkers van het Instituut voor Röntgenologie (Directeur: Dr. W.H.A.M. Penn) werd besloten tot radiotherapie van het bronchuscarcinoom. De bestraling werd op 25 november 1967 aangevangen. Omdat de klinische toestand van patiënt tijdens de eerste dagen van opneming snel achteruit leek te gaan, werd vanaf 1 december tevens  $\alpha$ -amino-glutethimide (Elipten) \*) in een dosering van 500 mg per dag gegeven. Deze qua chemische structuur aan het slaapmiddel glutethimide (Doriden, Ciba) verwante verbinding remt de omzetting van cholesterol naar pregnenolon in de bijnierschors waardoor de produktie van steroiden als cortisol, corticosteron en aldosteron zeer snel daalt (Scheingart c.s.-1966, Fishman c.s.-1967). Op 6 december kreeg patiënt klachten over een orthostatische hypotensie. Het lichaamsgewicht was in de voorafgaande week met 4 kg afgenomen. Het 11-hydroxycorticosteroidengehalte van het plasma was gedaald tot 28,1

\*)  $\alpha$ -amino-glutethimide (Elipten) werd ons door de N.V. Ciba te Basel welwillend ter beschikking gesteld.

$\mu\text{g}$  per 100 ml, de uitscheiding van de 17-hydroxycorticosteroiden met de urine tot 5,5 mg per 24 uur en de uitscheiding van de 11-hydroxycorticosteroiden tot 268  $\mu\text{g}$  per 24 uur. In deze periode bedroeg de *secretiesnelheid van corticosteron* 2,8 mg per 24 uur. Na toediening van grote hoeveelheden natriumchloride verdwenen de klachten van patient en steeg het lichaamsgewicht weer tot de uitgangswaarde. Patient werd op 6 januari 1968 uit het ziekenhuis ontslagen.

Patient Da., geboren 1946. \*)

*Voorgeschiedenis:* Patient was op 10 oktober 1966 ziek geworden met een algemeen en vaag klachtenpatroon. Hij werd echter toenemend vaward. Bij opnemng op de neurologische afdeling van het Ziekenhuis St. Annadal te Maastricht (Hoofd: Dr. G. Padberg) imponeerde het beeld als een virale encefalitis. Wel werd een verhoogd gehalte aan glucose in het bloed vastgesteld en bleek een hypokaliemische alkalose aanwezig te zijn. In de loop van een week steeg de bloeddruk tot waarden rond 250/140 mmHg. Er trad geleidelijk spieratrofie op. Op 27 november 1966 werd patient overgeplaatst naar de neurologische afdeling van het St. Radboud Ziekenhuis te Nijmegen (Hoofd Prof. Dr. J. J. G. Prick) en na onderling overleg op 7 december naar onze afdeling.

*Lichaamsonderzoek:* Patient maakte een suffe indruk en reageerde traag. Het gelaat was vergeleken met enkele weken eerder gemaakte foto's opgezet en vrij bleek. Het toonde een papulo-pustuleus exantheem. De bloeddruk bedroeg 150/100 mmHg. Er was geen oedeem. De spieren van de extremiteiten waren zeer sterk atrofisch. Striae waren niet aanwezig.

*Laboratoriumonderzoek:* Er was een hypokaliemische alkalose. De gehalten van mineralen in het plasma waren: natrium 134 meq/l, kalium 3,4 meq/l (tijdens toediening van 6 g kaliumchloride per os), chloride 103 meq/l en bicarbonaat 34,6 meq/l. Het glucosegehalte van het bloed varieerde tussen 130 en 200 mg%.

Het gehalte van de 11-hydroxycorticosteroiden in het plasma was verhoogd en varieerde gedurende 24 uur slechts tussen 44 en 52  $\mu\text{g}$  per 100 ml. De uitscheiding van de totale 17-hydroxycorticosteroiden met de

---

\*) Deze patient werd door J. A. Flendrig en medewerkers op 28 november 1967 op de vergadering van de Nederlandse Vereniging voor Endocrinologie uitvoerig besproken.

urine was 141 mg per 24 uur. De *secretiesnelheid van corticosteron* was verhoogd tot 27,0 mg per 24 uur, die van aldosteron bedroeg slechts 18 µg per 24 uur.

Na twee dagen dexamethason-toediening in een hoeveelheid van 2 mg om de 6 uur bleek de uitscheiding van de 17-hydroxycorticosteroiden te zijn toegenomen tot 620 mg per 24 uur. Ook de *secretiesnelheid van corticosteron* was enorm gestegen tot 191 mg per 24 uur. Op dit paradoxale antwoord op dexamethason bij deze patient wordt in dit proefschrift niet nader ingegaan.

*Beloop:* Bij rontgenologisch onderzoek van de borstorganen werd ventraal in het mediastinum een schaduw gezien die suggestief was voor de aanwezigheid van een thymoom. Op 27 december 1966 werd door de chirurg (Prof. Dr. W. J. H. Schmidt) thoracotomie verricht, waarbij 62 g tumorweefsel werd verwijderd. Bij patholoog-anatomisch onderzoek (Prof. Dr. P. H. M. Schillings) werd de diagnose: 'maligne thymoma van het spoelceltype' gesteld. Postoperatief bleek het hypercorticisme snel te verdwijnen. Op 10 juni 1967 was de *secretiesnelheid van corticosteron* 1,2 mg per 24 uur. Bij onderzoek van de tumor bleek inderdaad ACTH-activiteit aanwezig te zijn (Laboratorium Dr. G. W. Liddle, Vanderbilt University, Nashville, Tenn., U.S.A.).

Patient St., geboren 1900.

Patient werd op 12 april 1967 op de inwendige afdeling A van het St. Canisius Ziekenhuis te Nijmegen (Hoofd: H. B. Benraad) opgenomen \*). Hij had al jaren last van kortademigheid en was altijd een stevige roker geweest. Twee maanden voor opname was hij plotseling gaan klagen over dikke enkels, terwijl omstreeks dezelfde tijd polydipsie en polyurie ontstonden. Bij het eerste onderzoek maakte patient een eufore indruk. Het gelaat was niet opvallend veranderd. De bloeddruk bedroeg 140/85 mmHg, de centrale veneuze druk was niet verhoogd. Er was oedeem aan beide onderbenen. De longen toonden het beeld van een emfyseem. Spieratrofie werd niet gezien. Er waren geen striae. Bij het laboratoriumonderzoek werd een hypokaliemische alkalose vastgesteld. De gehalten van mineralen in plasma waren: natrium 149 meq/l, kalium

\*) Gaarne danken wij collega Benraad voor de ons geboden mogelijkheid de secretiesnelheid van corticosteron bij deze patient te bepalen en voor zijn bereidwilligheid de klinische gegevens voor dit proefschrift beschikbaar te stellen.

2,5 meq/l, chloride 103 meq/l en bicarbonaat 33 meq/l. Er was een glucosurie en het glucosegehalte van het bloed, nuchter afgenomen, bedroeg 217 mg%.

Het gehalte van de 11-hydroxycorticosteroïden in het plasma was verhoogd en varieerde gedurende 24 uur slechts tussen 40 en 41  $\mu$ g per 100 ml. De uitscheiding van de totale 17-hydroxycorticosteroïden met de urine bedroeg 44,7 mg, die van de 17-ketosteroïden 40,1 mg per 24 uur. De *secretiesnelheid van corticosteron* was verhoogd tot 11,9 mg per 24 uur. Dexamethason, toegediend in een dosering van 2 mg om de 6 uur, veroorzaakte geen duidelijke vermindering van de uitscheiding van de 17-hydroxycorticosteroïden, de 11-hydroxycorticosteroïden of de 17-ketosteroïden. Bij röntgenologisch onderzoek werden geen zekere aanwijzingen verkregen voor de aanwezigheid van een bijniertumor of een tumor elders in het lichaam. De klinische toestand van patiënt ging ondanks behandeling met  $\alpha$ -amino-glutethimide snel achteruit. Er trad een progressieve spieratrofie op, de man werd psychotisch en is op 7 juni 1967 overleden. Bij autopsie (Dr. P.M. Arkenbout) werd perifeer in de onderkwab van de rechter long een niet-gedifferentieerd carcinoom gevonden met uitzaaiing naar het mediastinum.

De drie hier beschreven ziektegeschiedenissen van patiënten met het ectopische ACTH-syndroom illustreren dat dit ziektebeeld zich op verschillende wijzen kan presenteren. Bij patiënt St. werd het klinische beeld geheel beheerst door de verschijnselen van het hypercorticisme: diabetes mellitus, oedeem en hypokaliëmiscie alkalose. Hoewel gericht naar de aanwezigheid van een maligne tumor werd gezocht, werd deze pas bij de autopsie gevonden. Ook bij patiënt Da. stond het progressief-maligne beloop van het hypercorticisme met enorme spieratrofie en ernstige psychische veranderingen op de voorgrond. Geheel anders was het ziektebeeld bij patiënt Ja. Bij hem waren de lokale klachten van de tumor het belangrijkste. De hypokaliëmiscie alkalose, het opgezette gelaat en de spieratrofie deden echter de aanwezigheid van hypercorticisme vermoeden.

De secretiesnelheid van corticosteron was bij onze patiënten met het ectopische ACTH-syndroom onmiskenbaar verhoogd. De geproduceerde hoeveelheid corticosteron lijkt echter pathofysiologisch van weinig be-

tekenis te zijn indien men deze vergelijkt met de hoeveelheid cortisol die, afgeleid uit de uitscheiding van de totale 17-hydroxycorticosteroiden, vermoedelijk bij deze patiënten werd gevormd. Zoals in hoofdstuk 1 is uiteengezet kan van een hoeveelheid corticosteron van 25 mg per dag weinig invloed op de koolhydraatstofwisseling en op de huishouding van natrium en kalium verwacht worden. In dit verband lijkt ons de waarneming bij patiënt St. van belang. Bij hem was de hypokaliëmie het meest uitgesproken en was het nuchtere bloedsuikergehalte het hoogst. De secretiesnelheid van corticosteron daarentegen was de laagste van de gevonden waarden en bedroeg slechts drie maal de gemiddelde uitkomsten bij gezonde volwassenen.

Overigens blijkt uit de zeer lage secretiesnelheid van aldosteron bij de patiënten Ja. en Da. dat ook dit hormoon niet aansprakelijk kan zijn geweest voor de aanwezige hypokaliëmiscie alkalose. De door Cost in 1963 geformuleerde conclusie dat "the production of excess corticosterone is responsible for the mineralo-corticoid-excess syndrome observed in this and other patients with 'carcinoma induced adrenocortical hyperactivity'" lijkt op grond van de nu bekende gegevens dus niet houdbaar.

### *1.2.3. De secretiesnelheid van corticosteron na acute en na chronische stimulering door ACTH*

Bij nadere beschouwing blijkt de secretiesnelheid van corticosteron bij de in paragraaf 1.2.2. besproken patiënten minder hoog te zijn dan bij gezonde volwassenen tijdens maximale stimulering met ACTH. In hoofdstuk 3 zagen wij dat toediening van ACTH gedurende één dag de secretiesnelheid van corticosteron tien tot twintig maal doet stijgen, terwijl de uitscheiding van 17-hydroxycorticosteroiden ongeveer drie maal zo hoog werd. Bij onze patiënten met chronische ACTH-stimulering daarentegen was de secretiesnelheid van corticosteron slechts drie tot zeven maal het gemiddelde bij gezonde mensen, terwijl de excretie van 17-hydroxycorticosteroiden gemiddeld hoger was dan tijdens ACTH-toediening gedurende een dag. Deze gegevens suggereren dat ACTH in het acute experiment vooral de produktie van corticosteron bevordert, terwijl de bijnier bij langdurige ACTH-prikkeling relatief meer cortisol en minder corticosteron produceert. Een aantal literatuurgegevens zouden deze stelling kunnen steunen, Bayliss c.s.-1954,



Nugent c.s.-1959, Reed c.s.-1964 en Tucci c.s.-1967 namen waar dat de cortisolproductie van de bijnier van de mens bij chronische ACTH-stimulering voortdurend toeneemt. Aan deze waarnemingen ontbreken gegevens over de produktie van corticosteron. Raiti c.s. maten zowel de produktie van cortisol als die van corticosteron op de derde dag van ACTH-stimulering en vonden dat beide procentueel even sterk waren toegenomen. In deze studies ontbreken helaas gegevens over het effect van ACTH op de eerste dag van toediening. Wel suggereren deze gegevens dat de produktie van corticosteron bij langdurige ACTH-stimulering niet verder toeneemt. Ook de waarnemingen van Grant c.s. (1957) passen goed in deze veronderstelling. Deze onderzoekers verwijderden in twee tempi de bijnieren van een aantal vrouwen met een gemetastaseerd mammacarcinoom. Bij elke operatie, waarbij dus één bijnier werd verwijderd, werd de produktie van zowel cortisol als van corticosteron bepaald uit het veneuze bloed van deze bijnier. Vóór de verwijdering van de tweede bijnier werd gedurende vier dagen ACTH toegediend. Uit de vermelde gegevens van de onderzoekers kan men berekenen dat de gemiddelde cortisolproductie van de bijnier die het eerst werd verwijderd 1,9 maal zo hoog was als de gemiddelde corticosteronproductie. De cortisolproductie van de tweede bijnier, die gedurende vier dagen met ACTH was gestimuleerd, was gemiddeld 5,3 maal zo hoog als die van corticosteron. Indien men nu bedenkt dat bij operaties de endogene ACTH-afgifte maximaal wordt gestimuleerd, dan mag men de cortisol/corticosteron-verhouding die bij de eerste operatie werd gevonden, representatief achten voor acute ACTH-stimulering, terwijl die van de laatste operatie het resultaat van chronische ACTH-prikkeling weergeeft. Dat wil dus zeggen dat ook deze waarneming suggereert dat chronische ACTH-stimulering de produktie van cortisol relatief meer stimuleert dan die van corticosteron.

Ook uit het dierexperiment zijn enkele aanwijzingen voor de bovengenoemde opvatting te verkrijgen. In 1954 stelden Kass en medewerkers vast dat konijnen na langdurige toediening van ACTH relatief meer cortisol dan corticosteron gingen produceren. In 1966 zag Morozova dat het bijnierweefsel van konijnen die in vivo tenminste 1 dag ACTH kregen toegediend, meer cortisol en minder corticosteron in vitro vormden dan het weefsel van controledieren.

Wij hebben getracht voor bovengenoemde stelling steun te verkrijgen

in twee waarnemingen bij gezonde proefpersonen. Aan deze volwassenen werd gedurende drie dagen ACTH toegediend in een dosering van 45 E intramusculair tweemaal per dag. De proefpersonen gebruikten gewone ziekenhuisvoeding. De secretiesnelheid van corticosteron werd gemeten op de eerste en op de derde dag van de toediening. De uitscheiding van de totale 17-hydroxycorticosteroiden met de urine werd bepaald als maat voor de cortisolproductie. Tabel 24 geeft een overzicht van de verkregen resultaten. De uitscheiding van de 17-hydroxycorticosteroiden met de urine blijkt op de derde dag van de ACTH-toediening ongeveer tweemaal zo hoog te zijn als op de eerste dag, die van de 11-hydroxycorticosteroiden steeg bij de eerste patiënt bijna drieëneenhalf maal en bij de tweede met ruim 85%. De secretiesnelheid van corticosteron op de derde dag van de ACTH-toediening was bij de eerste patiënt maar 50% hoger dan op de eerste dag. Bij de tweede patiënt waren de uitkomsten op beide dagen identiek.

T a b e l 24

Het effect van toediening van ACTH \*)  
gedurende drie achtereenvolgende dagen  
op de secretiesnelheid van corticosteron  
en op de uitscheiding van 11-hydroxycorticosteroiden  
en 17-hydroxycorticosteroiden met de urine

No. patiënt **)	Controle waarneming	ACTH-toediening	
		1e dag	3e dag
		Secretiesnelheid van corticosteron mg/24 uur	
1	2,3	20,5	30,2
6	3,7	23,3	23,5
		Excretie van 11-hydroxycorticosteroiden $\mu$ g/24 uur	
1	230	1080	3744
6	268	1736	3210
		Excretie van 17-hydroxycorticosteroiden mg/24 uur	
1	9,6	13,6	28,2
6	13,5	22,7	45,7

\*) ACTH werd tweemaal per dag in een hoeveelheid van 45 E intramusculair toegediend.

\*\*\*) zie tabel 14 in hoofdstuk 2.

#### *1.2.4. Samenvatting*

Bij drie patiënten met het ectopische ACTH-syndroom werd een verhoogde secretiesnelheid van corticosteron gevonden. Deze verhoging bleek niet zo sterk te zijn dat hiervan belangrijke biologische effecten verwacht mochten worden. Uit eigen observaties en gegevens uit de literatuur werd de stelling geadstrueerd dat chronische ACTH-overproductie de secretie van corticosteron relatief minder verhoogt dan die van cortisol in tegenstelling tot het effect van acute ACTH-stimulering.

### 1.3. De secretiesnelheid van corticosteron bij het bijniercarcinoom

#### *1.3.1. Inleiding*

Bij het bijniercarcinoom kan het patroon van de corticosteroidenproductie zeer sterk variëren. Er zijn carcinomen bekend waarbij een eenvoudig bijnierfunctieonderzoek weinig of geen veranderingen aan het licht bracht. Daarnaast zijn tumoren beschreven waarbij alleen een of meer voorlopers van cortisol in overmaat worden geproduceerd. Tenslotte zijn tumoren bekend waarbij de productie van één van de bekende actieve bijnierschorssteroiden (cortisol, aldosteron, oestrogenen en androgenen) op de voorgrond staat. Bovendien hangt de hoeveelheid geproduceerde hormonen af van de grootte en eventuele metastasering van het carcinoom. Door ons werd de secretiesnelheid van corticosteron, onder verschillende omstandigheden, gemeten bij twee patiënten met een hormonaal-actief bijniercarcinoom. Bij één van deze patiënten stond de overproductie van aldosteron sterk op de voorgrond, terwijl bij de andere patiënt voornamelijk tekenen aanwezig waren van een overproductie van cortisol.

#### *1.3.2. Eigen waarnemingen*

##### ZIEKTEGESCHIEDENISSEN:

Patiënte Pe., geboren 1946.

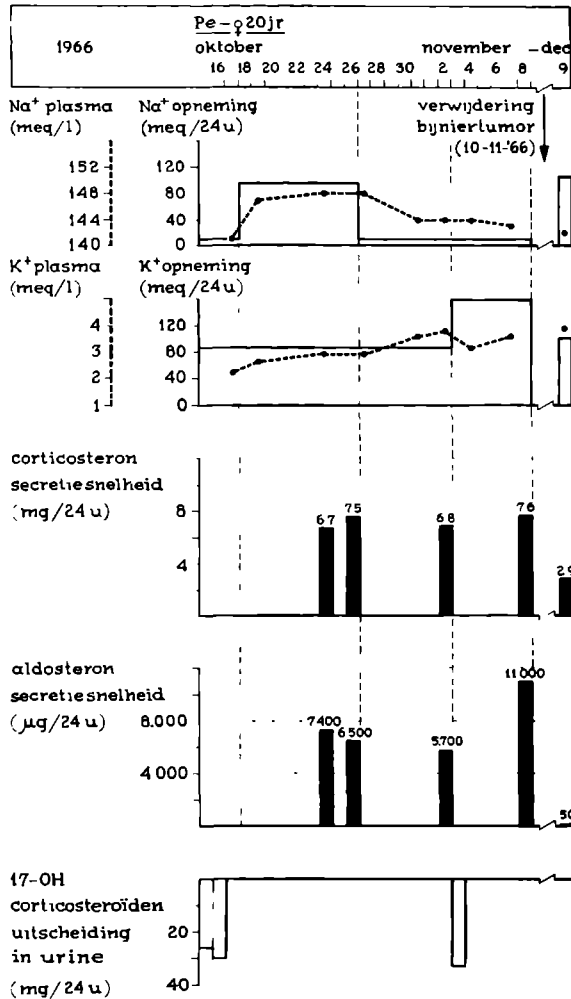
*Voorgeschiedenis:* Patiënte werd op 13 september 1966 op de interne afdeling van het St. Jans Gasthuis te Weert (A.L.M. Oomen, internist)

opgenomen nadat bij poliklinisch onderzoek een verhoogde bloeddruk was vastgesteld. Het lichaamsgewicht was sedert een half jaar afgenomen met 4 kg. De laatste paar weken was nycturie ontstaan. Tijdens opneming bedroeg de bloeddruk 210/110 mmHg. Het kaliumgehalte van het plasma was verlaagd tot 2,7 meq/l. De aldosteronexcretie met de urine bedroeg tijdens het gebruik van een natriumhoudend dieet 120 µg per 24 uur. Bij röntgenologisch onderzoek werd op het intraveneuze pyelogram boven de rechter nier een beeld gezien dat verdacht was voor een ruimte-innemend proces. Ter nadere verificatie van de waarschijnlijkheidsdiagnose hyperaldosteronisme en voor eventuele behandeling werd patiënte op 10 oktober 1966 naar onze afdeling overgeplaatst.

*Lichaamsonderzoek:* Bij opneming bedroeg de bloeddruk 220/130 mmHg. Het gelaat was bleek. Er was geen oedeem. Het beharingspatroon was normaal en er waren geen tekenen van virilisatie. Het hart was bij percussie niet vergroot. De onderpool van de rechter nier was te voelen. De oogfundi toonden geen afwijkingen.

*Laboratoriumonderzoek:* De bezinkingssnelheid van de erythrocyten was 66 mm na een uur. De glucosebelastingcurve had een normaal beloop. Er was een metabole alkalose. De pH van het capillaire bloed bedroeg 7,511. De gehalten van mineralen in het plasma waren: natrium 147 meq/l, kalium 2,6 meq/l, chloride 100 meq/l en bicarbonaat 36 meq/l.

De secretiesnelheid van aldosteron was bij gebruik van een natriumhoudend dieet extreem verhoogd en bedroeg 7400 µg per 24 uur. De *secretiesnelheid van corticosteron* was nauwelijks verhoogd en bedroeg 6,7 mg per 24 uur. Figuur 17 toont de resultaten van bepalingen van de secretiesnelheid van aldosteron en corticosteron bij wijzigingen van het natrium- en kaliumgehalte in de voeding. De uitscheiding van de totale 17-hydroxycorticosteroiden met de urine was 25,7 en 29,9 mg per 24 uur. De uitscheiding van de 11-hydroxycorticosteroiden met de urine was verhoogd en bedroeg 676 µg per 24 uur. Gedurende 24 uur werd om de 4 uur de concentratie van de 11-hydroxycorticosteroiden in het plasma bepaald. De uitkomsten waren: om 4.00 uur: 12,9 µg per 100 ml, 8.00 uur: 13,3, 10.00 uur: 21,8, 12.00 uur: 20,8, 16.00 uur: 19,3, 20.00 uur: 19,5 en 24.00 uur: 12,9 µg per 100 ml. Een fraai 24-uurs-ritme was dus niet aanwezig.



Figuur 17. Het effect van veranderingen van de opneming van natrium en kalium met de voeding op de secretiesnelheid van aldosteron en corticosteron bij patiente Pe. Verandering van het natriumaanbod heeft geen effect op de aldosteron- en op de corticosteronproductie. Vergroting van het kaliumaanbod doet de secretiesnelheid van aldosteron verdubbelen, maar heeft géén effect op de secretiesnelheid van corticosteron. De uitscheiding van de 17-hydroxycorticosteroiden is verhoogd. Tijdens gebruik van een natriumhoudend dieet stijgt de plasmaconcentratie van natrium. Bij beperking van het natriumgehalte in de voeding daalt de plasmaconcentratie van natrium en stijgt die van kalium. Na verwijdering van de bijniertumor is de secretiesnelheid van aldosteron en van corticosteron normaal geworden.

*Röntgenologisch onderzoek:* (Dr. W.H.A.M. Penn). Na injectie van contrastvloeistof in de aorta werd boven de rechter nier een vuistgroot gebied met talrijke onregelmatig gevormde contrastvlekken gezien. Het beeld was verdacht voor arterio-veneuze shunts in een bijniergezwel.

*Beloop:* Op 10 november 1966 werd door de chirurg (Prof.Dr. W.J.H. Schmidt) een vuistgrote hobbelige tumor boven de rechter nier verwijderd. Bij microscopisch onderzoek (Prof.Dr. P.H.M. Schillings) bleken de cellen in de tumor trabeculair gerangschikt te zijn. De kernen toonden polymorfie en talrijke mitosen. Er was ingroei in de vaten. Het beeld paste bij een bijniercarcinoom. Na de operatie daalde de bloeddruk tot 140/80 mmHg en werden reeds na enkele dagen normale gehalten van de mineralen in het plasma gevonden. Op 9 december was de secretiesnelheid van aldosteron bij gebruik van een natriumhoudend dieet normaal: 50 µg per 24 uur. De secretiesnelheid van corticosteron was gedaald tot 2,9 mg per 24 uur.

Op 9 januari 1967 werd patiënte echter opnieuw op onze afdeling opgenomen wegens koorts en levermetastasen. In deze periode was de uitscheiding van de totale 17-hydroxycorticosteroiden met de urine verhoogd tot 43 mg per 24 uur. De secretiesnelheid van aldosteron was ook nu echter niet verhoogd en bedroeg 76 µg per 24 uur. Op 19 maart 1967 is patiënte overleden.

Patiënt Do., geboren 1905.

*Voorgeschiedenis:* Patiënt werd op 28 januari 1966 in onze kliniek opgenomen na een poliklinisch onderzoek wegens diabetes mellitus. Vier weken tevoren bemerkte hij polydipsie en polyurie. De laatste paar maanden was hij prikkelbaar geworden. Hij was 5 kg in gewicht aangekomen en vooral het gezicht was dikker geworden. Sedert een half jaar had de man last van dikke enkels.

*Lichaamsonderzoek:* Patiënt maakte een opgewonden indruk. Het gelaat was opgeblazen. De bloeddruk bedroeg 170/80 mmHg. De centrale veneuze druk was niet verhoogd. Er was oedeem rond de enkels. Er waren geen striae.

*Laboratoriumonderzoek:* De bezinkingssnelheid van de erythrocyten bedroeg 17 mm na een uur. Er was een glucosurie. Het glucosegehalte van het bloed bedroeg 540 mg%. Er was een hypokaliëmische alkalose,

de pH van het capillaire bloed bedroeg 7,540. De gehalten van mineralen in het plasma waren: natrium 141 meq/l, kalium 2,6 meq/l, chloride 91 meq/l en bicarbonaat 36 meq/l. Het gehalte van de 11-hydroxycorticosteroiden in het plasma was verhoogd, de acht waarden gedurende 24 uur varieerden van 33 tot 43 µg per 24 uur. Een ritmische variatie was er niet. De uitscheiding van de totale 17-hydroxycorticosteroiden met de urine bedroeg 26,0 mg per 24 uur en die van de 17-ketosteroiden 16,7 mg per 24 uur. De *secretiesnelheid van corticosteron* was 7,9 mg per 24 uur. De secretiesnelheid van aldosteron was, bij gebruik van een natriumarm dieet, laag-normaal en bedroeg 97 µg per 24 uur. Tijdens toediening van ACTH, intraveneus in een hoeveelheid van 120 E in een 24 uur lopend infuus, nam de uitscheiding van de 17-hydroxycorticosteroiden met de urine toe tot twee maal de uitgangswaarde (42,6 mg per 24 uur). De secretiesnelheid van corticosteron steeg tot tien maal de uitgangswaarde en bedroeg 77,4 mg per 24 uur. Na toediening van dexamethason in een hoeveelheid van 2 mg om de 6 uur was de *secretiesnelheid van corticosteron* 7,4 mg per 24 uur. Er was dus geen daling ten opzichte van de uitgangswaarde. De uitscheiding van de 17-hydroxycorticosteroiden met de urine daalde tot 17,7 mg per 24 uur. De invloed van de gegeven hoeveelheid dexamethason was dus zeer gering. *Röntgenonderzoek:* Bij planigrafie van het bovengebied van de linker nier werd een sinaasappelgrote beschaduwing gezien.

*Operatie:* Op 24 februari 1966 werd door de chirurg (Dr. D. du Moulin) een tennisbalgrote tumor boven de linker nier verwijderd. Bij microscopisch onderzoek (Prof. Dr. P. H. M. Schillings) werd de diagnose bijniercarcinoom gesteld.

### 1.3.3. Commentaar

De waarnemingen bij de door ons onderzochte patiënten illustreren dat het steroidpatroon bij bijniercarcinomen van geval tot geval sterk kan variëren. In beide gevallen was immers de secretiesnelheid van corticosteron van dezelfde orde van grootte. Bij patiënte Pe. bestond een enorm verhoogde produktie van aldosteron terwijl het beeld bij patiënt Do. beheerst werd door de verhoogde produktie van cortisol bij een laag-normale secretie van aldosteron. Desondanks was de mate van alkalose bij beide patiënten vrijwel gelijk.

Veranderingen van de natriumopneming met de voeding veroorzaakte

bij patiënte Pe. (figuur 17) geen verandering van de secretiesnelheid van aldosteron. Ook de secretiesnelheid van corticosteron nam niet toe bij beperking van het natriumgehalte van de voeding.

Toen grote hoeveelheden kaliumchloride aan de voeding werden toegevoegd, steeg de produktie van aldosteron echter tot twee maal de uitgangswaarde. De waarneming dat de secretiesnelheid van aldosteron niet veranderde door natriumbeperving, maar duidelijk steeg bij kaliumbelasting, suggereert dat het stimulerende effect van het kalium-ion op de aldosteronproduktie tot stand komt door een direct effect op de bijnier en niet door interactie met het renine-angiotensine-systeem.

De extra toediening van kalium beïnvloedde de secretiesnelheid van corticosteron niet. Uit resultaten die in hoofdstuk 3 zijn besproken is reeds gebleken dat ook bij gezonde volwassenen en bij patiënten met primair hyperaldosteronisme toediening van kaliumchloride de secretiesnelheid van corticosteron niet doet stijgen.

Tijdens gebruik van een natriumhoudend dieet steeg het natriumgehalte van het plasma van 141 tot 148 meq/l, terwijl het kaliumgehalte in deze periode niet hoger kwam dan 2,9 meq/l. In de daarop volgende periode, toen het natriumgehalte van het dieet werd beperkt, steeg het kaliumgehalte van het plasma tot 3,6 meq/l zoals ook bij hyperaldosteronisme tijdens gebruik van natriumarme voeding wordt gezien.

Waarnemingen over de secretiesnelheid van corticosteron ten gevolge van een bijniercarcinoom zijn spaarzaam in de literatuur verspreid en worden meestal niet begeleid door klinische gegevens. Cost (1963) vond met een semikwantitatieve methode bij vier patiënten met een hormonaal-actief bijniercarcinoom een normale excretie van corticosteron-metabolieten met de urine. Karl c.s. (1965c) en Biglieri c.s. (1963) vermelden ieder een patiënt met een bijniercarcinoom, bij wie de secretiesnelheid van corticosteron even hoog was als bij de door ons onderzochte patiënten, namelijk respectievelijk 6 en 8 mg per 24 uur.

### Samenvatting

Bij twee patiënten met een bijnierschorscarcinoom werd een slechts licht-verhoogde secretiesnelheid van corticosteron vastgesteld. De produktie van steroiden was overigens zeer verschillend, terwijl bij beide patiënten toch een nagenoeg gelijke graad van metabole alkalose werd gevonden.



## § 2. DE SECRETIESNELHEID VAN CORTICOSTERON BIJ PRIMAIR HYPERALDOSTERONISME

### 2.1. Literatuurgegevens

Primair hyperaldosteronisme werd in 1955 voor het eerst door Conn beschreven. Dit ziektebeeld is gekenmerkt door hypertensie en een verhoogde, niet op veranderingen van de circulatie reagerende, produktie van aldosteron, terwijl geen aantoonbaar nierlijden als oorzaak van deze verhoogde produktie aansprakelijk kan worden gesteld. Later werd gevonden dat een verlaagde of niet-meetbare renine-activiteit van het plasma een nagenoeg obligaat verschijnsel van dit ziektebeeld is (Genest c.s.-1962, Conn c.s.-1964b). Een normale uitscheiding van 17-hydroxycorticosteroiden met de urine is een voorwaarde voor het stellen van de diagnose.

Over de produktie van corticosteron bij primair aldosteronisme zijn in de literatuur slechts weinig gegevens bekend. Wel werd onder anderen door Neher (1958), Louis en Conn (1958) en Bailey c.s. (1960) vastgesteld dat het adenoomweefsel van deze patiënten in vitro corticosteron vormt; soms was deze produktie zelfs groter dan in normaal bijnierweefsel. Een verhoogde secretiesnelheid van corticosteron werd in 1963 door Biglieri en medewerkers bij drie van zeven door hen onderzochte patiënten vastgesteld. Kono en Miyaka (1964) deelden mede dat de secretiesnelheid van corticosteron bij hun patiënten in de 'normal range' was; gedetailleerde gegevens worden door deze onderzoekers niet verstrekt. Karl en Raith (1965c) vonden bij één patiënt een verhoogde secretiesnelheid. Sasaki (1966) vermeldt een 'elevation' van de secretiesnelheid van corticosteron bij vijf patiënten. Op het 'Acta Endocrinologica Congres' te Helsinki in augustus 1967 werd door Vecsei van de groep van Wolff medegedeeld dat bij zes van elf patiënten met een mineralocorticoid excess syndroom (tien maal werd een duidelijk hyperaldosteronisme gevonden) de secretiesnelheid van corticosteron hoger was dan 5,0 mg per 24 uur. Bij dezelfde zes patiënten bleek eveneens ook de produktie van desoxycorticosteron matig verhoogd te zijn (normaal 50-400 µg per 24 uur, bij de patiënten 414-1612 µg per 24 uur). In een recente mededeling (Wolff c.s.-1968) wordt echter vermeld dat bij één van deze patiënten de secretiesnelheid van corticosteron niet gedaald

was na het operatief verwijderen van twee aldosteron-producerende adenomen.

In dit verband mag worden opgemerkt dat Karl en Raith (1965c) bij 19 van 24 door hen onderzochte patiënten met essentiële hypertensie een verhoogde secretiesnelheid van corticosteron vonden tot waarden van 11 mg per 24 uur. Vermeulen en Van der Straeten (1963) onderzochten bij 10 patiënten met essentiële hypertensie de produktie van corticosteron. Bij drie van deze patiënten was de secretiesnelheid van corticosteron verhoogd tot 6,3, 7,0 en 7,3 mg per 24 uur.

## 2.2. Eigen waarnemingen

De secretiesnelheid van corticosteron werd bij twee patiënten met primair hyperaldosteronisme bestudeerd onder verschillende omstandigheden.

### ZIEKTEGESCHIEDENISSEN:

Patiënte Lo., geboren 1930.

*Voorgeschiedenis:* Patiënte werd op 13 juli 1967 op de interne afdeling van het r.-k. Binnenziekenhuis te Eindhoven (Hoofd: Dr. A. Lips) opgenomen voor nadere analyse van haar hypertensie. Daar een hypokaliëmi-sche alkalose zonder aantoonbaar nierlijden werd vastgesteld, werd zij op 4 augustus 1967 voor nader onderzoek en verificatie van de waarschijnlijkheidsdiagnose primair hyperaldosteronisme naar onze kliniek overgeplaatst.

*Klinische observatie en beloop:* De bloeddruk varieerde van 140/90 tot 160/110 mmHg. Bij gebruik van een natriumhoudend dieet was het kaliumgehalte van het plasma 1,6 meq/l en het natriumgehalte 148 meq/l. De pH van het arteriële bloed was 7,535. De secretiesnelheid van aldosteron was onder dezelfde omstandigheden verhoogd tot 1960 µg per 24 uur. De renine-activiteit van het plasma was, ook tijdens gebruik van een natriumarm dieet, onmeetbaar laag. De uitscheiding van de 17-hydroxycorticosteroiden met de urine was niet verhoogd. Na injectie van contrastvloei-stof in de aorta werd boven de rechter nier een kastanje-groot gebied gezien, met een onregelmatig gevormd vaatpatroon dat verdacht was voor een vaatrijke tumor. Op 13 november 1967 werd door

de chirurg (Prof.Dr. W.J.H.Schmidt) de rechter bijnier verwijderd, waarin een kersgrote, goed afgekapselde tumor werd gevonden. Vijf dagen na de operatie bedroeg de secretiesnelheid van aldosteron tijdens het gebruik van een natriumhoudend dieet 42 µg per 24 uur.

Patiënte Ba., geboren 1920.

Patiënte werd op 30 december 1966 in onze kliniek opgenomen verdacht van primair hyperaldosteronisme. De bloeddruk varieerde van 150/85 tot 180/115 mmHg. Tijdens het gebruik van een natriumhoudend dieet was het kaliumgehalte van het plasma 2,3 meq/l en het natriumgehalte 146 meq/l. De secretiesnelheid van aldosteron was in deze periode verhoogd en bedroeg 404 µg per 24 uur. De renine-activiteit van het plasma was tijdens gebruik van een natriumarm dieet laag. De uitscheiding van 17-hydroxycorticosteroiden met de urine was normaal. Bij operatie werd door de chirurg (Prof.Dr. W.J.H.Schmidt) geen bijnieradenoom gevonden. De gehele linker en de helft van de rechter bijnier werden verwijderd. Het hyperaldosteronisme verdween tijdelijk, de aldosteronexcretie bedroeg enkele dagen na de operatie 3,4 µg per 24 uur. In verband met een opnieuw opgetreden en ernstige hypokaliëmie met hyperaldosteronisme, werd in oktober 1967 een behandeling met α-amino-glutethimide begonnen.\*)

Tabel 25 vermeldt de resultaten van de metingen van de secretiesnelheid van aldosteron en corticosteron tezamen met gegevens over de natrium- en kaliumuitscheiding met de urine. Zoals uit deze tabel blijkt werd bij beide patiënten een normale secretiesnelheid van corticosteron vastgesteld. Bij gebruik van een natriumhoudend dieet bedroeg de secretiesnelheid bij Lo., gemeten op twee verschillende dagen, 3,4 en 2,8 mg per 24 uur, en bij patiënte Ba. 4,5 mg per 24 uur. Beperking van het natriumgehalte in het dieet had bij patiënte Ba. geen duidelijke wijziging van de secretiesnelheid van corticosteron tot gevolg (3,8 mg per 24 uur na 13 dagen natriumarm dieet).

---

\*) Uitvoerige gegevens over dit ziektebeloop zijn door Dr. A. van 't Laar en medewerkers op 28 november 1967 op de vergadering van de Nederlandse Vereniging voor Endocrinologie medegedeeld.

T a b e l 25

Overzicht van enkele gegevens van twee patiënten met primair hyperaldosteronisme

Patiënte Geslacht Leeftijd	Datum	Dieet		Urine		Secretiesnelheid		Bijzonderheden
		Natrium meq/ 24 uur	Kalium meq/ 24 uur	Natrium meq/ 24 uur	Kalium meq/ 24 uur	aldo- steron µg/ 24 uur	cortico- steron mg/ 24 uur	
Lo. ♀ 37 jr	15- 8-67	112	52	143	38	1960	3,4	7e dag van kaliumchloride- toediening 8e dag van dexamethason- toediening 5 dagen na verwijdering bijnieradenoom
	18- 8-67	112	52	143	56	1410	2,8	
	25- 8-67	11	160	40	67	3849	3,4	
	8- 9-67	11	56	9	31	2890	0,6	
	18-11-67	vrij dieet		37	11	42	1,5	
Ba. ♀ 46 jr	6- 1-67	113	100	84	60	404	4,5	6e dag van kaliumchloride- toediening  α-amino-glutethimide- behandeling sedert 9 oktober
	24- 1-67	10	100	21	70	707	3,8	
	30- 1-67	10	178	36	124	838	3,6	
	8-10-67	vrij dieet		153	118	897		
	26-10-67	113	82	98	58	236	3,1	

Toediening van extra kalium aan het dieet had bij beide patiënten wel een toeneming van de aldosteronproduktie tot gevolg, maar de secretiesnelheid van corticosteron veranderde onder deze omstandigheden niet (bij patiënte Lo. van 2,8 naar 3,4 mg per 24 uur en bij patiënte Ba. van 3,8 tot 3,6 mg per 24 uur). Dit werd ook bij normale proefpersonen vastgesteld (hoofdstuk 3).

Een derde argument voor de stelling dat de produktie van corticosteron bij primair hyperaldosteronisme normaal geregeld wordt, is te vinden in de waarneming bij patiënte Lo. Na toediening van dexamethason in een hoeveelheid van 0,5 mg om de 6 uur gedurende acht dagen bleek de secretiesnelheid van corticosteron tijdens het gebruik van een natriumarm dieet te zijn gedaald tot 0,600 mg per 24 uur. Deze waarde is geheel in overeenstemming met die welke bij normale personen onder vergelijkbare omstandigheden werden gevonden (hoofdstuk 3).

Ook bij patiënte Ba. werd op een indirecte wijze aangetoond dat de corticosteronproduktie voor een belangrijk deel ACTH-afhankelijk is. Tijdens de behandeling met  $\alpha$ -amino-glutethimide gedurende 17 dagen was de - autonome - aldosteronproduktie gedaald van 897 tot 236  $\mu$ g per 24 uur. Zoals door de groep van Liddle (Fishman c.s.-1967) is aangetoond wordt de produktie van cortisol bij primair hyperaldosteronisme door deze behandeling nauwelijks onderdrukt omdat compensatoir de aanvankelijk verminderde produktie van cortisol weer snel gecompenseerd wordt door een verhoogde ACTH-afgifte. Bij patiënte Ba. werd door ons tijdens de behandeling met  $\alpha$ -amino-glutethimide een normale secretiesnelheid van corticosteron gemeten: 3,1 mg per 24 uur. Ook deze produktie is blijkbaar compensatoir door een verhoogde ACTH-afgifte op peil gehouden.

### Samenvatting

Bij twee patiënten met primair hyperaldosteronisme werd een normale secretiesnelheid van corticosteron vastgesteld. Er werden enkele argumenten aangevoerd voor de opvatting dat de regeling van de corticosteronproduktie bij deze patiënten niet verschilt van die van normale personen.

GEBRUIKTE AFKORTINGEN EN DE NOMENCLATUUR VAN ENKELE TOEGEPASTE MEDICAMENTEN

Afkorting	Volledige benaming	
THB	tetrahydrocorticosteron	
allo-THB	allo-tetrahydrocorticosteron	
B	corticosteron	
F	cortisol	
NADP	nicotinamide-adenine dinucleotide-fosfaat	
cyclisch AMP	cyclisch adenosine-3'-5'-monofosfaat	
Gebruikte benaming	Generieke naam	Handelsnaam
ACTH	adrenocorticotrope hormoon	Cortrophine (Organon)
angiotensine	angiotensine II val <sup>5</sup> -hypertensine-11-asp- $\beta$ -amide	Hypertensine (Ciba)
dexamethason	11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-trihydroxypregna-1,4, dien-3,20 dion	Dexamethason (Organon)
heparine	heparine	Tromboliquine (Organon)
Ro1-8307	N, formylchitosan-polysulfaat	Ro1-8307 (Hoffmann- La Roche)
$\alpha$ -amino-glutethimide	$\alpha$ -ethyl- $\alpha$ -p-aminophenylglutarimide	Elipten (Ciba)



## Samenvatting

In hoofdstuk 1 zijn, na een kort overzicht van de ontdekking van corticosteron, een aantal biologische en biochemische gegevens besproken. Nog steeds is het niet zeker of corticosteron bij de mens een functie heeft als perifere werkend hormoon. De biologische activiteit van dit hormoon is in vergelijking met die van cortisol en aldosteron gering. In experimenteel onderzoek blijkt de glucocorticoïde activiteit van corticosteron bijna de helft van die van cortisol te zijn. Daarbij moet rekening gehouden worden met het feit dat deze biologische metingen werden uitgevoerd aan de rat, een dier waarvan de bijnieren hoofdzakelijk corticosteron produceren en in het geheel geen cortisol. De produktie van corticosteron bij de mens bedraagt ongeveer het zevende deel van de produktie van cortisol.

Vervolgens wordt een overzicht gegeven van de plaats van corticosteron in de biosynthese van andere corticosteroiden. Corticosteron is een voorloper van aldosteron. Corticosteron wordt niet, zoals cortisol en aldosteron, selectief in één zone van de bijnier gemaakt, maar wordt zowel door de zona glomerulosa als de zona fasciculata geproduceerd. De belangrijkste metabolieten van corticosteron, die met de urine worden uitgescheiden zijn tetrahydroderivaten die aan glucuronzuur gebonden zijn. Tot slot wordt in dit overzicht van het metabolisme van corticosteron aan de hand van literatuurgegevens betoogd dat de vorming van corticosteronsulfaat in de bijnier van de mens kwantitatief weinig belangrijk is.



Hoofdstuk 2 geeft een beschrijving van de methode ter bepaling van de secretiesnelheid van corticosteron. Bij de ontwikkeling hiervan werd uitgegaan van de methode volgens Peterson en Pierce. Als speurdosis wordt  $^3\text{H}$ -corticosteron toegediend, terwijl  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride wordt gebruikt als reagens om de specifieke activiteit van THB of allo-THB in de urine te bepalen. In deze methode is, zowel vóór als ná de acetyleringsstap, dunnelaagchromatografie ingevoerd, waardoor de bepaling aan bruikbaarheid en snelheid heeft gewonnen. Aandacht is geschonken aan de verantwoording van deze methode. De specificiteit blijkt uit de volgende resultaten: (i) Na voortgezette chromatografie blijft de isotopenverhouding nagenoeg constant. (ii) Na selectieve afsplitsing van een van de twee  $^{14}\text{C}$ -acetaatgroepen blijkt de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -verhouding van het gevormde monoacetaat het dubbele te bedragen van de verhouding in het diacetaat. (iii) Wanneer zowel THB als allo-THB uit de urine worden geïsoleerd blijkt de specifieke activiteit van deze metabolieten nagenoeg identiek te zijn. Bij 16 hospitaliserende patiënten varieerde de secretiesnelheid van 2,3 - 6,5 mg/24 uur met een gemiddelde van 3,8 mg/24 uur. Deze uitkomsten komen overeen met die welke andere onderzoekers hebben gevonden bij gezonde volwassenen.

In hoofdstuk 3 zijn aan de hand van de beschikbare literatuurgegevens de eigen waarnemingen besproken over de regelmechanismen van de secretiesnelheid van corticosteron. Aangevoerd wordt dat in het kortdurende experiment het stimulerende effect van ACTH meer uitgesproken is op de produktie van corticosteron dan op die van cortisol. Wanneer de endogene ACTH-afgifte door toediening van dexamethason geremd wordt, daalt de secretiesnelheid van corticosteron tijdens gebruik van een natriumarm dieet tot ongeveer 15% van de uitgangswaarde. Beperking van het natriumgehalte in de voeding heeft, onder omstandigheden met normale ACTH-produktie, geen duidelijke toeneming van de secretiesnelheid van corticosteron tot gevolg. Ook toediening van angiotensine, in een hoeveelheid die wel de produktie van aldosteron stimuleert, veroorzaakt evenmin een duidelijke toeneming van de secretie van corticosteron. Indien de ACTH-afgifte door dexamethason geremd wordt, heeft angiotensine echter eenzelfde stimulerend effect op de produktie van corticosteron als op die van aldosteron. De betekenis van dit gegeven in samenhang met de resultaten van Bledsoe en

medewerkers die een toeneming van de secretie van corticosteron hebben waargenomen indien zij tijdens toediening van dexamethason het natriumgehalte van de voeding beperkten, wordt besproken. Tenslotte worden enkele waarnemingen vermeld waaruit blijkt dat verhoging van het kaliumaanbod met de voeding géén invloed heeft op de produktie van corticosteron.

Hoofdstuk 4 is gewijd aan het effect van heparine en het heparinoïd Rol-8307 op de secretiesnelheid van corticosteron. Aangetoond wordt dat tijdens toediening van deze stoffen de secretiesnelheid van corticosteron daalt, maar dat deze remming procentueel minder is dan die van aldosteron. De besproken gegevens over het effect van heparine op bijnierweefsel in vitro wettigen de conclusie dat heparine niet alleen de omzetting van corticosteron in aldosteron blokkeert, maar ook de vorming van corticosteron uit een van zijn voorlopers remt. Tijdens toediening van heparine bleek de gevoeligheid van de bijnier voor ACTH niet duidelijk veranderd te zijn, immers de toeneming van de secretiesnelheid van aldosteron en corticosteron onder invloed van ACTH blijkt voor en tijdens behandeling met heparine procentueel gelijk te zijn. Toediening van heparine gedurende 24 uur had geen duidelijke invloed op de produktie van aldosteron en corticosteron op de dag van toediening. Twee of drie dagen later werd echter een geringe vermindering van de secretiesnelheid van aldosteron gevonden, terwijl op de corticosteronproduktie geen duidelijk effect werd aangetoond.

In hoofdstuk 5 zijn waarnemingen vermeld over de produktie van corticosteron bij patiënten met het syndroom van Cushing en bij patiënten met primair hyperaldosteronisme. Drie patiënten met het ectopische ACTH-syndroom worden beschreven. De secretiesnelheid van corticosteron bleek bij deze vorm van het syndroom van Cushing weliswaar verhoogd te zijn, maar de gevonden uitkomsten zijn lager dan die welke bij normale proefpersonen worden gevonden na maximale stimulering met ACTH gedurende een dag. De produktie van cortisol daarentegen, gemeten als de uitscheiding van de totale 17-hydroxycorticosteroïden, was bij de patiënten wel groter dan na maximale stimulering met ACTH gedurende een dag bij gezonde volwassenen. Aan de hand van literatuurgegevens en eigen waarnemingen wordt aannemelijk gemaakt dat het stimulerende effect van ACTH op de produktie van corticosteron na de eerste dag van toediening relatief

afneemt.

Bij twee patiënten met een bijniercarcinoom werd een slechts weinig verhoogde secretiesnelheid van corticosteron gevonden. Het patroon van steroidproductie toonde bij deze patiënten overigens belangrijke verschillen. Tot slot werden twee patiënten besproken met primair hyperaldosteronisme. De secretiesnelheid van corticosteron was bij beide patiënten normaal. Enkele resultaten maken waarschijnlijk dat bij deze patiënten evenals bij gezonde volwassenen, de productie van corticosteron vooral door ACTH wordt gereguleerd.

## Summary

Chapter 1 presents a brief review of the discovery of corticosterone, followed by a discussion of some biological and biochemical data. It is concluded that it is still uncertain whether in man corticosterone has a physiological function as a hormone. The biological activity of this steroid is low as compared with that of cortisol and aldosterone. Data from the literature show that the glucocorticoid activity of corticosterone amounts to nearly half that of cortisone. However the experiments from which this is concluded used rats as test-animals, the adrenals of which produce corticosterone as the principal steroid and no cortisol at all. In man the production of corticosterone appears to be one-seventh of the cortisol-production.

Next, the position of corticosterone in the biosynthesis of other corticosteroids is reviewed. Corticosterone is a principal precursor of aldosterone. Corticosterone is not selectively produced in one zone of the adrenal gland, as is the case with cortisol and aldosterone; it is produced in both zona glomerulosa and the zona fasciculata. The principal urinary metabolites of corticosterone are tetrahydro-derivatives conjugated with glucuronic acid. At the end of this review of corticosterone metabolism, it is argued on the basis of data from the literature that the quantity of corticosterone sulphate produced in the human adrenal gland is negligible.

Chapter 2 describes the procedure developed for the determination of the secretion rate of corticosterone which is based essentially on

the method of Peterson and Pierce.  $^3\text{H}$ -corticosterone is administered as the tracer and  $^{14}\text{C}$ -acetic anhydride is used as the labelling reagent for determining the specific activity of urinary THB or allo-THB. Thin layer chromatography was introduced both before and after the acetylation step which makes the procedure less time consuming and less complicated. Various tests on the reliability of the method are described. The following three observations provide evidence for the specificity of the method: (i) After continued chromatography, the isotope ratio remains virtually constant. (ii) after selective removal of one of the two  $^{14}\text{C}$ -acetate groups, the  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio of the monoacetate formed appears to be twice the ratio of the diacetate. (iii) When both THB and allo-THB are isolated from the urine, the specific activity of the two metabolites differ only to a negligible extent. In 16 hospitalized patients the secretion rate ranged from 2.3 mg/24 hours to 6.5 mg/24 hours (mean value: 3.8 mg/24 hours). These findings are consistent with those obtained by other investigators in normal human adults.

Chapter 3 contains our observations on mechanisms regulating corticosterone secretion and discusses the results with reference to available data from the literature. It is demonstrated that, in short-term experiments, ACTH has a more pronounced stimulating effect on corticosterone production than on that of cortisol. When the endogenous ACTH release is inhibited by administration of dexamethasone, the secretion rate of corticosterone diminishes to about 15% of the initial value during a low-salt regimen. Under conditions of normal ACTH production, restriction of salt in the diet does not increase the rate of corticosterone secretion. However, if the ACTH release is inhibited by dexamethasone administration, angiotensin stimulates corticosterone secretion to the same extent as that of aldosterone. The significance of this finding is discussed with reference to the results of Bledsoe and co-workers, who observed increased corticosterone secretion when in the course of dexamethasone medication they reduced the salt content of the diet. Finally, a number of observations are given which show that an increased potassium supply in the diet exerts no influence on corticosterone production.

Chapter 4 presents the effect of heparin and the heparinoid Ro 1-8307 on the secretion rate of corticosterone. It is demonstrated

that corticosterone secretion diminishes during administration of these agents, the inhibition being percentually less than that of aldosterone secretion. From these observations it can be concluded that heparin exerts its effect not only on the transformation of corticosterone into aldosterone but also on the synthesis of corticosterone from precursors. The results of in vitro studies are in accordance with this conclusion. During heparin medication the susceptibility of the adrenal gland to ACTH shows no obvious change: before and during treatment with heparin, aldosterone and corticosterone show the same percentual increase in the secretion rate under the influence of ACTH. Heparin administration during 24 hours does not discernibly influence the production of aldosterone and corticosterone on the day of administration; however, a few days thereafter the secretion of aldosterone was slightly lower while no influence was seen on the corticosterone secretion rate.

Chapter 5 presents observations on corticosterone production in patients with Cushing's syndrome and in patients with primary aldosteronism. Three patients with an ectopic ACTH syndrome are described. It was observed that in this form of Cushing's syndrome the secretion rate of corticosterone was increased, however to levels lower than those found in normal subjects maximally stimulated by ACTH administration during one day. The excretion of total 17-hydroxycorticosteroids in these patients was higher than that in normal adults after maximal ACTH stimulation during one day. These data suggest that after prolonged stimulation of the adrenals by ACTH the corticosterone secretion rate diminishes. Literature data are discussed which are in accordance with this hypothesis.

The secretion rate of corticosterone was found to be only slightly increased in two patients suffering from adrenal carcinoma; otherwise the pattern of steroid production showed considerable differences in these patients. In two patients with primary aldosteronism the corticosterone secretion rate was normal. The results obtained tend to show that the corticosterone production in these patients, like that in normal adults, is regulated chiefly by ACTH.



## Literatuur

- Abbott, E.C., A.G. Gornall, M. Stiefel en J.C. Laidlaw (1965) - Studies on the influence of heparin-like compound on hypertension, electrolytes and aldosterone synthesis in man - *Canad.med.Ass.J.* 92, 346.
- Abbott, E.C., D.J. Sutherland, M. Stiefel en J.C. Laidlaw (1966a) - The influence of a heparin-like compound on aldosterone in human hypertension - In: 2<sup>nd</sup> Int. Congress Hormonal Steroids, Excerpta med. Sect. III, p. 187.
- Abbott, E.C., A.G. Gornall, D.J.A. Sutherland, M. Stiefel en J.C. Laidlaw (1966b) - The influence of a heparin-like compound on hypertension, electrolytes and aldosterone in man - *Canad.med.Ass.J.* 94, 1155.
- Adams, J.B. (1964) - Enzymic synthesis of steroid sulphates - *Biochim. biophys.* 82, 572.
- Ames, R.P., A.J. Borkowski, A.M. Sicinski en J.H. Laragh (1965) - Prolonged infusions of angiotensin II and norepinephrine and blood pressure electrolyte balance, and aldosterone and cortisol secretion in normal man and in cirrhosis with ascites - *J.clin.Invest.* 44, 1171.
- Appleby, J.I., G. Gibson, J.K. Norymberski en R.D. Stubbs (1955) - Indirect analysis of corticosteroids. I. The determination of 17-hydroxycorticosteroids - *Biochem.J.* 60, 453.
- Ayres, P.J., R.P. Gould, S.A. Simpson en J.F. Tait (1956) - The in vitro demonstration of differential corticosteroid production within the ox adrenal gland - *Biochem.J.* 63, 19p.
- Ayres, P.J., O. Garrod, S.A.S. Tait, J.F. Tait en G. Walker (1957) -



- The use of (16-<sup>3</sup>H)aldosterone in studies of human peripheral blood - Ciba Found. Coll. Endocrin. 11, 309.
- Ayres, P.J., O. Garrod, S.A.S. Tait en J.F. Tait (1958) - Primary aldosteronism (Conn's syndrome) - In: Intern. Symp. on Aldosterone, Muller A.F. en O'Connor (Eds.), Churchill, London, p. 143.
- Bailey, R.E., C.I. Slade, A.H. Lieberman en J.A. Luetscher (1960) - Steroid production by human adrenal adenomata and nontumorous adrenal tissue in vitro - J. clin. Endocr. 20, 457.
- Barter, F.C., A.G.T. Casper, C.S. Delea en J.D.H. Slater (1961) - On the role of the kidney in control of adrenal steroid production - Metabolism 10, 1006.
- Barter, F.C., B.H. Barbour, A.A. Carr en C.S. Delea (1964) - On the role of potassium and of the central nervous system in the regulation of aldosterone secretion - In: Aldosterone, Beaulieu E.E. en P. Robel (Eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 221.
- Barter, F.C., L.R. Burwell, W.W. Davis en C.S. Delea (1967) - Control of the biogenesis of aldosterone - In: Proc. of the 3<sup>rd</sup> Asia and Oceania Congr. of Endocrinol., Manila, p. 184.
- Bayliss, R.I.S. en A.W. Steinbeck (1954) - The adrenal response to corticotrophin - Brit. med. J. 1, 486.
- Benraad, Th.J. en P.W.C. Kloppenborg (1965) - Double isotope assay of aldosterone in urinary extracts with the combined use of thin-layer and paper chromatography - Clin. chim. Acta 12, 565.
- Benraad, Th.J. (1966) - Bepaling van aldosteron met behulp van een dubbel-isotoop methode - Dissertatie, Nijmegen.
- Benraad, Th.J. c.s. (1968) - ter perse.
- Biglieri, E.G., S. Hane, P.E. Slaton en P.H. Forsham (1963) - In vivo and in vitro studies of adrenal secretions in Cushing's syndrome and primary aldosteronism - J. clin. Invest. 42, 516.
- Biglieri, E.G., M.A. Herron en N. Brust (1966) - 17-Hydroxylation deficiency in man - J. clin. Invest. 45, 1946.
- Biron, P., E. Koiw, W. Nowaczynski, J. Brouillet en J. Genest (1961) - The effects of intravenous infusions of valine-5 angiotensin II and other pressor agents on urinary electrolytes and corticosteroids, including aldosterone - J. clin. Invest. 40, 338.
- Blair-West, J.R., J.P. Coghlan, D.A. Denton, J.R. Goding, J.A. Munro,

- R.E.Peterson en M.Wintour (1962) - Humoral stimulation of adrenal cortical secretion - *J. clin. Invest.* 41, 1606.
- Blair-West, J.R., J.P.Coghlan, D.A.Denton, J.R.Goding, M. Wintour en R.D.Wright (1963) - The control of aldosterone secretion - *Recent Progr.Hormone Res.* 19, 311.
- Blair-West, J.R., J.P.Coghlan, D.A.Denton, J.A.Munro, M. Wintour en R.D.Wright (1964) - The effect of bilateral nephrectomy and midcollicular decerebration with pinealectomy and hypophysectomy on the corticosteroid secretion of sodium-deficient sheep - *J.clin. Invest.* 43, 1576.
- Bledsoe, T., D.P.Island, A.M.Riondel en G.W.Liddle (1964) - Modification of aldosterone secretion and electrolyte excretion in man by a chemical inhibitor of 18-oxidation - *J.clin.Endocr.* 24, 740.
- Bledsoe, T., D.P.Island en G.W.Liddle (1966) - Studies of the mechanism through which sodium depletion increases aldosterone biosynthesis in man - *J.clin. Invest.* 45, 524.
- Boström, H., C.Franksson en B.Wengle (1964) - Studies on ester sulphates: Sulphate conjugation in adult human adrenal extracts - *Acta endocr.* 47, 633.
- Boucher, R., R.Veyrat, J.de Champlain en J.Genest (1964) - New procedures for measurement of human plasma angiotensin and renin activity levels - *Canad. med. Ass.J.*, 90, 194.
- Brown, W.H. (1928) - A case of pluriglandular syndrome: 'Diabetes of bearded woman' - *Lancet* II, 1022.
- Bulaschenko, H., E.M.Richardson en F.C.Dohan (1960) - Urinary excretion of C-20 reduction products of corticosterone and 11-dehydrocorticosterone - *Arch.Biochem.* 87, 81.
- Bull, M.B., R.S.Hillman, P.J.Cannon en J.H.Laragh (1966) - The control of renin and aldosterone secretion: Influence of sodium and potassium balance and changes in blood volume - *J.clin. Invest.* 45, 992.
- Bunge, G. (1873) - Über die Bedeutung des Kochsalzes und das Verhalten der Kalisalze in menschlichen Organismus - *Z. Biol.* 9, 104.
- Bush, I.E., en A.A.Sandberg (1953) - Adrenocortical hormones in human plasma - *J.biol. Chem.* 205, 783.
- Bush, I.E. (1953) - Species differences in adrenocortical secretion - *J. Endocr.* 9, 95.

- Cade, R. en T. Perenich (1965) - Secretion of aldosterone by rats - Amer. J. Physiol. 208, 1026.
- Cannon, P.J., R.P. Ames en J.H. Laragh (1966) - Relation between potassium balance and aldosterone secretion in normal subjects and in patients with hypertensive or renal tubular disease - J. clin. Invest. 45, 865.
- Carpenter, C.C.J., J.O. Davis en C.R. Ayres (1961) - Relation of renin, angiotensin II, and experimental renal hypertension to aldosterone secretion - J. clin. Invest. 40, 2026.
- Carstensen, H., A.C.J. Burgers en C.H. Li (1961) - Demonstration of aldosterone and corticosterone as the principal steroids formed in incubates of adrenals of the american bullfrog (*Rana catesbeiana*) and stimulation of their production by mammalian adrenocorticotropin - Gen. Comp. Endocr. 1, 37.
- Cejka, V., L.A. de Vries, M.E. Smorenberg-Schoorl, J.J. van Daatselaar, J.G.G. Borst en C.L.H. Majoor (1960) - Effect of heparinoid and spiro lactone on the renal excretion of sodium and aldosterone - Lancet I, 317.
- Cejka, V., L.A. de Vries, J.J. van Daatselaar en J.G.G. Borst (1962a) - Het effect van aldosteron en aldosteron-antagonisten bij patienten met hypo-aldosteronisme door heparinoid - Ned. T. Geneesk. 1, 617.
- Cejka, V. (1962b) - Clinical studies with some aldosterone antagonists - Folia med. Neerl. 5, Additamentum 1, 40.
- Christy, N.P. (1961) - Adrenocorticotrophic activity in the plasma of patients with Cushing's syndrome associated with pulmonary neoplasms - Lancet I, 85.
- Conn, J.W. (1951a) - Metabolic effects in man of orally and parenterally administered corticosterone (compound B) - In Proc. 2<sup>nd</sup> Clinical ACTH Conference, The Blakiston Co., Philadelphia, vol. 1, p. 221.
- Conn, J.W., S.S. Fajans en L.H. Louis (1951b) - Metabolic effects in man of orally and parenterally administered corticosterone (compound B) - Trans. Ass. Amer. Phycns. 64, 269.
- Conn, J.W. (1955) - Primary aldosteronism, a new clinical syndrome - J. Lab. clin. Med. 45, 3.
- Conn, J.W. (1955) - Primary aldosteronism - J. Lab. clin. Med. 45, 661.
- Conn, J.W., D.R. Rovner, E.L. Cohen en S. Kleinbergs (1964a) - A block in adrenal biosynthesis of aldosterone induced by heparinoid -

- Clin. Res. 12, 351.
- Conn, J.W., E.L. Cohen en D.R. Rovner (1964b) - Suppression of plasma renin activity in primary aldosteronism - J. Amer. med. Ass. 190, 125.
- Conn, J.W., D.R. Rovner, E.L. Cohen en J.E. Anderson (1966) - Inhibition by heparinoid of aldosterone biosynthesis in man - J. clin. Endocr. 26, 527.
- Cost, W.S. (1960) - Kwantitatieve bepaling van de bijnierschors-hormonen en hun voornaamste metaboliëten in urine - Dissertatie, Groningen.
- Cost, W.S. (1963) - A mineralocorticoid excess syndrome presumably due to excessive secretion of corticosterone - Lancet I, 1022.
- Crigler, J.F., S.H. Silverman en L. Wilkins (1952) - Further studies on the treatment of congenital adrenal hyperplasia with cortisone: Effect of cortisone and compound B in infants with disturbed electrolyte metabolism - Pediatrics 10, 397.
- Daughaday, W.H. (1958) - Binding of corticosteroids by plasma proteins. III. The binding of corticosteroid and related hormones by human plasma and plasma protein fractions as measured by equilibrium dialysis - J. clin. Invest. 37, 511.
- Daughaday, W.H. (1958) - Binding of corticosteroids by plasma proteins. IV. The electrophoretic demonstration of corticosteroid binding globulin - J. clin. Invest. 37, 519.
- Davis, J.O., C.C.J. Carpenter, C.R. Ayres, J.E. Holman en R.C. Bahn (1961) - Evidence for secretion of an aldosterone-stimulating hormone by the kidney - J. clin. Invest. 40, 684.
- Davis, J.O., J. Urquhart en J.T. Higgins Jr. (1963) - The effects of alterations of plasma sodium and potassium concentration on aldosterone secretion - J. clin. Invest. 42, 597.
- Davis, J.O. (1967) - The regulation of aldosterone secretion. In: The adrenal cortex, Eisenstein A.B. (Ed.), J. en A. Churchill Ltd., London, p. 203.
- Davis, W.W., L.R. Burwell, G. Kelley, A.G.T. Casper en F.C. Bartter (1966) - Studies of the loci of stimulation of aldosterone: Biosynthesis during sodium depletion - Biochem. biophys. Res. Commun. 22, 218.
- De Moor, P., O. Steeno, M. Raskin en A. Hendriks (1960) - Fluorimetric

- determination of free plasma 11-hydroxycorticosteroids in man - Acta endocr. 33, 297.
- Dorfman, R.I. (1962) - Corticoids - In: Methods in hormone research, Dorfman, R.I. (Ed.), Academic Press, New York-London, 2, p. 325.
- Dorfman, R.I. en F. Ungar (1965) - In: Metabolism of steroid hormones. Academic Press, New York-London, p. 123.
- Eichhorn, J. en O. Hechter (1957) - Status of deoxycorticosterone as intermediary in the biosynthesis of cortisol - Proc. Soc. exp. Biol. 95, 311.
- Eichhorn, J. en O. Hechter (1958) - Role of 11 $\beta$ -hydroxyprogesterone as intermediary in biosynthesis of cortisol and corticosterone - Proc. Soc. exp. Biol. 97, 614.
- Eilers, E.A. en R.E. Peterson (1964) - Aldosterone secretion in the rat - In: Aldosterone, Beaulieu E.E. en R. Robel (Eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 251.
- Eisenstein, A.B. en I. Strack (1961) - Effect of sodium deficiency on secretion of hormones by the rat adrenal cortex - Endocrinology 68, 121.
- Engel, L.L., P. Carter en L.L. Fielding (1955) - Urinary metabolites of administered corticosterone: Steroids liberated by glucuronidase hydrolysis - J. biol. Chem. 213, 99.
- Exley, D. (1965) - Urinary excretion of C-20-reduction products of corticosterone - Biochem. J. 94, 271.
- Fachet, J., E. Stark, K. Vallent en M. Palkovits (1962) - Some observations on the functional interrelationship between the thymus and the adrenal cortex - Acta med. Acad. Sci. hung. 18, 461.
- Felt, V. (1966) - Heparin and the biosynthesis of aldosterone in hyperaldosteronism - Čas. Lék. čes. 105, 1230. Geciteerd uit Excerpta med. (Amst.), Sect. III, 21 (1967) 255.
- Ferrebee, J.W., C. Ragan, D.W. Atchley en R.F. Loeb (1940) - A comparison of certain effects of desoxycorticosterone acetate, corticosterone and cortical extract on a patient with Addison's disease - Endocrinology 27, 360.
- Fishman, L.M., R.D. Gordon, D.P. Island en G.W. Liddle (1966) - Effects of elevated plasma renin activity on cortisol and aldosterone

- secretion in man - Clin. Res. 14, 279.
- Fishman, L.M., G.W. Liddle, D.P. Island, N. Fleischer en O. Küchel (1967) - Effects of amino-glutethimide on adrenal function in man - J. clin. Endocr. 27, 481.
- Ford, H.C. en R.E. Bailey (1965) - The effect of heparin on sodium and potassium excretion and aldosterone secretion and metabolism in primary aldosteronism - Clin. Res. 13, 114.
- Ford, H.C. en R.E. Bailey (1966) - The effect of heparin on aldosterone secretion and metabolism in primary aldosteronism - Steroids 7, 30.
- Fraser, R., V.H.T. James, J.J. Brown, P. Isaac, A.F. Lever en J.I.S. Robertson (1965) - Effect of angiotensin and of frusemide on plasma aldosterone, corticosterone, cortisol and renin in man - Lancet II, 989.
- Fraser, R., V.H.T. James, J.J. Brown, D.L. Davies, A.F. Lever en J.I.S. Robertson (1966) - Changes in plasma aldosterone, cortisol, corticosterone and renin concentration in a patient with sodium-losing renal disease - J. Endocr. 35, 311.
- Fremery, P. de, E. Laqueur, T. Reichstein, R.W. Spanhoff en I.E. Uyldert (1937) - Corticosteron, a crystallized compound with the biological activity of the adrenal-cortical hormone - Nature 139, 26.
- Fukushima, D.K., A.D. Kemp, R. Schnieder, M.B. Stokem en T.F. Gallagher (1954) - Studies in steroid metabolism: Isolation and characterization of new urinary steroids - J. biol. Chem. 210, 129.
- Ganong, W.F. en P.J. Mulrow (1962) - Role of the kidney in adrenocortical response to hemorrhage in hypophysectomized dogs - Endocrinology 70, 182.
- Ganong, W.F., E.G. Biglieri en P.J. Mulrow (1966) - Mechanism regulating adrenocortical secretion of aldosterone and glucocorticoids - Recent Progr. Hormone Res. 22, 381.
- Genest, J., P. Biron, M. Chretien, R. Boucher en E. Koiw (1962) - Blood angiotensin levels in normal subjects and hypertensive patients - J. clin. Invest. 41, 1360.
- Giroud, C.J.P., M. Saffran, A.V. Schally, J. Stachenko en E.H. Venning (1956) - Production of aldosterone by rat adrenal glands in vitro - Proc. Soc. exp. Biol. 92, 855.
- Giroud, C.J.P., J. Stachenko en P. Piletta (1958) - In vitro studies of

- the functional zonation of the adrenal cortex and of the production of aldosterone - In: Intern. Symp. on Aldosterone, Muller A.F. en O'Connor (Eds.), Churchill, London, p. 56.
- Gláz, E. (1960) - Regulation der Aldosteronsekretion - Handbook 6<sup>th</sup> International Congress of Internal Medicine, p. 123.
- Gláz, E. en K. Sugár (1962) - The effect of synthetic angiotensin II on synthesis of aldosterone by the adrenals - *J. Endocr.* 24, 299.
- Gláz, E. en K. Sugár (1964) - Effect of heparin and heparinoids on the synthesis of aldosterone and corticosterone by the rat adrenal gland - *Endocrinology* 74, 159.
- Goldsmith, O., D.H. Solomon en R. Horton (1967) - Hypogonadism and mineralocorticoid excess: The 17-hydroxylase deficiency syndrome - *New Engl. J. Med.* 277, 673.
- Gorter, E. en W.C. de Graaff (1955) - *Klinische diagnostiek* - H.E. Stenfert Kroese N.V., Leiden.
- Grahame-Smith, D.G., R.L. Ney en E.W. Sutherland (1967) - Adenosine 3',5'-monofosphate as the intracellular mediator of the action of adrenocorticotrophic hormone on the adrenal cortex - *J. biol. Chem.* 242, 5535.
- Grant, J.K. en A.C. Brownie (1955) - The role of fumarate and TPN in steroid enzymic 11 $\beta$ -hydroxylation - *Biochim. biophys. Acta* 18, 433.
- Grant, J.K., A.P.M. Forrest en T. Symington (1957) - The secretion of cortisol and corticosterone by the human adrenal cortex - *Acta endocr.* 26, 195.
- Haynes, R.C. en L. Berthet (1957) - Studies on the mechanism of action on the adrenocorticotrophic hormone - *J. biol. Chem.* 225, 115.
- Haynes, R.C. (1958) - The activation of adrenal phosphorylase by the adrenocorticotrophic hormone - *J. biol. Chem.* 233, 1220.
- Haynes, R.C., S.B. Koritz en F.G. Péron (1959) - Influence of adenosine 3',5'-monophosphate on corticoid production by rat adrenal glands - *J. biol. Chem.* 234, 1421.
- Hechter, O., R.P. Jacobsen, R. Jeanloz, H. Levy, C.W. Marshall, G. Pincus en V. Schenker (1949a) - The bio-oxygenation of 11-desoxycorticosterone at C-11 - *J. Amer. chem. Soc.* 71, 3261.
- Hechter, O. (1949b) - Corticosteroid release from isolated adrenal gland - *Fed. Proc.* 8, 70.

- Hechter, O., A.Zaffaroni, R.P.Jacobsen, H.Levy, H.W.Jeanloz, V. Schenker en G.Pincus (1951) - The nature and biogenesis of the adrenal secretory product - *Rec.Progr.Hormone Res.* 6, 215.
- Hechter, O. en I.D.K.Halkerston (1964) - On the action of mammalian hormones - In: *The hormones*, 5, Academic Press, New York, p.697.
- Henry, R.J. (1964) - *Clinical Chemistry, principles and technics* - Hoeber Medical Division, Harper & Row, Publishers.
- Hilf, R. (1965) - The mechanism of action of ACTH - *New Engl. J. Med.* 273, 798.
- Jaques, R., K.Küttner, H.J.Bein en R.Meier (1960) - 'Bindung' eines synthetischen Polypeptides (Hypertensin) an Heparin und Freisetzung des Peptides durch compound 48/80 in vitro - *Experientia* 16, 47.
- Johnson, B.B., A.H.Lieberman en P.J.Mulrow (1957) - Aldosterone excretion in normal subjects depleted of sodium and potassium - *J.clin.Invest.* 36, 757.
- Kaplan, N.M. en F.C. Bartter (1962) - The effect of ACTH, renin, angiotensin II, and various precursors on biosynthesis of aldosterone by adrenal slices - *J. clin. Invest.* 41, 715.
- Kaplan, N.M. (1965) - The biosynthesis of adrenal steroids: Effects of angiotensin II, adrenocorticotropin and potassium - *J. clin. Invest.* 44, 2029.
- Karl, H.J. en L.Raith (1965a) - Die Corticosteronsekretion beim Menschen: Methode zur Bestimmung der Sekretionsrate. Werte von Normalpersonen - *Klin. Wschr.* 43, 863.
- Karl, H.J. en L.Raith (1965b) - Die Corticosteronsekretion beim Menschen: Beziehung zur Körpergewicht und Körperoberfläche. Vergleich zur Cortisolsekretion.- *Klin. Wschr.* 43, 867.
- Karl, H.J. en L.Raith (1965c) - Die Corticosteronsekretion bei Hypertonie - In: *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin*, Schlegel, B. (Ed.), Bergmann-Verlag, München, p.370.
- Karl, H.J. en L.Raith (1966) - Die Corticosteronsekretion beim Menschen. Die Sekretionsraten von Corticosteron und Cortisol bei Stimulierung der Nebennierenrinde mit ACTH - *Klin. Wschr.* 44, 303.
- Kass, E.H., O.Hechter, I.A.Macchi en T.W.Mou (1954) - Changes in patterns of secretion of corticosteroids in rabbits after prolonged



- treatment with ACTH - Proc. Soc. exp. Biol. 85, 583.
- Kendall, E.C., H.L. Mason, W.M. Hoehn en B.F. McKenzie (1937a) - The structure and physiologic activity of compound B: Its relation to compound A and Reichstein's corticosterone - Proc. Mayo Clin. 12, 136.
- Kendall, E.C., H.L. Mason, W.M. Hoehn en B.F. McKenzie (1937b) - Studies in the chemistry of the suprarenal cortex. The probable position of the undetermined atom of oxygen - Proc. Mayo Clin. 12, 270.
- Kielmann, N., J. Stachenko en C.J.P. Giroud (1966) - Production rate of corticosterone sulfate in normal human adults - Steroids 8, 993.
- Klein, G.P. en C.J.P. Giroud (1967) - Incorporation of  $7\alpha$ - $^3\text{H}$ -pregnenolone and  $4$ - $^{14}\text{C}$ -progesterone into corticosteroids and some of their ester sulfates by human newborn adrenal slices - Steroids 9, 113.
- Kliman, B. en R.E. Peterson (1960) - Double isotope derivative assay of aldosterone - J. Biol. Chem. 235, 1639.
- Kloppenborg, P.W.C., Th.J. Benraad en C.L.H. Majoor (1965) - Metingen van de secretiesnelheid van aldosteron - Ned. T. Geneesk. I, 1178.
- Kloppenborg, P.W.C. (1966) - De secretiesnelheid van aldosteron onder normale en pathologische omstandigheden - Dissertatie, Nijmegen.
- Kono, T. en T. Miyake (1964) - The volume of distribution, metabolic clearance rate, secretion rate and mean plasma concentration of aldosterone, cortisol and corticosterone in various clinical conditions - Proc. 2<sup>nd</sup> Intern. Congr. Endocrinol., London, p. 246.
- Laar, A. van 't (1967) - Stoornissen in de uitscheiding van water in het bijzonder bij een tekort aan cortisol - Dissertatie, Nijmegen.
- Laplanche, C. en J. Stachenko (1966) - Aldosterone and corticosterone production by rat adrenal slices as a function of the time of incubation - Canad. J. Biochem. 44, 85.
- Liddle, G.W. (1960) - Tests of pituitary-adrenal suppressibility in the diagnosis of Cushing's syndrome - J. clin. Endocr. 20, 1539.
- Liddle, G.W., D. Island en C.K. Meador (1962) - Normal and abnormal regulation of corticotropin secretion in man - Recent Progr. Hormone Res. 18, 125.
- Liddle, G.W., J.R. Givens, W.E. Nicholson en D.P. Island (1965) - The

- ectopic ACTH syndrome - *Cancer* 25, 1057.
- Liddle, G.W. (1967) - Cushing's syndrome - In: *The adrenal cortex*, Eisenstein A.B. (Ed.), J. and A. Churchill Ltd., London, p.523.
- Lipsett, M.B. en B.Hökfelt (1961) - Conversion of 17 $\alpha$ -hydroxy-pregnenolone to cortisol - *Experientia* 17, 449.
- Lommer, D. en H.P. Wolff (1966a) - ACTH-Stimulierung der Corticosteroid-biosynthese durch Freisetzung 'gebundener' 21-desoxy-pregnene - *Experientia* 22, 654.
- Lommer, D. en H.P. Wolff (1966b) - Stimulation of the in vitro biosynthesis of corticosteroids by angiotensin II - *Experientia* 22, 699.
- Louis, L.H. en J.W. Conn (1958) - Content of aldosterone, corticosterone, hydrocorticosterone, and cortisone in adrenal tissue of patients with primary aldosteronism - *J. Lab. clin. Med.* 52, 923.
- Majoor, C.L.H., H. Prenen, P.J.J. van Munster en R.J.A.F.M. Schlatmann (1957) - Heparine, een werkzaam diureticum, niet alleen bij het nefrotisch syndroom - *Ned. T. Geneesk.* II, 1289.
- Majoor, C.L.H., H. Prenen, P.J.J. van Munster en R.J.A.F.M. Schlatmann (1957) - Het diuretische effect van heparine, in het bijzonder bij patiënten met het nefrotisch syndroom - *Ned. T. Geneesk.* II, 1301.
- Majoor, C.L.H., R.J.A.F.M. Schlatmann, A.P. Jansen en H. Prenen (1960a) - Excretion pattern and mechanism of diuresis induced by heparin - *Clin. Chim. Acta* 5, 591.
- Majoor, C.L.H., R.J.A.F.M. Schlatmann, A.P. Jansen, H. Prenen en V. Cejka (1960b) - The amphenone-like action of heparin and some heparinoids - *Acta endocr.* 51, 191.
- Majoor, C.L.H., R.J.A.F.M. Schlatmann, A.P. Jansen, H. Frohn en H. Prenen (1962a) - Investigations on the influence of heparin and some heparinoids upon the renal excretion of sodium and adrenal steroids - especially aldosterone - in man and dog - *Folia med. Neerl.* 5, Additamentum 1, 79.
- Majoor, C.L.H., A.P. Jansen, R.J.A.F.M. Schlatmann, J. van der Korst en H. Prenen (1962b) - Heparin and related sulphated polysaccharides as diuretic and aldosterone suppressing drugs in man and dog - *Acta cardiol.* 17, 657.
- Marusic, E.T. en P.J. Mulrow (1967) - Stimulation of aldosterone biosynthesis in adrenal mitochondria by sodium depletion - *J. clin.*

- Invest. 46, 2101.
- Mason, H.L., C.S. Myers en E.C. Kendall (1936) - The chemistry of crystalline substances isolated from the suprarenal gland - J. biol. Chem. 114, 613.
- Mason, H.L. (1948) - Metabolites of 11-dehydrocorticosterone: Pregnane-3( $\alpha$ ), 20-diol-11-one - J. biol. Chem. 172, 783.
- Mattingly, D. (1962) - A simple fluorimetric method for the estimation of free 11-hydroxycorticoids in human plasma - J. clin. Path. 15, 374.
- Meador, C.K., G.W. Liddle, D.P. Island, W.E. Nicholson, C.P. Lucas, J.G. Nuckton en J.A. Luetscher (1962) - Cause of Cushing's syndrome in patients with tumors arising from 'nonendocrine' tissue - J. clin. Endocr. 22, 693.
- Melby, J.C., T.E. Wilson, S.L. Dale en R.V. Hickler (1965) - Extrarenal regulation of aldosterone secretion in primary aldosteronism - J. clin. Invest. 44, 1074.
- Migeon, C.J., A.A. Sandberg, A.C. Paul en L.T. Samuels (1956) - Metabolism of 4-C<sup>14</sup>-corticosterone in man - J. clin. Endocr. 16, 1291.
- Morozova, M.S. (1966) - Effect of repeated ACTH administration on 3 $\beta$ -ol-dehydrogenase activity and synthesis of steroids from progesterone in adrenal glands of rabbits - Fed. Proc. 20, T63.
- Muldowney, F.P. en P. Banks (1960) - Kaluretic effect of heparin - Lancet I, 548.
- Müller, J. (1965a) - Aldosterone stimulation in vitro: Evaluation of assay procedure and determination of aldosterone-stimulating activity in a human urine extract - Acta endocr. 48, 283.
- Müller, J. (1965b) - Aldosterone stimulation in vitro: Stimulation of aldosterone production by monovalent cations - Acta endocr. 50, 301.
- Müller, J. (1966) - Aldosterone stimulation in vitro: Site of action of different aldosterone-stimulating substances on steroid biosynthesis - Acta endocr. 52, 515.
- Mulrow, P.J. en W.F. Ganong (1960) - Aldosterone secretion following hemorrhage in hypophysectomized dogs - Fed. Proc, 19, 152.
- Mulrow, P.J. en W.F. Ganong (1961a) - The effect of hemorrhage upon aldosterone secretion in normal and hypophysectomized dogs - J. clin. Invest. 40, 579.
- Mulrow, P.J. en W.F. Ganong (1961b) - The mechanism of aldosterone

- stimulation following hemorrhage in the hypophysectomized dog - J. clin. Invest. 40, 1065.
- Mulrow, P.J. en G.L. Cohn (1961c) - Corticosteroid release and synthesis in vitro by adrenal slices from patients with Cushing's syndrome - J. clin. Invest. 40, 1250.
- Mulrow, P.J., W.F. Ganong, G. Cera en A. Kuljian (1962a) - The nature of the aldosterone-stimulating factor in dog kidneys - J. clin. Invest. 41, 505.
- Mulrow, P.J. en W.F. Ganong (1962b) - Role of the kidney and the renin-angiotensin system in the response of aldosterone secretion to hemorrhage - Circulation 15, 213.
- Neher, R. (1958) - Aldosterone and other adrenocortical hormones in human adrenals and adrenal tumours - In: Aldosterone, Beaulieu E.E. en P. Robel (Eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 11.
- Nowaczynski, W., E. Koiw en J. Genest (1962) - The isolation of 6 $\beta$ -hydroxycorticosterone and its 11-dehydro derivative from the adrenal gland, adrenal adenoma, and urine of a patient with primary hyperaldosteronism - Canad. J. Biochem. 40, 1779.
- Nugent, C.A., K. Eik-Nes, L.T. Samuels en F.H. Tyler (1959) - Changes in plasma levels of 17-hydroxycorticosteroids during the intravenous administration of adrenocorticotropin (ACTH): Response to prolonged infusions of small amounts of ACTH - J. clin. Endocr. 19, 334.
- O'Riordan, J.L.H., G.P. Blanshard, A. Moxham en J.D.N. Nabarro (1966) - Corticotrophin-secreting carcinomas - Quart. J. Med. 35, 137.
- Pabst, M.L., R. Sheppard en M.H. Kuizenga (1947) - Comparison of liver-glycogen deposition and work performance tests for the bio-assay of adrenal cortex hormones - Endocrinology 41, 5.
- Pasqualini, J.R. (1958) - Modes de conjugaison de la corticostérone et de la 11-déhydrocorticostérone - C.R. Acad. Sci. 246, 2945.
- Pasqualini, J.R. (1960) - Identification du sulfate de corticostérone dans l'urine humaine après administration de corticostérone - C.R. Acad. Sci. 250, 3892.
- Pasqualini, J.R. en M.F. Jayle (1961) - Corticosteroid 21-sulphates in human urine - Biochem. J. 81, 147.
- Pasqualini, J.R., G. Lafoscade en M.F. Jayle (1964a) - Role of 21-

- hydroxypregnenolone and of 17 $\alpha$ , 21-dihydroxypregnenolone in the biogenesis of C<sub>21</sub> and C<sub>19</sub> steroids by adrenal gland slices - *Steroids* 4, 739.
- Pasqualini, J.R. (1964b) - 6 $\beta$ -hydroxycorticosterone in human urine - *Arch. Biochem.* 106, 15.
- Pasqualini, J.R. (1964c) - Conversion of tritiated-18-hydroxycorticosterone to aldosterone by slices of human cortico-adrenal gland and adrenal tumour - *Nature* 201, 501.
- Pasqualini, J.R. en M.F. Jayle (1964d) - Corticosteroid structure and conjugation in human urine and plasma - In: *Structure and metabolism of corticosteroids*, J.R. Pasqualini en M.F. Jayle (Eds.), Academic Press, London-New York, p. 85.
- Pasqualini, J.R. (1967) - Simultaneous metabolism of <sup>3</sup>H-corticosterone 21-sulfate and corticosterone-<sup>14</sup>C in man - *J. clin. Endocr.* 27, 885.
- Perera, G.A., D.W. Blood en K.H. Reinhold (1946) - 11-dehydrocorticosterone: Its effects on hypoadrenalism in man - *Amer. J. Med.* 1, 135.
- Peterson, R.E. (1957a) - The identification of corticosterone in human plasma and its assay by isotope dilution - *J. biol. Chem.* 225, 25.
- Peterson, R.E. (1957b) - Plasma corticosterone and hydrocortisone levels in man - *J. clin. Endocr.* 17, 1150.
- Peterson, R.E. (1959) - The miscible pool and turnover rate of adrenocortical steroids in man - *Recent Progr. Hormone Res.* 15, 231.
- Peterson, R.E. en C.E. Pierce (1960) - The metabolism of corticosterone in man - *J. clin. Invest.* 39, 741.
- Plager, J.E. en L.T. Samuels (1952) - Enzyme system involved in the oxidation of carbon-21 in steroids - *Fed. Proc.* 11, 383.
- Raiti, S., A. Kowarski, E.E. Morris en C.J. Migeon (1966) - Some aspects of the control of aldosterone secretion in man - *Bull. Johns Hopk. Hosp.* 119, 407.
- Raman, P.B., R.J. Ertel en F. Ungar (1964) - Conversion of progesterone -4-<sup>14</sup>C to 18-hydroxycorticosterone and aldosterone by mouse adrenals in vitro - *Endocrinology* 74, 865.
- Raman, P.B. en R.I. Dorfman (1966) - Studies of aldosterone biosynthesis in vitro - *Biochemistry* 5, 1795.
- Reed, P.R., C.B. Clayman en W.L. Palmer (1964) - Adrenocortical and pituitary responsiveness following long-term, high dosage cortico-

- tropin administration - *Ann. intern. Med.* 61, 1.
- Reichstein, T. (1937) - Über Bestandteile der Nebennieren Rinde (X).  
Zur Kenntnis des Corticosterons - *Helv. chim. Acta* 20, 953.
- Richardson, E.M., J.C. Touchstone en F.C. Dohan (1955) - Urinary  
alpha-ketolic steroid metabolites of cortical hormones administered  
to subjects with adrenal cortical insufficiency - *J. clin. Invest.* 34, 285.
- Robinson, W.D. - In een mondelinge mededeling aan J.W. Conn (1951a).
- Sandberg, A.A., H. Rosenthal, S.L. Schneider en W.R. Slaunwhite (1967) -  
Protein-steroid interactions and their role in the transport and  
metabolism of steroids - In: *Steroid dynamics*, Pincus G., T. Nakao  
en J.F. Tait (Eds.), Academic Press, New York-London, p. 1.
- Sanders, L.L., W.J. Flanagan, T.E. Wilson, S.L. Dale en J.C. Melby  
(1966) - Aldosterone metabolism in anephric humans - *J. clin. Invest.*  
45, 1067.
- Sasaki, C. (1966) - Corticosterone-secretion rate in normal and hyper-  
tensive subjects - *Folia endocr.* 42, 801. Geciteerd uit *Excerpta  
med. (Amst.)*, Sect. III, 21 (1967) 350.
- Sayers, G. en M.A. Sayers (1949) - The pituitary-adrenal system -  
*Ann. N.Y. Acad. Sci.* 50, 522.
- Schlatmann, R.J.A.F.M., A.P. Jansen, H. Prenen en C.L.H. Majoor (1960)  
- The natriuretic action of heparin and some related substances -  
*Lancet* I, 314.
- Schlatmann, R.J.A.F.M., H. Prenen, A.P. Jansen en C.L.H. Majoor (1962)  
- The natriuretic action of heparin and some related sulphated  
polysaccharides in dog and man - *Acta physiol. pharmacol. neerl.*  
10, 310.
- Schlatmann, R.J.A.F.M., A.P. Jansen, H. Prenen, J.K. van der Korst en  
C.L.H. Majoor (1964) - The natriuretic and aldosterone-suppressive  
action of heparin and some related polysulfated polysaccharides -  
*J. clin. Endocr.* 24, 35.
- Schteingart, D.E., R. Cash en J.W. Conn (1966) - Amino-glutethimide  
and metastatic adrenal cancer - *J. Amer. med. Ass.* 198, 1007.
- Schuler, W., P. Desaulles en R. Meier (1954) - Electrocortin-Wirkung  
in Glykogentest - *Experienta* 10, 142.
- Sealey, J.E., J.N. Gerten, J.G.G. Ledingham en J.H. Laragh (1967) -  
Inhibition of renin by heparin - *J. clin. Endocr.* 27, 699.

- Sharma, D.C., C.Nerenberg, J.L.Gabrilove en R.I.Dorfman (1966) - Effect of heparin on aldosterone biosynthesis - Fed. Proc. 25, 769.
- Sharma, D.C., C.A.Nerenberg en R.I.Dorfman (1967) - Studies on aldosterone biosynthesis in vitro - Biochemistry 6, 3472.
- Simpson, I. (1938) - The use of synthetic desoxycorticosterone acetate in Addison's disease - Lancet II, 557.
- Simpson, S.A. en J.F.Tait (1952) - A quantitative method for the bioassay of the effect of adrenal cortical steroids on mineral metabolism - Endocrinology 50, 150.
- Singer, B. en M.P.Stack-Dunne (1955) - The secretion of aldosterone and corticosterone by the rat adrenal - J. Endocr. 12, 130.
- Singer, B., C.Losito en S.Salmon (1964) - Some studies on the effect of angiotensin II on adrenocortical hormone secretion in hypophysectomized rats with renal pedicle ligation - Endocrinology 74, 325.
- Slater, J.D.H., A.G.T.Casper, C.S.Delea en F.C.Bartter (1961) - Stimulation of the adrenal cortex by the renin-angiotensin system - Clin. Res. 9, 209.
- Slater, J.D.H., B.H.Barbour, H.H.Henderson, A.G.T.Casper en F.C.Bartter (1963) - Influence of the pituitary and the renin-angiotensin system on the secretion of aldosterone, cortisol, and corticosterone - J. clin. Invest. 42, 1504.
- Slaunwhite, W.R. en A.A.Sandberg (1959) - Transcortin: A corticosteroid-binding protein of plasma - J. clin. Invest. 38, 384.
- Southcott, C.M., V.A.Sproule, H.McIntosh en M.Darrach (1958) - Isolation of 20 $\alpha$ -di-hydrocorticosterone from the plasma of normal males treated with corticosterone - Canad. J. Biochem. 36, 819.
- Spät, A. en J.Sturcz (1966) - The effect of angiotensin II on adrenal steroid synthesis in the rat - Acta physiol. Acad. Sci. hung. 29, 213.
- Speirs, R.S. en R.K.Meyer (1951) - A method of assaying adrenal cortical hormones based on a decrease in the circulating eosinophil cells of adrenalectomized mice - Endocrinology 48, 316.
- Speirs, R.S., S.A.Simpson en J.F.Tait (1954) - Certain biological activities of crystalline electrocortin - Endocrinology 55, 233.
- Sprague, R.G. - In een mondelinge mededeling aan G.W. Thorn c.s. (1953).
- Stachenko, J. en C.J.P.Giroud (1959) - Functional zonation of the adrenal cortex: Site of ACTH action - Endocrinology 64, 743.

- Stephenson, N.R. (1956) - The relative potency of adrenal corticoids by the thymus involution method - *Canad. J. Biochem.* 34, 253.
- Stone, D. en O. Hechter (1954) - Studies on ACTH action in perfused bovine adrenals: The site of action of ACTH in corticosteroidogenesis - *Arch. Biochem.* 51, 457.
- Straeten, M. van der, A. Vermeulen en N. Orié (1963) - The determination of cortisol and corticosterone production rates by isotope dilution method - *Acta endocr.* 43, 430.
- Sutherland, E.W., I. Øye en R.W. Butcher (1965) - The action of epinephrine and the role of the adenyl cyclase system in hormone action - *Recent Progr. Hormone Res.* 21, 623.
- Sweat, M.L. en M.D. Lipscomb (1955) - A transhydrogenase and reduced triphosphopyridine-nucleotide involved in the oxidation of desoxycorticosterone to corticosterone by adrenal tissue - *J. Amer. chem. Soc.* 77, 5185.
- Thorn, G.W., G.F. Koepf, R.A. Lewis en E.F. Olsen (1940) - Carbohydrate metabolism in Addison's disease - *J. clin. Invest.* 19, 813.
- Thorn, G.W., D. Jenkins, J.C. Laidlaw, F.C. Goetz, J.F. Dingman, W.L. Arons, D.H.P. Streeten en B.H. McCracken (1953) - Pharmacologic aspects of adrenocortical steroids and ACTH in man - *New Engl. J. Med.* 248, 232.
- Tonelli, G., L. Thibault en I. Ringler (1965) - A bio-assay for the concomitant assessment of the antiphlogistic and thymolytic activities of topically applied corticoids - *Endocrinology* 77, 625.
- Touchstone, J.C., H. Bulaschenko, E.M. Richardson en F.C. Dohan (1954) - The isolation of pregnane-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,21-triol-20-one, allopregnane-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,21-triol-20-one, pregnane-3 $\alpha$ ,21-diol-11,20-dione and  $\Delta^4$ -pregnene-11 $\beta$ ,21-diol-3, 20 dione from the urine of normal subjects treated with corticotropin - *Arch. Biochem.* 52, 573.
- Tucci, J.R., E.A. Espiner, P.I. Jagger, G.L. Pauken en D.P. Lauler (1967) - ACTH-stimulation of aldosterone secretion in normal subjects and in patients with chronic adrenocortical insufficiency - *J. clin. Endocr.* 27, 568.
- Ulick, S. en K.K. Vetter (1962) - The secretion of 18-dihydroaldosterone by the human adrenal - *J. clin. Invest.* 41, 1406.



- Ulick, S., E. Gautier, K.K. Vetter, J.R. Markello, S. Yaffe en C.U. Lowe (1964) - An aldosterone biosynthetic defect in a salt-losing disorder - *J. clin. Endocr.* 24, 669.
- Vallent, K. en J. Fachet (1965a) - Die Wirkung von Heparin in der Regulierung des Wasser- und Elektrolythaushaltes - *Klin. Wschr.* 43, 235.
- Vallent, K., T. Fehér en J. Fachet (1965b) - Über die Wirkung der Heparinbehandlung auf die Ausscheidung der einzelnen 17-Ketosteroidfraktionen - *Endokrinologie* 43, 51.
- Vecsei, P., W. Nolten, St. Purjesz en H.P. Wolff (1967) - Studies of the secretion and metabolism of desoxycorticosterone - *Acta endocr. Suppl.* 119, 141.
- Vermeulen, A. en M. van der Straeten (1963) - Adrenal cortical function in benign essential hypertension - *J. clin. Endocr.* 23, 574.
- Veyrat, R., J. Fabre en A.F. Muller (1962) - Inhibition sélective de la sécrétion de l'aldostérone par un héparinoïde semi-synthétique (Rol-8307) - *Helv. med. Acta* 29, 543.
- Veyrat, R., E.L. Manning, J. Fabre en A.F. Muller (1963) - Mesure de la sécrétion de l'aldostérone sous administration d'un adrénostatique semi-synthétique, l'héparinoïde Rol-8307 - *Rev. franc. Étud. clin. biol.* 8, 667.
- Veyrat, R., H.R. Brunner, E.L. Manning en A.F. Muller (1966) - Interrelations entre le potassium, la rénine et l'aldostérone - *Helv. med. Acta, Suppl.* 46, 141.
- Veyrat, R., H.R. Brunner, A. Grandchamp en A.F. Muller (1967) - Inhibition of renin by potassium in man - *Acta endocr. Suppl.* 119, 86.
- Visser, H.K.A., H.J. Degenhart, E. Desmit en W.S. Cost (1967) - Mineralocorticoid excess in two brothers with dwarfism, hypokalaemic alkalosis and normal blood pressure - *Acta endocr.* 55, 661.
- Weliky, I. en L.L. Engel (1962) - The conversion in vitro of 17-hydroxypregnenolone to cortisol by a human adrenal tumor - *J. biol. Chem.* 237, 2089.
- Wilkins, L., L.I. Gardner, J.F. Crigler, S.H. Silverman en C.J. Migeon (1952) - Further studies on the treatment of congenital adrenal hyperplasia with cortisone - *J. clin. Endocr.* 12, 257.

Wolff, H.P., Ch. Barth, G. Biro, A. Bohle, G. Dhom, A. Distler, A. Helber, H. Liebau, I. Purjesz, S. Roscher, J. Schürholz, P. Vecsei  
en K.F. Weinges (1968) - Normokaliämischer primärer Aldosteronismus - Klin. Wschr. 46, 357.

## DANKBETUIGING

Aan alle personen die hebben bijgedragen bij het tot stand komen van dit proefschrift wil ik op deze plaats mijn dank uitspreken.

Mej. J.M. Barendsen heeft door de uitvoering van de corticosteronbepalingen een werkzaam aandeel in het onderzoek gehad. Bij de ontwikkeling van de bepalingsmethode heeft de heer E.K. Wilms op het laboratorium van de afdeling voor medische biologie (hoofd Dr. W.J. van Dongen) een belangrijke bijdrage geleverd. De aldosteronbepalingen werden uitgevoerd door de dames M.L.A. Verwilghen en I.M. van de Wijngaart.

Daar in dit geschrift een aantal klinische waarnemingen vermeld staan, moge een woord van dank aan de collega's in de kliniek en aan de verpleegsters van de afdelingen, die hierbij behulpzaam waren, niet ontbreken. Onder leiding van Dr. A.P. Jansen, hoofd van het laboratorium van de kliniek voor inwendige ziekten, werden de klinisch-chemische bepalingen verricht, waarvan de resultaten in dit proefschrift zijn vermeld.

De tekeningen werden met zorg gemaakt door de heer A.D.A. Nooren van de medische tekenkamer (hoofd Chr. van Huyzen) en het fotowerk werd verricht door de afdeling medische fotografie (hoofd A. Reynen). Het personeel van de medische bibliotheek (hoofd E. de Graaff) was behulpzaam bij het verzamelen van de literatuurgegevens.

Mevr. L. van 't Laar-Langerveld heeft mij van het begin af bijgestaan in de verzorging en het persklaar maken van het manuscript. Mevr. I. Casparie-van Velsen was mij onder andere behulpzaam bij het samenstellen van de literatuurlijst en het corrigeren van de drukproeven.

