

Aus der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Michael Roden
Funktionsbereich Spezielle Endokrinologie
Ärztlicher Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schott

**Untersuchung verschiedener Schnelltests zur Bestimmung der
korrekten Lage eines Katheters bei der selektiven
Nebennierenvenenblutuntersuchung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Christina Stella Antoniadis
2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Holger S. Willenberg

Zweitgutachter: PD Dr. med. Johannes Stegbauer

Meinen Eltern gewidmet

Zusammenfassung

Der primäre Aldosteronismus (PA) ist mit 5-12 % der häufigste Grund einer sekundären arteriellen Hypertonie, wobei der PA im Wesentlichen auf den Boden einer idiopathischen bilateralen Hyperplasie der *Zona glomerulosa* oder eines unilateralen Aldosteronproduzierenden Adenoms entsteht. Zur Differenzierung dieser zwei Hauptursachen des PA empfiehlt sich die seitengetrennte Nebennierenvenenblutentnahme mittels eines Nebennierenvenenkatheters. Die Erfolgsrate für aussagekräftige Testergebnisse ist vor allem von der korrekten Katheterlage abhängig, die idealerweise mit Hilfe eines Schnelltests kontrolliert wird. Da aber die als Goldstandard verwendeten Cortisolassays ca. 45 min dauern, hatten wir uns als Ziel gesetzt, schnellere Verfahren zu testen. Es wurden 49 Nebennierenvenenproben von Patienten untersucht, bei denen ein PA diagnostiziert wurde. Wir haben zwei Vitamin C-Streifenteste (VCTS1 und VCTS2) untersucht. Ferner haben wir einen Adrenochrom-basierten kolorimetrischen-Test (ABC) entwickelt, in dem die Katecholamine chemisch zu Adrenochrom oxidiert wurden. Weiterhin haben wir einen Adrenalin-(Epinephrin)-ELISA-Test und einen Methamphetamin-Test (MET) untersucht. Hier zeigte sich, dass der ABC-Test gleich schnell ist wie der VCTS1, VCTS2 und MET-Test, gefolgt vom ELISA-Test. Dies ging auf Kosten der Zuverlässigkeit (Sensitivität zwischen 60 % und 80 % für den ABC-Test und VCTS1 oder etwa 10 % für den VCTS2 und MET, Spezifität von 70 und 100 % für den ABC-Test und den VCTS1 oder eine Spezifität zwischen 90 und 100 % für den VCTS2 und MET). Das beste Verhältnis von Sensitivität zu Spezifität wurde mit dem Cortisol-Schnelltest erreicht (Sensitivität 96,7 %, Spezifität 100 % bei einem Selektivitätsindex von 1,7). Die Dauer des Tests war jedoch die längste (Mittelwert > 30 min). Die untersuchten Schnelltests könnten als vielversprechende „bedside“-Tests für eine rasche Bestimmung der richtigen Lage des Nebennierenvenenkatheters während *adrenal vein sampling* (AVS) fungieren. Obwohl die Ergebnisse ermutigend sind, weisen sie eine Rate an ca. 20-30 % falsch negativen Ergebnissen auf. Dies schafft die Notwendigkeit für weitere Verbesserungen in diesem Bereich. Solange wird der Cortisol-Schnelltest noch Anwendung finden.

Abstract

Primary aldosteronism (PA) is the most common cause of secondary arterial hypertension. The two main causes are idiopathic bilateral hyperplasia of the zona glomerulosa or a unilateral aldosterone produced adenoma. For the differentiation of these two main causes of the PA, adrenal vein blood sampling (AVS) using adrenal vein catheter is recommended. The success rate for the test results depends mainly on the correct catheter position, which is ideally controlled by a rapid test. But since the gold standard cortisol assays take about 45 min, we set the goal of finding faster procedures. Patients diagnosed with PA and undergoing an adrenal vein catheter have been studied. Two vitamin C strip tests were investigated. Further, we developed an adrenochrome-based colorimetric-test (ABC) in which the catecholamines were chemically oxidized to adrenochrome. Due to the significantly higher adrenaline concentration in the adrenal vein compared to the peripheral plasma, the formation of adrenochrome resulted in a color change. We also investigated an epinephrine ELISA test and a methamphetamine test (MET). 49 adrenal vein samples were examined, of which material could be used for various tests. Here it was shown that the ABC test was equally fast as the vitamin C strip tests and the methamphetamine test, followed by the adrenalin ELISA test. This was at the cost of reliability (sensitivity between 60 % and 80 % for the ABC test and VCTS1 or about 10 % for VCTS2 and MET, specificity of 70 and 100 % for the ABC test and the VCTS1 or a specificity between 90 and 100 % for the VCTS2 and MET). The best ratio of sensitivity to specificity was achieved with the cortisol rapid test (sensitivity 96.7 %, specificity 100 % with a selectivity index of 1.7). The duration of the test, however, was the longest (mean > 30 min). These tests could serve as promising "bedside tests" for a rapid determination of the correct location of the adrenal vein catheter during AVS. The success of the tests is assessed primarily on the basis of diagnostic specificity. Although the results are very encouraging, they show an approximately 20-30 % rate of false negative results. This creates the need for further improvements in this area.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|---|
| ABC | Adrenochrom-basierter kolorimetrischer-Test |
| A/CPAs | Aldosteron- und Cortisol-cosezernierende Nebennierenrindenadenome |
| ACE | <i>angiotensin converting enzyme</i> |
| ACQ | Aldosteron-Cortisol-Quotient |
| ACTH | Adrenocorticotropes Hormon |
| APA | Aldosteronproduzierendes Adenom |
| ARQ | Aldosteron-Renin-Quotient |
| AV | <i>adrenal vein</i> |
| AVS | <i>adrenal vein sampling</i> |
| BAH | bilaterale adrenale Hyperplasie |
| cAMP | <i>3',5'-cyclic adenosine monophosphate</i> |
| CgA | Chromogranin A |
| COMT | Catechol-O-Methyltransferase |
| CST | Captopril-Stimulationstest |
| CT | Computertomographie |
| dl | Deziliter |
| ELISA | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> |
| FH | familiärer Hyperaldosteronismus |
| FST | Fludrocortison-Suppressionstest |
| IHA | idiopathischer Hyperaldosteronismus |
| l | Liter |
| LC-MS/MS | Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie |
| LI | Lateralisationsindex |
| MAO | Monoaminoxidase |
| MDA | Methylendioxyamphetamin |
| MET | Methamphetamin |
| mg | Milligramm |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| mmHg | Millimeter Quecksilbersäule |
| mmol | Millimol |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| nmol | Nanomol |
| NNM | Nebennierenmark |

| | |
|-------|---|
| NNR | Nebennierenrinde |
| NNV | Nebennierenvene |
| NPW | negativer prädiktiver Wert |
| PA | primärer Aldosteronismus |
| PET | Positronen-Emissions-Tomographie |
| pg | Pikogramm |
| pmol | Pikomol |
| PPW | positiver prädiktiver Wert |
| pR | peripher rechts |
| PV | periphere Vene / <i>peripheral vein</i> |
| RAAS | Renin-Angiotensin-Aldosteron-System |
| RCA | <i>rapid cortisol assay</i> |
| Sek. | Sekunden |
| SI | Selektivitätsindex |
| VCI | <i>Vena cava inferior</i> |
| VCTS1 | Vitamin C-Schnellstreifen 1 |
| VCTS2 | Vitamin C-Schnellstreifen 2 |
| zL | zentral links |
| zR | zentral rechts |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

| | |
|--------------|--|
| Abbildung 1 | Regelkreis des RAAS |
| Abbildung 2 | Empfohlenes diagnostisches Vorgehen bei Verdacht auf einen primären Aldosteronismus |
| Abbildung 3 | Schematische Darstellung des Nebennierenvenenkatheters |
| Abbildung 4 | Konversion von Adrenalin zu Adrenochrom und Adrenolutin |
| Abbildung 5 | Adrenalin-ELISA-Test |
| Abbildung 6 | Darstellung des ABC-Tests |
| Abbildung 7 | Konzentrationen von Cortisol, Metanephrin und Adrenalin in der NNV im Vergleich zur VCI |
| Abbildung 8 | Adrenochrom-Absorption |
| Abbildung 9 | Vitamin C-Schnellstreifen |
| Abbildung 10 | Methamphetamin-Teststreifen |
| Abbildung 11 | Rapid-Adrenalin-ELISA |
| Tabelle 1 | Vergleiche zwischen den verschiedenen Assays |
| Tabelle 2 | Testcharakteristika basierend auf dem SI 2,0 nach Leitlinie und dem selbstermittelten SI von 1,7 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Pathophysiologische Grundlagen -Aldosteron-..... | 3 |
| 1.2. Definition und Klinik des primären Aldosteronismus | 4 |
| 1.3. Die verschiedenen Entitäten..... | 5 |
| 1.4. Diagnostik des primären Aldosteronismus..... | 6 |
| 1.5. Therapie des primären Aldosteronismus | 9 |
| 1.6. Nebennierenvenenkatheter | 11 |
| 1.7. Weitere Sekretionsprodukte der Nebenniere und deren Stellenwert beim Nebennierenvenenkatheter | 16 |
| 1.8. Ziele der Arbeit | 19 |
| 2. Patienten, Material und Methoden | 23 |
| 2.1. Cortisol-Schnelltest..... | 24 |
| 2.2. Adrenochrom-basierter kolorimetrischer-Test (ABC-Test)..... | 25 |
| 2.3. Vitamin C-Schnelltest | 26 |
| 2.4. Methamphetamin-Schnelltest | 27 |
| 2.5. Rapid-Adrenalin (Epinephrin)-ELISA-Test..... | 28 |
| 3. Ergebnisse | 30 |
| 3.1. Cortisol-Schnelltest..... | 30 |
| 3.2. Adrenochrom-basierter kolorimetrischer-Test (ABC-Test)..... | 32 |
| 3.3. Vitamin C-Schnelltest | 35 |
| 3.4. Methamphetamin-Schnelltest | 36 |
| 4. Diskussion..... | 38 |
| 5. Schlussfolgerungen..... | 46 |
| 6. Literatur- und Quellenverzeichnis..... | 47 |

1. Einleitung

Nebenniere

Die Nebennieren sind paarig retroperitoneal gelegene endokrine Drüsen und sitzen den oberen Nierenpolen auf. Auf der dorsalen Seite besitzt jede Nebenniere ein Hilum, aus dem Venen und Lymphgefäße austreten. Arterien und Nerven dringen an mehreren Stellen der Oberfläche in das Organinnere ein. Die Nebenniere gliedert sich in Rinde und Mark. Die Nebennierenrinde (*Cortex*) ist mesodermalen Ursprungs und besteht aus 3 Zonen, welche unterschiedliche Steroidhormone produzieren. Die außen gelegene *Zona glomerulosa* (Ort der Aldosteronproduktion), die mittlere *Zona fasciculata* (Ort der Cortisolproduktion) und die dem Mark anliegende *Zona reticularis* (Beschränkung der Steroidbiosynthese auf Steroidhormonvorläufer und adrenale Androgene). Neuroektodermale Zellen, die aus dem Sympathikusgrenzstrang eingewandert sind, bilden das Nebennierenmark (NNM). Das schwach basophile Zytoplasma der Markzellen enthält Granula, die sich durch Behandlung mit Chromsalzen in braunem Ton darstellen lassen. Aus diesem Grund werden diese auch chromaffine Zellen genannt (Vrezas et al., 2004). In Ihnen werden die Katecholamine, z.B. Adrenalin und Noradrenalin, gebildet und in die Blutbahn abgegeben. Dies ist auch der Ort, aus dem 90 % des peripher messbaren Metanephrins, Abbauprodukt des Adrenalins, stammt (Lenders und Eisenhofer, 2014).

Steroidhormone

Die Steroidbiosynthese in der Nebennierenrinde (NNR) wird hauptsächlich durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), Kalium und das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) gesteuert (Mattsson und Young, 2006). Weitere neurotrophe Faktoren, wie Neuropeptide und endotheliale Faktoren, sind ebenfalls beschrieben (Ehrhart-Bornstein et al., 1998; Willenberg et al., 2008). Diese stellen Regelkreise dar, in denen über einen Feedback-Mechanismus die hormonelle Produktion gesteuert wird. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Synthese aller Steroidhormone ist die enzymatische Umwandlung der Ausgangssubstanz Cholesterin zu Pregenolon. Der weitere Syntheseweg der Steroidhormone wird durch die

Enzymexpression in den Zellen bestimmt (Payne und Hales, 2004). Durch vielfache enzymatische Schritte werden in der Nebennierenrinde, ausgehend von Pregenolon, Mineralkortikoide, Glukokortikoide und Androgene gebildet. Das hypophysäre Hormon ACTH stimuliert die Freisetzung der Glukokortikoide und der Androgene, in geringem Ausmaß, auch die der Mineralkortikoide (Payne und Hales, 2004). Die Aldosteronsekretion wird jedoch vorwiegend in der *Zona glomerulosa* unter dem Einfluss des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems realisiert (Mattsson und Young, 2006) (Abb. 1).

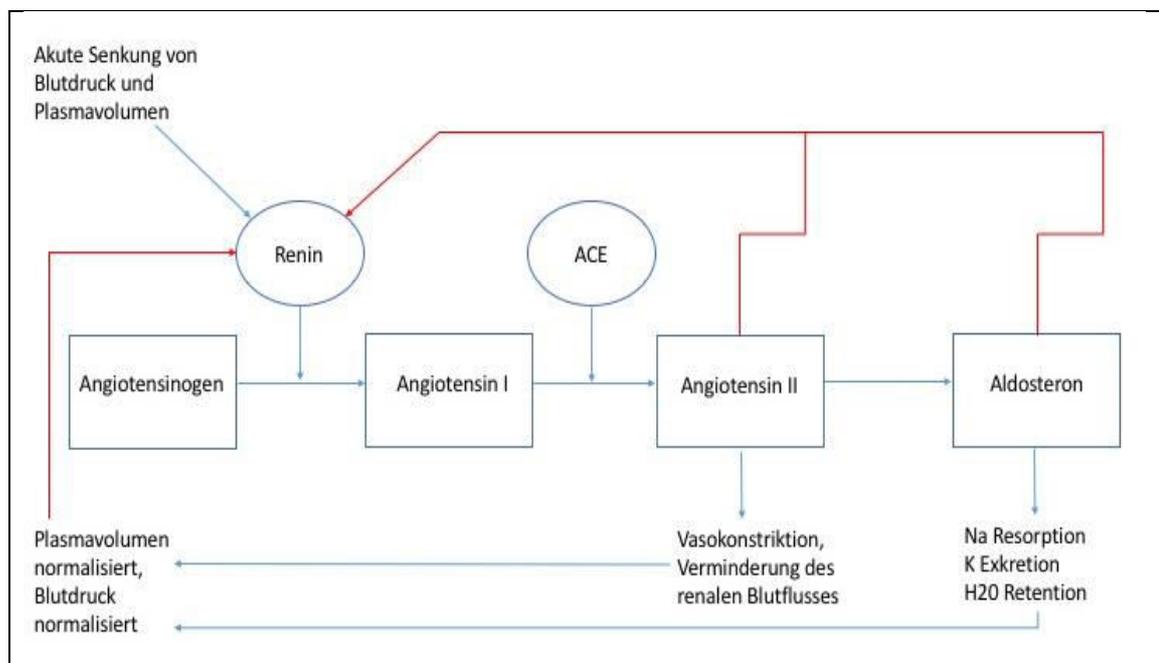


Abb.1: **Regelkreis des RAAS.** Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System existiert als gewebeständiges zirkulierendes System in Myokard, Gefäßwänden, Niere und anderen Organen. Die Freisetzung von Angiotensin II fungiert als wichtiger Stimulus für die Aldosteronfreisetzung. Dies fördert den Rücktransport von Natrium und Wasser aus dem Urin ins Blut, wodurch das Blutvolumen steigt. Eine überschießende Aktivierung des Systems wird durch eine negative Rückkopplung vermieden. So wird durch einen höheren Blutdruck, Angiotensin II und Aldosteron die Freisetzung von Renin gehemmt (Gross, 1958). Abkürzung; ACE: *angiotensin converting enzyme*, aktiviert (blauer Pfeil), hemmt (roter Pfeil).

Erkrankungen der Nebennieren manifestieren sich mit einer Über- oder Unterproduktion von Steroidhormonen und/oder einem autonomen Wachstum und werden nach den vorwiegend gebildeten Hormonen differenziert. Eine vermehrte Sekretion von Aldosteron wird Aldosteronismus genannt und wird in einen primären (Conn-Syndrom) und einen sekundären Aldosteronismus unterteilt (Conn, 1955).

1.1. Pathophysiologische Grundlagen -Aldosteron-

Die Begriffe „Elektrocortin“ und „Mineralokortikoid“ für Aldosteron betonen die Eigenschaft der Natriumregulation dieses Steroidhormons (Willenberg, 2017). Aldosteron ist ein Derivat von Cholesterol und wird in der *Zona glomerulosa* der Nebenniere produziert und hauptsächlich als Reaktion auf den Kaliumspiegel, sowie die reninabhängige Ausschüttung von Angiotensin II freigesetzt. Aldosteron übt seine Wirkung durch Bindung an den nukleären Mineralokortikoidrezeptor aus. In epithelialen Geweben, z.B. Nierentubulus, Colon, Speichel- und Brustdrüsen, erhöht Aldosteron die Rückresorption von Natrium (Mattsson und Young, 2006). Die klinischen Merkmale des primären Aldosteronismus (PA) werden teilweise durch die renalen Wirkungen von Aldosteron bestimmt. Die Hauptwirkung von Aldosteron besteht darin, die Anzahl offener Natriumkanäle im kortikalen Tubulus zu erhöhen, was zu einer erhöhten Natriumresorption führt (Masilamani et al., 1999). Daher senkt Aldosteron die Natriumkonzentration im Urin und die Natriumexkretion durch die Nieren. Darüber hinaus wird Natrium im Plasma streng reguliert und eine erhöhte Natriumretention führt zur Verdünnung von Natrium durch Wasserretention und Trinken (Willenberg, 2017). So entwickelt sich beim PA ein Zustand der Hypervolämie, um der Salzüberladung zu entgehen. Dies begünstigt eine hypervolämische Hypertonie, eine Dilatation der Gefäße, sowie eine Inflammation (Catena et al., 2015). Hohe Aldosteronwerte haben über die arterielle Hypertonie hinaus negative Auswirkungen auf das nichtepitheliale Gewebe (Gilbert und Brown, 2010). Dazu gehören der erhöhte oxidative Stress und der Kollagenumbau. Dies führt zu einer endothelialen Dysfunktion, linksventrikulären Hypertrophie und Fibrosierung in Niere, Herz und Blutgefäßen (Brown, 2005). Die autonome Aldosteronsekretion ist auch mit

weiteren Effekten über der Blutdruckerhöhung und den Herz-Kreislauf-Komplikationen hinaus assoziiert (Mattsson und Young, 2006). Obwohl die Pathogenese noch unklar ist, stellt sich das metabolische Syndrom bei Patienten mit einem PA häufiger als bei Patienten mit einer essentiellen Hypertonie dar (Fallo et al., 2006). Zusammenfassend ist bekannt, dass Patienten mit PA bei gleicher Blutdruckhöhe, wie ein Vergleichskollektiv essentieller Hypertoniker, ein signifikant höheres Risiko für Schlaganfall, Myokardinfarkt, linksventrikulärer Hypertrophie und metabolischem Syndrom haben (Milliez et al., 2005). Dies ist möglicherweise durch die mit der Salzretention assoziierten Hypertonie bedingt; zahlreiche nicht-genomische proinflammatorische Wirkungen des Aldosterons werden ebenfalls diskutiert (White, 2003; Willenberg, 2017). Die Folgen sind unabhängig von der Schwere der arteriellen Hypertonie und machen die Erkennung und Behandlung dieses wichtigen Krankheitsbildes umso wichtiger (Fritsch Neves und Schiffrin, 2003).

1.2. Definition und Klinik des primären Aldosteronismus

Der primäre Aldosteronismus ist die häufigste Form der sekundären arteriellen Hypertonie mit einer Prävalenz von 5-10 % aller Hypertoniker (Rossi et al., 2006; Hannemann et al., 2012) und 10-20 % bei Patienten mit therapieresistenter Hypertonie (Calhoun et al., 2002). Einen primären, oft normokaliämischen PA weisen ca. 6-12 % aller Hypertoniker auf (Büchner et al., 2006). Patienten mit einem Conn-Syndrom haben im Vergleich zu Patienten mit einer essentiellen Hypertonie bei ebenso schlechten Blutdruckwerten ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Folgen (Milliez et al., 2005). Ferner haben Patienten mit einem Aldosteronismus eine höhere Gefahr für die Entwicklung einer Niereninsuffizienz, sowie metabolischer Komplikationen (Fourkotis et al., 2012; Hanslik et al., 2015). Unter anderem wurde diese Erkrankung von Jerome Conn im Jahr 1955 bei einer 34-jährigen Hausfrau beschrieben, die unter der Trias Hypertonie, Hypokaliämie und metabolischer Alkalose litt (Conn, 1955). Begleitsymptome waren intermittierende Tetanien, Muskelschwäche, Polyurie und Polydipsie. Im Urin der Patientin fand sich in hoher Konzentration Aldosteron, welches in der Lage ist, Natrium zu retinieren. Im Labor stellte sich zusätzlich zur hypokaliämischen, metabolischen Alkalose eine Hypernatriämie

dar. Nach Adrenalektomie, die ohne Bildgebung und lediglich auf dem Boden der Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen erfolgte, verschwanden die Symptome. Die histologische Begutachtung erbrachte den Befund eines ca. 4 cm großen Nebennierenrindenadenomes (Conn, 1955). Der PA oder Conn-Syndrom ist demnach definiert als ein inadäquat hoher Aldosteronspiegel (Funder et al., 2008). Die früher beschriebene Prävalenz von < 1 % ist darauf zurückzuführen, dass ursprünglich nur Patienten mit den typischen Trias; Hypertonie, Hypokaliämie und metabolischer Alkalose eine Diagnostik bezüglich PA erhalten haben. Obwohl bereits Conn selbst 1965 (Conn et al., 1965) das Krankheitsbild PA auch ohne das Vorhandensein dieser drei Symptome beschrieb, dauerte es fast vierzig Jahre bis durch Einführung des Aldosteron-Renin-Quotienten (ARQ) die Diagnose des normokaliämischen PA sensitiver gestellt werden konnte (Gordon, 2004). Spätere Studien haben bestätigt, dass ein Großteil der Patienten mit einem primären Aldosteronismus normokaliämisch ist (Calhoun et al. 2002; Rossi et al., 2002; Mulatero et al., 2004).

1.3. Die verschiedenen Entitäten

Die beiden Hauptformen sind das unilaterale Aldosteronproduzierende Adenom (APA), ein gutartiger Tumor der Nebennierenrinde, und die bilaterale adrenale Hyperplasie (BAH), auch bekannt als idiopathischer Aldosteronismus (IHA) (Reincke et al., 2003). Während die Mehrzahl der Fälle sporadisch auftreten, sind 1-5 % der Fälle familiäre Formen. Derzeit sind drei verschiedene familiäre Formen bekannt: familiärer Hyperaldosteronismus Typ I (FH1), Typ II (FH2) und Typ III (FH3) (Zennaro et al., 2015). In den letzten Jahren erschienen mehrere Artikel in Form von Falldarstellungen über Patienten mit PA in Kombination mit einem Hypercortisolismus aufgrund von Aldosteron- und Cortisol-cosezierenden Nebennierenrindenadenomen (A/CPAs) (Späth et al., 2011). Mit 1 % der Patienten mit PA ist das Aldosteronproduzierende Nebennierenrindenkarzinom mit einer schlechten Prognose als letzte und äußerst seltene Form zu nennen (Seccia et al., 2005).

1.4. Diagnostik des primären Aldosteronismus

Zu Beginn der Diagnostik wird versucht eine Unterscheidung der Hypertoniepatienten in solche mit bzw. ohne sekundäre Hypertonie zu treffen. Wünschenswert wäre ein routinemäßiges Screening auf sekundäre Ursachen bei allen neu diagnostizierten Hypertonikern. Insbesondere sollte die Diagnose des primären Aldosteronismus unter den folgenden Bedingungen in Betracht gezogen werden (Funder et al., 2016; Baguet et al., 2016).

Indikationen für ein Screening:

- Hypertonie und spontane Hypokaliämie ($< 3,5$ mmol/l im ungestauten Blut) oder Hypokaliämie, hervorgerufen durch Verabreichung eines niedrig dosierten Diuretikums
- Junges Manifestationsalter der arteriellen Hypertonie in der Familienanamnese oder zerebrovaskulärer Vorfall im jungen Alter (< 40 Jahre)
- Therapieresistenter arterieller Hypertonus: drei antihypertensive Medikamente und RR $> 140/90$ mm Hg bzw. kontrollierte Hypertonie, RR $< 140/90$ mm Hg bei Erweiterung auf vier oder mehr Antihypertensiva
- Nachweis von Endorganschäden, die in keinem Verhältnis zur Schwere der Hypertonie stehen (linksventrikuläre Hypertrophie, AV-Block, Karotisstenose)
- Mittelschwere oder schwere Hypertonie Grad 2 oder 3, d.h. ≥ 150 mmHg systolisch und/oder ≥ 100 mmHg diastolisch, in drei verschiedenen Blutdruckmessungen an drei verschiedenen Tagen
- Hypertonie und Vorhandensein eines adrenalen Inzidentaloms
- Arterielle Hypertonie in Kombination mit einem Schlafapnoesyndrom
- Wenn eine Evaluation für sekundäre Hypertonie in Betracht gezogen wird, z.B. bei Testung auf Phäochromozytom oder renovaskulären Erkrankungen
- Bei hypertensiven erstgradigen Verwandten von Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus

Screening-Test für PA: Aldosteron-Renin-Quotient (ARQ)

Da Kalium in der Niere durch Natrium ausgetauscht wird und durch die Hypervolämie verdünnt wird, ist die Entwicklung einer Hypokaliämie bei Patienten mit einer Hypertonie, eine spezifische Eigenschaft des PA. Das Serumkalium ist allein jedoch nicht sensitiv genug, mildere Formen eines PA anzuzeigen (Funder et al., 2016). Dennoch kann der Nachweis einer Hypokaliämie und eines Kaliumverlustes über die Niere eine wertvolle Information während des Screeningprozesses sein, wie auch eine metabolische Alkalose (Balas et al., 2010; Baguet et al., 2016). Als Screening-Parameter wird heutzutage der Aldosteron-Renin-Quotient verwendet. Im Jahr 1976 wurde zunächst der ARQ als Screening-Parameter vorgestellt (Dunn und Espiner, 1976), er wurde jedoch erst im Jahr 1981 als Routineverfahren eingeführt (Hiramatsu et al., 1981; Weinberger und Fineberg, 1993). Beim primären Aldosteronismus findet sich ein Aldosteronspiegel, welcher im Vergleich zum Reninspiegel zu hoch ist (Funder et al., 2008). Zu beachten ist, dass Antihypertensiva, die den ARQ deutlich beeinflussen, vor dem Screening möglichst pausiert werden müssen (Funder et al., 2016). Die Sensitivität und Spezifität des ARQ-Screenings kann gesteigert werden, wenn neben dem ARQ auch Indizes der Aldosteronwirkung in das Screening mit einfließen (Willenberg et al., 2009; Balas et al., 2010). Da außer dem Reninspiegel und dem Kaliumhaushalt auch weitere Faktoren Einfluss auf die Aldosteronsekretion haben (Willenberg et al., 2008; Fischer et al., 2013) ist im Falle eines positiven Screeningtests zur Diagnosesicherung ein Bestätigungstest notwendig (Funder et al., 2008).

Bestätigungstests

Die aktuellen Leitlinien empfehlen bei positivem ARQ die Durchführung eines oder mehrerer Bestätigungstests, um die Diagnose endgültig zu bestätigen oder auszuschließen. Dies schließt falsch positive Testergebnisse aus, bevor man zur Subtypendiagnostik voranschreitet. Auf weitere Bestätigungsverfahren kann verzichtet werden, wenn folgende Kriterien zutreffen: spontane Hypokaliämie, ein inadäquat hoher Aldosteronwert > 200 ng/l (550 pmol/l) und ein Reninspiegel, welcher unter der Nachweisgrenze liegt (z.B. $< 1,0$ ng/l)

(Funder et al., 2016). Es gibt keinen Bestätigungstest, der als Goldstandard gilt, die Wahl des Testsverfahrens orientiert sich jeweils an den Komorbiditäten, der Compliance des Patienten, sowie der lokalen Expertise (Funder et al., 2016). Etwa zwei Wochen vor Testdurchführung sollten nur Medikamente verwendet werden, die das RAAS minimal beeinflussen (Solar et al., 2012). Es stehen vier Bestätigungstests zur Verfügung. Die am häufigsten verwendeten Bestätigungstests sind der Kochsalzbelastungstest und der Fludrocortison-Suppressionstest (FST) (Mattsson and Young, 2006). Das zugrundeliegende Prinzip dieser Tests besteht darin, dass ein Anstieg des intravasalen Volumens die Reninfreisetzung und demzufolge auch die Aldosteronproduktion bei Patienten ohne primären Aldosteronismus reduzieren sollte (Haase et al., 2014). Idealerweise zeigen diese Tests, dass der Aldosteronspiegel trotz Kochsalzbelastung bzw. Exposition gegenüber Fludrocortison inadäquat hoch für die Volumenexpansion ist (Haase et al., 2014). Der Captopril-Stimulationstest (CST) wurde ebenfalls als ein potentieller Bestätigungstest eingeführt. Captopril hemmt die Konversion von Angiotensin I in Angiotensin II, wodurch bei gesunden Probanden die Aldosteronproduktion gehemmt und der Reninspiegel erhöht wird (Rossi et al., 2007).

Subtypendiagnostik

Die Differenzierung der Subtypen ist entscheidend zur Bestimmung der Behandlungsoptionen (Abb. 2). Eine einseitige Erkrankung wird mit einer einseitigen Adrenalectomie und die bilaterale Erkrankung medikamentös behandelt (Reincke et al., 2003). Eine korrekte Charakterisierung ist daher unerlässlich, um auf der einen Seite den Patienten unnötige Operationen zu ersparen und auf der anderen Seite die Patienten zu identifizieren, die von einer Operation profitieren und bei denen eine lebenslange medikamentöse Therapie vermieden werden könnte (Wolley und Stowasser, 2017). Jeder Patient mit PA sollte an erster Stelle eine Computertomographie (CT) der Nebennieren erhalten, um ein Nebennierenrindenzinom auszuschließen und dem Radiologen oder gegebenenfalls Operateur wichtige anatomische Informationen zu liefern (Funder et al., 2016). Die CT-Untersuchung erwies sich jedoch als wenig sensitiv und spezifisch zur Diagnostik unilateraler Erkrankungen, da ein beträchtlicher Anteil der Patienten falsch klassifiziert

wurde (Young et al., 2004; Kempers et al., 2009; Kamemura et al., 2017). In Studien wurden die Nebennierenvenenproben mit dem CT-Befund bei 62 Patienten verglichen und es konnte gezeigt werden, dass die CT-Ergebnisse in 68 % der Fälle ungenau waren (Magill et al., 2001). In einer Übersichtsarbeit von Stowasser et al. waren Adenome mit einer Größe von weniger als 1 cm für fast 50 % der Aldosteronproduzierenden Adenome verantwortlich, die chirurgisch entfernt wurden (Stowasser et al., 2001). In einer weiteren Studie hatten Patienten mit einem Adenom in 14,6 % der Fälle in der CT-Untersuchung, die Lokalisation der Erkrankung beim AVS bilateral. Andererseits konnte, bei fehlerhafter Kanülierung der Nebennierenvenen die asymmetrische Aldosteronsekretion dem Nachweis entgehen, sodass einigen Patienten die mögliche Heilung des Bluthochdrucks durch operative Intervention verwehrt wurde (Kempers et al., 2009). Konsensus-Richtlinien legen daher nahe, dass bei den meisten Patienten ein *adrenal vein sampling* (AVS) durchgeführt werden sollte (Funder et al., 2016). Eine Ausnahme stellen jüngere Patienten (< 30-35 Jahre) mit einem deutlichen primärem Aldosteronismus und einem eindeutigen einseitigen CT-Befund dar. Dies basiert auf der Tatsache, dass Nebennierenrindeninzidentalome in dieser Altersgruppe selten sind und AVS- sowie CT-basierte Diagnosen eine hohe Konkordanz haben (Zhu et al., 2016). In diesem Falle kann die unilaterale Adrenalektomie ohne AVS erfolgen (Arlt, 2010) (Abb. 2).

1.5. Therapie des primären Aldosteronismus

Das Hauptziel der Behandlung ist die Vorbeugung der Mortalität vom Aldosteronexzess und allen daraus resultierenden schwerwiegenden kardiovaskulären Folgen. Durch die Behandlung (Adrenalektomie oder medikamentöse Therapie) ist die kardiovaskuläre Morbidität reversibel (Rossi et al., 2008). Die Adrenalektomie führt zum Rückgang der linksventrikulären Hypertrophie (Catena et al., 2007), verbessert die diastolische linksventrikuläre Funktion (Rossi et al., 2013), reduziert die Dicke des Intima-Media-Komplexes und führt langfristig zur Verbesserung der Nierenfunktion (Wu et al., 2011; Lin et al., 2012).

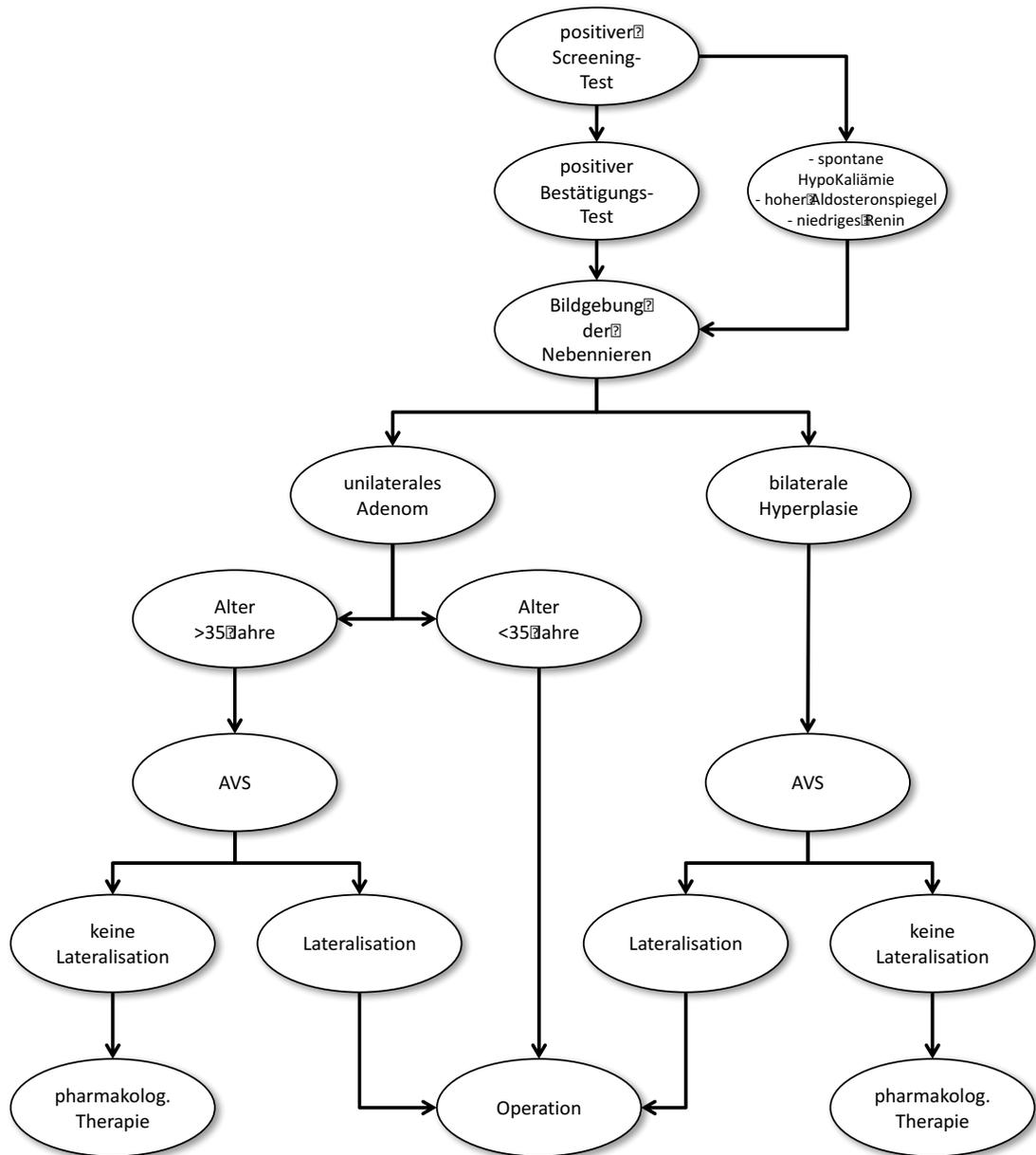


Abb. 2: **Empfohlenes diagnostisches Vorgehen bei Verdacht auf einen primären Aldosteronismus.** Die Diagnostik bei Verdacht auf PA sollte einem Stufenschema folgen: 1) Screening 2) Bestätigungstest 3) Differenzierung in uni- bzw. bilaterale Erkrankung 4) Einleitung einer spezifischen Therapie (Funder et al., 2016). Es sollte betont werden, dass ein Bestätigungstest bei hochverdächtiger Konstellation eines PA, d.h. junger Patient mit klar pathologischem Aldosteron-Renin-Quotienten, (Aldosteron > 200 ng/l, Renin unterhalb der Nachweisgrenze < 1,0 ng/l) schwerer hypokaliämischer Hypertonie und typischem radiologischem Befund, nicht zwingend erforderlich ist (Arlt, 2010).

Der postoperative Nutzen durch die Adrenalektomie ist groß und es besteht eine geringe perioperative Komplikationsrate. Klinische und biochemische Aspekte zur postoperativen Erfolgskontrolle sind die Besserung des Blutdruckes mit Reduktion der antihypertensiven Medikation oder Kaliumnormalisierung. Ferner sollte der Aldosteron- und Reninspiegel kontrolliert werden (Young, 2003). Falls präoperativ eine Cortisol-Cosekretion vorlag, sollte postoperativ eine Hydrocortisonsubstitution erfolgen (Willenberg et al., 2017). Patienten, die eine bilaterale adrenale Hyperplasie haben oder die nicht in der Lage sind, operiert zu werden bzw. eine Operation ablehnen, sollten medikamentös mit einem antimineralokortikoid-wirksamen Medikament behandelt werden, beispielsweise mit Spironolacton, Eplerenon oder Amilorid bis zur Normalisierung des Renins (Mattsson und Young, 2006).

1.6. Nebennierenvenenkatheter

Der Nebennierenvenenkatheter (engl. adrenal vein sampling, AVS) mit selektiver Nebennierenvenenblutentnahme gilt als Goldstandard zur Charakterisierung der häufigsten Formen des PA: zur Lokalisation Aldosteronproduzierender Adenome und zur Abgrenzung von einer bilateralen Nebennierenrindenhyperplasie (Magill et al., 2001; Espiner et al., 2003; Daunt, 2005; Rossi et al., 2014; Funder et al., 2016). Der Nebennierenvenenkatheter zeigt an, ob die autonome Aldosteronproduktion bei Patienten mit PA uni- oder bilateral stattfindet (Daunt, 2005). AVS ist ein sicheres und hoch effektives Verfahren, welches bei 37,8 % aller PA-Patienten die Therapie in großem Maße verbessert, die andernfalls basierend auf den Ergebnissen von bildgebenden Verfahren nicht ordnungsgemäß behandelt worden wären (Kempers et al., 2009). Der AVS, der erstmals 1967 im *New England Journal of Medicine* vorgestellt wurde, wird am häufigsten beim primären Aldosteronismus durchgeführt, da dies die häufigste Nebennierenerkrankung mit einer übermäßigen Hormonproduktion ist (Melby et al., 1967; Dunnick et al., 1979; Doppman und Gill, 1996; Young et al., 1996). AVS wird weniger häufig verwendet, um andere funktionelle Nebennierenerkrankungen, einschließlich dem Phäochromozytom und Cushing-Syndrom, zu beurteilen (Blondin et al., 2015). Die venöse Drainage der Nebennieren erfolgt beidseits über eine

zentrale Vene (Anson et al., 1947). Die rechte Nebennierenvene (NNV) fließt direkt in die Hinterwand der *V. cava inferior* oberhalb der rechten Nierenvene (Gagnon, 1956). Beide Nebennieren haben auch eine Vielzahl an oberflächlich verlaufenden Kapselvenen, die auf der rechten Seite oft die Nierenkapsel durchdringen und mit interkostalen, phrenischen und hepatischen Venen verbunden sind (Gagnon, 1956). Die angiographische Darstellung der oberflächlichen Venen ermöglicht die Erkennung einer korrekten Katheterposition (Blondin et al., 2015). Anatomische Varianten in der venösen Drainage beider Nebennierenvenen tragen zu den technischen Schwierigkeiten bei der Probenentnahme bei (Magill et al., 2001). Zur selektiven Nebennierenvenenblutentnahme wird eine Schleuse in die Femoralvene platziert und die Position der Katheterspitze durch Kontrastmittel oder Durchleuchtung verifiziert (Blondin et al., 2015). Das Verfahren wird optimal morgens durchgeführt, der Patient sollte nüchtern sein (Young und Stanson, 2009). AVS wird durch die Katheterisierung der rechten Femoralvene über die Seldinger-Technik mit darauffolgendem Probegewinn aus beiden Nebennierenvenen durchgeführt. In den meisten Zentren erfolgt die Katheterisierung der linken Nebennierenvene zunächst, gefolgt von der rechten Nebennierenvene und der *V. cava inferior* (Magill et al. 2001). Die Bestätigung der korrekten Katheterlage erfolgt durch die Beurteilung der Cortisolspiegel, die an jedem Sondierungsort asserviert werden (Daunt, 2005). Die Technik der AVS geriet 1970 aufgrund der technischen Schwierigkeiten der Katheterisierung, vor allem der rechten Nebennierenvene, in Kritik (Doppman und Gill, 1996). Es wurde versucht, AVS durch andere diagnostische Verfahren zu ersetzen, um Nebennierenraumforderungen zu unterscheiden. Die CT und MRT Untersuchungen sind bei der Differenzierung außerordentlich sensitiv, bieten aber keine Informationen über die Nebennierenfunktion. Kein anderes diagnostisches Verfahren ist in dieser Hinsicht so genau wie AVS (Magill et al., 2001). Zur Sicherstellung der Genauigkeit der AVS sollten die Nebennierenvenenprobenentnahmen in spezialisierten Zentren durchgeführt werden (Doppman und Gill, 1996). Bei der Untersuchung wird venöses Blut von jeder Seite drainiert und für Cortisol- und Aldosteronmessungen bei der Abklärung des PA genutzt (Young und Stanson, 2009) (Abb. 3).

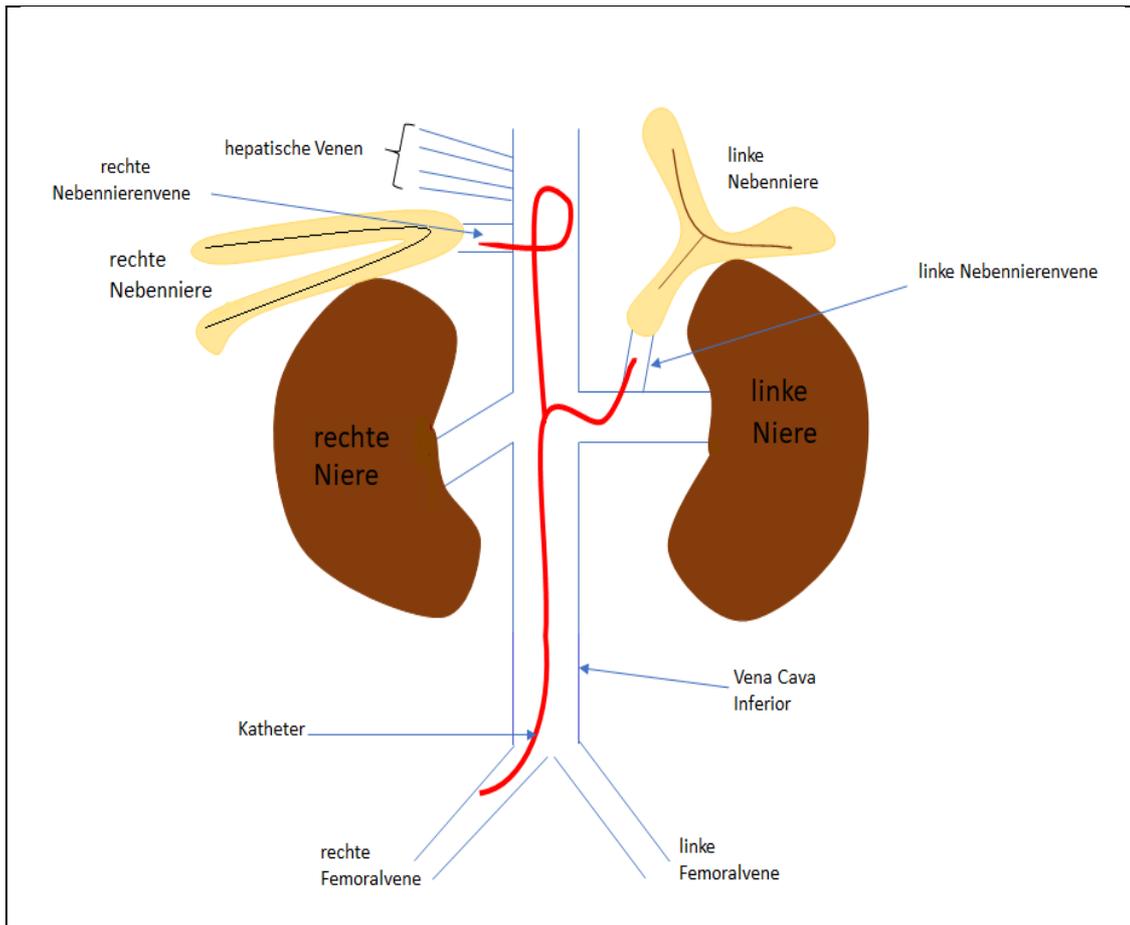


Abb. 3: **Schematische Darstellung des Nebennierenvenenkatheters.** Die Nebennierenvenen werden sequentiell mit einem Katheter kanüliert, über dem Blut abgenommen wird. Ob die Nebennierenvene "getroffen" wurde, stellt sich erst nach der Hormonmessung heraus. Eine Methode, die schnell anzeigt, ob der Katheter erfolgreich in die Nebennierenvene inseriert wurde und Nebennierenvenenblut ansaugt, wäre wünschenswert.

Da das Nebennierenvenenblut reich an Cortisol ist, wird dies als Marker für eine erfolgreiche Nebennierenvenenprobe verwendet, wobei bestimmte Einschränkungen gelten (Späth et al., 2011; Dekkers et al., 2013; Blondin et al., 2015). Es sind beidseits erfolgreiche kanülierte Nebennierenvenen (NNV) erforderlich, um sicher zwischen Adenom und idiopathischem Hyperaldosteronismus (IHA) unterscheiden zu können (Magill et al. 2001). Die Erfolgsrate für aussagekräftige Testergebnisse ist, vor allem von der korrekten Lage des Nebennierenvenenkatheters abhängig, und benötigt einen erfahrenen interventionellen Radiologen. Zur Bestimmung der korrekten Lage des Nebennierenvenenkatheters müssen sowohl technische als auch anatomische Faktoren berücksichtigt werden (Blondin et al., 2015).

Auswertung der Blutproben bei Patienten mit PA - unilaterale oder bilaterale Erkrankung?

In der Differenzierung der unilateralen vs. bilateralen Aldosteronproduktion, definiert die Auswertung des Aldosteron-Cortisol-Quotienten (ACQ) den Subtyp (Doppman und Gill, 1996). Im ersten Schritt bilden wir den Quotienten der Cortisolkonzentrationen in der Nebennierenvene (*adrenal vein, AV*) und peripheren Vene (*peripheral vein, PV*), der auch als Selektivitätsindex (SI) bezeichnet wird ($SI = \text{Cortisol AV} / \text{Cortisol PV}$) (Funder et al., 2008). Wenn eine Nebennierenvenenprobe asserviert wird, wird deshalb zeitgleich eine periphere Blutprobe zur Bestimmung der Cortisol- und Aldosteronspiegel gewonnen (Stowasser et al., 2001). Eine einfache periphere Kontrolle wird über die in der Leistenvene einliegenden Schleuse abgenommen. Empirisch wurde ein SI von > 2 für eine erfolgreiche Katheterisierung festgelegt (Funder et al., 2008). Bei einem $SI < 2$ handelt es sich um Blut, welches keine Nebenniere drainiert (Blondin et al., 2015). Im zweiten Schritt werden die Aldosteron-Cortisol-Verhältnisse für beide Nebennierenvenen (AV) berechnet und miteinander verglichen ($\text{Aldosteron AV Seite 1} : \text{Cortisol AV Seite 1} / \text{Aldosteron AV Seite 2} : \text{Cortisol AV Seite 2}$). Dieser Quotient wird auch als Lateralisationsindex (LI) bezeichnet. Je höher der LI, desto sicherer der Nachweis der Lateralisation (Rossi et al., 2014; Funder et al., 2016). Ist der $LI > 2$, dann deutet dies auf eine unilaterale Erkrankung hin (Rossi et al., 2014). Ist der $LI > 3$, dann liegt mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ein APA vor. Wenn der ACQ in der sicher kanülierten Nebennierenvene kleiner ist als im peripheren Blut, dann kann dies ein Hinweis auf einen APA auf der kontralateralen Seite sein. Bei der bilateralen adrenalen Hyperplasie, ist der ACQ in beiden Nebennierenvenen erhöht im Vergleich zur peripheren Vene, als Hinweis auf eine bilaterale Aldosteronproduktion (Rossi et al., 2014).

Komplikationen

Komplikationen bei AVS sind sehr selten, wenn die richtigen Techniken und Erfahrung angewandt werden und werden in den meisten Studien mit weniger als 2,5 % beschrieben (Daunt, 2005; Rossi et al., 2012). Dabei kann es sich um eine Thrombose oder Ruptur der Vene handeln, was mit einer Infarzierung oder Blutung einhergeht. Andere mögliche Komplikationen wären das Auftreten einer Nebennierenrindeninsuffizienz oder einer hypertensiven Krise (Gross et al., 1992).

Schnelltests zur Verbesserung des AVS

Im Jahr 2007 wurde erstmals von einer italienischen Gruppe eine Studie veröffentlicht, die die Anwendung eines Cortisol-Schnelltests während AVS bei 5 Probanden getestet hat (Mengozzi et al., 2007). Eine zweite Studie von Auchus et al. bei 30 Patienten zeigte, dass die Verwendung eines Cortisol-Assays bei AVS eine erneute Probenentnahme am gleichen Tag erlaubte und die Erfolgsquote der Untersuchung erhöhte (Auchus et al., 2009). Die Erfolgsrate stieg von 73 % auf 97 % nach Einführung des *rapid cortisol assays* (RCA) und eines damit verbundenen Algorithmus (Auchus et al., 2009). Die Dauer der Untersuchung dauerte ca. 1 Stunde (30 min für den Transport, 10 min für Zentrifugation und Verdünnung und 20 min für den Assay). Bis zum Testergebnis wurden die Katheterschleusen beim Patienten belassen, wenn das Resultat nicht erfolgreich war, wurde die Probeentnahme wiederholt (Auchus et al., 2009). In einer Studie von 2011 wurde der Effekt des RCA auf den Erfolg von AVS in einer Kontrollgruppe mit einer niedrigen Erfolgsquote verglichen. Es wurden 46 Patienten mit 47 Patienten verglichen, die AVS ohne RCA erhalten haben (Betz et al., 2011). In der Kohorte ohne RCA lag der Erfolg von AVS bei 55 % (26 von 47 NNV-Proben). Nach Einführung des RCA stieg die Erfolgsrate auf 85 % (39 von 46 Proben). Die Dauer der Untersuchung lag bei ca. 25-30 min. Die beiden Haupteffekte des Cortisol-Schnelltests auf das Ergebnis waren durch die erneute Kanülierung der rechten NNV und einen verzögerten Trainingseffekt zurückzuführen. Das macht den Assay vor allem für Zentren mit niedrigen Erfolgsraten besonders nützlich. Die Aufnahme eines Cortisol-Assays in die AVS-Protokolle gilt als sichere und effektive Methode zur Steigerung der Erfolgsraten (Betz et al., 2011).

1.7. Weitere Sekretionsprodukte der Nebenniere und deren Stellenwert beim Nebennierenvenenkatheter

Metanephrin

Ähnlich zu den Katecholaminen haben deren Metabolite (Normetanephrin und Metanephrin) eine sehr schnelle zirkulatorische *Clearance* und eine viel kürzere Plasmahalbwertszeit im Vergleich zu Cortisol (3-6 min gegenüber 70-120 min) (Eisenhofer et al., 1995). Plasma-Metanephrin, der O-methylierte Metabolit von Adrenalin, stellt einen alternativen Marker zu Cortisol bei AVS dar (Dekkers et al., 2013). Mehr als 90 % des Plasma-Metanephrins wird im Nebennierenmark produziert, wobei < 10 % des Epinephrins nach deren Freisetzung aus den Nebennieren produziert wird (Eisenhofer et al., 1995). Durch die kurze Halbwertszeit des Metanephrins im Vergleich zu Cortisol, kommt es zu einer nahezu 100-fachen Zunahme der adrenalen im Vergleich zu den peripheren Konzentrationen in Fällen, bei denen der Katheter richtig liegt (Eisenhofer et al., 1995). Solch große Gradienten liefern bei entsprechender Analytik sensitivere Möglichkeiten, um die korrekte Stelle der Probenentnahme zu ermitteln als die kleineren Gradienten des Plasma-Cortisols. Ferner erfolgt die Produktion des Metanephrins in der Nebenniere kontinuierlich und unabhängig von der Adrenalinfreisetzung (Eisenhofer et al., 1998). Daher zeigen die Plasmakonzentrationen des Metanephrins eine relativ geringe Zunahme auf Stress. Dadurch werden Schwankungen des Nebennierenvenenflusses oder andere Einflüsse, die die Interpretation der Aldosteronmessungen im Nebennierenvenenblut beeinflussen könnten, vermieden (Eisenhofer et al., 1995; Eisenhofer et al., 1998).

Vitamin C

Eine weitere wichtige Rolle in der Nebenniere hat das Vitamin C. Die Nebennieren sind reich an Vitamin C und weisen Konzentrationen von bis zu 10 mmol/l auf (Levine und Morita, 1985). Aufgrund der Tatsache, dass die Nebennieren nach Stress Vitamin C freisetzen und die Vitamin C Konzentration in den Nebennierenvenen weit höher ist als die der peripheren Venen wurden in einer Studie von 2007 Patienten mit einem Aldosteronismus getestet, bei denen AVS durchgeführt wurde (Padayatty et al., 2007). Bei diesen Patienten wurden

die Vitamin C- und Cortisolkonzentrationen, sowohl in der Nebennierenvene als auch in der peripheren Vene nach ACTH-Stimulation gemessen. In dieser Studie wurde erstmals die simultane Ausschüttung von Vitamin C, sowohl aus der zentralen als auch aus der peripheren Vene gezeigt. Nach der ACTH-Stimulation stiegen die maximalen Vitamin C Konzentrationen in der NNV signifikant mehr im Vergleich zu den entsprechenden peripheren Vitamin C Konzentrationen an. Dies war kein anhaltender Anstieg, sondern ein sekretorischer Peak, und der höchste Mittelwert bei 2 min war signifikant größer als die Werte bei 0, 6, 8, 10 und 15 min. Ein solcher Peak ist in der peripheren Vene nicht aufgetreten. Die Freisetzung von Cortisol wurde durch Vitamin C beschleunigt, das mit steigender Cortisolkonzentration abnahm (Padayatty et al., 2007). Die lokalen Vitamin C Konzentrationen im NNM, die aus der ACTH-induzierten Freisetzung von Vitamin C resultieren, können sicherstellen, dass die Noradrenalin synthese immer mit maximaler Geschwindigkeit stattfindet (Dhariwal et al., 1989 und 1991). Da Noradrenalin das Substrat für die Adrenalin synthese ist und da Cortisol lokal die Phenylethanolamin-N-Methyltransferase hochreguliert, kann die kombinierte Wirkung von Vitamin C und Cortisol angereichertem Blut aus der Nebennierenrinde auch dafür sorgen, dass die Adrenalin synthese auch maximal im Nebennierenmark fortschreitet (Levine und Morita, 1985; Wurtman, 2002).

Chromogranin A

Ein anderer Ansatz ist durch den Stellenwert von Chromogranin A (CgA) zu erklären. Es gibt Hinweise für die Messung von CgA anstelle von Cortisol zur Beurteilung der Selektivität von AVS (Rossi, 2007; Young und Stanson, 2009; Stewart und Allolio, 2010; Auchus et al., 2010). Chromogranin A ist zusammen mit den Katecholaminen in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks lokalisiert und wird zusammen mit den Katecholaminen aus dem NNM freigesetzt (Crivellato et al., 2008; Koshimizu et al., 2010). Obwohl CgA als Marker für neuroendokrine Tumore, einschließlich des Phäochromozytoms bekannt ist (Barakat et al., 2004) sind seine Regulation, Sekretion und Plasmahalbwertszeit noch unklar (Montero-Hadjadje et al., 2006). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass CgA tonisch ins Nebennierenvenenblut freigesetzt wird. Dies könnte dazu dienen, die Selektivität von AVS zu beurteilen. Eine

Studie wurde entwickelt, um zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang von CgA zwischen der unteren Hohlvene und der Nebennierenvene gibt. Weiter wurde getestet, ob CgA zur Bestimmung der Lateralisation von AVS verwendet werden könnte und ob irgendwelche Vorteile gegenüber dem Cortisol-Assay existieren (Seccia et al., 2011). Das erste Ergebnis dieser Studie hat gezeigt, dass bei Patienten ohne Einnahme von Medikamenten, die die CgA-Freisetzung verfälschen, z.B. Protonenpumpeninhibitoren (Modlin et al., 2010), eine Erhöhung des CgA-Spiegels zwischen NNV und *Vena cava inferior* (VCI) ersichtlich war. Diese Beobachtung zeigt, dass CgA kontinuierlich aus der Nebenniere freigesetzt wird. Verglichen mit der VCI waren die CgA-Werte nur auf der linken Seite signifikant höher, da auf der linken Seite die Erfolgsrate beim Erreichen einer selektiven Katheterisierung nahezu bei 100 %, während auf der rechten Seite bei ungefähr 85 % liegt. Die variable Erfolgsrate bei der selektiven Katheterisierung auf der rechten Seite verwechselte die Bewertung der CgA-Werte. Umgekehrt wird die Behauptung, dass CgA tonisch von der Nebenniere ausgeschüttet wird, durch die Steigerung auf der linken Seite, wo die Erfolgsrate fast vollständig war, weiter gestützt. Ferner ist gezeigt worden, dass die Zunahme von CgA zwischen der VCI und der Nebennierenvene beider Seiten viel kleiner ist als die von Cortisol (Seccia et al., 2011).

1.8. Ziele der Arbeit

Hintergrund und Problemstellung

Der Erfolg von AVS wird überwiegend durch die Genauigkeit und Geschwindigkeit der Katheterinsertion in die rechte Nebennierenvene bestimmt, die einen qualifizierten interventionellen Radiologen benötigt, um die Katheterspitze korrekt zu positionieren und eine selektive Probeentnahme von Nebennierenvenenblut zu gewinnen. Die Genauigkeit kann durch Überprüfung der Katheterlage aus Messungen des Cortisolspiegels in der Nebenniere im Vergleich zum peripheren Plasmacortisolspiegel (Cortisol NNV : Cortisol peripher-Quotient) während des Verfahrens verbessert werden. Ein großes Problem bei den Messungen von Plasmacortisol für die Cortisol-Assays besteht darin, dass diese in einem externen Labor durchgeführt werden müssen, was die Überprüfung der korrekten Katheterlage beträchtlich verzögert und somit auch die Zeit der AVS-Prozedur verlängert. Cortisol weist eine hohe Eiweißbindung und eine längere Halbwertszeit als Aldosteron auf, weshalb sich andere Marker für die Anzeige einer erfolgreichen Nebennierenvenenkanülierung besser eignen als Cortisol. Da Cortisol eine lange zirkulierende Halbwertszeit (ca. 70-120 min) aufweist, ist der Anstieg des Cortisolspiegels in der Nebennierenvene im Vergleich zur peripheren Vene relativ gering und in der Folge mit Interpretationsfehlern behaftet (Dekkers et al., 2013). Die Konzentrationen im Nebennierenvenenplasma sind nur 3- bis 5-fach höher als im peripheren Plasma, was genaue Messungen erfordert. Darüber hinaus wird Cortisol aufgrund physiologischer ACTH-Fluktuationen variabel sezerniert, sodass fluktuierende Spiegel die Interpretation der AVS-Selektivität beeinträchtigen können (Spark et al., 1974; Tanemoto et al., 2009; Seccia et al., 2012). Da die Cortisolsekretion nicht konstant ist, kann die Probenentnahme zu einer Zeit der geringen Cortisolsekretion zu schlechten und ungenauen Cortisolgradienten und Unsicherheit über den Erfolg der Nebennierenvenenkanülierung führen. Ferner kann eine exzessive Sekretion von Cortisol auch bei Aldosteronomen auftreten. Dies führt bei ausgeprägten Fällen ebenfalls zur Entstehung eines Cushing-Syndroms auf dem Boden eines endogenen Hypercortisolismus (Willenberg et al., 2010). Dieses Krankheitsbild wird auch „*Connshing-Syndrom*“ bezeichnet. In diesen Fällen kann die

Interpretation des Nebennierenvenenkatheters ebenfalls problematisch werden und zu Fehlern führen (Späth et al., 2011). Die genaue Prävalenz der autonomen Cortisolsekretion beim primären Aldosteronismus ist unklar, mit Berichten von 4 % in einer größeren italienischen Studie (Fallo et al., 2011) bis 21 % in einer kleinen japanischen Kohorte (Hiraishi et al., 2011). Abgesehen davon, dass nach der Adrenalectomie eine Nebennierenrindeninsuffizienz auftreten kann, beeinflusst die Cortisol-Cosekretion möglicherweise die AVS-Interpretation (Willenberg et al., 2010; Goupil et al., 2015). Im Gegensatz dazu steht das Adrenalin im Plasma, welches eine extrem kurze Halbwertszeit von weniger als 3 min hat. Das führt zu einer mindestens 100-fachen Zunahme der Konzentration in der Nebennierenvene im Vergleich zur peripheren Konzentration, wenn der Katheter korrekt platziert ist. Solche großen Gradienten erfordern eine weit weniger genaue und empfindliche Detektion als für den Nachweis des 3- bis 5-fachen Gradienten für Plasma-Cortisol (Eisenhofer et al., 1995).

Fragestellung und Hypothese

Ziel war es, einen Test zur leichteren Identifizierung der korrekten Position des Katheters zu entwickeln, der möglichst schnell und sensitiv die Identifizierung von Blut aus der Nebennierenvene ermöglicht. Da Adrenalin im Nebennierenvenenblut wegen seiner kurzen Halbwertszeit ca. 100-1000-fach höher konzentriert ist als Cortisol, ergibt sich die Frage, ob Adrenalin ein geeigneter Marker ist, der für das Blut der Nebennierenvene charakteristisch ist und für eine schnelle und sensitive Nachweismethode benutzt werden kann (Molinnus et al., 2015). Außerdem ist heutzutage bekannt, dass sowohl die Nebennierenrinde als auch das Nebennierenmark hohe Ascorbatmengen akkumulieren. Ascorbinsäure ist ein Cofaktor, der sowohl in der Biosynthese der Katecholamine, als auch in der Steroidogenese erforderlich ist (Patak et al., 2004). Da der NNV-Katheter durch Variationen der Nebennierenvenendrainage zusätzlich erschwert wird, ist oft unklar, ob niedrige Cortisolkonzentrationen im Nebennierenvenenblut aus einer inkorrekten Katheterlage oder aus einem anderen Grund resultieren. Wir haben geprüft, ob der Nachweis von Vitamin C in der NNV als zusätzliches Maß für die Aussage über eine korrekte Katheterlage von Bedeutung sein kann.

Diese Arbeit verfolgte damit folgende Ziele:

Im Rahmen dieser Arbeit haben wir Blut von AVS-Untersuchungen analysiert, welches im Rahmen von klinischen Studien in der Universitätsklinik Düsseldorf gewonnen wurde. Diese bereits etablierten Studien wurden im weiteren Verlauf zur prospektiven Bewertung der verschiedenen diagnostischen Tests weiter ausgebaut. Unser Ziel war es, einen Schnelltest zu entwickeln, der dem Untersucher innerhalb kurzer Zeit Auskunft darüber gibt, ob die Nebennierenvene durch den eingeführten Katheter tatsächlich getroffen wurde. Das bedeutet im Einzelnen:

I. Im Rahmen unserer ersten Fragestellung befassten wir uns mit der Untersuchung des bisher verwendeten Cortisol-Schnelltests (RCA) im Vergleich zu anderen neu entwickelten Tests. Gibt es einen besseren Test als den Cortisol-Schnelltest, der in Zukunft eingesetzt werden könnte? Die untersuchten Tests wurden in Hinsicht auf mehrere Parameter miteinander verglichen: Geschwindigkeit, Sensitivität und Spezifität, sowie positiver und negativer prädiktiver Wert.

II. Optimierung und Charakterisierung eines neuen Tests, des Adrenochrom-basierten kolorimetrischen-Tests (ABC), der für den Einsatz am Krankenbett bei AVS entworfen wurde, um schnell die korrekte Lage des Nebennierenvenenkatheters anzuzeigen.

III. Die Nebenniere stellt das Organ mit der höchsten Konzentration an Vitamin C und Katecholaminen im Körper dar. Vitamin C und Katecholamine werden von den Nebennierenzellen aktiv sezerniert. Dies führt zu der Fragestellung, ob Tests unter Verwendung dieser Analyte schnellere Verfahren als der Cortisol NNV / Cortisol peripher-Quotient sein könnten, um idealerweise im Sinne eines „bedside“-Tests die korrekte Katheterlage anzuzeigen. Daher wurden zwei Vitamin C-Streifentests untersucht.

IV. Kann ein Drogenschnelltest auf Methamphetamin über die Kreuzreaktion des verwendeten Antikörpers auch für den Nachweis hoher Adrenalin-Spiegel in der NNV klinisch verwendet werden? Könnte dieser Test im Alltag eingesetzt werden, um die richtige Lage des NNV-Katheters anzuzeigen?

V. Könnte basierend auf der gleichen Idee ein verkürzter Adrenalin-ELISA-Test Anwendung finden? Dieser Test ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay für die *in vitro* diagnostische quantitative Bestimmung von Adrenalin (Epinephrin) im NNV-Plasma.

2. Patienten, Material und Methoden

In der Klinik für Endokrinologie, Rheumatologie und Diabetologie des Universitätsklinikums Düsseldorf haben wir von 2010 bis 2012 konsekutiv 49 Patienten untersucht, bei denen eine NNV-Katheteruntersuchung erfolgte und verschiedene Schnelltests durchgeführt wurden. Die Studie wurde im Rahmen des Conn-Registers und der ENSAT-Aktivität durchgeführt und von der Ethikkommission bewilligt (#3027 und #3919). Der Patient wurde ausführlich über die Testuntersuchungen aufgeklärt und hat sein Einverständnis zugesagt.

Folgende Tests wurden angewendet und sind weiter unten näher beschrieben:

- Wir haben den bereits etablierten Cortisol-Schnelltest angewendet.
- Wir haben zwei Vitamin C-Streifentests untersucht.
- Wir haben ein schnelles chemisches Nachweisverfahren für den qualitativen Katecholaminnachweis entwickelt (ABC-Test).
- Wir haben einen Methamphetamin-Streifentest verwendet, der auch als Drogenschnelltest genutzt werden kann.
- Ferner haben wir einen stark verkürzten Adrenalin-ELISA-Test („quick and dirty“) durchgeführt.
- Darüberhinaus haben wir die Performance der o.g. alternativen Testuntersuchungen im Vergleich zum bisherigen Cortisol_{NNV} : Cortisol_{peripher}-Quotienten untersucht.
- Wir haben im Durchschnitt die Zeiten ermittelt, die wir zur Durchführung dieser vier neuen Testverfahren im Vergleich zum Cortisol-Schnelltest gebraucht haben.
- Am Ende haben wir wichtige klinische und hormonelle Parameter erfasst, ferner richtig und falsch positive, sowie richtig und falsch negative Testergebnisse errechnet.

Die Voraussetzungen zur Durchführung unserer Testuntersuchungen waren folgende: ein primärer Aldosteronismus lag bei den untersuchten Patienten vor, d.h. es lag ein pathologischer Aldosteron-Renin-Quotient bzw. eine hypokaliämische Hypertonie vor und es bestand keine hinreichende Suppression von Aldosteron in den o.g. Bestätigungstests. Ferner lag kein

Hinweis für einen familiären Aldosteronismus oder für ein Cortisol-cosezernierendes Aldosteronom vor.

2.1. Cortisol-Schnelltest

Wir haben das Zentrallabor informiert, dass an diesem Tag ein Cortisol-Schnelltest durchgeführt wird. Zu jeder Blutabnahme aus der Nebennierenvene (zentral, z) wurde eine Blutabnahme aus der Schleuse abgenommen (peripher, p). Wir haben 2 LiHeparin (hellgrüne) Röhrchen auf 2 Sonderscheine (1 Röhrchen pro Schein) vorbereitet. Diese wurden beschriftet, z.B. „1. Versuch zentral rechts“ („NNV re 1“ bzw. „zR1“) und „peripher zum 1. Versuch zentral rechts“ („pNNV re 1“ bzw. „pR1“). Aus diesem LiHeparin-Röhrchen wurde Cortisol bestimmt für den Schnelltest im Zentrallabor und den Schnelltest im Rahmen unserer Studie. Die Radiologen haben die rechte Nebennierenvene dargestellt, und es erfolgte die Blutabnahme (1. Versuch rechts). Die Spritzeninhalte wurden in ein LiHeparin Röhrchen gegeben (für den Schnelltest und die Studie) und in 1-2 gelbe Serumröhrchen für die exakte Bestimmung von Aldosteron und Cortisol hinterher. Für die Aldosteronbestimmung haben wir viel Blut benötigt – durch Nachverdünnung oder gegebenenfalls Doppelbestimmung. Deshalb haben wir nach Möglichkeit versucht, mindestens ein ganz volles Röhrchen – besser noch 2 Röhrchen zu befüllen. Es ist wichtig, dass die Blutabnahme immer zentral und peripher erfolgen muss (für peripher reicht i.d.R. 1 Serumröhrchen). In der Zwischenzeit haben die Radiologen die linke Nebennierenvene dargestellt, es erfolgte die Blutabnahme von jeweils einem Serumröhrchen für die Hormonmessung und einem grünen Plasmaröhrchen für die Studie („NNV li“ bzw. „zL1“ und „pNNV li“ bzw. „pL1“). Falls der Schnelltest negativ ausfiel (Gradient von zentral : peripher < 2-3), stellten die Radiologen die rechte NNV im 2. Versuch nochmal dar („NNV re 2“ bzw. „zR2“ und „pNNV re 2“ bzw. „pR2“). Daraufhin wurde die Schleuse gezogen. Die Cortisolbestimmung erfolgte in µg/dl und die Aldosteronbestimmung in ng/l. Dabei war wichtig, dass die Röhrchen nicht mit hämolytischem Blut gefüllt wurden, da durch den Sog, der zur Hämolyse führt, auch Blut aus der *V. cava* / *V. renalis* gezogen wird. Dies gelang nicht immer. Allgemein wird ein Selektivitätsindex von 2,0 angenommen, um sicher zwischen

den Cortisolkonzentrationen in Nebennieren- und peripheren Venen zu unterscheiden (Rossi et al., 2014; Funder et al., 2016). Um diese Empfehlung zu überprüfen, haben wir einen Grenzwert ermittelt, der den niedrigsten SI bei gesicherter Lateralisierung bzw. eindeutigen Aldosteronkonzentrationsunterschieden angibt. Dieser Grenzwert sollte sich aus der im Vergleich zum Nebennierenvenencortisol höchsten relativen Cortisolkonzentration in einer peripheren Nebennierenvene und der maximalen Schwankung zwischen Schnelltest-Cortisol und Endergebnis-Cortisol bzw. Interassay-Koeffizient zusammensetzen.

2.2. Adrenochrom-basierter kolorimetrischer-Test (ABC-Test)

Da Adrenalin im Nebennierenvenenblut wegen seiner kurzen Halbwertszeit ca. 100-1000-fach höher konzentriert ist als Cortisol (Dekkers et al., 2013), stellten wir uns die Frage, ob Adrenalin ein geeigneter Marker ist, der für das Blut der Nebennierenvene charakteristisch ist und für eine schnelle und sensitive Nachweismethode benutzt werden kann. Nach Erhalt der Nebennierenvenenproben haben wir einen *adrenochrome-based colorimetric-test* (ABC-Test) durchgeführt.

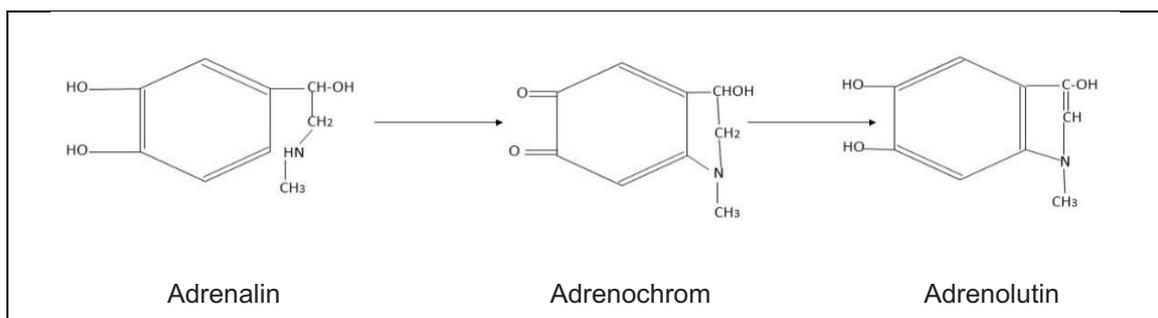


Abb. 4: **Konversion von Adrenalin zu Adrenochrom und Adrenolutin.** Es wurde gezeigt, dass die Oxidation von Adrenalin zu Adrenochrom auf enzymatische (Bindoli et al., 1989) und nicht-enzymatische Oxidationswege basiert (D'Ischia et al., 1988). Die Umwandlung von Adrenochrom in das grün fluoreszierende Adrenolutin ist sehr schnell (Dhalla et al., 1989).

Auf Grund der erheblich höheren Konzentration von Adrenalin in der Nebennierenvene im Vergleich zum peripheren Plasma führt die Bildung von

Adrenochrom bei der chemischen Oxidation der Katecholaminen (Abb. 4) zu einem Farbumschlag. Dieser kann eingesetzt werden, um rasch die richtige Lage des Katheters in der Nebennierenvene zu signalisieren. In der Praxis sieht dieser Test, der sehr einfach und schnell durchzuführen ist, so aus, dass 1 ml Plasma mit Oxidationsreagenzien reagiert. Die Probe muss gut geschüttelt, eventuell unter warmes Wasser gehalten werden. In einem weiteren Schritt wurden mehrere Metalle, wie Silberoxid, Selenoxid und Manganoxid unter verschiedenen Bedingungen getestet, und die kolorimetrischen Reaktionen verschiedener Proben von Probanden sind dokumentiert worden. Dabei sahen wir mit Silberoxid die besseren Reaktionen, sodass der Test in dieser Form weiter Anwendung fand.

2.3. Vitamin C-Schnelltest

Die Nebennieren stellen das Organ mit den höchsten Konzentrationen an Katecholaminen und Vitamin C im Körper dar (Patak et al., 2004). Daher haben wir uns bemüht, einen schnellen Vitamin C-Assay zu entwickeln, der eine Antwort über die korrekte Lage geben wird, während der Patient noch auf dem Tisch liegt und bevor die Katheterisierung beendet ist (Padayatty et al., 2007).

Wir verwendeten zwei verschiedene Vitamin C-Schnellstreifen:

- Vitamin C-Schnelltest 1: entwickelt für Urinuntersuchungen (Macherey-Nagel)
- Vitamin C-Schnelltest 2: für die Obstdiagnostik entwickelt (Quantofix, Macherey-Nagel; Bestellnummer: 91314) mit visuell sichtbaren Abstufungen der Konzentrationen von 0/100/200/300/500/1000/2000 mg/l Ascorbinsäure.

Vitamin C ist in vielen Lebensmitteln, vor allem im Obst, enthalten. Es wird auch als Stabilisator und Antioxidationsmittel zugesetzt. Durch Aufdrücken auf die Schnittfläche von Früchten kann auch der Vitamin C Gehalt von Obst orientierend ermittelt werden. Bei diesen Teststreifen haben wir die Teststäbchen für 10 Sek. in Kontakt mit der Probe gebracht. Wir haben ca. 30 Sek. gewartet und daraufhin das Testfeld mit der Farbskala verglichen. Wenn Vitamin C in der Probe vorhanden war, so hat sich das Testpapier grün bis blau gefärbt. Dadurch hatten wir Rückschlüsse bekommen, ob der NNV-Katheter erfolgreich war.

2.4. Methamphetamin-Schnelltest

Methamphetamin ist eine synthetische Substanz gehörend zur Familie der Phenylethylaminen, zu der auch die Katecholamine gehören. Die Wirkung von Methamphetamin setzt meist binnen 30 min ein, die Plasmahalbwertszeit beträgt etwa 9 Stunden (Logan, 2002). Basierend auf eine mögliche Kreuzreaktion des verwendeten Antikörpers haben wir eine mögliche Rolle der Methamphetamin Teststreifen zum Nachweis von Nebennierenvenenblut getestet.

Bei diesem Test haben wir den Methylendioxyamphetamin (MDA)-Drogentest (Diagnostik Nord) für den *in vitro* Gebrauch verwendet. Das ist ein immunochemischer Test zum schnellen und qualitativen Nachweis von MDA im Urin. Es handelt sich dabei um eine Antigen-Antikörper Reaktion um die Droge im Urin nachzuweisen. Der Test kann bis zu einer Nachweisgrenze von 500 ng/ml eingesetzt werden und liefert ein visuelles Ergebnis. Bei dieser Untersuchung sind die Teststreifen mit einem Tropfen Nebennierenvenenblut und Blut vom peripheren Plasma für mindestens 10 Sek. in Berührung gekommen bis eine Kontrolllinie erscheint. Das Blut sollte nicht über der mit MAX (Abb. 10) gekennzeichneten Ebene hinaus in Berührung kommen. Anschließend wurde der Teststreifen auf eine saubere, trockene Unterlage gelegt, die ihm keine Feuchtigkeit entzieht. Das Ergebnis konnte nach 5 min, spätestens nach 15 min abgelesen werden. Bei der Auswertung betrachtet man das Reaktionsfeld. Bei Erscheinen von zwei farbigen Banden ist der Test negativ. Wenn nur in der Kontrollregion eine rote Bande erscheint, so deutet das Fehlen einer roten Linie in der Testregion auf ein positives Testergebnis hin. Wenn sich keine rote Linie in der Kontrollregion zeigt, ist der Test ungültig und sollte wiederholt werden. Eine sehr schwache Linie in der Testregion zeigt an, dass die Methamphetaminkonzentration nahe an der Nachweisgrenze liegt. In unserem Falle haben wir durch die hochspezifische Antigen-Antikörper Reaktion den Nachweis hoher Adrenalin Spiegel in der NNV erwartet. Wenn Adrenalin in der Probe vorhanden ist, so müsste auf dem Teststreifen nur eine Bande erscheinen (Kontrollbande).

2.5. Rapid-Adrenalin (Epinephrin)-ELISA-Test

Wir haben einen stark verkürzten ELISA-Test für die Detektion von Adrenalin in den AVS Proben untersucht (Abb. 5). Es wurde der Cusabio-ELISA (Katalog Nr. CSB-E08677h) benutzt.

Schritte: 1. Nach der Zentrifugation (ca. 3 min) wird 50 µl Nebennierenvenenplasma in Well A3 (von links gezählt) pipettiert. 50 µl Plasma aus einer peripheren Vene wird in Well A4 (von links gezählt) pipettiert. 2. Pipettieren von 50 µl Peroxidase-konjugiertes Adrenalin in die Wells A2, A3 und A4 (von links gezählt) 3. Pipettieren von 50 µl Anti-Adrenalin-Antikörper (blaue Lösung) in die Wells A2, A3 und A4, (von links gezählt) gut mischen und ca. 3 - 5 min schütteln. 4 & 5. Entfernen von allen Flüssigkeiten aus den Wells. Hinzufügen von 200 µl Waschpuffer in jedes Well, Entfernen des Waschpuffers. Pipettieren von 50 µl Substrat A in die Wells A1, A2, A3 und A4 und Pipettieren von 50 µl Substrat B in die Wells A1, A2, A3 und A4. Ca. 3 min schütteln. 50 µl Stopplösung in die Wells A1, A2, A3 und A4 geben, 3× lesen in einer ELISA-Maschine bei 450 nm. Berechnen der mittleren optischen Dichten in einer Excel-Tabelle beispielsweise wie folgt: $ABS („Well A2 / Well A1“ \times 100)$ für „positive Kontrolle“, $ABS („Well A4 / Well A3“ \times 100)$ für Patientenprobe.

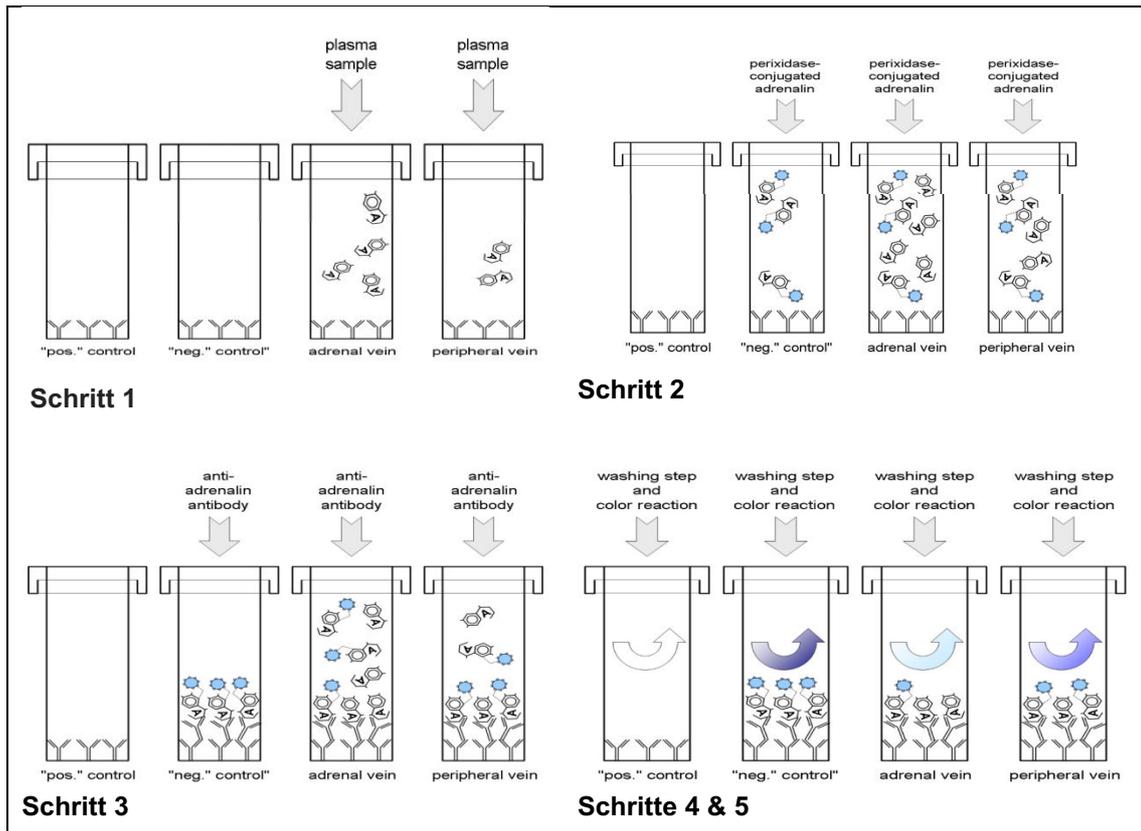


Abb. 5: **Adrenalin-ELISA-Test**. Die verschiedenen Schritte des Adrenalin-ELISA-Tests sind in der Abbildung dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Cortisol-Schnelltest

Es gelang, 39 Cortisol-Schnelltests zu untersuchen. Der Frauenanteil betrug 51,9 %. Das durchschnittliche Alter lag bei 56 Jahren. Um die Sensitivität des Cortisol-Schnelltests zu verbessern, haben wir einen Grenzwert für den SI ermittelt, über dem eine erfolgreiche Kanülierung der Nebennierenvene gesichert werden konnte. Dabei zeigte sich, dass unter Berücksichtigung der Interassay-Differenzen ein Selektivitätsindex von 1,7 sicher zwischen zentraler und peripherer Cortisolkonzentration unterscheidet. Im Folgenden wurden deshalb Auswertungen vorgenommen, die den empfohlenen SI von 2,0 und unseren ermittelten SI von 1,7 berücksichtigen.

Bei einem zunächst zugrunde gelegten SI von 2,0 konnte der Cortisol-Schnelltest bei 73 % der NNV-Proben die korrekte Katheterlage rechts anzeigen, bei einem SI von 1,7 waren es 87,6 %. Der Cortisol-Schnelltest hat zwischen 30 min bis 1 Stunde gedauert (Tabelle 1). Sensitivität und Spezifität sind für die unterschiedlichen SI-Angaben in Tabelle 2 dargestellt.

| Test | n | Dauer |
|-----------------------------|----|---------------|
| <i>rapid cortisol assay</i> | 39 | ca. 45 min |
| Adrenochrom-Test | 58 | ca. 10 min |
| Methamphetamin-Test | 52 | ca. 10 min |
| Vitamin C-Test 1 | 24 | ca. 10 min |
| Vitamin C-Test 2 | 49 | ca. 9 min |
| Adrenalin-ELISA | 33 | ca. 20-30 min |

Tabelle 1. **Vergleiche zwischen den verschiedenen Assays.** Die Tabelle fast summarisch das Abschneiden verschiedener Schnelltests zusammen. Es zeigt sich, dass der ABC-Test ungefähr ebenso schnell ist wie der Vitamin C-Test 1, Vitamin C-Test 2 und Methamphetamin-Test, gefolgt vom Adrenalin-ELISA. Der Test mit der längsten Dauer ist der Cortisol-Schnelltest.

| | Spezifität (in %) | Sensitivität (in %) | PPW (in %) | NPW (in %) |
|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|----------------------|----------------------|
| Angaben für SI von 2,0 | | | | |
| Cortisol-Schnelltest | 100 | 92,9 | 100 | 77,8 |
| Adrenochrom-Test | 70 | 56,5 | 89 | 25 |
| Methamphetamin-Test | 100 | 8,6 | 100 | 20 |
| Vitamin C-Test 1 | 100 | 81 | 100 | 33,3 |
| Vitamin C-Test 2 | 87 | 11 | 80 | 17 |
| Adrenalin-ELISA | 87 | 64 | 94 | 43 |
| Angaben für SI von 1,7 | | | | |
| Cortisol-Schnelltest | 100 | 96,7 | 100 | 87,5 |
| Adrenochrom-Test | 85,7 | 51 | 95,8 | 21 |
| Methamphetamin-Test | 100 | 8,3 | 100 | 15,4 |
| Vitamin C-Test 1 | 66 | 77 | 93 | 33 |
| Vitamin C-Test 2 | 83 | 11 | 80 | 13 |
| Adrenalin-ELISA | 86 | 62 | 94 | 37 |

Tabelle 2. **Testcharakteristika basierend auf dem SI 2,0 nach Leitlinie und dem selbstermittelten SI von 1,7.** In dieser Tabelle sind die Sensitivität und Spezifität, sowie der positiver und negativer prädiktiver Wert der verschiedenen Testuntersuchungen anhand des Grenzwertes für unterschiedliche SIs zusammengefasst. NPW=negativer prädiktiver Wert, PPW=positiver prädiktiver Wert, SI=Selektivitätsindex.

3.2. Adrenochrom-basierter kolorimetrischer-Test (ABC-Test)

Es wurden 58 ABC-Tests (30 mit Proben aus der linken NNV und 28 mit Proben aus der rechten NNV) durchgeführt. In 34 Fällen konnten die Tests die richtige Katheterlage anzeigen, entsprechend einer Sensitivität von ca. 57 %. Bei der Oxidation von Adrenalin zu Adrenochrom kam es zu einem roten Farbumschlag (Abb. 6). Dieser wurde genutzt, um die richtige Katheterlage anzuzeigen. Weitere Assay-Spezifikationen sind den Tabellen 1 und 2 zu entnehmen.

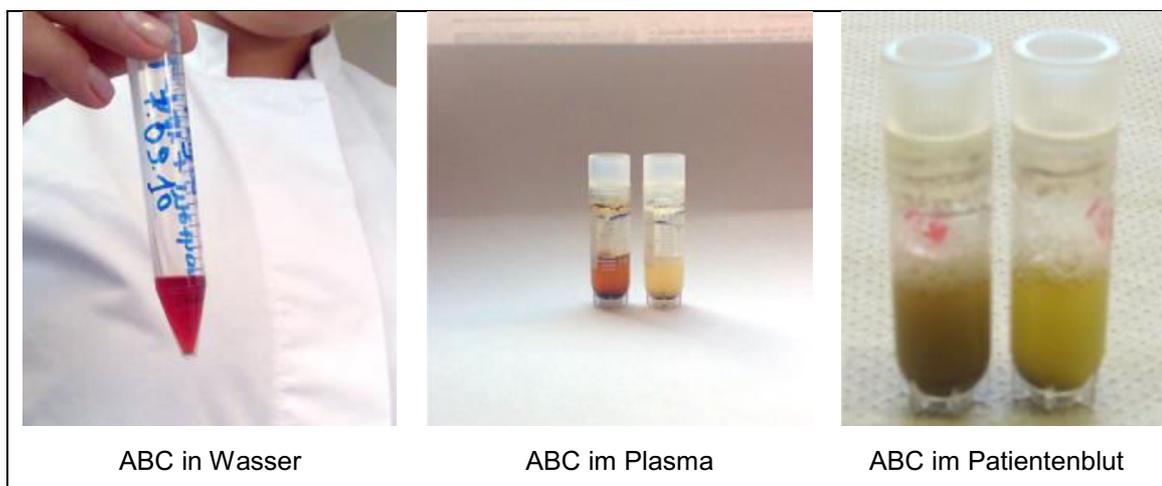


Abb. 6: **Darstellung des ABC-Tests.** Die Entwicklung des adrenochrombasierten kolorimetrischen (ABC)-Tests: Katecholamine werden zu Adrenochrom oxidiert, wobei das gelbgrüne Plasma in orange oder grau umgewandelt wird. Adrenalin wird zu Adrenochrom im Plasma oxidiert. Der rote Farbumschlag zeigt Adrenochrom an.

Wir haben für die Durchführung des ABC Tests im Durchschnitt ca. 10 min gebraucht. Basierend auf den oben genannten Untersuchungen haben wir Daten gesammelt, die darauf hindeuten, dass der ABC-Test ein vielversprechender und schneller „bedside“-Test für die rasche Bestimmung der richtigen Lage des Nebennierenvenenkatheters während AVS werden könnte. Trotzdem wies der Test eine hohe Rate an falsch negativen Ergebnissen auf. Infolgedessen ergibt sich ein niedriger negativer prädiktiver Wert von 25 %. Trotz der durchschnittlich über 100-fach höheren AdrenalinKonzentration im Nebennierenvenenplasma im Vergleich zum peripheren Plasma, zeigt diese eine beträchtliche Variabilität (2.000 bis 20.000 pg/ml) (Abb. 7).

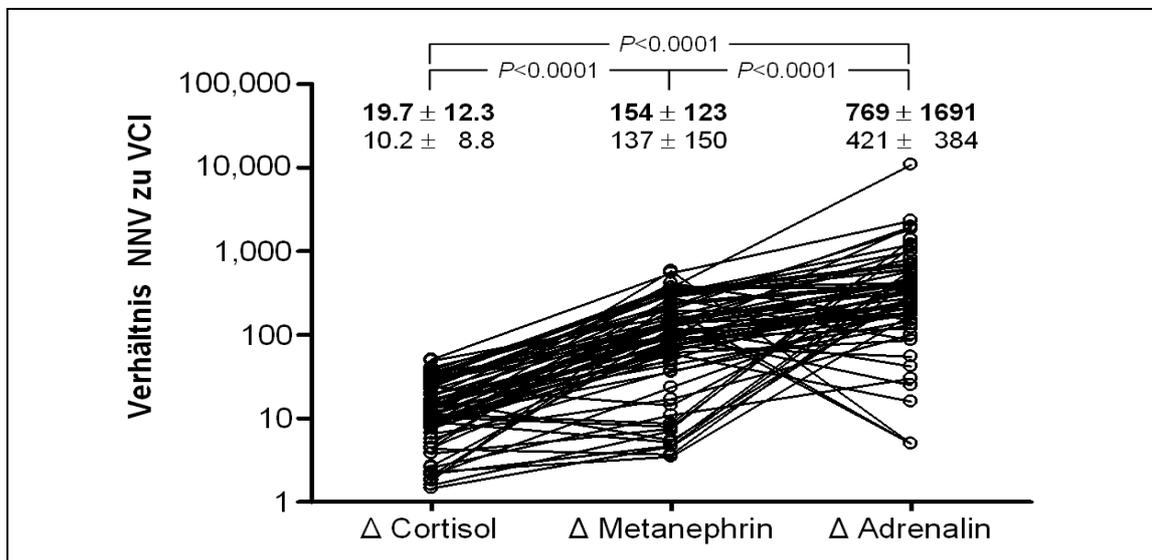


Abb. 7: **Konzentrationen von Cortisol, Metanephrin und Adrenalin in der NNV im Vergleich zur VCI.** Cortisol (in $\mu\text{g}/\text{dl}$) ist im Nebennierenvenenblut nach Infusion mit oder ohne Corticotropin (ACTH) niedriger konzentriert als Metanephrin (in pg/ml) oder Adrenalin (in pg/ml) (Abkürzungen: NNV: Nebennierenvene, VCI: vena cava inferior/Schleuse). Zusammenarbeit mit Prof. G. Eisenhofer, TU Dresden.

Dies könnte eine Verdünnung von Nebennierenvenenblut mit dem aus anderen Quellen z.B. ungenaue Katheterlage, lokale Variationen des Blutflusses oder physiologische Unterschiede in der Freisetzung der Katecholaminen aus dem Nebennierenmark widerspiegeln. Folgendermaßen reflektieren die Befunde von falsch negativen Ergebnissen die unzureichende Sensitivität des Tests, die auch durch die Untersuchung mittels Absorptiometrie dokumentiert wird (Abb. 8). Der Test ist demnach wenig sensitiv und zeigt nur „hochselektive Treffer“ richtig an. Eine mögliche Hämolyse generiert zudem falsch positive Befunde. Angaben zu Zeit und Präzision des Assays finden sich in den Tabellen 1 und 2.

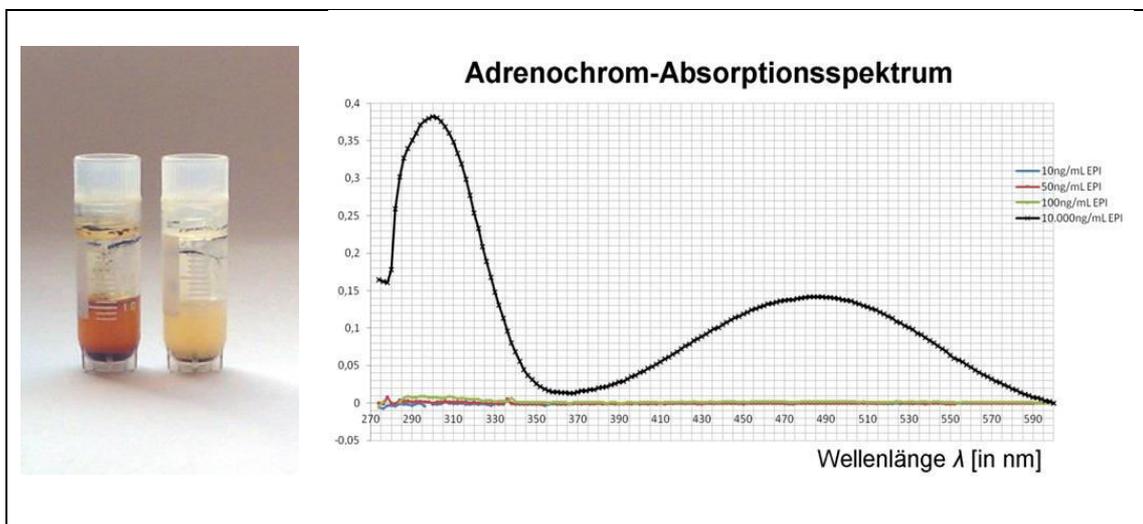


Abb. 8: **Adrenochrom-Absorption.** Beispiel für einen ABC-Test (links) und in vitro-Messungen für die Konversion von Adrenalin (EPI) zu Adrenochrom (rechts). Der Farbumschlag ist erst bei höheren Konzentrationen ersichtlich. Abkürzungen; EPI: Epinephrin, ng/ml: Nanogramm/Milliliter, nm: Nanometer. Zusammenarbeit mit Prof. G. Eisenhofer, TU Dresden.

3.3. Vitamin C-Schnelltest

Wir führten 49 Untersuchungen mit Teststreifen für den „Vitamin C-Test 2“ bei 27 Patienten und 24 „Vitamin C-Tests 1“ bei 12 Patienten durch. Beim „Vitamin C-Schnelltest 1“ lag der Frauenanteil bei 58,3 %, beim „Vitamin C-Schnelltest 2“ bei etwa 51,8 %. Beim „Vitamin C-Schnelltest 1“ konnten 10 der Streifen die richtige Katheterlage rechts anzeigen, 2 der Teststreifen konnten richtig die falsche Katheterlage nachweisen. Die Sensitivität dieses Tests lag bei 77 %. Bei 17 von 24 „Vitamin C-Schnellstreifen 2“ konnte korrekt die Lage des NNV-Katheters vorhergesagt werden. Die Spezifität dieses Tests lag bei 83 % (s. auch Tabellen 1 und 2). Bei dieser Untersuchung wird der Farbunterschied zwischen der peripheren und der NNV-Probe verglichen (Abb. 9).

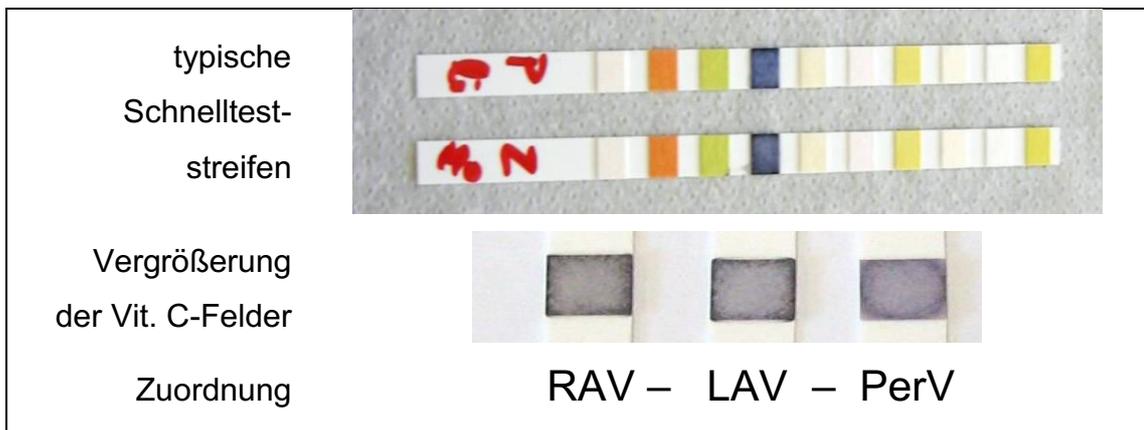


Abb. 9: **Vitamin C-Schnellstreifen.** Die Teststäbchen dienen zur Schnellbestimmung von Ascorbinsäure (Vitamin C). Die Testdurchführung ist sehr einfach und besteht nur aus Eintauchen und Ablesen. Das Ergebnis liegt sofort vor. Nach 30 Sek. kann man das Testfeld mit der Farbskala vergleichen. Ist Ascorbinsäure vorhanden, so färbt sich das Testpapier grün bis blau. In diesem Falle konnte der Vitamin C-Streifentest die richtige Katheterlage anzeigen. Das Testpapier der zentralen Vene ist «dunkler» als das der peripheren. Abkürzungen; RAV: right adrenal vein, LAV: left adrenal vein, PerV: peripheral vein.

3.4. Methamphetamin-Schnelltest

Insgesamt wurden 52 Methamphetamin Teststreifen bei 27 Patienten durchgeführt. In 9 Fällen konnten die Tests die richtige Katheterlage anzeigen. Die Sensitivität lag bei 8,3 % bei einer Spezifität von 100 %. Wir haben für die Durchführung der Tests im Durchschnitt 10 min gebraucht. Bei diesem Test konkurrieren immobilisierte Moleküle mit eventuell in der Probe enthaltenen Adrenalinmolekülen um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen (Abb. 10). Wenn Adrenalin in der Probe vorhanden ist, konkurriert es mit den Konjugaten in der Testregion um die Bindungsstellen an den Antikörpern. Dies setzt voraus, dass die Adrenalinkonzentration in der Probe hoch genug ist, um die Bindungsstellen vollständig zu besetzen. Ist Adrenalin nicht enthalten, so binden die Antikörper-Gold-Komplexe an die immobilisierten Konjugaten auf der Membran und bilden eine sichtbare Linie. Deshalb bedeutet das Erscheinen eines Farbbands in der Testregion ein negatives Ergebnis. Die schlechte Sensitivität des Tests könnte widerspiegeln, dass nur in den Proben mit einer hohen Adrenalinkonzentration eine Antigen-Antikörper Reaktion entsteht. Auch bei diesem alternativen Schnelltest haben wir zur Durchführung maximal 10 min gebraucht (s. Tabellen 1 und 2).



Abb. 10: **Methamphetamin-Teststreifen.** Die Teststreifen werden für mindestens 10 Sek. in die Probe eingetaucht. Das Blut sollte dabei nicht über die mit MAX gekennzeichnete Ebene hinaus in Berührung kommen. Sobald eine Kontrolllinie erscheint kann der Teststreifen von der Blutprobe entfernt werden. Das Ergebnis kann nach spätestens 15 min abgelesen werden. Die Teststreifen zeigen eine Kreuzreaktion mit Epinephrinen an. In diesem Falle erscheinen in der zentralen Probe zwei farbige Banden, entsprechend einem negativen Ergebnis. z=central/adrenal vein sample, p=peripheral sample, MAX: maximal.

3.5. Rapid-Adrenalin (Epinephrin)-ELISA-Test

Bei 19 Patienten wurden 33 rapid-Epinephrin-ELISA-Tests durchgeführt. In 23 Fällen lag der ELISA-Test richtig, einer Trefferquote von 69,7 % entsprechend. Die Sensitivität lag bei 64 % und die Spezifität bei 87 %. Bei diesem Test wurde der optische Unterschied zwischen der Nebennierenvenenprobe und der Probe aus der peripheren Vene miteinander verglichen (Abb. 11).

Wir haben für die Durchführung des Tests im Durchschnitt 20-30 min gebraucht. Sensitivität, Spezifität, sowie positive und negative prädiktive Werte wurden errechnet und sind in Tabelle 2 angegeben.

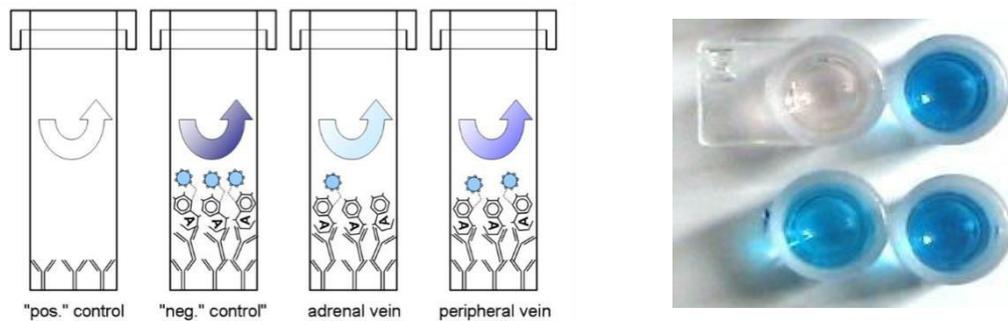


Abb. 11: **Rapid-Adrenalin-ELISA**. Beispiel für einen vereinfachten Adrenalin-ELISA (links nochmal skizzenartige Darstellung, rechts Mikrotiterplatte mit Patientenproben). Man erkennt, dass die Positivkontrolle (oben links auf der Mikrotiterplatte) hell bleibt und ein Ergebnis produziert, als ob viel Adrenalin gebunden hätte. Die Negativkontrolle (daneben oben rechts auf der Mikrotiterplatte) weist eine intensive Blaufärbung auf, weil markiertes Adrenalin ungehemmt binden konnte. Nun erkennt man optisch bereits den Unterschied zwischen der Nebennierenvenenprobe (unten links auf der Mikrotiterplatte), die mehr Adrenalin enthält und deshalb etwas heller ist als die Probe aus der peripheren Vene (unten rechts auf der Mikrotiterplatte).

4. Diskussion

Der primäre Aldosteronismus wird heute als die häufigste sekundäre endokrine Ursache der Hypertonie anerkannt (Fardella et al., 2000; Calhoun et al., 2002), die zu schwerwiegenden kardiovaskulären und renalen Komplikationen führen kann (Savard et al., 2013; Mulatero et al., 2013; Monticone et al., 2018). Der Therapieerfolg ist jedoch ausgezeichnet, wenn dieses Krankheitsbild angemessen diagnostiziert und behandelt wird. Die korrekte Klassifikation ist die Grundlage für eine spezifische Therapie, wofür AVS aktuell noch eine notwendige Voraussetzung ist, um zwischen unilateraler Erkrankung und bilateraler Erkrankung eindeutig differenzieren zu können ist (Funder et al., 2016). Die Untersuchung mittels AVS hat aber den Nachteil, dass aufgrund anatomischer Varianten die rechte Nebennierenvene nicht immer getroffen wird (Young und Klee, 1988). Mehrere Zentren weisen eine deutliche Verbesserung, bei zunehmender Häufigkeit der Untersuchungen und nach Einführung eines Schnelltests, (Cortisol-Schnelltest bzw. *rapid cortisol assay*) auf (Auchus et al., 2009; Betz et al., 2011). Der Cortisol-Schnelltest ist sicher, reproduzierbar, einfach zu interpretieren und kostengünstig (Mengozzi et al., 2007). Die Cortisolmessung während der Durchführung von AVS kann dem Radiologen, eine Rückmeldung geben, und mehrere Studien deuten darauf hin, dass dies den AVS-Erfolg verbessert (Betz et al., 2011; Reardon et al., 2011). Allerdings wurde der Selektivitätsindex, der zugrunde gelegt wird, nie systematisch wissenschaftlich untersucht, und die bisher etablierten "schnellen" Methoden erfordern einen relativ langen Zeitaufwand (ca. 30 min) – mit den o.g. genannten Nachteilen (Wolley und Stowasser, 2017).

Daher hatten wir uns bei dieser Arbeit als Ziel gesetzt, einen Schnelltest zu entwickeln, der dem Untersucher innerhalb kurzer Zeit Auskunft darüber gibt, ob die Nebennierenvene durch den eingeführten Katheter tatsächlich getroffen wurde, oder ob Blut aus einer anderen anatomischen Struktur asserviert wurde. Der Cortisol-Schnelltest wies bei Auswertung unserer Ergebnisse die höchste Spezifität und Sensitivität auf, ist aber mit ca. 45 min kein „echter“ Schnelltest. Aus einigen wenigen Einrichtungen werden kürzere Zeiten berichtet (Page et al., 2018). Es wurde deutlich, dass alternative Tests zur Identifizierung von Blut

aus der Nebennierenvene entwickelt werden müssen. Ferner wurde es deutlich, dass andere Marker als Cortisol für die Bestätigung einer erfolgreichen Nebennierenvenenkanülierung von großer Bedeutung sind (Dekkers et al., 2013; Eisenhofer et al., 2016).

Als alternativen Marker haben wir die Katecholamine, einschl. Adrenalin, und deren Abbauprodukte untersucht. Der Adrenochrom-basierte kolorimetrische-Test (ABC) ist hinreichend kurz und vor allem dann gut, wenn die Nebennierenvene hochselektiv getroffen wurde. Die Nachteile gewinnen an Gewicht, wenn – gemessen am Cortisolgradienten – der SI relativ niedrig ist und deshalb falsch negative Testergebnisse entstehen oder weil eine Rotfärbung des Plasmas durch Hämolyse zu falsch positiven Testergebnissen führen kann.

Trotz der ermutigenden Ergebnisse weist der ABC-Test eine falsch negative-Rate von ca. 20 % auf, was die Notwendigkeit für eine weitere Verfeinerung unterstützt. Gründe hierfür sind nach unseren Erkenntnissen die erheblichen Schwankungen der AdrenalinKonzentrationen im Nebennierenvenenblut und der für das menschliche Auge und auch in der Absorptiometrie nur unzureichend erfassbare Farbumschlag bei relativ niedrigen, aber physiologischen AdrenalinKonzentrationen im Nebennierenvenenblut.

Der Erfolg dieses Tests wird in erster Linie anhand der diagnostischen Spezifität beurteilt. Wenn diese durch eine weitere Optimierung des Tests ausreichend hoch wird, könnte bei einem positiven Testergebnis die Notwendigkeit für Cortisolmessungen nur auf jenen Proben beschränkt werden, die ein negatives Ergebnis für den ABC-Test abgeliefert haben. Klinisch erscheint dieses Vorgehen bisher jedoch noch wenig praktikabel.

Zusätzlich wäre es sinnvoll, die Testergebnisse jeweils mit direkten Messungen der Katecholaminen zu vergleichen. Dies war uns aufgrund des geringen Probeaufkommens und der gleichzeitigen Anwendung anderer Tests in dieser Studie nicht möglich.

Zusammenfassend haben wir gesehen, dass der ABC-Test nicht in der Lage ist, den Cortisol-Schnelltest zu ersetzen. Trotz seiner Vorteile der verkürzten Dauer und einfachen Anwendung, muss dieser Test weiterentwickelt werden.

Basierend auf der gleichen Idee der hohen Katecholaminkonzentration im Nebennierenvenenblut, wie beim ABC-Test haben wir untersucht, ob ein Drogenschnelltest auf Methamphetamin über die Kreuzreaktion des verwendeten Antikörpers, auch für den Nachweis hoher Adrenalinpiegel in der NNV klinisch verwendet werden kann. Die Teststreifen waren einfach anwendbar und kostengünstig, wiesen jedoch eine hohe Rate an falsch negativen Testergebnissen auf. Die Spezifität des Tests ist hoch, es zeigte sich aber eine niedrige Sensitivität. Dies könnte damit erklärt werden, dass die Katecholaminkonzentrationen in der Probe nicht hoch genug sind, um die Bindungsstellen vollständig zu besetzen. Die schlechte Sensitivität des Tests könnte widerspiegeln, dass nur in den Proben mit einer hohen AdrenalinKonzentration eine Antigen-Antikörper Reaktion entsteht. Ob dieses Testprinzip gänzlich aufzugeben ist, kann allerdings erst beurteilt werden, wenn auch andere Drogenschnelltests systematisch angeschaut werden.

Einen weiteren Stellenwert könnte das Metanephrin haben. Die Studie von Dekkers et al. belegt die Verwendung des Plasma-Metanephrins als sensitivere Alternative zu Cortisol, um die Selektivität von AVS zu beurteilen (Dekkers et al., 2013). Da Metanephrin-Immunoassays verfügbar sind, wäre es gegebenenfalls lohnenswert zu untersuchen, ob sich diese für eine Schnelltestentwicklung eignen. Unter den, mit Cortisol als selektiv bewerteten Verfahren ($SI > 2,0$), war das Verhältnis der Nebennierenvene zur peripheren Vene für Metanephrin 6-fach höher als das von Cortisol (94,0 vs. 15,5). Der Selektivitätsindex für Metanephrin wurde unter diesen Bedingungen mit 12 bestimmt, wäre jedoch erneut bei einem SI von 1,7 zu untersuchen. Da die Erfolgsraten in den AVS-Proben für Metanephrin höher waren als die für Cortisol (91 % vs. 56 %), scheint dies ein aussichtsreiches Unterfangen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Metanephrin im Vergleich zu Cortisol einen überlegenen Analyten darstellt, um die Selektivität der Nebennierenvenenblutentnahme bei den Verfahren ohne ACTH-Stimulation zu bestimmen (Dekkers et al., 2013). Andere Erkenntnisse zur Metanephrin-basierten Schnelltestentwicklung können wir durch unsere Studie nicht beisteuern.

Der NNV-Katheter ist ein technisch anspruchsvolles Verfahren, welches durch Variationen der Nebennierenvenendrainage zusätzlich erschwert wird. Es ist oft unklar, ob niedrige Cortisolkonzentrationen im Nebennierenvenenblut aus einer inkorrekten Katheterlage, oder aus einem Störfaktor resultieren (Padayatty et al., 2007). Basierend auf den Erkenntnissen der Studie von Padayatty et al. haben wir zwei Vitamin C-Assays untersucht. Beide Vitamin C-Schnelltests waren sehr schnelle, einfach zu handhabende und günstige Streifentests, wobei die Anwendung von Teststreifen 1 bessere Daten produzierte. Nichtsdestotrotz ist auch bei diesem alternativen Test die Sensitivität auf einem optimierungsbedürftigen Niveau.

Der gute Vorhersagewert des Vitamin C-Schnelltests 2 ist am ehesten auf die niedrige Sensitivität zurückzuführen und kein „echter“ Vorteil gegenüber Streifentest 1. Aktuell sind diese für die Routine nicht verwendbar, zumal falsch positive Ergebnisse leicht durch das Auftragen hämolytischen Plasmas auf den Streifen entstehen können.

Beim Adrenalin-ELISA-Test führen verkürzte Inkubationszeiten zu einem schnellen Resultat. Der Test scheint insgesamt zu ungenau, da die verfügbaren Antikörper gegen Adrenalin das große Problem haben, zu unspezifisch auch an z.B. Plasmaeiweiße zu binden und eine relativ niedrige Affinität zu Adrenalin haben. Im Durchschnitt haben wir ca. 20-30 min gebraucht, da die Bindungs- und Waschzeiten und die Anzahl der Waschschrte drastisch minimiert wurden. Dennoch ist die Zeit zu lang, um als „echter“ Schnelltest benutzt zu werden, obwohl die Verkürzung der Assayschritte bereits zu inakzeptablen Einbußen der Assaygenauigkeit führte, und auch das Ablesen mittels ELISA-Reader und minimierter Eichkurve, die nur aus minimaler und maximaler Konzentration bestand, keine Verbesserung mehr brachte und genauso gut oder schlecht war, wie das optische Ablesen. Bei dessen Verkürzung wird der Immunoassay inakzeptabel fehleranfällig und kann in dieser Form nicht für die Anwendung empfohlen werden.

Eine Weiterentwicklung der oben geschilderten Schnelltests für die rasche Applikation am Krankenbett und die spezifische Identifikation von Nebennierenvenenblut hätte mögliche Vorteile gegenüber Messungen von Cortisol zum Nachweis der korrekten Katheterlage während AVS. Wir erwarten dadurch eine mehr als 50 %-ige Reduktion der AVS-Prozedurzeit, ein Aspekt, der für Patienten, sicher bequem ist. Außerdem wird mit einer erheblichen Reduktion der Kosten bei dem Verfahren gerechnet. Außerdem ist es denkbar, dass die Durchführung von AVS für einen breiteren Nutzerkreis als nur in spezialisierten Zentren geöffnet wird. Basierend auf diesen Erkenntnissen könnte der Adrenochrom-basierte kolorimetrischer-Test ein vielversprechender Schnelltest sein. Außerdem ist eine weitere Verbesserung bezüglich der Sensitivität der Tests dadurch zu erwarten, dass Fortschritte im Bereich der Materialien und Chemie gemacht werden, aber auch beispielsweise, weil durch die Validierung der Konzentrationen von Katecholaminen und Metanephrin in der Nebennierenvene andere Grenzwerte erarbeitet werden könnten.

Nennenswert sind weitere Verfahren, die bereits im Rahmen von Studien getestet wurden oder mit denen wir in Zukunft rechnen könnten.

Eine neue Methode zur Subtypisierung von Patienten mit PA umfasst die Messung zusätzlicher Steroide zu Aldosteron, einschließlich der Hybridsteroiden, 18-Hydroxycortisol und 18-Oxocortisol (Stowasser et al., 1996; Nakamura et al., 2011; Mulatero et al., 2012; Satoh et al., 2015). Dies wurde durch die Entwicklung der Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) gefördert (Peitzsch et al., 2015). Diese Technologie ist nicht nur genauer als die verfügbaren Immunoassays, sondern ermöglicht auch die gleichzeitige Messung mehrerer Steroide in einer einzigen Probe, eine nützliche Methode für die Diagnostik der Patienten mit primärem Aldosteronismus (Eisenhofer et al., 2016). Manche Steroidprofile haben eine Signatur, die typisch für bestimmte Mutationen sind, die zu einem Conn-Syndrom führen. In diesen Fällen ist eine hohe Selektivität nicht notwendig, um das Vorhandensein eines auf diese Art entstandenen Tumors zu zeigen (Williams et al., 2016).

Ohnehin besteht aufgrund der technisch anspruchsvollen Aspekte des AVS großes Interesse an anderen Methoden zur Bestimmung der Lateralisation. Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist in Kombination mit dem CT vielversprechend und wurde in mehreren Studien mit markiertem Metomidat untersucht (Wolley und Stowasser, 2017). Metomidat ist ein Inhibitor der 11 β -Hydroxylase und kann als PET-Tracer eingesetzt werden. In einer Studie haben 39 Patienten mit einem primären Aldosteronismus und fünf mit nichtfunktionellen Adenomen ein PET-CT mit Metomidat erhalten; dies wurde mit dem Goldstandard AVS verglichen (Burton et al., 2012). Die Studie zeigte, dass ein maximales Uptake-Verhältnis von 1,25 : 1 zwischen den Nebennieren eine Spezifität von 87 % und eine Sensitivität von 76 % für einseitige Erkrankungen aufwies und die Spezifität ist bei Patienten mit einem maximalen Uptake-Quotienten der höheren Seite von > 17 weiter angestiegen (Burton et al., 2012). Obwohl dies weitere Bestätigungen erfordert, könnte die PET-CT-Untersuchung daher in Zukunft eine nützliche Ergänzung für die Lateralisation sein, wenn AVS nicht verfügbar oder nicht erfolgreich ist. Es gibt jedoch erhebliche technische Barrieren für die Verwendung von ¹¹C-Metomidat, hauptsächlich die kurze Halbwertszeit von 20 min, die eine große Nähe zu einem Zyklotron erforderlich macht (Wolley und Stowasser, 2017). Ein CT mit Einzelphotonenemission unter Verwendung von ¹³¹I-6beta-Iodmethyl-19-norcholesterol kann unter bestimmten Umständen ebenfalls nützlich sein und eine im Vergleich zur Szintigraphie verbesserte Auflösung bieten, obwohl das erforderliche Protokoll schwierig ist (Yen et al., 2009).

Alternative Wege könnten im Nachweis von Cortisol bzw. Steroidhormonen durch Färbung mit Tetrazolinium-Blau basieren. Bei dem Test, der ca. 10 min dauert, werden Steroidhormone mit Tetrazolinium-Blau markiert. Während der Test in der Lage ist, prinzipiell doppelt so hohe Cortisolkonzentrationen wie in der peripheren Vene zu identifizieren, hat er den Nachteil, dass er zu sehr mit Bestandteilen des Plasmas bzw. Serums interferiert (Lau et al., 2013).

Darüberhinaus zeigte ein veröffentlichter Bericht, der einen immunochromatographischen Ansatz in Form eines einfachen Teststreifens verwendet, der semiquantitativ innerhalb von 5 min abgelesen werden kann,

eine wesentliche Verbesserung des AVS-Erfolgs in einer multizentrischen Studie (Yoneda et al., 2016).

Ferner könnte ein *3',5'-cyclic adenosine monophosphate* (cAMP)-Bioassay weiterentwickelt werden. Hier werden Zellen mit einem cAMP-Sensor stabil transfiziert und zeigen bei Abnahme der Fluoreszenz die Adrenalinwirkung an. Das Protokoll dauert ca. 20 min, besteht allerdings aus mehreren Schritten (Nikolaev et al., 2004).

Ein weiterer Ansatz ist die Entwicklung eines Nano-/biotechnologischen Sensors. Da die Adrenalinkonzentration in der Nebennierenvene viel höher ist als peripher (Bravo et al., 1981; Collste et al., 1986), könnte Adrenalin als ein Biomarker zur Detektion der richtigen Lage des Nebennierenvenenkatheters verwendet werden. Die Katecholamine Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin werden über die Monoaminoxidase (MAO) zu Dihydroxyphenylglucol, Dihydroxymandelsäure und DOPAC, sowie über die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) zu Metanephrin, Normetanephrin und 3-Methoxytyramin metabolisiert. Ein auf einem Silizium-Chip immobilisiertes Enzym verstoffwechselt die Katecholamine, wobei die Änderung der elektrischen Ladung gemessen werden könnte (Molinnus et al., 2015). Bereits erhobene Daten haben gezeigt, dass in Bioassays die Katecholaminwirkung, die durch eine Veränderung im Fluoreszenzmuster einer manipulierten Zelle auftritt, relativ schnell dargestellt werden kann. Ferner wurde gezeigt, dass ein enzymbasierter Assay zu verändertem Sauerstoffverbrauch und Ladungsverschiebungen in einem Mikrokompartiment führt, welche mittels Chip-Technologie ausgelesen werden können (Molinnus et al., 2018). Weiterführende Untersuchungen könnten in Zukunft dazu dienen, den Assay derart zu modifizieren bzw. miniaturisieren, dass er im klinischen Alltag eingesetzt werden könnte.

Zusammenfassend wird klar, dass seit der ersten Beschreibung des primären Aldosteronismus durch Jerome Conn im Jahre 1955, dieses Krankheitsbild immer mehr an Bedeutung gewonnen hat (Conn und Louis, 1956). Trotzdem scheinen Erkennung und Screening in nicht spezialisierten Zentren suboptimal zu sein (Mulatero et al., 2016; Gordon, 2016). Die Verbesserung des

Bewusstseins und die Verbesserung der diagnostischen Abklärung vom primären Aldosteronismus werden die Erkennungsraten erhöhen, was letztendlich zur Verbesserung der Hypertonie in dieser Gruppe und daher zur Senkung der Morbidität und Mortalität führen wird. Der diagnostische Prozess ist mittlerweile weitestgehend etabliert und die Verbesserung hat sich in letzter Zeit hauptsächlich aus den Verfeinerungen zusammengesetzt: Sicherstellen, dass wir falsch positive und falsch negative Screening Ergebnisse minimieren und, dass durch die Katheteruntersuchungen die chirurgisch behandelbaren Formen besser charakterisiert werden (Wolley und Stowasser, 2017).

5. Schlussfolgerungen

Die Verwirklichung o.g. Ziele besitzt ein erhebliches Potential zur Revolutionierung der gegenwärtigen Strategien für die Diagnose und Behandlung dieser wichtigen und einfach heilbaren Form der sekundären Hypertonie. Der Hauptfokus dieser Studie dient dazu, einen Schnelltest zu entwickeln, der dem Kliniker hilft, die korrekte Lage des Nebennierenvenenkatheters anzuzeigen. Dies bietet mehrere Vorteile. Da damit gerechnet wird, dass AVS-Untersuchungen in Zukunft nur bei bestimmten Problemfällen eingesetzt werden, wird ein sicherer Schnelltest gerade in Zukunft benötigt, da die Erfahrungen mit dieser Technik bei zurückhaltendem Einsatz zurückgehen könnten. Durch Anwendung eines validen Schnelltests kann die Rate an nicht-informativen Katheteruntersuchungen gesenkt werden. Durch die schnelle Verifizierung der korrekten Katheterlage werden auch die Durchleuchtungszeiten und damit die Strahlenexposition, sowie die Menge an Kontrastmittel gesenkt. Die anatomische Variabilität und die technischen Herausforderungen für eine korrekte Nebennierenvenenkatheterisierung bleiben trotz aller Fortschritte bestehen. Einen Beitrag zur leichteren Identifizierung der korrekten Position des Katheters könnte hier ein Test leisten, der möglichst schnell und sensitiv die Identifizierung von Blut aus der Nebennierenvene ermöglicht. Nichtsdestotrotz sind die untersuchten Schnelltests aufgrund o.g. Nachteile bisher nicht in der Lage, den etablierten Cortisol-Schnelltest vollständig zu ersetzen. Wir haben im Rahmen der Studie gesehen, dass der Cortisol-Schnelltest weiterhin ein allgemein akzeptiertes Verfahren ist und in allen Fällen durchgeführt werden sollte. Die weitere Entwicklung von Schnelltests, die als vielversprechende „bedside“-Tests während des NNV-Katheters fungieren könnten, sind jedoch weiterhin von großer Bedeutung. Zusammenfassend haben wir bei Auswertung unserer Testuntersuchungen gesehen, dass der Cortisol-Schnelltest gar kein echter „Schnelltest“ ist. Der Adrenochrom-basierte Test, der Adrenalin-ELISA und die Ascorbinsäure-Tests stellen alternative schnellere Tests dar und bieten teilweise Potential für eine Weiterentwicklung; die auch eine Voraussetzung ist, um einen klinischen Stellenwert zu bekommen. Bis dahin wird und sollte der etablierte Cortisol-Schnelltest weiter Anwendung finden.

6. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Anson BJ, Cauldwell EW, Pick JW, Beaton L. The blood supply of the kidney, suprarenal gland and associated structures. *Surg. Obstet.* 1947; 84(3): 313-320
2. Arlt W. A detour guide to the Endocrine Society Clinical Practice Guideline on case detection, diagnosis and treatment of patients with primary aldosteronism. *Eur J Endocrinol.* 2010; 162(3): 435-438
3. Auchus RJ, Michaelis C, Wians FH Jr, Dolmatch BL, Josephs SC, Trimmer CK, Anderson ME, Nwariaku FE. Rapid cortisol assays improve the success rate of adrenal vein sampling for primary aldosteronism. *Ann Surg.* 2009; 249(2): 318-321
4. Auchus RJ, Wians FH Jr, Anderson ME, Dolmatch BL, Trimmer CK, Josephs SC, Chan D, Toomay S, Nwariaku FE. What we still do not know about adrenal vein sampling for primary aldosteronism. *Horm Metab Res.* 2010; 42(6): 411-415
5. Baguet JP, Steichen O, Mounier-Vehier C, Gosse P. SFE/SFHTA/AFCE consensus on primary aldosteronism, part 1: Epidemiology of PA, who should be screened for sporadic PA? *Ann Endocrinol.* 2016; 77(3):187-191
6. Balas M, Zosin I, Maser-Gluth C, Hermsen D, Cupisti K, Schott M, Schinner S, Knoefel WT, Scherbaum WA, Willenberg HS. Indicators of mineralocorticoid excess in the evaluation of primary aldosteronism. *Hypertens Res.* 2010; 33(8): 850–856
7. Barakat MT, Meeran K, Bloom SR. Neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer.* 2004; 11(1): 1-18
8. Betz MJ, Degenhart C, Fischer E, Pallauf A, Brand V, Linsenmaier U, Beuschlein F, Bidlingmaier M, Reincke M. Adrenal vein sampling using cortisol assays in primary aldosteronism is useful in centers with low success rates. *Eur J Endocrinol.* 2011; 165(2): 301-306
9. Bindoli A, Rigobello MP, Galzigna L. Toxicity of aminochromes. *Toxicol Lett.* 1989; 48(1): 3-20
10. Blondin D, Quack I, Haase M, Kücükköylü S, Willenberg HS. Indication and technical aspects of adrenal blood sampling. *RoFo.* 2015; 187(1):19-28
11. Bravo EL, Tarazi RC, Fouad FM, Vidt DG, Gifford RW Jr. Clonidine-suppression test: a useful aid in the diagnosis of pheochromocytoma. *N Engl J Med.* 1981; 305(11): 623-626
12. Brown NJ. Aldosterone and end-organ damage. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2005; 14(3): 235-241
13. Büchner N, Vonend O, Rump LC. Pathophysiology of hypertension: what's new? *Herz.* 2006; 31(4): 294-302

14. Burton TJ, Mackenzie IS, Balan K, Koo B, Bird N, Soloviev DV, Azizan EA, Aigbirhio F, Gurnell M, Brown MJ. Evaluation of the sensitivity and specificity of (11)C-metomidate positron emission tomography (PET)-CT for lateralizing aldosterone secretion by Conn's adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97(1): 100-109
15. Calhoun DA, Nishizaka MK, Zaman MA, Thakkar RB, Weissmann P. Hyperaldosteronism among black and white subjects with resistant hypertension. *Hypertension.* 2002; 40(6): 892-896
16. Catena C, Colussi G, Brosolo G, Novello M, Sechi LA. Aldosterone and Left Ventricular Remodeling. *Horm Metab Res.* 2015; 47(13): 981-986
17. Catena C, Colussi G, Lapenna R, Nadalini E, Chiuch A, Gianfagna P, Sechi LA. Long-term cardiac effects of adrenalectomy or mineralocorticoid antagonists in patients with primary aldosteronism. *Hypertension.* 2007; 50(5): 911-918
18. Collste P, Brismar B, Alveryd A, Björkhem I, Hardstedt C, Svensson L, Ostman J. The catecholamine concentration in central veins of hypertensive patients - an aid not without problems in locating pheochromocytoma. *Acta Chir Scand Suppl.* 1986; 530: 67-71
19. Conn JW, Cohen EL, Rovner DR, Nesbit RM. Normokalemic Primary Aldosteronism. A detectable cause of curable essential hypertension. *JAMA* 1965; 193: 200-206
20. Conn JW, Louis LH. Primary aldosteronism, a new clinical entity. *Ann Intern Med.* 1956; 44(1): 1-15
21. Conn JW. Primary aldosteronism, a new clinical syndrome. *J Lab Clin Med.* 1955; 45(4): 661-664
22. Crivellato E, Nico B, Ribatti D. The chromaffin vesicle: advances in understanding the composition of a versatile, multifunctional secretory organelle. *Anat Rec.* 2008; 291(12):1587-1602
23. D'Ischia M, Palumbo A, Prota G. Adrenalin oxidation revisited. New products beyond the adrenochrome stage. *Tetrahedron* 1988; 44(20): 6441-6446
24. Daunt N. Adrenal vein sampling: how to make it quick, easy and successful. *Radiographics.* 2005; 25: S143-S158
25. Dekkers T, Deinum J, Schultzekool LJ, Blondin D, Vonend O, Hermus AR, Peitzsch M, Rump LC, Antoch G, Sweep FC, Bornstein SR, Lenders JW, Willenberg HS, Eisenhofer G. Plasma metanephrine for assessing the selectivity of adrenal venous sampling. *Hypertension.* 2013; 62(6): 1152-1157
26. Dhalla KS, Ganguly PK, Rupp H, Beamish RE, Dhalla NS. Measurement of adrenolutin as an oxidation product of catecholamines in plasma. *Mol Cell Biochem.* 1989; 87(1): 85-92
27. Dhariwal KR, Shirvan M, Levine M. Ascorbic acid regeneration in chromaffin granules. In situ kinetics. *J Biol Chem.* 1991; 266(9): 5384-5387

28. Dhariwal KR, Washko P, Hartzell WO, Levine M. Ascorbic acid within chromaffin granules. In situ kinetics of norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem.* 1989; 264(26): 15404-15409
29. Doppman JL, Gill JR Jr. Hyperaldosteronism: sampling the adrenal veins. *Radiology.* 1996; 198(2): 309-312
30. Dunn PJ, Espiner EA. Outpatient screening tests for primary aldosteronism. *Aust N Z J Med.* 1976; 6(2): 131-135
31. Dunnick NR, Doppman JL, Mills SR, Gill JR Jr. Preoperative diagnosis and localization of aldosteronomas by measurement of corticosteroids in adrenal venous blood. *Radiology.* 1979; 133(2): 331-333
32. Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev.* 1998; 19(2): 101-143
33. Eisenhofer G, Dekkers T, Peitzsch M, Dietz AS, Bidlingmaier M, Treitl M, Williams TA, Bornstein SR, Haase M, Rump LC, Willenberg HS, Beuschlein F, Deinum J, Lenders JW, Reincke M. Mass Spectrometry-Based Adrenal and Peripheral Venous Steroid Profiling for Subtyping Primary Aldosteronism. *Clin Chem.* 2016; 62(3): 514-524
34. Eisenhofer G, Friberg P, Pacak K, Goldstein DS, Murphy DL, Tsigos C, Quyyumi AA, Brunner HG, Lenders JW. Plasma metadrenalines: do they provide useful information about sympatho-adrenal function and catecholamine metabolism? *Clin Sci (Lond).* 1995; 88(5): 533-542
35. Eisenhofer G, Keiser H, Friberg P, Mezey E, Huynh TT, Hiremagalur B, Ellingson T, Duddempudi S, Eijssbouts A, Lenders JW. Plasma metanephrines are markers of pheochromocytoma produced by catechol-O-methyltransferase within tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83(6): 2175-2185
36. Eisenhofer G, Rundquist B, Aneman A, Friberg P, Dakak N, Kopin IJ, Jacobs MC, Lenders JW. Regional release and removal of catecholamines and extraneuronal metabolism to metanephrines. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80(10): 3009-3017
37. Espiner EA, Ross DG, Yandle TG, Richards AM, Hunt PJ. Predicting surgically remedial primary aldosteronism: role of adrenal scanning, posture testing and adrenal vein sampling. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(8): 3637-3644
38. Fallo F, Bertello C, Tizzani D, Fassina A, Boulkroun S, Sonino N, Monticone S, Viola A, Veglio F, Mulatero P. Concurrent primary aldosteronism and subclinical cortisol hypersecretion: a prospective study. *J Hypertens.* 2011; 29(9): 1773-1777
39. Fallo F, Veglio F, Bertello C, Sonino N, Della Mea P, Ermani M, Rabbia F, Federspil G, Mulatero P. Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(2): 454-459
40. Fardella CE, Mosso L, Gómez-Sánchez C, Cortés P, Soto J, Gómez L, Pinto M, Huete A, Oestreicher E, Foradori A, Montero J. Primary

- hyperaldosteronism in essential hypertensives: prevalence, biochemical profile, and molecular biology. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(5): 1863-1867
41. Fischer E, Reuschl S, Quinkler M, Rump LC, Hahner S, Bidlingmaier M, Reincke M; Participants of the German Conn's Registry - Else Kröner-Fresenius-Hyperaldosteronism Registry. Assay characteristics influence the aldosterone to renin ratio as a screening tool for primary aldosteronism: results of the German Conn's registry. *Horm Metab Res.* 2013; 45(7): 526-531
 42. Fourkiotis V, Vonend O, Diederich S, Fischer E, Lang K, Endres S, Beuschlein F, Willenberg HS, Rump LC, Allolio B, Reincke M, Quinkler M; Mephisto Study Group. Effectiveness of eplerenone or spironolactone treatment in preserving renal function in primary aldosteronism. *Eur J Endocrinol.* 2012; 168(1): 75-81
 43. Fritsch Neves M, Schiffrin EL. Aldosterone: a risk factor for vascular disease. *Curr Hypertens Rep.* 2003; 5(1): 59-65
 44. Funder JW, Carey RM, Fardella C, Gomez-Sanchez CE, Mantero F, Stowasser M, Young WF Jr, Montori VM; Endocrine Society. Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(9): 3266-3281
 45. Funder JW, Carey RM, Mantero F, Murad MH, Reincke M, Shibata H, Stowasser M, Young WF Jr. The management of primary aldosteronism: Case detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016; 101(5): 1889-1916
 46. Gagnon R. The venous drainage of the human adrenal gland. *Rev Can Biol.* 1956; 14(4): 350-359
 47. Gilbert KC, Brown NJ. Aldosterone and Inflammation. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010; 17(3): 199-204
 48. Gordon RD. Primary aldosteronism- actual epidemics or false alarm? *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2004; 48(5): 666-673
 49. Gordon RD. The importance of not overlooking curable hypertension: primary aldosteronism rarely screened for reflecting poor uptake of Endocrine Society Guidelines. *J Hypertens.* 2016; 34(11): 2143-2144
 50. Goupil R, Wolley M, Ungerer J, McWhinney B, Mukai K, Naruse M, Gordon RD, Stowasser M. Use of plasma metanephrine to aid adrenal venous sampling in combined aldosterone and cortisol over-secretion. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep.* 2015; 2015: 150075
 51. Gross F. Renin and Hypertension, physiological or pathological agents? *Klin Wochenschr.* 1958; 36(15): 693-706
 52. Gross MD, Falke THM, Shapiro B, Sandler MP. Adrenal glands. In: *Endocrine imaging.* Norwalk, Conn: Appleton & Lange, 1992; 271, 349
 53. Haase M, Gruber M, Gao X, Vonend O, Willeberg HS. Confirmatory testing for primary aldosteronism. In: Hellmann P. (Ed.) *Primary Aldosteronism - Molecular Genetics, Endocrinology and Translational*

Medicine. Springer 2014

54. Hannemann A, Bidlingmaier M, Friedrich N, Manolopoulou J, Spyroglou A, Völzke H, Beuschlein F, Seissler J, Rettig R, Felix SB, Biffar R, Döring A, Meisinger C, Peters A, Wichmann HE, Nauck M, Wallaschofski H, Reincke M. Screening for primary aldosteronism in hypertensive subjects: results from two German epidemiological studies. *Eur J Endocrinol.* 2012; 167(1): 7-15
55. Hanslik G, Wallaschofski H, Dietz A, Riester A, Reincke M, Allolio B, Lang K, Quack I, Rump LC, Willenberg HS, Beuschlein F, Quinkler M, Hannemann A. Increased prevalence of diabetes mellitus and the metabolic syndrome in patients with primary aldosteronism of the German Conn's Registry. *Eur J Endocrinol.* 2015; 173(5): 665-675
56. Hiraishi K, Yoshimoto T, Tsuchiya K, Minami I, Doi M, Izumiyama H, Sasano H, Hirata Y. Clinicopathological features of primary aldosteronism associated with subclinical Cushing's syndrome. *Endocr J.* 2011; 58(7): 543-551
57. Hiramatsu K, Yamada T, Yukimura Y, Komiya I, Ichikawa K, Ishihara M, Nagata H, Izumiyama T. A screening test to identify aldosterone-producing adenoma by measuring plasma renin activity. Results in hypertensive patients. *Arch Intern Med.* 1981; 141(12): 1589-1593
58. Kamemura K, Wada N, Ishijo T, Matsuda Y, Fujii Y, Kai T, Fukuoka T, Sakamoto R, Orgo A, Suzuki T, Umakoshi H, Tsuiki M, Naruse M. Significance of adrenal computed tomography in predicting laterality and indicating adrenal vein sampling in primary aldosteronism. *J Hum Hypertens.* 2017; 31(3): 195-199
59. Kempers MJ, Lenders JW, van Outheusden L, van der Wilt GJ, Schultze Kool LJ, Hermus AR, Deinum J. Systematic review: diagnostic procedures to differentiate unilateral from bilateral adrenal abnormality in primary aldosteronism. *Ann Intern Med.* 2009; 151(5): 329-337
60. Koshimizu H, Kim T, Cawley NX, Loh YP. Chromogranin A: a new proposal for trafficking, processing and induction of granule biogenesis. *Regul Pept.* 2010; 160(1-3): 153-159
61. Lau JF, Mohammed F, Antoniadis C, Haase M, Blondin D, Vonend O, Kinski E, Dekkers T, Bornstein SR, Lenders JW, Eisenhofer G, Willenberg HS. Rapid testing in adrenal venous sampling. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2013; 121-P76
62. Lenders JW, Eisenhofer G. Pathophysiology and diagnosis of disorders of the adrenal medulla: focus on pheochromocytoma. *Compr Physiol.* 2014; 4(2): 691-713
63. Levine M, Morita K. Ascorbic acid in endocrine systems. *Vitam Horm.* 1985; 42: 1-64
64. Lin YH, Lin LY, Chen A, Wu XM, Lee JK, Su TC, Wu VC, Chueh SC, Lin WC, Lo MT, Wang PC, Ho YL, Wu KD; TAIPAI Study Group. Adrenalectomy improves increased carotid intima-media thickness and

- arterial stiffness in patients with aldosterone producing adenoma. *Atherosclerosis*. 2012; 221(1): 154-159
65. Logan BK, Methamphetamine –Effects on Human Performance and Behavior. In: *Forensic Science Review*. 2002; 14: 134-151
 66. Magill SB, Raff H, Shaker JL, Brickner RC, Knechtges TE, Kehoe ME, Findling JW. Comparison of adrenal vein sampling and computed tomography in the differentiation of primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86(3): 1066-1071
 67. Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA. Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest*. 1999; 104(7): R19-R23
 68. Mattsson C, Young WF Jr. Primary aldosteronism: diagnostic and treatment strategies. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2006; 2(4): 198-208
 69. Melby JC, Spark RF, Dale SL, Egdahl RH, Kahn PC. Diagnosis and localization of aldosterone-producing adenomas by adrenal-vein catheterization. *N Engl J Med*. 1967; 277(20): 1050-1056
 70. Mengozzi G, Rossato D, Bertello G, Garrone C, Milan A, Pagni R, Veglio F, Mulatero P. Rapid cortisol assay during adrenal vein sampling in patients with primary aldosteronim. *Clin Chem*. 2007; 53(11): 1968-1971
 71. Milliez P, Girerd X, Plouin PF, Blacher J, Safar ME, Mourad JJ. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 45(8): 1243-1248
 72. Modlin IM, Gustafsson BI, Moss SF, Pavel M, Tsolakis AV, Kidd M. Chromogranin A-biological function and clinical utility in neuroendocrine tumor disease. *Ann Surg Oncol*. 2010; 17(9): 2427–2443
 73. Molinnus D, Bartz A, Bäcker M, Siegert P, Willenberg HS, Poghossian A, Keusgen M, Schöning MJ. Detection of adrenaline based on substrate recycling amplification. *Proc Engineering* 2015; 120: 540–543
 74. Molinnus D, Hardt G, Käver L, Willenberg HS, Kröger JC, Poghossian A, Keusgen M, Schöning MJ. Chip-based biosensor for the detection of low adrenaline concentrations to support adrenal venous sampling. *Sens Actuators B Chem* 2018; 272: 21-27
 75. Molinnus D, Hardt G, Siegert P, Willenberg HS, Poghossian A, Keusgen M, Schöning MJ. Detection of adrenaline in blood as biomarker for adrenal venous sampling. *Electroanalysis* 2018; 30: 937-942
 76. Montero-Hadjadje M, Ait-Ali D, Turquier V, Guillemot J, Boutahricht M, Magoul R, Malagon MM, Yon L, Vaudry H, Anouar Y. Chromogranins/Secretogranins and derived peptides: insights from the Amphibian Model. *Handbook of biologically active peptides*. New York: Academic Press 2006; 311-319
 77. Monticone S, D’Ascenzo F, Moretti C, Williams TA, Veglio F, Gaita F, Mulatero P. Cardiovascular events and target organ damage in primary aldosteronism compared with essential hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018; 6(1): 41-50

78. Mulatero P, di Cella SM, Monticone S, Schiavone D, Manzo M, Mengozzi G, Rabbia F, Terzolo M, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE, Veglio F. 18-hydrocorticosterone, 18-hydroxycortisol, and 18-oxocortisol in the diagnosis of primary aldosteronism and its subtypes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97(3): 881-889
79. Mulatero P, Monticone S, Bertello C, Viola A, Tizzani D, Iannaccone A, Crudo V, Burrello J, Milan A, Rabbia F, Veglio F. Long-term cardio- and cerebrovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98(12): 4826-4833
80. Mulatero P, Monticone S, Burrello J, Veglio F, Williams TA, Funder J. Guidelines for primary aldosteronism: uptake by primary care physicians in Europe. *J Hypertens.* 2016; 34(11):2253-2257
81. Mulatero P, Stowasser M, Loh KC, Fardella CE, Gordon RD, Mosso L, Gomez-Sanchez CE, Veglio F, Young WF Jr. Increased diagnosis of primary aldosteronism, including surgically correctable forms, in centers from five continents. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(3): 1045-1050
82. Nakamura Y, Satoh F, Morimoto R, Kudo M, Takase K, Gomez-Sanchez CE, Honma S, Okuyama M, Yamashita K, Rainey WE, Sasano H, Ito S. 18-oxocortisol measurement in adrenal vein sampling as a biomarker for subclassifying primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96(8): E1272-1278
83. Nikolaev VO, Bünemann M, Hein L, Hannawacker A, Lohse MJ. Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem.* 2004; 279(36): 37215-37218
84. Padayatty SJ, Doppman JL, Chang R, Wang Y, Gill J, Papanicolaou DA, Levine M. Human adrenal glands secrete vitamin C in response to adrenocorticotrophic hormone. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86(1): 145-149
85. Page MM, Taranto M, Ramsay D, van Schie G, Glendenning P, Gillett MJ, Vasikaran SD. Improved technical success and radiation safety of adrenal vein sampling using rapid, semi-quantitative point-of-care cortisol measurement. *Ann Clin Biochem.* 2018; 55(5): 588-592
86. Patak P, Willenberg HS, Bornstein SR. Vitamin C is an important cofactor for both adrenal cortex and adrenal medulla. *Endocr Res.* 2004; 30(4): 871-875
87. Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev.* 2004; 25(6): 947-970
88. Peitzsch M, Dekkers T, Haase M, Sweep FC, Quack I, Antoch G, Siegert G, Lenders JW, Deinum J, Willenberg HS, Eisenhofer G. An LC-MS/MS method for steroid profiling during adrenal venous sampling for investigation of primary aldosteronism. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015; 145: 75-84
89. Reardon MA, Angle JF, Abi-Jaoudeh N, Bruns DE, Haverstick DM, Matsumoto AH, Carey RM. Intraprocedural cortisol levels in the evaluation of proper catheter placement in adrenal venous sampling. *J Vasc Interv*

- Radiol. 2011; 22(11): 1575-1580
90. Reincke M, Seiler L, Rump LC. Normokaliämischer primärer Hyperaldosteronismus. *Dtsch Arztebl* 2003; 100(4): A-184-190
 91. Rossi E, Regolisti G, Negro A, Sani C, Davoli S, Perazzoli F. High prevalence of primary aldosteronism using postcaptopril plasma aldosterone to renin ratio as a screening test among Italian hypertensives. *Am J Hypertens*. 2002; 15(10 Pt 1): 896-902
 92. Rossi GP, Auchus RJ, Brown M, Lenders JW, Naruse M, Plouin PF, Satoh F, Young WF Jr. An expert consensus statement on use of adrenal vein sampling for the subtyping of primary aldosteronism. *Hypertension*. 2014; 63(1): 151-160
 93. Rossi GP, Barisa M, Allolio B, Auchus RJ, Amar L, Cohen D, Degenhart C, Deinum J, Fischer E, Gordon R, Kickuth R, Kline G, Lacroix A, Magill S, Miotto D, Naruse M, Nishikawa T, Omura M, Pimenta E, Plouin PF, Quinkler M, Reincke M, Rossi E, Rump LC, Satoh F, Schultze Kool L, Seccia TM, Stowasser M, Tanabe A, Trerotola S, Vonend O, Widimsky J Jr, Wu KD, Wu VC, Pessina AC. The Adrenal Vein Sampling International Study (AVIS) for identifying the major subtypes of primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; 97(5): 1606-1614
 94. Rossi GP, Belfiore A, Bernini G, Desideri G, Fabris B, Ferri C, Giacchetti G, Letizia C, Maccario M, Mallamaci F, Mannelli M, Palumbo G, Rizzoni D, Rossi E, Agabiti-Rosei E, Pessina AC, Mantero F; Primary Aldosteronism Prevalence in Italy Study Investigators. Comparison of the captopril and the saline infusion test for excluding aldosterone-producing adenoma. *Hypertension*. 2007; 50(2):424-431
 95. Rossi GP, Bernini G, Caliumi C, Desideri G, Fabris B, Ferri C, Ganzaroli C, Giacchetti G, Letizia C, Maccario M, Mallamaci F, Mannelli M, Mattarello MJ, Moretti A, Palumbo G, Parenti G, Porteri E, Semplicini A, Rizzoni D, Rossi E, Boscaro M, Pessina AC, Mantero F; PAPY Study Investigators. A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48(11): 2293-2300
 96. Rossi GP, Bolognesi M, Rizzoni D, Seccia TM, Piva A, Porteri E, Tiberio GA, Giulini SM, Agabiti-Rosei E, Pessina AC. Vascular remodeling and duration of hypertension predict outcome of adrenalectomy in primary aldosteronism patients. *Hypertension*. 2008; 51(5): 1366-1371
 97. Rossi GP, Cesari M, Cuspidi C, Maiolino G, Cicala MV, Bisogni V, Mantero F, Pessina AC. Long-term control of arterial hypertension and regression of left ventricular hypertrophy with treatment of primary aldosteronism. *Hypertension*. 2013; 62(1): 62-69
 98. Rossi GP. New concepts in adrenal vein sampling for aldosterone in the diagnosis of primary aldosteronism. *Curr Hypertens Rep*. 2007; 9(2): 90-97
 99. Satoh F, Morimoto R, Ono Y, Iwakura Y, Omata K, Kudo M, Takase K, Seiji K, Sasamoto H, Honma S, Okuyama M, Yamashita K, Gomez-Sanchez CE, Rainey WE, Arai Y, Sasano H, Nakamura Y, Ito S.

- Measurement of peripheral plasma 18-oxocortisol can discriminate unilateral adenoma from bilateral diseases in patients with primary aldosteronism. *Hypertension*. 2015; 65(5): 1096-1102
100. Savard S, Amar L, Plouin PF, Steichen O. Cardiovascular complications associated with primary aldosteronism: a controlled cross-sectional study. *Hypertension*. 2013; 62(2): 331-336
 101. Seccia TM, Fassina A, Nussdorfer GG, Pessina AC, Rossi GP. Aldosterone-producing adrenocortical carcinoma: an unusual cause of Conn's syndrome with an ominous clinical course. *Endocr Relat Cancer*. 2005; 12(1):149-159
 102. Seccia TM, Miotto D, Battistel M, Motta R, Barisa M, Maniero C, Pessina AC, Rossi GP. A stress reaction affects assessment of selectivity of adrenal venous sampling and of lateralization of aldosterone excess in primary aldosteronism. *Eur J Endocrinol*. 2012;166(5): 869-875
 103. Seccia TM, Miotto D, De Toni R, Maniero C, Vincenzi M, Motta R, Pessina AC, Rossi GP. Chromogranin A measurement for assessing the selectivity of adrenal venous sampling in primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96(5): E825-E829
 104. Solar M, Malirova E, Ballon M, Pelouch R, Ceral J. Confirmatory testing in primary aldosteronism: extensive medication switching is not needed in all patients. *Eur J Endocrinol*. 2012; 166(4): 679-686
 105. Spark RF, Kettyle WR, Eisenberg H. Cortisol dynamics in the adrenal venous effluent. *J Clin Endocrinol Metab*. 1974; 39(2): 305-310
 106. Späth M, Korovkin S, Antke C, Anlauf M, Willenberg HS. Aldosterone and cortisol-co-secreting adrenal tumors: the lost subtype of primary aldosteronism. *Eur J Endocrinol*. 2011; 164(4): 447-455
 107. Stewart PM, Allolio B. Adrenal vein sampling for primary aldosteronism: time for a reality check. *Clin Endocrinol*. 2010; 72(2): 146-148
 108. Stowasser M, Bachmann AW, Tunny TJ, Gordon RD. Production of 18-oxo-cortisol in subtypes of primary aldosteronism. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1996; 23(6-7): 591-593
 109. Stowasser M, Gordon RD, Rutherford JC, Nikwan NZ, Daunt N, Slater GJ. Diagnosis and management of primary aldosteronism. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2001; 2(3): 156-169
 110. Tanemoto M, Suzuki T, Abe M, Abe T, Ito S. Physiologic variance of corticotropin affects diagnosis in adrenal vein sampling. *Eur J Endocrinol*. 2009; 160(3): 459-463
 111. Vrezas I, Willenberg HS, Bornstein SR. Adrenal cortex, development, anatomy, physiology. In: Luciano Martini (Ed.): *Encyclopedia of Endocrine Diseases*, 50-52. Academic Press, 2004
 112. Weinberger MH, Fineberg NS. The diagnosis of primary aldosteronism and separation of two major subtypes. *Arch Intern Med*. 1993; 153(18): 2125-2129

113. White PC. Aldosterone: direct effects on and production by the heart. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(6): 2376-2383
114. Willenberg HS, Kolentini C, Quinkler M, Cupisti K, Krausch M, Schott M, Scherbaum WA. The serum sodium to urinary sodium to (serum potassium)² to urinary potassium (SUSPPUP) ratio in patients with primary aldosteronism. *Eur J Clin Invest.* 2009; 39(1): 43–50
115. Willenberg HS, Schinner S, Ansurudeen I. New mechanisms to control aldosterone synthesis. *Horm Metab Res* 2008; 40(7): 435-441
116. Willenberg HS, Späth M, Maser-Gluth C, Engers R, Anlauf M, Dekomien G, Schott M, Schinner S, Cupisti K, Scherbaum WA. Sporadic solitary aldosterone- and cortisol-co-secreting adenomas: endocrine, histological and genetic findings in a subtype of primary aldosteronism. *Hypertens Res.* 2010; 33(5): 467-472
117. Willenberg HS. How to Escape from Primary Aldosteronism? News and Views on an Adrenal Disorder of Salt Retention. *Horm Metab Res.* 2017; 49(3): 151-163
118. Williams TA, Peitzsch M, Dietz AS, Dekkers T, Bidlingmaier M, Riester A, Treitl M, Rhayem Y, Beuschlein F, Lenders JW, Deinum J, Eisenhofer G, Reincke M. Genotype-Specific Steroid Profiles Associated With Aldosterone-Producing Adenomas. *Hypertension.* 2016; 67(1): 139-145
119. Wolley MJ, Stowasser M. New Advances in the Diagnostic Workup of Primary Aldosteronism. *J Endocr Soc.* 2017; 1(3): 149-161
120. Wu VC, Kuo CC, Wang SM, Liu KL, Huang KH, Lin YH, Chu TS, Chang HW, Lin CY, Tsai CT, Lin LY, Chueh SC, Kao TW, Chen YM, Chiang WC, Tsai TJ, Ho YL, Lin SL, Wang WJ, Wu KD; TAIPAI Study Group. Primary aldosteronism: changes in cystatin C-based kidney filtration, proteinuria, and renal duplex indices with treatment. *J Hypertens.* 2011; 29(9): 1778–1786
121. Wurtman RJ. Stress and the adrenocortical control of epinephrine synthesis. *Metabolism.* 2002; 51(6): 11-14
122. Yen RF, Wu VC, Liu KL, Cheng MF, Wu YW, Chueh SC, Lin WC, Wu KD, Tzen KY, Lu CC; TAIPAI Study Group. ¹³¹I-6beta-iodomethyl-19-norcholesterol SPECT/CT for primary aldosteronism patients with inconclusive adrenal venous sampling and CT results. *J Nucl Med.* 2009; 50(10): 1631-1637
123. Yoneda T, Karashima S, Kometani M, Usukura M, Demura M, Sanada J, Minami T, Koda W, Gabata T, Matsui O, Idegami K, Takamura Y, Tamiya E, Oe M, Nakai M, Mori S, Terayama N, Matsuda Y, Kamemura K, Fujii S, Seta T, Sawamura T, Okuda R, Takeda Y, Hayashi K, Yamagishi M, Takeda Y. Impact of new quick gold nanoparticle-based-cortisol assay during adrenal vein sampling for primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016, 101(6): 2554-2561
124. Young WF Jr, Klee GG. Primary aldosteronism. Diagnostic evaluation. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1988; 17(2): 367-395

125. Young WF Jr, Stanson AW, Grant CS, Thompson GB, van Heerden JA. Primary aldosteronism: adrenal venous sampling. *Surgery* 1996; 120(6): 913-920
126. Young WF Jr, Stanson AW, Thompson GB, Grant CS, Farley DR, van Heerden JA. Role for adrenal venous sampling in primary aldosteronism. *Surgery*. 2004; 136(6): 1227–1235
127. Young WF Jr. Minireview: primary aldosteronism-changing concepts in diagnosis and treatment. *Endocrinology*. 2003; 144(6): 2208-2213
128. Young WF, Stanson AW. What are the keys to successful adrenal venous sampling (AVS) in patients with primary aldosteronism? *Clin Endocrinol. (Oxf)* 2009; 70(1): 14-17
129. Zennaro MC, Boulkroun S, Fernandez-Rosa F. An update on novel mechanisms of primary aldosteronism. *J Endocrinol*. 2015; 224(2): R63-77
130. Zhu L, Zhang Y, Zhang H, Zhou W, Shen Z, Zheng F, Tang X, Tao B, Zhang J, Lu X, Xu J, Chu S, Zhu D, Gao P, Wang JG. Comparison between adrenal venous sampling and computed tomography in the diagnosis of primary aldosteronism and in the guidance of adrenalectomy. *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95(39): e4986