

### **3 Material und Methoden**

Freiwillige, gesunde Probanden nahmen an der Untersuchung teil. In Vorversuchen wurde zunächst diejenige Hydrocortison- bzw. Epinephrin-Dosis ermittelt, die unter Infusionsbedingungen Plasma- bzw. Serumkonzentrationen simulierte, die während Hypoglykämie beobachtet wurden. Zur Dosisfindung wurden 4 (Hydrocortison) bzw. 3 (Epinephrin) Probanden untersucht. Für die Hauptversuche wurden Gruppen aus je 10 Personen gebildet, die entweder eine Hydrocortisoninfusion oder eine Epinephrininfusion erhielten. Drei Probanden bildeten eine Kontrollgruppe (Infusion von 0,9% NaCl).

Die Durchführung und mögliche Risiken der Studie wurden jedem Probanden erklärt, bevor dieser die Einverständniserklärung unterzeichnete.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité Berlin genehmigt.

#### **3.1 Probanden**

Bei allen Probanden wurde vor Versuchsteilnahme eine ärztliche Untersuchung durchgeführt. Die Familienanamnese war bei allen Personen in bezug auf Diabetes mellitus oder Fettstoffwechselstörungen leer. Alle Probanden waren gesund und hatten keine wesentlichen Vorerkrankungen in der Anamnese. Kein Proband nahm therapeutische Medikamente ein. 9 der 14 weiblichen Probanden nahmen orale Kontrazeptiva ein. Die Blutwerte für Nüchtern glukose, Triglyzeride, Cholesterin, HbA1c und die Leberenzyme lagen bei allen Teilnehmern im Normbereich, der BMI war  $\leq 25$ . Bei der Epinephringruppe erfolgte zusätzlich eine EKG-Untersuchung, um kardiale Auffälligkeiten auszuschließen.

Die Hydrocortisongruppe bestand aus 10 Probanden (6 männlich, 4 weiblich) im Alter zwischen 19 und 33 Jahren (mittleres Alter: 24,4 Jahre). Der durchschnittliche BMI betrug 21,6 (19-25).

Die Epinephringruppe bestand aus 10 Probanden (6 männlich, 4 weiblich) im Alter zwischen 19 und 25 Jahren (mittleres Alter: 24,1 Jahre). Der durchschnittliche BMI betrug 21,7 (19-25).

### 3.2 Experimentelles Protokoll

Die Versuche begannen morgens nach einer 12-stündigen Nahrungs- und 24-stündigen Alkoholkarenz.

Den Probanden wurde beidseitig in eine antecubitale Vene ein Verweilkatheter gelegt. Über eine Seite erfolgte die Infusion von Hydrocortison bzw. Epinephrin, über die andere Seite die Blutentnahmen zur Bestimmung der Insulinrezeptorbindung an mononukleären Zellen und der Hormon- und Zytokin-Konzentration.

In Vor- und Hauptversuchen erfolgte zur Hormon-, Glukose- bzw. Zytokinbestimmung die erste Blutentnahme sofort, eine zweite basale Blutentnahme nach 15min zum Zeitpunkt 0. Weitere Blutentnahmen erfolgten in Abständen von 30 Minuten (siehe Abbildungen 1 und 2).

Je 10ml Blut wurden in einem Serum- bzw. EDTA-Plasma-Röhrchen entnommen und auf Eis gekühlt. Innerhalb einer Stunde wurden die Proben zentrifugiert, in Aliquots zu 200 $\mu$ l abpipettiert und bis zur Bestimmung der einzelnen Parameter bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

In den Hauptversuchen und den Kontrollversuchen wurde zum Zeitpunkt 0 und am Ende der Infusion zusätzlich jeweils 40ml heparinisiertes Vollblut für das Insulinbindungsexperiment abgenommen, um den Einfluss der erhöhten Cortisol- bzw. Epinephrinkonzentration auf die Insulinrezeptorbindung auf mononukleären Zellen zu untersuchen. Zusätzlich erfolgte eine Bestimmung des Blutbildes und des Differentialblutbildes zum Beginn und am Ende der Infusion.

In der Hydrocortisonreihe wurde IL-10 und TNF $\alpha$  aus Plasmaproben der Hauptversuche zu den Zeitpunkten 0, 60, 90, 150 und 180 min bestimmt.

In der Epinephrinreihe erfolgte die Bestimmung von IL-10 und TNF $\alpha$  aus Serumproben der Hauptversuche zu den Zeitpunkten 0, 60, 90 und 120 min sowie aus basalen und LPS-stimulierten Vollblut zum Zeitpunkt 0 und 120 min.

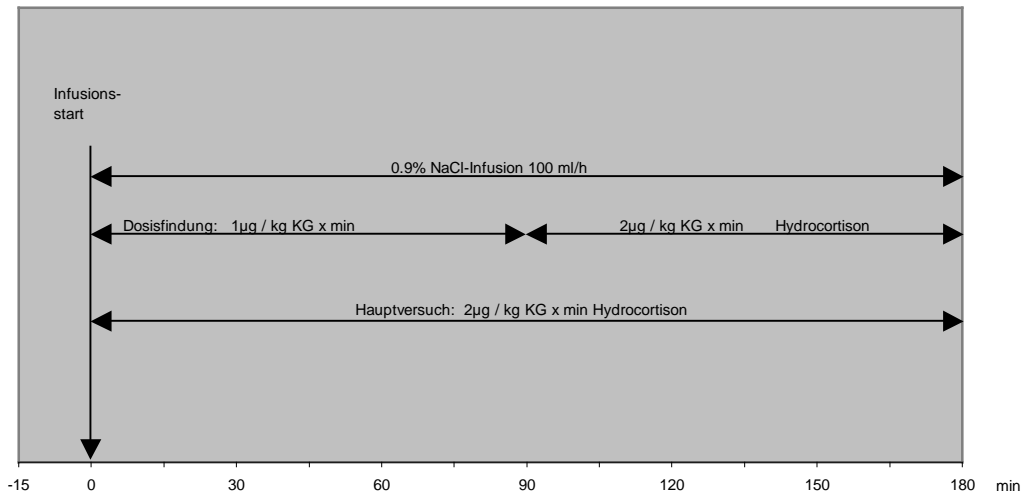


Abb.1: Infusionsschema Hydrocortison

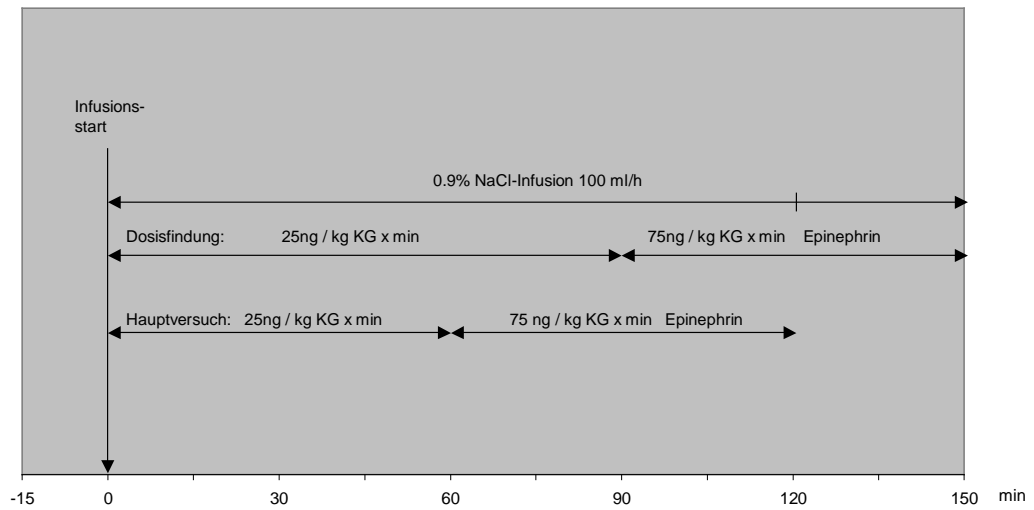


Abb.2: Infusionsschema Epinephrin

### 3.2.1 Dosisfindung Hydrocortison

Ziel der Dosisfindung war es, diejenige Infusionsdosis zu bestimmen, die zu Cortisol-Plasmakonzentrationen führt, die während Hypoglykämie erreicht wurden. Die Versuche begannen morgens zwischen 7.05 Uhr und 7.20 Uhr, um die zirkadiane Rhythmik der endogenen Cortisonproduktion nicht zu stören.

Die verwendeten Dosierungen von Hydrocortison, die den Probanden infundiert wurden, richteten sich nach bereits publizierten Daten.<sup>88,89,90</sup>

Hydrocortison 100® von Pharmacia Upjohn, aufgelöst in 100ml 0,9% NaCl, wurde mittels Perfusor infundiert.

Zum Zeitpunkt 0 begann die Infusion mit  $1\mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht x min Hydrocortison für einen Zeitraum von 90min. Danach wurde die Hydrocortisoninfusion mit  $2\mu\text{g}/\text{kg}$  KG x min für weitere 90min fortgeführt. Bei diesen Untersuchungen wurden zu Infusionsbeginn relativ hohe Cortisolausgangswerte ( $853\pm 129\text{nmol}/\text{l}$ ) gemessen, die unter der exogenen Hydrocortisonzufuhr auf Werte von  $1243\pm 219\text{nmol}/\text{l}$  zu Infusionsende anstiegen. Um den Anteil der endogenen Cortisolproduktion im zeitlichen Verlauf einschätzen zu können, wurde bei einem Probanden mit einem abweichenden Infusionsschema wie folgt vorgegangen: zur gleichen Anfangszeit (7.20 Uhr) wurde mit der Infusion von 100ml/h 0,9% NaCl-Lösung begonnen. Nach 3 Stunden erfolgte für 120 Minuten eine Infusion mit  $2\mu\text{g}/\text{kg}$  KG x min Hydrocortison. Die Blutentnahmen erfolgten in den ersten 3 Stunden stündlich, danach halbstündlich.

Aufgrund der ermittelten Daten aus den Dosisfindungsexperimenten wurde das Infusionsschema wie unter 3.2.2 beschrieben angewendet.

### 3.2.2 Hauptversuch Hydrocortison

Da es im Dosisfindungsversuch unter Infusion von  $1\mu\text{g}/\text{kg}$  KG x min Hydrocortison nach 60min noch zu einem Abfall der Plasma-Cortisolkonzentration gekommen war, entsprechend dem Abfall der endogenen Cortisolproduktion, wurde der Versuchsbeginn auf 9.00 Uhr verschoben. Zum Zeitpunkt 0 begann die Infusion mit  $2\mu\text{g}/\text{kg}$  KG x min Hydrocortison. Gleichzeitig wurden 100ml/h 0,9%NaCl-Lösung infundiert. Die Infusion dauerte 180 Minuten.

Die Infusion von 0,9%NaCl-Lösung erfolgte, um Flüssigkeitsverluste durch die 12-stündige Nahrungskarenz und die Blutentnahmen auszugleichen.

### 3.2.3 Dosisfindung Epinephrin

Ziel der Dosisfindung war es, diejenige Infusionsdosis zu bestimmen, die zu Epinephrin-Plasmakonzentrationen führt, die während Hypoglykämie erreicht wurden. Die Versuche begannen zwischen 8.25 Uhr und 9.25 Uhr, im gleichen Zeitraum wie die Hauptversuche der Hydrocortisongruppe.

Adrenalin 1:1000® von Jenapharm, in 50ml 0,9% NaCl aufgelöst, wurde mittels Perfusor infundiert. Die Infusion von Epinephrin betrug in den ersten 90 Minuten 25ng/kg KG x min, darauf schloss sich eine Infusion von 75ng/kg KG x min Epinephrin für 60 Minuten an. Die gewählte Dosierung richtete sich nach bereits publizierten Daten, wobei eine Dosis von 75ng/kg KG x min Epinephrin keine signifikanten Nebenwirkungen aufwies.<sup>91</sup>

Die Blutentnahmen erfolgten zu den oben genannten Zeitpunkten.

Alle Probanden wurden während der Epinephrininfusion mittels Monitor kontinuierlich bezüglich EKG, Puls und Blutdruck überwacht.

### 3.2.4 Hauptversuch Epinephrin

Die Versuche begannen zwischen 8.35 Uhr und 9.00 Uhr morgens, im gleichen Zeitraum wie die Dosisfindungsversuche und die Hauptversuche der Hydrocortisongruppe.

Den Probanden wurde über 60 Minuten 25ng/kg KG x min Epinephrin infundiert, in den anschließenden 60 Minuten wurde 75ng/kg KG x min Epinephrin infundiert.

Ebenso wie den Probanden der Hydrocortisongruppe wurde den Probanden der Epinephringruppe zusätzlich 100ml/h 0,9% NaCl-Lösung über den gesamten Zeitraum infundiert. Alle Probanden wurden während der Epinephrininfusion mittels Monitor kontinuierlich bezüglich EKG, Puls und Blutdruck überwacht.

### 3.2.5 Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe bestand aus 3 Personen, denen über 3 Stunden eine 0,9% NaCl-Lösung mit einer Geschwindigkeit von 100ml/h infundiert wurde. Die Blutentnahmen zur Bestimmung der Glukose- und Insulinkonzentration sowie zur Bestimmung der Insulinbindung der Monozyten erfolgten zu den oben genannten Zeitpunkten.

### 3.3 Analytische Methoden

#### 3.3.1 Insulinbindungsexperiment

Die Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen beruhte auf der von Böyum beschriebenen Methode.<sup>54</sup> Hierzu wurden 40ml Vollblut in heparinisierte Spritzen abgenommen. Für die Isolierung mononukleärer Zellen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation wurden jeweils 8ml Blut mit 20ml Lymphoprep® vorsichtig versetzt und 20min bei 20°C und 2000U/min zentrifugiert.

Die mononukleäre Zellschicht wurde abpipettiert, in PBS-Puffer resuspendiert und erneut 5min zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschvorgang mit PBS-Puffer schloss sich ein Waschvorgang mit Lymph-Puffer an (Tabelle 1).

Tab.1: Zusammensetzung des Lymph-Puffers (pH 7,8) plus 1 g/l humanes Serumalbumin

Substanz	mol/l
HEPES	0,05
NaCl	0,12
KCl	0,005
MgSO <sub>4</sub>	0,0012
Na-Acetat	0,015
Glukose	0,01
CaCl	0,01

Die mononukleären Zellen wurden nach wiederholter Zentrifugation (5min, 20°C, 2000U/min) in Lymph-Puffer gelöst, um eine Endkonzentration von 2-5 Millionen Zellen je Ansatz (200µl) zu erhalten.

Die Vitalität wurde durch Trypan-Blau-Färbung bestimmt und lag über 95%. Der Prozentanteil an Monozyten in dieser Endpräparation wurde durch Pappenheim-Färbung einer Zellsuspensionsprobe bestimmt. Die Monozyten wurden dabei mikroskopisch anhand der morphologischen Kriterien prozentual ausgezählt. Doppelte Aliquots der Zellsuspension (200µl) wurden mit <sup>125</sup>I-Insulin in einem Wasserbad bei 11°C für 90min inkubiert in der Abwesenheit bzw. Anwesenheit von unmarkiertem

Insulin in Konzentrationen zwischen 0,1 und 100nmol/l (Tabelle 2). Als radioaktives Insulin wurde <sup>125</sup>I-Humaninsulin A 14 im lyophilisierten Zustand mit einer Ausgangsaktivität von 3,7 Mega Bequerel genutzt. Radioaktives Insulin wurde freundlicherweise von der Fa. Hoechst zur Verfügung gestellt. 50µl <sup>125</sup>I-Insulin entsprachen 12000-13000 counts pro Minute.

Tab.2: Pipettierschema des Insulinbindungsexperiments

Röhrchen	Zellsuspension	Puffer	Insulin in mol/l	<sup>125</sup> I-Insulin
1+2	200µl	25µl	----	50µl
3+4	200µl	-----	25µl 1x10 <sup>-10</sup>	50µl
5+6	200µl	-----	25µl 5x10 <sup>-10</sup>	50µl
7+8	200µl	-----	25µl 1x10 <sup>-9</sup>	50µl
9+10	200µl	-----	25µl 5x10 <sup>-9</sup>	50µl
11+12	200µl	-----	25µl 1x10 <sup>-8</sup>	50µl
13+14	200µl	-----	25µl 5x10 <sup>-8</sup>	50µl
15+16	200µl	-----	25µl 1x10 <sup>-7</sup>	50µl

Nach 90-minütiger Inkubation wurden 100µl der Ansätze in gekühlte, mit 150µl Öl (Gemisch aus 40ml Di-isononyl-phtalate und 76,6ml Di-butyl-phtalate) gefüllte Mikroröhrchen pipettiert.

Danach wurde die Zellsuspension für 3min bei 11000U/min über dem Ölgemisch abzentrifugiert. Die Mikroröhrchen wurden auf Höhe der Ölphase mit einer Zange scharf durchtrennt. Die Gefäßspitzen mit der Zellsuspension sowie die Gefäßenden mit dem Überstand wurden voneinander getrennt in Glasröhrchen aufgefangen und die Radioaktivität über 2min im γ-Counter gemessen. Die zellgebundene Radioaktivität (TB) wurde nach der Formel  $TB = B / (B + F)$  berechnet. (TB: totale Bindung; B: gebundene Aktivität; F: freie Aktivität). In einem weiteren Schritt wurde die spezifische Bindung (SB) berechnet:  $SB = TB - NSB$  (nichtspezifische Bindung  $\hat{=}$  TB bei einer Insulinkonzentration von  $1 \times 10^{-7}$ ). Als Insulinbindung wurde die spezifische Bindung je 1000 000 Monozyten festgelegt.



### 3.3.2 Vollblut-Stimulationsassay

IL-10 und TNF $\alpha$  wurden aus Plasma der Hauptversuche mit Epinephrininfusion zum Zeitpunkt 0 und 120 min unter basalen und LPS-stimulierten Bedingungen bestimmt. Ein Zusatz von Lipopolysaccharid wurde verwendet, um die TNF $\alpha$ - und IL-10-Spiegel zu erhöhen und damit in den Messbereich, der von uns genutzten Assays zu gelangen. Zur Bestimmung der LPS-stimulierten Werte wurden zu 4ml mit NH<sub>4</sub>-Heparin versetztem Blut 40 $\mu$ l Lipopolysaccharid gegeben. Anschließend wurde für 5h30min bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die Basalwerte wurde 4ml mit NH<sub>4</sub>-Heparin versetztem Blut ohne LPS unter gleichen Bedingungen inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Plasma bei 4°C und 3000U/min 15min abzentrifugiert und bei -80 °C eingefroren.

Die TNF $\alpha$ - und die IL-10-Bestimmung erfolgte wie nachstehend beschrieben.

### 3.3.3 TNF $\alpha$ -Bestimmung

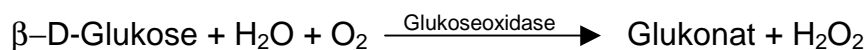
Die TNF $\alpha$ -Bestimmung erfolgte mittels Sandwich-Enzymimmunoassay. Die Proben oder Standards wurden in eine mit Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert und reagierten mit einem ersten Antikörper (monoklonaler Maus-Antikörper gegen TNF $\alpha$ ). Nach der Inkubation wurden überschüssige Bestandteile durch Waschen entfernt, und anschließend eine zweite Inkubation mit einem polyklonalen enzymmarkierten TNF $\alpha$ -Antikörper vorgenommen. Es bildete sich dabei ein Sandwichkomplex aus dem ersten Antikörper, TNF $\alpha$  und dem enzymmarkierten Antikörper. Nach Auswaschen des überschüssigen enzymmarkierten Antikörpers begann nach Zusatz der chromogenen Lösung (Tetramethylbenzidin mit Wasserstoffperoxid) die Bildung des farbigen Endprodukts. Durch Zugabe von Stopplösung (2N Salzsäure) wurde die Farbreaktion beendet. Danach wurde die Absorption bei 450nm gemessen. Im Endprodukt war die Farbintensität der Menge von TNF $\alpha$  proportional. Der Messbereich für TNF $\alpha$  lag in einem Bereich von 16-1000pg/ml. Die Bestimmung erfolgte als Doppelbestimmung.

### 3.3.4 IL-10-Bestimmung

IL-10 wurde mittels Sandwich-Enzymimmunoassay bestimmt. Die Proben oder Standards wurden in eine mit Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert und reagierten mit diesem ersten Antikörper (monoklonaler Maus-Antikörper gegen IL-10). Nach der Inkubation wurden überschüssige Bestandteile durch Waschen entfernt, und es schloss sich eine zweite Inkubation mit einem polyklonalen enzymmarkierten IL-10-Antikörper an. Es bildete sich dabei ein Sandwichkomplex aus dem 1. Antikörper, IL-10 und dem enzymmarkierten Antikörper. Nach Auswaschen des überschüssigen enzymmarkierten Antikörpers begann nach Zusatz der chromogenen Lösung (Tetramethylbenzidin mit Wasserstoffperoxid) die Bildung des farbigen Endprodukts. Zugabe von Stopplösung (2N schweflige Säure) beendete die Farbreaktion. Danach wurde die Extinktion bei 450nm gemessen. Der Messbereich des Tests lag in einem Bereich von 15–1000pg/ml. Die Messung erfolgte als Doppelbestimmung.

### 3.3.5 Glukosebestimmung

Die Glukosebestimmung aus Serum erfolgte quantitativ mittels des „Beckman Glukose Analysators 2“. Dieses System nutzt die Glukose-Oxidase-Methode für die Glukosebestimmung. Glukose wird durch das Enzym Glukose-Oxidase zu Glukonsäure oxidiert.



Der mittels Sauerstoffelektrode erfasste Sauerstoffverbrauch entspricht der Glukosekonzentration. Zur Bestimmung wurde eine Doppelmessung je Probe durchgeführt.

### 3.3.6 Cortisolbestimmung

Die Cortisolbestimmung wurde mit der freundlichen Unterstützung von Frau Dr. Brux, Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité durchgeführt.

Die Cortisolbestimmung erfolgte mit einem kommerziellen Kit. Technicon Immuno 1 System Cortisol® ist ein magnetischer Separationsassay, basierend auf dem Prinzip eines heterogenen kompetitiven Immunoassay. Enzymgebundenes Cortisol, die Proben und eine begrenzte Anzahl von Antikörpern gegen Cortisol wurden bei 37°C inkubiert. Die mIMP-Reagenz (monoclonal ImmunoMagnetic Particle) wurde hinzugefügt und während einer zweiten Inkubation wurde der Antikörper-Hapten-Komplex gebildet. Der mIMP-Antikörper-Komplex wurde gewaschen, wobei die Antikörperfraktion von der Antigenfraktion getrennt wurde. Das Substrat pNPP (para-Nitrophenyl-Phosphat) wurde hinzugefügt. Die alkalische Phosphatase im Antikörperkomplex reagierte mit pNPP, es entstanden para-Nitrophenoxid und Phosphat. Die Extinktion von para-Nitrophenoxid wurde bei 405nm gemessen. Der Messbereich lag in einem Bereich von 0,2-60,0µg/dl. Die Bestimmung erfolgte als Einfachmessung.

### 3.3.7 Epinephrinbestimmung

Die Katecholaminbestimmung wurde mit der freundlichen Unterstützung von Herrn Dipl.-Biochem. Priem, Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité, durchgeführt.

Die Epinephrinkonzentrationen wurden mittels Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (Fa. Chromsystems) bestimmt. Vor der chromatographischen Trennung wurden die Katecholamine durch selektive Absorption an Aluminiumoxid aus dem Plasma isoliert.

Als elektrochemisches Messprinzip bei diesem System der Flüssigkeitschromatographie diente die Amperometrie. Dabei wurde zwischen der Arbeitselektrode und der Referenzelektrode eine Polarisierungsspannung angelegt. Die Probensubstanzen wurden in der Messzelle an der Arbeitselektrode vorbeigeleitet und wurden dort oxidiert bzw. reduziert. Die oxidative Reaktion der Katecholaminmoleküle führte zur Abgabe von 2 Elektronen. Der dabei fließende Strom war proportional zur Konzentration der eingesetzten Probensubstanz. Der Strom wurde von einem Messgerät erfasst, elektrisch verstärkt und dann als chromatographisches Signal dargestellt. Der

Messbereich lag bei Konzentrationen zwischen 10-1000pg/ml. Die Bestimmung erfolgte als Einfachmessung.

### 3.3.8 Insulinbestimmung

Die Serum-Insulinbestimmung erfolgte mittels heterogenen, kompetitiven Radioimmunoassay mit einem kommerziellen Kit.

Radioaktiv markiertes Insulin, eine begrenzte Anzahl von Insulin-Antikörpern und die Proben wurden bei Raumtemperatur für 3h inkubiert. Der Präzipitationskomplex GAGP-PPT wurde hinzugefügt. Es schloss sich eine erneute Inkubation für 15-25min bei Raumtemperatur an. Die Ansätze wurden bei Raumtemperatur mit 2800U/min für 20min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Radioaktivität der Präzipitate im  $\gamma$ -Counter gemessen. Die Bestimmung erfolgte als Doppelmessung.

### 3.4 Materialien

#### 3.4.1 Medikamente / Chemikalien

0,9 % NaCl-Lösung	Braun, Melsungen
Adrenalin 1:1000	Jenapharm, Jena
Hydrocortison 100	Pharmacia & Upjohn, Stockholm, Schweden
Trasylol®	Bayer Vital, Leverkusen
A 14 <sup>125</sup> I-Insulin	Hoechst, Frankfurt/ Main
CaCl x H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Di-butyl-phthalate	Sigma, Steinheim
Di-isononyl-phthalate	Sigma, Steinheim
Glukose	Merck, Darmstadt
Giemsa	Merck, Darmstadt
HEPES C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	Sigma, Steinheim
Heparin-Natrium	ratiopharm, Ulm
humanes Serumalbumin	Behring, Marburg
Insulin, human recombinant	Sigma, Steinheim
KCl	Sigma, Steinheim
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Lipopolysacharid LPS 1mg/ml	Sigma, Steinheim
Lymphoprep	Nycomed Pharma, Oslo, Norwegen
May-Grünwald	Merck, Darmstadt
MgSO <sub>4</sub> 7 x H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Na-Acetat x 3 H <sub>2</sub> O	Sigma, Steinheim
NaCl	Sigma, Steinheim
PBS (10x)	Gibco BRL, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, Steinheim

### 3.4.2 Assays

- Cortisol, Technicon Immuno 1 System, Fa. Bayer, Tarrytown USA
- Epinephrin - HPLC, Fa. Chromsystems, München
- Insulin I 125 RIA, Fa. Sorin, Düsseldorf
- TNF $\alpha$  Milenia, Fa. DPC Biermann, Bad Nauheim
- Quantikine Human IL-10 Immunoassay, Fa. R&D Systems GmbH, Wiesbaden

### 3.4.3 Instrumente

Beckman Glukose Analysator 2	Beckman Instruments, München
EKG-Monitor „Sirecust 960“	Siemens, München
Infusomat „IVAC 598“	Braun, Melsungen
Perfusor „Injectomat cp IS“	Fresenius, Bad Homburg
Zentrifuge „Varifuge 3.2 RS“	Heraeus, Hanau
Zentrifuge „Biofuge B“	Heraeus, Hanau
Arbeitsbank „Hera Safe HS 15“	Heraeus, Hanau
CO <sub>2</sub> -Inkubator „BB 16“	Heraeus, Hanau
$\gamma$ -Counter „1277 Gammamaster“	LKB, Wallac, Schweden
Mikroskop „Axiolab“	Carl Zeiss, Jena

### 3.5 Statistik

Messwerte wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben, soweit nicht anders gekennzeichnet. Zur statistischen Auswertung wurde der Student's t-Test für verbundene Stichproben angewendet. Bei mehr als zwei Messpunkten wurde zunächst mittels ANOVA (One Way Repeated Measures Analysis of Variance) auf generelle statistische Signifikanzen untersucht. Als post-Test kam der Tukey Test zum Einsatz. Für  $P < 0,05$  wurde Signifikanz angenommen.