

Aus der Klinik für Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Inhibition des Antidiuretischen Hormons (ADH) durch
Glucocorticoide und ADH-unabhängige Mechanismen der
Wasserrückresorption

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Friederike Charlotte Ufer

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. Pfeiffer
2. Prof. Dr. med. M. Fromm
3. Prof. Dr. med. Chr. Schöfl

Datum der Promotion: 16.05.2010

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Ursprung und Synthese von Vasopressin	2
1.2 Wirkungen von Vasopressin	3
1.3 Vasopressin am Rezeptor	4
1.4 Interaktion von Glucocorticoiden und Vasopressin.....	6
1.5 ADH-unabhängige Mechanismen der renalen Wasserrückresorption.....	9
1.6 Fragestellung.....	13
2 Methodik	14
2.1 Aufbau der klinischen Studie	14
2.1.1 Auswahl der Probanden	15
2.1.2 Versuchsablauf	16
2.2 Laborchemische Bestimmungen.....	18
2.2.1 Hormonelle Bestimmungen mit Immunoassays	19
2.2.1.1 ADH-Bestimmung aus Heparin-Plasma.....	19
2.2.1.2 Renin-Bestimmung aus EDTA-Plasma.....	21
2.2.1.3 Aldosteron-Bestimmung aus Serum.....	21
2.2.1.4 ANP-Bestimmung aus EDTA-Plasma	22
2.2.1.5 ACTH-Bestimmung aus EDTA-Plasma	22
2.2.2 Bestimmung von Plasma- und Urinosmolalitäten	23
2.2.3 Prednisolon-Bestimmungen aus Serum	23
2.2.4 Elektrolyte aus Serum und Urin.....	24
2.2.5 Kreatinin aus Serum und Urin	24
2.2.6 U-Aquaporin-2 im Urin	24
2.2.7 Prostaglandin E2 im Urin.....	25
2.3 Auswertung der Daten	25
3 Ergebnisse	26
3.1 Einfluss der Glucocorticoideinnahme auf relevante Blutparameter während des Durstversuchs	26
3.1.1 Plasma-ADH und Plasmaosmolalität	26
3.1.2 Elektrolyte im Serum und Kreatinin-Clearance.....	30

3.1.3	ANP im Plasma.....	33
3.1.4	Renin und Aldosteron	35
3.2	Einfluss der Glucocorticoideinnahme auf relevante Urinparameter während des Durstversuchs	38
3.2.1	Urinosmolalität und Urinvolumen	38
3.2.2	Elektrolyte im Urin	42
3.2.3	U-AQP2-Ausscheidung im Urin.....	46
3.2.4	PGE2-Ausscheidung im Urin.....	49
3.3	Einfluss der Glucocorticoideinnahme auf relevante Urinparameter nach Gabe des V2R-Agonisten Minirin®.....	51
3.4	Kontrolle der Compliance	54
4	Diskussion.....	56
4.1	Prednisolon supprimiert ADH im Plasma.....	57
4.2	Keine Reduzierung der renalen Wasserrückresorption trotz ADH-Suppression .	58
4.2.1	Kein Einfluss der Glucocorticoide auf u-AQP2-Ausscheidung.....	60
4.3	ADH-unabhängige renale Wasserrückresorption.....	61
4.3.1	RAAS-induzierter Einbau von AQP2?	61
4.3.2	ANP-induzierter Einbau von AQP2?.....	63
4.3.3	Verschiebt PGE2 die Relation von Endo-und Exozythose der AQP2-Translokation in Abwesenheit von ADH?	65
4.4	Exkurs: Mögliche Mechanismen der ADH-Suppression unter Prednisolon.....	67
4.5	Limitationen dieser Arbeit.....	70
4.5.1	Limitationen im Studiendesign.....	70
4.5.2	Limitationen der laborchemischen Bestimmungen	71
4.5.3	Limitationen der zugrunde gelegten biophysiologicalen Zusammenhänge.....	71
5	Zusammenfassung	73
6	Literaturverzeichnis.....	75
	Abkürzungsverzeichnis	86
	Selbständigkeitserklärung.....	88
	Publikationsliste	89
	Danksagung.....	90
	Curriculum Vitae.....	91

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Überblick Versuchsablauf.....	16
Abbildung 2:	Plasmakonzentration von ADH.....	28
Abbildung 3:	ADH bezogen auf die Plasmaosmolalität	30
Abbildung 4:	Verlauf der Natriumkonzentration im Serum.....	31
Abbildung 5:	Verlauf der Kaliumkonzentration im Serum	32
Abbildung 6:	Plasma-Kreatinin-Clearance.....	33
Abbildung 7:	ANP-Konzentration im Plasma	34
Abbildung 8:	AUC-ANP	34
Abbildung 9:	Reninkonzentration im Plasma	36
Abbildung 10:	AUC-Renin	36
Abbildung 11:	Aldosteronkonzentration im Serum.....	37
Abbildung 12:	AUC-Aldosteron.....	38
Abbildung 13:	Urin-osmolalität	39
Abbildung 14:	Urinvolumen	40
Abbildung 15:	Zusammenhang zwischen Urinvolumen und Osmolalität	41
Abbildung 16:	Natriumkonzentration im Urin	43
Abbildung 17:	Gesamtmenge an ausgeschiedenem Natrium im Urin	44
Abbildung 18:	Kaliumkonzentration im Urin.....	45
Abbildung 19:	Gesamtmenge an ausgeschiedenem Kalium im Urin.....	46
Abbildung 20:	Absolut ausgeschiedene Mengen von u-AQP2 im Urin.....	48
Abbildung 21:	Gesamtmenge an u-AQP2 im Urin	48
Abbildung 22:	u-AQP2-Ausscheidung im Urin bezogen auf Kreatinin	49
Abbildung 23:	Absolut ausgeschiedene Menge von PGE2 im Urin	50
Abbildung 24:	Gesamtmenge an PGE2 im Urin	50
Abbildung 25:	Ausscheidungsrate des PGE2.....	51
Abbildung 26:	u-AQP2-Konzentration im Urin nach i.v. Gabe von Minirin®	52
Abbildung 27:	PGE2-Konzentration im Urin nach i.v. Gabe von Minirin®.	53
Abbildung 28:	Morgendliches Plasma-ACTH	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Überblick der laborchemischen Bestimmungen	18
Tabelle 2:	Anstieg der Plasmaosmolalität	29
Tabelle 3:	AUC der Urinosmolalität	40
Tabelle 4:	Korrelationen von Urinvolumen und Urinosmolalität.....	41
Tabelle 5:	Gesammelte Urinmenge während des Durstens	42
Tabelle 6:	Urinosmolalität vor und nach Applikation von Minirin®	54
Tabelle 7:	Prednisolon im Serum.....	54

1 Einleitung

Die Aufrechterhaltung der Homöostase des menschlichen Wasser- und Elektrolythaushalts ist ein komplexer und lebensnotwendiger Vorgang. Im täglichen Leben können ständig Aspekte der Nierenphysiologie am eigenen Leib beobachtet werden. An heißen Sommertagen verliert man über die Haut Flüssigkeit, sodass wenig und stark konzentrierter Urin die Folge ist. Andererseits führt eine erhöhte Trinkmenge zur Produktion von großen Volumina hellen, wenig konzentrierten Urins. Dass die Regulierung dieser scheinbar einfachen Vorgänge dennoch hoch kompliziert ist, lässt sich aus der Vielzahl der daran beteiligten Organe sowie aus der Aktivierung der unterschiedlichen hormonellen Regelkreise ableiten.

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit ist es, den Einfluss exogener Glucocorticoide auf diese fein abgestimmten Regulationsmechanismen zu untersuchen. Der Fokus liegt dabei auf dem Antidiuretischen Hormon (ADH) und den Konsequenzen einer Suppression von ADH für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Wasserhaushalts. Eine zentrale Rolle spielt in diesem Zusammenhang Aquaporin-2 (AQP2), das maßgeblich an der renalen Wasserrückresorption beteiligt ist und dessen alternativen Aktivierungswege hier von Interesse sind.

In diesem Abschnitt erfolgt zunächst eine allgemeine Einführung in die Thematik mit Würdigung und kritischer Einschätzung des aktuellen Wissensstandes. Zu Beginn werden die Synthese und vielfältigen Wirkungen von ADH, die molekularen Grundlagen der ADH-vermittelten Signaltransduktion sowie die Interaktion von ADH mit Glucocorticoiden thematisiert. Daran anknüpfend wird aufgezeigt, dass es Hinweise für ADH-unabhängige Mechanismen der renalen Wasserrückresorption gibt, sodass am Ende dieses Kapitels die konkrete Fragestellung dieser Arbeit und die Motivation für die Durchführung hergeleitet werden können. Die methodischen Details der durchgeführten *in vivo* Probandenstudie sowie der laborchemischen Untersuchungen werden im anschließenden Abschnitt erläutert.

Im dritten Teil dieser Arbeit werden die Ergebnisse präsentiert und dann im vierten Abschnitt ausführlich im Kontext der aktuellen Literatur diskutiert und eingeordnet. Zusätzlich werden die Limitationen aufgezeigt. Abschließend findet sich eine Zusammenfassung der vorliegenden Forschungsarbeit mit einer Kurzcharakterisierung der zentralen Ergebnisse.

1.1 Ursprung und Synthese von Vasopressin

Das Hormon 8-Arginin-Vasopressin (ADH) ist ein Nonapeptid, das überwiegend in magnozellulären Neuronen der hypothalamischen Nuclei paraventricularis (PVN) und supraopticus (SON) synthetisiert wird. Bei der enzymatischen Prozessierung von ADH aus einem deutlich größeren Präprohormon (pro-ADH) entstehen äquimolare Mengen des Trägerproteins Neurophysin 2 und des Glykopeptids Copeptin¹. Die Rolle dieser beiden Proteine ist noch nicht vollständig geklärt, aber es wurde gezeigt, dass sie für das Verpacken in neurosekretorische Vesikel, den anschließenden Transport sowie für die richtige Faltung des Nonapeptids unerlässlich sind². In diesem Zusammenhang vermuteten Barat et al.³ den durch verschiedene Gendefekte bedingten Mangel an Copeptin und die daraus resultierende fehlerhafte Faltung des Vasopressins als eine Ursache des zentralen Diabetes insipidus. Der weitaus größte Teil des hypothalamisch synthetisierten Vasopressins gelangt direkt über axonalen Transport der Neurone in den Hypophysenhinterlappen, wo es gespeichert und bei entsprechenden Stimuli wie Hyperosmolarität des Plasmas, Hypotension oder Hypovolämie ins Blut sezerniert wird⁴. Ein wesentlich kleinerer Anteil ist nicht für die Wirkung in der Peripherie vorgesehen, sondern verbleibt als Neuromodulator innerhalb des zentralen Nervensystems.

Zwar konnte gezeigt werden, dass einige der magnozellulären Neurone des PVN und SON über die Eminentia mediana Vasopressin direkt in das Pfortadersystem der Hypophyse sezernieren, dennoch wird der überwiegende Anteil des intracerebral verbleibenden Vasopressins in anderen Neuronen synthetisiert. Eine wichtige Rolle spielen in diesem Zusammenhang die parvozellulären Anteile des PVN, die zu den Portalgefäßen, zum Hirnstamm und zum Rückenmark projizieren. Von dort finden sich Vasopressin-transportierende Fasern mit Verbindung zum Hippocampus, der Area-Broca, dem Locus coeruleus und den motorischen Kerngebieten des Nervus vagus⁵.

Aber nicht nur im Hypothalamus wird Vasopressin exprimiert, sondern in sehr unterschiedlichen Teilen des Groß- und Kleinhirns, wie Hallbeck et al.⁶ anhand des Nachweises von entsprechender messenger-RNA (mRNA) an Mäusen zeigen konnten. Im Bereich der Stria terminalis und des Corpus amygdaloideum konnten sie geschlechtsspezifische Unterschiede in der Vasopressin-Expression zeigen, die sich jedoch nicht in allen Spezies finden. De Vries et al.⁷ zeigten, dass insbesondere in

diesen Hirnarealen die Vasopressin-Expression stark durch gonadale Hormonsekretion beeinflusst wird und eine Gonadektomie zu zentral reduziertem Vasopressin führt. Hervorzuheben ist, dass diese Unterschiede nicht für die durch magnozelluläre Neurone der PVN und SON innervierten Gebiete gelten⁸.

Das Neuropeptid Vasopressin findet sich also sowohl in der Peripherie, wohin es vorwiegend über die zur Neurohypophyse projizierenden Axone der magnozellulären Hypothalamuskern gelangt, als auch an verschiedenen Orten innerhalb des zentralen Nervensystems. An letztere gelangt es durch Projektion aus den parvozellulären Kernen des Hypothalamus, wird aber darüber hinaus jeweils lokal synthetisiert. Die intracerebrale Ausschüttung erfolgt teilweise geschlechtsspezifisch.

1.2 Wirkungen von Vasopressin

Seit den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts, seit Vigneaud und seinen Kollegen die Isolation des Vasopressins gelang⁹, sind sukzessive weitere periphere und zentrale Funktionen dieses Hormons gezeigt worden.

Die beiden Schlüsselfunktionen dieses Neuropeptids werden augenscheinlich, wenn man sich die synonymen Bezeichnungen Vasopressin und Antidiuretisches Hormon vor Augen führt: die Vasokonstriktion der großen Kapazitätsgefäße (Vasopressin) und die renal vermittelte Antidiurese (ADH). Neben diesen beiden Schlüsselfunktionen wird ADH zunehmend mit anderen Aufgaben im Organismus in Verbindung gebracht. Wichtig ist hier die Beteiligung von ADH an der Regulierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA), wo es die Ausschüttung des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH) stimuliert¹⁰. Dabei potenziert ADH die Wirkungen des Corticotropin-Releasing-Hormons (CRH)¹¹. Zunehmend größeres Interesse wird den Funktionen von ADH im Metabolismus entgegengebracht, wo es die Freisetzung von Insulin und Glukagon und den Katabolismus von Proteinen stimuliert^{12, 13}.

Vielfältig sind die Einflüsse von ADH bei der Regulierung von Sozialverhalten zwischen Individuen einer Spezies, hier meist im Zusammenspiel mit Oxytocin, dem zweiten neurohypophysären Hormon¹⁴. So konnte an verschiedenen Tiermodellen der Einfluss von ADH auf die Paarbildung¹⁵, den Mutterinstinkt¹⁶ oder die Modulation von aggressivem sowie ängstlichem Verhalten¹⁷ gezeigt werden. Anknüpfend an die Arbeiten mit Nagetieren¹⁵, konnte inzwischen am Menschen ebenfalls ein Zusammenhang zwischen dem für den Vasopressin-1a-Rezeptor kodierenden Gen und

dem Paarungsverhalten gezeigt werden¹⁸. Der beobachtete Zusammenhang ließ sich jedoch nur bei Männern und nicht bei Frauen nachweisen. Interessant sind auch Arbeiten über Vasopressin, die sich mit der Frage beschäftigen, warum manche Spezies monogam (ca. 5 %) und andere polygam leben¹⁹.

Bereits 1965 wurde ADH in Zusammenhang mit Lern- und Gedächtnisleistungen gebracht. Ein Review von de Wied²⁰ gibt darüber einen guten Überblick und bildet vermutlich gleichzeitig das Fundament für den Einsatz von Neuropeptiden in der Alzheimer-Therapie²¹. Das soziale Gedächtnis sowie die komplizierten Mechanismen der sozialen Erkennung und Anerkennung einer Spezies werden ebenfalls von ADH vermittelt²². Diesen Einfluss übt ADH vermutlich über das olfaktorische System aus²³. Thompson et al.²⁴ konnten an menschlichen Probanden ADH-abhängige geschlechtsspezifische Modulation von nonverbalen Reaktionen zeigen. ADH beeinflusst auch psychiatrische Phänomene wie Depressionen oder Angst, wie erfolgreiche Therapieversuche mit ADH-Antagonisten zeigten²⁵.

1.3 Vasopressin am Rezeptor

Die physiologischen Effekte von Vasopressin werden über die Rezeptorsubtypen V1R und V2R vermittelt, die beide an ein G-Protein (GTP-bindendes Protein) gekoppelt sind und sich an der Zelloberfläche befinden²⁶.

Der in dieser Arbeit zentrale V2R findet sich überwiegend in der Niere, genauer in den Prinzipalzellen des Sammelrohrs sowie in den Epithelzellen der Pars recta des distalen Tubulus (TAL) aber auch im Innenohr²⁷. Über G-Proteine aktiviert er die membranständige Adenylatcyclase, was in einem zytoplasmatischen Anstieg von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) resultiert. Dieser cAMP-Anstieg bewirkt die Aktivierung von Proteinkinase A (PKA) und über verschiedene Phosphorylierungen den Einbau von präformierten, hochspezifischen Wasserkanälen (Aquaporinen) in die apikale Zellmembran der Prinzipalzellen des Sammelrohrs²⁸. Durch die Identifizierung dieser Aquaporine, insbesondere AQP2, konnten die Konzentration des Urins sowie die Regulierung der Plasmaosmolalität inklusive der damit verbundenen Vorgänge auf zellulärer und molekularer Ebene besser verstanden werden. Die intrazelluläre Translokation von AQP2 geschieht innerhalb weniger Minuten. In Experimenten mit Zellen aus Rattennieren konnte bereits 2 Minuten nach Applikation von ADH die Relokation von AQP2 in die Zellmembran gezeigt werden. Ein Maximum der AQP2-

Relokation wurde 10 min nach Zugabe von ADH beobachtet²⁹. Zusätzlich wurde ein langfristig induktiver Effekt von Vasopressin auf die AQP2-Synthese beschrieben³⁰.

An der Regulierung der Plasmaosmolalität ist ADH einerseits über die Regulierung von AQP2 beteiligt, andererseits fördert es die Expression des Na-K-2Cl-Kotransporters im TAL. Durch letzteres scheint ADH direkten Einfluss auf die Konzentrierung des Harns mittels des Gegenstromprinzips zu nehmen³¹. Bei Nagetieren konnte eine innerhalb von Sekunden bis Minuten einsetzende Vasopressin-vermittelte Steigerung der NaCl-Absorption im TAL demonstriert werden^{28,32}. Über einen weiteren Mechanismus konnte zusätzlich der Einfluss von ADH auf die Ausscheidung von Harnstoff gezeigt werden³³.

Neben den vorwiegend renalen V2R unterscheidet man beim V1R weiter zwischen V1aR und V1bR. Der V1aR ist ubiquitär, jedoch vorwiegend in der Gefäßmuskulatur, den Hepatozyten, den Zellen der Makula densa und Thrombozyten lokalisiert^{34,35}. Der V1bR (syn. V3R) wurde in der Adenohypophyse, dem Pankreas sowie im weißem Fettgewebe identifiziert^{17,35,12}. Beide funktionieren über eine Aktivierung von Phospholipase C. Masutani et al.³⁶ konnten zeigen, dass es über den V1aR zu einem Anstieg des durchschnittlichen arteriellen Blutdrucks und des Herzminutenvolumens kommt. Sie vermuteten, dass diese Aktivität durch den konsekutiven Anstieg von zyttoplasmatischem Ca^{2+} nach Aktivierung von Phospholipase C und Inositoltriphosphat (IP3) vermittelt wird und Vasopressin so den Effekt von Noradrenalin auf das Myokard und das Gefäßsystem potenziert.

Über den V1R ist ADH in die Kontrolle der hypothalamisch-hypophysären Achse einbezogen. Zentral konnten V1bR im Hypophysenvorderlappen lokalisiert werden, worüber nachweislich die Freisetzung von ACTH stimuliert wird³⁷. In der Nebenniere selbst finden sich V1aR, die eine Steroidsekretion bewirken. Der direkte Einfluss von ADH auf die Sekretion von Aldosteron in der Zona glomerulosa sowie von Glucocorticoiden in der Zona fasciculata konnte für verschiedene Säugetiere gezeigt werden³⁸. Es gibt Hinweise dafür, dass die in der Niere (z.B. TAL und Sammelrohr) identifizierten V1aR ebenfalls an der Regulierung des Wasserhaushalts beteiligt sind, allerdings ist ihre Wirkung im Detail noch nicht abschließend geklärt³⁴.

Eine V1bR vermittelte Stimulation der Glucagon-Sekretion durch ADH konnte in einer Zelllinie von α -Pankreaszellen des Hamsters³⁹ und eine Stimulation der Insulin Sekretion in murinen Pankreasinseln⁴⁰ nachgewiesen werden. Immunhistochemisch wurden V1bR in humanen α - und β -Zellen des Pankreas nachgewiesen³⁹.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich im humanen Organismus sowohl V1aR als auch V1bR an verschiedenen Lokalisationen innerhalb und außerhalb des zentralen Nervensystems befinden, wohingegen ein Vorkommen der V2R bisher nur in der Peripherie beschrieben wurde.

1.4 Interaktion von Glucocorticoiden und Vasopressin

Die Synthese und Sezernierung von Glucocorticoiden in der Nebennierenrinde wird über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse mittels eines negativen Feedback-Mechanismus reguliert⁴¹. Dabei ist eine gewisse Baseline-Versorgung des Körpers mit Glucocorticoiden für die regelrechte Funktion fast aller Gewebe unverzichtbar.

Im hypothalamischen Nucleus paraventricularis (PVN) wird das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) sezerniert⁴². Anschließend gelangt CRH über die Portalgefäße in die Proopiomelanocortin (POMC) Zellen des Hypophysenvorderlappens, wo es über die cAMP abhängige Proteinkinase A die Synthese von POMC induziert, aus dem unter anderen ACTH abgespalten wird. ACTH wiederum stimuliert in der Nebennierenrinde die Steroidhormonsynthese aus Cholesterinester. Ferner wurde eine Stimulation des Nebennierenrindenwachstums durch ACTH nachgewiesen⁴³. Die Freisetzung von CRH beruht auf Impulsen aus dem limbischen System sowie einem negativen Feedback durch ACTH⁴⁴ und der im Blut zirkulierenden Glucocorticoide selbst⁴⁵. Zirkulierendes Glucocorticoid ist beim Menschen Cortisol und bei Ratten und Mäusen Corticosteron. Die CRH-Konzentration im Blut unterliegt zirkadianen Schwankungen mit einem Maximum in den frühen Morgenstunden. Stress und die Aktivität des Immunsystems zählen ebenfalls zu den wichtigen Stellgrößen der HPA⁴⁶.

Wie bereits im Abschnitt 1.2 kurz erwähnt, agieren CRH und Vasopressin synergistisch bei der Freisetzung von ACTH. Dabei fungiert Vasopressin einerseits selbst über V1b-Rezeptoren als schwaches Sekretagogum für ACTH, andererseits scheint seine potenzierende Wirkung auf CRH von noch größerer Bedeutung zu sein, wie *in vitro*^{47, 48} und *in vivo* an Ratten⁴⁹ gezeigt werden konnte. Vasopressin, das im Hypophysenvorderlappen im Zusammenspiel mit CRH die Sekretion von ACTH stimuliert, wird gemeinsam mit CRH in denselben parvozellulären neurosekretorischen Anteilen des PVN synthetisiert. Anschließend gelangt es über dieselben Axone wie

CRH über die externe Zone der Eminentia mediana ins portale Kapillarsystem des Hypophysenvorderlappens^{49, 50}. Bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass alle CRH synthetisierenden Zellen des PVN ebenfalls ADH enthalten, wohingegen bei Ratten nur bei ca. der Hälfte aller CRH-synthetisierenden Perikarien ADH nachgewiesen werden konnte⁵¹.

Darüber, ob die magnozellulären Anteile des PVN und SON ebenfalls Vasopressin für die Wirkung im Hypophysenvorderlappen synthetisieren und somit Einfluss auf die Regulierung der HPA haben, gibt es nur wenige Arbeiten, die zu verschiedenen Ergebnissen kommen^{51, 11}. Dies mag daran liegen, dass diese Unterscheidung methodisch eine große Herausforderung darstellt, da die verschiedenen neuroanatomischen Strukturen sehr dicht beieinander lokalisiert sind. In *in vivo* Studien hat sich außerdem gezeigt, dass die Versuchstiere nach Möglichkeit nicht anästhesiert werden sollten, aber gleichzeitig möglichst wenig Stress haben dürfen, was weitere Schwierigkeiten mit sich bringt⁵².

Die meisten Arbeiten befassen sich im Zusammenhang mit dem Zusammenspiel von Glucocorticoiden und Vasopressin mit der Bedeutung von Vasopressin für die ACTH-Sekretion und damit mit dem Einfluss von Vasopressin auf die Sekretion von Cortisol in der Nebennierenrinde. Es konnte gezeigt werden, dass Cortisolmangel im Plasma zu einer verstärkten ADH-Sekretion in der Hypophyse führt⁵³. Dabei sind die Einflüsse von ADH und CRH auf die ACTH-Sekretion sehr unterschiedlich. Canny et al.⁵⁴ konnten zeigen, dass ADH zu einer Erhöhung der Anzahl sekretorischer Zellen führt, wohingegen CRH die ACTH-Ausschüttung pro Zelle steigert. Ebenfalls gut untersucht ist der Anstieg von ADH-Synthese und Sekretion unter Glucocorticoidmangel, der beispielsweise im Zusammenhang mit einer Hypophysenunterfunktion auftritt. Bei Patienten mit Hypophysenunterfunktion und resultierendem Glucocorticoidmangel wurde trotz niedriger Plasmaosmolalität ein signifikant erhöhtes Plasma-Vasopressin beobachtet⁵⁵. Unter exogener Zufuhr von Glucocorticoiden normalisierten sich die ADH-Werte und eine zuvor klinisch imponierende Hyponatriämie konnte so erfolgreich therapiert werden⁵⁵.

Watts⁵⁶ weist in seiner Übersichtsarbeit darauf hin, dass die seit Jahren in der Literatur fest verankerte Theorie von einer einfachen negativen Feedback-Kopplung zwischen Glucocorticoiden und deren Sekretionsstimuli CRH und ADH wahrscheinlich nicht

uneingeschränkt in allen Situationen gültig ist. Er betont, dass der Unterschied zwischen Gen-Expression, Peptidsynthese und Peptidfreisetzung nicht außer Acht gelassen werden darf. Zwar konnte Watts zeigen, dass zirkulierende Glucocorticoide die ADH-Gentranskription schnell und direkt reduzieren, doch trifft er diese Aussage ausschließlich für die parvozellulären Anteile der PVN. Seine Aussage ist konsistent mit anderen Tierexperimenten an Ratten, wo nach Adrenalektomie wiederholt ein Anstieg von ADH-mRNA und Peptidexpression in den parvozellulären neurosekretorischen Neuronen gezeigt werden konnte^{57, 58, 59}. Später konnten Kovacs et al.⁶⁰ zusätzlich an adrenektomierten männlichen Ratten einen Anstieg von ADH-hnRNA in den parvozellulären Anteilen des PVN zeigen, der durch die Substitution mit Corticosteron supprimiert werden konnte.

Es kann folglich als gesichert angenommen werden, dass der negative Feedback des Cortisols, der sowohl für CRH im Hypothalamus als auch für ACTH im Hypophysenhinterlappen gezeigt werden konnte⁴⁵, ebenso für die vasopressinergen parvozellulären Anteile des PVN gilt. Inwieweit sich dieser negative Feedback-Mechanismus analog auf die magnozellanulären Vasopressin synthetisierenden Neurone übertragen lässt, bleibt in der Literatur weiterhin unklar.

Beispielsweise konnten Kovacs et al.⁶⁰ in ihrer oben zitierten Studie an adrenektomierten Ratten keinen Anstieg der ADH-hnRNA auf Stimulation mit Stress in den magnozellanulären Anteilen des PVN, SON oder des Nucleus suprachiasmaticus (SCN) nachweisen. Zu etwas anderen Ergebnissen kommen Davis et al.⁶¹, die ebenfalls mit adrenektomierten Ratten arbeiteten und einen Anstieg von ADH-mRNA in den parvozellulären sowie magnozellanulären Neuronen des PVN zeigen konnten. Wurden diese Ratten zuvor mit dem Glucocorticoid Dexamethason behandelt, blieb der Anstieg aus. Ebenfalls kein Anstieg von ADH-mRNA wurde im SON und SCN beobachtet.

In einer *in vitro* durchgeführten elektrophysiologischen Arbeit mit Neuronen des PVN von Ratten wurde nach Applikation von Corticosteron und/ oder Hydrocortison eine Inhibition von 58 % der magnozellanulären vasopressinergen Neurone beobachtet⁶². Allerdings wurden auch in dieser Arbeit lediglich die magnozellanulären Anteile des PVN und nicht die magnozellanulären Gebiete des SON und SCN untersucht.

Erkut et al.⁶³ zeigten die beschriebenen Feedback-Effekte auf hypothalamischer Ebene erstmals am Menschen. Post mortem verglichen sie mittels Immunhistochemie die ADH-Expression im PVN und SON von prä mortal mit Corticosteroiden behandelten Patienten und Kontrollen. Die ADH-Menge betrug bei den unter Glucocorticoidtherapie verstorbenen Patienten nur 31 % der ADH-Menge in der Kontrollgruppe. Allerdings weisen die Autoren darauf hin, dass sie keine Unterschiede zwischen magno- und parvozellulären Neuronen treffen konnten. Eine solche Unterscheidung ist schwer, da im menschlichen Hypothalamus - im Gegensatz zur Ratte - anatomisch keine räumliche Trennung zwischen beiden Zellpopulationen des PVN besteht.

Am Menschen durchgeführte *in vivo* Studien, die den Einfluss von exogenem Glucocorticoidexzess auf die Plasma-ADH-Konzentrationen und die daraus resultierenden Auswirkungen auf den Wasserhaushalt, den Gefäßtonus, die HPA-Regulierung, den Metabolismus oder die Psyche analysieren, gibt es nur wenige.

Erstmals konnte 2006 in Klinik für Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin (Charité – Universitätsmedizin Berlin) von Bähr et al.⁶⁴ in einer klinischen Studie an sieben gesunden männlichen Probanden der hemmende Einfluss von exogenem Glucocorticoidexzess auf das Plasma-ADH gezeigt werden. In derselben Arbeit wurde ebenfalls gezeigt, dass es trotz des supprimierten ADH nicht zu einer Polyurie im Sinne eines Diabetes insipidus centralis kam. Während des Durstens blieb die renale Wasserrückresorption und damit die adäquate Urinkonzentration erhalten.

Eine Erklärung für die Mechanismen, die einer erhaltenen Wasserrückresorption unter supprimiertem ADH zugrunde liegen ist, in der Literatur bis jetzt nicht beschrieben.

1.5 ADH-unabhängige Mechanismen der renalen Wasserrückresorption

Wie im vorangegangenen Abschnitt hergeleitet, gibt es Hinweise auf die Existenz alternativer und weitgehend ADH-unabhängiger Mechanismen der renalen Wasserrückresorption. Grundsätzlich stellt sich die Frage, inwieweit solche alternativen Mechanismen abhängig oder unabhängig von AQP2-Wasserkanälen sind.

Erste Anhaltspunkte für die Existenz von ADH-unabhängiger AQP2-Translokation wurden in *in vitro* Studien gefunden. Beispielsweise konnte in Zellkulturen aus Rattennieren demonstriert werden, dass eine 24-stündige Erhöhung der effektiven

extrazellulären Osmolarität (Tonizität) zu einer signifikanten Steigerung der AQP2-Expression in Abwesenheit von ADH mittels Stimulation von AQP2-Gen-Transkription führt ⁶⁵. In Zellkulturen muriner medullärer Sammelrohrzellen konnte ebenfalls nach osmotischer Stimulation eine Steigerung des Einbaus von AQP2 in die apikale Zellmembran beobachtet werden ⁶⁶. Diese *in vitro* Arbeiten ließen also vermuten, dass Hyperosmolalität auch *in vivo* ein ADH-unabhängiger Mechanismus der AQP2-Aktivierung und damit der Wasserrückresorption sein könnte, was zu Tierexperimenten an Brattleboro-Ratten veranlasste. Brattleboro-Ratten wurden 1965 entdeckt und leiden aufgrund einer Nukleotid-Deletion im zweiten Exon des ADH-NP11-Gens unter einem absolut ADH-defizienten autosomal-rezessiven Diabetes insipidus centralis ⁶⁷. Obwohl Unterschiede zum humanen Diabetes insipidus centralis bestehen, der überwiegend autosomal dominant vererbt wird und sich meist erst in den ersten Lebensjahren manifestiert, eignen sich Brattleboro-Ratten gut als Model, um die zellulären Effekte von ADH zu studieren. Erstaunlicher Weise wurde in Brattleboro Ratten dennoch immunhistochemisch die Existenz von AQP2 nachgewiesen, wenn auch vermindert im Gegensatz zu Kontrollgruppen ⁶⁸.

Li et al. ⁶⁹ konnten *in vivo* an Brattleboro-Ratten zeigen, dass durch Hyperosmolalität eine ADH-unabhängige Steigerung der Expression sowohl von renalem AQP2 als auch von renalen Na-K-2Cl Cotransportern induziert wird. Ebenfalls kam es zu einem Anstieg der Urinosmolalität. Ob die Hyperosmolalität durch Glucose- oder NaCl-Infusionen hervorgerufen wurde, spielte dabei keine Rolle. Allerdings kommt eine andere Arbeitsgruppe, die ebenfalls *in vivo* mit Brattleboro-Ratten gearbeitet hat, zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen. Zwar konnten sie während 12-stündigen Durstens ebenfalls einen Anstieg der Urinosmolalität registrieren, doch blieb ein Anstieg von AQP2-mRNA in den Sammelrohrzellen aus ⁷⁰.

Ob der AQP2-Einbau alleine durch lokale osmotische Stimulation hervorgerufen werden kann, wird sich in dieser humanen *in vivo* Arbeit nicht überprüfen lassen.

Eine gänzlich andere Hypothese zur ADH-unabhängigen Wasserrückresorption kann aus Arbeiten mit dem Mineralocorticoid Aldosteron abgeleitet werden. Schon lange gibt es konkrete Hinweise darauf, dass es nicht-genomische Effekte dieses Hormons gibt. Über die Bindungsstärke (65 pN) konnte ein membranständiger Mineralocorticoid-Rezeptor nachgewiesen werden, der allerdings noch nicht eindeutig identifiziert ist ⁷¹. Bereits 2002 konnte an entnommenen Zellen von Rattennieren gezeigt werden, dass

Aldosteron im IMCD (inner medullary collecting duct) zusätzlich zur klassischen genomischen Aktivierung der Natriumreabsorption ⁷² auch einen schnellen, nicht genomischen Einfluss auf die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration in der IMCD Zellen hat. ⁷³. Durch Zugabe von Aldosteron konnte innerhalb von 4 Minuten eine signifikante Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration registriert werden. Erfolgte die Zugabe von Aldosteron in Kombination mit ADH, so wurde die vorher bei alleiniger Zugabe von ADH gemessene cAMP-Erhöhung in Anwesenheit von Aldosteron potenziert. Dieser Effekt des Aldosterons konnte weder durch den klassischen Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonisten Spironolacton noch durch Zugabe von V1R- und/oder V2R-Antagonisten blockiert werden. Die Insertion von AQP2 in die apikale Zellmembran nach Aktivierung von V2R durch ADH wird ebenfalls über eine Erhöhung von intrazellulärem cAMP vermittelt, wie bereits im Abschnitt 1.3 erläutert wurde. Daher kann vermutet werden, dass Aldosteron entweder gänzlich unabhängig von ADH an der Insertion von AQP2 beteiligt ist oder zumindest bei relativem ADH-Mangel substituierend wirkt. Ein weiteres indirektes Indiz für die mögliche Kompensation von ADH durch Aldosteron findet sich in einer etwas älteren Arbeit zu osmotischer Stimulation von Brattleboro-Ratten. Es wurde gezeigt, dass Brattleboro-Ratten im Vergleich mit einer Kontrollgruppe nach Applikation von Isoproterenol, das eine Reninfreisetzung und damit Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) induziert, signifikant weniger trinken als in der Kontrollgruppe ⁷⁴. Zwar wurden in dieser Arbeit weder Vasopressin-Spiegel noch AQP2-Insertion bestimmt, dennoch kann ein Aldosteron vermittelter Effekt vermutet werden.

Auch wenn die Details des ADH-vermittelten Einbaus von AQP2 in die apikale Zellmembran von Sammelrohrzellen noch nicht vollständig verstanden sind, so gilt nach Aktivierung des membranständigen V2R der cAMP-Anstieg mit konsekutiver Aktivierung der PKA und resultierender Phosphorylierung von AQP2 an Ser²⁵⁶ als gesichert. In diesem Zusammenhang konnte wiederholt gezeigt werden, dass dabei die Phosphorylierung am Ser²⁵⁶ entscheidend für die Akkumulation von AQP2 in der apikalen Zellmembran ist ⁷⁵. Unklarheit besteht darüber, ob die Phosphorylierung die Translokation von AQP2 induziert, oder beispielsweise die Endocytose von bereits eingebautem AQP2 blockiert und so zu einer Akkumulation von AQP2-Molekülen führt ⁷⁶. Bouley et al. ²⁹ haben gezeigt, dass die essentielle Phosphorylierung von Ser²⁵⁶ alternativ zu cAMP durch eine cGMP-vermittelte Signalkaskade induziert werden kann.

In *in vitro* Versuchen an Rattennieren zeigten sie, dass ein cGMP-abhängiger und cAMP-unabhängiger Einbau von AQP2 möglich ist, der nicht über Aktivierung der PKA sondern mittels Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) vermittelt wird. In der gleichen Arbeit demonstrierten sie, dass diese cGMP-abhängige Translokation von AQP2 durch Stickstoffmonoxid (NO) oder durch das Atriale Natriuretische Peptid (ANP) vermittelt werden kann. In einer Anschlussarbeit derselben Arbeitsgruppe wurde in Abwesenheit von ADH sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mittels Immunfluoreszenzmikroskopie die apikale Akkumulation von AQP2 nach cGMP Erhöhung durch Gabe des Phosphodiesterase-5-Hemmers (Sildenafil) gezeigt⁷⁷.

Aber auch die Inhibition der renalen Prostaglandin E2 –Synthese (PGE2) könnte im Falle eines durch Glucocorticoide supprimierten ADH von zentraler Bedeutung für die erhaltene Wasserrückresorption sein. ADH stimuliert die Bildung von PGE2 in der Niere. In ADH-defizienten Brattleboro-Ratten findet sich ein signifikant niedrigeres PGE2 als in Kontrollgruppen⁷⁸. Eine extrem hohe PGE2-Ausscheidung im Urin zeigen dagegen Patienten mit nephrogenem Diabetes insipidus, der durch ein defektes AQP2 und konsekutiv erhöhte ADH-Plasmaspiegel gekennzeichnet ist⁷⁹. Gleichzeitig gibt es Hinweise darauf, dass ADH durch PGE2 auf verschiedenen Wegen antagonisiert wird. So kann PGE2 nach Bindung an den EP3-Rezeptor zum einen die V2R-abhängige cAMP-Erhöhung inhibieren, sowie alternativ über die Aktivierung von Rho mit nachfolgender Actin-Polymerisation die Translokation von AQP2 verhindern⁸⁰. Auch konnte gezeigt werden, dass PGE2 die Entfernung von AQP2 aus der Zellmembran fördert, ohne dass AQP2 dafür zwangsläufig dephosphoryliert werden muss⁸¹.

Prostaglandine werden enzymatisch aus Phospholipiden der Zellmembran synthetisiert. Ein zentraler Schritt ist dabei die Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandin H2, woraus wiederum andere Prostaglandine hervorgehen. Für diese Umwandlung ist das Enzym Prostaglandin-H-Synthase (PGHS) verantwortlich, welches sowohl eine Cyclooxygenase-2 (COX-2) als auch eine Peroxidaseaktivität besitzt. Wird mittels nicht-steroidaler Antirheumatika (z.B. Indometacin) die COX-2-Aktivität der Prostaglandin-H-Synthase durch Acetylierung irreversibel inhibiert, kommt es zu einer Steigerung der Antidiurese in dehydrierten Ratten und einer Hochregulierung der V2R-mRNA⁸². In gesunden Menschen resultiert die Einnahme von Indometacin und damit die Inhibition der PGE2-Synthese in einer gesteigerten Ausscheidung von AQP2 im Urin⁸³. Eine COX-2-Inhibierung durch das Glucocorticoid Corticosteron wurde in der Ratte

gezeigt⁸⁴. Im Urin werden keine vollständigen Aquaporin-2-Moleküle ausgeschieden, sondern nur Teile des Moleküls. Korrekter ist es folglich von urinary-AQP2 (u-AQP2) zu sprechen. In dieser Arbeit wird daher u-AQP2 verwendet, wenn explizit von den im Urin gemessenen Werten für AQP2 die Rede ist.

Beim Menschen könnte die Suppression der lokalen Synthese von PGE2 unter Glucocorticoiden dazu beitragen, dass trotz supprimiertem Plasma-ADH die Antidiurese aufrecht erhalten werden kann.

1.6 Fragestellung

Cortisolmangel im Plasma resultiert in schwerer Hyponatriämie, die mit einem erhöhten Plasma-ADH-Spiegel einhergeht und sich unter Substitution mit exogenen Glucocorticoiden normalisiert^{55, 85}. Umgekehrt konnte am Menschen gezeigt werden, dass exogener Glucocorticoidexzess zu einer tonischen ADH-Suppression führt⁶⁴. Trotz des signifikant reduzierten Plasma-ADH-Spiegels kam es bei den Probanden eben dieser Studie nicht zu einer Polyurie im Sinne eines Diabetes insipidus centralis, sondern die adäquate renale Urinkonzentration während des Durstens blieb erhalten.

An die beobachtete ADH-unabhängige Wasserückresorption galt es in der vorliegenden Forschungsarbeit anzuknüpfen. Sie wurde dafür mit doppelter Zielsetzung durchgeführt. Zunächst sollte das oben beschriebene Phänomen der ADH-Suppression unter Glucocorticoidexzess mit erhaltener Wasserrückresorption an einer größeren Probandenzahl *in vivo* erneut untersucht werden. Darüber hinaus sollten Erklärungen für die beobachtete ADH-unabhängige Wasserückresorption gefunden werden. Auch wenn in der Literatur bislang keine konkrete Erklärung für dieses Phänomen existiert, gibt es Hinweise auf alternative Mechanismen. Um diesen Hinweisen auf mögliche Mechanismen einer ADH-unabhängigen Antidiurese bestmöglich nachzugehen, konzipierten wir diese klinische *in vivo* Studie mit Durstversuchen an gesunden männlichen Probanden.

Da in diesem Zusammenhang Nierenbiopsien gesunder Probanden ethisch nicht vertretbar waren, wurde die u-AQP2-Ausscheidung im Urin gemessen, um Rückschlüsse auf die intrarenalen Vorgänge zu ziehen^{83, 86}. Gleichzeitig wurden Renin, Aldosteron und ANP aus dem Serum bzw. Plasma der Probanden bestimmt. Im Urin war die Messung von PGE2 von zentraler Bedeutung.

2 Methodik

Um die im vorangegangenen Abschnitt hergeleitete Fragestellung zu untersuchen, wurde eine klinische Studie für 12 gesunde männliche Probanden konzipiert, die grundsätzlich auf der Durchführung von standardisierten Durstversuchen (DV) nach Diederich et al.⁸⁷ basiert. Entsprechend einer bereits in der Klinik für Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin (Charité – Universitätsmedizin Berlin) erfolgreich abgeschlossenen Vorstudie wurde zu Beginn jeweils ein Durstversuch ohne Prednisoloneinnahme durchgeführt. Dieser wurde als basaler Durstversuch bezeichnet. Zwei weitere Durstversuche am Tag 1 und Tag 5 der Prednisoloneinnahme (30 mg/d über 5 d) folgten. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass die gewählte Prednisolondosis von 30 mg/d zu einer Suppression des detektierten Plasma-Vasopressins unter 4 pg/ml führt⁶⁴. Um unter *in vivo* Bedingungen die zugrundeliegende Fragestellung möglichst umfassend zu beantworten, erfolgten diverse hormonelle und nicht hormonelle Bestimmungen aus Blut und Urin der Probanden, die unten detailliert beschrieben werden.

2.1 Aufbau der klinischen Studie

Nach Planung einer *in vivo* Studie mit 12 gesunden männlichen Probanden, erfolgte die Genehmigung durch die Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin (EudraCT-Studiennummer 2005-003488-22). Für die Festlegung der Gruppengröße auf 12 spielte die Arbeit von Pedersen et al.⁸³ eine Rolle, in der sich bei gleicher Gruppengröße eine signifikante Modulation ($p < 0,050$) der Aquaporin-2-Ausscheidung durch Hemmung der Cyclooxygenase zeigte.

Die Art der zu messenden Parameter und die relativ leichte Kontrolle der Compliance (siehe unten) ermöglichten, auf eine Placebo-Kontrolle sowie eine Randomisierung zu verzichten. Die Medikamenteneinnahme konnte über Bestimmung der Prednisolon- und ACTH-Konzentrationen im Serum bzw. Plasma und die regelrechte Durchführung der Durstversuche durch wiederholtes Wiegen der Probanden sichergestellt werden. Die Studie wurde konsekutiv angelegt.

2.1.1 Auswahl der Probanden

Per Aushang an verschiedenen öffentlich zugänglichen Orten auf dem Campus der Charité – Universitätsmedizin Berlin wurden gesunde junge Männer für die Teilnahme an dieser klinischen Studie rekrutiert. Sie durften in keinem Abhängigkeitsverhältnis zu den Studiendurchführenden stehen. Von den über 70 Bewerbern wurden 12 Männer im Alter zwischen 23 und 33 Jahren ($27,0 \pm 0,7$ Jahre MW \pm SEM) mit einem mittleren Body Mass Index von $23,6 \pm 0,6$ kg/m² MW \pm SEM (Schwankungsbreite: 21-27 kg/m²) ausgewählt. Die Probanden wurden persönlich durch den betreuenden Arzt und mittels eines Informationsblattes über Ziel und Durchführung der Studie sowie eventuelle Nebenwirkungen der verabreichten Medikamente aufgeklärt. Nach Unterzeichnung der Einverständniserklärung erfolgte die Voruntersuchung, bestehend aus ausführlicher Anamnese, körperlicher Untersuchung, Ableitung eines 12-Kanal-EKG, Untersuchung des Spontanurins mittels Teststreifens (pH-Wert, Leukozyten, Nitrit, Proteingehalt, Glucose, Ketonkörper, Bilirubin, Urobilinogen, Blut und Hämoglobin), Bestimmung von Leberwerten (GOT, GPT, γ -GT, AP, Bilirubin ges.) und Lipiden (Triglyceride, Gesamtcholesterin) im Serum sowie einer Routine-Labor-Untersuchung (großes Blutbild, Natrium, Kalium, Kalzium, Kreatinin und Blutzucker). Ziel war es, gesunde Probanden zu rekrutieren, sodass folgende Ausschlusskriterien galten:

Hypertonie (BD syst. > 140 mmHg, BD diast. > 90 mmHG), Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz, Polyurie, Polydipsie, Adipositas (BMI > 30 kg/m²), Dyslipidämie, anamnestisch Ulcus ventriculi oder duodeni, Osteoporose, Hyperkalzämie, Infektionskrankheit, Z.n. Tuberkulose, Z.n. Malignom, Z.n. Thrombose, anstehende oder gerade durchgeführte Impfung, psychiatrische Erkrankungen (z.B. Depression, Schizophrenie), Krampfleiden, Glaukom, Katarakt, ausgeprägte Akne, Willebrand-Jürgens-Syndrom, kardiovaskuläre Vorerkrankungen, Herzinsuffizienz \geq NYHA II, Substanzmissbrauch (z.B. Alkohol, Nikotin, alle psychoaktiven Substanzen), klinisch signifikant abweichende EKG-Befunde in der Voruntersuchung, klinisch signifikant abweichende Laborbefunde in der Voruntersuchung, Teilnahme an einer anderen Medikamenten-Studie während der vergangenen 60 Tage, Blutspende von mehr als 500 ml während der vergangenen 60 Tage, regelmäßige Medikamenteneinnahme.

In den Eingangsuntersuchungen wurden keine pathologischen Werte erhoben, sodass die unbedenkliche Teilnahme aller Probanden gewährleistet war. Es erfolgte individuell

die Besprechung der notwendigen Verhaltensweisen während der Studie (Alkoholabstinenz, keine zusätzlichen Medikamente, Meldung möglicher Nebenwirkungen). Beim Gerling-Konzern wurde für jeden Probanden eine Versicherung abgeschlossen (Versicherungsschein-Nr. 70-5644584-4). Als Aufwandsentschädigung erhielten die Probanden nach Abschluss aller Versuchstage 300 € von der Brahms AG. Im Gegenzug wurde der Brahms AG (Kontakt Prof. Morgenthaler) unter Wahrung der Anonymität der Probanden eine EDTA-Plasma Probe jeder Blutentnahme überlassen. Anhand der ebenfalls übermittelten korrespondierenden ADH-Werte konnte die Brahms-AG einen Schnelltest zur Copeptin Bestimmung validieren.

2.1.2 Versuchsablauf

Maximal vier Wochen nach Durchführung der Eingangsuntersuchung begann jeder der 12 Probanden mit einem basalen Durstversuch ohne Prednisoloneinnahme. Darauf folgte eine mindestens dreitägige Pause, bevor die Probanden über fünf Tage jeweils morgens um 07.45 Uhr 30 mg Prednisolon (20 mg + 10 mg Decortin H® der Merck Pharma GmbH, Frankfurt) einnahmen. Am ersten und am fünften Tag der Prednisolon Einnahme erfolgten jeweils zwei weitere Durstversuche.

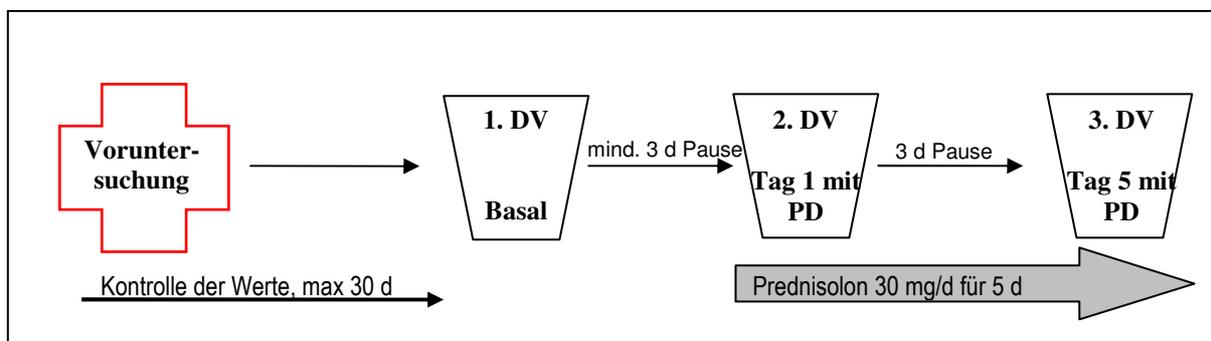


Abbildung 1: Überblick Versuchsablauf

Alle Durstversuche wurden standardisiert nach einem seit Jahren etablierten Protokoll der Klinik für Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin (Charité – Universitätsmedizin Berlin) wie folgt durchgeführt^{64, 87}:

Zwischen 07.00 und 17.30 Uhr durften die Probanden weder Flüssigkeit noch Speisen mit hohem Wassergehalt (wie z.B. Suppen, Obst, Salat oder Eiscreme) zu sich nehmen. Alle Versuchstage begannen morgens um 07.30 Uhr in der Klinik, welche dann bis 18.00 Uhr nicht verlassen werden durfte. Zu den Zeitpunkten 08.00; 10.00; 12.00; 14.00; und 16.00 Uhr erfolgte jeweils

1. venöse Blutentnahme, wunschweise durch wiederholte Venen-Punktion oder über einen um 08.00 Uhr gelegten venösen Zugang (5x9 ml Serum, 2x9 ml EDTA Plasma, 2x9 ml EDTA Plasma + 10 µg Trasylool, 2x6 ml Li-Heparin Gel),
2. Registrierung des Urinvolumens und Gewinnung von Urinproben,
3. Messung von Blutdruck (nach Riva-Rocci) und Herzfrequenz,
4. eine Gewichtskontrolle.

Nach Verwerfung eines eventuellen Urinrestvolumens wurden um 16.30 Uhr einmalig 4 µg Desmopressinacetat (Minirin® der Ferring Arzneimittel GmbH, Kiel) intravenös als Bolus appliziert. Desmopressinacetat ist ein seit über 30 Jahren zugelassenes Arzneimittel, das in seiner Wirkung auf den Wasserhaushalt dem physiologisch vorkommenden Vasopressin entspricht. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Desmopressinacetat selektiv auf V2R und nur in wesentlich geringerem Maße auf V1R oder Oxytocin-Rezeptoren wirkt⁸⁸. Es ist also davon auszugehen, dass es nicht zu einer entscheidenden vasopressorischen Wirkung auf die großen Kapazitätsgefäße kommt, da diese V1R vermittelt ist.

Um 17.30 Uhr erfolgten eine weitere Bestimmung des Urinvolumens sowie eine Gewinnung von Urinproben. Nach erneuter Kontrolle der Vitalparameter Blutdruck und Herzfrequenz wurden die Probanden anschließend nach Hause entlassen. Dort sammelten sie selbständig bis zum nächsten Morgen (07.30 Uhr) ihren Urin in einem dafür erhaltenen Vacutainer® (Becton Dickson GmbH, Heidelberg) und lagerten ihn bei 4°C. Um 8.00 Uhr morgens wurde der Sammelbehälter im Labor entgegengenommen. Das Urinvolumen wurde bestimmt und entsprechende Proben gewonnen.

Grundsätzlich galten für alle Versuche generelle sowie individuelle Abbruchkriterien. Ein genereller Abbruch der Versuche wäre beim Auftreten unerwarteter Nebenwirkungen der beiden verwendeten Arzneimittel erfolgt. Die individuellen Abbruchkriterien wurden wie folgt festgelegt:

1. jederzeit auf Wunsch des Probanden,
2. Körpergewichtsverlust > 5 % des Ausgangsgewichts,
3. Blutdruckabfall > 30 mmHg syst.

2.2 Laborchemische Bestimmungen

Die nachfolgende Tabelle 1 gibt einen Überblick über alle vorgenommenen Bestimmungen. Die einzelnen Nachweismethoden werden in den folgenden Abschnitten näher charakterisiert. Einen besonderen Stellenwert nimmt dabei die Erläuterung des Immunoassays ein, da mit diesem Verfahren quantitative Bestimmungen kleinster Substanzmengen wie die des hier zentralen Vasopressins möglich sind.

Material	Abnahme	Parameter (Nachweis)
Serum	auf Eis, dann 15 min bei 3000 U/min zentrifugiert	Natrium (<i>ionensensitive Elektrode</i>) Kalium (<i>ionensensitive Elektrode</i>) Kreatinin (<i>Jaffé-Reaktion</i>) Aldosteron (<i>RIA</i>) Prednisolon (<i>HPLC</i>)
Plasma (EDTA)	auf Eis dann 15 min zentrifugiert bei 3000 U/min	Osmolalität (<i>Gefrierpunktniedrigung</i>) Renin (<i>RIA</i>) ACTH (<i>CLIA</i>)
Plasma (EDTA) + 10.000 IE Trasylol	auf Eis dann 15 min bei 3000 U/min zentrifugiert	ANP (<i>RIA</i>)
Plasma (Li-Heparin-Gel)	auf Eis, dann 30 min bei 3000 U/min zentrifugiert	Vasopressin (<i>RIA</i>)
Urin		Natrium (<i>ionensensitive Elektrode</i>) Kalium (<i>ionensensitive Elektrode</i>) Kreatinin (<i>Jaffé-Reaktion</i>) Osmolalität (<i>Gefrierpunktniedrigung</i>) u-AQP2 (<i>RIA</i>) PGE2 (<i>EIA</i>)

Tabelle 1: Überblick der laborchemischen Bestimmungen

Alle Blutabnahmen erfolgten mit S-Monovetten® (Sarstedt AG&Co, Nürnberg) nach dem Aspirationsprinzip, um die Abnahmegeschwindigkeit individuell anpassen zu können. Zentrifugiert wurde ausschließlich in der *Thermo Scientific® Zentrifuge* (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Die Bestimmungen der Osmolalitäten (Blut und Urin) erfolgten unmittelbar nach Materialgewinnung. Die Proben für die Bestimmung von ADH und ANP wurden sofort bei -80° C und alle anderen Proben sofort bei -20° C eingefroren. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass so die Messungen später en bloc erfolgen konnten.

2.2.1 Hormonelle Bestimmungen mit Immunoassays

Yalow und Berson entwarfen 1951 erstmals einen Immunoassay in Form eines Radioimmunoassays (RIA) zur Messung von Insulin⁸⁹. Seither gehören Immunoassay in der Bioanalytik zu den beliebtesten Nachweisverfahren von Substanzen geringer Konzentrationen, beispielsweise Hormonen. Zwar wurden in den letzten 50 Jahren verschiedene Detektionstechniken (z.B. Chemolumineszenz, ELISA, RIA, DNA-Labels) sowie Assay-Prinzipien (kompetitiver Assay, nicht-kompetitiver-Sandwich-Assay, direkter Assay) entwickelt, dennoch blieb die Grundlage eines jeden Assays eine Antigen-Antikörper-Reaktion. So lässt sich im Prinzip jede Substanz, gegen die Antikörper (AK) erzeugt werden können, bestimmen. Die jeweils benötigten Antikörper wurden häufig durch Immunisierung von Tieren gewonnen. Seit 1975 können monoklonale Antikörper *in vitro* produziert werden⁹⁰. Ein Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit zur Automatisierung vieler Messungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ADH, ANP, Renin, Aldosteron und u-AQP2 mittels Radioimmunoassays bestimmt. Anhand der gemessenen Radioaktivitäten von bekannten Konzentrationen einer Testsubstanz wurden jeweils Standardkurven ermittelt und dann daraus die unbekannt Konzentrationen abgeleitet. Lediglich ACTH wurde mittels Chemolumineszenz-Immunoassays (CLIA) bestimmt. Die jeweiligen Messbereiche, verwendeten Antikörper, die Intra- und Interassay-Variabilitäten sowie Sensitivität und Spezifität werden nachfolgend im Einzelnen beschrieben.

2.2.1.1 ADH-Bestimmung aus Heparin-Plasma

Da die möglichst akkurate Messung der Vasopressinkonzentration im Plasma essentiell zur Beantwortung der zugrundeliegenden Fragestellung ist, wurde kein kommerzieller Kit verwendet, sondern ein hochempfindlicher RIA nach Morton et al.⁹¹ durchgeführt. Verdeutlicht wird die Überlegenheit dieser Methode beim Vergleich der unteren Nachweisgrenze, die im hier durchgeführten RIA bei 0,4 pg/ml lag und vom Marktführer für seinen kommerziellen *Arg8 EIA Kit* (Assay Designs, Inc. Ann Arbor, MI, USA) mit 4,1 pg/ml angegeben wird. Die einzelnen Arbeitsschritte werden nachfolgend beschrieben.

Nach Blutentnahme von jeweils zwei Ammonium-Heparinat-Monovetten wurden diese sofort auf Eis gekühlt und anschließend in der Kühlzentrifuge (diese wurde vorher bereits auf 4°C vorgekühlt) für 20 min mit 3000 U/min zentrifugiert. Die relativ lange

Zentrifugationszeit und das Stehenlassen des ersten 1 cm vom Plasmaüberstand (über den zellulären Bestandteilen) beim anschließenden Abpipettieren, sollten dabei eine unerwünschte Mitbestimmung des an Thrombozyten gebundenen ADH verhindern⁹². Das Plasma wurde in 1,5 ml Portionen aliquotiert und bei -80 ° C gelagert.

Nach Auftauen bei Raumtemperatur wurden die Plasma-Proben erneut für 5 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Für die nun folgende Extraktion wurden die verwendeten *Sep-Pak® C-18-Kartusche* (Water Associates, Milford, MA, USA) erst mit 4 ml Methanol und dann mit 5 ml H₂O aktiviert. Zur besseren Handhabung wurden einfache Trichter als Einführhilfen verwandt. Nun wurde jede Kartusche mit 1 ml Plasma beschickt und das Volumen mit Hilfe einer Vakuumpumpe (Waters, Milford, MA, USA) bei ca. 15 mmHg durch den Filter der Kartuschen gezogen.

Anschließend wurden die Kartuschen mit 5 ml 1 %-Essigsäure gereinigt, bevor aus jeder Kartusche mit 2,2 ml Methanol das ADH eluiert wurde. Bei Raumtemperatur wurde nun das Methanol des Eluats verblasen. Der Rückstand wurde jetzt in 150 µl eines zuvor hergestellten TRIS-Puffers (50 mmol/l, pH 7,4) gelöst und erneut für fünf Minuten zentrifugiert. Der Vorteil dieses Zwei-Komponenten-Puffers besteht darin, dass er Proteine nicht in ihren Reaktionen beeinflusst.

Je Probe wurden nun zweimal 50 µl in ein neues Röhrchen pipettiert, sodass eine Doppelwertbestimmung möglich wurde. Es folgten die Zugabe von 50 µl ADH-Thyroglobin-AK (Dr. Morton, MRC Blood Pressure Unit, Glasgow, Schottland - Titer 1:25000) sowie 50 µl radioaktiv markiertem 3-¹²⁵I-Tyrosylol-Vasopressin (Amersham International, Buckinghamshire, England, verdünnt auf ca. 1000 cpm/50 µl) als Tracer. Der AK wurde in Kaninchen durch Immunisierung mit an Rinder-Thyreoglobulin gebundenem Vasopressin gewonnen⁹³. Im gleichen Arbeitsschritt wurden ebenfalls die ADH-Proben für die Standardkurve verdünnt (8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 und 0 pg Vasopressin/ Röhrchen) und mit den identischen Zugaben versehen. Alle Proben wurden erneut gemischt, mit Folie verschlossen und bei 4 ° C für 24 h inkubiert.

Nach entsprechender Inkubation wurde zu den radioaktiven Proben jeweils 1 ml des gekühlten Trennreagenz (1 %-Dextrancoated-Charcoal-Lösung) gegeben, um das freie Vasopressin zu adsorbieren und vom AK-gebundenen Vasopressin zu trennen. Es folgte eine erneute zehnmünütige Zentrifugation bei 3000 U/min. Sofort im Anschluss wurde der Überstand von Hand dekantiert. Bei diesem Arbeitsschritt war besondere Eile geboten, da für die Trennung nur ein sehr begrenztes Zeitfenster von wenigen Minuten

zur Verfügung stand. Lässt man zu viel Zeit verstreichen, wirkt das Trennreagenz nicht mehr ausreichend.

In einem letzten Arbeitsschritt konnte jetzt mit Hilfe des automatischen Gamma-Counters *Wizard-1470®* (Perkin Elmer, Rodgau früher Bertold) die verbliebene Vasopressin-Konzentration unter Messung der Radioaktivität in counts per minute anhand der jeweiligen Standardkurven ermittelt werden. Da in jedem Ansatz zur Kontrolle auch zwei Vasopressin-Proben des hauseigenen ADH-Pools mit bekannten Konzentrationen von Anfang an mitliefen, konnten je Assay nur maximal 10 Probanden-Proben bestimmt werden. Alle Proben wurden als „echte“ Doppelwerte ermittelt, sodass aus jeweils vier Ergebnissen am Ende der Mittelwert bestimmt werden konnte.

Die Intraassay-Variabilität betrug 4,9 % und die Interassay-Variabilität 8,8 %. Die Nachweisgrenze lag bei 0,4 pg/ml ADH im Plasma.

2.2.1.2 Renin-Bestimmung aus EDTA-Plasma

Verwendet wurde der kommerzielle Kit *Renin III. Generation Model 12* (Cisbio International Bioassays, Bagnols-sur-Cèze 30200, Frankreich). Gemessen wurde hierbei nur das aktive Renin. In der Sandwich-Technik wurden paarweise monoklonale Anti-Humanrenin-AK von der Maus verwendet, wobei die nicht ans Röhrchen gebundenen AK mit Jod^{125} markiert waren. Der Puffer bestand aus einer Tris-HCl-Lösung (pH 7,9), die Pferdeserum und Natriumazid (0,1 %) enthält. Der Messbereich des Assays lag zwischen 1-320 ng/l, wobei die funktionale Empfindlichkeit bei 5 ng/l lag. Die durchschnittliche Intraassay-Variabilität lag bei 1,8 % und die Interassay-Variabilität bei 4,1 %. Die Spezifität war sehr hoch, lediglich mit Hämoglobin werden leichte Interferenzen beobachtet. Aus diesem Grund wurde mittels Augenmaß darauf geachtet, keine hämolytischen Proben zu verwenden. Der Referenzbereich bei gesunden jungen Männern liegt im Liegen zwischen 2,5-25,8 ng/l Renin im Plasma.

2.2.1.3 Aldosteron-Bestimmung aus Serum

Aldosteron wurde mittels des kommerziellen Festphasen RIA *Coat-A-Count® Aldosteron* (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA 90045, USA) gemessen. Dabei erfolgt eine direkte quantitative Bestimmung mit Hilfe von ^{125}I -markiertem Aldosteron, das eine vorgegebene Zeit mit dem Aldosteron im Serum der Probanden um die Bindung der im Teströhrchen enthaltenen spezifischen AK

konkurrierte. Der Messbereich dieses RIA lag zwischen 25-1200 ng/l, wobei die Nachweisgrenze in den hier erfolgten Messungen bei 27 ng/l lag. Es war von einer mittleren Intraassay-Variabilität von 3,3 % und einer mittleren Interassay-Variabilität von 8,3 % auszugehen. Die Spezifität wird mit nahezu 100 % angegeben. Der Referenzbereich bei gesunden jungen Männern liegt bei Blutentnahme im Liegen zwischen 10-160 ng/l Aldosteron im Serum, nach einer mindestens 30-minütigen Ruhephase. In aufrechter Position liegt er mit 40-310 ng/l Aldosteron deutlich höher.

2.2.1.4 ANP-Bestimmung aus EDTA-Plasma

Vor der Abnahme des Plasmas für die ANP-Bestimmungen erfolgte jeweils eine Zugabe von 10 µg (10.000 IE) Aprotinin (Trasylol® Bayer AG, Leverkusen), um die Serinprotease Plasmin zu hemmen. Aus dem zuvor bei -80°C gelagerten Plasma wurde ANP dann mittels einer *Sep-Pak® C-18-Kartusche* (Water Associates, Milford, MA, USA) aus dem Plasma extrahiert, analog zu Pedersen et al.⁹⁴. Die hier verwendeten Anti-ANP-AK stammten vom Hasen und wurden von der Abteilung für Klinische Chemie des Bispebjerg-Hospitals in Dänemark geliefert. Die Nachweisgrenze dieses RIA lag bei 0,5 pmol/l mit einer Intraassay-Variabilität von 10 % und einer Interassay-Variabilität von 12 %.

2.2.1.5 ACTH-Bestimmung aus EDTA-Plasma

ACTH wurde mittels des vollautomatischen Chemolumineszenz-Immunoassays *Immulite 2000* (Siemens Medical Solutions Diagnostics, München; früher DPC, Los Angeles, CA 90045, USA) gemessen. Das Testprinzip beruht auch hier auf einer Antigen-AK-Reaktion, die im Rahmen eines sequentiellen heterogenen nicht-kompetitiven Assays abläuft. Das zugrunde liegende Detektionsprinzip ist die Chemolumineszenz. Dabei zerfällt eine energiereiche Verbindung unter Lichtemission in ein energieärmeres Endprodukt. Die verwendeten monoklonalen ACTH-AK stammten von der Maus. Der Messbereich umfasste Werte bis 1250 pg/ml (278 pmol/l) und die analytische Sensitivität betrug 5 pg/ml (1,1 pmol/l). Die Intraassay-Variabilität betrug 7,7 % und die Interassay-Variabilität lag bei 8,5 %. Der Test war hochspezifisch für ACTH.

2.2.2 Bestimmung von Plasma- und Urinosmolalitäten

Die Osmolalität von Plasma- und Urinproben wurde mit Hilfe des digitalen *Osmomat® 030* (Gonotec GmbH, Berlin) nach dem Prinzip der Gefrierpunktniedrigung ermittelt. Diese Messung macht sich ein chemisches Phänomen zu nutze: Die Gefrierpunkte von wässrigen Lösungen (hier Plasma und Urin) niedriger liegen als die von reinen Flüssigkeiten (hier Aquadest). Entscheidend ist, dass die Erniedrigung mittels einer kryoskopischen Konstante ($-1,858^{\circ}\text{C}$ pro 1 osmol/kg H_2O) berechnet werden kann, die nur vom Lösungsmittel und nicht vom gelösten Stoff abhängt. Somit ist die Gefrierpunktniedrigung von Plasma und Urin (näherungsweise) direkt proportional zu ihrer Molalität⁹⁵.

Bei Raumtemperatur wurden 50 μg jeder Probe in ein sauberes Messgefäß pipettiert und dann mittels Peltier-Element bis zu einem vorgegebenen Wert unterkühlt, ohne dass die Lösung gefror. Dann wurde automatisch eine kalte Glasnadel eingetaucht und so die Eisbildung eingeleitet. Die Temperatur der Probe stieg nun bis zum Gefrierpunkt wieder an, wobei sich ebenda in der Abkühlungskurve ein Wendepunkt von einigen Sekunden Dauer zeigte. Dieser Wendepunkt (bzw. Plateau bei destilliertem Wasser) wurde registriert und mit der kryoskopischen Konstante verrechnet. Auf der Digitalanzeige konnte jetzt die Osmolalität in mOsmol/kg H_2O abgelesen werden. Vor der nächsten Messung musste die Glasnadel kurz abgewischt werden.

Da die Messungen der Osmolalitäten jeweils direkt im Anschluss an die Probengewinnung vorgenommen wurden, erfolgte zur Sicherstellung der Genauigkeit in regelmäßigen Abständen eine Zweipunktkalibrierung. Nach 0-Punkt-Bestimmung mit destilliertem Wasser wurde mit Hilfe einer Standardlösung von 300 mOsmol/kg der zweite Messpunkt überprüft und gegebenenfalls eine Eichung vorgenommen. Die Messungen wurden jeweils dreimal wiederholt, bevor anschließend der Mittelwert gebildet wurde.

2.2.3 Prednisolon-Bestimmungen aus Serum

Zur Kontrolle der Compliance bezüglich der Medikamenteneinnahme wurde die Serum-Prednisolon-Konzentration im Labor von Prof. Kleuser (Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin) bestimmt. Die Bestimmung erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wie beschrieben von Gysler et al.⁹⁶. Verwendet wurde das *LaChrom HPLC* System (Merck Pharma GmbH, Frankfurt). Die UV-Messung

erfolgt bei 254 nm. HPLC ist eine analytische Methode, die auf einem chromatografischen Trennverfahren zur Quantifizierung von Stoffen basiert. Als interner Vergleichsstandard diente hier Betamethason. Alle Bestimmungen wurden als Doppelwerte vorgenommen, die Intraassay-Variabilität lag bei 10 % und die Interassay-Variabilität bei 16 %.

2.2.4 Elektrolyte aus Serum und Urin

Die beiden Kationen Natrium und Kalium wurden sowohl im Serum als auch im Urin mittels indirekt messenden ionensensitiven Elektroden bestimmt. Diese elektrochemischen Halbzellen bestimmen die auftretende elektrische Spannung zwischen der verwendeten Messlösung und dem jeweiligen elektrochemisch aktiven Elektronenmaterial⁹⁷. Für gesunde junge Erwachsene gelten nach dieser Methode ein Natrium von 134-145 mmol/l und ein Kalium von 3,4-5,2 mmol/l als Referenzwerte im Serum. Sowohl die Natrium- als auch die Kaliumausscheidung im Urin unterliegen physiologischer Weise großen Schwankungen in Kombination mit einer circadianen Rhythmik. Daher gibt es keine allgemeingültigen Referenzwerte, sondern alle Werte müssen immer aus dem konkreten Kontext heraus interpretiert werden.

2.2.5 Kreatinin aus Serum und Urin

Die Messung erfolgte mit *COBAS Integra® 400* (Roche Diagnostics AG, Schweiz). Diese Methode basiert auf einem erstmals von Max Jaffé (1841-1911) beschriebenen kinetischen Farbstest. Kreatinin und Pikrinsäure bilden einen gelb-orangen Komplex, der eine photometrische kinetische Messung ermöglicht⁹⁸. Die Kreatinin-Clearance im Plasma und damit näherungsweise die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) wurde mit der gängigen von Cockcroft und Gault entwickelten Formel berechnet:

$$\text{Kreatinin-Clearance (ml/min)} = \frac{(140 - \text{Lebensjahre}) \times \text{Körpergewicht}}{0,82 \times \text{Serum-Kreatinin } (\mu\text{mol/l})}$$

2.2.6 U-Aquaporin-2 im Urin

Die Bestimmung des u-AQP2 erfolgte im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Pedersen (Department of Medicine, Holstebro Hospital, Denmark). Verwendet wurde ein RIA, dessen verwendete Hasen-AK (LL358) von Prof. Nielsen (Department of Cell Biology,

Aarhus University) synthetisiert wurden. Die Extraktion des verwendeten ^{125}I -markierten AQP2 wurde mittels Gelfiltration an einer Sephadex® G-10 Kolonne (GE-Healthcare Deutschland, München) vorgenommen. Alle weiteren Schritte erfolgten analog zu Pedersen et al.⁸⁶.

2.2.7 Prostaglandin E2 im Urin

Die Bestimmung von Prostaglandin E2 im Urin wurde mit dem kommerziellen hochsensitiven *PGE2 High Sensitivity EIA KIT* (Assay Designs, Inc. Ann Arbor, MI, USA) vorgenommen. Dieser kompetitive Enzymimmunoassay (EIA) zeichnet sich durch eine sehr hohe Verlässlichkeit und relative einfache Handhabung aus. Der Kit enthält monoklonale PGE2-AK von der Maus. Nach einer festgelegten Inkubationszeit wurde die ablaufende Enzymreaktion gestoppt und die erzeugte Gelbfärbung von einem Mikroplatten-Reader bei 405 nm Wellenlänge abgelesen. Dabei war die Intensität umgekehrt proportional zur PGE2-Konzentration im Urin. Der Messbereich dieses hochsensitiven Assays lag zwischen 7,8-1000 pg/ml bei einer Sensitivität von 8,26 pg/ml. Die Interassay-Variabilität betrug 10,9 % und die Intraassay-Variabilität 6,3 %.

2.3 Auswertung der Daten

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte am Computer mit Hilfe von Microsoft Excel® 2003, der Statistiksoftware SPSS® Version 16.0 für Windows (Chicago, USA) und dem Graphikprogramm SigmaPlot® 2001. Alle erhobenen Daten wurden ausschließlich pseudonymisiert im Rahmen der geltenden Dokumentations- und Mitteilungspflichten an Dritte weitergegeben.

Die Variablen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Für nicht normal verteilte Variablen wurde der Wilcoxon-Test, für alle normal verteilten Variablen der Student's T-test verwendet. Korrelationen wurden mittels Test nach Pearson berechnet. Die Fläche unter der Kurve (AUC) wurde mittels der Trapezmethode berechnet. Als statistisch signifikant wurde ein α -Fehler (p-Wert) von $\leq 0,05$ betrachtet, was einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\leq 5\%$ entspricht. Unter hoch signifikant werden Ergebnisse verstanden, die einen α -Fehler von $\leq 0,001$ und somit eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\leq 0,1\%$ haben. Wenn nicht anders gekennzeichnet, sind alle Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardfehler (MW \pm SEM) angegeben.

3 Ergebnisse

Sämtliche Durstversuche konnten im Zeitraum von 12/2006 bis 03/2007 komplikationslos durchgeführt werden. In keinem Fall musste ein Durstversuch vorzeitig abgebrochen werden. Es traten keine klinischen Auffälligkeiten der 12 gesunden männlichen Probanden im Anschluss an die Versuche auf.

3.1 Einfluss der Glucocorticoideinnahme auf relevante Blutparameter während des Durstversuchs

Sämtliche Blutentnahmen konnten bei allen Probanden zu den vorgesehenen Abnahmezeitpunkten (08.00, 10.00, 12.00, 14.00 und 16.00 Uhr) regelrecht erfolgen. 11 der 12 Probanden entschieden sich für den Einsatz von Venenverweilkanülen.

3.1.1 Plasma-ADH und Plasmaosmolalität

Am ersten Versuchstag lag der morgendliche ADH-Basalwert um 08.00 Uhr bei 5 der 12 Probanden über der Nachweisgrenze des Assays (0,4 pg/ml) mit einem Mittelwert von 0,45 pg/ml und einem Standardfehler von 0,09 pg/ml. Während des Durstversuchs stieg ADH im Plasma bei allen 12 Probanden an. Bereits um 10.00 Uhr konnte bei sämtlichen Probanden ein Wert oberhalb der Nachweisgrenze gemessen werden. Nach achtstündigem Dursten lag das ADH um 16.00 Uhr bei $1,79 \pm 0,15$ pg/ml. Für alle Ergebnisse unterhalb der Nachweisgrenze wurde in statistischen Berechnungen ein Wert von 0,39 pg/ml angenommen. Gegen die ebenfalls mögliche Verteilung von Zufallsvariablen im Bereich von 0 bis $< 0,4$ pg/ml sprach die zugrunde liegende Physiologie.

Die Einnahme des Prednisolons hatte einen signifikanten Einfluss sowohl auf den Basalwert als auch den Verlauf des ADH-Plasma-Spiegels im Durstversuch. Am ersten Tag der Prednisoloneinnahme lag der 08.00 Uhr Wert bei allen Probanden unterhalb der Nachweisgrenze des RIA und war damit niedriger als bei der Vergleichsuntersuchung ohne Einnahme von Prednisolon. Unter Prednisoloneinnahme blieb der Anstieg des ADH im Verlauf des Durstversuches aus. Der 16.00 Uhr Wert war nach einem Tag unter Prednisolon hoch signifikant niedriger als am basalen Versuchstag ($p < 0,001$).

Nach fünf Tagen unter oraler Einnahme von 30 mg/d Prednisolon lag das morgendliche Plasma-ADH bei 11 von 12 Probanden unterhalb der Nachweisgrenze. Analog zum ersten Tag unter Prednisoloneinnahme zeigte sich auch nach fünf Tagen unter Glucocorticoideinnahme kein signifikanter Anstieg während des Durstens. Lediglich bei einem Probanden konnte um 16.00 Uhr mit einem ADH-Wert von 0,5 pg/ml ein Wert innerhalb der Nachweisempfindlichkeit gemessen werden. Im Vergleich zum basalen Versuchstag waren die 16.00 Uhr Werte hoch signifikant niedriger ($p < 0,001$). Die Dauer der Prednisoloneinnahme hatte keinen Einfluss auf die Supprimierung des Plasma-ADH.

Am basalen Versuchstag wurden zu jeder der fünf Blutentnahmen (08.00, 10.00, 12.00, 14.00, 16.00 Uhr) die ADH-Werte im Plasma bestimmt. An den folgenden Versuchstagen wurden zunächst bei zwei Probanden alle Werte bestimmt. Da jedoch sämtliche Werte unterhalb der Nachweisgrenze lagen, wurde bei den übrigen Probanden auf die Bestimmungen der Zwischenwerte verzichtet und das Plasma-ADH lediglich vor und nach achtstündigem Dursten ermittelt (siehe [Abbildung 2](#)).

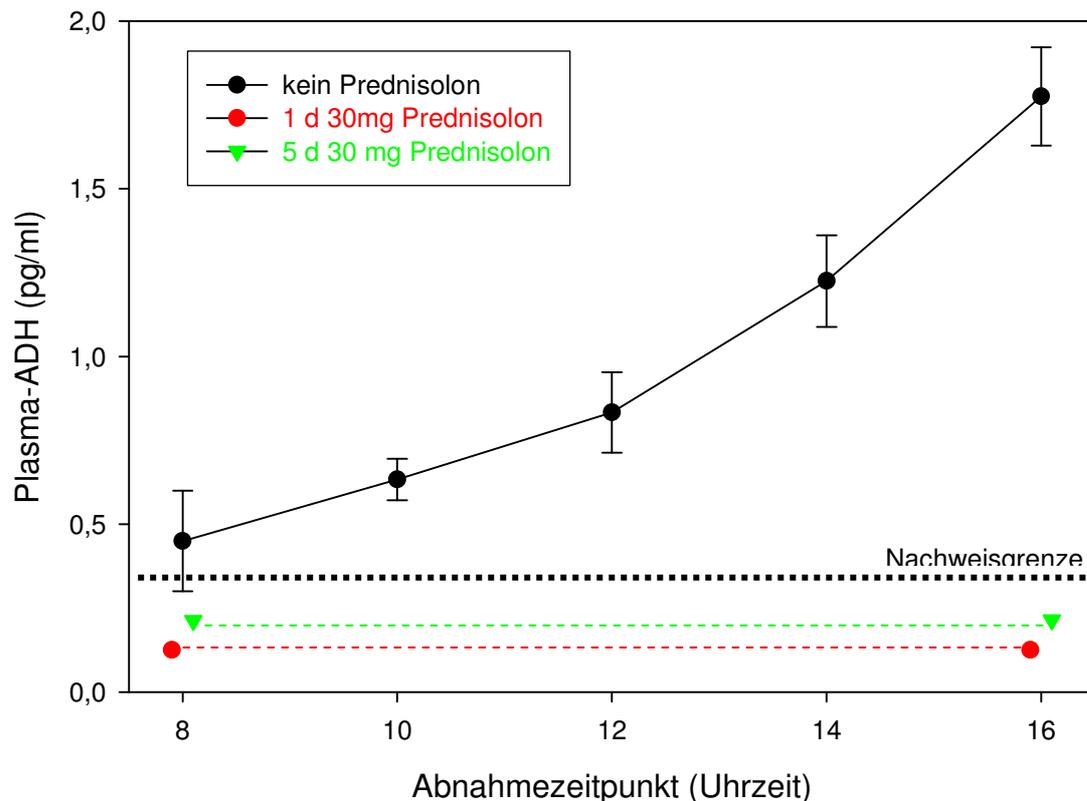


Abbildung 2: Plasmakonzentration von ADH in pg/ml während des Durstens. Dargestellt sind die MW \pm SEM der 12 gesunden männlichen Probanden an allen drei Versuchstagen (ohne PD schwarz, nach 1 d 30 mg PD rot und nach 5 d 30 mg PD grün). Zur besseren Übersicht wurden die Werte unterhalb der Nachweisgrenze nebeneinander dargestellt, was nicht notwendiger Weise ihrer wirklichen Verteilung entspricht.

Während des Durstens kam es zu einem Anstieg der Plasmaosmolalität. Diese lag im basalen Durstversuch um 08.00 Uhr morgens bei $281,8 \pm 0,74$ mOsmol/kg und stieg hoch signifikant auf $290,2 \pm 1,15$ mOsmol/kg an ($p < 0,001$). Es konnte bei allen 12 Probanden ein Anstieg verzeichnet werden.

Am ersten Tag der Prednisoloneinnahme lag die morgendliche Plasmaosmolalität bei $278,92 \pm 0,85$ mOsmol/kg und stieg erneut bei allen Probanden durch Dursten hoch signifikant auf $288,75 \pm 0,89$ mOsmol/kg an ($p < 0,001$).

Auch nach 5 Tagen Prednisoloneinnahme stieg die Plasmaosmolalität im Durstversuch von morgendlichen $280,17 \pm 0,81$ mOsmol/kg hoch signifikant auf $290 \pm 0,95$ mOsmol/kg an ($p < 0,001$). Die Anstiege sind in Tabelle 2 dargestellt. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede der Anstiege zwischen den Versuchstagen mit und

ohne Prednisoloneinnahme. Die Abbildung 3 zeigt das Nomogramm der Plasmaosmolalität bezogen auf das jeweilige Plasma-ADH. In Anlehnung an Robertson u. Ganguly⁹⁹ wurde durch Messreihen in unserer Abteilung das normale Verhältnis von ADH und Plasmaosmolalität ermittelt. in Abbildung 3 wird das normale Verhältnis durch einen Korridor grauer Linien dargestellt.

	Anstieg P-Osmolalität MW (mOsmol/kg)	Anstieg P-Osmolalität SEM (mOsmol/kg)	Prozentuale Änderung des MW 08.00 zu 16.00 Uhr	Anstieg P-Osmolalität Range (mOsmol/kg)	Signifikanz des Anstiges
Basaler Durstversuch	10,67	± 0,52	+ 8,1 %	7-13	p < 0,001
1d 30mg Prednisolon	9,83	± 0,75	+ 8,1 %	6-16	p < 0,001
5d 30mg Prednisolon	9,84	± 0,69	+ 8,1 %	6-16	p < 0,001

Tabelle 2: Anstieg der Plasmaosmolalität (mOsmol/kg) von 08.00 bis 16.00 Uhr an allen drei Versuchstagen bei 12 gesunden männlichen Probanden.

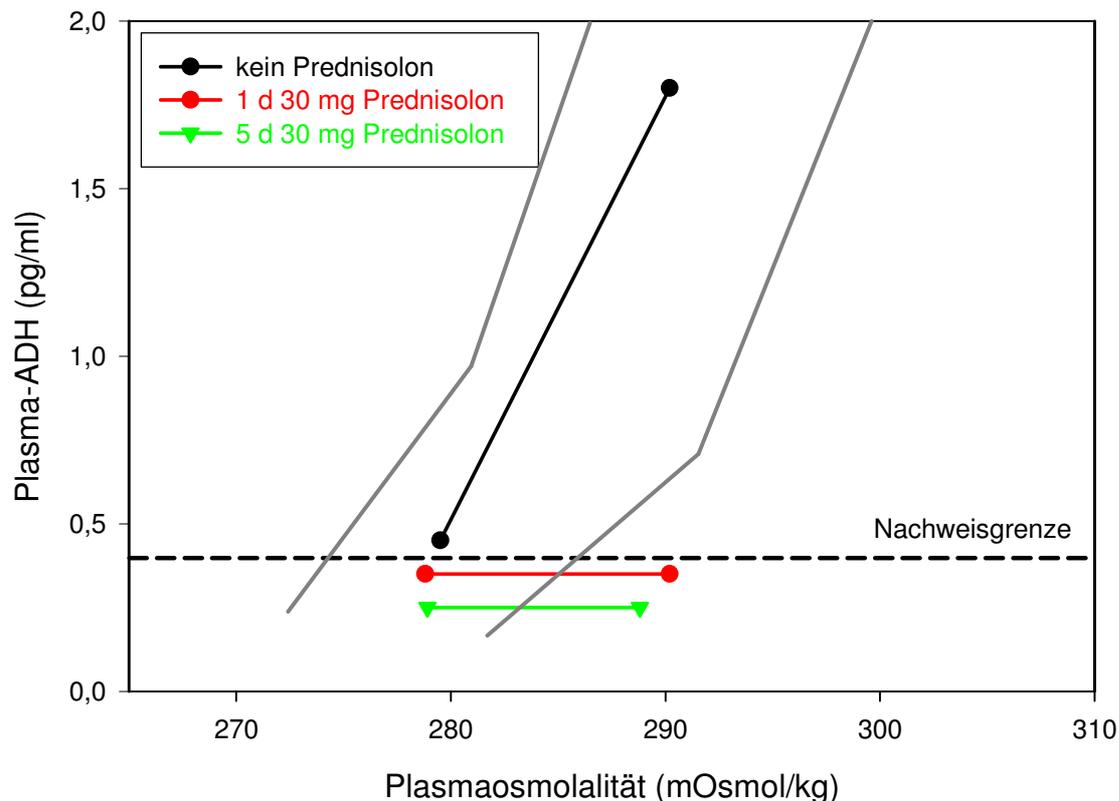


Abbildung 3: Nomogramm von ADH (pg/ml) bezogen auf die Plasmaosmolalität (mOsmol/kg). Dargestellt sind MW jeweils von 08.00 und 16.00 Uhr bei 12 gesunden männlichen Probanden an allen drei Versuchstagen (ohne PD in schwarz, nach 1 d 30 mg PD in rot und nach 5 d 30 mg PD in grün). Zur besseren Übersicht wurden die Werte unterhalb der Nachweisgrenze nebeneinander dargestellt, was nicht notwendiger Weise ihrer wirklichen Verteilung entspricht.

3.1.2 Elektrolyte im Serum und Kreatinin-Clearance

Zu allen Messzeitpunkten wurden die Natrium- und Kaliumkonzentrationen im Serum bestimmt. Zu Beginn des basalen Versuchstages lag die Natriumkonzentration bei $135,2 \pm 0,5$ mmol/l. Während des Durstens kam es lediglich bei 5 Probanden zu einem Anstieg der Natriumspiegel, bei 7 Probanden fiel der Wert leicht ab. Diese Änderungen zeigen sich nicht im 16.00 Uhr Wert von $135,2 \pm 0,6$ mmol/l.

An beiden Versuchstagen unter Prednisoloneinnahme stieg die Natriumkonzentration im Serum während des Durstens an. Vergleicht man die Ausgangswerte um 08.00 Uhr mit den letzten Bestimmungen um 16.00 Uhr des jeweiligen Versuchstages, so ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Allerdings lässt sich für beide Versuchstage unter

Prednisolon eine tendenzielle Zunahme der Serumkonzentration von Natrium feststellen ($p = 0,070$ für 1 Tag PD und $p = 0,06$ für 5 Tage PD), siehe dazu Abbildung 4.

Vergleicht man die Flächen unter den Kurven (AUC), so war die AUC am basalen Versuchstag signifikant ($p = 0,010$) höher als am ersten Tag der Medikamenteneinnahme. Zwischen den anderen Versuchstagen fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

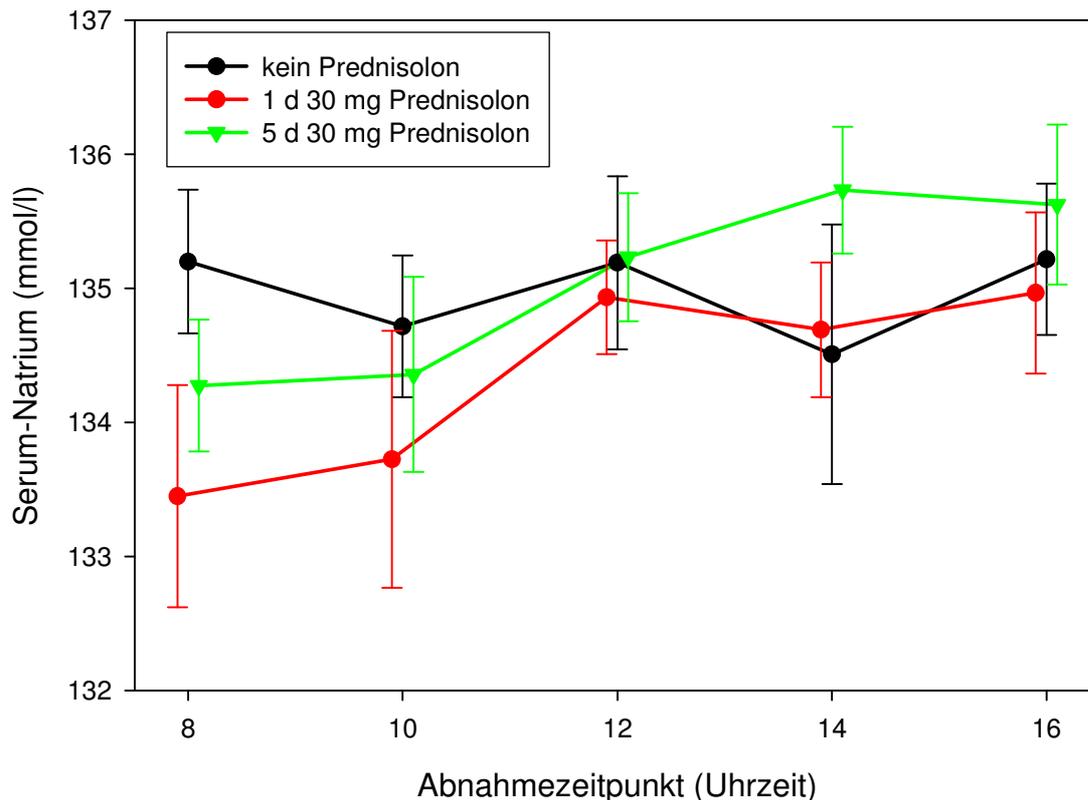


Abbildung 4: Verlauf der Natriumkonzentration im Serum (mmol/l) während des Durstens. Dargestellt sind die MW \pm SEM der 12 gesunden männlichen Probanden an allen drei Versuchstagen (ohne PD schwarz, nach 1 d 30 mg PD rot und nach 5 d 30 mg PD grün).

Als zweites Serumelektrolyt wurde Kalium bestimmt. Bei Betrachtung der Abbildung 5 wird deutlich, dass die Ausgangs- und Endwerte der Kaliumkonzentration am basalen Versuchstag nahezu identisch waren, während unter Glucocorticoideinnahme eine tendenzielle Zunahme zu verzeichnen war. Am basalen Versuchstag konnte lediglich bei 6 Probanden ein Kaliumanstieg durch Dursten registriert werden ($+0,12 \pm 0,09$ mmol/l). Am ersten Tag der Medikamenteneinnahme wurde bereits bei 9 Probanden ein steigendes Kalium ermittelt, was einer Zunahme des Kaliumspiegels um

+0,29 ± 0,09 mmol/l entsprach. Nach fünf Tagen Prednisoloneinnahme wurde bei allen 12 Probanden ein Anstieg sichtbar (+0,52 ± 0,07 mmol/l). Der Anstieg nach fünf Tagen Prednisolon ist signifikant höher als ohne Medikamenteneinnahme ($p = 0,001$) und signifikant höher als am ersten Tag der Medikamenteneinnahme ($p = 0,010$). Am basalen Versuchstag wurde bei der 08.00 Uhr Messung bei einem klinisch unauffälligen Probanden mit intakter Nierenfunktion ein Kaliumwert von 6,9 mmol/l ermittelt (Referenzbereich: 3,4 – 5,2 mmol/l). Da alle übrigen Werte dieses Probanden zwischen 3,3 und 4,2 mmol/l lagen, wurde dieser Wert als Fehlbestimmung gewertet und aus der Statistik ausgeschlossen. Ferner ist es sehr unwahrscheinlich, dass ein solch hoher Wert von einem Gesunden symptomlos toleriert wird.

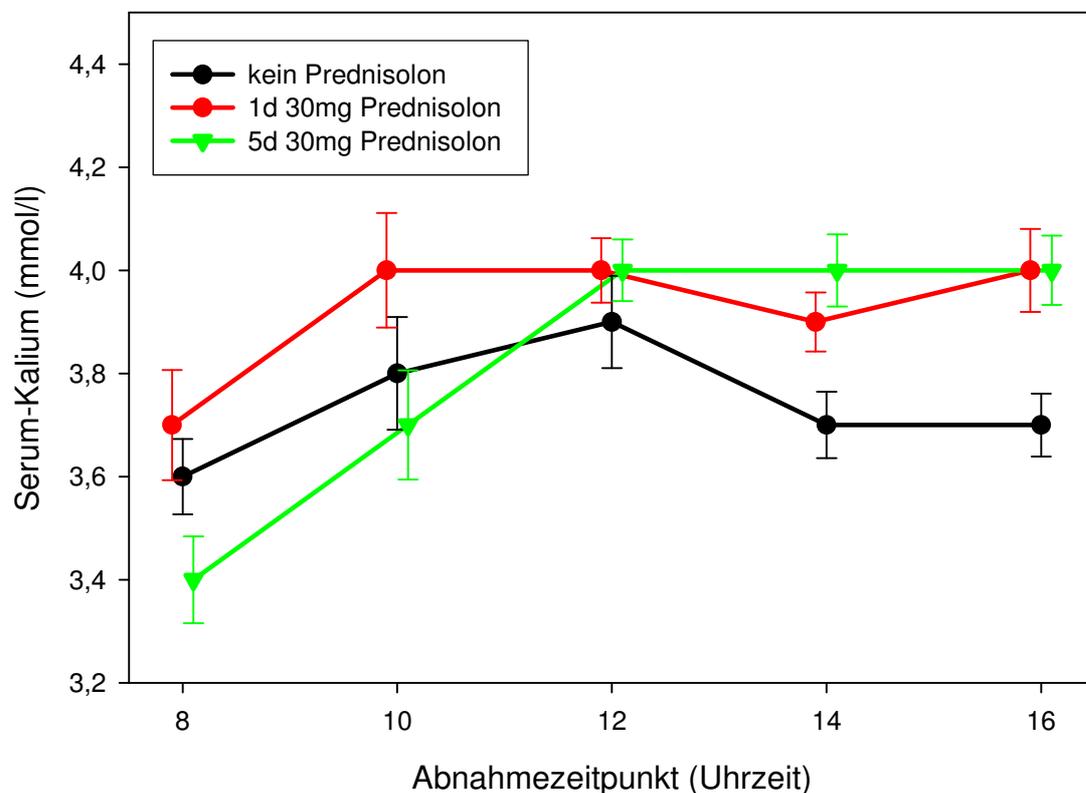


Abbildung 5: Verlauf der Kaliumkonzentration im Serum (mmol/l) während des Durstens. Dargestellt sind MW ± SEM der 12 gesunden männlichen Probanden an allen drei Versuchstagen (ohne PD schwarz, nach 1 d 30 mg PD rot und nach 5 d 30 mg PD grün).

Die Kreatinin-Clearance im Plasma als ungefähres Maß für die glomeruläre Filtrationsrate blieb sowohl vom Dursten als auch von der Prednisoloneinnahme

unbeeinflusst. Bei keinem Probanden lag sie außerhalb des Referenzbereiches von 90 bis 130 ml/min (siehe Abbildung 6).

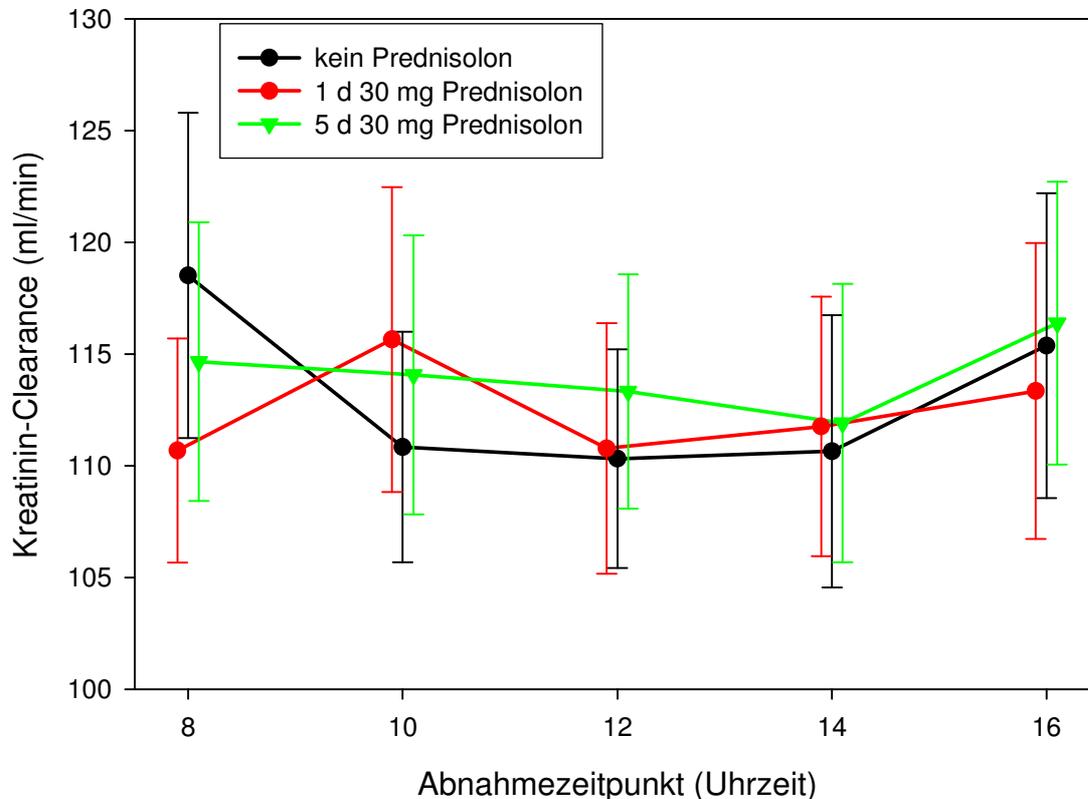


Abbildung 6: Plasma-Kreatinin-Clearance (ml/min) während des Durstens. Dargestellt sind MW \pm SEM bei 12 gesunden männlichen Probanden an allen drei Versuchstagen (ohne PD schwarz, nach 1 d 30 mg PD rot und nach 5 d 30 mg PD grün).

3.1.3 ANP im Plasma

Unter Prednisolon lagen sämtliche Plasmaspiegel des Atrialen Natriuretischen Peptids über denen am basalen Versuchstag. Im basalen Durstversuch lag der Mittelwert des Plasma-ANP um 08.00 Uhr morgens bei $8,9 \pm 0,6$ pmol/l, am ersten Tag der Prednisoloneinnahme stieg dieser Wert auf $9,4 \pm 0,9$ pmol/l und am fünften Tag der Prednisoloneinnahme stieg er auf $11,6 \pm 1,7$ pmol/l (siehe Abbildung 7). In Abbildung 8 sind die AUCs des Plasma-ANP im direkten Vergleich dargestellt.

Die Veränderung des ANP im Plasma korrelierte nicht mit der in Abschnitt 3.1.2 gezeigten Veränderung von Natrium oder Kalium im Urin ($r_{(\text{Natrium})} = 0,321$; $r_{(\text{Kalium})} = 0,415$).

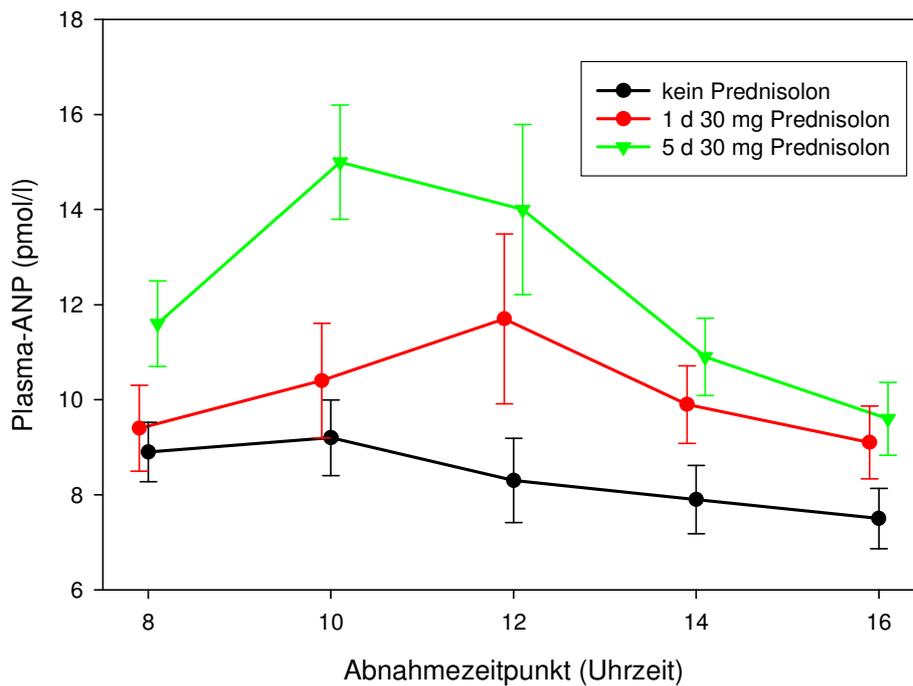


Abbildung 7: ANP-Konzentration im Plasma (pmol/l) während des Durstens. Dargestellt sind MW \pm SEM von 12 gesunden männlichen Probanden an allen drei Versuchstagen (ohne PD in schwarz, nach 1 d mit 30 mg PD oral in rot und nach 5 d mit 30 mg PD oral in grün).

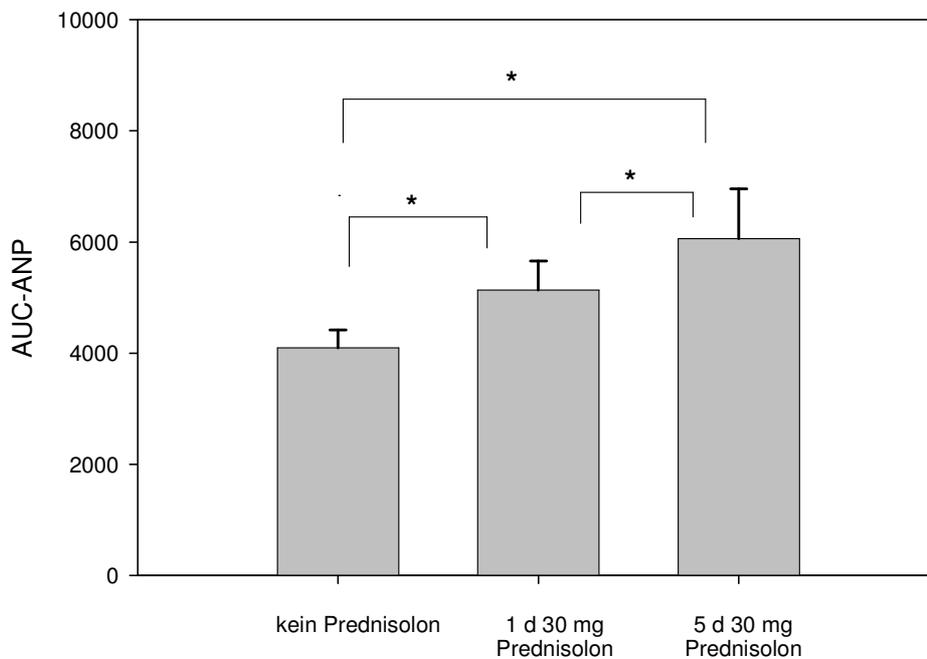


Abbildung 8: AUC-ANP während des Durstens. Dargestellt sind MW \pm SEM mit n = 12 für alle drei Versuchstage.
*: signifikant mit p < 0,05

3.1.4 Renin und Aldosteron

Am basalen Versuchstag kam es während des Durstens zu keinen signifikantem Veränderungen der Reninkonzentrationen im Plasma. Um 08.00 Uhr lag die Reninkonzentration bei $15,36 \pm 3,15$ ng/l und bei der letzten Messung um 16.00 Uhr mit $13,80 \pm 2,10$ ng/l leicht darunter. Bei keinem der Probanden wurde ein Wert außerhalb des Referenzbereiches (2,5-25,8 ng/l) gemessen.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Reninspiegel unter Prednisoloneinnahme. Die Einnahme des Glucocorticoids erhöhte die Plasmareninkonzentration signifikant. Am ersten Tag der Prednisoloneinnahme stieg die Reninkonzentration während des Durstens signifikant von $13,22 \pm 1,54$ ng/l auf $33,66 \pm 5,25$ ng/l an ($p = 0,001$). Um 16.00 Uhr hatten 7 der 12 Probanden eine Reninkonzentration im Plasma oberhalb des Referenzbereiches.

Am fünften Tag der Glucocorticoideinnahme kam es ebenfalls zu einem signifikantem Anstieg ($p = 0,020$) der Reninkonzentration im Plasma der Probanden. Die Bestimmung um 16.00 Uhr lieferte einen Reninwert von $27,71 \pm 5,12$ ng/l, wobei 6 von 12 Probanden Werte oberhalb des Referenzbereiches boten (siehe Abbildung 9).

Betrachtet man die AUCs an den drei Versuchstagen, so waren die AUCs unter Prednisolon jeweils signifikant höher als ohne Medikamenteneinnahme (siehe Abbildung 10).

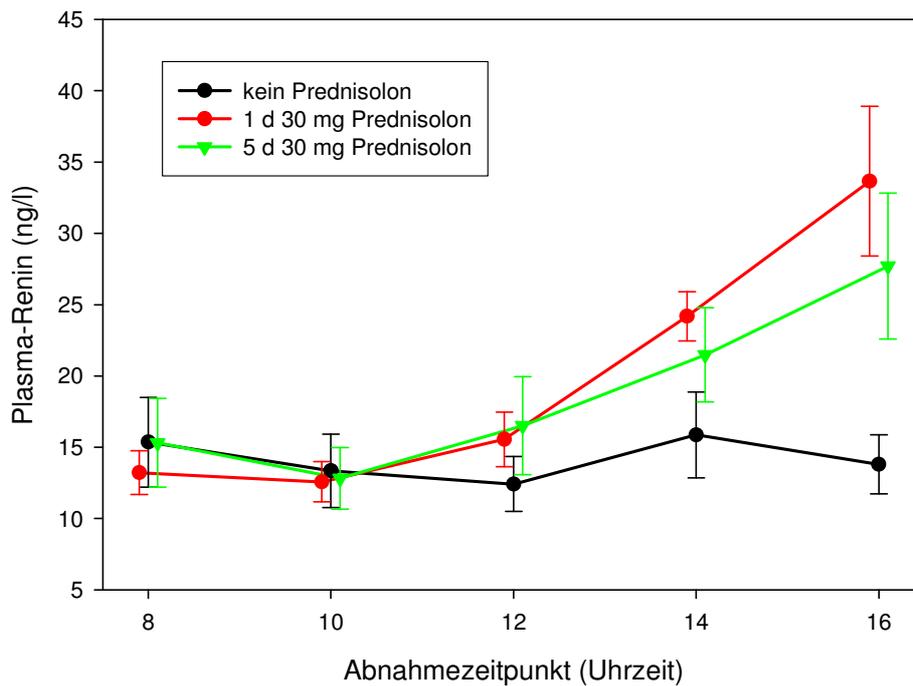


Abbildung 9: Reninkonzentration im Plasma (ng/l) während des Durstens. MW \pm SEM bei 12 gesunden männlichen Probanden. Die drei Versuchstage sind farblich getrennt voneinander dargestellt (ohne PD in schwarz, nach 1 d mit 30 mg PD oral in rot und nach 5 d mit 30 mg PD oral in grün).

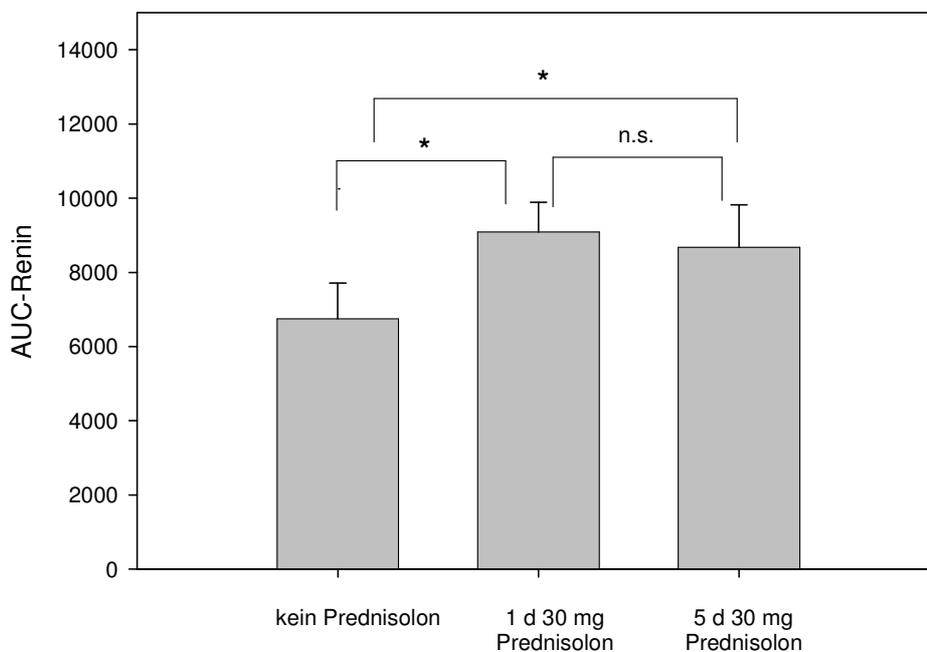


Abbildung 10: AUC-Renin während des Durstens. MW \pm SEM mit n = 12 an allen drei Versuchstagen

*: signifikant mit $p < 0,05$

n.s.: nicht signifikant

Insgesamt lagen 44 der 180 im Serum gemessenen Werte (24 %) von Aldosteron unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten RIA (27 ng/l). Für statistische Berechnungen wurde für alle Ergebnisse unterhalb der Nachweisgrenze ein Wert von 26,9 ng/l angenommen. Am basalen Versuchstag lagen 12 von 60 Werten (20%), am ersten Tag der Prednisoloneinnahme 6 von 60 (10 %) und am letzten Tag der Prednisoloneinnahme 26 von 60 Werten (43 %) unterhalb der Nachweisgrenze des RIA.

Analog zum oben gezeigten Verlauf der Reninkonzentration im Plasma gab es auch beim Aldosteron am basalen Versuchstag während des Durstens keine signifikante Änderung im Tagesverlauf. Im Mittel kam es zu einem Abfall von $30,2 \pm 23,0$ ng/l. Unter Prednisolon kam es dagegen, ebenfalls analog zum Renin, im Mittel zu einem Anstieg der Aldosteronkonzentration (siehe [Abbildung 11](#)). Am ersten Tag unter PD betrug der Anstieg $46,2 \pm 30,7$ ng/l und am fünften Tag unter PD betrug die Zunahme $9,9 \pm 18,4$ ng/l.

An beiden Versuchstagen unter Prednisolon waren die AUCs des Serumaldosterons signifikant höher als ohne Prednisolon (siehe [Abbildung 12](#)).

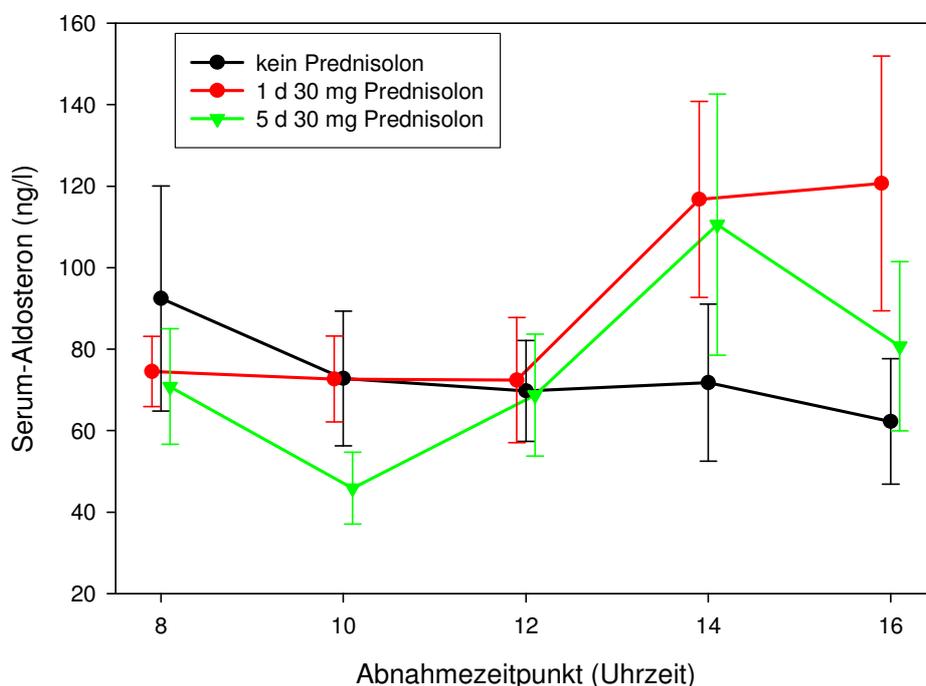


Abbildung 11: Aldosteronkonzentration im Serum (ng/l) während des Durstens. Dargestellt sind MW \pm SEM bei 12 gesunden männlichen Probanden an allen drei Versuchstagen (ohne PD in schwarz, nach 1 d mit 30 mg PD oral in rot und nach 5 d mit 30 mg PD oral in grün).

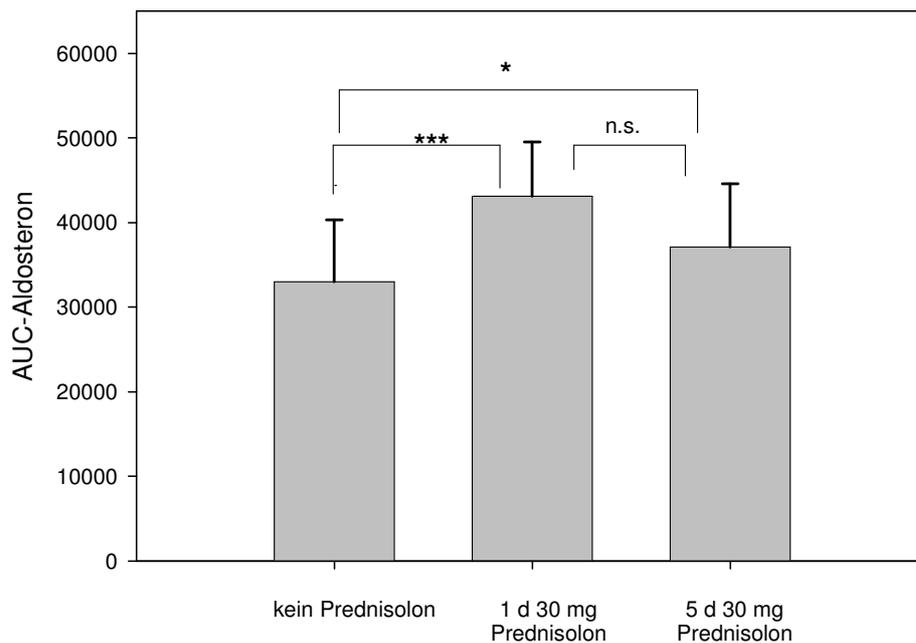


Abbildung 12: AUC-Aldosteron während des Durstens. MW ± SEM mit n = 12 an allen drei Versuchstagen.

*: signifikant mit p < 0,05,

***: signifikant mit p = 0,001

n.s.: nicht signifikant

3.2 Einfluss der Glucocorticoideinnahme auf relevante Urinparameter während des Durstversuchs

Anders als die Blutparameter wurden alle Parameter aus dem Urin zusätzlich um 17.30 Uhr sowie aus dem nächtlichen Sammelurin bestimmt werden. Der 17.30 Uhr Urin wurde jeweils nach Gabe von 4 µg Desmopressinacetat (Minirin®) i.v. gewonnen (vgl. Abschnitt 2.1.2). Die Auswertung erfolgte daher getrennt. In diesem Abschnitt werden die Werte während des Durstens (bis 16.00 Uhr) dargestellt, im Abschnitt 3.3 erfolgt die Darstellung der Ergebnisse nach Gabe des V2R-Agonisten Minirin®.

3.2.1 Urinosmolalität und Urinvolumen

An allen drei Versuchstagen hatten die Mittelwerte der Urinosmolalität einen ähnlichen Tagesverlauf. Die Osmolalität nahm zunächst ab und hatte sowohl basal als auch unter Medikamenteneinnahme um 12.00 Uhr ihr Minimum (siehe Abbildung 13). Vergleicht

man die 08.00 Uhr Werte mit denen von 16.00 Uhr, so stieg die Osmolalität des Urins sowohl am basalen Versuchstag ($p = 0,026$) als auch am ersten Tag unter Prednisolon ($p = 0,030$) signifikant an. Nicht signifikant war der Anstieg hingegen am dritten Versuchstag.

Insgesamt hatte die Prednisoloneinnahme keinen signifikanten Einfluss auf die Fähigkeit zur Konzentration des Urins: Die Kurvenverläufe der drei Versuchstage sind weitgehend identisch und die AUCs unterscheiden sich nicht signifikant (siehe Tabelle 3).

Einer der Probanden konnte seinen Urin im Tagesverlauf in keinem der drei Durstversuche stärker konzentrieren. Allerdings stellte seine morgendliche Urinosmolalität an jedem Versuchstag das Maximum der Gruppe dar, sodass sich vermutlich aus diesem hohen Wert zu Beginn des Durstversuches der fehlende Anstieg der Osmolalität erklären lässt.

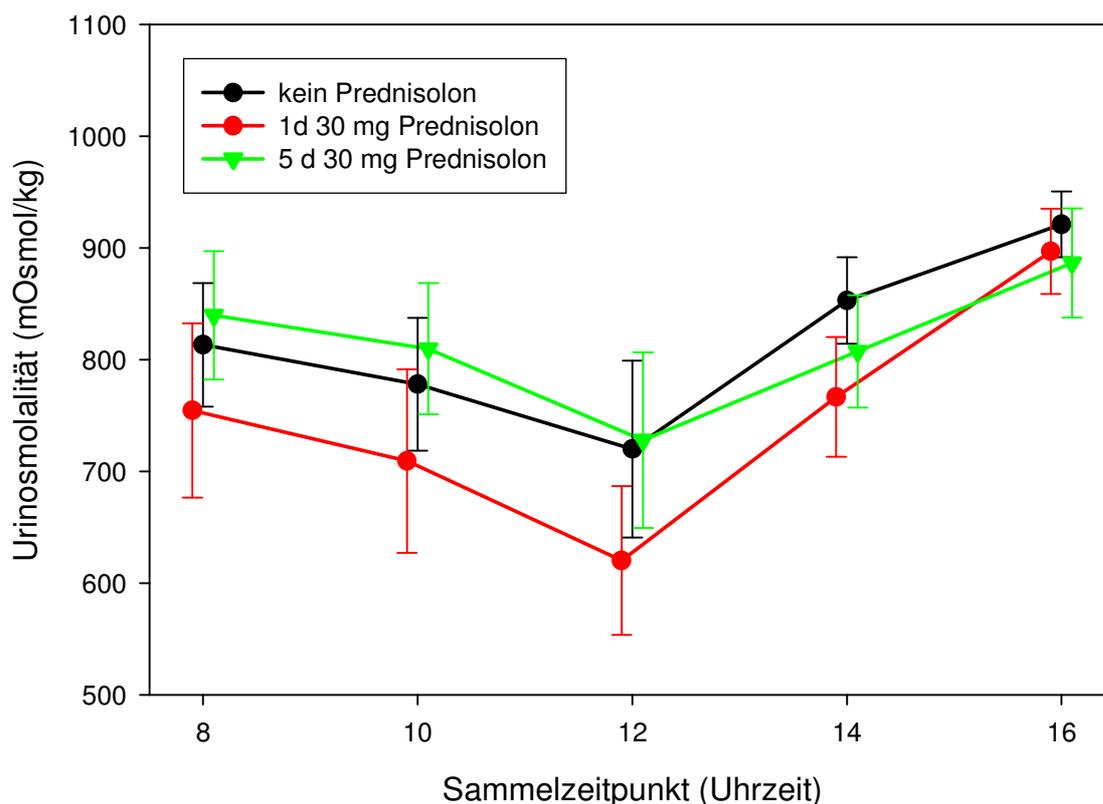


Abbildung 13: Urinosmolalität während des Durstens (mOsmol/kg). Dargestellt sind $MW \pm SEM$ bei 12 gesunden männlichen Probanden. Die drei Versuchstage sind farblich getrennt voneinander dargestellt (ohne PD in schwarz, nach 1 d 30 mg PD in rot und nach 5 d 30 mg PD in grün).

	kein Prednisolon Urinosmolalität MW ± SEM	1 d Prednisolon Urinosmolalität MW ± SEM	5 d Prednisolon Urinosmolalität MW ± SEM
AUC	386215 ± 22348 n.s.	350640 ± 24192 n.s.	385030 ± 24930 n.s.

Tabelle 3: AUC der Urinosmolalität an allen drei Versuchstagen. Darstellung von MW ± SEM mit n = 12.
n.s.: keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchstagen

Entsprechend des umgekehrt proportionalen Verhältnisses von Urinosmolalität und Urinvolumen stellen sich die Verlaufskurven des Urinvolumens spiegelbildlich zur Osmolalität dar (siehe Abbildung 14). An allen drei Versuchstagen korrelierte die Urinosmolalität mit dem entsprechenden Urinvolumen. Nach Pearson entsprach dies einem Korrelationskoeffizienten von $r = -0,858$ und war mit $p < 0,001$ hoch signifikant. Es bestand also ein starker negativ-linearer Zusammenhang zwischen den beiden Werten (siehe Abbildung 15). In Tabelle 4 sind die Korrelationskoeffizienten für die Tage im Einzelnen wiedergegeben.

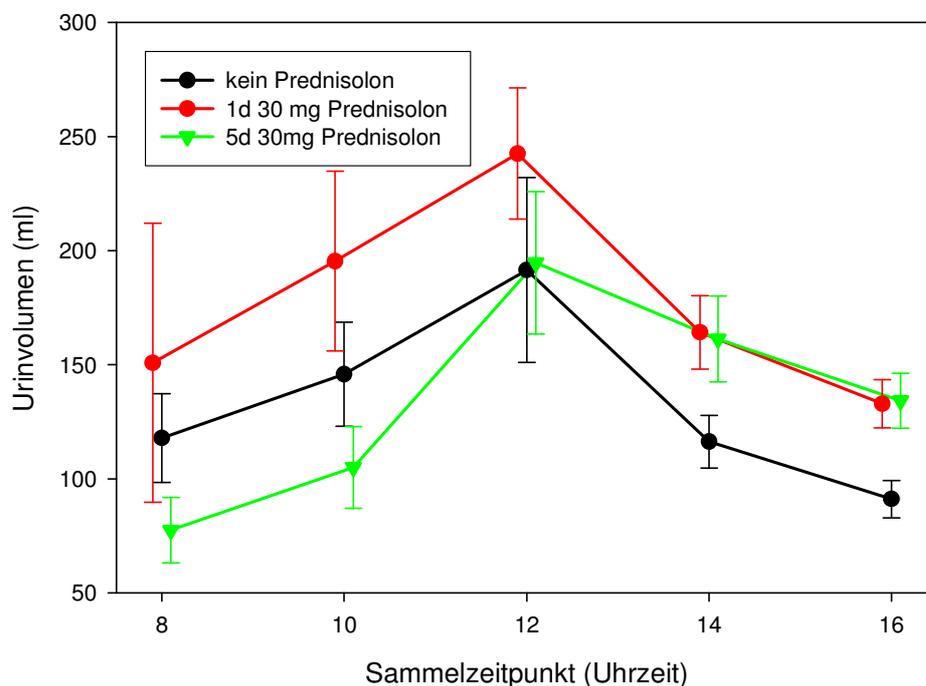


Abbildung 14: Urinvolumen während des Durstens (ml). Dargestellt sind MW ± SEM bei 12 gesunden männlichen Probanden an allen drei Versuchstagen (ohne PD in schwarz, nach 1 d 30 mg PD in rot und nach 5 d 30 mg PD in grün).

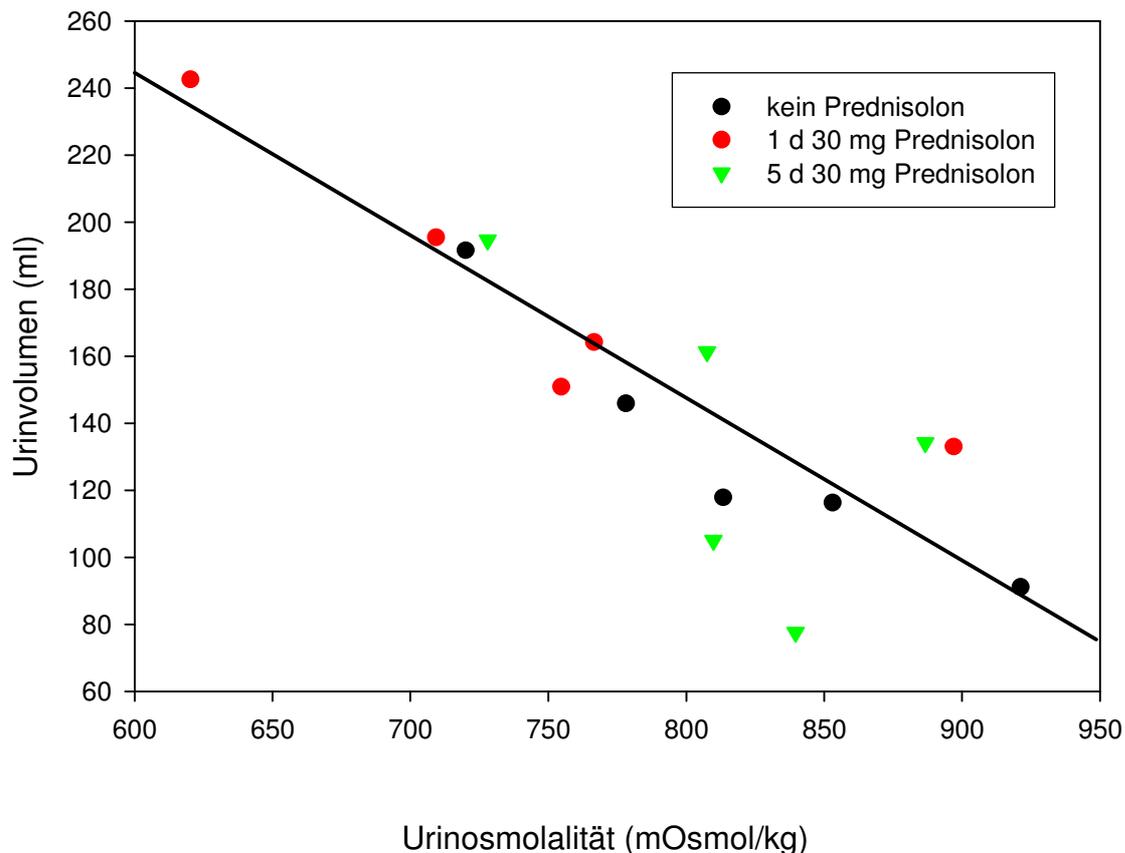


Abbildung 15: Zusammenhang zwischen Urinvolumen und Urinosmolalität an allen drei Versuchstagen (ohne PD schwarz, nach 1 d 30 mg PD rot und nach 5 d 30 mg PD grün) mit einer gemeinsamen Regressionsgeraden und dem Regressionskoeffizienten $r^2 = 0,736$.

	kein Prednisolon	1 d 30 mg Prednisolon	5 d 30 mg Prednisolon
Korrelation nach Pearson von Urinvolumen und Osmolalität	$r = -0,954^{**}$	$r = -0,928^*$	$r = -0,831$

Tabelle 4: Korrelationen von Urinvolumen und Urinosmolalität an allen drei Versuchstagen bei 12 gesunden männlichen Probanden.
 $**$ = die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (einseitig).
 $*$ = die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (einseitig).

Analog zur Urinosmolalität gab es auch beim Urinvolumen keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweils gesammelten Urinmengen von 08.00 bis 16.00 Uhr an den Versuchstagen. Allerdings bestand ein Trend ($p = 0,070$) zu einem höheren

Urinvolumen am ersten Tag unter Prednisolon im Vergleich zum basalen Tag (siehe Tabelle 5).

	Urinvolumen 08.00 - 16.00 Uhr MW (ml)	Urinvolumen 08.00 - 16.00 Uhr SEM (ml)	Urinvolumen 08.00 - 16.00 Uhr Range (ml)
Basaler Durstversuch	653 n.s.	± 79	241-1160
1 d 30 mg Prednisolon	885 n.s.	± 107	560-1810
5 d 30 mg Prednisolon	672 n.s.	± 76	310-1250

Tabelle 5: Gesammelte Urinmenge während des Durstens zwischen 08.00 und 16.00 Uhr bei 12 gesunden männlichen Probanden. Dargestellt sind alle drei Versuchstage.
n.s.: keine signifikanten Unterschiede zwischen den gesammelten Urinvolumina der Versuchstage

3.2.2 Elektrolyte im Urin

Entsprechend der zunehmenden Konzentrierung des Harns stieg im Laufe der Durstversuche die Natriumkonzentration im Urin an. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 grafisch dargestellt. Am basalen Versuchstag stieg die Natriumkonzentration im Urin um $48,3 \pm 16,8$ mmol/l. Am ersten Tag der Prednisoloneinnahme war der Anstieg mit $42,1 \pm 15,6$ mmol/l etwas geringer. Im Verlauf des fünften Tages der Prednisoloneinnahme stieg die Natriumkonzentration im Urin um $88,3 \pm 15,9$ mmol/l an. Dieser Anstieg ist signifikant höher als am basalen Tag ($p = 0,048$) und ebenfalls signifikant höher als am ersten Tag unter Prednisolon ($p = 0,022$). Die kumulierten absoluten Ausscheidungsmengen von Natrium im Urin unterschieden sich nicht signifikant (siehe Abbildung 17).

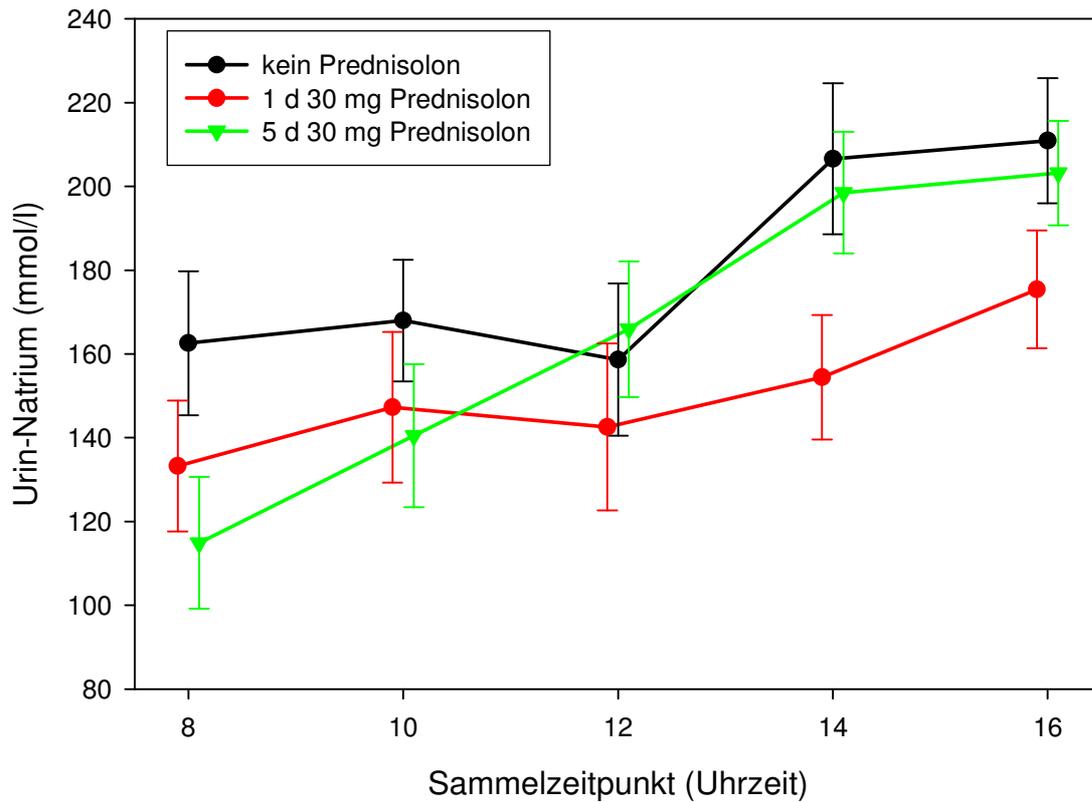


Abbildung 16: Natriumkonzentration im Urin (mmol/l) während des Durstens. Dargestellt sind MW \pm SEM (n=12) an allen drei Versuchstagen (ohne Prednisolon schwarz, nach 1 d 30 mg Prednisolon rot und nach 5 d 30 mg Prednisolon grün).

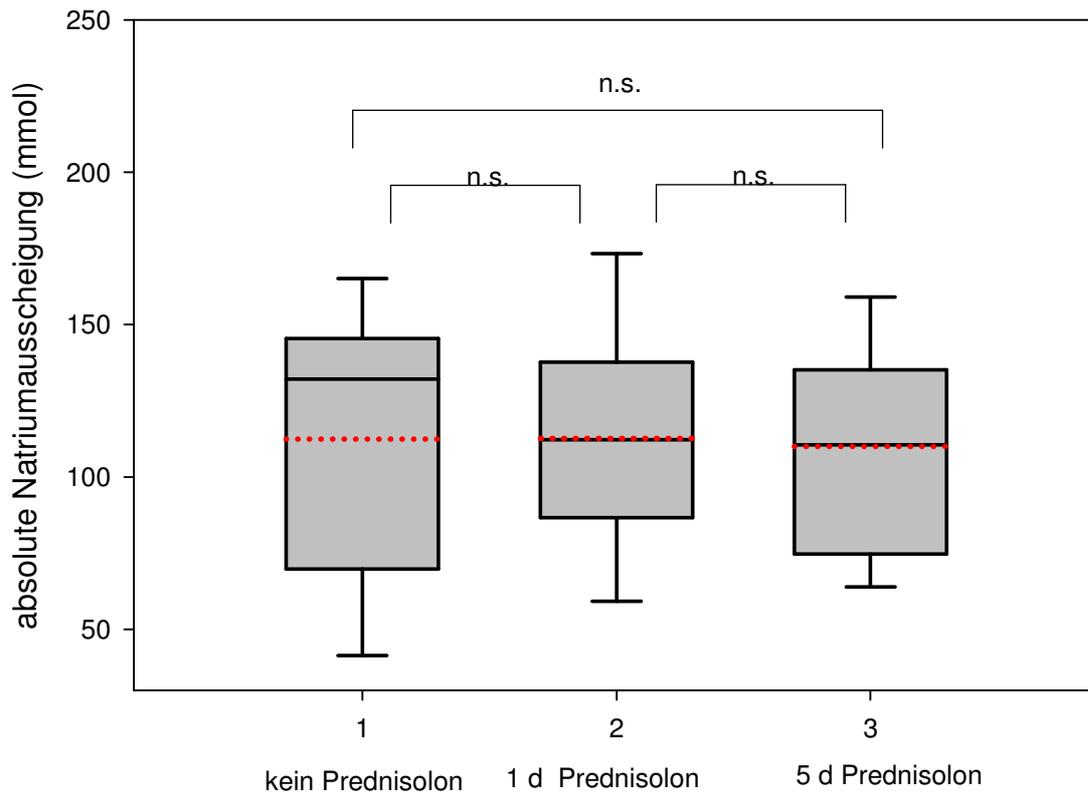


Abbildung 17: Gesamtmenge an ausgeschiedenem Natrium im Urin (mmol) von 08.00 bis 16.00 Uhr an allen drei Versuchstagen bei 12 gesunden männlichen Probanden. Innerhalb der Box repräsentiert die schwarze Linie den Median, die rot-gestrichelte Linie zeigt den Mittelwert an.
n.s.: keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchstagen

Entsprechend der Zunahme der Natriumkonzentration im Urin (siehe Abbildung 16) stieg die Kaliumkonzentration im Urin ebenfalls an allen drei Versuchstagen an. Der Anstieg war jedoch zu keinem Messzeitpunkt signifikant (siehe Abbildung 18).

Die Gesamtmenge des im Urin ausgeschiedenen Kaliums war unter einem Tag Prednisolon signifikant höher als am basalen Versuchstag ($p = 0,041$) und ebenfalls signifikant höher als am fünften Tag der Prednisoloneinnahme ($p < 0,001$). Am dritten Tag der Prednisoloneinnahme war die ausgeschiedene Menge am geringsten (siehe Abbildung 19).

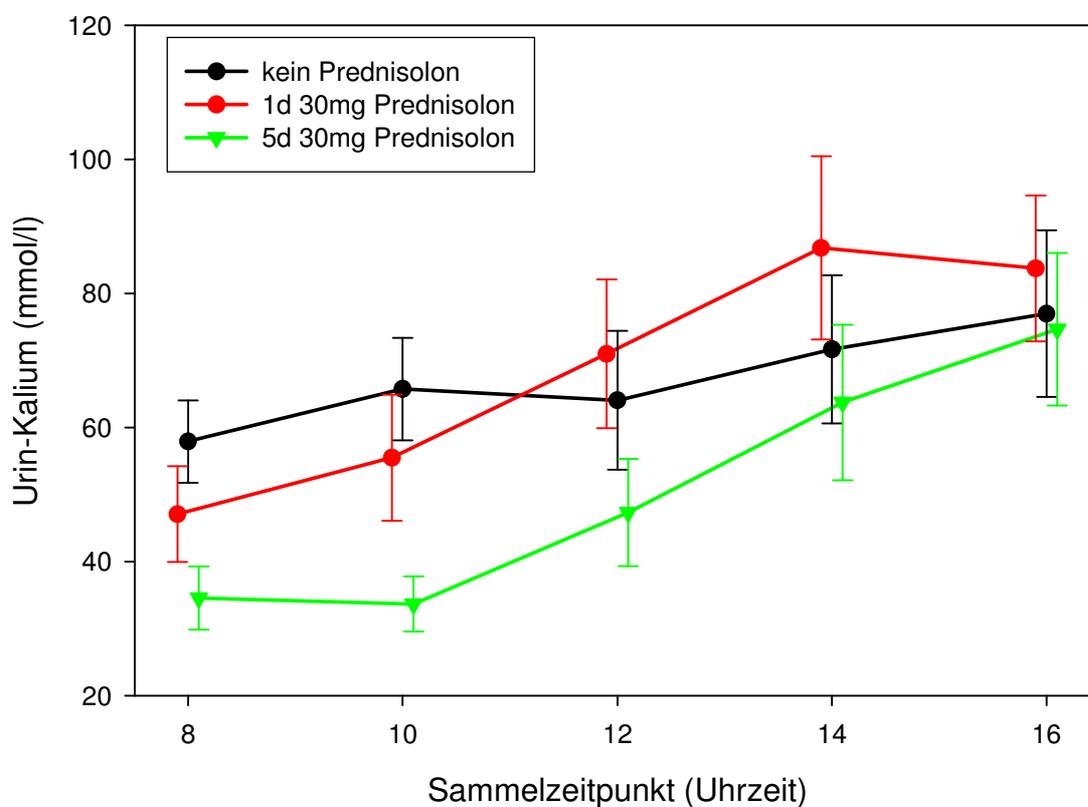


Abbildung 18: Kaliumkonzentration im Urin (mmol/l) während des Durstens. Dargestellt sind $MW \pm SEM$ von 12 gesunden männlichen Probanden an allen drei Versuchstagen (ohne Prednisolon schwarz, nach 1 d 30 mg Prednisolon rot und nach 5 d 30 mg Prednisolon grün).

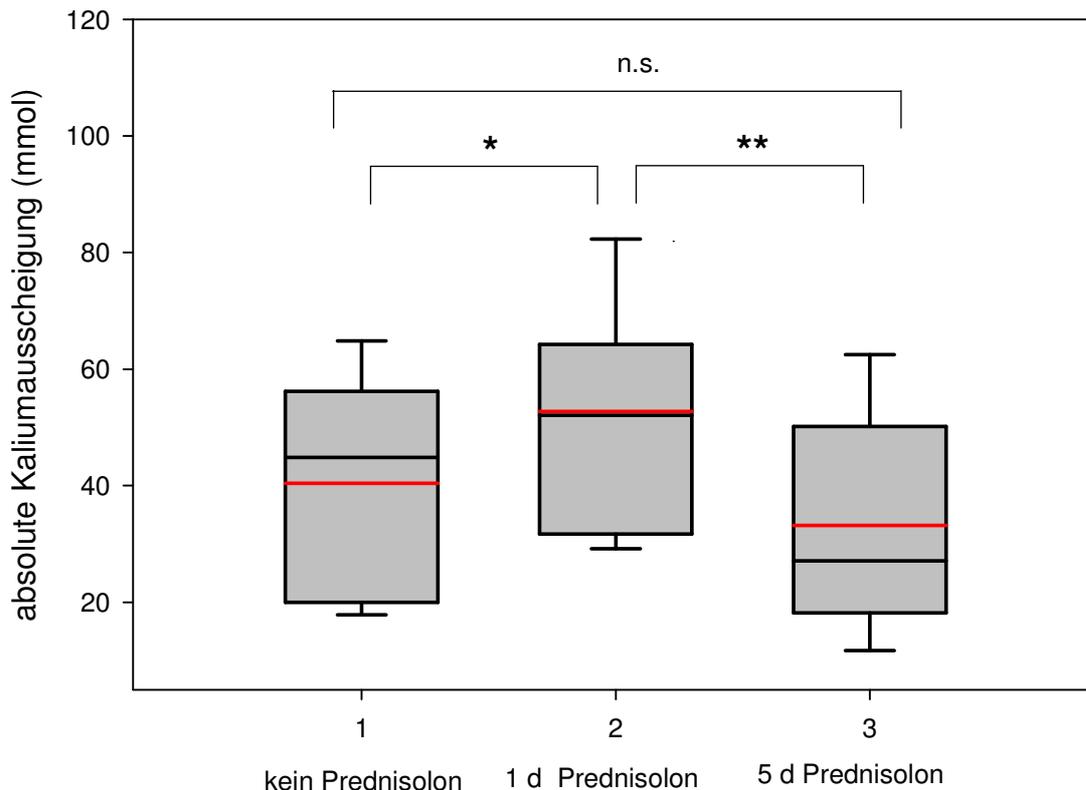


Abbildung 19: Gesamtmenge an ausgeschiedenem Kalium im Urin (mmol) von 08.00 bis 16.00 Uhr an allen drei Versuchstagen bei 12 gesunden männlichen Probanden. Innerhalb der Box repräsentiert die schwarze Linie den Median, die rote Linie zeigt den Mittelwert an.
 *: signifikant mit $p = 0,041$ (1 d PD vs. basal)
 **: signifikant mit $p < 0,001$ (1 d PD vs. 5 d PD)
 n.s.: nicht signifikant (basal vs. 5 d PD)

3.2.3 U-AQP2-Ausscheidung im Urin

Aus allen Urinproben der Probanden wurde u-AQP2 bestimmt, sodass pro Proband insgesamt 21 Bestimmungen vorgenommen wurden. Trotz wiederholter Messungen unplausibler Werte, wurden für einen Probanden am basalen Versuchstag für drei der sieben Sammelzeitpunkte Werte bestimmt, die zwischen dem 4,5- und dem 17-fachen der jeweiligen SD vom MW entfernt lagen. Diese Werte wurden für alle weiteren statistischen Berechnungen nicht verwendet. Bei einem anderen Probanden konnte kein 14.00 Uhr Wert des ersten Tages unter Prednisolon ermittelt werden. Vermutlich waren entweder die Probe selbst oder verwendete Hilfsmittel verunreinigt.

Um die jeweils ausgeschiedene Gesamtmenge an u-AQP2 zu ermitteln, wurden die in ng/ml gemessenen Werte mit den registrierten Urinvolumina (ml) multipliziert. Am basalen Versuchstag kam es zu keinen signifikanten Änderungen der u-AQP2-Ausscheidungsmenge während des Durstens. Am ersten Tag unter Prednisolon stieg die Ausscheidungsmenge im Tagesverlauf signifikant ($p = 0,026$) an. Am fünften Tag der Prednisoloneinnahme konnte ebenfalls ein Anstieg beobachtet werden, der jedoch nicht signifikant war (siehe Abbildung 20). In Abbildung 21 sind für alle drei Tage die absoluten kumulierten Mengen an ausgeschiedenem u-AQP2 bis 16.00 Uhr dargestellt. Es wird deutlich, dass deren Mittelwerte an allen drei Tagen sehr dicht beieinander liegen (kein Prednisolon 719 ± 65 ng, 1 Tag Prednisolon 718 ± 65 ng, 5 Tage Prednisolon 716 ± 60 ng). Die kumulierten Ausscheidungsmengen unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Versuchstagen.

In Abbildung 22 ist die u-AQP2-Ausscheidung in Relation zur Kreatininausscheidung dargestellt. Bezogen auf die Kreatininausscheidung kam es im Tagesverlauf des basalen Versuchstages zu einem Abfall der ausgeschiedenen Menge an u-AQP2 von 0,16 u-AQP2 pro Kreatinin (ng/mg). Dieser Abfall war jedoch nicht signifikant ($p = 0,330$). Nach fünf Tagen unter Prednisolon fand im Tagesverlauf eine leichte Zunahme um 0,11 u-AQP2 pro Kreatinin (ng/mg) statt, die jedoch ebenfalls nicht signifikant war ($p = 0,100$).

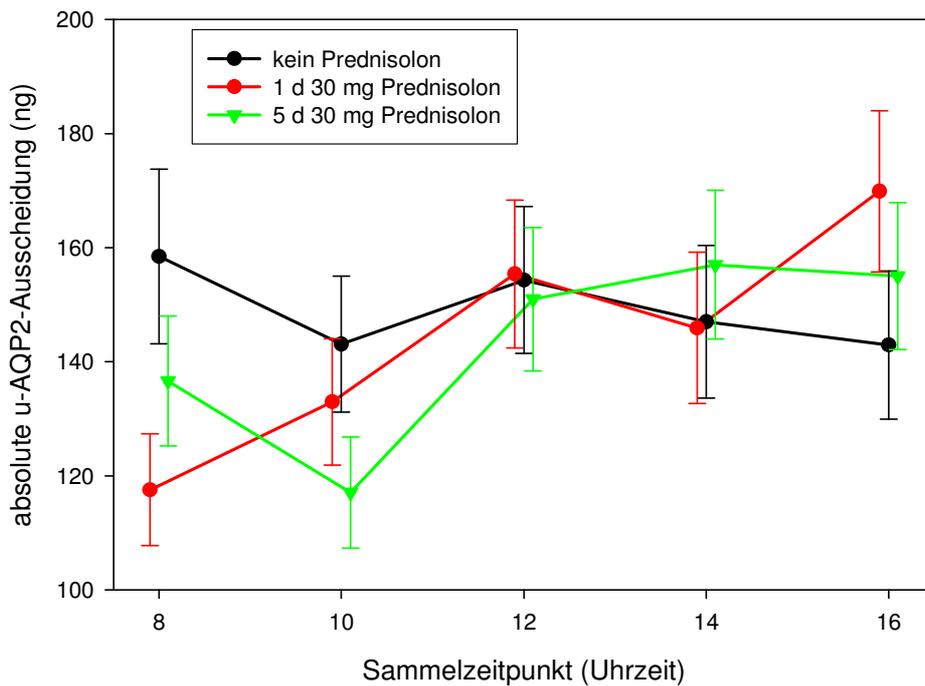


Abbildung 20: Absolut ausgeschiedene Mengen von u-AQP2 im Urin (ng). Darstellung von $MW \pm SEM$ ($n = 12$) an allen drei Versuchstagen (ohne PD schwarz, nach 1 d 30 mg PD rot und nach 5 d 30 mg PD grün).

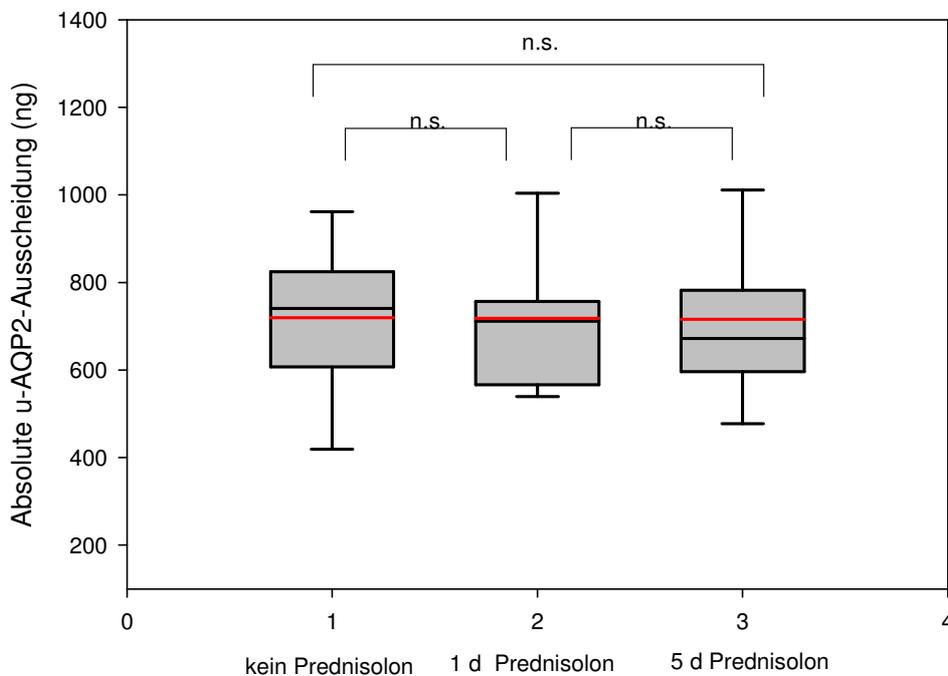


Abbildung 21: Gesamtmenge an u-AQP2 (ng) im Urin von 08.00 bis 16.00 Uhr an allen drei Versuchstagen bei 12 gesunden männlichen Probanden. Die schwarze Linie repräsentiert den Median, die rote Linie zeigt den Mittelwert an. n.s.: keine signifikanten Unterschiede

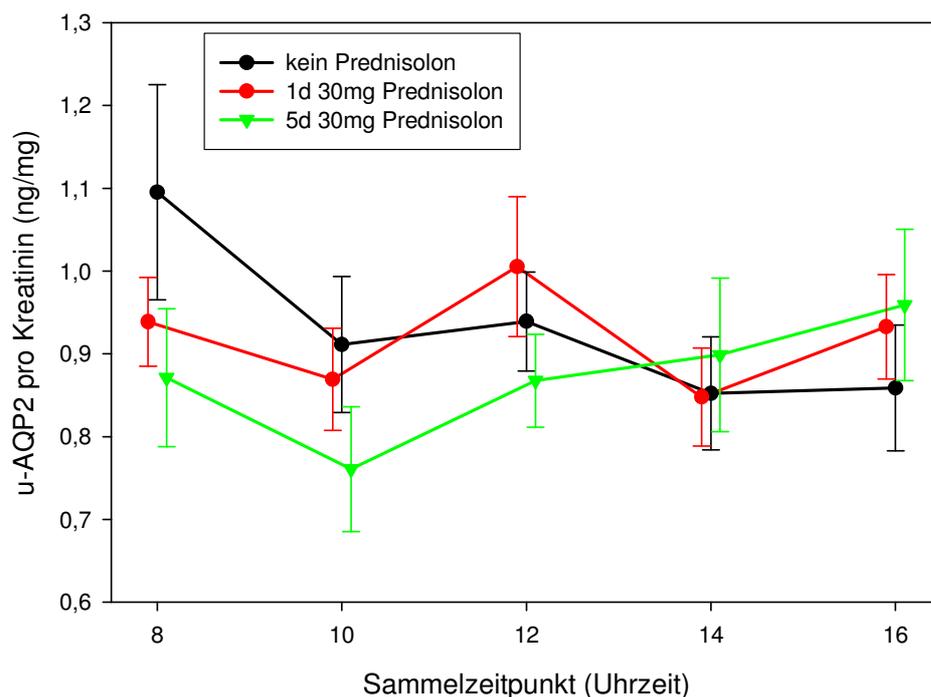


Abbildung 22: u-AQP2-Ausscheidung im Urin bezogen auf Kreatinin (ng/mg). Dargestellt sind MW \pm SEM bei 12 gesunden männlichen Probanden an allen drei Versuchstagen (ohne PD schwarz, nach 1 d 30 mg PD rot und nach 5 d 30 mg PD grün).

3.2.4 PGE2-Ausscheidung im Urin

Die absolute Ausscheidung von PGE2 im Urin nahm sowohl mit als auch ohne externe Glucocorticoidzufuhr im Tagesverlauf zu. Wie in [Abbildung 23](#) ersichtlich, war der Anstieg unter Prednisolon tendenziell stärker als am basalen Versuchstag. Statistisch signifikant war dieser Unterschied jedoch nicht. Betrachtet man die kumulierte Ausscheidungsmenge von PGE2 während des Durstens, so blieb sie analog zur oben gezeigten u-AQP2-Ausscheidung unter Prednisolon weitgehend konstant. Die kumulierte Ausscheidungsmenge unter Prednisolon unterschied sich statistisch nicht signifikant vom basalen Versuchstag (siehe [Abbildung 24](#)).

Am dritten Versuchstag wurden um 08.00 Uhr bei einem Probanden 49625 pg/ml PGE2 gemessen. MW \pm SEM der übrigen Probanden zum selben Zeitpunkt lagen bei 1205 ± 148 pg/ml. Die 49625 pg/ml PGE2 waren als extremer Ausreißer anzusehen und wurden in allen weiteren statistischen Berechnungen nicht berücksichtigt.

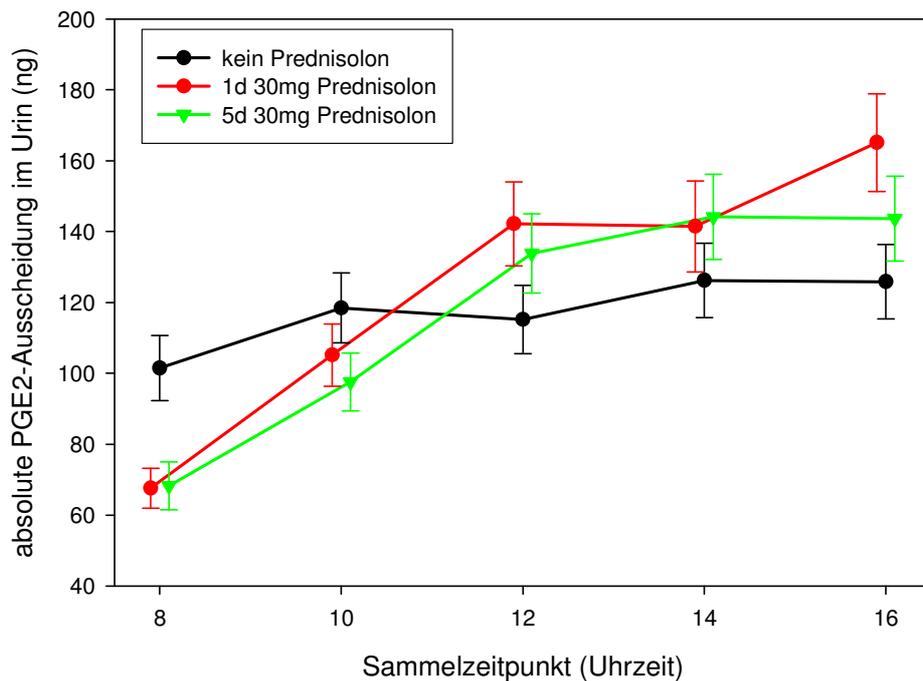


Abbildung 23: Absolut ausgeschiedene Mengen von PGE2 im Urin (ng). Darstellung von MW \pm SEM (n=12) an drei Versuchstagen (ohne PD schwarz, nach 1 d 30 mg PD rot und nach 5 d 30 mg PD grün).

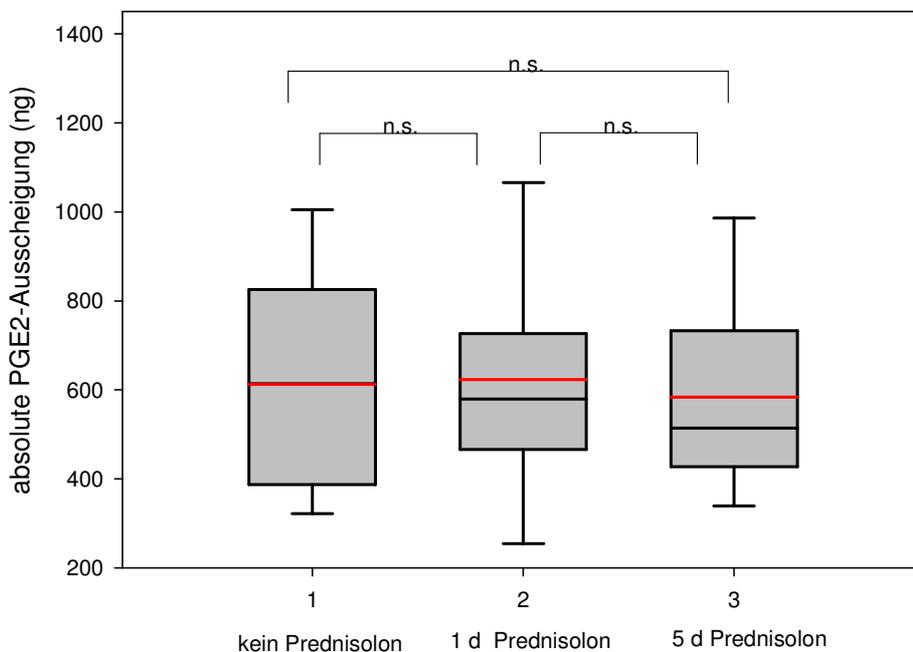


Abbildung 24: Gesamtmenge an PGE2 (ng) im Urin von 08.00 bis 16.00 Uhr an allen Versuchstagen bei 12 gesunden männlichen Probanden. Die schwarze Linie markiert den Median, die rote Linie den Mittelwert. n.s.: keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchstagen

Die Ausscheidungsrate pro Minute des PGE2 erhöhte sich an allen drei Versuchstagen im Tagesverlauf (siehe Abbildung 25). Die Steigerungen unter Prednisolon waren jeweils signifikant ($p = 0,040$ für den ersten und $p = 0,050$ für den fünften Tag unter Prednisolon), während die Steigerung am basalen Versuchstag nicht signifikant war ($p = 0,170$).

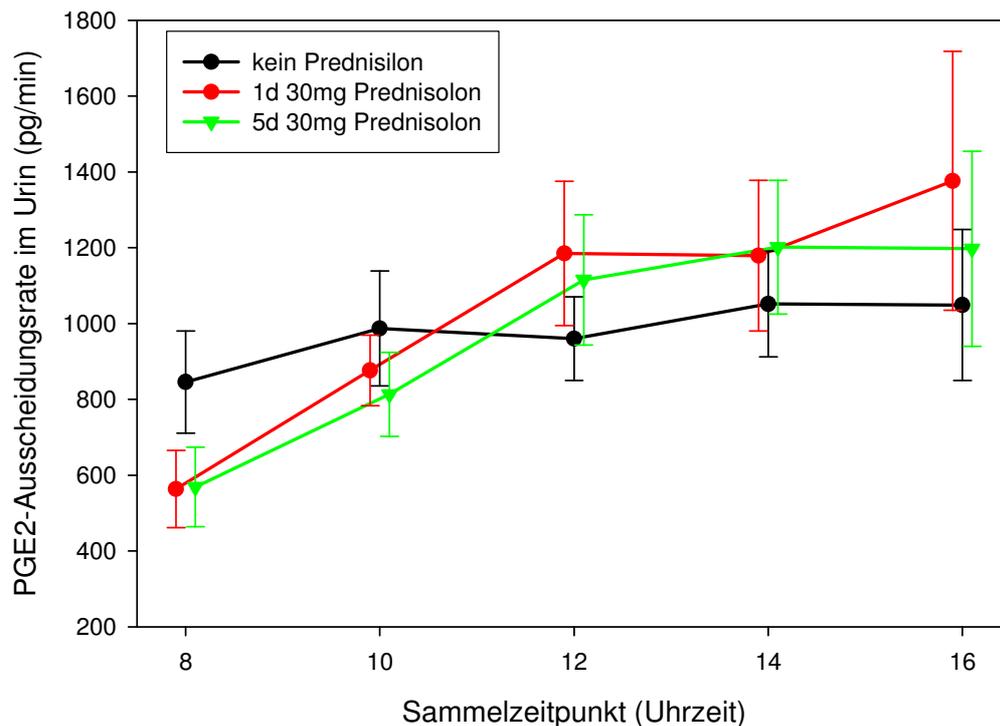


Abbildung 25: Ausscheidungsrate des PGE2 im Urin (pg/min). Dargestellt sind die MW \pm SEM bei 12 gesunden männlichen Probanden während des Durstens an allen drei Versuchstagen (ohne PD schwarz, nach 1 d 30 mg PD rot und nach 5 d 30 mg PD grün).

3.3 Einfluss der Glucocorticoideinnahme auf relevante Urinparameter nach Gabe des V2R-Agonisten Minirin®

In diesem Abschnitt wird der Einfluss der Prednisoloneinnahme auf die ermittelten Urinparameter u-AQP2, PGE2, Osmolalität und Volumen nach intravenöser Gabe von 4 μ g des V2R-Agonisten Minirin® gezeigt.

Die Ausscheidung von u-AQP2 stieg allen drei Versuchstagen nach Gabe von Minirin® hoch signifikant an (jeweils $p \leq 0,001$). Die Anstiege unter Prednisoloneinnahme unterschieden sich nicht signifikant von dem ohne Glucocorticoideinnahme.

Bei einem Probanden wurde auch nach Messwiederholung ein u-AQP2 gemessen, das um mehr als die 18-fache Standardabweichung vom Mittelwert entfernt lag. Dieser Wert wurde in den weiteren statistischen Berechnungen nicht berücksichtigt.

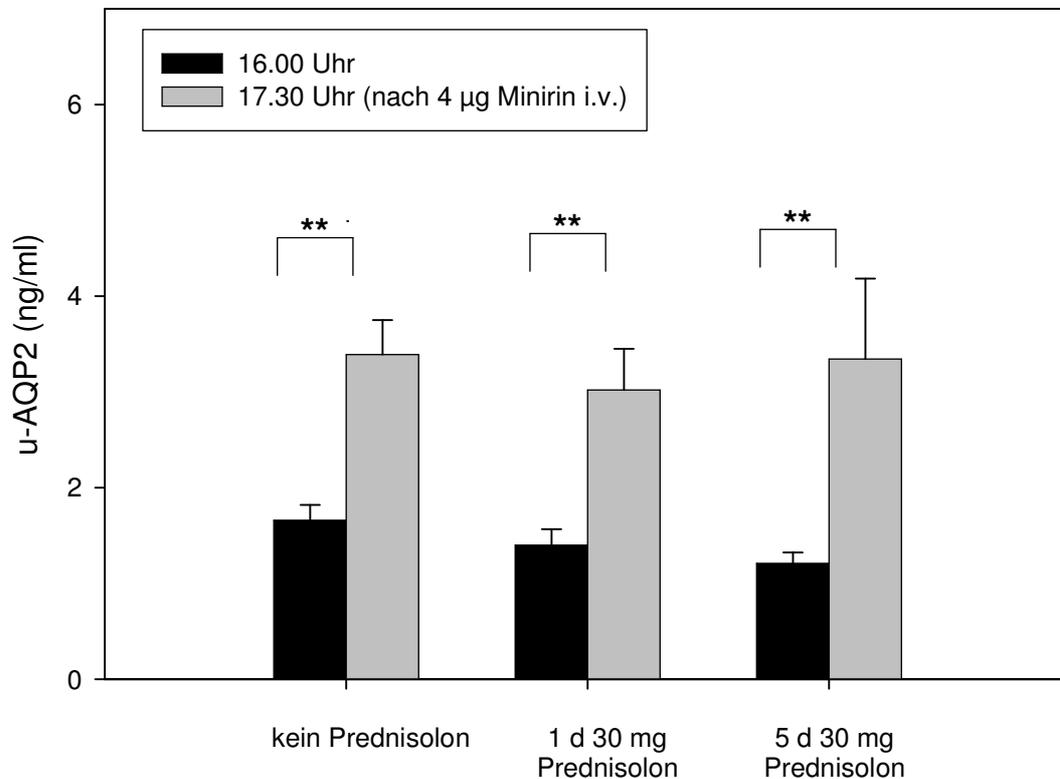


Abbildung 26: u-AQP2 Konzentration im Urin (ng/ml) vor und nach intravenöser Gabe von 4µg Minirin®. Dargestellt sind MW ± SEM bei 12 gesunden männlichen Probanden jeweils ohne PD, nach 1 d mit 30 mg PD oral und nach 5 d mit 30 mg PD oral.
***: signifikant mit $p < 0,001$

Die Konzentration von PGE2 stieg nach Gabe von Minirin® ebenfalls an (siehe [Abbildung 27](#)). Allerdings waren die Anstiege an keinem der Versuchstage signifikant. Auch bestanden keine signifikanten Unterschiede der Anstiege untereinander.

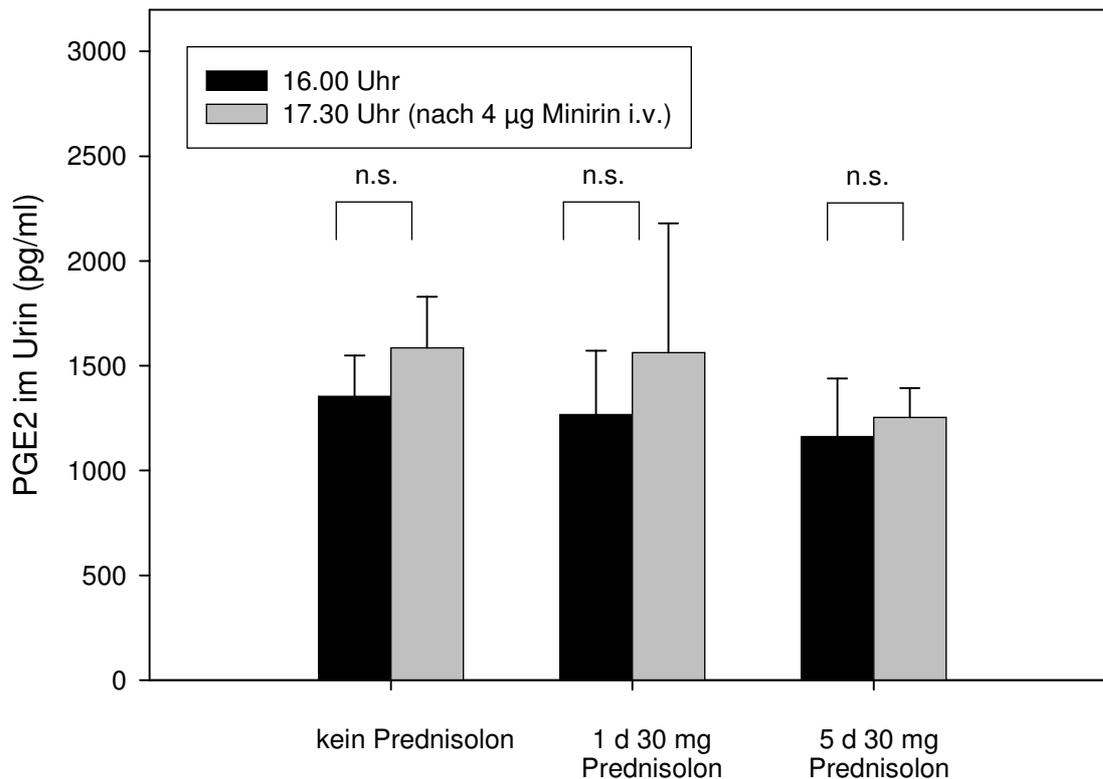


Abbildung 27: PGE2-Konzentration im Urin (pg/ml) vor und nach intravenöser Gabe von 4 µg Minirin®. Dargestellt sind MW ± SEM bei 12 gesunden männlichen Probanden jeweils ohne PD, nach 1 d mit 30 mg PD oral und nach 5 d mit 30 mg PD oral. n.s.: Anstieg ist nicht signifikant

Die Urinosmolalität stieg regelmäßig im Anschluss an die intravenöse Applikation von Minirin® an. Ohne Prednisolon war der Anstieg im Mittel nicht signifikant, wohingegen er an beiden Tagen unter Prednisoloneinnahme hoch signifikant war (siehe [Tabelle 6](#)). Die Osmolalität des nächtlichen Sammelurins war unter Prednisoloneinnahme jeweils signifikant höher als am basalen Versuchstag ohne Glucocorticoideinnahme.

Die Einnahme von Prednisolon hatte im Mittel keinen signifikanten Einfluss auf das registrierte Urinvolumen nach Gabe von Minirin® (4 µg i.v.). Das Volumen des nächtlichen Sammelurins lag am Versuchstag ohne Medikamenteneinnahme mit 500 ± 62 ml signifikant über (p = 0,340) dem am ersten Tag der Prednisoloneinnahme 365 ± 36 ml. Weitere signifikante Unterschiede bestanden nicht.

	kein Prednisolon Urin Osmolalität MW ± SEM (mOsmol/l)	1 d Prednisolon Urin Osmolalität MW ± SEM (mOsmol/l)	5 d Prednisolon Urin Osmolalität MW ± SEM (mOsmol/l)
16.00 Uhr	921,2 ± 29,5	897,0 ± 38,2	886,7 ± 48,9
17.30 Uhr (nach 4 µg Minirin® i.v.)	954,8 ± 17,4	1029,3 ± 51,6	1030,4 ± 48,1
Anstieg nach Minirin® Gabe	33,6 ± 25,9*	132,3 ± 31,0#	143,8 ± 20,4**
Signifikanz des Anstiegs nach Minirin® Gabe	nicht signifikant p = 0,221	hoch signifikant p = 0,001	hoch signifikant p < 0,001
nächtlicher Sammelurin	979,0 ± 24,3 #,*	1109,3 ± 37,2 n.s.	1083,0 ± 31,1

Tabelle 6: Urinosmolalität (mOsmol/l) vor und nach Applikation von Minirin® (4 µg i.v.) sowie im nächtlichen Sammelurin. Dargestellt sind MW ± SEM bei 12 gesunden männlichen Probanden jeweils ohne PD, nach 1 d mit 30 mg PD oral und nach 5 d mit 30 mg PD oral.

#: hoch signifikant, p = 0,001 (kein PD vs. 1 d 30 mg PD)

*: signifikant, p = 0,004 (kein PD vs. 5 d 30 mg PD)

n.s.: nicht signifikant, p = 0,540 (1 d 30 mg PD vs. 5 d 30 mg PD)

3.4 Kontrolle der Compliance

Um die regelrechte Prednisoloneinnahme der Probanden zu überprüfen, wurden an beiden Versuchstagen unter Glucocorticoideinnahme jeweils um 10 Uhr die Prednisolonspiegel der Probanden im Serum bestimmt. Es konnte bei allen 12 Probanden Prednisolon im Serum nachgewiesen werden (siehe Tabelle 7).

	Prednisolon im Serum 10.00 Uhr Range (ng/ml)	Prednisolon im Serum 10.00 Uhr Mittelwert (ng/ml)	Prednisolon im Serum 10.00 Uhr SEM (ng/ml)
1 d 30 mg Prednisolon	340 – 440	370	± 10
5 d 30 mg Prednisolon	220 – 420	330	± 10

Tabelle 7: Prednisolon im Serum (ng/ml) an beiden Versuchstagen mit Medikamenteneinnahme bei 12 gesunden männlichen Probanden um 10.00 Uhr.

Zusätzlich wurde der ACTH-Spiegel im Plasma am basalen Versuchstag sowie am fünften Tag der Prednisoloneinnahme um 8.00 Uhr bestimmt (siehe [Abbildung 28](#)). Am basalen Versuchstag konnte bei allen Probanden ein morgendlicher ACTH-Spiegel im Plasma oberhalb der Nachweisgrenze des Assays (5 pg/ml) ermittelt werden. Im Mittel wurden $31,63 \pm 5,27$ pg/ml gemessen.

Am letzten Tag der Prednisoloneinnahme lag der morgendliche ACTH-Wert im Plasma bei $22,94 \pm 2,23$ pg/ml und war damit signifikant niedriger als am basalen Versuchstag ($p = 0,044$).

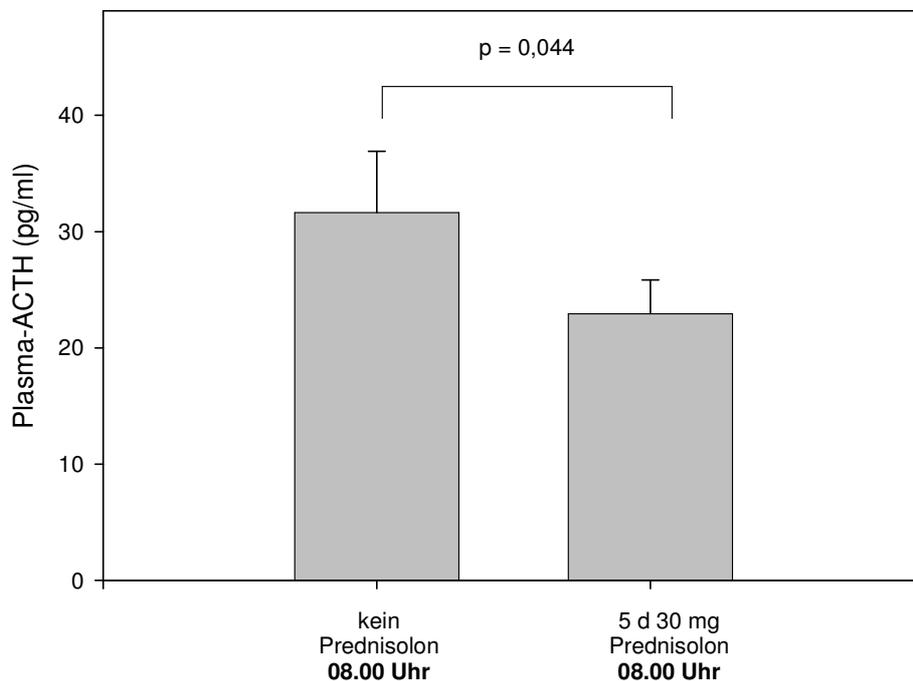


Abbildung 28: Morgendliches Plasma-ACTH (pg/ml) ohne Prednisolon sowie am fünften Tag der oralen Einnahme von 30 mg/d Prednisolon. Dargestellt sind MW \pm SEM bei 12 gesunden männlichen Probanden.

Die wiederholte Kontrolle des Körpergewichts bei allen Probanden zu sämtlichen Messzeitpunkten zeigte moderate Körpergewichtsabfälle, die in keinem Fall mehr als 3 % des Ausgangsgewichts betrugten.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine fünftägige orale Prednisoloneinnahme von 30 mg/d den Plasma-ADH-Spiegel supprimiert und inwiefern die renale Wasserrückresorption dadurch moduliert wird. Zur Beantwortung dieser zweifachen Fragestellung wurden Durstversuche an gesunden männlichen Probanden durchgeführt. Gemäß einem etablierten Protokoll erfolgte jeweils zu Beginn ein basaler Durstversuch ohne Medikamenteneinnahme. An diesen basalen Durstversuch schlossen sich zwei weitere Durstversuche am ersten und letzten Tag einer fünftägigen Prednisoloneinnahme an. Die Compliance der Probanden wurde anhand der Bestimmung von Prednisolon- und ACTH-Spiegeln sichergestellt. Um Hinweise für ADH-unabhängige Mechanismen der Wasserrückresorption zu erhalten, wurden unter anderem im Plasma Renin und ADH, im Serum Aldosteron und im Urin PGE₂ bestimmt.

Es wurde gezeigt, dass orale Glucocorticoidzufuhr den Plasma-ADH-Spiegel signifikant supprimiert. Auch nach achtstündigem Dursten stieg das Plasma-ADH unter Prednisolon nicht über die Nachweisgrenze des verwendeten RIA (0,4 pg/ml) an. Die Prednisoloneinnahme hatte keinen Einfluss auf den Anstieg der Plasmaosmolalität während des Durstens. Daraus kann gefolgert werden, dass der endogene Anstieg des ADH trotz entsprechender osmotischer Stimulation ausblieb.

Weiterhin gezeigt wurde, dass die Fähigkeit zur Urinkonzentration unter Glucocorticoidexzess trotz des supprimierten Plasma-ADH uneingeschränkt erhalten blieb. Ebenfalls blieb die kumulierte Ausscheidungsmenge von u-AQP2 unter Prednisolon konstant. Sie diene als Maß für die renal in die Plasmamembran der Sammelrohrzellen eingebauten AQP2-Moleküle. Eine Änderung der glomerulären Filtrationsrate, gemessen als Kreatinin-Clearance, konnte ausgeschlossen werden.

Die Spiegel der Hormone ANP, Renin und Aldosteron stiegen unter Prednisoloneinnahme im Vergleich zum basalen Durstversuch signifikant an. Unter Prednisolon konnte dagegen keine signifikante Änderung der PGE₂-Ausscheidung im Urin beobachtet werden.

Insgesamt lassen sich aus den Ergebnissen Rückschlüsse auf alternative Mechanismen der renalen Wasserrückresorption und insbesondere auf einen ADH-unabhängigen Aquaporin-2-Einbau ziehen. Diese werden aufbauend auf einer grundsätzlichen Diskussion der Ergebnisse im Folgenden dargelegt.

4.1 Prednisolon supprimiert ADH im Plasma

Am basalen Versuchstag kam es zu einem normalen Anstieg von ADH im Plasma. Die orale Einnahme von 30 mg Prednisolon dagegen hatte eine Suppression des Plasma-ADH unter die Nachweisgrenze des verwendeten RIA (0,4 pg/ml) zur Folge (siehe Abbildung 2). An allen drei Versuchstagen stieg die Plasmaosmolalität während des achtstündigen Durstens unverändert an (siehe Tabelle 2), daher ist von einem adäquaten osmotischen Stimulus für die endogene ADH-Sekretion auszugehen⁴. Da der erwartete ADH-Anstieg trotz dieser Stimulation ausblieb (siehe Abbildung 3), muss die Glucocorticoideinnahme die endogene Vasopressin-Antwort auf den osmotischen Stimulus verhindert haben. Die Dauer der Prednisoloneinnahme hatte dabei keinen Einfluss auf den beschriebenen Effekt. Bereits am ersten Tag der Prednisoloneinnahme konnte im Durstversuch bei keinem der Probanden das Plasma-ADH zum Anstieg über die Nachweisgrenze stimuliert werden.

In dieser Arbeit konnten somit die von Bähr et al.⁶⁴ publizierten Resultate an einer größeren Probandenzahl bestätigt werden. Ebenfalls im Einklang mit unseren Ergebnissen sind Tierexperimente an Hunden, bei denen eine Cortisol-Infusion zu einer signifikanten Reduktion der ADH-Antwort auf osmotische Stimulation führte^{100, 101}. An männlichen Wistar-Ratten untersuchten Batalhão et al.¹⁰² den Einfluss von Dexamethason auf die Vasopressin-Sekretion während des endotoxämischen Schocks. Sie konnten zeigen, dass unter Dexamethason-Gabe nach Induktion eines endotoxämischen Schocks die erwartete endogene Vasopressin-Antwort zur Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks ausblieb. Die eingangs zitierten *in vitro* Arbeiten^{62, 53, 61} konnten ebenfalls eine ADH-Supprimierung durch Glucocorticoide zeigen.

Im fraglichen Widerspruch zu unseren Ergebnissen steht eine Studie an Ratten, bei der die Applikation des Glucocorticoids Dexamethason zu keiner Suppression der Vasopressin-Sekretion führte, gleichwohl eine Suppression von Corticosteron registriert wurde¹⁰³. Einschränkung muss hinzugefügt werden, dass es sich um eine rein intrazerebrale Injektion von Dexamethason handelte und auch die osmotische Stimulation nur zentral erfolgte. Ruginsk et al.¹⁰⁴ konnten ebenfalls nach Stimulation mit einer hypertonen Infusion unter Applikation von Dexamethason keine Reduktion des Plasma-Vasopressin-Spiegels an Ratten beobachten. Diese beiden Arbeiten deuten

darauf hin, dass eventuell zwischen dem Einfluss verschiedener Glucocorticoide und der jeweiligen ADH-Stimulation unterschieden werden muss.

4.2 Keine Reduzierung der renalen Wasserrückresorption trotz ADH-Suppression

Es ist allgemein akzeptiert, dass ADH über renale V2R den Einbau von AQP2 in die apikale Zellmembran von Prinzipalzellen des Sammelrohrs vermittelt (siehe Abschnitt 1.3). Einigkeit herrscht ebenfalls darüber, dass ADH über die AQP2-Translokation den potentesten antidiuretischen Effekt in der Niere induziert ¹⁰⁵.

Wird endogen eine supraphysiologische Menge an ADH ausgeschüttet, spricht man vom Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion (SIADH) oder auch Schwartz-Barter-Syndrom. Klinisch äußert sich dies in einer hypotonen Verdünnungs-Hyponatriämie aufgrund von gesteigerter ADH-bedingter renaler Wasserrückresorption ¹⁰⁶. Schwerwiegende und irreversible neurologische Ausfälle im Hirnstamm können die Folge sein. Bei hospitalisierten Patienten ist SIADH eine Ursache von Hyponatriämie und tritt oft nach Schädel-Hirn-Traumata auf. Therapeutisch stehen heute unter anderem ADH-Antagonisten für die Behandlung des SIADH zur Verfügung ¹⁰⁷. Nicht selten wird die Hyponatriämie durch eine hohe ADH-Plasma-Konzentration hervorgerufen, die wiederum durch niedrige Cortisol-Plasma-Spiegel bedingt ist und mit exogenen Glucocorticoiden behandelt wird ^{55, 85}.

Entsprechend tritt bei endogenem Vasopressin-Mangel, dem sogenannten Diabetes insipidus centralis, eine massive Polyurie mit konsekutiver Polydipsie auf. Die Polyurie ist auf den verminderten ADH-Plasma-Spiegel zurückzuführen, der die unzureichende renale Wasserrückresorption bedingt ¹⁰⁸. Das ausgeschiedene Urinvolumen kann dabei mehr als 50 ml/kg Körpergewicht in 24 h betragen und die Urinosmolalität liegt unter 300 mOsmol/kg. Diabetes insipidus centralis kann genetisch bedingt oder erworben (z.B. in Folge von Traumata, Neoplasien, Infektionen, toxischen Noxen oder Gefäßmalformationen) sein. Die Therapie besteht in der Applikation von V2R-Agonisten wie Desmopressinacetat (Minirin®).

Bei den Probanden dieser Studie wurde das Plasma-ADH durch Prednisolon unter die Nachweisgrenze des RIA supprimiert und ließ sich auch durch Anstieg der Plasmaosmolalität im achtstündigen Durstversuch nicht in messbare Bereiche stimulieren (siehe Abbildung 3). Wendet man die von Diederich et al.⁸⁷ entwickelte Formel zur Diagnose des Diabetes insipidus an, so würden die Probanden unserer Studie nach Prednisoloneinnahme alle in die Kategorie des Diabetes insipidus fallen. Im basalen Durstversuch dagegen galten nach Diederich et al. alle Probanden als unauffällig. Doch diese Formel betrachtet allein das Verhältnis von Plasma-ADH zu Plasmaosmolalität und wurde ursprünglich zur Differentialdiagnose polyurischer Syndrome entwickelt. Keine Beachtung wird hingegen dem Urinvolumen oder der Urinosmolalität geschenkt. Würde Prednisolon einen Diabetes insipidus bei unseren Probanden imitieren - wie es nach der Formel von Diederich et al. scheint – müsste das Urinvolumen erhöht und die Urinosmolalität erniedrigt sein.

Aber es kam bei den Probanden dieser Studie zu keiner Änderung ihrer Wasserdiurese. Die Urinosmolalität stieg an allen drei Versuchstagen während der Durstversuche an (siehe Abbildung 13) und es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Anstiegen oder den AUCs (siehe Tabelle 3). Ebenfalls bestanden keine signifikanten Unterschiede des kumulierten Urinvolumens der Versuchstage. Zwar war das ausgeschiedene Urinvolumen am ersten Tag der Prednisoloneinnahme höher als am basalen Versuchstag, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant (siehe Tabelle 5). Die Korrelation von ausgeschiedenem Urinvolumen mit der entsprechenden Urinosmolalität war hoch (siehe Tabelle 4) und änderte sich trotz supprimierten Plasma-ADH nicht signifikant. Warum die Urinosmolalität um 12.00 Uhr an allen Tagen ein Minimum (Abbildung 13) und entsprechend das ausgeschiedene Urinvolumen ein Maximum (Abbildung 14) hatte, bleibt unklar. Pedersen et al.⁸⁶ haben ebenfalls Durstversuche am Menschen durchgeführt und beschrieben während der ersten vier Stunden einen Abfall der Urinosmolalität, nicht aber des Volumens. Die exakten Werte wurden leider nicht publiziert, was einen genauen Vergleich erschwert. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens wäre eine gesteigerte Flüssigkeitsaufnahme der Probanden vor Versuchsbeginn. Dies war laut Versuchsanweisung zwar nicht gestattet und alle Probanden verneinten auf explizites Nachfragen eine erhöhte Flüssigkeitsaufnahme vor Beginn des Durstens, diese kann aber nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die Beobachtung der erhaltenen Wasserdiurese unter Plasma-ADH-Supprimierung mittels exogenem Glucocorticoidexzess ist konsistent mit den Ergebnissen von Bähr et al.⁶⁴. Allerdings gibt es andere Arbeiten, die unter mehrtägiger Applikation von Cortisol am Menschen eine Steigerung des Urinvolumens zeigten^{109, 110}. Bei bis zu 23 % der Patienten, die unter einem Cushing-Syndrom mit endogenem Cortisolexzess leiden, wird eine Polyurie in Kombination mit Polydipsie beschrieben¹¹¹. Auch tierexperimentell resultiert sowohl exogener¹¹² als auch endogener¹¹³ Glucocorticoidexzess bei Hunden in einer Polyurie.

In der Literatur ist eine teilweise Steigerung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) unter Einnahme von Glucocorticoiden beschrieben¹¹⁴. Bei unseren Probanden wurde die GFR näherungsweise mittels der Kreatinin-Clearance im Plasma bestimmt. Unter Prednisolon wurde jedoch keine signifikante Hyperfiltration beobachtet. Auch wurde die GFR durch Dursten nicht signifikant beeinflusst. Die Autoregulation der Niere im Bereich eines mittleren arteriellen Blutdrucks von 70-180 mmHg scheint bei unseren Probanden demnach nicht außer Kraft gesetzt worden zu sein (siehe Abbildung 6).

4.2.1 Kein Einfluss der Glucocorticoide auf u-AQP2-Ausscheidung

Im vorangegangenen Abschnitt wurde demonstriert, dass sich die eingangs geäußerte Vermutung einer ADH-unabhängigen Wasserrückresorption bestätigt hat. Einleitend wurde gezeigt, dass die antidiuretische Wirkung von ADH mittels renaler AQP2-Insertion in die apikale Plasmamembran geschieht. Mit der Messung der u-AQP2-Ausscheidung im Urin der Probanden wollten wir näherungsweise Hinweise auf die apikale Insertion von AQP2 gewinnen. Es konnte wiederholt gezeigt werden, dass die Änderung des ADH-Spiegels im Plasma mit der ausgeschiedenen Menge an u-AQP2 korreliert^{115, 86}.

Wie vermutet kam es zu keiner signifikanten Änderung der kumulierten u-AQP2-Ausscheidung, trotz massiv reduziertem Plasma-ADH (siehe Abbildung 21). Ein geringer Unterschied bestand lediglich in der u-AQP2-Ausscheidung im Tagesverlauf. Während sie am basalen Versuchstag weitgehend konstant blieb, kam es unter Prednisolon jeweils zu einem leichten Anstieg der u-AQP2-Ausscheidung (siehe Abbildung 20). Auch nach Normierung auf die Kreatinin-Ausscheidung war keine signifikante Änderung der u-AQP2-Ausscheidung im Tagesverlauf oder unter Prednisoloneinnahme messbar (siehe Abbildung 22).

Am basalen Versuchstag kam es trotz eines signifikanten Anstieges des Plasma-ADH zu keiner Steigerung der u-AQP2-Ausscheidung. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sich kurzfristige Änderungen des ADH-Spiegels nicht unmittelbar in einer Änderung der u-AQP2-Ausscheidung widerspiegeln. Beispielsweise wurde in dehydrierten Long-Evans Ratten erst nach 16 Stunden ein signifikanter Anstieg von u-AQP2 festgestellt ⁷⁰. Auch Pedersen et al. ⁸⁶ beschrieben erst nach 12 Stunden Flüssigkeitsrestriktion einen signifikanten Anstieg von u-AQP2 bezogen auf die Kreatinin-Ausscheidung beim Menschen.

Mit Messung der u-AQP2-Ausscheidung nach Applikation des V2R-Agonisten Desmopressinacetat (Minirin®) am Ende jedes Durstversuches konnten wir überprüfen, ob die Signaltransduktion am V2R selbst durch die Glucocorticoide inhibiert wurde. Nach Gabe des V2R-Agonisten kam es jeweils zu einem signifikanten Anstieg der u-AQP2-Ausscheidung. Dieser Anstieg blieb unbeeinflusst von der Prednisoloneinnahme (siehe Abbildung 26). Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass nach Glucocorticoideinnahme die Signaltransduktion von der Aktivierung des V2R bis zur Insertion von AQP2 in die apikale Zellmembran erhalten blieb.

4.3 ADH-unabhängige renale Wasserrückresorption

Bis jetzt konnte gezeigt werden, dass ADH unter Prednisolon supprimiert wurde. Gleichzeitig kam es zu keiner Änderung der renalen Wasserausscheidung. Ebenfalls unverändert blieb die u-AQP2-Ausscheidung im Urin. Bringt man diese drei Beobachtungen in einen gemeinsamen Kontext, wird die Existenz von ADH-unabhängigen Mechanismen einer AQP2-vermittelten Wasserrückresorption sehr wahrscheinlich. Einleitend wurden denkbare Mechanismen einer solchen ADH-unabhängigen Wasserrückresorption aufgezeigt (vgl. Abs. 1.5). Diese werden nachfolgend anhand der *in vivo* Resultate der vorliegenden Arbeit diskutiert.

4.3.1 RAAS-induzierter Einbau von AQP2?

Wie gerade in einem aktuellen Review ¹⁰⁵ aufgezeigt, konnten bis heute nicht alle Details der AQP2-Translokation abschließend geklärt werden. Etabliert ist inzwischen die V2R-vermittelte intrazelluläre cAMP-Erhöhung mit konsekutiver Aktivierung von PKA und resultierender Phosphorylierung von AQP2 an Ser²⁵⁶. Diese ADH-vermittelte

Aktivierung der Signalkaskade führt letztlich zur Translokation von AQP2 aus Vesikeln in die apikale Zellmembran⁷⁶.

Das Mineralocorticoid Aldosteron kann ebenfalls eine Erhöhung der cAMP-Konzentration in renalen Sammelrohrenzellen bewirken oder dort die ADH-vermittelte cAMP-Erhöhung verstärken⁷³. Aldosteron ist Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und wird in der Zona glomerulosa in der Nebennierenrinde aus Cholesterinestern synthetisiert. Es fördert die renale Natriumretention und Kaliumausscheidung. Sekretionsstimuli für Aldosteron sind Angiotensin II (als Teil des RAAS), Hyperkaliämie, Hyponatriämie sowie in geringerem Maße der Plasma-ACTH-Spiegel¹¹⁶. Hemmend wirken Hypokaliämie, Hypernatriämie, Somatostatin oder auch ANP¹¹⁷.

Bei den Probanden unserer Studie kam es unter Prednisoloneinnahme zu einer deutlichen Zunahme der Aktivierung des RAAS. Unter Prednisolon stieg die Plasma-Reninkonzentration im Tagesverlauf signifikant an (siehe Abbildung 9 und Abbildung 10). Signifikant war auch der Anstieg der Aldosteron-AUC unter Prednisolon im Vergleich zum basalen Versuchstag (siehe Abbildung 12). Der starke Renin-Anstieg ist insofern erstaunlich, als Renin durch ANP inhibiert wird¹¹⁸, welches ebenfalls stark anstieg (siehe Abbildung 7).

Als Erklärung des beobachteten Aldosteron-Anstiegs in unserer Studie kommt weder eine Steigerung des ACTH-Spiegels (Abbildung 28), noch eine Hyponatriämie (Abbildung 4) in Frage. Als mögliche Stimuli bleiben der leichte Anstieg der Serum-Kaliumkonzentration (Abbildung 5) und die signifikante Erhöhung des Renin- und damit des Angiotensin II-Spiegels (Abbildung 9). Möglicherweise lag eine Kombination dieser beiden Stimuli vor. Mit ADH war zudem ein potenter Renin-Inhibitor supprimiert¹¹⁹.

In Anbetracht der Tatsache, dass Aldosteron in der Niere zu Natriumretention und Kaliumausscheidung führt, scheinen die Messungen der Elektrolyte im Urin auf den ersten Blick verwirrend. Bei den Probanden dieser Studie erhöhte sich sowohl die Natrium- als auch die Kaliumkonzentration des Urins (siehe Abbildung 16 und Abbildung 18), jedoch waren diese Effekte nicht Prednisolon-abhängig. Möglicherweise bewirkte Aldosteron in Abwesenheit von ADH über Bindung an einen membranständigen Mineralocorticoidrezeptor⁷¹ eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung⁷³ mit konsekutiver Translokation von AQP2 in die apikale Zellmembran. Zwar besitzt auch Prednisolon selbst eine Mineralocorticoid-Potenz¹²⁰, jedoch ist diese so schwach¹²¹,

dass eine ausreichende Aktivierung des Mineralocorticoidrezeptors durch Prednisolon unwahrscheinlich ist⁷³.

Eine andere Arbeit legt die Vermutung nahe, dass Aldosteron über einen klassischen intrazellulären Mineralocorticoidrezeptor an der Translokation von AQP2 beteiligt ist. Bei gesunden Ratten kam es unter Applikation eines Aldosteron-Antagonisten zu einer signifikant erhöhten Urinausscheidung mit verminderter Urinosmolalität¹²². Mittels semiquantitativem Immunoblotting konnte in dieser Studie gleichzeitig eine 45 % Reduktion der AQP2-Expression in Anwesenheit des Aldosteron-Antagonisten nachgewiesen werden. *In vitro* wurde bei der Applikation von Aldosteron in Kulturen muriner Sammelrohrzellen zwischen einem lang- und einem kurzfristigen Effekt unterschieden werden. Innerhalb der ersten 24 Stunden kam es zu einer verminderten AQP2-Expression. Bei längerer Aldosterongabe hingegen wurde die AQP2-Expression gesteigert¹²³.

Ein möglicher intrazellulärer cAMP-Anstieg in den Sammelrohrzellen konnte nicht als Anstieg von cAMP im Urin nachgewiesen werden⁶⁴. Inwiefern die Ausscheidung von cAMP im Urin mit einem intrazellulären cAMP-Anstieg in den Prinzipalzellen des Sammelrohrs gleichgesetzt werden kann, ist jedoch unklar.

Auch wenn die beobachtete Aktivierung des RAAS unter Prednisoloneinnahme signifikant war und es Hinweise für einen Aldosteron-vermittelten AQP2-Einbau gibt, sprechen die Messungen von cAMP im Urin⁶⁴ dagegen, dass der Aldosteron-induzierte cAMP-Anstieg alleine die ADH-unabhängige Wasserrückresorption bedingt hat.

4.3.2 ANP-induzierter Einbau von AQP2?

Das Atriale Natriuretische Peptid für eine gesteigerte Wasserrückresorption verantwortlich zu machen, erscheint im ersten Moment nicht besonders naheliegend. Denn schon aus seinem Namen lässt sich die Schlüsselfunktion dieses Hormons ableiten. Es bewirkt in der Niere eine gesteigerte Natriuresis mit konsekutiver Erhöhung der Wasserausscheidung. So soll der Körper vor Volumenüberlastung geschützt werden. ANP ist zudem ein potenter Vasodilatator und wirkt hemmend auf das RAAS. Klassischer Weise wird ANP daher Gegenspieler von ADH gesehen.

Jedoch gibt es zunehmend Hinweise, dass das renale Zusammenspiel von ADH und ANP synergistisch sein könnte (siehe Abs. 1.5). *In vitro* konnte in Sammelrohrzellen von Ratten die Existenz eines ANP-Rezeptors nachgewiesen werden¹²⁴, der eine

intrazelluläre cGMP-Erhöhung bewirkt²⁹. Ebenfalls *in vitro* wurde die cGMP-abhängige intrazelluläre Translokation von AQP2 gezeigt, die durch ANP hervorgerufen wird²⁹. Dabei aktiviert ANP über cGMP die Proteinkinase G - anstelle der cAMP vermittelten Aktivierung vom Proteinkinase A – und vermittelt so die Phosphorylierung von Ser²⁵⁶.

Unter Prednisoloneinnahme war der Plasma-ANP-Spiegel signifikant erhöht (siehe Abbildung 7). Die ANP-AUC war unter Prednisolon ebenfalls signifikant gesteigert (siehe Abbildung 8). Die Änderung des Plasma-ANP korrelierte nicht mit der Änderung der Natriumausscheidung im Urin ($r = 0,321$). Auch nahm unter Prednisolon die kumulierte Natriumausscheidung nicht signifikant zu (siehe Abbildung 17), wie es nach der Steigerung von ANP im Plasma zu erwarten gewesen wäre. Die Natriumkonzentration im Serum stieg ebenfalls unter Prednisolon trotz deutlich erhöhtem Plasma-ANP an (siehe Abbildung 4). Diese Befunde zeigen, dass unter exogenem Glucocorticoidexzess und supprimiertem ADH der natriuretische Effekt von ANP nicht zum Tragen kam.

In Durstversuchen ohne Prednisoloneinnahme wurde auch von anderen Arbeitsgruppen kein Anstieg von ANP im Tagesverlauf beschrieben⁸⁶, was sich mit unseren Beobachtungen am basalen Tag deckte. Dagegen wurde in Ratten eine signifikante Erhöhung des Plasma-ANP nach zentraler osmotischer Stimulation¹⁰³ sowie nach exogener Stimulation mit dem Glucocorticoid Dexamethason gezeigt¹²⁵.

Das signifikant erhöhte Plasma-ANP könnte über cGMP den ADH-unabhängigen Einbau von AQP2 in die apikale Plasmamembran bewirkt haben und die erhaltene Wasserrückresorption erklären²⁹. Starklint et al.¹²⁶ beschrieben bei Probanden nach Nahrungskarenz und anschließender hyperosmolarer Stimulation ebenfalls eine ANP-Erhöhung im Plasma. Sie sahen in dieser Erhöhung eine mögliche Erklärung für die ebenfalls erhöhte Ausscheidung von u-AQP2. Passend zu der Vermutung einer cGMP-abhängigen AQP2-Insertion ist die oben angeführte⁶⁴ Abnahme der cAMP-Ausscheidung im Durstversuch unter Prednisolon.

Zunehmend rücken zentrale Funktionen von ANP in den Vordergrund. Es gelang der immunreaktive Nachweis von ANP im PVN, SON und der Neurohypophyse¹²⁷. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass endogenes ANP einen direkten

Einfluss auf die Oxitocin-Synthese als Antwort auf osmotische Stimuli besitzt ¹²⁸. Durch Hypertonizität werden zentrale ANPerge Neuronen aktiviert, wodurch die Oxitocin-Sekretion stimuliert wird. In Kulturen muriner Hypophysenvorderlappenzellen inhibierte ANP die CRH-stimulierte ACTH-Freisetzung und nahm so Einfluss auf die Regulierung der HPA ¹²⁹. Eine entsprechende zentrale neuroendokrine Regulierung des Wasser- und Elektrolythaushalts durch ANP wurde von Antunes-Rodrigues et al. ¹³⁰ bereits beschrieben.

Das renale Zusammenspiel von ADH und ANP ist noch weitgehend ungeklärt und es gibt darüber widersprüchliche Aussagen in der Literatur. Einige Arbeiten beschreiben *in vitro* eine ANP-vermittelte Inhibition von ADH in der Niere ¹³¹. Andere postulieren einen biphasischen Effekt von ANP auf die Natriurese und Diurese. Nach einer zehnminütigen Steigerung der Natriurese und Diurese unter ANP-Infusion beschrieben Wang et al. ¹³² nach 90 Minuten einen vermehrten Einbau von AQP2 sowie eine erhöhte Wasserrückresorption. Inwieweit dieser Effekt kompensatorisch oder ANP-vermittelt ist, blieb unklar.

Es kann festgehalten werden, dass wir erstmals *in vivo* am Menschen zeigen konnten, dass es unter Prednisolon trotz ADH-Suppression zu einer signifikanten ANP-Erhöhung im Plasma kam. Diese Erhöhung bestand basal und ließ sich zusätzlich im Durstversuch steigern. Kombiniert man dies mit den eindeutigen Ergebnissen von tierexperimentellen und *in vitro* Arbeiten, so ist eine ANP-vermittelte AQP2-Translokation zur Aufrechterhaltung der renalen Wasserrückresorption sehr wahrscheinlich. Zur weiteren Analyse wäre eine gleichzeitige Bestimmung von sowohl cGMP- und u-AQP2-Ausscheidung im Urin als auch der Plasma-ANP- und Plasma-ADH-Spiegel in Nachfolgestudien sinnvoll. Es ist vorstellbar, dass die ANP-Erhöhung über eine zentrale Rückkopplung getriggert wurde.

4.3.3 Verschiebt PGE2 die Relation von Endo-und Exozythose der AQP2-Translokation in Abwesenheit von ADH?

Wie einleitend erläutert, antagonisiert Prostaglandin E2 vermutlich die ADH-induzierte Translokation von AQP2 in die apikale Zellmembran der Sammelrohrzellen ⁸⁰. Nach Bindung an den EP3-Rezeptor kann PGE2 nach Aktivierung von Rho mit nachfolgender Actin-Polymerisation die Translokation von AQP2 verhindern. Es wurde ebenfalls in

verschiedenen Arbeiten gezeigt, dass die ADH-vermittelte cAMP-Erhöhung durch PGE2 inhibiert wird^{133, 134}. Zudem scheint PGE2 die Exozytose von AQP2 und damit den Ausbau aus der apikalen Zellmembran zu fördern⁸¹.

Manche Arbeiten zeigen eine ADH-vermittelte Stimulation der Bildung von PGE2^{78, 79}, daher kann PGE2 als eine Art renaler Schutzmechanismus verstanden werden. Im Sinne eines negativen Feedbacks antagonisiert PGE2 die antidiuretische Wirkung von ADH und reguliert so die renale Feinabstimmung. Nach Machida et al.⁸² kann PGE2 die ADH-Wirkung sowohl akut über eine Hemmung des cAMP-Anstieges modulieren als auch längerfristig durch eine Inhibition von V2R-mRNA-Expression. Durch Hemmung der COX-2 können Glucocorticoide die PGE2-Synthese hemmen¹³⁵.

Nach dieser Theorie bliebe die Balance der Wasserrückresorption erhalten, wenn die renale PGE2-Synthese bei supprimiertem ADH ebenfalls verringert wäre. Unsere Resultate konnten dies allerdings nicht bestätigen. Die PGE2-Ausscheidung im Urin der Probanden wurde durch die Prednisoloneinnahme nicht verringert (siehe Abbildung 23 und Abbildung 24). Die Ausscheidungsrate stieg sogar unter Prednisolon im Tagesverlauf stärker als am basalen Versuchstag (siehe Abbildung 25). Die eingangs geäußerte Hypothese, dass Prednisolon über eine COX-2 Inhibierung die PGE2-Synthese reduzieren würde, konnte damit nicht bestätigt werden.

Insgesamt erscheint es etwas problematisch aus dem im Urin gemessenen PGE2 auf die Menge von aktivem PGE2 in den renalen Sammelrohrzellen zu schließen. PGE2 ist ein Eicosanoid, das ubiquitär im Körper lokal synthetisiert und auch abgebaut wird. Die Halbwertszeit von PGE2 beträgt nur wenige Minuten. Im Gegensatz zu den klassischen Hormonen erreicht PGE2 seine Erfolgszellen nicht über die systemische Zirkulation. Es ist dennoch möglich, dass das im Urin gemessene PGE2 auch aus anderen Organen des Körpers stammte und nicht allein die lokale Konzentration in den Sammelrohrzellen widerspiegelte.

Nach pharmakologischer Stimulation des V2R mit Desmopressinacetat stieg die PGE2-Konzentration im Urin leicht an (siehe Abbildung 27). Prednisolon hatte dabei keinen signifikanten Einfluss auf die Stärke des Anstieges. Dies legt die Vermutung nahe, dass die oben beschriebene ADH-induzierte Stimulation der PGE2-Synthese über V2R vermittelt wird. Eine mögliche Inhibierung der PGE2-Synthese in den Sammelrohrzellen der Niere durch Prednisolon konnten wir mittels der PGE2-Ausscheidung im Urin nicht

nachweisen. Denkbar wäre allerdings, dass die Prednisolon-vermittelte Inhibierung der COX-2 durch eine von Zhang et al. ¹³⁶ beschriebene Erhöhung der COX-2-Immunoreaktivität mittels des Mineralocorticoids Aldosteron ausgeglichen wurde.

Mit unseren Ergebnissen konnten wir die von Pedersen et al. ⁸³ beschriebene Erhöhung der u-AQP2-Ausscheidung unter dem COX-2 Inhibitor Ibuprofen nicht für den COX-2 Inhibitor Prednisolon bestätigen.

Es ist davon auszugehen, dass PGE2 entscheidend an der Regulierung der renalen Wasserrückresorption beteiligt ist. Allerdings lässt sich durch unsere Ergebnisse eine verminderte PGE2-Synthese als Antwort auf die supprimierten ADH-Spiegel unter Prednisoloneinnahme nicht nachweisen. Um ein genaues Verständnis der PGE2-vermittelten Balance der AQP2-Translokation beim Menschen zu bekommen, wären Nierenbiopsien notwendig.

4.4 Exkurs: Mögliche Mechanismen der ADH-Suppression unter Prednisolon

Prednisolon ist ein synthetisches Glucocorticoid, das ungefähr viermal so potent ist wie das physiologisch beim Menschen zirkulierende Cortisol. Die Halbwertszeit von Prednisolon liegt bei 3 Stunden und die Wirkdauer bei ca. 12-36 Stunden ¹³⁷. Prednisolon ist lipophil und kann daher die Blut-Hirn-Schranke gut passieren. Nach oraler Applikation von Prednisolon beträgt die Bioverfügbarkeit beim Menschen $82 \pm 13 \%$ (MW \pm SD) ¹³⁷. Der Wirkeintritt ist dosisabhängig, kann aber nach oraler Einnahme von 20 mg Prednisolon bereits nach wenigen Minuten eintreten ¹³⁸. Der Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration nach oraler Einnahme von 30 mg Prednisolon wird nach $1,5 \pm 0,5$ Stunden (MW \pm SD) erreicht. Dann ist eine maximale Konzentration von 458 ± 150 ng/ml (MW \pm SD) Prednisolon im Plasma zu erwarten ^{120, 139}. Bei unseren Probanden wurden die Prednisolonspiegel 2 Stunden nach oraler Einnahme bestimmt und lagen bei 370 ± 10 ng/ml am ersten Tag der Prednisoloneinnahme und bei 330 ± 10 ng/ml nach fünf Tagen Prednisolon (siehe Tabelle 7). Wir schließen daraus, dass das Prednisolon von allen Probanden regelrecht eingenommen und enteral resorbiert wurde.

Die signifikante Verringerung des Plasma-ACTH-Spiegels nach fünf Tagen Prednisoloneinnahme (siehe Abbildung 28) zeigt, dass die zentral erreichte

Konzentration von Prednisolon hoch genug war, um im Sinne eines negativen Feedbacks auf die HPA zu wirken. Die körpereigene CRH-Sekretion im PVN des Hypothalamus wurde so teilweise inhibiert und es kam im Hypophysenvorderlappen zur verminderten ACTH-Sekretion. Zusätzlich machte sich vermutlich der ADH-Mangel und damit das Fehlen eines zweiten Sekretagogums für ACTH bemerkbar.

In der Literatur ist der negative Feedback-Mechanismus von Cortisol auf die parvozellulären vasopressinergen Neurone, die direkten Einfluss auf die Regulierung der HPA haben, gut belegt⁵⁶. Aus unserer Beobachtung des massiv supprimierten Plasma-ADH, welches überwiegend in den hypothalamischen magnozellularären Neuronen des PVN und SON synthetisiert wird (vgl. Abschnitt 1.1), lassen sich zwei mögliche Rückschlüsse ziehen. Einerseits kann *in vivo* ein Glucocorticoidexzess beim Menschen zu einer Suppression der magnozellularären Vasopressin-synthetisierenden Neurone im Hypothalamus führen. Andererseits kann die Glucocorticoidwirkung auf Inhibition der neurohypophysären ADH-Sekretion beruhen. Ein kombinierter Einfluss auf beide Regionen ist ebenfalls möglich. Diskutiert werden muss darüber hinaus die Möglichkeit einer Glucocorticoid-abhängigen Modulation der zentralen Osmorezeptoren sowie eine Reduzierung der Plasmahalbwertszeit von ADH.

Für eine direkte Wirkung der Glucocorticoide auf hypothalamische magnozellularäre vasopressinerge Neurone spricht der Nachweis von Glucocorticoid-Rezeptoren (GR) im Zytoplasma dieser Neuronen. Der Nachweis wurde mittels Bindungsstudien des synthetischen Glucocorticoid-Agonisten [³H]RU-28362 an adrenalektomierten Ratten erbracht¹⁴⁰. Allerdings konnte in anderen Arbeiten immunhistochemisch erst nach zehntägiger hypoosmotischer Stimulation GR-Expression im SON nachgewiesen werden¹⁴¹. Durch diese zehntägige hypoosmotische Stimulation wird eine maximale Inhibition des Plasma-ADH und der ADH-mRNA im SON erreicht. Ohne diese vorherige Stimulation fanden sich keine GR im SON. Papanek et al.¹⁴² führten die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich des Vorkommens von GR im SON darauf zurück, dass es vermutlich verschiedene GR gibt, die noch nicht alle identifiziert sind. Werden beispielsweise Rezeptor-AK zum Nachweis verwendet, können andere Resultate erreicht werden, als wenn die Expression eines Gens gemessen wird. Auch könnte die Abspaltung von ADH aus pro-ADH durch Glucocorticoidgabe gehemmt worden sein. Erkut et al.⁶³ beschrieben post mortem eine geringere Vasopressin-

Expression in Hypothalami von mit Glucocorticoiden behandelten Patienten bei gleichbleibender pro-ADH Expression. Möglicherweise ist dies durch eine geringere Expression der Prohormon-Konvertasen PC-1 und PC-2 zu erklären¹⁴³. Dazu passen die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse von Papanek et al.¹⁴² aus Versuchen an SON-Zellen von Ratten. In Anwesenheit von Corticosteron beobachteten sie eine fehlende ADH-Sekretion nach osmotischer Stimulation. Da sie keine Änderung der ADH-mRNA registrierten, gehen sie von einem nicht genomischen Effekt des Glucocorticoids aus. Andere Arbeiten postulieren ebenfalls das Vorkommen eines membranständigen GR, über den die Vasopressin-Sekretion nicht-genomisch gehemmt wird¹⁴⁴.

Gegen die Vorstellung einer isolierten Hemmung der neurohypophysären ADH-Sekretion spricht eine Studie mit einem selektiven Modulator des Estrogenrezeptors (Tamoxifen) an Ratten. Dort wurde eine signifikante Supprimierung der Plasma-ADH-Spiegel gemessen, ohne dass im Vergleich zur Kontrollgruppe ein reduzierter ADH-Gehalt in der Neurohypophyse gemessen wurde¹⁴⁵.

Alternativ könnte Prednisolon die Empfindlichkeit der zentralen Osmorezeptoren modulieren bzw. die Antwort der magnozellulären vasopressinergen Neurone auf osmotische Stimulation. Diese These vertreten Biewenga et al.¹¹³ nach ihren Experimenten an Hunden mit endogenem Glucocorticoidexzess und supprimiertem Plasma-ADH. In *in vitro* Arbeiten wurde später gezeigt, dass durch Blockade der Synapsen an vasopressinergen Neuronen der Ratte eine Vasopressin-Antwort im Sinne von erhöhter ADH-mRNA auf osmotische Stimulation ausblieb¹⁴⁶. Dennoch ist es sehr unwahrscheinlich, dass Glucocorticoide die ADH-Suppression alleine über eine Modulation von Osmorezeptoren ausüben. Bei Hunden beobachteten Papanek et al.¹⁴⁷ eine Senkung des basalen ADH-Spiegels infolge mehrtägiger Glucocorticoidapplikation. Der ohne Medikamentengabe beobachtete Zusammenhang zwischen der Natriumkonzentration im Serum und des Plasma-ADH-Spiegels wurde durch die Glucocorticoidapplikation außer Kraft gesetzt. Daraus folgerten die Autoren, dass die Wirkung des Cortisols nicht mit der Idee einer alleinigen Modifikation der Osmorezeptoren zu vereinbaren ist.

Eine weitere Möglichkeit, die vorliegenden Ergebnisse zu erklären, wäre eine Prednisolon-vermittelte Senkung der Halbwertszeit von ADH im Plasma. Es finden sich

in der Literatur jedoch keine Hinweise auf einen solchen Effekt von Prednisolon auf die Halbwertszeit von ADH.

Am wahrscheinlichsten beruht die beobachtete ADH-Supprimierung unter oraler Einnahme von Prednisolon also auf einem negativen Feedback-Mechanismus auf hypothalamischer Ebene unter Einbeziehung der magnozellularen vasopressinergen Neurone des SON und PVN. Inwieweit dieser Effekt genomisch und/ oder nicht-genomisch vermittelt ist, kann nicht eindeutig geklärt werden. Andere Erklärungsmodelle wie eine Modulation der Osmorezeptoren, eine Inhibition der neurohypophysären Sekretion oder auch eine veränderte Halbwertszeit von ADH im Plasma sind wie oben dargelegt für eine Erklärung der Ergebnisse von untergeordneter Relevanz.

4.5 Limitationen dieser Arbeit

Die Interpretation der aufgezeigten Ergebnisse verlangt eine sorgfältige Analyse der spezifischen Limitationen, die im Zusammenhang dieser Arbeit zu bedenken sind. Limitationen ergeben sich vor allem aus dem Studiendesign, aus Defiziten der laborchemischen Bestimmungen, sowie den unterstellten biophysiological Zusammenhängen.

4.5.1 Limitationen im Studiendesign

Mit 12 Probanden ist die Fallzahl für statistische Berechnungen relativ klein. Bei der Bestimmung einiger Parameter, wurden einzelne Messergebnisse wegen Unplausibilität ausgeschlossen. Dadurch verringerte sich die Fallzahl einiger Messgrößen auf 9 bis 11. Aufgrund der teilweise beobachteten morgendlichen Elektrolytschwankungen sollte zukünftig bei klinischen Studien dieser Art die Nahrungsaufnahme während und unmittelbar vor den Durstversuchen standardisiert werden, um Nahrung als Störgröße auszuschließen. Neben der Nahrungsaufnahme sollte die Flüssigkeitsaufnahme in den 12 Stunden vor Beginn des Durstversuches festgelegt werden. Möglicherweise könnten damit die großen Unterschiede zwischen den morgendlichen Urinosmolalitäten verhindert werden. Außerdem ließe sich so eine unbewusste vorsorgliche Flüssigkeitsaufnahme unterbinden. Interessant wäre in diesem Zusammenhang, ob das

beobachtete „12.00-Uhr-Phänomen“ (max. Urinvolumen und min. Urinosmolalität; siehe Abbildung 13 und Abbildung 14) unter diesen Bedingungen persistieren würde.

4.5.2 Limitationen der laborchemischen Bestimmungen

Ein kritischer Punkt dieser Arbeit besteht in der Empfindlichkeit des Vasopressin-RIA. Die Nachweisgrenze dieses RIA lag bei 0,4 pg/ml und war damit im Vergleich zu anderen Nachweismethoden oder kommerziell erhältlichen RIA sehr niedrig. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass ADH in Konzentrationen unter 0,4 pg/ml einen signifikanten Einfluss auf die Nierenfunktion ausübt. Beispielsweise wäre eine sukzessive Adaptation der magnozellularen vasopressinergen Neurone an die erhöhten Glucocorticoidspiegel denkbar, welche in einer Erhöhung des Vasopressin-Sekretion resultieren könnte. Eine mögliche Erhöhung im Bereich von 0 bis 0,4 pg/ml konnte aber von unserem RIA nicht erkannt werden. Dieses Problem wird erst zu lösen sein, wenn empfindlichere Nachweismethoden verfügbar und etabliert werden.

4.5.3 Limitationen der zugrunde gelegten biophysiologicalen Zusammenhänge

Ohne Nierenbiopsien konnten wir keine AQP2-Konzentration in den Prinzipalzellen des Sammelrohrs der Niere messen. Näherungsweise konnten wir daher nur die u-AQP2-Ausscheidung im Urin der Probanden messen. Es ist inzwischen allgemein anerkannt, aus einem Anstieg von u-AQP2 im Urin auf einen vermehrten Einbau von AQP2 in die apikale Zellmembran zu folgern⁸⁶. Für diese Annahme sprechen sicherlich auch unsere Ergebnisse. Nach pharmakologischer Stimulierung des V2R kam es zu einer signifikanten Erhöhung der u-AQP2-Ausscheidung im Urin. Allerdings ist nicht abschließend geklärt, ob sich diese beiden Werte proportional zueinander entwickeln. Wahrscheinlich entspricht die Menge der u-AQP2-Ausscheidung nicht der Menge an eingebautem AQP2 sondern nur wenigen Prozent hiervon¹¹⁵. Der überwiegende Teil von AQP2 wird intrazellulär recycelt. Allerdings stieg bei Ratten nach 48-stündiger Flüssigkeitsrestriktion die renale AQP2-Konzentration vierfach an, wohingegen die Ausscheidung von u-AQP2 im Urin um das Neunfache stieg¹¹⁵. Ebenfalls besteht nicht immer ein Zusammenhang zwischen der Urinosmolalität und der u-AQP2-Ausscheidung¹⁴⁸. Es ist denkbar, dass das im Urin gemessene u-AQP2 nicht durch die Membraninsertion sondern durch den Ausbau von AQP2 entsteht. Es ist darüber hinaus

unklar, ob das Verhältnis zwischen ausgeschiedenem u-AQP2 und recyceltem AQP2 fest oder variabel ist.

Dennoch bietet die u-AQP2-Bestimmung aktuell die einzige Möglichkeit *in vivo* am Menschen Rückschlüsse auf die Veränderungen intrarenaler AQP2-Translokationen zu ziehen. Wünschenswert wären hier Tierexperimente, die sich explizit der Beziehung von u-AQP2 zu AQP2 in verschiedenen Hydrationszuständen sowie in An- und Abwesenheit von ADH widmen. Da ähnlich zum AQP2 auch Einschränkungen bei möglichen Rückschlüssen aus Bestimmung von cAMP und PGE2 im Urin bestehen, könnten in einem solchen Tierexperiment gleichzeitig intrarenale Messungen dieser beiden Stoffe erfolgen. Wir hielten es für unververtretbar an gesunden Probanden Nierenbiopsien vorzunehmen.

5 Zusammenfassung

Die renale Wasserückresorption mittels des hochspezifischen Aquaporin-2-Wasserkanals in den Prinzipalzellen des Sammelrohrs ist ein wesentlicher Mechanismus der Aufrechterhaltung der Homöostase des menschlichen Wasser- und Elektrolythaushalts. Lange wurde angenommen, dass allein das Antidiuretische Hormon (ADH) nach Bindung am Vasopressin-2-Rezeptor (V2R) über eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung die Translokation von Aquaporin-2 (AQP2) in die apikale Zellmembran der Prinzipalzellen bewirkt. Allerdings wurde 2006 eine ADH-unabhängige renale Wasserrückresorption unter exogener Glucocorticoidzufuhr beschrieben. Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren

- (1) die Suppression des Plasma-ADH unter exogener Glucocorticoidzufuhr an einer größeren Probandenzahl *in vivo* zu überprüfen,
- (2) die ADH-unabhängige Antidiurese zu bestätigen und
- (3) die biophysiologicalen Vorgänge einer ADH-unabhängigen renalen Wasserückresorption zu untersuchen.

Um den negativen Feedback von exogenen Glucocorticoiden auf die ADH-Sekretion zu untersuchen, wurden an 12 gesunden männlichen Probanden standardisierte Durstversuche durchgeführt. Auf einen basalen Durstversuch ohne Medikamenteneinnahme folgten zwei weitere Durstversuche am ersten und letzten Tag einer fünftägigen Einnahme von 30 mg/d Prednisolon oral. Für die Beurteilung der intrazellulären AQP2-Translokation wurde die Ausscheidung von urinary-AQP2 (u-AQP2) im Urin bestimmt. Im Anschluss an das achtstündige Dursten wurden jeweils 4 µg des V2R-Agonisten Desmopressinacetat i.v. appliziert.

Im basalen Durstversuch ohne Glucocorticoidaufnahme stieg das Plasma-ADH signifikant von $0,45 \pm 0,09$ auf $1,79 \pm 0,15$ pg/ml an. Unter Prednisolon stieg das Plasma-ADH auch nach achtstündigem Dursten nicht über die Nachweisgrenze des verwendeten Radioimmunoassays von 0,4 pg/ml an. Keine signifikanten Unterschiede gab es beim Anstieg der Plasmaosmolalität, der jeweils 8,1 % betrug.

Trotz des supprimierten Plasma-ADH wurde der Urin im Tagesverlauf entsprechend konzentriert. Die Prednisoloneinnahme hatte keinen Einfluss auf die Ausscheidung von u-AQP2 während des Durstens. Diese Ergebnisse machen die Existenz von ADH-unabhängigen Mechanismen der AQP2-Translokation wahrscheinlich. Nach pharmakologischer Stimulation des V2R kam es unabhängig von der

Prednisoloneinnahme zur signifikanten Steigerung der Ausscheidung von u-AQP2. Dies impliziert, dass Prednisolon die Signaltransduktion am V2R nicht modulierte.

Unter Prednisoloneinnahme waren die Plasmaspiegel des Atrialen Natriuretischen Peptids (ANP) signifikant erhöht. In der Tat wurde bereits *in vitro* gezeigt, dass ANP über einen cGMP-vermittelten Mechanismus die AQP2-Translokation in die apikale Zellmembran der renalen Sammelrohrzellen und damit die Wasserrückresorption bewirken kann. Unsere Daten unterstützen die Möglichkeit der Existenz des gleichen Mechanismus *in vivo*.

Unter Prednisolon wurde zudem in dieser Arbeit eine signifikante Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) festgestellt. 2009 wurde ein membranständiger Aldosteronrezeptor in renalen Sammelrohrzellen nachgewiesen, dessen Aktivierung dort eine cAMP-Erhöhung und damit die Translokation von AQP2 in die apikale Zellmembran bewirken kann. Über diesen Pathomechanismus könnte der erhöhte Aldosteron-Spiegel zur erhaltenen Antidiurese beigetragen haben.

Prednisolon hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Prostaglandin E2 (PGE2) Ausscheidung im Urin. Somit konnte eine vermutete Inhibierung der COX-2-Synthese und damit Inhibierung der renalen Prostaglandinsynthese durch Prednisolon nicht bestätigt werden.

In dieser Arbeit wurde zusammenfassend gezeigt, dass es

- (1) unter Prednisolon zu einer signifikanten Supprimierung des Plasma-ADH mit
- (2) erhaltener AQP2-vermittelter renaler Antidiurese kam und
- (3) die zugrundeliegenden biophysiologicalen Mechanismen der ADH-unabhängigen Wasserrückresorption folgendermaßen interpretiert werden können: Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die Hypothese, dass das Phänomen der ADH-unabhängigen Antidiurese auf den signifikant erhöhten Plasma-ANP-Spiegel zurückzuführen ist. Vermutlich induzierte ANP über cGMP die ADH-unabhängige Translokation von AQP2 in die apikale Zellmembran. Unterstützend könnte der beobachtete Aldosteron-Anstieg über cAMP ebenfalls den Einbau von AQP2 bewirkt haben. Eine Prednisolon-vermittelte Hemmung der COX-2 abhängigen PGE2-Synthese und damit Hemmung eines ADH-Antagonisten wurde hingegen nicht beobachtet.

6 Literaturverzeichnis

1. Acher R, Chauvet J, Rouille Y. Dynamic processing of neuropeptides: sequential conformation shaping of neurohypophysial preprohormones during intraneuronal secretory transport. *J Mol Neurosci* 2002;18:223-228.
2. de Bree FM. Trafficking of the vasopressin and oxytocin prohormone through the regulated secretory pathway. *J Neuroendocrinol* 2000;12:589-594.
3. Barat C, Simpson L, Breslow E. Properties of human vasopressin precursor constructs: inefficient monomer folding in the absence of copeptin as a potential contributor to diabetes insipidus. *Biochemistry* 2004;43:8191-8203.
4. Brownstein MJ, Russell JT, Gainer H. Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science* 1980;207:373-378.
5. Sawchenko PE and Swanson LW. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 1982;205:260-272.
6. Hallbeck M, Hermanson O, Blomqvist A. Distribution of preprovasopressin mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 1999;411:181-200.
7. de Vries GJ and Miller MA. Anatomy and function of extrahypothalamic vasopressin systems in the brain. *Prog Brain Res* 1998;119:3-20.
8. de Vries GJ, Buijs RM, Van Leeuwen FW. Sex differences in vasopressin and other neurotransmitter systems in the brain. *Prog Brain Res* 1984;61:185-203.
9. Turner RA, Pierce JG, du Vigneaud V. The purification and the amino acid content of vasopressin preparations. *J Biol Chem* 1951;191:21-28.
10. Bähr V, Hensen J, Hader O, Oelkers W. Effects of osmotically stimulated endogenous vasopressin on basal and CRH-stimulated ACTH release in man. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1988;117:103-108.
11. Whitnall MH. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog Neurobiol* 1993;40:573-629.
12. Hiroshima M, Aoyagi T, Fujiwara Y et al. Hypermetabolism of fat in V1a vasopressin receptor knockout mice. *Mol Endocrinol* 2006;21:247-58.
13. Tanoue A. New topics in vasopressin receptors and approach to novel drugs: effects of vasopressin receptor on regulations of hormone secretion and metabolisms of glucose, fat, and protein. *J Pharmacol Sci* 2009;109:50-52.
14. Carter CS, Grippo AJ, Pournajafi-Nazarloo H, Ruscio MG, Porges SW. Oxytocin, vasopressin and sociality. 2008;Volume 170:331-336.
15. Young LJ and Wang Z. The neurobiology of pair bonding. *Nat Neurosci* 2004;7:1048-1054.

16. Bosch OJ and Neumann ID. Brain vasopressin is an important regulator of maternal behavior independent of dams' trait anxiety. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(44):17139-44.
17. Caldwell HK, Lee HJ, Macbeth AH, Young WS, III. Vasopressin: Behavioral roles of an "original" neuropeptide. *Prog Neurobiol* 2007;84:1-24.
18. Walum H, Westberg L, Henningsson S et al. Genetic variation in the vasopressin receptor 1a gene (AVPR1A) associates with pair-bonding behavior in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:14153-6.
19. Lim MM, Hammock EA, Young LJ. The role of vasopressin in the genetic and neural regulation of monogamy. *J Neuroendocrinol* 2004;16:325-332.
20. de Wied, Diamant M, Fodor M. Central nervous system effects of the neurohypophyseal hormones and related peptides. *Front Neuroendocrinol* 1993;14:251-302.
21. de Bree F. Neuropeptides in the therapy of Alzheimer's disease. *Drug News Perspect* 2001;14:151-157.
22. Bielsky IF and Young LJ. Oxytocin, vasopressin, and social recognition in mammals. *Peptides* 2004;25:1565-1574.
23. Bielsky IF, Hu SB, Ren X, Terwilliger EF, Young LJ. The V1a vasopressin receptor is necessary and sufficient for normal social recognition: a gene replacement study. *Neuron* 2005;47:503-513.
24. Thompson RR, George K, Walton JC, Orr SP, Benson J. Sex-specific influences of vasopressin on human social communication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:7889-94.
25. Simon NG, Guillon C, Fabio K et al. Vasopressin antagonists as anxiolytics and antidepressants: recent developments. *Recent Pat CNS Drug Discov* 2008;3:77-93.
26. Maybauer MO, Maybauer DM, Enkhbaatar P, Traber DL. Physiology of the vasopressin receptors. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2008;22:253-263.
27. Kitano H, Suzuki M, Kitanishi T et al. Regulation of inner ear fluid in the rat by vasopressin. *Neuroreport* 1999;10:1205-1207.
28. Frokiaer J, Nielsen S, Knepper MA. Molecular physiology of renal aquaporins and sodium transporters: exciting approaches to understand regulation of renal water handling. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2827-2829.
29. Bouley R, Breton S, Sun T et al. Nitric oxide and atrial natriuretic factor stimulate cGMP-dependent membrane insertion of aquaporin 2 in renal epithelial cells. *J Clin Invest* 2000;106:1115-1126.
30. Boone M and Deen PM. Physiology and pathophysiology of the vasopressin-regulated renal water reabsorption. *Pflugers Arch* 2008;456:1005-24.

31. Kim GH, Ecelbarger CA, Mitchell C, Packer RK, Wade JB, Knepper MA. Vasopressin increases Na-K-2Cl cotransporter expression in thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol* 1999;276:F96-F103.
32. Knepper MA, Kim GH, Fernandez-Llama P, Ecelbarger CA. Regulation of thick ascending limb transport by vasopressin. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:628-634.
33. Sands JM. Regulation of renal urea transporters. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:635-646.
34. Aoyagi T, Izumi Y, Hiroyama M et al. Vasopressin Regulates the Renin-Angiotensin-Aldosterone System via V1a Receptors in the Macula Densa Cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295:100-7.
35. Thibonnier M, Coles P, Thibonnier A, Shoham M. Molecular pharmacology and modeling of vasopressin receptors. *Prog Brain Res* 2002;139:179-196.
36. Masutani S, Senzaki H, Ishido H et al. Vasopressin in the treatment of vasodilatory shock in children. *Pediatr Int* 2005;47:132-136.
37. Gillies GE, Linton EA, Lowry PJ. Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature* 1982;299:355-357.
38. Grazzini E, Boccara G, Joubert D et al. Vasopressin regulates adrenal functions by acting through different vasopressin receptor subtypes. *Adv Exp Med Biol* 1998;449:325-334.
39. Folny V, Raufaste D, Lukovic L et al. Pancreatic vasopressin V1b receptors: characterization in In-R1-G9 cells and localization in human pancreas. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E566-E576.
40. O'Carroll AM, Howell GM, Roberts EM, Lolait SJ. Vasopressin potentiates corticotropin-releasing hormone-induced insulin release from mouse pancreatic beta-cells. *J Endocrinol* 2008;197:231-239.
41. Antoni FA. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocr Rev* 1986;7:351-378.
42. Vale W, Spiess J, Rivier C, et al. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin. *Science* 1981;213:1394-1397.
43. Kempna P and Flück CE. Adrenal gland development and defects. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2008;22:77-93.
44. Wang W, Murphy B, Dow KE, David AR, Fraser DD. Systemic adrenocorticotrophic hormone administration down-regulates the expression of corticotropin-releasing hormone (CRH) and CRH-binding protein in infant rat hippocampus. *Pediatr Res* 2004;55:604-610.

45. Keller-Wood ME and Dallman MF. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev* 1984;5:1-24.
46. Derijk R and Berkenbosch F. The immune-hypothalamo-pituitary-adrenal axis and autoimmunity. *Int J Neurosci* 1991;59:91-100.
47. Gillies G and Lowry P. Corticotrophin releasing factor may be modulated vasopressin. *Nature* 1979;278:463-464.
48. Turkelson CM, Thomas CR, Arimura A, Chang D, Chang JK, Shimizu M. In vitro potentiation of the activity of synthetic ovine corticotropin-releasing factor by arginine vasopressin. *Peptides* 1982;3:111-113.
49. Rivier C, Rivier J, Mormede P, Vale W. Studies of the nature of the interaction between vasopressin and corticotropin-releasing factor on adrenocorticotropin release in the rat. *Endocrinology* 1984;115:882-886.
50. Whitnall MH, Mezey E, Gainer H. Co-localization of corticotropin-releasing factor and vasopressin in median eminence neurosecretory vesicles. *Nature* 1985;317:248-250.
51. Whitnall MH, Smyth D, Gainer H. Vasopressin coexists in half of the corticotropin-releasing factor axons present in the external zone of the median eminence in normal rats. *Neuroendocrinology* 1987;45:420-425.
52. Canny BJ, Clarke IJ, Funder JW. Adrenocorticotropin responses to endogenous and exogenous secretagogues in the sheep: specificity of glucocorticoid action. *Neuroendocrinology* 1990;51:181-189.
53. Ma XM and Aguilera G. Differential regulation of corticotropin-releasing hormone and vasopressin transcription by glucocorticoids. *Endocrinology* 1999;140:5642-5650.
54. Canny BJ, Jia LG, Leong DA. Corticotropin-Releasing Factor, But Not Arginine Vasopressin, Stimulates Concentration-Dependent Increases in ACTH Secretion from a Single Corticotrope - Implications for Intracellular Signals in Stimulus-Secretion Coupling. *J Biol Chem* 1992;267:8325-8329.
55. Oelkers W. Hyponatremia and inappropriate secretion of vasopressin (antidiuretic hormone) in patients with hypopituitarism. *N Engl J Med* 1989;321:492-496.
56. Watts AG. Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine CRH neurons: A complexity beyond negative feedback. *Front Neuroendocrinol* 2005;26:109-130.
57. Kiss JZ, Mezey E, Skirboll L. Corticotropin-releasing factor-immunoreactive neurons of the paraventricular nucleus become vasopressin positive after adrenalectomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:1854-1858.
58. Sawchenko PE. Adrenalectomy-induced enhancement of CRF and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neurosecretory neurons: anatomic peptide and steroid specificity. *J Neurosci* 1987;7:1093-1106.

59. Wolfson B, Manning RW, Davis LG, Arentzen R, Baldino F, Jr. Co-localization of corticotropin releasing factor and vasopressin mRNA in neurones after adrenalectomy. *Nature* 1985;315:59-61.
60. Kovacs KJ, Foldes A, Sawchenko PE. Glucocorticoid negative feedback selectively targets vasopressin transcription in parvocellular neurosecretory neurons. *J Neurosci* 2000;20:3843-3852.
61. Davis LG, Arentzen R, Reid JM et al. Glucocorticoid sensitivity of vasopressin mRNA levels in the paraventricular nucleus of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:1145-1149.
62. Saphier D and Feldman S. Ionophoretic application of glucocorticoids inhibits identified neurones in the rat paraventricular nucleus. *Brain Res* 1988;453:183-190.
63. Erkut ZA, Pool C, Swaab DF. Glucocorticoids suppress corticotropin-releasing hormone and vasopressin expression in human hypothalamic neurons. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2066-2073.
64. Bähr V, Franzen N, Oelkers W, Pfeiffer AF, Diederich S. Effect of exogenous glucocorticoid on osmotically stimulated antidiuretic hormone secretion and on water reabsorption in man. *Eur J Endocrinol* 2006;155:845-848.
65. Hasler U, Vinciguerra M, Vandewalle A, Martin PY, Feraille E. Dual effects of hypertonicity on aquaporin-2 expression in cultured renal collecting duct principal cells. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1571-1582.
66. Umenishi F, Narikiyo T, Schrier RW. Effect on stability, degradation, expression, and targeting of aquaporin-2 water channel by hyperosmolality in renal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:1593-1599.
67. Schmale H, Bahnsen U, Richter D. Structure and expression of the vasopressin precursor gene in central diabetes insipidus. *Ann N Y Acad Sci* 1993;689:74-82.
68. DiGiovanni SR, Nielsen S, Christensen EI, Knepper MA. Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:8984-8988.
69. Li C, Wang W, Summer SN et al. Hyperosmolality In Vivo Upregulates Aquaporin 2 Water Channel and Na-K-2Cl Co-Transporter in Brattleboro Rats. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1657-1664.
70. Saito T, Ishikawa S, Sasaki S et al. Lack of vasopressin-independent upregulation of AQP-2 gene expression in homozygous Brattleboro rats. *Am J Physiol* 1999;277:R427-R433.
71. Wildling L, Hinterdorfer P, Kusche-Vihrog K, Treffner Y, Oberleithner H. Aldosterone receptor sites on plasma membrane of human vascular endothelium detected by a mechanical nanosensor. *Pflugers Arch* 2009;458:223-230.
72. Stokes JB. Understanding how aldosterone increases sodium transport. *Am J Kidney Dis* 2000;36:866-870.

73. Sheader EA, Wargent ET, Ashton N, Balment RJ. Rapid stimulation of cyclic AMP production by aldosterone in rat inner medullary collecting ducts. *J Endocrinol* 2002;175:343-347.
74. Fuller LM and Fitzsimons JT. Thirst in Brattleboro rats. *Am J Physiol* 1988;255:R217-R225.
75. McDill BW, Li SZ, Kovach PA, Ding L, Chen F. Congenital progressive hydronephrosis (cph) is caused by an S256L mutation in aquaporin-2 that affects its phosphorylation and apical membrane accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:6952-6957.
76. Fenton RA and Moeller HB. Recent discoveries in vasopressin-regulated aquaporin-2 trafficking. *Prog Brain Res* 2008;170:571-579.
77. Bouley R, Pastor-Soler N, Cohen O, McLaughlin M, Breton S, Brown D. Stimulation of AQP2 membrane insertion in renal epithelial cells in vitro and in vivo by the cGMP phosphodiesterase inhibitor sildenafil citrate (Viagra). *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;288:F1103-F1112.
78. Dunn MJ, Greely HP, Valtin H, Kintner LB, Beeuwkes R. Renal excretion of prostaglandins E2 and F2alpha in diabetes insipidus rats. *Am J Physiol* 1978;235:E624-E627.
79. Hochberg Z, Even L, Danon A. Amelioration of polyuria in nephrogenic diabetes insipidus due to aquaporin-2 deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;49:39-44.
80. Tamma G, Wiesner B, Furkert J et al. The prostaglandin E2 analogue sulprostone antagonizes vasopressin-induced antidiuresis through activation of Rho. *J Cell Sci* 2003;116:3285-3294.
81. Zelenina M, Christensen BM, Palmer J, Nairn AC, Nielsen S, Aperia A. Prostaglandin E(2) interaction with AVP: effects on AQP2 phosphorylation and distribution. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;278:F388-F394.
82. Machida K, Wakamatsu S, Izumi Y et al. Downregulation of the V2 vasopressin receptor in dehydration: mechanisms and role of renal prostaglandin synthesis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292:F1274-F1282.
83. Pedersen RS, Bentzen H, Bech JN, Pedersen EB. Effect of an acute oral ibuprofen intake on urinary aquaporin-2 excretion in healthy humans. *Scand J Clin Lab Invest* 2001;61:631-640.
84. Zhang MZ, Harris RC, McKanna JA. Regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) in rat renal cortex by adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:15280-15285.
85. Diederich S, Franzen NF, Bähr V, Oelkers W. Severe hyponatremia due to hypopituitarism with adrenal insufficiency: report on 28 cases. *Eur J Endocrinol* 2003;148:609-617.

86. Pedersen RS, Bentzen H, Bech JN, Pedersen EB. Effect of water deprivation and hypertonic saline infusion on urinary AQP2 excretion in healthy humans. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:F860-F867.
87. Diederich S, Eckmanns T, Exner P, Al Saadi N, Bähr V, Oelkers W. Differential diagnosis of polyuric/polydipsic syndromes with the aid of urinary vasopressin measurement in adults. *Clin Endocrinol Oxf* 2001;54:665-671.
88. Slusarz MJ, Slusarz R, Ciarkowski J. Investigation of mechanism of desmopressin binding in vasopressin V2 receptor versus vasopressin V1a and oxytocin receptors: molecular dynamics simulation of the agonist-bound state in the membrane-aqueous system. *Biopolymers* 2006;81:321-338.
89. Yalow RS and Berson SA. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* 1959;184 (Suppl 21):1648-1649.
90. Kohler G and Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495-497.
91. Morton JJ, Connell JM, Hughes MJ, Inglis GC, Wallace EC. The role of plasma osmolality, angiotensin II and dopamine in vasopressin release in man. *Clin Endocrinol Oxf* 1985;23:129-138.
92. Bichet DG, Arthus MF, Barjon JN, Lonergan M, Kortas C. Human platelet fraction arginine-vasopressin. Potential physiological role. *J Clin Invest* 1987;79:881-887.
93. Skowsky WR and Fisher DA. The use of thyroglobulin to induce antigenicity to small molecules. *J Lab Clin Med* 1972;80:134-144.
94. Pedersen EB, Eiskjaer H, Madsen B, Danielsen H, Egeblad M, Nielsen CB. Effect of captopril on renal extraction of renin, angiotensin II, atrial natriuretic peptide and vasopressin, and renal vein renin ratio in patients with arterial hypertension and unilateral renal artery disease. *Nephrol Dial Transplant* 1993;8:1064-1070.
95. Sweeney TE and Beuchat CA. Limitations of methods of osmometry: measuring the osmolality of biological fluids. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1993;264:R469-R480.
96. Gysler A, Lange K, Korting HC, Schafer-Korting M. Prednicarbate biotransformation in human foreskin keratinocytes and fibroblasts. *Pharm Res* 1997;14:793-797.
97. Camman K and Galster H. *Das Arbeiten mit ionenselektiven Elektroden: Eine Einführung für Praktiker*. 1995;3rd ed. Berlin: Springer:1-88.
98. Jung K. [The determination of creatinine--the Jaffe reaction 100 years later. On the occasion of the 75th anniversary of the death of Max Jaffe, discoverer of the picric acid reaction of creatinine]. *Z Urol Nephrol* 1987;80:65-68.
99. Robertson GL and Ganguly A. Osmoregulation and baroregulation of plasma vasopressin in essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1986;8 Suppl 7:S87-S91.

100. Papanek PE and Raff H. Chronic physiological increases in cortisol inhibit the vasopressin response to hypertonicity in conscious dogs. *Am J Physiol* 1994;267:R1342-R1349.
101. Raff H, Skelton MM, Cowley AW, Jr. Cortisol inhibition of vasopressin and ACTH responses to arterial hypotension in conscious dogs. *Am J Physiol* 1990;258:64-69.
102. Batalhao ME, Moreto V, Stabile AM, ntunes-Rodrigues J, Carnio EC. Role of dexamethasone on vasopressin release during endotoxemic shock. *Regul Pept* 2008;147:67-71.
103. Lauand F, Ruginsk SG, Rodrigues HL et al. Glucocorticoid modulation of atrial natriuretic peptide, oxytocin, vasopressin and Fos expression in response to osmotic, angiotensinergic and cholinergic stimulation. *Neuroscience* 2007;147:247-257.
104. Ruginsk SG, Oliveira FRT, Margatho LO, Vivas L, Elias LLK, ntunes-Rodrigues J. Glucocorticoid modulation of neuronal activity and hormone secretion induced by blood volume expansion. *Experimental Neurology* 2007;206:192-200.
105. Hoffert JD, Chou CL, Knepper MA. Aquaporin-2 in the "-omics" era. *J Biol Chem* 2009;284:14683-14687.
106. Ghali JK. Mechanisms, risks, and new treatment options for hyponatremia. *Cardiology* 2008;111:147-157.
107. Palm C, Pistrosch F, Herbrig K, Gross P. Vasopressin Antagonists as Aquaretic Agents for the Treatment of Hyponatremia. *The American Journal of Medicine* 2006;119:S87-S92.
108. Robertson GL. Diabetes insipidus. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1995;24:549-572.
109. Raisz LG, McNeely WF, Saxon L, Rosenbaum JD. The effects of cortisone and hydrocortisone on water diuresis and renal function in man. *J Clin Invest* 1957;36:767-779.
110. Aubry RH, Nankin HR, Moses AM, Streeten DH. Measurement of the osmotic threshold for vasopressin release in human subjects, and its modification by cortisol. *J Clin Endocrinol Metab* 1965;25:1481-1492.
111. o.V. *Harrisons Innere Medizin*. Hrs Dietel M, Suttorp N und Zeitz M 2005;: Berlin-p 2297.
112. Sirek OV and Best CH. Intramuscular cortisone administration to dogs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1952;80:594-598.
113. Biewenga WJ, Rijnberk A, Mol JA. Osmoregulation of systemic vasopressin release during long-term glucocorticoid excess: a study in dogs with hyperadrenocorticism. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1991;124:583-588.
114. Garcia DL, Rennke HG, Brenner BM, Anderson S. Chronic glucocorticoid therapy amplifies glomerular injury in rats with renal ablation. *J Clin Invest* 1987;80:867-874.

115. Wen H, Frokiaer J, Kwon TH, Nielsen S. Urinary excretion of aquaporin-2 in rat is mediated by a vasopressin-dependent apical pathway. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1416-1429.
116. Coghlan JP, Blair West JR, Denton DA et al. Control of aldosterone secretion. *J Endocrinol* 1979;81:55P-67P.
117. Isales CM, Bollag WB, Kiernan LC, Barrett PQ. Effect of ANP on sustained aldosterone secretion stimulated by angiotensin II. *Am J Physiol* 1989;256:C89-95.
118. Johnston CI, Hodsman PG, Kohzuki M, Casley DJ, Fabris B, Phillips PA. Interaction between atrial natriuretic peptide and the renin angiotensin aldosterone system. Endogenous antagonists. *Am J Med* 1989;87:24S-28S.
119. Tagawa H, Vander AJ, Bonjour JP, Malvin RL. Inhibition of renin secretion by vasopressin in unanesthetized sodium-deprived dogs. *Am J Physiol* 1971;220:949-951.
120. Frey BM and Frey FJ. Clinical pharmacokinetics of prednisone and prednisolone. *Clin Pharmacokinet* 1990;19:126-146.
121. Diederich S, Scholz T, Eigendorff E et al. Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Synthetic Mineralocorticoids and Glucocorticoids: Receptor Transactivation and Prereceptor Metabolism by 11beta-hydroxysteroid-dehydrogenases. *Horm Metab Res* 2004;36:423-429.
122. Jonassen TE, Promeneur D, Christensen S, Petersen JS, Nielsen S. Decreased vasopressin-mediated renal water reabsorption in rats with chronic aldosterone-receptor blockade. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;278:F246-F256.
123. Hasler U, Mordasini D, Bianchi M, Vandewalle A, Feraille E, Martin PY. Dual influence of aldosterone on AQP2 expression in cultured renal collecting duct principal cells. *J Biol Chem* 2003;278:21639-48.
124. Terada Y, Moriyama T, Martin BM, Knepper MA, Garcia-Perez A. RT-PCR microlocalization of mRNA for guanylyl cyclase-coupled ANF receptor in rat kidney. *Am J Physiol* 1991;261:F1080-F1087.
125. Gardner DG, Hane S, Trachewsky D, Schenk D, Baxter JD. Atrial natriuretic peptide mRNA is regulated by glucocorticoids in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;139:1047-1054.
126. Starklint J, Bech JN, Pedersen EB. Down-regulation of urinary AQP2 and unaffected response to hypertonic saline after 24 hours of fasting in humans. *Kidney Int* 2005;67:1010-1018.
127. Kawata M, Nakao K, Morii N et al. Atrial natriuretic polypeptide: topographical distribution in the rat brain by radioimmunoassay and immunohistochemistry. *Neuroscience* 1985;16:521-546.
128. Chriguier RS, ntunes-Rodrigues J, Franci CR. Atrial natriuretic peptide mediates oxytocin secretion induced by osmotic stimulus. *Brain Res Bull* 2003;59:505-511.

129. Guild S and Cramb G. Characterisation of the effects of natriuretic peptides upon ACTH secretion in mice. *Biochemical Society Transactions* 1999;25:S567-.
130. Antunes-Rodrigues J, de CM, Elias LL, Valenca MM, McCann SM. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* 2004;84:169-208.
131. Dillingham MA and Anderson RJ. Inhibition of vasopressin action by atrial natriuretic factor. *Science* 1986;231:1572-1573.
132. Wang W, Li C, Nejsum LN et al. Biphasic effects of ANP infusion in conscious, euvolumic rats: roles of AQP2 and ENaC trafficking. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:F530-F541.
133. Edwards RM, Jackson BA, Dousa TP. ADH-sensitive cAMP system in papillary collecting duct: effect of osmolality and PGE2. *Am J Physiol* 1981;240:F311-F318.
134. Torikai S and Kurokawa K. Effect of PGE2 on vasopressin-dependent cell cAMP in isolated single nephron segments. *Am J Physiol* 1983;245:F58-F66.
135. Zhang MZ, Harris RC, McKanna JA. Regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) in rat renal cortex by adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:15280-15285.
136. Zhang MZ, Hao CM, Breyer MD, Harris RC, McKanna JA. Mineralocorticoid regulation of cyclooxygenase-2 expression in rat renal medulla. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283:F509-F516.
137. Hogger P. [What happens in the body with glucocorticoids? Pharmacokinetics and pharmacodynamics]. *Pharm Unserer Zeit* 2003;32:296-301.
138. Barth J, Mollmann HW, Wagner T, Hochhaus G, Derendorf H. [Problems of equivalency points during therapy with glucocorticoids. A comparison of the clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of prednisolone and methylprednisolone]. *Dtsch Med Wochenschr* 1994;119:1671-1676.
139. Rohatagi S, Barth J, Mollmann H et al. Pharmacokinetics of methylprednisolone and prednisolone after single and multiple oral administration. *J Clin Pharmacol* 1997;37:916-925.
140. Kiss JZ, van Eekelen JA, Reul JM, Westphal HM, de Kloet ER. Glucocorticoid receptor in magnocellular neurosecretory cells. *Endocrinology* 1988;122:444-449.
141. Berghorn KA, Knapp LT, Hoffman GE, Sherman TG. Induction of glucocorticoid receptor expression in hypothalamic magnocellular vasopressin neurons during chronic hypoosmolality. *Endocrinology* 1995;136:804-807.
142. Papanek PE, Sladek CD, Raff H. Corticosterone inhibition of osmotically stimulated vasopressin from hypothalamic-neurohypophysial explants. *Am J Physiol* 1997;272:R158-R162.
143. Erkut ZA, Gabreels BA, Eikelenboom J, Van Leeuwen FW, Swaab DF. Glucocorticoid treatment is associated with decreased expression of processed AVP

but not of proAVP, neurophysin or oxytocin in the human hypothalamus: are PC1 and PC2 involved? *Neuro Endocrinol Lett* 2002;23:33-44.

144. Liu X, Wang CA, Chen YZ. Nongenomic effect of glucocorticoid on the release of arginine vasopressin from hypothalamic slices in rats. *Neuroendocrinology* 1995;62:628-633.
145. Kundi SA, Forsling M, Kleimestur H, Wazir S, Khan TM. Effect of tamoxifen on pituitary vasopressin level. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2004;16:80-83.
146. Sladek CD, Fisher KY, Sidorowicz HE, Mathiasen JR. Osmotic stimulation of vasopressin mRNA content in the supraoptic nucleus requires synaptic activation. *Am J Physiol* 1995;268:R1034-R1039.
147. Papanek PE and Raff H. Physiological increases in cortisol inhibit basal vasopressin release in conscious dogs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1994;266:R1744-R1751.
148. Baumgarten R, van de Pol MH, Deen PM, van Os CH, Wetzels JF. Dissociation between urine osmolality and urinary excretion of aquaporin-2 in healthy volunteers. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1155-1161.

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon, Vasopressin
AK	Antikörper
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
AQP2	Aquaporin-2
AUC	Area under the curve
BD	Blutdruck
BMI	Body-Mass-Index (kg/m ²)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CLIA.	Chemolumineszenz-Immunoassay
CRH	Corticotropin releasing hormon
d	abgeleitet von lat. <i>dies</i> , der Tag
dest.	destilliert
DV	Durstversuch
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, ein Komplexbildner
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
HF	Herzfrequenz
HLPC	high performance liquid chromatography (Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie)
hnRNA	heteronuclear RNA
HPA	hypothalamo-pituitary-adrenal-axis (Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse)
IE	internationale Einheiten
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
PD	Prednisolon
PGE2	Prostaglandin E2
PKA	Proteinkinase A

PKG	Proteinkinase G
POMC	Proopiomelanocortin
pro-ADH	Präprohormon des ADH
PVN	Nucleus paraventricularis
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIA	Radioimmunoassay
SCN	Nucleus supraopticus
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SIADH	Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion
SON	Nucleus supraopticus
TAL	thick ascending limb (dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife)
u-AQP2	urinary-Aquaporin-2
V1R	Vasopressin-1-Rezeptor
V2R	Vasopressin-2-Rezeptor

Selbständigkeitserklärung

„Ich, Friederike Charlotte Ufer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Inhibition des Antidiuretischen Hormons (ADH) durch Glucocorticoide und ADH-unabhängige Mechanismen der Wasserrückresorption* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 29. Juni 2009

Friederike Charlotte Ufer

Publikationsliste

European Conference for Endocrinology (2009)

Ufer E, Mai K, Diederich S, Pedersen E, Exner P, Pfeiffer A, Bähr V.:

“Feedback inhibition of prednisolone on vasopressin (AVP) secretion but preserved renal water reabsorption after thirsting point to an AVP independent antidiuretic action”

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf dem Weg der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben. Ich bedanke mich bei meinen Kollegen, Kommilitonen, Freunden und meiner Familie für die vielfältige Hilfe und Motivation.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. A. Pfeiffer danke ich für die Möglichkeit, in seinem Team meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen. Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. V. Bähr und Dr. med. K. Mai für Ihre angenehme Betreuung meiner Arbeit. Ohne ihre Unterstützung, Mühe und fachliche Expertise wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ebenfalls möchte ich mich sehr herzlich bei Petra Exner bedanken, die mich tatkräftig bei allen Messungen unterstützt hat, mir oft mit wertvollem Rat zur Seite stand und während der gesamten Zeit für mein leibliches Wohl gesorgt hat. Genauso danke ich allen anderen Mitarbeitern der endokrinologischen Abteilung für Ihre ausdauernde Hilfsbereitschaft.

Meiner Kommilitonin Johanna Timm danke ich für ihre Unterstützung beim praktischen Teil meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. B. Kleuser und seinen Mitarbeitern danke ich für die kollegiale Unterstützung bei der Messung von Prednisolon. Herrn Prof. Dr. E. Pedersen und seinen Mitarbeitern danke ich für die Hilfe bei der Bestimmung von u-AQP2, PGE2 und ANP.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer liebevoll unterstützt und ermutigt haben.

Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.