

### **3 METHODIK DER DATENERHEBUNG UND AUSWERTUNG**

#### **3.1 Auswahl und Komplettierung der Patientendaten**

##### **3.1.1 Einschlußkriterien**

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Daten wurden im Zeitraum von November 1998 bis Oktober 2000 durch Auswertung von Krankenakten aller Patienten, die im Zeitraum zwischen Januar 1984 und Dezember 1999 im Universitätsklinikum Benjamin Franklin der FU Berlin (UKBF) aufgrund eines zufällig entdeckten Nebennierentumors behandelt wurden, mit Hilfe eines Erhebungsbogens ermittelt. Voraussetzung war, daß für die Erarbeitung der Fragestellung hinreichend Informationen aus den Krankenakten zu entnehmen waren und die Kriterien eines zufällig entdeckten Nebennierentumors erfüllt waren. Dabei bedeutet „zufällig“, daß die Diagnostik nicht wegen einer vermuteten oder nachgewiesenen Nebennierenerkrankung eingeleitet wurde.

##### **3.1.2 Ausschlußkriterien**

Ein Fall wurde dann nicht in die Studie eingeschlossen, wenn ein extraadrenaler, maligner Tumor in der Vorgeschichte bekannt war oder eindeutige klinische Hinweise auf eine Erkrankung der Nebenniere vor Durchführung der bildgebenden Diagnostik aus den Unterlagen zu entnehmen waren.

### 3.1.3 Inhalt des verwendeten Erhebungsbogens

Mit dem verwendeten Erhebungsbogen wurden folgende Daten erfasst:

- Name, Geburtsdatum, Anschrift, Telefonnummer, Hausarzt und Geschlecht der Patienten.
- Zeitpunkt und Alter bei Erstdiagnose, Art des zur Diagnosestellung benutzten bildgebenden Verfahrens, Anlaß zur Durchführung der Untersuchung, Größe und Lokalisation des Nebennierentumors bei Erstdiagnose und bei den Verlaufsuntersuchungen sowie das Datum der einzelnen Verlaufsuntersuchungen.
- Nebendiagnosen, die im Zusammenhang mit NNI gehäuft auftreten wie Diabetes mellitus, Hyperlipoproteinämie, Adipositas und arterielle Hypertonie.
- Laborchemische allgemeine (Kalium, Glucose, Cholesterin, Triglyceride, HbA<sub>1c</sub>, Harnsäure, alkalische Phosphatase,  $\gamma$ -GT, Calcium) sowie
- Endokrinologische Diagnostik (Serum-Cortisol, Plasma-ACTH, Urin-Katecholamine, Urin-Cortisol, Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS), Plasma-Renin-Aktivität (PRA), Dexamethason-Hemmtest, CRH-Test).
- Szintigraphie mit Jod-131-Meta-Jodobenzylguanidin (MIBG).
- Blutdruck, Pulsfrequenz, Körpergröße und Gewicht bei der Aufnahmeuntersuchung.

Aus den Parametern Körpergröße und Gewicht wurde der Body mass index (BMI) berechnet.

## 3.2 Laborchemische Untersuchungen

### 3.2.1 Das Radioligandenassay-Prinzip

Zur Konzentrationsbestimmung von Substanzen im Nano- oder Pikogrammbereich eignen sich wegen ihrer großen Genauigkeit analytische Methoden, die durch die Anwendung radioaktiver Substanzen gekennzeichnet sind und sich unter dem Oberbegriff Radioligandenassays zusammenfassen lassen. Dieses analytische Prinzip wird in zwei Hauptgruppen der kompetitiven und nichtkompetitiven Assays untergliedert.

Der „klassische“ Radioimmunoassay (RIA) ist ein kompetitiver Assay, d.h. natürliche Antigene (aus der Probe) konkurrieren mit einer bestimmten Menge künstlicher, radioaktiv markierter Antigene (Tracer) um einen im Unterschluß vorliegenden Antikörper, der spezifisch gegen das gesuchte Antigen gerichtet ist. Die Testsubstanz (z.B. Aldosteron im Plasma) und die radioaktiv markierte Substanz (z.B. I 125-Aldosteron) werden in einer ihrer jeweiligen Menge entsprechenden Verhältnis an den Antikörper gebunden. Mißt man nach Entfernung der nicht an den Antikörper gebundenen radioaktiven Substanz ihre Aktivität oder die Aktivität der Antigen-Antikörper Komplexe, so läßt sich die Konzentration der Testsubstanz ermitteln, wenn parallel eine Eichkurve mit bekannten Mengen der nicht markierten Substanz angelegt wird.

Im Gegensatz zum RIA ist der immunradiometrische Assay (IRMA) ein nichtkompetitives Verfahren. Hierbei wird mit einem Überschuß an Antikörpern gegenüber dem nachzuweisenden Antigen gearbeitet und darüber hinaus als Tracer ein radioaktiv markierter Antikörper benutzt. Auch dieser Assay ist ein 3-Reaktanden-System, bei dem zuerst ein Antikörper, meist fixiert an eine feste Phase, mit dem Antigen der Probe (z.B. Plasma-ACTH) inkubiert wird. Aufgrund des überschüssigen Antikörperangebotes werden alle Antigenmoleküle gebunden. Nach Inkubation und Fixation der Antigene an die Antikörper wird ein zweiter, radioaktiv markierter Antikörper (z.B. I 125-ACTH-Antikörper) zugefügt, der das Antigen an einem anderen Epitop erkennt. Es bildet sich nun ein Sandwich, das sich zusammensetzt aus fixiertem Antikörper / Antigen / I 125-Antikörper. Die nach Auswaschen gemessene Radioaktivität ist proportional der Zahl gebundener Antigen-Moleküle und läßt mittels einer Eichkurve Aussagen zur Konzentration der Testsubstanz zu.

Zur Aktivitätsmessung diente ein Gamma-Szintillationszähler der Firma Multi Prias, United Packard GmbH, Frankfurt/Main.

### 3.2.2 Serum-Cortisol

Die Bestimmung erfolgte bis 1994 im Institut für klinische Chemie oder im Hormonlabor der endokrinologischen Abteilung des Universitätsklinikum Benjamin Franklin mittels Radioimmunoassay (Sorin). Hier wurde ein mit Antikörpern beschichtetes Röhrchen („coated tubes“) benutzt. Die Sensitivität lag bei 15-20 nmol/l. Die Intraassay-Variabilität lag bei verschiedenen Konzentrationen (100, 350 und 1000 nmol/l, n=15) bei 5,4, 3,9 und 4,5 %, die Interassay-Variabilität bei den gleichen Konzentrationen war bei 9,6, 5,7 und 5,5 % (3).

Seit 1994 wurde ein RIA Kit „Coat-A-Count“ der Firma Diagnostic Product Corporation (DPC) aus Los Angeles verwendet, der in Deutschland von der Hermann Biermann GmbH aus Bad Nauheim vertrieben wird (74). Alle Proben zur Bestimmung der Konzentration von Cortisol im Blut wurden nach ihrer Gewinnung innerhalb von maximal einer Stunde bei + 4 Grad Celsius für 7 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die Proben wurden bis zur endgültigen Bestimmung bei -20 Grad Celsius eingefroren.

Referenzbereiche:

bis 1994:	Morgens 140 - 690 nmol/l,	nachmittags 55 - 250 nmol/l
seit 1994:	Morgens 138 - 690 nmol/l,	nachmittags 55 - 331 nmol/l

### 3.2.3 Plasma-ACTH

Das für die Messung bestimmte Blut wurde nach Abnahme in ein EDTA Röhrchen gefüllt, das in zerstoßenem Eis gekühlt und dann innerhalb von 15 Minuten bei 4° C und 3000 Umdrehungen pro Minute für 10 min zentrifugiert wurde. Der vorsichtig abpipettierte Plasma-Überstand wurde bis zur Bestimmung bei -20° oder -70° Celsius eingefroren.

Bis Dezember 1988 wurde das ACTH mittels Radioimmunoassay der Firma Sorin Biomedica aus Sallugia, Italien bestimmt. Der Antikörper band ACTH-(1-39) und ACTH-(1-24) mit der gleichen Affinität (100 %), wobei zu dem C-terminalen Fragment 25-39 nur eine Affinität von 0,1 % bestand. Die Sensitivität lag bei 6 - 10 ng/l, die Intraassay-Variabilität bei verschiedenen Konzentrationen bei 3,3 - 8,2 % und die Interassay-Variabilität bei einer Plasmakonzentration von 50 ng/l bei 12,9 % (3). In neuerer Zeit erfolgten die ACTH-Bestimmungen mit einem immunoradiometrischen Assay (Allegro HS-ACTH) der Firma Nichols. Bei diesem „Sandwich-Typ-Assay“ wird ein gegen die C-terminale Region gerichteter polyklonaler Antikörper und ein gegen das N-terminale Fragment gerichteter monoklonaler Antikörper verwendet. Ersterer bildet durch Kopplung an Biotin und dessen Bindung an eine Avidin beschichtete Kugel die Festphase, letzterer ist durch radioaktive Markierung für die Detektion essentiell. Durch diese Methodik wird nur intaktes ACTH-(1-39) gemessen. Die Sensitivität liegt bei 3 - 5 ng/l. Die Intraassay- und Interassayvariationskoeffizienten liegen bei 3,0 % und 9,8 % (74). Zur Umrechnung in pmol/l sind die ACTH-Werte in ng/l mit 0,2202 zu multiplizieren.

Referenzbereich: 9 - 40 pg/ml (8 - 10 Uhr morgens)

### 3.2.4 Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS)

DHEAS wurde in der Abteilung für gynäkologische Endokrinologie des Universitätsklinikums Benjamin Franklin mit einem käuflichen RIA der Firma Biermann (Bad Nauheim) bestimmt.

Bei der Auswertung der DHEAS Laborparameter ist zu berücksichtigen, daß eine geschlechtsspezifische Abhängigkeit der physiologischen DHEAS Serumspiegel besteht. Daher erfolgte auch die Beurteilung, ob eine Abweichung vom Referenzbereich besteht, geschlechtsspezifisch und unter Berücksichtigung des Alters.

Referenzbereich:	Männer:	1,0 - 3,2 µg/ml
	Frauen: Bis zum 50. Lebensjahr:	1,0 - 2,8 µg/ml
	Nach dem 50. Lebensjahr:	0,4 - 1,2 µg/ml

### 3.2.5 Plasma-Renin-Aktivität (PRA)

Die Plasma-Renin-Aktivität bezeichnet die Geschwindigkeit der Angiotensin-I-Bildung aus Angiotensinogen, also der Reaktion, die von Renin katalysiert wird. Die Bestimmung erfolgte mit einer Modifikation (52) der Methode von Haber et al. (28) unter Benutzung eines RIA-Kits der Firma New England Nuclear (Billerica, USA). Dabei wurden die Plasmaproben initial ca. 12 Stunden gegen einen Puffer mit einem pH von 6 dialysiert, weil bei diesem pH die vorhandenen Angiotensinasen am wenigsten aktiv vorliegen und auch das pH-Optimum der Renin-Substrat-Reaktion von 5,5 in unmittelbarer Nähe liegt. Danach wurden die Proben unter Zugabe eines Angiotensinasen-Inhibitors (Ortho-Phenanthrolin) bei 37°C für 1 Stunde inkubiert und daraufhin sofort in Eiswasser gestellt oder eingefroren. Schließlich wurde das während der Inkubation entstandene Angiotensin I mit dem oben genannten Kit bestimmt.

Zur Umrechnung in ng/l\*s sind die in ng/ml\*h angegebenen PRA-Werte mit 0,2778 zu multiplizieren.

Referenzbereich:	liegend:	0,2 - 2,8 ng/ml/h
	stehend:	1,5 - 5,7 ng/ml/h

### 3.2.6 Plasma- und Urin-Aldosteron

Die Plasma- und Urin-Aldosteronkonzentration wurde bis zum Jahre 1989 mit einem Kit der Firma Compagnie Oris Industrie (Gifsur-Yvette, Frankreich) radioimmunologisch bestimmt. Die Sensitivität des Assays betrug 0,07 nmol/l. Die Intraassay-Variabilität war bei 0,85 nmol/l 8,2 % (n=10), die Interassay-Variabilität bei 0,578 nmol/l 10,4 % (n=10). In neuerer Zeit wird ein durch die Hermann Biermann GmbH (Bad Nauheim) vertriebener RIA-Kit „Coat-A-Count“ der Firma Diagnostic Product Corporation (DPC) aus Los Angeles verwendet. Der Intraassayvariationskoeffizient liegt bei Konzentrationen zwischen 200 und 1200 pg/ml um 3 %, der Interassayvariationskoeffizient bei einer Plasmakonzentration von 0,14 nmol/l bei 10,4 % (51)

Referenzbereich:

Plasma-Aldosteron liegend: 0,028 - 0,444 nmol/l

stehend: 0,111 - 0,860 nmol/l

Urin-Aldosteron (normale, salzhaltige Ernährung): 8,0 - 40,0 nmol/24h

### 3.2.7 Freies Cortisol im Urin (UFC)

Zur Bestimmung der Konzentration des freien Cortisols im Urin wurde ebenfalls der Radioimmunoassay von DPC „Coat-A-Count“ verwendet.

Die Urinproben wurden hierbei in 10 ml Plastikröhrchen bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 Grad Celsius eingefroren. Das freie Cortisol im Urin wird dazu nach dem vom Hersteller des Cortisol-Kits vorgeschriebenen Verfahren zuerst mit Dichlormethan (Methylenchlorid) aus dem Urin extrahiert. Das organische Lösungsmittel wird danach mit Stickstoff verblasen, der Rückstand in Wasser aufgenommen und in die Festphasen-Polypropylenreagenzröhrchen überführt. Das weitere Vorgehen entspricht dem Verfahren wie bei der Bestimmung von Serum-Cortisol.

Referenzbereich: 58 - 236 nmol/Vol

### 3.2.8 Urin-Katecholamine

Die Urin-Katecholamine wurden im Institut für klinische Chemie des Universitätsklinikums Benjamin Franklin mit einem käuflichen Assay der Firma Bio-Rad (München) durch fluorometrische Messung nach Adsorption mittels Ionenaustauschern bestimmt. Seit 1995 erfolgte die Bestimmung im Institut für klinische Chemie mittels Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC).

Referenzbereich (24 Std.-Sammelurin): Adrenalin:	4 - 20 µg / 24 Std.
Noradrenalin:	23 - 105 µg / 24 Std.
Dopamin:	190 - 450 µg / 24 Std.

### 3.2.9 Serum-Elektrolyte

Die Serum-Elektrolyte wurden im chemischen Zentrallabor des Universitätsklinikums Benjamin Franklin mit Hilfe eines Flammenphotometers (IL 743, Instrumentation Laboratory, Paderno-Duniano, Italien) bestimmt.

### 3.2.10 Nicht endokrinologische Laborwerte

Die Bestimmung der nicht endokrinologischen Laborwerte Kalium, Blutglucose, Cholesterin, Triglyceride, HbA<sub>1c</sub>, Harnsäure, alkalische Phosphatase,  $\gamma$ -GT und Calcium erfolgte im Institut für klinische Chemie des Universitätsklinikums Benjamin Franklin nach Routinemethoden.



### 3.3 Endokrinologische Tests

#### 3.3.1 Der Dexamethason-Hemmtest

Nach der Blutentnahme zur Bestimmung des Cortisol Basalwertes um 8 Uhr morgens erhalten die Patienten in der Regel 1 mg Dexamethason mit der Auflage, dieses um 24 Uhr einzunehmen. Manche Kliniker bevorzugen die Gabe von 2 mg Dexamethason. Es erfolgt am nächsten Tag eine Blutabnahme um 8 Uhr zur erneuten Cortisolbestimmung.

Referenzbereich: Cortisol basal:	138 - 690 nmol/l
Cortisol supprimiert (1 mg Dexamethason):	< 140 nmol/l

Eine unzureichende Suppression des Cortisols spricht für eine autonome Cortisolsekretion (DD: M. Cushing / Cushing-Syndrom / subklinisches Cushing-Syndrom). Wenn man den Dexamethason-Hemmtest als Screening-Test für ein Cushing-Syndrom einsetzt, sind die Grenzwerte für eine ausreichende Suppression niedriger anzusetzen (< 100 nmol/l und < 80 nmol/l bei 1 bzw. 2 mg Dexamethason, neuerdings < 50 nmol/l) um eine ausreichende Sensitivität zu erreichen.

#### 3.3.2 Der Corticotropin-Releasing-Hormon Test (CRH-Test)

Der CRH-Test oder Corticoliberin Test wird zur Diagnostik eines Cushing-Syndroms oder subklinischen Cushing-Syndroms vorzugsweise um 12 Uhr durchgeführt. Exogen appliziertes (ovines oder humanes) CRH stimuliert wie endogenes CRH die Sekretion von Corticotropin [ACTH (1-39)] aus dem Hypophysenvorderlappen. Die Patienten erhalten eine Dosis von 100 µg humanem CRH intravenös appliziert. Nach basaler Blutentnahme folgen Blutabnahmen für Plasma-Cortisol und -ACTH nach 15, 30, 45, 60, 75 und 90 Minuten. Zum CRH-Test sollte erwähnt werden, daß ein in allen endokrinologischen Zentren standardisierter Testablauf nicht existiert. Teilweise werden auch Dosen von 1 µg CRH/kg Körpergewicht intravenös verabreicht. Einfluß auf das Testergebnis nehmen auch der Zeitpunkt der Applikation und die Art des CRH (ovines oder humanes CRH).

Als signifikante Stimulation von Plasma-Cortisol durch CRH wird ein Anstieg um mehr als 20 % des Basalwertes angesehen. Ein signifikanter ACTH-Anstieg ist ein Anstieg von mehr als 50 % des Basalwertes (3).

### **3.4 Das Subklinische Cushing-Syndrom**

Das Vorliegen eines SCS wurde dann angenommen, wenn folgende Kriterien erfüllt waren (47, 65):

- Keine erkennbaren klinischen Zeichen eines Hypercortisolismus
- Pathologisch ausfallender Dexamethason-Hemmtest (42, 44, 47, 65, 73):  
Plasma-Cortisol um 8 Uhr morgens nach nächtlicher Einnahme von
  - 1 mg Dexamethason > 140 nmol/l oder nach
  - 2 mg Dexamethason > 80 nmol/l oder nach
  - 8 mg Dexamethason > 50 nmol/l

Zusätzlich sollte mindestens eine der folgenden Kriterien erfüllt sein:

- ACTH basal nicht meßbar
- CRH-Test pathologisch
- Freies Cortisol im Urin erhöht
- Pathologische Cortisol-Tagesrhythmik

### **3.5 Die MIBG-Szintigraphie**

Wenn bei Patienten ein Phäochromozytom vermutet wird, kann eine Szintigraphie mit Jod-131-Meta-Jodobenzylguanidin (MIBG) eine hilfreiche Untersuchung bei der Entscheidung über das weitere Procedere sein.

Tumoren des paraganglionären Systems entstehen aus chromaffinen Zellen, die aus der Neuralleiste stammen. Sie besitzen die Fähigkeit zur Synthese von Adrenalin, Noradrenalin oder Dopamin und den Transportmechanismus für biogene Amine.

Prinzip der Szintigraphie ist die Verabreichung eines mit Radiojod in Metastellung markiertem Benzylguanidin, welches analog zu Noradrenalin durch den für biogene Amine spezifischen Transportmechanismus in die chromaffinen Zellen transportiert und in den neurosekretorischen Granula gespeichert wird.

Die Ganzkörperszintigraphie beim Erwachsenen wird 24 und 48 Stunden nach Injektion von 17,5 MBq  $^{131}\text{J}$ -MIBG durchgeführt. Die Ganzkörperszintigraphie bei Kindern und jungen Erwachsenen erfolgt 4 und 24 Stunden nach der Injektion von bis zu 185 MBq  $^{123}\text{J}$ -MIBG.

Die MIBG-Szintigraphie erlaubt einerseits die funktionelle Bestätigung eines Nebennierentumors als Phäochromozytom, andererseits eröffnet sie durch einen eventuellen Metastasennachweis die Möglichkeit der Erkennung eines malignen Phäochromozytoms.

### **3.6 Statistik**

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe der PC-Software Microsoft Excel durch Bestimmung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD).