

2 Methodik

2.1 Patienten

Das dieser Arbeit zugrundeliegende Kollektiv umfasst alle 28 Patienten, die zwischen 1994 und 1998 mit einer Polydipsie das Klinikum Benjamin Franklin aufgesucht haben und bei denen ein Durstversuch durchgeführt wurde.

Mit Hilfe eines Erfassungsbogens wurden folgende Daten erhoben:

- 1) Name, Geburtsdatum, Geschlecht.
- 2) Polyurie, Polydipsie, Nykturie, nächtliches Trinken, 24 Stunden Sammel-Urin.
- 3) Sonstige Erkrankungen, Medikamente.
- 4) Serum-Natrium, Serum-Kalium, Serum-Kalzium, Kreatinin, Blutglucose, Thyreoideastimulierendes Hormon (TSH), Trijodthyronin (T₃), Thyroxin (T₄).
- 5) Durstversuch mit Bestimmung von Plasma-Osmolalität, Urin-Osmolalität, Plasma-Vasopressin, Urin-Vasopressin, Serum-Natrium.
- 6) Datum der Erstdiagnose des D. I. bzw. der primären Polydipsie, Ätiologie, Therapie.

2.2 Probanden

Bei 13 Probanden (10 Männer, drei Frauen) wurde ein Durstversuch durchgeführt. Dabei handelte es sich um Mitarbeiter der endokrinologischen Klinik und deren Angehörige. Das Alter dieses „Normalkollektives“ lag zwischen 23 und 60 Jahren, bei einem Durchschnittsalter von 32 Jahren (Median 30 Jahre). Keiner der Probanden hatte eine bekannte endokrinologische oder andere internistische Erkrankung. Niemand nahm regelmäßig Medikamente ein.

Alle haben den Durstversuch ohne Probleme durchführen können. Klinisch waren keine besonderen Auffälligkeiten während des Versuches festzustellen (kein Blutdruckabfall, keine größeren Gewichtsverluste).

2.3 Versuchsablauf

Durchführung des Durstversuches (leicht modifiziert nach ⁸⁹):

Der Patient bzw. Proband kann bis morgens 6.00 Uhr so viel trinken wie eben nötig. Überhydrierung sollte vermieden werden! Ab 6.00 Uhr nur noch feste Speisen, keine Getränke, keine Suppen, kein Obst, kein Pudding!

Ab 8.00 Uhr:

- 1) Um 8.00 Uhr Nacht-Urin entleeren, 20 ml für Urin-Osmolalität und Urin-Vasopressin aufheben. Danach in 2 Stunden-Portionen bis einschließlich 16.00 Uhr Urin sammeln, Volumen registrieren und je 20 ml für Urin-Osmolalität und Urin-Vasopressin aufheben.
- 2) Um 8.00 Uhr und von 12.00 Uhr bis 16 Uhr zweistündliche Blutentnahme für Serum-Natrium, Plasma-Vasopressin und Plasma-Osmolalität.
- 3) Um 8.00 Uhr Patient wiegen. Danach Patient zweistündlich bis einschließlich 16.00 Uhr wiegen.
- 4) Ab 8.00 Uhr alle 2 Stunden Blutdruck nach Riva-Rocci und Puls.

Um 16.00 Uhr am Ende des Durstversuchs 4 µg Desmopressinacetat i. v., der Urin der nächsten 30 Minuten wird verworfen. Urin der darauf folgenden 30 Minuten wird gesammelt, das Volumen wird registriert und 20 ml für Urin-Osmolalität und Urin-Vasopressin werden aufgehoben. Erst danach darf der Patient trinken.

Bei den Probanden ist der Durstversuch um 16.00 Uhr beendet, keine Desmopressin-Gabe nötig.

Abbruchkriterien des Durstversuches:

- 1) Gewichtsverlust über 5 Prozent des Ausgangsgewichtes.
- 2) Unerträglicher Durst.
- 3) Erheblicher Blutdruckabfall.

2.4 Laborchemische Untersuchungen

2.4.1 Prinzip vom Radioimmunoassay

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

Der „klassische“ Radioimmunoassay (RIA) ist ein kompetitiver Assay, d. h. natürliche Antigene (aus der Probe) konkurrieren mit einer bestimmten Menge künstlicher radioaktiv markierter Antigene (Tracer) um einen im Überschuss vorliegenden Antikörper, der spezifisch gegen das gesuchte Antigen gerichtet ist. Die Testsubstanz (in der Arbeit Vasopressin im Plasma oder im Urin) und die radioaktiv markierte Substanz (z. B. 3-(125 J)Iodotyrosyl-Vasopressin) werden in einem ihrer jeweiligen Menge entsprechenden Verhältnis an den Antikörper gebunden. Wird nach Entfernung der nicht an den Antikörper gebundenen radioaktiven Substanz ihre Aktivität oder die Aktivität der Antigen-Antikörper-Komplexe gemessen, so lässt sich die Konzentration der Testsubstanz ermitteln, wenn parallel eine Eichkurve mit bekannten Mengen der nicht markierten Substanz angelegt wird (Standardkurve).

2.4.2 Bestimmung von 8-Arginin Vasopressin im Plasma

Die Bestimmung der Plasma-Konzentration von Vasopressin wurde nach der von Morton et al.¹ 1985 beschriebenen Methode durchgeführt. Der Antikörper wurde uns zu diesem Zweck freundlicherweise von Dr. J. J. Morton, MRC Blood Pressure Unit, Glasgow, Schottland zur Verfügung gestellt. Das Antiserum wurde in Neuseeland-Kaninchen durch an Rinder-Thyreoglobulin gebundenes Vasopressin hergestellt⁹⁰.

2.4.2.1 Probengewinnung

Die Blutentnahme erfolgt in Ammonium-Heparinat-Röhrchen, die umgehend eisgekühlt und bei 4°C für 20 min bei 3000 rpm (1600 x g) zentrifugiert werden. Der Plasma-Überstand wird vorsichtig abpipettiert, wobei 1 cm über dem Erythrozytensediment unbewegt stehen bleibt, um das an Thrombozyten gebundene Vasopressin nicht fälschlich mitzubestimmen⁹¹. Die so gewonnen Proben werden bei -20°C gelagert.

2.4.2.2 Präzipitation

Zur Präzipitation werden SepPak-C₁₈-Kartuschen (Waters Associates, Milford Mass., USA) mit 5 ml Methanol sowie 5 ml H₂O konditioniert und mit 1 ml der Plasma-Probe beschickt, die vorher nochmals bei 3000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert wird. Anschließend wird die Probe mit 5 ml 1 prozentiger Essigsäure gewaschen und mit 2 ml Methanol eluiert. Das Methanol des Eluats wird bei ca. 37°C mit Luft verblasen.

Der Rückstand wird in 150 µl Assay-Puffer (50 mmol/l TRIS-Puffer, pH 7,4) aufgelöst, sorgfältig vermischt und 5 min bei 4°C und 2500 rpm zentrifugiert.

2.4.2.3 Radioimmunoassay

Ebenso wie die Proben der Standardkurve (0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 und 8 pg Vasopressin/Röhrchen) werden 2 x 50 µl des rekonstituierten Proben-Eluates in 2 Röhrchen pipettiert, mit 50 µl Vasopressin-Thyreoglobulin-Antikörper (Titer 1:25000) und 50 µl 3-(125 J) Jodotyrosyl-Vasopressin als Tracer versetzt (Amersham International, Buckinghamshire, England; verdünnt auf ca. 1000 cpm/50 µl), gemischt und 72 h bei 4°C inkubiert. Danach wird dem Inkubat 1 ml einer 1 prozentigen „dextran-coated charcoal“-Lösung zugefügt, die das freie Vasopressin adsorbiert und so vom gebundenen trennt. Der Röhrcheninhalt wird erneut bei 3000 rpm 10 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anhand der im Röhrchen verbliebenen Radioaktivität, die mit Hilfe des Gamma-Szintillationszählers gemessen wird, kann die Vasopressin-Konzentration in der Plasma-Probe errechnet werden (Spline function, computergestützt).

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

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

2.4.3 Bestimmung von 8-Arginin Vasopressin im Urin

Die Bestimmung der Konzentration von Vasopressin im Urin wurde mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt. Zunächst verwendeten wir wie bei der Bestimmung im Plasma die Methode von Morton, wobei auf die Präzipitation verzichtet wurde. Eine so sensitive Methode ist allerdings für den quantitativen Nachweis des Vasopressins im Urin nicht notwendig, da die Urin-Werte weit oberhalb der Plasma-Werte liegen; gleichzeitig kommt es zu einem erhöhtem Arbeitsaufwand, da der Großteil der Proben verdünnt werden muss. Nach labortechnischer Testung verwendeten wir daher einen zum Nachweis von 8-Arginin Vasopressin im Plasma entwickelten Radioimmunoassay der Firma Nichols[®] Institute zur Bestimmung von Vasopressin im Urin.

2.4.3.1 Probengewinnung

Zunächst wird das Gesamtvolumen der Urin-Proben bestimmt, danach werden 20 ml für die Vasopressin-Bestimmung in Röhrchen sofort eisgekühlt und bei 4°C für 15 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C tiefgefroren.

2.4.3.2 Evaluation der Bestimmung des Vasopressins im Urin

Der Test wurde für die Bestimmung des Vasopressins im Urin evaluiert. Zunächst wurde geprüft, ob auf eine aufwendige Präzipitation des Urins verzichtet werden kann, da dies eine deutliche Zeiteinsparung bedeuten würde.

Weiter wurden Intra-Assay- und Inter-Assay-Variabilität und Wiederfindung im Radioimmunoassay untersucht.

Die Ergebnisse des Vergleiches der „Mortonmethode“ mit dem hier evaluierten Assay von Nichols[®] sind im Ergebnisteil Kapitel 3.2 wiedergegeben.

2.4.3.2.1 Präzipitation

Zur Präzipitation wird allen Urin-Proben 5 ml kaltes Ethanol zugesetzt. Nachdem die Mischung 30 min bei 8°C geschüttelt wurde und bei 8°C für 15 min bei 1500 x rpm zentrifugiert wurde, werden die Überstände dekantiert. Das Eluat wird in einem 37°C warmen Wasserbad unter einem Strom von reinem Stickstoffgas bis zum Trocknen

eingedampft. Die getrockneten Probenextrakte werden mit 0,8 ml Assay-Puffer (phosphatgepufferte Kochsalzlösung pH 7,4) rekonstituiert.

Bei zehn Proben wurde ein Vergleich der Vasopressin-Bestimmung im Urin mit Präzipitation und ohne Präzipitation durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson beträgt 0,99, die Korrelation ist sowohl nach Pearson als auch nach Spearman mit $p < 0,001$ signifikant. Die Werte ohne Präzipitation lagen um 8,7 Prozent ($x = 1,087 y - 18,6$) über den Werten mit Präzipitation.

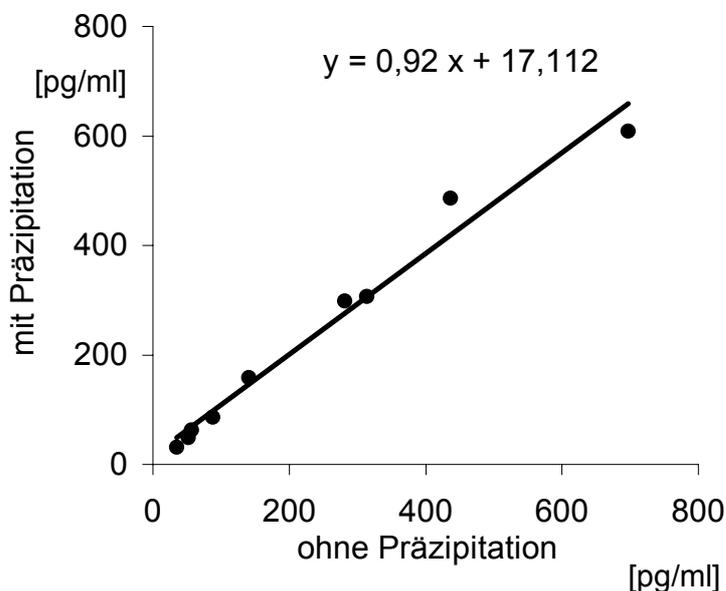


Abbildung 6: Vergleich der Bestimmung des Vasopressins im Urin mit und ohne Präzipitation (Nichols® Kit).

Aufgrund dieses Ergebnisses haben wir bei weiteren Bestimmungen des Vasopressins im Urin auf eine Präzipitation des Urins verzichtet.

2.4.3.2.2 Radioimmunoassay

Jede rekonstituierte Probe, der Standard (0; 2; 4; 8; 16; 32 und 64 pg/ml) und die Kontrollen werden mit 0,4 ml des gekühlten Assay-Puffers (s. o.) und mit 0,1 ml gekühltem Anti-Vasopressin (Kaninchen-Antiserum in phosphatgepufferter Kochsalzlösung) versetzt. Der Inhalt der Röhrchen wird 24 h bei 8°C inkubiert. Dann wird 0,1 ml gekühltes 125 J-Vasopressin zugesetzt und wieder 24 h inkubiert. Nach Zusatz von 0,1 ml Anti-Kaninchen-Präzipitierungsreagenz und sorgfältigem Mischen

wird 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird 1,0 ml deionisiertes Wasser jedem Röhrchen zugesetzt, und die Mischung wird 15 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Jedes Röhrchen wird 2 min im Gamma-Zähler gemessen. Über die Standardkurve kann mittels Dreisatz die Vasopressin-Konzentration in der Urin-Probe berechnet werden.

Mit dieser Methode liegt die Nachweisgrenze für Vasopressin im Urin bei einer Konzentration von 1,7 pg/ml Urin. Dieser Wert wurde grafisch ermittelt. Dabei wurden zwei Standardabweichungen von der 100 Prozent Bindung abgezogen und dieser Wert als Sensitivität interpretiert⁹². Die grafische Konstruktion ist in Abbildung dargestellt. Nach den Angaben des Herstellers beträgt die berechnete Sensitivität für die Bestimmung im Plasma 1,3 pg/ml⁹³.

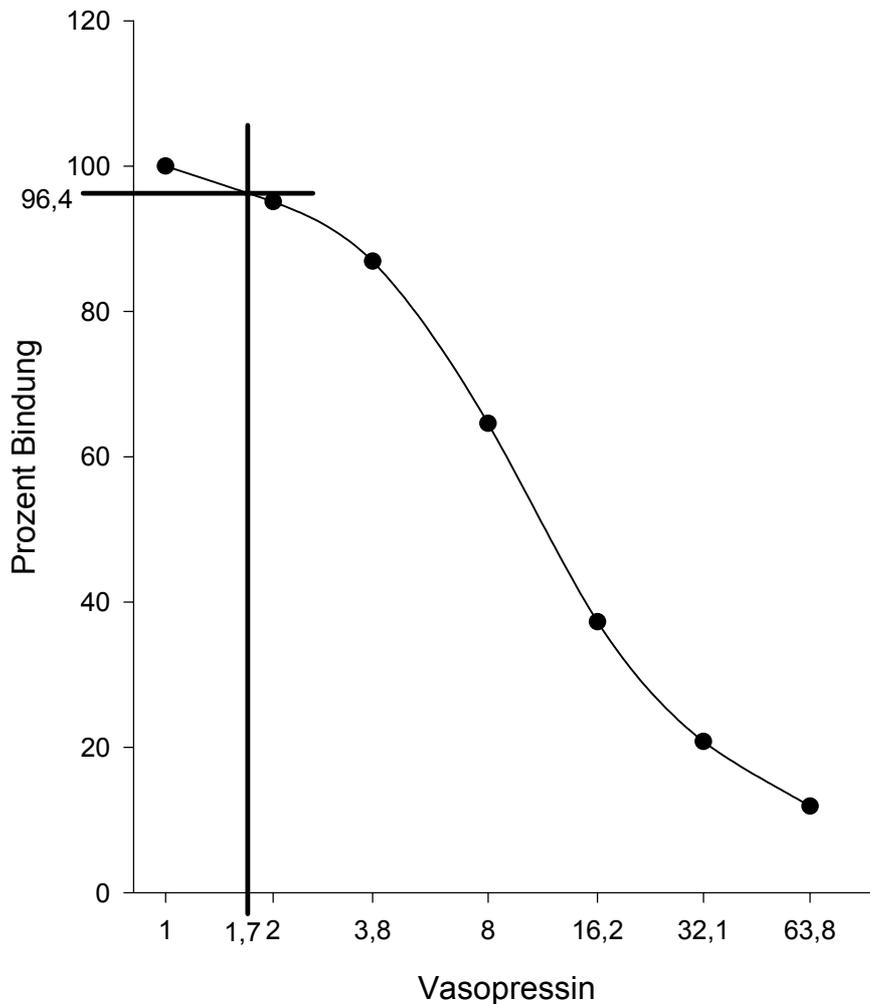


Abbildung 7: Bestimmung der Sensitivität des Nichols[®] Kit zur Bestimmung von Vasopressin im Urin über die Standardkurve.

2.4.3.2.2.1 Intra-Assay und Inter-Assay-Variabilität

Zur Bestimmung der Intra-Assay-Variabilität wurden neun identische Proben in einem Radioimmunoassay untersucht. Die Ergebnisse des Assays sind in Abbildung 8 dargestellt. Die Intra-Assay-Variabilität beträgt 6,0 Prozent (Mittelwert = 218,17; Standardabweichung = 13,06).

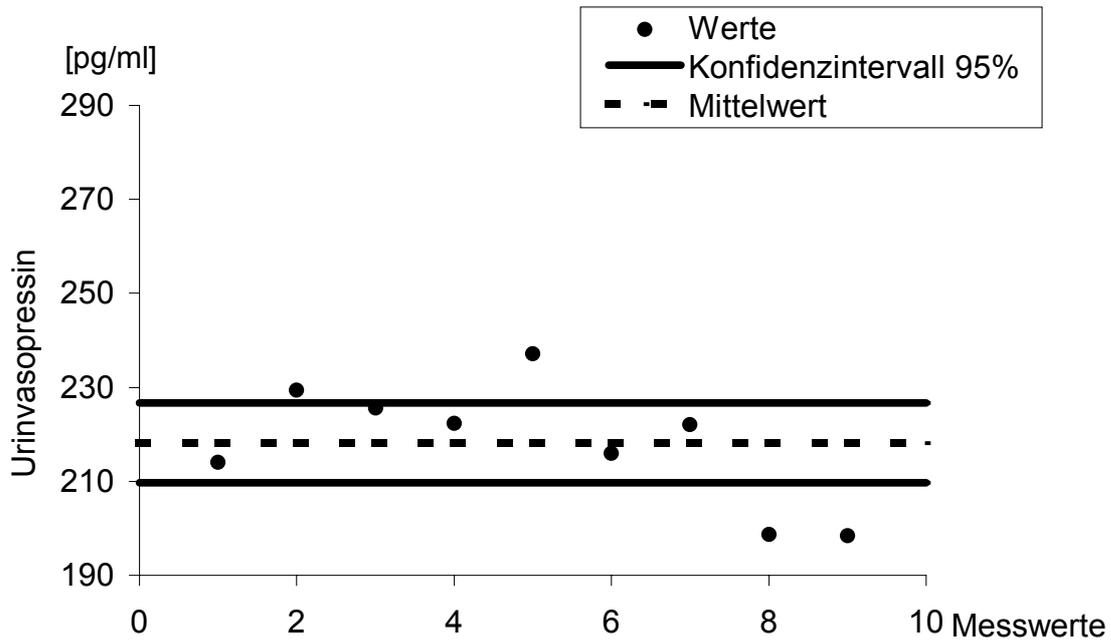


Abbildung 8: Darstellung der Intra-Assay-Variabilität (Nichols® Kit).

Die Inter-Assay-Variabilität wurde durch Bestimmung der Werte einer Probe in 12 verschiedenen Radioimmunoassay-Läufen ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt. Die Inter-Assay-Variabilität beträgt 6,7 Prozent (Mittelwert = 245,76; Standardabweichung = 16,45).

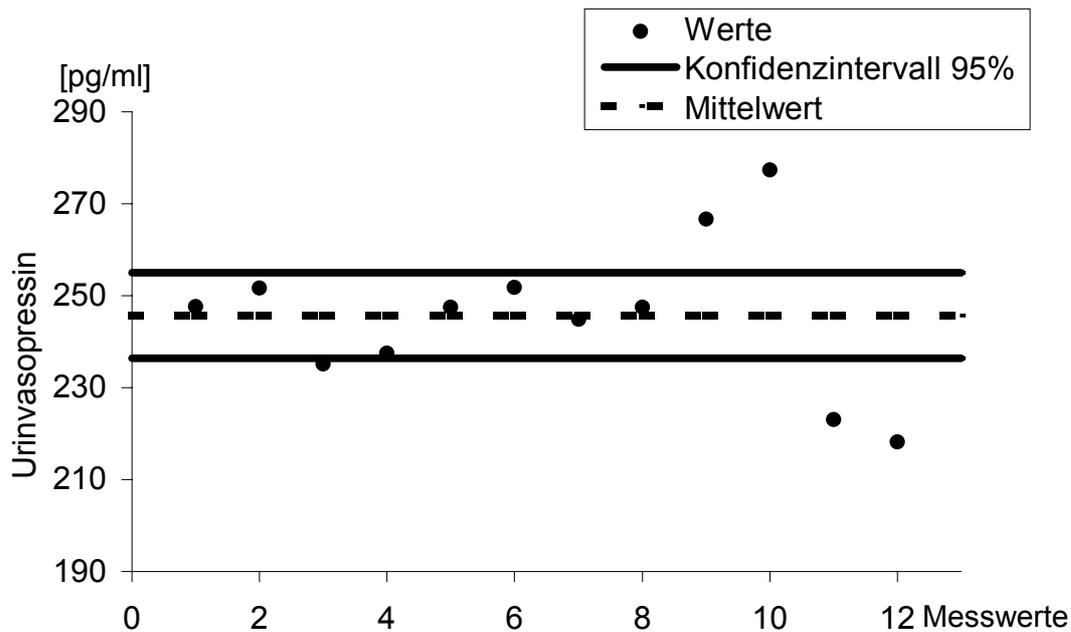


Abbildung 9: Darstellung der Inter-Assay-Variabilität (Nichols® Kit).

Die analytische Wiederfindung von Vasopressin aus Urin wurde durch den Zusatz von Vasopressin zu zwei verschiedenen Urin-Proben bestimmt. Die Urin-Proben boten verschieden hohe Osmolalitäts-Werte (Tabelle 2).

Tabelle 2: Analytische Wiederfindung im Urin mittels Nichols® Kit.

Probe	Osmolalität (mosmol/kg)	Endogenes Vasopressin (pg/ml)	Zugesetztes Vasopressin (pg/ml)	Erwarteter Wert (pg/ml)	Wieder- gefundenes Vasopressin (pg/ml)	% Wieder- findung
A	613	14,3	2	16,3	16,3	100
			10	24,4	26,4	108,2
			100	114,3	116,5	101,9
			400	414,3	480,0	115,9
B	387	< 1,7	2	2	2,86	143
			10	10	9,9	99
			100	100	101,5	101,5
			400	400	440,5	110,1

In Abbildung 10 ist die Korrelation zwischen den gefundenen Werten und den berechneten Werten dargestellt. Der Korrelationswert r beträgt 0,99 mit einem $p < 0,001$ nach Pearson (zweiseitig). Auch nach Spearman besteht eine Signifikanz mit $p < 0,001$.

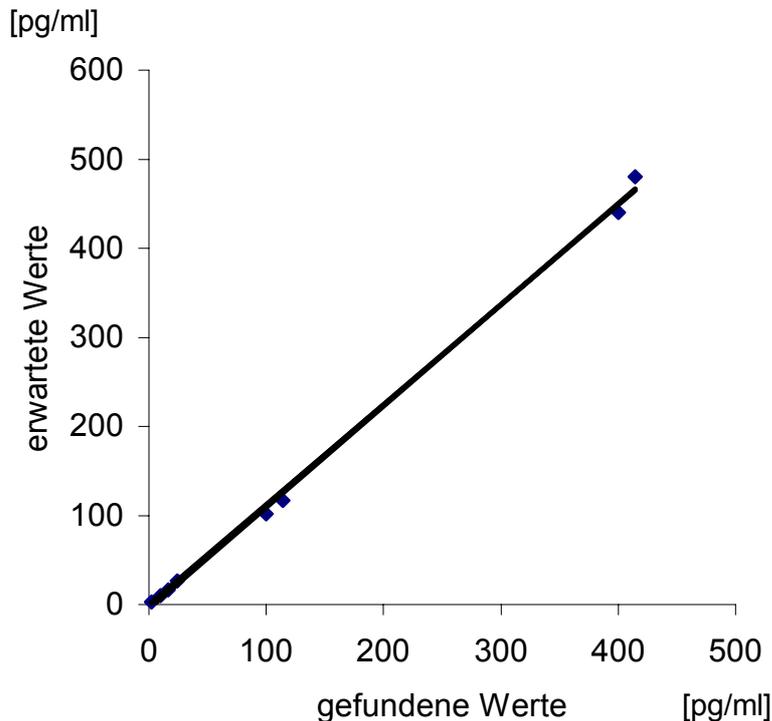


Abbildung 10: Korrelation der gefundenen Werte (Abszisse) und erwarteten Werte (Ordinate) bei der analytischen Wiederfindung (Nichols[®] Kit).

2.4.4 Bestimmung der Plasma- und Urin-Osmolalität

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

Es wird dabei der Gefrierpunkt von wässrigen Lösungen gemessen. Die Gefrierpunktniedrigung im Vergleich zum Gefrierpunkt des reinen Wassers ist ein direktes Maß für die Osmolalität einer Substanz.

Zur Bestimmung wird die Probe in ein sauberes Gefäß mit Hilfe eines Peltier-Elementes unter den Gefrierpunkt abgekühlt. Die Eisbildung wird durch das Eintauchen einer kalten Nadel ausgelöst. Im Anschluss an diesen Vorgang steigt die Temperatur wieder, bis sich der Gefrierpunkt in der Probe eingestellt hat. Bei reinem Wasser ergibt sich ein länger anhaltendes Plateau, bei Lösungen ein einige Sekunden dauernder Wendepunkt. Dieser Wendepunkt wird über den Messkopf, der Teil einer Wheatstoneschen Brücke ist, vom Gerät gespeichert und digital angezeigt. Die Eichung des Gerätes erfolgt mit einer Standardlösung von 300 mosmol/kg und destilliertem Wasser.

2.4.5 Elektrolyte

Die Serumelektrolyte wurden im chemischen Zentrallabor mit einem Flammenphotometer (IL 743, Instrumentation Laboratory, Paderno-Duniano, Italien) bestimmt.

2.5 Statistik

Die statistische Berechnung wurde mit Hilfe eines Personalcomputers und der Softwareprogramme Microsoft[®] Excel 97, SPSS[®] 8.0 for Windows und Confidence Interval Analysis⁹⁴ durchgeführt.

Die Grafiken wurden mittels Microsoft[®] Organigramm 2.0, Microsoft[®] Excel 97 und Sigma Plot 4.0 erstellt.