

2 METHODIK

2.1 SIADH bei Patienten mit sekundärer Nebennierenrinden-Insuffizienz

2.1.1 Auswahl und Komplettierung der Patientendaten

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Daten wurden in der Zeit vom August 2000 bis Juli 2001 durch Auswertung von Krankenakten erstellt. Dazu wurden zunächst die Befundordner der endokrinologischen Abteilung des Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Jahre 1981 bis 2001 untersucht. Es wurden die Befunde aller Patienten ausgewertet, die als klinisches Problem eine Hyponatriämie (Serum-Natrium-Konzentration < 130 mmol/l) oder ein SIADH zeigten, bzw. die eine Plasma-Osmolalität kleiner 270 mosmol/kg aufwiesen, und bei denen eine Plasma-Vasopressin-Bestimmung vorlag.

Aus diesem Kollektiv wurden die Patienten mit einem SIADH (Kriterien siehe 1.1.1.2) bei sekundärer Nebennierenrinden-Insuffizienz (Kriterien siehe 2.1.2) durch Studium ihrer Krankenakten genauer charakterisiert.

Mit Hilfe eines dafür erstellten Auswertebogens wurden folgende Daten erhoben:

1. Name, Geburtsdatum, Geschlecht, Zeitpunkt der Diagnose, Adresse.
2. Klinische Zeichen und Symptome bei Aufnahme.
3. Sonstige Erkrankungen, Medikamenten- und ggf. gynäkologische Anamnese.
4. Laborchemische, Bild gebende und endokrinologische Diagnostik bei Aufnahme und im weiteren Verlauf der stationären Behandlung.
5. Therapeutische Maßnahmen zur Korrektur der Hyponatriämie, Hormonsubstitution.

Hauptziel bei diesem Vorgehen war die exakte Erfassung aller Patienten mit einem SIADH bei sekundärer Nebennierenrinden-Insuffizienz, Nebenziel die Erfassung aller Patienten mit einer Hyponatriämie und deren ätiologische Zuordnung.

2.1.2 Endokrinologische Funktionsdiagnostik

Nachdem sich die Patienten mit einem SIADH von der Hyponatriämie erholt hatten, wurden endokrinologische Funktionstests zur Diagnose der sekundären Nebennierenrinden-Insuffizienz durchgeführt. Die Tests wurden in dieser Arbeit u.a. ausgewertet. Die der Auswertung zugrunde gelegten Kriterien werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

Alle Hormonbestimmungen wurden mit Hilfe hochsensitiver Radioimmunoassays durchgeführt (siehe 2.2.3.1).

2.1.2.1 Bestimmung der Hormonbasalwerte

Um eine Nebennierenrinden-Insuffizienz auszuschließen, kann das basale Serum-Cortisol zusammen mit dem basalen Plasma-ACTH morgens zwischen 8.00 und 9.00 Uhr bestimmt werden. Eine morgendliche Serum-Cortisol-Konzentration ≤ 83 nmol/l spricht für eine Nebennierenrinden-Insuffizienz und macht dynamische Hypophysen-Tests entbehrlich ¹²⁰. Eine morgendliche Serum-Cortisol-Konzentration ≥ 525 nmol/l schließt eine Nebennierenrinden-Insuffizienz praktisch aus.

Ist bei Nachweis einer pathologisch niedrigen Cortisolsekretion die Plasma-ACTH-Konzentration gleichzeitig deutlich erhöht, so liegt eine primäre Nebennierenrinden-Insuffizienz vor. Ist das Plasma-ACTH niedrig-normal oder nicht nachweisbar, so liegt eine hypothalamo-hypophysär-bedingte, sekundäre oder tertiäre Nebennierenrinden-Insuffizienz vor. Die Messung von basalem Plasma-ACTH kann somit zur Differenzierung zwischen primärer und sekundärer (tertiärer) Nebennierenrinden-Insuffizienz dienen ¹²⁰.

2.1.2.2 Corticotropin (ACTH)-Kurztest

Sicherer Beweis für eine Nebennierenrinden-Insuffizienz ist der Nachweis der fehlenden bzw. eingeschränkten adrenalen Funktionsreserve durch den sog. ACTH-Kurztest (morgens zwischen 8.00 und 10.00 Uhr 250 μ g ACTH 1-24 i.v., Blutentnahmen bei 0 und 30 oder 60 min). Zum Beweis einer intakten

Nebennierenrinden-Funktion sollte das Serum-Cortisol 60 Minuten nach ACTH-Stimulation auf ≥ 550 nmol/l ansteigen ¹²⁰.

Bei der sekundären Nebennierenrinden-Insuffizienz findet sich ein fehlender bzw. unzureichender Anstieg des Serum-Cortisols, weil es mit zunehmender Dauer der sekundären bzw. tertiären Nebennierenrinden-Insuffizienz durch den Wegfall der hypothalamo-hypophysären Stimulation zu einer verminderten Ansprechbarkeit der Nebennierenrinde auf ACTH aufgrund einer relativen Nebennierenrinden-Atrophie kommt.

Hat der ACTH-Kurztest bei der primären Nebennierenrinden-Insuffizienz eine nahezu 100 prozentige Sensitivität ¹²¹, so ist sie bei der sekundärer Nebennierenrinden-Insuffizienz geringer ¹²², da der Test bei leichterer sekundärer Insuffizienz normal ausfallen kann. Deshalb müssen bei normaler Cortisol-Antwort in diesem Test und bei weiter bestehendem Verdacht auf eine sekundäre Nebennierenrinden-Insuffizienz zusätzliche Tests durchgeführt werden (Metopiron- oder Insulin-Hypoglykämie-Test).

2.1.2.3 Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH)-Test

Die Differenzierung zwischen einer sekundären (hypophysären) und tertiären (hypothalamisch bedingten) Nebennierenrinden-Insuffizienz kann durch den CRH-Test erfolgen. Diese Unterscheidung hat keine unmittelbare Behandlungskonsequenz, gibt aber Auskunft über die genaue Lokalisation des Schadens.

Das Prinzip des CRH-Tests beruht darauf, daß exogenes CRH die hypophysäre ACTH-Ausschüttung und damit die adrenale Cortisol-Sekretion stimuliert. Dazu werden dem Patienten zum Zeitpunkt 0 Minuten im Liegen 100 µg CRH (gelöst in 0,9 % NaCl) intravenös über eine Venenverweilkanüle injiziert. Blutabnahmen für Cortisol und ACTH erfolgen bei 0, 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten.

Ein maximaler Anstieg des Serum-Cortisols auf ≥ 400 nmol/l wird dabei als normal angesehen ¹²². Das Plasma-ACTH soll auf mindestens das doppelte des Ausgangswertes ansteigen.

Bei einer hypophysären Schädigung wird auf CRH-Stimulation keine oder nur eine unzureichende ACTH-Ausschüttung erfolgen, dementsprechend auch nur ein

geringer oder fehlender Cortisolanstieg. Bei einer hypothalamischen Schädigung wird die CRH-deprivierte, aber prinzipiell funktionsfähige Hypophyse auf exogenes CRH mit einer überschießenden und langanhaltenden ACTH-Ausschüttung reagieren, wobei der Cortisolanstieg aufgrund der Nebennierenrinden-Atrophie (siehe oben) unzureichend bleibt.

2.1.2.4 Insulin-Hypoglykämie-Test

Der sichere Ausschluß einer klinisch relevanten, partiellen Nebennierenrinden-Insuffizienz kann nur durch einen auch den Hypothalamus stimulierenden Test erfolgen, da nur so die Funktion der gesamten Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse beurteilt werden kann. Der Goldstandard für die hypothalamische Stimulation ist der Insulin-Hypoglykämie-Test.

Durch Hypoglykämiestreß wird eine starke Stimulation des Hypothalamus und damit der CRH-Ausschüttung bewirkt. Konsekutiv kommt es zu einem starken ACTH- und Cortisol-Anstieg.

Der Test wird morgens vor 10.00 Uhr am nüchternen Patienten im Liegen unter kontinuierlicher Überwachung durch ärztliches Personal durchgeführt. Über einen sicheren, großlumigen intravenösen Zugang wird dem Patienten 0,1 bis 0,15 IE Alt-Insulin/kg Körpergewicht injiziert. Ziel ist das Erreichen einer Hypoglykämie $< 2,2$ mmol/l. Bei 0, 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten wird Blut für Cortisol, ACTH und Glucose abgenommen.

Als physiologisch gilt ein bei Erreichen einer Hypoglykämie ($< 2,2$ mmol/l) maximaler Anstieg des Serum-Cortisols auf > 500 nmol/l und des Plasma-ACTH auf > 100 pg/ml¹²³.

Durch das Erreichen einer Hypoglykämie kann mit dem Insulin-Hypoglykämie-Test auch die Wachstumshormon(= STH)-Achse mitgetestet werden (zusätzliche Blutabnahmen für die STH-Bestimmung).

2.1.2.5 Metopiron-Test

Bei Vorliegen von Kontraindikationen (hirnorganische Anfallsleiden, Koronare Herzerkrankungen, Herzinsuffizienz) für den Insulin-Hypoglykämie-Test kann der Metopiron-Test zum Einsatz kommen¹²⁴. Metopiron hemmt die 11 β -Hydroxylase der Nebennierenrinde und damit die Konversion von 11-Desoxycortisol zu Cortisol. Die Hypocortisolämie stellt einen starken Reiz für Hypothalamus und Hypophyse dar (etwa gleicher Stimulus wie beim Insulin-Hypoglykämie-Test).

30 mg Metopiron/kg Körpergewicht werden um 24.00 Uhr zusammen mit einer kleinen Mahlzeit eingenommen. Blut wird am folgenden Morgen um 8.00 Uhr zur 11-Desoxycortisol-, Cortisol- und ACTH-Bestimmung gewonnen.

Ein Anstieg des 11-Desoxycortisol auf ≥ 200 nmol/l und des ACTH auf > 150 pg/ml sprechen gegen eine sekundäre Nebennierenrinden-Insuffizienz¹²⁰. Der Test ist nur verwertbar, wenn das Serum-Cortisol auf < 230 nmol/l abgefallen ist, da sonst keine ausreichende Suppression der 11 β -Hydroxylase durch Metopiron stattfand (keine ausreichende hypothalamische Stimulation).

2.1.2.6 kombinierter Hypophysenvorderlappen-Test und kombinierter Releasing-Hormon-Test

Zur Beurteilung der Funktion der anderen Hypophysenvorderlappen-Achsen wurde bei vielen in dieser Arbeit untersuchten Patienten zusätzlich zur Insulin-Injektion im Insulin-Hypoglykämie-Test 200 μ g TRH und 100 μ g GnRH injiziert¹²⁵ oder ein kombinierter Releasing-Hormon-Test nach Schopohl et al.¹²⁶ durchgeführt. Bei letzterem werden 100 μ g CRH, 100 μ g GRF (beide von Bissendorf Peptide GmbH, Wedemark, Deutschland), 200 μ g TRH und 100 μ g GnRH (beide von Hoechst AG, Frankfurt, Deutschland) intravenös appliziert. Die Blutabnahmen bei beiden Tests für ACTH, Cortisol, STH, LH und FSH erfolgen vor Injektion sowie nach 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten. Für die Bestimmung von TSH und Prolaktin wird Blut nur zum Zeitpunkt 0 und 30 Minuten entnommen.

Als Normalwerte für die basalen und stimulierten Hypophysenvorderlappen-Hormone gelten Daten von Schopohl et al.¹²⁶ sowie Daten des endokrinologischen Labors des Universitätsklinikums Benjamin Franklin.

Bei Patienten, bei denen weder ein kombinierter Hypophysenvorderlappen-Test (erweiterter Insulin-Hypoglykämie-Test) noch ein kombinierter Releasing-Hormon-Test erfolgte, wurden zur Beurteilung der anderen Hypophysenvorderlappen-Achsen die Basalwerte der entsprechenden Hormone verwendet.

2.1.3 Statistik

Die Auswertung der Patientendaten erfolgte deskriptiv mittels statistischer Berechnungen von Mittelwert, Standardabweichung und Median. Diese Berechnungen und die Grafiken wurden mit Hilfe eines Personalcomputers und des Softwareprogrammes Microsoft[®] Excel 2000 durchgeführt bzw. erstellt.

2.2 ADH-Suppression unter Glucocorticoid-Therapie

2.2.1 Auswahl der Probanden

Nach Genehmigung der in vivo-Studie durch die Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Benjamin Franklin wurden mögliche Teilnehmer der Studie mittels Aushang im Klinikum gesucht.

Sieben gesunde, männliche Probanden wurden durch ein Informationsblatt mit Einverständniserklärung über Ziel und Durchführung der Studie, eventuelle Nebenwirkungen der verabreichten Medikamente, Versicherungsschutz sowie geforderte Verhaltensweisen der Probanden während der Studie (kein Alkohol, keine Drogen, keine zusätzlichen Medikamente) aufgeklärt. Für jeden der sieben in die Studie eingeschlossenen Probanden wurde eine Probandenversicherung abgeschlossen und eine Eingangsuntersuchung mit ausführlicher Anamnese sowie eine Routine-Labor-Untersuchung (Blutbild, Serum-Natrium, -Kalium, -Kreatinin, -Calcium, Blutzucker, Urinstatus) durchgeführt.

Dabei galten folgende Ausschlußkriterien:

Hypertonie, Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz, Polyurie, Polydipsie, Adipositas, Hyperlipidämie, anamnestisch Ulcus ventriculi oder duodeni, Osteoporose, Hypercalzämie, Infektionskrankheiten, Z.n. Tuberculose, Z.n. Malignom, Z.n. Thrombose, demnächst geplante oder gerade durchgeführte Impfung, psychiatrische Erkrankungen (Depression etc.), Krampfleiden, Glaukom, Katarakt, ausgeprägte Akne, regelmäßige Medikamenteneinnahme.

Das Alter der sieben Probanden lag zwischen 24 und 37 Jahren, bei einem Durchschnittsalter von 27,7 Jahren (Median 27 Jahre). Keiner der Probanden hatte eine bekannte endokrinologische oder andere internistische Erkrankungen (siehe Ausschlußkriterien). Niemand nahm regelmäßig Medikamente ein.

Bei allen Probanden konnten die drei Durstversuche ohne Probleme durchgeführt werden. Klinisch gab es während der Versuche keine Auffälligkeiten (kein Blutdruckabfall, keine größeren Gewichtsverluste, keine Medikamenten-Nebenwirkungen).

Abbruchkriterien des Durstversuches waren:

1. Gewichtsverlust über fünf Prozent des Ausgangsgewichtes.
2. Unerträglicher Durst.
3. Erheblicher Blutdruckabfall.

2.2.2 Versuchsablauf

Am ersten Versuchtag wurde bei den sieben Probanden ein basaler Durstversuch ohne Prednisolon-Einnahme durchgeführt. Nach einer eintägigen Pause nahmen die Probanden vom dritten bis zum siebten Versuchstag (fünf Tage lang) jeweils um 8.00 Uhr 30 mg Prednisolon (Decortin H[®], Hoechst AG, Frankfurt, Deutschland) oral ein. Am dritten und siebten Tag erfolgte jeweils ein weiterer Durstversuch unter Prednisolon-Einnahme.

Durchführung des Durstversuches (nach Diederich et al. ¹¹⁹) im einzelnen:

An den drei Durstversuchstagen durften die Probanden zwischen 8.00 und 17.00 Uhr keine Flüssigkeiten zu sich nehmen. Für die Nahrungsaufnahme gab es bis auf das

Verbot von Suppen und anderen Speisen mit hohem Flüssigkeitsgehalt (Obst, Pudding, etc.) keine Einschränkungen.

Zu den Uhrzeiten 8.00, 12.00, 14.00 und 16.00 Uhr mußten jeweils folgende Tätigkeiten ausgeführt werden:

1. Urin entleeren und sammeln, Urin-Volumen registrieren und verwerfen, 20 ml Urin für Urin-Osmolalität- und Urin-cAMP-Bestimmung aufheben.
2. Blut für Plasma-Vasopressin- und Plasma-Osmolalität-Bestimmung abnehmen.
3. Proband wiegen, Blutdruck nach Riva-Rocci und Herzfrequenz messen.

Um 16.00 Uhr nach der letzten Blutabnahme wurde den Probanden 4 µg des V₂-Rezeptor-Agonisten Desmopressinacetat (Minirin[®], Ferring Kiel, Deutschland) intravenös verabreicht. Danach erfolgte eine einmalige Spontanurin-Sammlung um ca. 17.00 Uhr. Das Urin-Volumen wurde registriert und 20 ml für die Urin-Osmolalität- und Urin-cAMP-Bestimmung aufgehoben.

2.2.3 Laborchemische Untersuchungen

2.2.3.1 Prinzip des Radioimmunoassays

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.

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 Überschuss vorliegenden Antikörper, der spezifisch gegen das gesuchte Antigen gerichtet ist. Die Testsubstanz (z.B. Vasopressin im Plasma) und die radioaktiv markierte Substanz (z.B. 3-(125 J)-Jodotyrosyl-Vasopressin) werden in einer ihrer jeweiligen Menge entsprechenden Verhältnis an den Antikörper gebunden. Nach Entfernung der nicht an den Antikörper gebundenen radioaktiven Substanz mißt man ihre Aktivität oder die Aktivität der Antigen-Antikörper-Komplexe. Anhand der Radioaktivität läßt sich dann die Konzentra-

tion der Testsubstanz aus einer Eichkurve ermitteln, die mit bekannten Mengen der nicht markierten Substanz angelegt wird (Standardkurve).

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

2.2.3.2 Bestimmung von ADH im Plasma

Die Konzentration von Vasopressin im Plasma wurde durch einen hochsensitiven Radioimmunoassay nach der Methode von Morton et al.¹²⁷ bestimmt.

Dazu erfolgte die Blutentnahme für die Vasopressin-Bestimmung in Ammonium-Heparinat-Röhrchen, die für den Transport eisgekühlt und anschließend bei 4 °C für 20 Minuten bei 3000 rpm (1600 x g) zentrifugiert wurden. Beim Abpipettieren des Plasma-Überstandes aus den Röhrchen mußte man darauf achten, 1 cm über dem Erythrozytensediment unbewegt stehen zu lassen. Dadurch wurde die Mitbestimmung des an Thrombozyten gebundenen Vasopressins verhindert¹²⁸. Der Plasma-Überstand wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

Vor der Extraktion des ADH wurde der Plasma-Überstand noch einmal bei 3000 rpm und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Die Extraktion des ADH aus dem Plasma erfolgte mit SepPak-C₁₈-Kartuschen (Waters Associates, Milford Mass., USA), die erst mit 5 ml Methanol und 5 ml H₂O konditioniert und folgend mit 1 ml des Plasma-Überstandes beschickt wurden.

Anschließend wurden die Kartuschen mit 5 ml einprozentiger Essigsäure gewaschen und das ADH mit 2 ml Methanol aus der Säule eluiert. Das Methanol des Eluates wurde bei ca. 37°C verblasen, der Rückstand in 150 µl Assay-Puffer (50 mmol/l Tris-Puffer, pH 7,4) aufgelöst, sorgfältig vermischt und 5 Minuten bei 4 °C und 2500 rpm zentrifugiert.

Für die Durchführung des Radioimmunoassays wurden je 50 µl des rekonstituierten Proben-Eluates in zwei Assay-Röhrchen pipettiert, mit 50 µl Vasopressin-Thyreoglobulin-Antikörper (Titer 1:25000) und 50 µl radioaktiv markiertes 3-(125 J)Jodotyrosyl-Vasopressin als Tracer versetzt (Amersham International, Buckinghamshire, Eng-

land, verdünnt auf ca. 1000 cpm/50 µl), gemischt und 72 Stunden bei 4 °C inkubiert. Auf die gleiche Weise wurde mit den Vasopressin-Proben der Standardkurve verfahren (0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 und 8 pg Vasopressin/Röhrchen). Den Antikörper stellte uns zu diesem Zweck Dr. J. J. Morton, MRC Blood Pressure Unit, Glasgow, Schottland, zur Verfügung. Das Antiserum war in neuseeländischen Kaninchen durch Immunisierung mit an Rinder-Thyreoglobulin gebundenem Vasopressin gewonnen worden ¹²⁹.

Im Anschluß fügte man dem Inkubat 1 ml einer gekühlten, einprozentigen „dextran-coated charcoal“-Lösung (Trennreagenz) zu, die das freie Vasopressin adsorbierte und so vom gebundenen trennte. Der Röhrcheninhalt wurde erneut bei 3000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand anschließend dekantiert.

Anhand der im Röhrchen verbliebenen Radioaktivität, die mit Hilfe des Gamma-Szintillationszählers gemessen wurde, konnte die Vasopressin-Konzentration in der Plasmaprobe unter Verwendung der Standardkurve errechnet werden (Spline function, computergestützt).

Mit dieser Methode liegt die Nachweisgrenze für Vasopressin im Plasma bei 0,2 pg/ml. Die Intra-Assay-Variabilität beträgt 4,9 Prozent, die Inter-Assay-Variabilität 8,8 Prozent. Der Normalbereich von Plasma-Vasopressin bei normal hydrierten Gesunden liegt zwischen 0,45 und 0,92 pg/ml (Mittelwert 0,71, Standardabweichung 0,13) ¹¹⁵.

Bei den sieben Probanden dieser Studie lag die Nachweisgrenze des Radioimmunoassays für Plasma-ADH bei 0,4 pg/ml, weil nicht genügend Plasma zur weiteren Verdünnung der Proben vorhanden war.

Diese Methode ist etwa fünf mal sensitiver als der beste auf dem Markt befindliche „kit“ zur Messung von Plasma-ADH.

2.2.3.3 Bestimmung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) im Urin

Für die quantitative Bestimmung von cAMP in humanen Urin wurde der cAMP-Radioimmunoassay angewandt. Die Methode basiert auf dem von Steiner et al. ¹³⁰ beschriebenen Radioimmunoassay für zyklische Nucleotide.

Da von zwei Probanden die Durstversuche im Rahmen von Vorversuchen gelaufen waren, und ihre Urinproben nicht konserviert wurden, standen nur die Urinproben von fünf Probanden für die cAMP-Bestimmung im Urin zu Verfügung.

Die frisch gesammelten Urinproben wurden bis zur Bestimmung des cAMP tiefgefroren.

Die aufgetauten Urinproben konnten nach Verdünnung mit destilliertem Wasser oder Assay-Puffer (50 mmol/l Tris/HCl, 4 mmol/l EDTA, pH 7,5) auf 1:50 oder 1:100 direkt im Assay verwendet werden.

Zur Durchführung des Assays wurden je 50 µl der verdünnten Urinprobe in zwei Assay-Röhrchen pipettiert, die in einem 0 °C kalten Wasserbad standen. 50 µl radioaktiv markiertes [³H]-cAMP (Amersham International, Buckinghamshire, England) als Tracer und 100 µl eines für cAMP spezifischen Bindungsproteins (Amersham International, Buckinghamshire, England) wurden dazugegeben. Anschließend wurde der Inhalt der Röhrchen durchmischt und für zwei Stunden bei 2-8 °C inkubiert. Die bekannten cAMP-Proben der Standardkurve (1, 2, 4, 8, 16 pmol cAMP/Röhrchen) behandelte man genauso.

Nach der Inkubation wurden 100 µl gekühltes Trennreagenz („charcoal“-Suspension) zu den Röhrchen hinzugefügt, so daß das freie cAMP adsorbiert und damit von dem gebundenen getrennt werden konnte. Den Inhalt der Röhrchen zentrifugierte man anschließend für 1-6 Minuten. Der Überstand (200 µl) wurde vorsichtig abpipettiert, und die Radioaktivität des Röhrcheninhaltes mit dem Gamma-Szintillationszähler bestimmt. Mit Hilfe der gemessenen Radioaktivität und der Standardkurve konnte die Konzentration von cAMP in der Urinprobe errechnet werden.

Die Nachweisgrenze für cAMP liegt bei diesem Assay bei 0,05 pmol. Messungen von zyklischem AMP sind im Bereich von 0,2 bis 16 pmol/Röhrchen möglich.

2.2.3.4 Bestimmung der Plasma- und Urin-Osmolalität

Die Messung der Plasma- und Urin-Osmolalität erfolgte mit Hilfe eines digitalen Mikro-Osmometers (Firma Roebling, Berlin), das nach dem Prinzip der Gefrierpunktniedrigung arbeitet.

Es wird der Gefrierpunkt von wässrigen Lösungen (z.B. Plasma- oder Urinproben) gemessen. Die Gefrierpunktniedrigung im Vergleich zum Gefrierpunkt des reinen Wassers ist dabei ein direktes Maß für die Osmolalität einer Substanz. Reines Wasser gefriert bei 0 °C, eine wässrige Lösung mit der Osmolalität von 1 osmol/kg Wasser bei -1,858 °C.

Zur Bestimmung der Osmolalität wird die Probe in einem sauberen Gefäß mit Hilfe eines Peltier-Elementes unterkühlt, d.h. die Probe gefriert nicht, obwohl der Gefrierpunkt bereits unterschritten ist. Bei einer bestimmten Unterkühlung wird eine kalte Nadel automatisch in die Probe eingetaucht. Damit wird die Eisbildung eingeleitet. Nun steigt die Temperatur wieder an, bis sich der Gefrierpunkt in der Probe eingestellt hat. Bei reinem Wasser zeigt die Abkühlungskurve ein länger anhaltendes Plateau, bei Lösungen ergibt sich ein einige Sekunden dauernder Wendepunkt. Das Plateau oder der Wendepunkt wird über einen Messkopf, der Teil einer Wheatstone'schen Brücke ist, in der Digitalanzeige des Gerätes gespeichert. Die Digitalanzeige erfolgt dann in mosmol/kg H₂O, da die Osmolalität in direktem Zusammenhang mit der Gefrierpunktniedrigung steht.

Die Eichung des Gerätes wird mit einer Standardlösung von 300 mosmol/kg und destilliertem Wasser erreicht.

2.2.4 Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe eines Personalcomputers und der Softwareprogramme Microsoft[®] Excel 2000 und SPSS[®] 8.0 für Windows durchgeführt. Dabei erfolgte die Signifikanzberechnung der Daten mittels gepaartem T-Test¹³¹. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant betrachtet.

Die Grafiken wurden mittels Microsoft[®] Excel 2000 und Sigma Plot 5.0 erstellt.