Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rolf F. Maier
des Fachbereiches der Medizin der Philipps- Universität Marburg

In Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

Erhebung von Normwerten für die Prostaglandin-und Leukotrien-Ausscheidung bezogen auf die Kreatinin-Ausscheidung im Spontanurin bei Kindern aller Altersstufen

Inaugural - Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin, dem Fachbereich der Medizin der Phillips-Universität Marburg vorgelegt von Ina Zilonkovski aus Gotha Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philippsuniversität Marburg am 11.12.2008
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund
Referent: Prof. Dr. H.W. Seyberth
1. Korreferent: PD Dr. Dr. H.G. Wahl

Für meine Eltern
und
für Markus

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS IV

ABBILDUNGSVERZEICHNIS VI

TABELLENVERZEICHNIS IX

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS X

1. Einleitung 1

1.1. Eicosanoide 1

1.1.1. Synthese der Prostaglandine und Leukotriene 1

1.1.2. Metabolismus der Prostaglandine und Leukotriene 4

1.1.3. Funktionsweise der Eicosanoide 4

1.2. Eicosanoide und ihre Bedeutung bei ausgesuchten Krankheiten 8

1.3. Eicosanoid- Analytik und ihre Problematik 11

2. Patienten und Methoden 15

2.1. Ethik 15

2.2. Methoden 15

2.2.1. Studiendesign 15

2.2.2. Prinzip der fraktionierten 24 h Urinsammlung 17
2.2.3. Bestimmung der Prostaglandine im Urin 17
2.2.3.1. Probenvorbereitung 18
2.2.3.2. Prinzip der Prostaglandin-Analytik 19
2.2.4.Bestimmung der Leukotriene im Urin 23
2.2.4.1. Prinzip der Leukotrien-Analytik 23
2.2.4.2. Angaben und Einstellungen des Massenspektrometers 27
2.2.5. Klinische Chemie 29
2.3. Patienten 30
2.4. Statistik 35
2.4.1. Phase I 35
2.4.2. Phase II 36

3. Ergebnisse 37

3.1. Phase I 37
3.1.1. Zirkadiane Rhythmik 37
3.1.2. Korrelation 44
3.2. Phase I und II 50
3.2.1. Altersunterschiede 50
3.2.2. Geschlechtsunterschiede 51
3.2.3. Normwertbestimmung 51

4. Diskussion 55

5. Zusammenfassung 65

6. Danksagung 68

7. Literaturverzeichnis 69

8. Anhang 77

8.1. Aufklärungsbögen 77
8.1.1. Aufklärungsbogen Phase I für Eltern 77
8.1.2. Aufklärungsbogen Phase II für Eltern 79
8.1.3. Aufklärungsbogen Phase I Studienteilnehmer 81
8.1.4. Aufklärungsbogen Phase II Studienteilnehmer 83
8.2. Urinsammelprotokoll 85
8.3. Fragebogen für Phase I und II 86
8.4. Datentabellen 87
8.4.1. Friedman Test 87
8.4.2. Mann-Whitney U-Test 88
8.4.3. Kruskal-Wallis-Test 90
8.5. Lebenslauf 92
8.6. Akademische Lehrer 93
8.7. Ehrenwörtliche Erklärung 94

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Auszug aus der Eicosanoid-Synthese	3
Abbildung 2:	Wirkungsweise der Eicosanoide	5
Abbildung 3:	Zeitplan der Untersuchung	16
Abbildung 4:	Prinzip der Probenaufbereitung des fraktioniert gesammelten 24 h Sammelurin	19
Abbildung 5:	Schema der Prostanoid-Analytik mittels GC-MS-MS	22
Abbildung 6:	Schema der Leukotrien-Analytik mittels GC-MS-MS	26
Abbildung 7:	Veränderung der Eluentenprofile während der LC- Messung	29
Abbildung 8:	Phase I : Altersverteilung der männlichen Probanden	30
Abbildung 9:	Phase I : Altersverteilung der weiblichen Probanden	31
Abbildung 10:	Anzahl der Urinfraktionen pro 24 h Urinsammlung	32
Abbildung 11:	Phase II : Altersverteilung der männlichen Probanden	34
Abbildung 12:	Phase II : Altersverteilung der weiblichen Probanden	34
Abbildung 13:	Boxplot PGE_2 über 24 h	38
Abbildung 14:	Boxplot PGE-M über 24 h	38
Abbildung 15:	Boxplot 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ über 24 h	39
Abbildung 16:	Boxplot 2,3-dinor-6-keto-$PGF_{1\alpha}$ über 24 h	39

Abbildung 17: Boxplot TxB_2 über 24 h 40
Abbildung 18: Boxplot 2,3-dinor-TxB_2 über 24 h 40
Abbildung 19: Boxplot 11-dehydro-TxB_2 über 24 h 41
Abbildung 20: Boxplot Leukotrien E_4 über 24 h 41
Abbildung 21: Boxplot Urin-Kreatinin über 24 h 43
Abbildung 22: Kumulierte Wahrscheinlichkeit PGE_2 46
Abbildung 23: Kumulierte Wahrscheinlichkeit PGE-M 46
Abbildung 24: Kumulierte Wahrscheinlichkeit 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ 47
Abbildung 25: Kumulierte Wahrscheinlichkeit 2,3-dinor-6-keto-$PGF_{1\alpha}$ 47
Abbildung 26: Kumulierte Wahrscheinlichkeit TxB_2 48
Abbildung 27: Kumulierte Wahrscheinlichkeit 2,3-dinor-TxB_2 48
Abbildung 28: Kumulierte Wahrscheinlichkeit 11-dehydro-TxB_2 49
Abbildung 29: Kumulierte Wahrscheinlichkeit Leukotrien E_4 49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Beispiele der Prostaglandinwirkung	6
Tabelle 2:	Beispiele der Leukotrienwirkung	6
Tabelle 3:	Beispiele der Prostaglandin Modulation	7
Tabelle 4:	Differenzierung hereditärer hypokaliämischer Salzverlust-Tubulopathien	10
Tabelle 5:	Einstellungsparameter der Massenfilter	28
Tabelle 6:	Gradientenprofile der Eluenten während der LC- Messung	28
Tabelle 7:	Urin-Kreatinin mg/dl über 24 h mit Korrelation zum 24 h Sammelurin	43
Tabelle 8:	Korrelation der Eicosanoid Daten je Zeitintervall zu Eicosanoid Daten des 24 h Sammelurin	44
Tabelle 9:	Eicosanoid Normwerte der altersunabhängigen Eicosanoide	52
Tabelle 10:	Eicosanoid Normwerte der altersabhängigen Eicosanoide für Altersgruppe 1	53
Tabelle 11:	Eicosanoid Normwerte der altersabhängigen Eicosanoide für Altersgruppe 2	54
Tabelle 12:	Eicosanoid Referenzwerte in ng/h/1,73m^2 10. – 90.Perzentile	61
T**abelle 13 :**	Friedman-Test aller Eicosanoid-Daten	87
Tabelle 14:	Mann-Whitney U-Test aller Eicosanoid-Daten	88
Tabelle 15:	Mann-Whitney U-Test der Kreatinin-Daten	89
Tabelle 16:	Kruskal-Wallis-Test aller Eicosanoid-Daten	90
Tabelle 17:	Kruskal-Wallis-Test der Kreatinin-Daten	91

Abkürzungsverzeichnis

ADH	**A**nti**d**iuretisches **H**ormon
ADP	**A**denosin**di**p**h**osphat
ClC-kb	Renaler Chlorid-Kanal b (**c**hloride **c**hannel **k**idney **b**)
COX	**C**yclo**ox**ygenase
GC-MS-MS	**G**as-**C**hromatographie Tandem-**M**assen**s**pektrometrie
LC	**L**iquid-**C**hromatographie
LTB_4	**L**euko**t**rien **B_4**
LTC_4	**L**euko**t**rien **C_4**
LTD_4	**L**euko**t**rien **D_4**
LTE_4	**L**euko**t**rien **E_4**
LC-MS-MS	**L**iquid-**C**hromatographie Tandem-**M**assen**s**pektrometrie
MRM	**M**ultiple **R**eaction **M**onitoring
MS	**M**assen**s**pektrometrie
NSAID	**n**on-**s**teroidal **a**nti-**i**nflammatory **d**rugs
NCCT	Renaler **N**atrium-**C**hlorid-**C**o-**T**ransporter
NkCC2	Renaler **N**atrium-**K**alium-**2** **C**hlorid-**C**o-Transporter
ROMK	Renaler Kalium-Kanal
PG	**P**rosta**g**landin
PGE_2	**P**rosta**g**landin **E_2**
PGE-M	**P**rosta**g**landin **E** **M**etabolit

Q	**Q**uadrupole
SPE	**S**olide-**P**hase-**E**xtraction-Chromatography
TxA_2	**T**hrombo**x**an **A_2**
TxB_2	**T**hrombo**x**an **B_2**
2,3-dn-TxB_2	**2,3-d**i**n**or-**T**hrombo**x**an **B_2**
2,3-dn-6-k-$PGF_{1\alpha}$	**2,3-d**i**n**or-**6-k**eto-**P**rosta**g**landin **$F_{1\alpha}$**
6-k-$PGF_{1\alpha}$	**6-k**eto-**P**rosta**g**landin **$F_{1\alpha}$**
11-dh-TxB_2	**11-d**e**h**ydro-**T**hrombo**x**an **B_2**

1. Einleitung

1.1 Eicosanoide

Der Begriff der Eicosanoide ist eine Sammelbezeichnung für zahlreiche natürliche hormonähnliche Substanzen, die in ihrer Struktur geringfügig variieren und chemisch gesehen Derivate der Arachidonsäure sind. Sie werden nicht wie Hormone in speziellen Drüsenzellen gebildet und gespeichert, sondern in vielen Zellarten nach geeigneter Stimulation synthetisiert und nach sehr kurzer Halbwertszeit wieder durch verschiedene enzymatische Prozesse inaktiviert [7,13,39,49]. Somit gelten sie als lokale Hormone die sowohl über spezifische Rezeptoren, als auch über unspezifische Kaskaden ihre Wirkung entfalten. Eicosanoide stellen eine große Gruppe von intrazellulären und interzellulären Mediatoren ganz unterschiedlicher Wirkung dar. Die Prostaglandine und Leukotriene gehören als Metabolite der Arachidonsäure zur Gruppe der Eicosanoide [13,39,49].

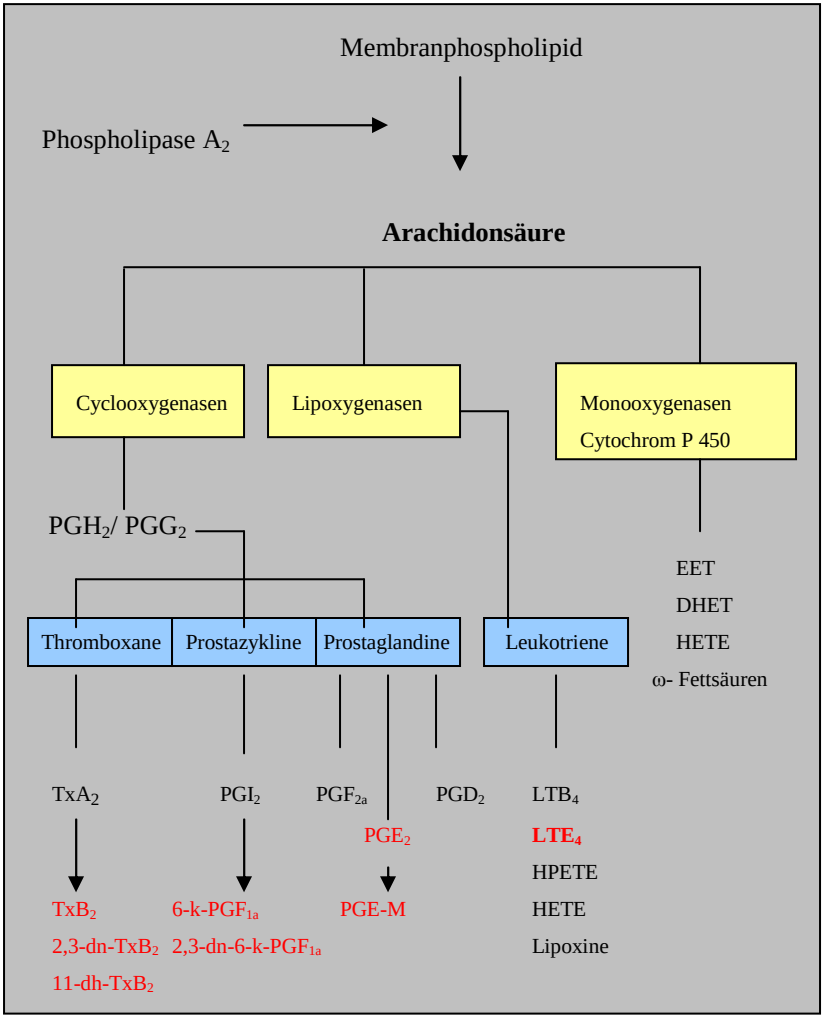
1.1.1. Synthese der Prostaglandine und Leukotriene

Ausgangssubstrat der Prostaglandin - und Leukotrienbiosynthese ist die Arachidonsäure, die durch das Enzym Phospholipase A_2 aus Membranlipiden freigesetzt wird. Die Aktivität dieses Enzyms ist streng kontrolliert und wird z.B. über Hormone reguliert. Aus der Arachidonsäure werden anschließend, unter Mitwirkung verschiedener Enzyme, unterschiedliche jedoch strukturell ähnliche Substrate synthetisiert. Die Prostaglandinbildung erfolgt durch die Cyclooxygenase (COX), von denen

zwei Isoformen bekannt sind: COX 1 und COX 2. Die COX 1 ist vorwiegend an intrazellulären Membransystemen lokalisiert. Sie wird ständig und konstant in den verschiedenen Zelltypen expremiert und die von ihr synthetisierten Prostaglandine sind z.B. für die Aufrechterhaltung der renalen Homöostase wichtig. Die COX 2 ist hauptsächlich am endoplasmatischen Retikulum des Zellkerns lokalisiert. Sie wird nur nach spezifischer Stimulation z.B. durch Hormone oder inflammatorische Mediatoren in den Zellen expremiert [6,13,39,49]. Die durch Aktivierung der COX 2 gebildeten Prostaglandine tragen unter anderem zur Ausbildung von Fieber und Schmerzen bei. Beide Isoformen synthetisieren PGH_2 aus der Arachidonsäure, welches Vorstufe für die Bildung aller weiteren Prostanoide ist, wie Prostaglandine, Thromboxane und Prostazykline (siehe Abb. Nr. 1) [13]. Hauptvertreter der Prostaglandine ist PGE_2 mit dessen Hauptmetabolit PGE-M, das $PGF_{2\alpha}$ und das PGD_2. Hauptvertreter der Thromboxane ist das TxA_2 mit dessen Metaboliten 2,3-dinor-TxB_2 und 11-dehydro-TxB_2. Hauptvertreter der Prostazykline ist das PGI_2 mit dessen Metaboliten 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ und 2,3-dinor-6-keto-$PGF_{1\alpha}$. Obwohl fast alle kernhaltigen Zellen in der Lage sind Eicosanoide zu synthetisieren, gelten einige der im Urin ausgeschiedenen Prostaglandine als Indikatoren für die renale Prostaglandinsynthese und andere spiegeln hauptsächlich die systemische Prostaglandinsynthese wieder. PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ gelten als ausschließlich renalen Ursprungs. TxB_2 und 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ werden hauptsächlich in der Niere synthetisiert und PGE-M, 2,3-dinor-6-keto-$PGF_{1\alpha}$, 2,3-dinor-TxB_2 und 11-dehydro-TxB_2 gelten als Indikatoren der extrarenalen, somit vorwiegend systemischen Prostaglandinsynthese [19,31,49,50,51].

Eine weitere Enzymgruppe, die Lipoxygenasen,synthetisieren die Substratgruppe der Leukotriene aus der AArachidonsäure, dessen Hauptvertreter Leukotrien E_4 und Leukotrien B_4 sind [13,49].

Abbildung Nr. 1: Auszug aus der Eicosanoid-Synthese



1.1.2. Metabolismus der Prostaglandine und Leukotriene

Die Eicosanoide werden hauptsächlich aus der membranständigen Arachidonsäure synthetisiert. Unterschiedlichste Stimuli (Angiotensin II, Vasopressin, Adrenalin, Thrombin, Kollagen, ADP, Histamin, Bradykinin, mechanische Stimulation, etc.) aktivieren die Freisetzung der Arachidonsäure aus der Zellmembran. Einmal synthetisierte Eicosanoide werden vorwiegend durch, im ganzen Körper verteilte, spezifische Enzyme inaktiviert. Ebenso wurde für einige Eicosanoide ein nicht enzymatischer Zerfall beschrieben. Diese entstandenen Metabolite durchlaufen typische hepatische Oxidationsprozesse und werden dann im Urin ausgeschieden [13].

1.1.3. Funktionsweise der Eicosanoide

Eicosanoide spielen bei den unterschiedlichsten physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen eine entscheidende Rolle in unserem Organismus (Abb. Nr. 2, Tab. Nr. 1, Tab. Nr. 2). Im Sinne eines Regulationskreislaufes werden sie durch spezifische Stimuli aktiviert und erhalten zum Teil durch eigene Metabolite negatives / bzw. positivesFeedback (Tab. Nr. 3). Neben wichtiger Mediatorfunktion bei der Infektionskaskade greifen sie regulierend in die Homöostase der Gerinnung ein, modulieren den Gefäßtonus und sind wichtige Regulatoren der Flüssigkeits- und Elektrolyt-Homöostase insbesondere im Bereich der Nieren. Ebenso sind sie bei der Entstehung von Schmerz und Fieber involviert [13,49,50,51].

Abbildung Nr. 2: Wirkungsweise der Eicosanoide [13]

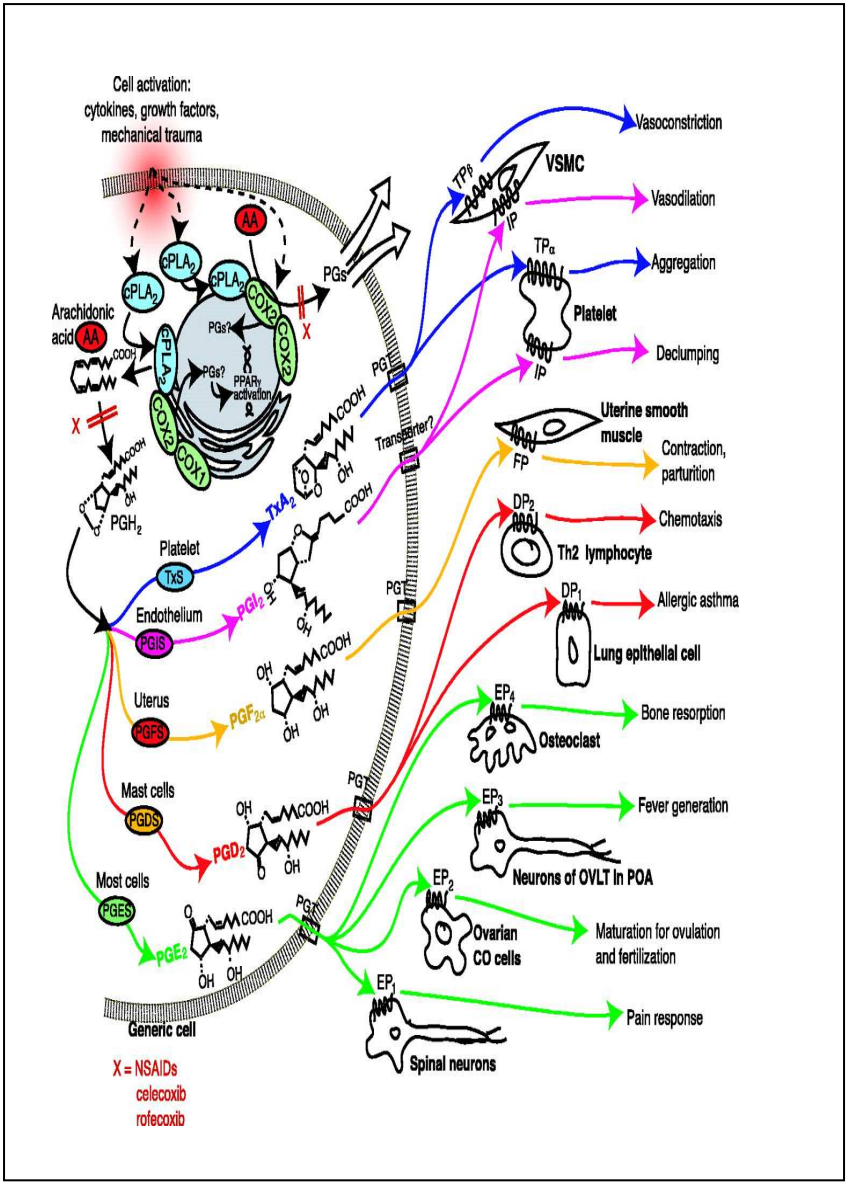


Tabelle Nr. 1: Beispiel der Prostanoidwirkung [49]

Stimulus	Prostanoid	Effekt
Interleukin 1	PGE_2	Fieber
Endotoxin	TxA_2	Pulmonale Hypertension
Kollagen	TxA_2, PGH_2	Thrombozytenaggregation
Artifizielle Ventilation	PGE_2, PGI_2	Persistierender Ductus Arteriosus
Nierenfunktionsstörung	PGE_2	Wasser- und Elektrolytverlust
Bradykinin	PGE_2	Vasodilatation
Furosemid	PGE_2	Reninfreisetzung
Malignität	PGE_2	Osteolyse, Hyperkalzämie

Tabelle Nr. 2: Beispiele der Leukotrienwirkung [49]

LTB_4	LTC_4/ LTD_4
Chemotaxis	Pulmonale Vasokonstriktion
Adhäsion und Aggregation von neutrophilen Granulozyten	Bronchialkonstriktion
Plasmaexsudation	Plasmaexsudation
Degranulation	Sekretion von Mucus
Aktivierung der Phospholipase	Aktivierung der Phospholipase

Tabelle Nr. 3: Beispiele der Prostaglandin Modulation [49]

Stimulus	**Effekt**	**Negativer Feedback**
Katecholamine	Lipolyse	PGE_2
ADH	Wasserretention	PGE_2
Angiotensin II	Vasokonstriktion	PGE_2
Sympathikus	Norepinephrin Freisetzung	PGE_2
Thrombozytenadhäsion	Thrombozytenaggre-gation	PGE_2
Interleukin 1	T-Zell Proliferation	PGE_2

Stimulus	**Effekt**	**Positiver Feedback**
Bradykinin	Algesie	PGE_2
Peptid- LT	Pulmonale Hypertension	TxA_2

Prostaglandine und Leukotriene sind proinflammatorische Mediatoren, die im Entstehungsprozess jeder entzündlichen Reaktion beteiligt sind.

Eine wichtige Rolle spielen sie z. B. bei der Ausprägung der verschiedensten klinischen Symptome einer allergischen Reaktion. So verursacht PGD_2 Bronchokonstriktion, Vasodilatation, Urtikaria und die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten. Des Weiteren ist es beteiligt an der Entstehung der allergischen Rhinitis und der allergischen Spätreaktion. Den Prostaglandinen $PGF_{2\alpha}$ und TxA_2 kann ebenfalls Bronchokonstriktion zugeschrieben werden. Dem entgegen wirken Prostazyklin und PGE_2 bronchodilatatorisch. Es konnte gezeigt werden, das die Inhalation von PGE_2 asthmatische Attacken unterschiedlicher Genese wie z.B. allergisch oder Stress induziertes Asthma vorbeugen kann [43]. Ebenso hat PGE_2 suppressiven Effekt auf die Interferon γ und IL 4 Synthese bei atopischer Dermatitis. Zudem spielt TxA_2 eine wichtige Funktion in der Entstehung der Hyperreagibilität des Bronchialsystems beim Asthma. Der Einsatz von Leukotrienantagonisten als Therapieoption des allergischen Asthmas hat sich bereits in im klinischen Alltag etabliert [36]. Weiterhin gibt es verschiedenartige renale oder systemische Erkrankungen, die mit Veränderungen der renalen Prostaglandinausscheidung einhergehen. Eine relevante Erkrankung während der neonatalen Periode ist die pulmonale Hypertonie, bei der eine vermehrte Ausscheidung von 2,3-dinor-6-keto-$PGF_{1\alpha}$ und 2,3-dinor-TxB_2 nachgewiesen werden konnte. Ebenso wurde beim persistierenden Ductus arteriosus eine erhöhte Exkretion von PGE_2 und PGI_2 im Urin aufgezeigt. Der Therapieansatz mit Indometacin als unselektiver COX-Hemmer ist eine anerkannte Alternative zur chirurgischen Intervention beim persistierenden Ductus arteriosus

[29,30,39]. Eine bedeutende diagnostische Relevanz haben Prostaglandine und deren Metaboliten bei der Gruppe der kongenitalen Erkrankungen der Nierentubuli (hereditäre Salzverlust-Tubulopathien). Diese Gruppe noch nicht abgeschlossen identifizierter genetischer Fehlbildungen der Ionentransportkanäle der Nierentubuli haben eine große Symptomenvarianz mit unterschiedlicher Ausprägung, denen fast allen erhöhte Prostaglandin-Ausscheidung im Urin nachgewiesen wurde (Tab. Nr. 4). Nach eingehender Untersuchung konnte aufgezeigt werden, dass die Symptomkomplexe durch die vermehrt synthetisierten Eicosanoide verursacht werden [1,20,26,49,50]. Diese Erkenntnis wird seit Jahrzehnten in spezialisierten pädiatrischen Zentren zum Teil sogar schon in der pränatalen Diagnostik angewandt. Bei frühzeitiger Diagnosestellung können die Symptome durch medikamentöse Hemmung der Prostaglandin-Synthese gelindert werden [22,27,39,45,49,50,51].

Tabelle Nr. 4: Differenzierung hereditärer hypokaliämischer Salzverlust- Tubulopathien [1,20,26,27,39,43,44,50]

	Gitelman Syndrom/ Thiazid ähnliche Tubulopathie	**Klassisches Bartter Syndrom**	**Hyperprostaglandin E Syndrom/** Neonatales Bartter Syndrom/ Furosemid ähnliche Tubulopathie	
Lokalisation der Mutation	distaler Tubulus	basolaterale Membran des distalen Nephrons	dicker aufsteigender Teil der Henle Schleife	Dicker aufsteigender Teil der Henle Schleife und Sammelrohr
Defekt	**NCCT** NaCl Co-Transporter	**ClC-Kb** Chlorid-Kanal	**NKCC2** Na-K-2Cl Co-Transporter	**ROMK** Kalium Kanal
Manifestations-zeitpunkt	Häufig Zufallsdiagnose im Laufe der Kindheit und im frühen Erwachsenenalter	Im Laufe der Kindheit	Pränatal, Frühgeburtlichkeit mit lebensbedrohlichem Verlauf	
Klinik	**Hypokaliämische**	**metabolische**	**Alkalose**	
Hypokaliämie	++	++	++	**+ (-)**
Polyhydramnion	-	**- (+)**	+	+
Polyurie	-	**- (+)**	+	+
Hypo/isosthenurie	-	-	+	+
Kalzurie	↓	↔	↑	↑
Nephrokalzinose	-	**- (+)**	+	+
Hypomagnesiämie	+	- / +	-	-
Hyperprostaglandinurie	**- (+)**	+	+	+

+/ - beobachtete Ausprägung der Charakteristika bei klinischen Fällen

1.3. Eicosanoid-Analytik und ihre Problematik

Eicosanoide haben nur eine sehr kurze Halbwertszeit, sie unterscheiden sich nur minimal in ihrer chemischen Struktur und es ist eine extrem sensitive Messmethode notwendig, um ihren niedrigen Level messen zu können. Zudem können die in vivo gemessenen Eicosanoid-Spiegel den tatsächlichen Level verfälschen, da die z.B. in Blutproben enthaltenen Zellen noch befähigt sind, kurzzeitig außerhalb des Körpers Eicosanoide zu synthetisieren. Des Weiteren wird ihre Synthese durch viele Reize getriggert wie z.B. durch die mechanische Manipulation einer Blutentnahme. Daher hat sich die Analyse der Eicosanoide und ihrer Metabolite im Blut zur Bestimmung ihrer Aktivität als ungenaue Methode erwiesen. Eine genauere Bestimmung kann erzielt werden, wenn die Eicosanoid-Analyse im Urin durchgeführt wird. Zum einen handelt es sich beim Urin normalerweise um eine zellfreie Flüssigkeit und damit fehlender ex vivo Synthese, zum anderen werden die Eicosanoide hauptsächlich als relativ stabile Metabolite im Urin ausgeschieden [19,31,49,50].

Die bisherige Bestimmung der Eicosanoide und deren Metabolite bezieht sich ausschließlich auf die Sammlung von 24 h Sammelurin [19,26,31,46,47,48]. Vor allem bei Kindern stellt die Urinsammlung über mehrere Stunden eine sehr aufwendige, belastende und zum Teil unpraktikable Untersuchungsmethode dar. Da die Urinsammlung gekühlt durchgeführt werden muss, ist diese unter häuslichen Bedingungen aufgrund hygienischer Gesichtspunkte zumeist unzumutbar.

Um intraindividuelle als auch interindividuelle Schwankungen auszugleichen, werden die im Urin bestimmten Eicosanoid-Level anschließend nach der Haycock`s Formel auf die Körperoberfläche bezogen und deren Stundenwert berechnet. Daraus ergibt sich die Einheit

ng/h/1,73m² für die Eicosanoide und deren Metabolite im Urin. Das die Beziehung der Eicosanoid-Synthese auf die Körperoberfläche erfolgt, gilt nicht als die beste Referenzmethode, da die Funktionsweise der renalen Ausscheidung von Eicosanoide und deren Metaboliten noch nicht vollständig als verstanden gilt [31]. Unbestritten ist der Einfluss einer normalen Nierenfunktion auf renal ausgeschiedene Substanzen, die bei der bisher gültigen Referenzeinheit keine Berücksichtigung findet [31].
In zahlreichen Studien hat sich Kreatinin als Bezugsgröße für renal ausgeschiedene Substanzen bewährt und ist somit Bestandteil vieler Normwerteinheiten. Der Hauptanteil des renal ausgeschiedenen Kreatinins stammt von intrazellulären Kreatinin-Vorstufen, Kreatin und Phosphokreatinin des Muskelstoffwechsels. Es wird fast ausschließlich glomerulär filtriert und nicht rückresorbiert. Daher gilt es auf der einen Seite als Parameter zur Abschätzung der Körpermuskelmasse und auf der anderen Seite als ideale Bezugsgröße für renal ausgeschiedene Substanzen. Es stellt ein geeignetes Maß dar, um gemessene Werte von renal ausgeschiedenen Substanzen zu standardisieren. Ebenso wurde mehrfach aufgezeigt, das der Bezug auf Kreatinin als Ersatz für die Sammlung von 24 h Sammelurin anwendbar ist [2,10,18,34,37,41,43,44].

Die Etablierung von Referenzwerten der Eicosanoid-Ausscheidung bezogen auf Kreatinin als interne Bezugsgröße im Spontanurin ist somit für die Verbesserung von Diagnostik und Therapieoptionen von großem Belang. Vor allem bei Kindern sind Normalwerte, die die endogene Synthese von Eicosanoiden wiederspiegeln unabdingbar für die weitere Erforschung unterschiedlichster Krankheitsbilder, bei denen eine Veränderung der Eicosanoid-Synthese vorliegt oder vermutet wird. Ebenso zur Dosisfindung bzw. Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung und damit zur

Therapiekontrolle medikamentöser Behandlungen, die in Synthese oder Wirkbereich der Eicosanoide eingreifen, ist es von entscheidender Bedeutung sich auf gültige Referenzwerte bei der Eicosanoid-Ausscheidung im Urin berufen zu können. Die Anwendung der Methode im Rahmen von Studien, die die Zusammenhänge von Pharmakokinetik und Pharmakodynamik untersuchen ist nur möglich, wenn parallel zur Spiegelstimmung im Blut eine zeitnahe Bestimmung der Wirkung im Spontanurin möglich ist.

Als Bestandteil jeder entzündlichen Reaktion sind die Eicosanoide als Mediatoren für die Entstehung von Schmerzen und Fieber verantwortlich. Die Hemmung ihrer Synthese ist somit das hauptsächliche Wirkgebiet der therapeutisch auch bei Kindern weit verbreiteten Medikamentengruppe der COX-Inhibitoren (NSAID = nonsteroidal anti-inflammatory drugs) [12,14,15]. Gerade in der Pädiatrie stände mit der Bestimmung der Eicosanoide im Spontanurin sowohl für pharmakologische Studien, als auch für die tägliche Praxis ein einfach anwendbares nicht invasives diagnostisches Mittel zur Verfügung [4]. Weitere pharmakologische Entwicklungen, wie z.B. Rezeptorantagonisten, selektive Syntheseinhibitoren und Eicosanoidanalogika würden neben den NSAID die Möglichkeiten der pharmakologischen Therapie bei den verschiedensten Erkrankungen bereichern [49].

Für größere multizentrische Studien, für ambulante Verlaufskontrollen von Patienten und für die Diagnostik bei sehr kleinen Kindern unter anderem zur Vermeidung unnötiger stationärer Aufenthalte, welche ausschließlich zur Durchführung der 24-stündigen Urinsammlung nötig wären, sollen die neuen Referenzwerte zu einer Verbesserung und Vereinfachung der Diagnostik im ambulanten klinischen Alltag führen und somit eine große Erleichterung für die Patienten und die Behandelnden bringen.

In der folgenden Studie werden die Zusammenhänge zwischen einerseits der Eicosanoid-Ausscheidung im kompletten 24 h Sammelurin bezogen auf Körperoberfläche und Zeit und andererseits der Eicosanoid-Ausscheidung in den einzelnen Urinfraktionen bezogen auf Kreatinin untersucht. Ziel dieser 2-phasigen Studie ist es, Aussagen über eine möglicherweise bestehende zirkadiane Rhythmik der Eicosanoid-Ausscheidung treffen zu können, sowie Referenzwerte für Kinder und Jugendliche aller Altersstufen zu erheben, die aus Spontanurin, d.h. einer einzigen Urinprobe bestimmt werden können und auf die Kreatinin-Ausscheidung bezogen werden.

2. Patienten und Methoden

2.1. Ethik

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg im März 2002 geprüft und nicht beanstandet. Die Eltern und Kinder wurden vor ihrer Teilnahme an der Studie durch ein Informationsblatt und ein Gespräch aufgeklärt. Die Zustimmung der Eltern erfolgte schriftlich, die der Kinder bis zum 13. Lebensjahr mündlich und ab dem 14. Lebensjahr ebenfalls schriftlich (siehe Anhang). Eine Genehmigung zur Durchführung der Studie an öffentlichen Schulen, wurde beim Hessischen Kultusministerium beantragt und im November 2002 genehmigt.

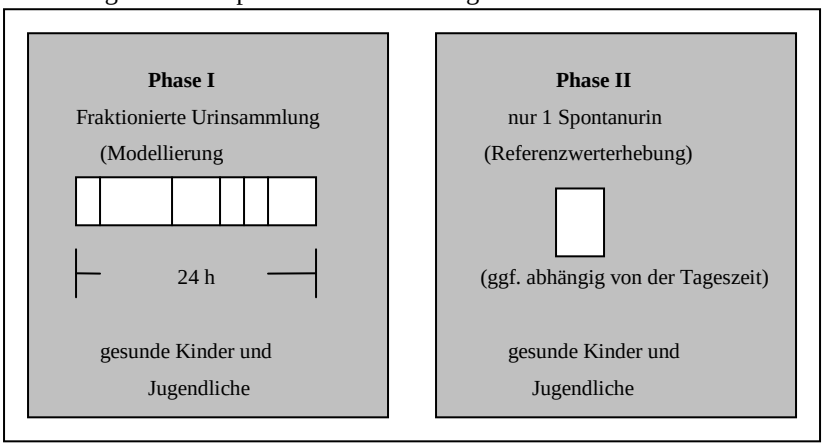
2.2. Methoden

2.2.1. Studiendesign

Es handelt sich um ein Projekt der Hypothesenprüfung. Es sollte folgende Hypothese überprüft werden: **Die renale Ausscheidung von Prostaglandinen und Leukotrienen im Bezug auf die renale Ausscheidung von Kreatinin im Spontanurin spiegelt mit einer ausreichenden diagnostischen Zuverlässigkeit die auf Körperoberfläche und Zeit bezogenen Ausscheidung von Prostaglandinen und Leukotrienen im 24 h Sammelurin wieder.**

Zur Durchführung dieser klinischen Studie und Untersuchung der vorliegenden Fragestellungen wurde ein zweizeitiges Vorgehen erarbeitet (Abb. Nr.3). In der ersten Phase wurden 24 h Sammelurine fraktioniert gesammelt, um die Zusammenhänge zwischen einerseits der Eicosanoid-Ausscheidung im kompletten 24 h Sammelurin bezogen auf Körperoberfläche und Zeit und andererseits der Prostanoid-Ausscheidung in den einzelnen Urinfraktionen bezogen auf Kreatinin aufzuzeigen. Dadurch Modellierung und Schätzung der Korrelation sowie Überprüfung, ob die Übereinstimmung von Alter, Geschlecht und / oder zirkadianem Rhythmus abhängig ist. Eine den Erkenntnissen aus Phase I angepassten Sammlung von Spontanurinen erfolgte in Phase II, welche der Ermittlung der Reverenzintervalle für die Eicosanoid-Ausscheidung im Spontanurin bezogen auf Kreatinin diente. In die Sammlung wurden Kinder und Jugendliche im Alter von 1-18 Jahren eingeschlossen, die bereit waren an einer Urinsammlung teilzunehmen. Die Sammlung erfolgte bei gesunden Kindern und Jugendlichen vorwiegend in Schulen und Kindertagesstätten.

Abbildung Nr. 3: Zeitplan der Untersuchung



2.2.2. Prinzip der fraktionierten 24 h Urinsammlung

Die Probanden erhielten Behältnisse in denen jede einzelne abgegebene Urinportion separat gesammelt wurde. Es gab keine zeitlichen Vorgaben zur Sammlung der einzelnen Portionen (die zeitlichen Abstände zwischen den Urinportionen ergaben sich aus den Bedürfnissen der Probanden) und ebenso keine Limitierung der Anzahl der einzelnen Portionen, lediglich die Vorgabe einer Mindestanzahl von drei Urinportionen innerhalb der 24 h Sammlung. Der Urin wurde während der gesamten Sammelzeit gekühlt aufbewahrt. Zur 24 h Urinsammlung erhielten die Probanden ein Protokoll (siehe Anhang) in dem sowohl die Daten der Probanden (Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht, soweit vorhanden: aktuelles Serumkreatinin), als auch die Zeitangabe der abgegebenen fraktionierten Urinproben eingetragen worden. Zur genauen Sammlung über 24 h wurde der Zeitpunkt der jeweils ersten Urinportion notiert, diese jedoch verworfen, um somit einen Nullpunkt der Sammlung zu erhalten und die Zeiträume bzw. die genaue Sammelzeit zwischen den einzelnen Urinportionen bestimmen zu können.

2.2.3. Bestimmung der Prostaglandine im Urin

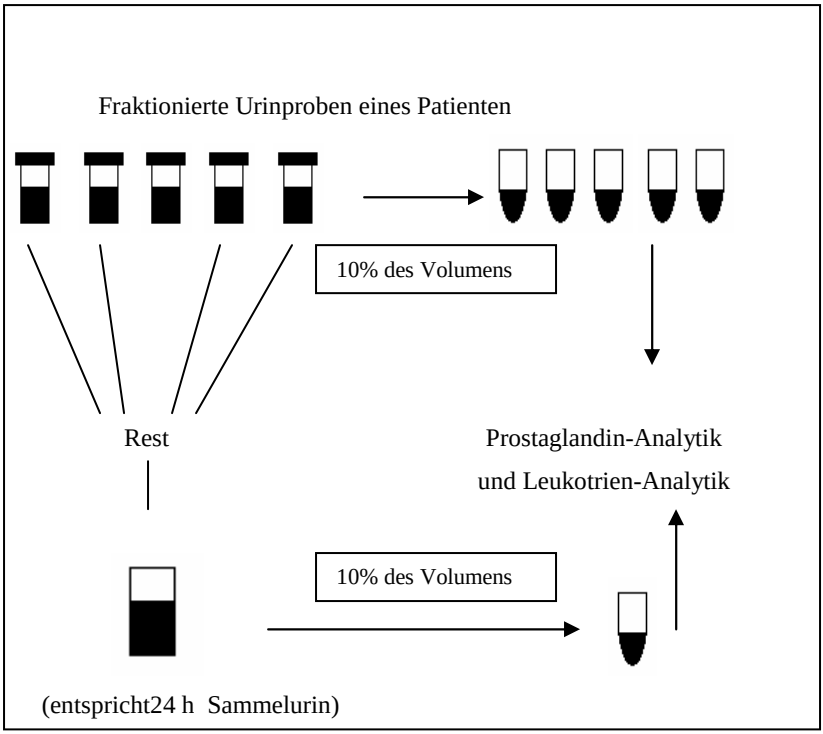
Die Prostaglandin-Analyse der Urinproben erfolgte im Eicosanoid-Labor von Prof. R.F. Maier (Kinderklinik der Universität Marburg) mittels Gaschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (GC-MS-MS) nach der als Goldstandard anerkannten Methode von Schweer et al. [45,46,47]. Es wurden PGE_2 und dessen Hauptmetabolit PGE-M, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ und 2,3-dinor-6-keto-$PGF_{1\alpha}$ als Hauptmetaboliten des PGI_2, TxB_2 und 2,3-dinor-

TxB_2 und 11-dhydro-TxB_2 als Hauptmetaboliten des TxA_2 im Urin gemessen. Die Prostaglandinwerte wurden in ng/ml gemessen.

2.2.3.1. Probenvorbereitung

In der ersten Phase der Studie erfolgte zuerst die Volumenbestimmung jeder fraktioniert abgegebenen Urinprobe. Jeweils 10% des Volumens der fraktionierten Urinproben wurde entnommen und der Prostaglandin-Analytik zugeführt. Der verbliebene Rest der zu einem Patienten zugehörigen fraktionierten Urinproben wurden zusammengeführt und gut vermischt. Aus dieser so imitierten 24 h Urinsammelprobe jedes Patienten wurden erneut 10% des Volumens entnommen und der Prostaglandin-Analytik zugeführt (Abb. Nr. 4). In der zweiten Phase der Studie konnten die Spontanurinproben direkt der Prostaglandin-Analytik zugeführt werden. Erfolgte die Prostaglandin-Analytik nicht sofort, wurden die entnommenen Proben zur Aufbewahrung bei –80°C tiefgefroren.

Abbildung Nr.4: Prinzip der Probenaufbereitung des fraktioniert gesammelten 24 h Sammelurin



2.2.3.2. Prinzip der Prostaglandin-Analytik

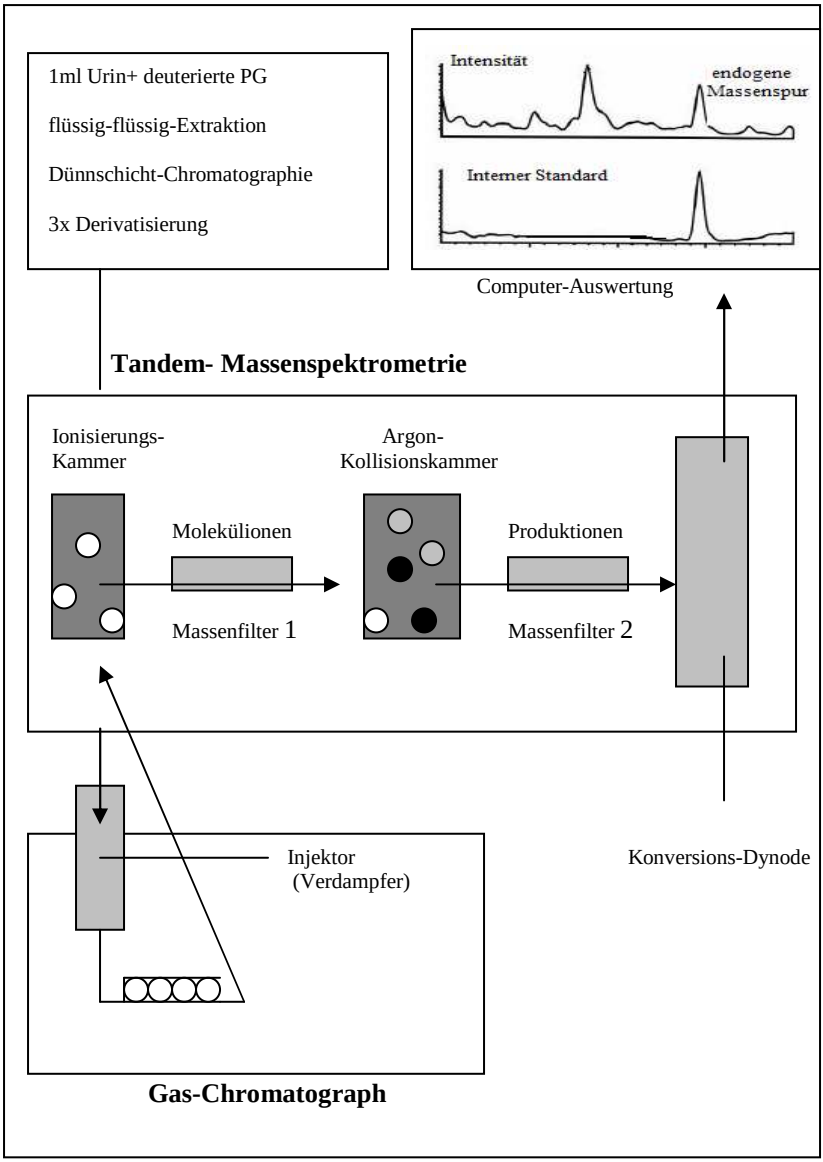
An die Prostanoid-Analytik werden ganz besondere Anforderungen gestellt, da Prostaglandine 1. zu einer Stoffgruppe strukturell sehr ähnlicher Substanzen gehören, die sich zum Teil nur durch einfache Isomerie unterscheiden, 2. in extrem niedrigen Konzentrationen (Nanogramm-Bereich) im menschlichen Urin vorliegen und 3. eine sehr kurze

Halbwertszeit haben. Sie muss überaus spezifisch und sensitiv sein. Bei der oft eingesetzten Methode der Radioimmuno-Assays kommt es durch auftretende Kreuzreaktionen oft zu falsch hoch gemessenen Werten und somit zu einer eingeschränkten Spezifität. Die Prostanoid-Analytik mittels GC-MS-MS ermöglicht eine genauere Auftrennung unterschiedlicher Substanzen, auch für den Fall, dass es sich nur um Isomere handelt (Abb. Nr. 5).

Der Urinprobe zugesetzte deuterierte Prostaglandine dienen als interner Standard. Zuerst muss die komplexe Matrix des Urins (vielfältige Verunreinigung z.B. durch Proteine) durch Reinigungsprozesse aufgearbeitet werden. Hierzu dient zunächst eine flüssig-flüssig-Extraktion und ein zweiter nachgeschalteter Reinigungsschritt in Form einer Dünnschichtchromatographie. Der abschließenden Aufreinigung mittels Gaschromatographie sind drei Derivatisierungsreaktionen vorgeschaltet (Methoximierung, Pentafluorobenzylierung, Trimethylsilylierung). Die derivatisierten Prostanoide werden in den Gaschromatographen injiziert. Durch Verdampfung des Substanzgemisches und anschließende Passage des Gases durch eine beschichtete Glaskapillare erfolgt im Gaschromatographen eine letzte Auftrennung, die zum einen auf den unterschiedlichen Siedepunkten und zum anderen auf der unterschiedlichen Affinität zur GC-Säule beruht. Die nun gereinigten und aufgetrennten Moleküle werden dem Massenspektrometer zugeführt. Im Massenspektrometer erfolgt die Ionisierung der Moleküle mittels „negative ion chemical ionisation“, wodurch die Prostaglandin-Moleküle eine negative Ladung erhalten und zu „Molekülionen“ werden. Diese werden nun in einem ersten Massenfilter (Quadrupol: elektromagnetisches Wechselfeld) weiter aufgetrennt und beschleunigt. Die nun in ihrer Molekülmasse gleichen, jedoch strukturell unterschiedlichen und

beschleunigten Ionen prallen in der Argon- Kollisionskammer auf Argonatome und zerbrechen dadurch in verschiedene Fragmente, den „Produktionen“. Durch einen zweiten nachgeschalteten Massenfilter werden die Ionen weiter differenziert und gelangen nun zur Konversions-Dynode, wo sie in Elektronen konvertiert werden . Ein „electron multiplier“ (= sekundärer Elektronen-Vervielfacher) wandelt die Elektronen anschließend zu einem messbaren Signal um. Durch die spezifischen Massen der einzelnen Tochter-Ionen (Fragmente des gesuchten Moleküls) und der Vergleich mit der bekannten Menge des zugesetzten internen Standards, der sich nur durch die Masse (Anzahl der deuterierten Atome) unterscheidet, kann sehr exakt die Menge des gesuchten Moleküls bestimmt werden. Dieses massenspektrometrische Bestimmungsverfahren wird als Multi-Reacting-Monitoring (MRM) unter Verwendung der Isotopendilution bezeichnet.[42,45,46,47]

Abbildung Nr. 5: Schema der Prostaglandin-Analytik mittels GC-MS-MS [42,45,46,47]



2.2.4. Bestimmung der Leukotriene im Urin

Die Bestimmung der Leukotriene aller Urinproben erfolgte ebenfalls im Eicosanoid- Labor von Prof. Seyberth (Kinderklinik der Universität Marburg) mittels einer modifizierten Analysemethode (Methode nach B. Watzer) unter Verwendung eines Liquid-Chromatographie- Tandem-Massenspektrometers (LC-MS-MS). Unter LC-MS versteht man die Verbindung von einer Flüssigkeitschromatographie (LC) mit der Massenspektrometrie (MS). Durch Kopplung der Methoden steht während der Methodenentwicklung für jeden Punkt des Chromatogramms ein Massenspektrum zur Verfügung. Für die quantitative Bestimmung nutzt man das zur GC-MS analoge Verfahren des MRM. Dadurch wird es möglich ohne vorherige Derivatisierung und unter Schonen der einzelnen Analyte von Verunreinigungen der Probenmatrix abzutrennen. Als Vertreter dieser Stoffgruppe wurde Leukotrien E_4 gemessen. Leukotrien E_4 wurde in ng/ml gemessen.

2.2.4.1.Prinzip der Leukotrien-Analytik

Aus den ähnlichen chemischen Gegebenheiten der Leukotriene (im Vergleich zu Prostaglandinen) ergibt sich der selbe hohe Anspruch an die Leukotrien-Analytik, wie für die oben aufgeführte Prostaglandin-Analytik. Durch eine erhöhte thermische Instabilität der LT nutzt man bei der massenspektrometrischen Analytik die Möglichkeit mittels Flüssigchromatographie bei Raumtemperatur arbeiten zu können und die Probe nicht verdampfen zu müssen. Die Bestimmung der Leukotriene

mittels LC-MS ermöglicht eine genaue Identifizierung der verschiedenen Leukotriene (Abb. Nr. 6).

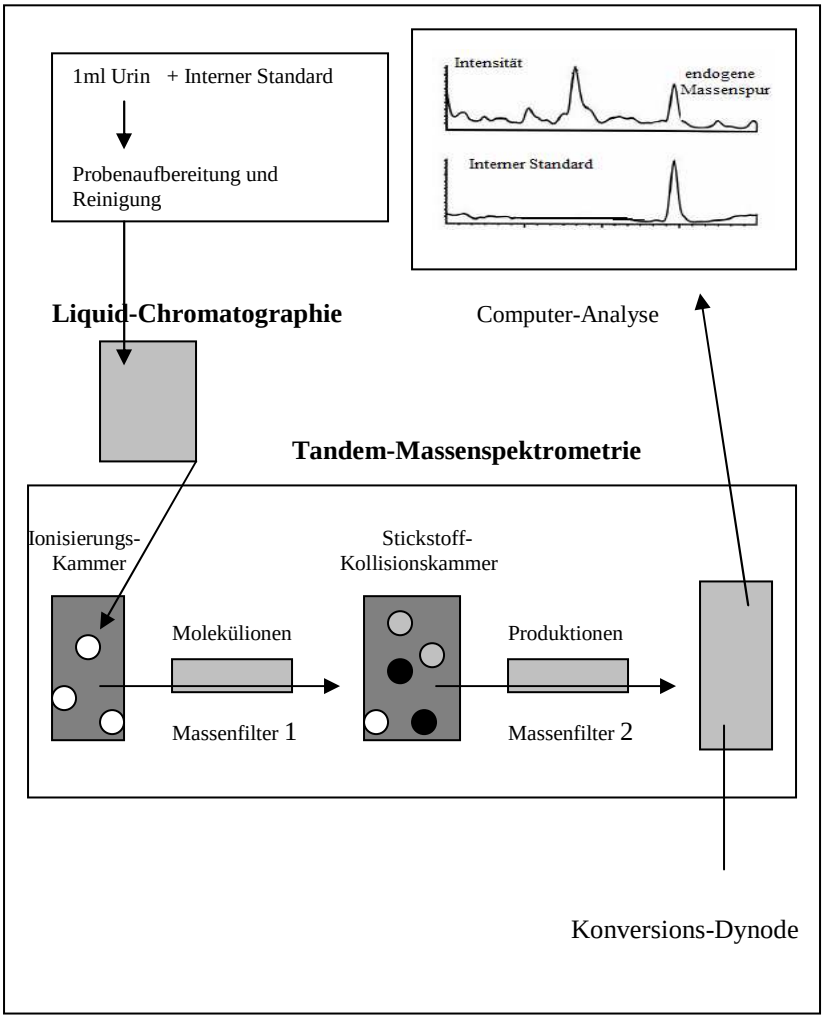
Von der zu bestimmenden Urinprobe genügt 1 ml Urin, dem zunächst dreifach deuterierte Leukotriene als Interner Standard (IS) hinzugefügt werden. Zur weiteren Probenvorbereitung erfolgt nacheinander die Ansäuerung der Probe auf einen pH-Wert von 4 mittels 2,5% Methansäure, die Zugabe von Aceton und abschließend eine Zentrifugation. Für den folgenden Schritt der Festphasenextraktion mittels solid- phase-extraction-chromatography (SPE) wird die SPE-KartuscheProbe noch durch Zugabe von Wasser und Methanol konditioniert. Durch Aufgabe der Probe auf den SPE und anschließende Waschschritte erfolgt die Aufreinigung der Probe mit folgenden Medien: Wasser, 10% Methanol und 10% Diisopropylether. Die Elution des Analyts erfolgt mit 500µl 100% Methanol. Die eluierte Probe wird mittels Stickstoff bis zur Trockene eingedampft. Durch Zugabe von Aceton und Wasser wird die Probe rekonstitutioniert und nachfolgend zentrifugiert, um die Probe für die Massenspektrometrie vorzubereiten. Der nach Zentrifugation erhaltene Überstand kann nun mittels Spritze zur weiteren Analyse in das LC-MS injiziert werden. Dort werden die Substanzen mittels Flüssigchromatographie (LC) zunächst weiter aufgetrennt. Die mobile Phase, die zur Durchführung der LC kontinuierlich zugeführt werden muss, wird in ihrer Zusammensetzung während jeweils einer Messung kontinuierlich verändert (Tab. Nr. 6).

Ermöglicht wird dieses durch zwei Eluenten: Eluent A (=0,2% Essigsäure, Wasser in 95% Acetonitril) und Eluent B (=5% Acetonitril in 0,2% Essigsäure, Wasser) und während der LC in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen zugeführt (Gradientenelution) werden (Abb. Nr. 7). Durch diese Modifizierung kann die Trennleistung der LC erhöht werden, auftretende Störfaktoren werden effektiver eliminiert und es ermöglicht die

Verbesserung der Analyt-Quantifizierung. Die nun aufgetrennten Moleküle werden anschließend dem Massenspektrometer zugeführt.

Im Massenspektrometer laufen mit einigen Ausnahmen die selben Reaktionsschritte ab, wie in der oben beschriebenen Methode der Prostaglandin-Analytik. Der Schritt zur Ionisierung der Moleküle unterscheidet sich bei der Leukotrien-Analytik, da die Moleküle hier in einer flüssigen Phase vorliegen (im Gegensatz zur Prostaglandin-Analytik, wo die Moleküle zur Ionisierung in einer gasförmigen Phase vorliegen) und zuerst verdampft werden müssen. Die Moleküle erhalten eine positive Ladung und werden zu „Molekülionen“. Diese werden nun in einem ersten Massenfilter (= Quadrupole 1 = Q1) von Ionen mit unterschiedlicher Masse abgetrennt (Einstellungen der Massenfilter Tab. Nr. 5). Die nun in ihrer Molekülmasse gleichen, jedoch strukturell unterschiedlichen und beschleunigten Ionen prallen in einer Stickstoff- Kollisionskammer auf Stickstoffatome (in der Prostaglandin-Analytik wurde eine Argon-Kollisionskammer verwendet) und zerbrechen dadurch in verschiedene Fragmente, die „Produktionen“. Durch einen zweiten nachgeschalteten Massenfilter (=Quadrupole 3= Q3) werden die Ionen weiter differenziert und gelangen nun zur Konversions-Dynode, wo sie in Elektronen konvertiert werden. Ein „electron multiplier“ (= sekundärer Elektronen-Vervielfacher) wandelt die Elektronen anschließend zu einem messbaren Signal um. Die spezifische Masse des Produktions (Fragment des gesuchten Moleküls) und die um drei Masseneinheiten höhere Molekül- bzw. Fragmentmasse (Anzahl der deuterierten Atome) des zugesetzten Internen Standards (IS) erlauben es, quasi zeitgleich für beide Moleküle die Massenspuren aufzuzeichnen. Man erhält so ein Chromatogramm aus dem man sehr exakt die Menge des zu bestimmenden Leukotriens durch den direkten Vergleich mit der bekannten Menge des IS bestimmen kann.

Abbildung Nr. 6: Schema der Leukotrien-Analytik mittels GC-MS-MS



2.2.4.2. Angaben und Einstellungen zum Massenspektrometer

Bei dem Gerät, handelte es sich um einen API 3000 von Applied Systems. Es wurden 3µm Polaris-Säulen (50 mm x 2 mm) verwendet. Die Bestimmung wurde unter Raumtemperatur durchgeführt. Die Auswertung der Messdaten erfolgte am Computer unter Verwendung der Software Version Analyst 1.2.

Allgemeine Einstellungen des Massenspektrometers:

- NEB: 9.00 PSI
- CUR: 11.00 PSI
- CAD: 4.00 PSI
- IS: 5500.00 V
- TEM: 400.00 °C
- FP: 130.00 V
- CE: 25.00 V

Einstellungsparameter für die Messung am Massenspektrometer:

- Scan Type: MRM
- Polarity: Positive
- Scan Mode: N/A
- Resolution Q1 : Unit
- Resolution Q3 : High
- DP: 25.00 V
- EP: 6.00 V
- CXP: 20.00 V

Tabelle Nr.5 : Einstellungsparameter der Massenfilter

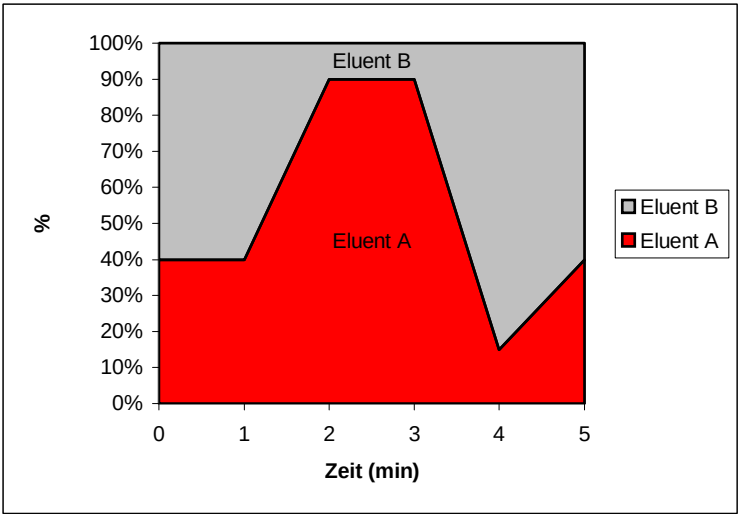
Leukotrien E_4			Interner Standard	
	Q1	Q3	Q1	Q3
Masse	440.20	189.40	443.20	192.40
Messzeit	250.00 msec	250.00 msec	250.00 msec	250.00 msec

Legende : Q= Quadrupole (Massenfilter)

Tabelle Nr. 6: Gradientenprofile der Eluenten während der LC-Messung

Schritt	Zeit (min)	Flussrate (µl/min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	0.1	200.00	40	60
1	1.0	200.00	40	60
2	5.0	200.00	90	10
3	6.0	200.00	90	10
4	7.0	200.00	15	85
5	8.0	200.00	40	60

Abbildung Nr.7: Veränderung der Eluentenprofile während der LC-Messung



2.2.5. Klinische Chemie

Zur Verifizierung der Prostaglandin- und Leukotrienausscheidung im Urin wurden weiterhin die Elektrolyte im Urin (Natrium, Kalium, Chlorid), die Osmolalität und das Urin-Kreatinin bestimmt. Diese Messungen erfolgten mit konventionellen Methoden im Zentrallabor der Universitätsklinik Marburg.

2.3. Patienten

Die erste Phase der klinischen Studie wurde zwischen März 2002 und Mai 2003 durchgeführt. In die Studie eingeschlossen wurden Kinder und Jugendliche im Alter von 1-18 Jahren, die bereit waren an einer Urinsammlung teilzunehmen und keine der Ausschlusskriterien aufwiesen. Es nahmen 60 Probanden (32 männliche und 28 weibliche) im Alter von 1-16 Jahren an der fraktionierten 24 h Urinsammlung teil (Abb. Nr. 8, 9).

Abbildung Nr.8: Phase I: Altersverteilung der männlichen Probanden

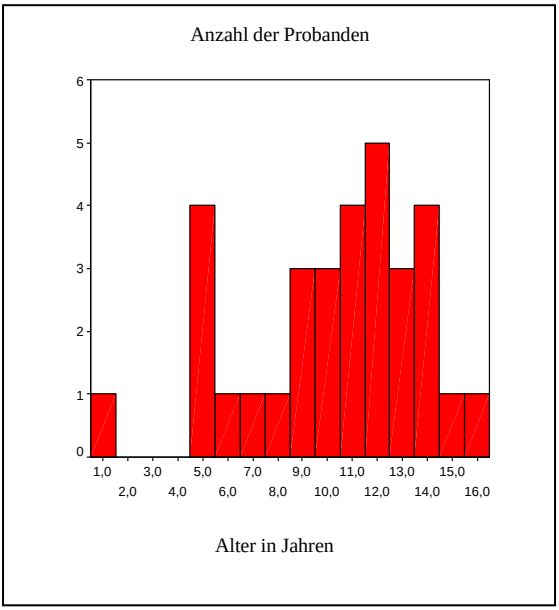
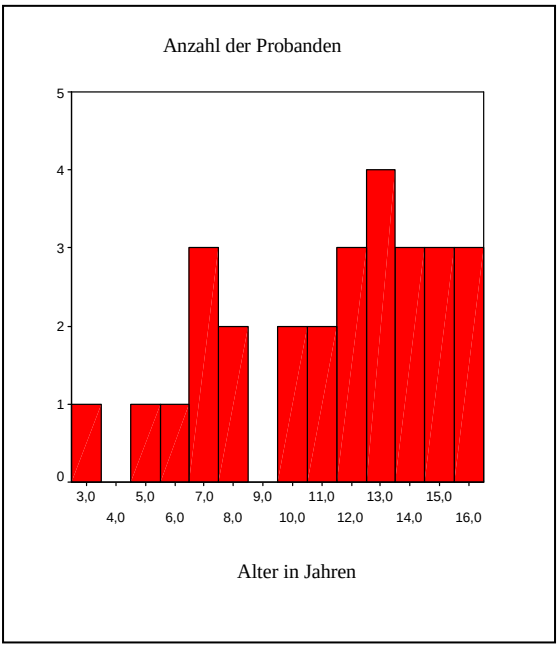


Abbildung Nr.9: Phase I: Altersverteilung der weiblichen Probanden



Bei allen Probanden handelte es sich um gesunde Kinder und Jugendliche, bei denen weder eine Störung der Nierenfunktion vorlag, noch in der Vorgeschichte schwerwiegende Erkrankungen aufgetreten waren. Anhand eines Fragebogens (siehe Anhang) wurden eventuelle vorliegende Erkrankungen und Medikamenteneinnahmen ermittelt.

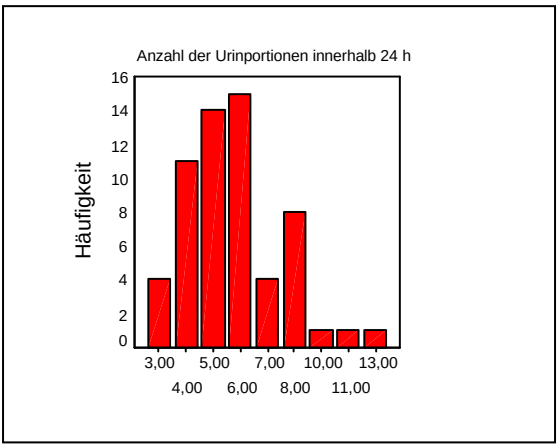
Folgende Ausschlusskriterien wurden festgelegt:

- schwere akute Erkrankung
- angeborene Erkrankungen die mit einer Veränderung der Prostanoid-Synthese oder Prostanoid-Ausscheidung einhergehen

- akute Einnahme von Medikamenten, welche die Postanoid-Synthese beeinflussen (z.B. NSAID, Steroide)
- Einnahme von Medikamenten, die den Urinfluss verändern (z.B. Diuretika)
- Patienten mit anatomischen Urinabflussproblemen
- Patienten mit vorliegender Niereninsuffizienz (Serumkreatinin >1,5mg/dl)

Für jeden Probanden erhielten wir eine individuelle Anzahl von Urinportionen innerhalb der 24 h Sammlung mit minimal drei Fraktionsproben und maximal 13 gesammelten Fraktionsproben. Im Mittel ergaben sich dadurch 5,8 Urinportionen pro Proband innerhalb von 24 h (Abb. Nr. 10).

Abbildung Nr. 10: Anzahl der einzelnen Urinfraktionen pro 24 Stunden



Demzufolge ergab sich auch eine sehr unterschiedliche Sammeldauer für die jeweiligen Urinportionen. Die kürzeste Sammelzeit für eine Urinportion betrug 20 Minuten und die längste Sammelzeit betrug 16 Stunden, dies ergab eine durchschnittliche Sammelzeit pro Urinportion von 4,1 Stunden.

Die Sammlung der Spontanurinportionen in der zweiten Phase der klinischen Studie erfolgte zwischen Mai 2003 und Mai 2005. In der Phase II wurden insgesamt 59 Probanden, 32 männliche und 27 weibliche im Alter von 2 Jahren bis 17 Jahren in die Studie eingeschlossen (Abb. Nr. 11,12). Von allen Studienteilnehmern wurde eine einzelne Spontanurinprobe, jeweils im Zeitraum zwischen 9:00 und 12:00 Uhr gesammelt. Die Sammlung erfolgte ebenfalls in Schulen und Kindertagesstätten. Bei den Probanden handelte es sich um gesunde Kinder und Jugendliche, bei denen mögliche Ausschlusskriterien ebenfalls mit einem Fragebogen (siehe Anhang) ermittelt wurden. Es galten die gleichen Ausschlusskriterien wie für die Probanden in Phase I.

Abbildung Nr.11: Phase II: Altersverteilung der männlichen Probanden

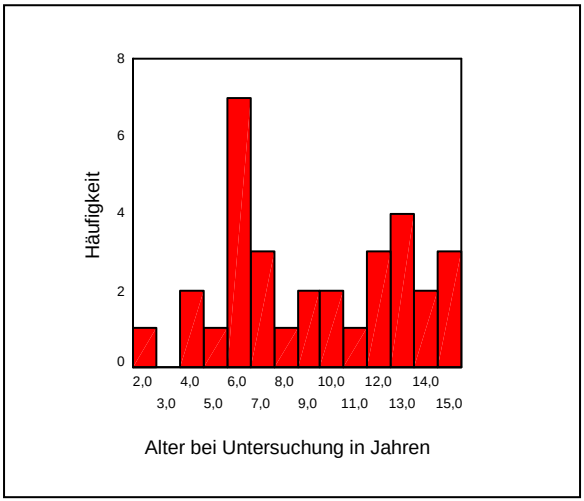
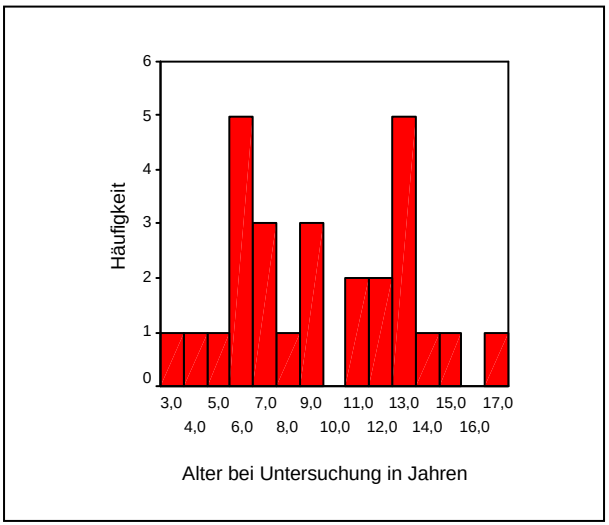


Abbildung Nr.12: Phase II: Altersverteilung der weiblichen Probanden



2.4. Statistik

2.4.1. Phase I

Die Auswertung aller erhaltener Messwerte erfolgte im Statistikprogramm SPSS Version 11.0. Die erhaltenen Rohdaten in ng/ml wurden zunächst auf Körperoberfläche (ng/h/1,73m²) und auf das im Urin gemessene Kreatinin (ng/mg Kreatinin) bezogen. Da für jeden Probanden eine unterschiedliche Anzahl von Urinfraktionen über die 24 h erhalten worden, die gleichzeitig mit verschieden langen Sammelzeiten zwischen den Fraktionen verbunden waren, wurden die Daten mittels SPSS in drei Stunden Intervalle umstrukturiert. So das jeder Proband für jedes einzelne Eicosanoid einen 24 h Sammelurinwert und acht Werte über die gesammelten 24 h erhielt, unabhängig von der Anzahl der pro Proband erhaltenen Fraktionen. Die Intervalle wurden wie folgt definiert: **Intervall 1:** 0:00-3:00, **Intervall 2:** 3:00-6:00, **Intervall 3:** 6:00-900, **Intervall 4:** 9:00-12:00, **Intervall 5:** 12:00-15:00, **Intervall 6:** 15:00-18:00, **Intervall 7:** 18:00-21:00 und **Intervall 8:** 21:00-0:00. Zur Überprüfung einer vorhandenen zirkadianen Rhythmik wurden die Prostanoidwerte in ng/mg Kreatinin mittels Boxplots grafisch dargestellt und in Bezug zum 24 h Sammelurinwert in ng/h/1,73m gesetzt. Mittels Friedmann-Test wurden anschließend signifikante Abweichung der einzelnen Prostanoid-Daten der Intervalle zu dem entsprechendem24 h Sammelurinwert in ng/h/1,73m² berechnet. Als Signifanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt. Zur Findung des geeigneten Zeitraumes für die Spontanurinsammlung in Phase II erfolgte die Korrelationsanalyse nach Pearson zwischen den Prostanoid-Daten in ng/mg

Kreatinin der Intervalle mit dem jeweiligen dazugehörigem 24 h Sammelurinwert bezogen auf die Körperoberfläche.

2.4.2. Phase II

Die erhaltenen Rohdaten wurden für die fortführenden Berechnungen ebenfalls auf Kreatinin und Körperoberfläche bezogen. Es erfolgte eine Überprüfung aller erhaltener Messwerte aus Phase I und II auf Alters- und Geschlechtsunterschiede mittels Mann-Whitney U-Test und Kruskal-Wallis-Test. Zur Berechnung vorhandener Altersunterschiede wurden zwei Altersbereiche wie folgt definiert: Altersbereich 1: Probanden <11 Jahren zum Zeitpunkt der Untersuchung, Altersbereich 2: Probanden > 11 Jahre und inklusive 11 Jahre zum Zeitpunkt der Untersuchung. Als Signifikanzniveau wurde ebenfalls $p < 0,05$ festgelegt. Zur Ermittlung eines Normbereiches der einzelnen Prostanoide wurde mittels deskriptiver Statistik der Mittelwert und die Konfidenzintervalle 10.-90. benutzt. Diese Berechnungen erfolgten ebenfalls mittels SPSS.

3. Ergebnisse

3.1. Phase I

Für jeden Probanden erhielten wir einen 24 h Wert und einen Wert pro Intervall je gemessenen Eicosanoid. Der Bezug der erhaltenen Daten auf die Körperoberfläche erfolgte aufgrund der angestrebten Vergleichbarkeit der Messdaten mit den bereits vorhandenen geltenden Normbereichsdaten (alte übliche Einheit für Prostaglandin-Bestimmung ng/h/1,73m²). Im Gegensatz dazu erfolgte die Berechnung auf das Urin-Kreatinin, um dementsprechend einen Bezugsparameter für die Spontanurinproben zu erhalten, der sowohl die Nierenfunktion als auch die Körpermasse der Probanden wiederspiegelt.

3.1.1. Zirkadiane Rhythmik

Anhand der Auftragung von Median und 10. - 90. Perzentile der einzelnen Intervalldaten jedes Prostanoids in ng/mg Kreatinin mittels Boxplots konnten keine relevanten tageszeitlichen Schwankungen erkennbar gemacht werden (Abb. Nr. 13-20). Wobei auffiel, das jeweils die morgendlichen Werte (0:00-6:00 Uhr) und die nächtlichen Werte (21:00-24:00 Uhr) einer höheren Schwankung unterlagen als die Tageswerte. Eine Ausnahme bildet das PGE-M, das über die gesamten 24 h deutliche Schwankungen aufweist. Maximal- und Minimalwerte wurden vor der Darstellung entfernt.

Abb. Nr. 13: Boxplot **PGE_2** über 24 h

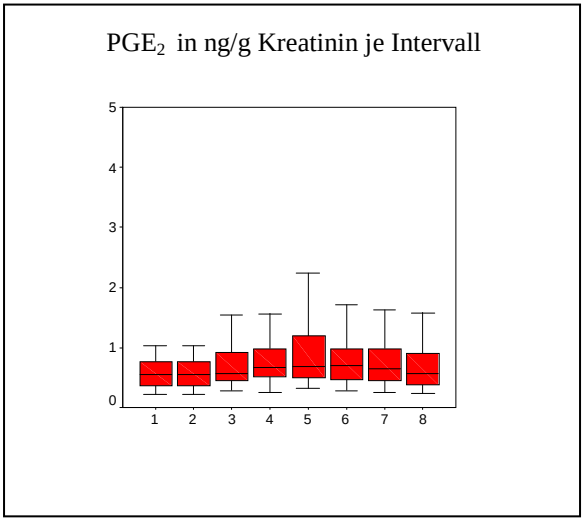


Abb. Nr. 14: Boxplot **PGE-M** über 24 h

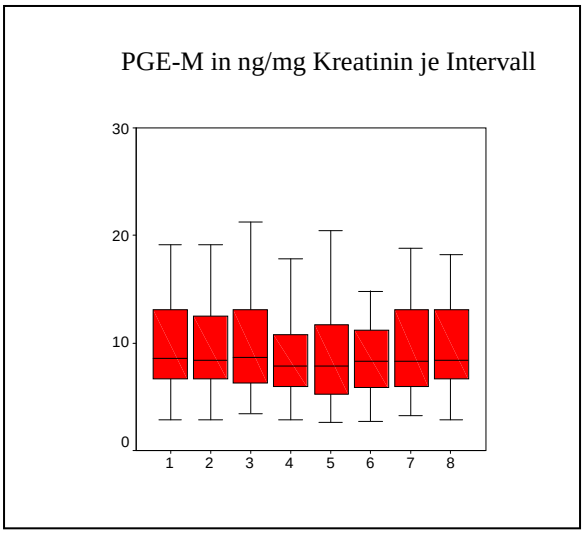


Abb. Nr. 15: Boxplot **6-keto-PGF$_{1\alpha}$** über 24 h

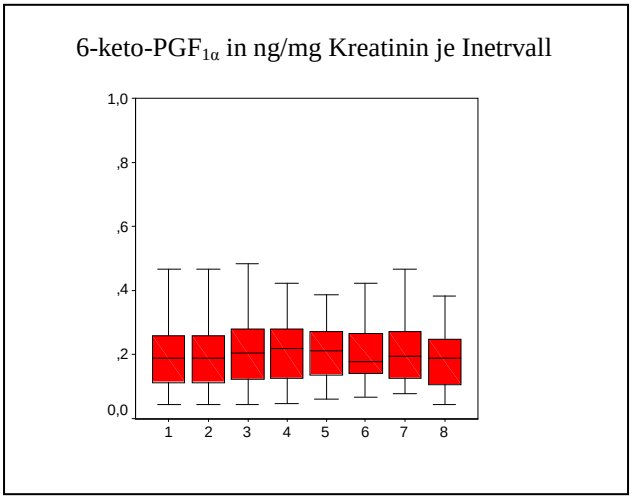


Abb. Nr.16: Boxplot **2,3-dinor-6-keto-PGF$_{1\alpha}$** über 24 h

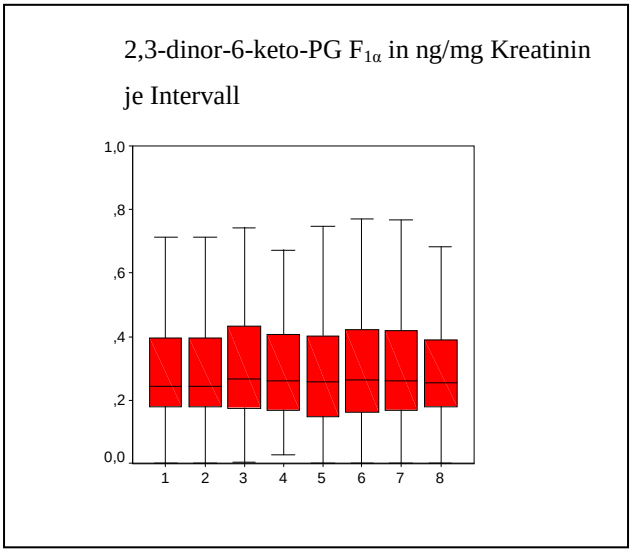


Abb. Nr. 17: Boxplot **TxB_2** über 24 h

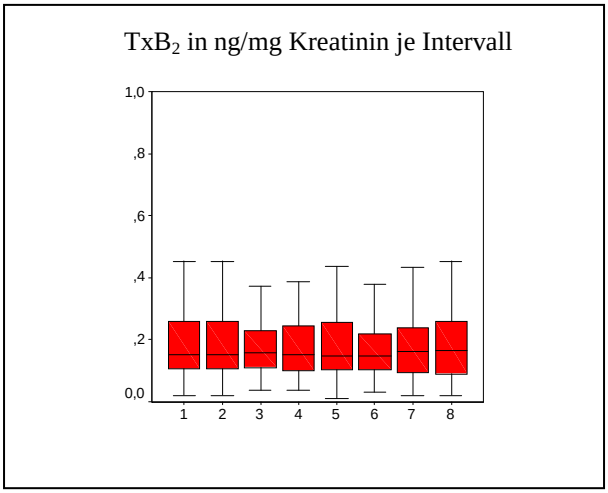


Abb. Nr. 18: Boxplot **2,3-dinor-TxB_2** über 24 h

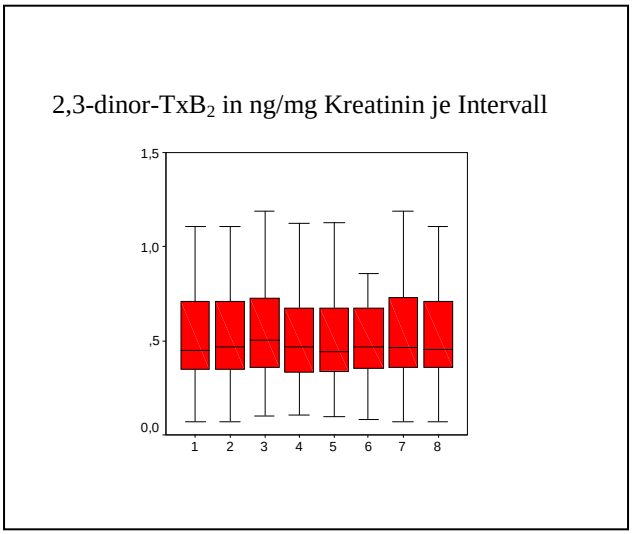


Abb. Nr. 19: Boxplot **11-dehydro-TxB_2** über 24 h

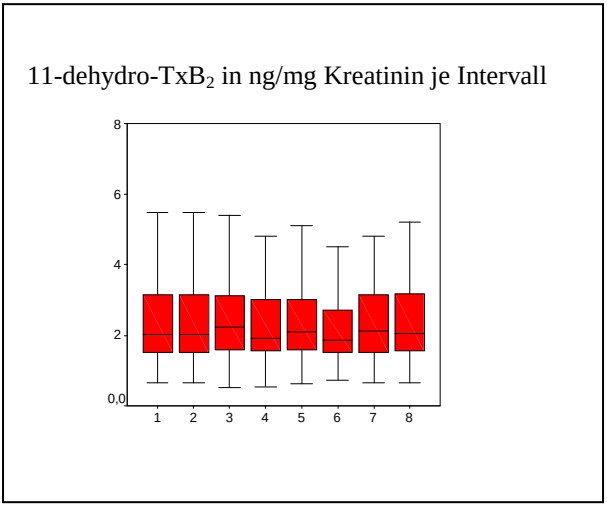
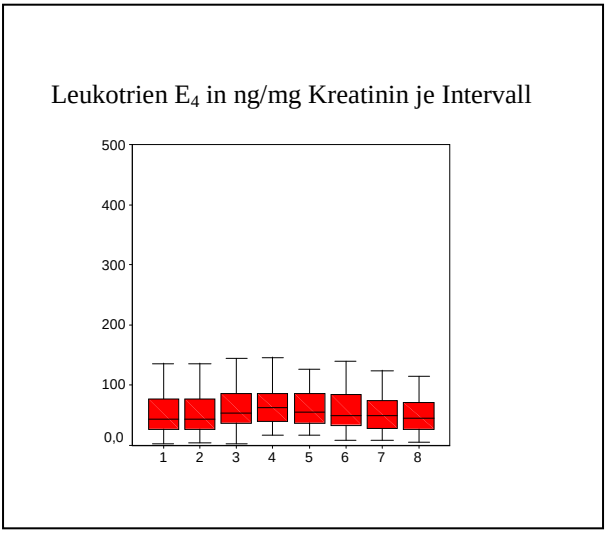


Abb. Nr. 20: Boxplot **Leukotrien E_4** über 24 h

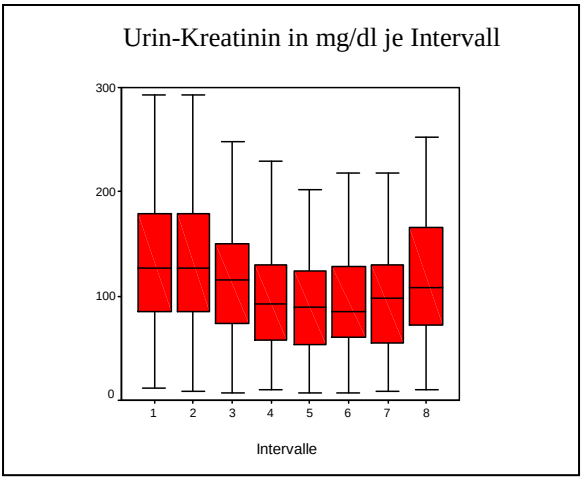


Um signifikante tageszeitliche Schwankungen statistisch zu erheben, wurde für die Werte bezogen auf Kreatinin der Friedman-Test durchgeführt. Die Berechnungen ergaben für PG E-M (p=0,08), 2,3-dinor-6-keto-$PGF_{1\alpha}$ (p=0,168) und TxB_2 (p=0,96) keine signifikanten tageszeitlichen Schwankungen. Alle weiteren untersuchten Eicosanoide wie PGE_2 (p=0,001), 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ (p=0,004), 2,3-dinor-TxB_2 (p=0,029), 11-dehydro-TxB_2 (p=0,018) und LTE_4 (p=0,001) konnte eine signifikante zirkadiane Rhythmik nachgewiesen werden. Wobei die fehlende zirkadiane Rhythmik von PGE_2, 2,3-dinor-6-keto-$PGF_{1\alpha}$ und TxB_2 erst nach Bezug auf Kreatinin hervortrat. Bei Verwendung der bisher üblichen Einheit (ng/h/1,73m^2) mit Bezug auf die Körperoberfläche konnte auch für die genannten Prostanoide eine signifikante zirkadiane Rhythmik nachgewiesen werden. Eine gegenteilige Ausnahme bildet das PGE_2, dass als einziges der untersuchten Eicosanoide die zirkadiane Rhythmik erst nach Bezug auf Kreatinin aufwies (siehe Anhang).

Die Untersuchung der Kreatininwerte in den einzelnen Intervallen ergab ebenfalls eine zirkadiane Rhythmik mittels Friedman Test. Im Verlauf der untersuchten 24 h konnte aufgezeigt werden, dass es zu einem leichten Kreatininanstieg während der nächtlichen Stunden kommt. Mit einem Peak zwischen 0:00-6:00 Uhr. Dem entgegen zeigt sich eine Abnahme der Kreatininausscheidung im Tagesverlauf relativ konstant bleibend mit einem Minimum zwischen 12:00 und 18:00 Uhr.

Bei Darstellung der Korrelation der einzelnen Urin-Kreatinin Werte je Intervall zum 24 h Wert ist erkennbar, dass alle Intervalle vergleichbar gut den 24 h Wert repräsentieren. Die beste Übereinstimmung ergibt sich allerdings im Zeitintervall zwischen 15:00 und 18:00 Uhr mit 0,795.

Abb. Nr.: 21 Boxplot **Urin-Kreatinin** über 24 h



Tab. Nr.7: Urin-Kreatinin mg/dl über 24 h und Korrelation zum 24 h Sammelurin

	Phase I	**Phase II**	**Phase I**
	Kreatinin in mg/dl 10. – 90. Perzentile	Kreatinin in mg/dl 10. – 90. Perzentile	Korrelation zum 24 h Wert
Intervall 1	45 – 218		0,622
Intervall 2	45 – 229		0,620
Intervall 3	39 – 171		0,718
Intervall 4	28 – 182	37 – 191	0,643
Intervall 5	21 – 169		0,766
Intervall 6	32 – 173		**0,795**
Intervall 7	25 – 190		0,622
Intervall 8	40 – 195		0,765
24h Wert	30 – 146		

3.1.2. Korrelation

Zur Findung eines für alle Prostanoide geeigneten Zeitintervalls zur Sammlung des Spontanurin wurde die Korrelation zwischen jedem Zeitintervall der Prostanoide in ng/mg Kreatinin zum entsprechendem 24 h Sammelurinwert in ng/h/1,73m² ermittelt (Tab. Nr. 7).

Tabelle Nr.8: Korrelation der Eicosanoid-Daten je Zeitintervall in ng/mg Kreatinin zu Eicosanoid-Daten des24 h Sammelurin in ng/h/1,73m^2

	0:00-3:00	3:00-6:00	6:00-9:00	9:00-12:00	12:00-15:00	15:00-18:00	18:00-21:00	21:00-24:00
PGE_2	0,258	0,213	0,079	0,831	**0,899**	0,415	0,312	0,250
PGE-M	0,555	0,598	0,558	0,495	0,515	0,588	0,669	**0,676**
$6kPGF_{1\alpha}$	0,878	0,939	0,300	0,884	**0,920**	0,869	0,738	0,919
$2,36kPGF_{1\alpha}$	**0,963**	0,960	0,619	0,944	0,931	0,939	0,927	0,960
TxB_2	**0,786**	0,695	0,779	0,599	0,554	0,574	0,630	0,783
$2,3TxB_2$	0,684	0,687	0,652	0,533	0,560	0,684	0,573	**0,754**
$11dhTxB_2$	0,764	0,770	0,607	0,674	0,647	0,731	0,660	**0,812**
LT E_4	0,995	0,995	**0,998**	0,977	0,996	0,996	0,995	0,995

Zeitintervall

Blau: höchste Korrelation

Gelb: Korrelation, des favorisierten Zeitintervalls

Es wird deutlich, dass der Tagesabschnitt mit der jeweils besten Korrelation für die einzelnen Prostanoide sehr unterschiedlich ist und im Einzelfall nicht für eine reale Sammlung von Spontanurinproben geeignet ist. Wobei sich für PGE_2, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ und Leukotrien E_4 eine sehr hohe Übereinstimmung zwischen gesammelten Fraktionswerten und 24 h Sammelurinwert im Zeitraum zwischen 9:00 Uhr und 12:00 befindet. Bei den restlichen Prostanoiden ergibt sich rein rechnerisch ein idealer Sammelzeitraum zwischen 21:00 Uhr und 03:00 Uhr, der in der täglichen Praxis nicht realisiert werden kann. Um sowohl eine größtmögliche Korrelation, eine geringe Streuung, als auch die Übertragung im Alltag zu gewährleisten wurde der Zeitraum zwischen 9:00 Uhr und 12:00 Uhr zur Spontanurinsammlung festgelegt. Der einerseits PGE_2, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ und Leukotrien E_4 mit einer hohen Korrelation aufweist und andererseits akzeptable Korrelationen der restlichen Prostanoide beschreibt. Eine Ausnahme bildet das PGE-M, das über die gesamten Intervalle tendenziell schlecht mit dem 24 h Sammelurinwert korreliert, was sich ebenso im gewählten Zeitraum mit einer fehlenden signifikanten Vergleichbarkeit wiederspiegelt.

Zur Überprüfung der Vorhersagegenauigkeit wurden die Eicosanoid-Daten des 24 h Wertes in ng/h/1,73m^2 gegen die Eicosanoid-Daten in ng/mg Kreatinin des favorisierten Zeitintervalls aufgetragen (Abb. Nr. 21-28). Die generell hohe Korrelation dieser Daten spiegeln sich auch in der graphischen Darstellung mittels Regressionsgeraden dar. Die größte Vorhersagegenauigkeit bietet 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ trotz der nicht idealsten Korrelation im Zeitintervall zwischen 9:00-12:00 Uhr. Dem entgegen zeigt sich bei den Daten des Leukotrien E_4 hohe Abweichungen von einer idealen Vorhersage trotz hoher ermittelter Korrelation im genannten Zeitintervall.

Abb. Nr. 22: **PGE_2** 24 h Wert in ng/h/1,73m^2 zum Zeitintervall 9:00-12:00Uhr in ng/mg Kreatinin

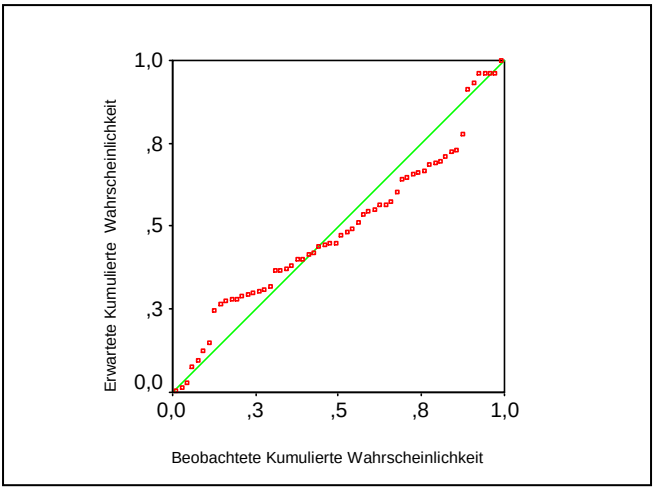


Abb. Nr. 23: **PGE-M** 24 h Wert in ng/h/1,73m^2 zum Zeitintervall 9:00-12:00 Uhr in ng/mg Kreatinin

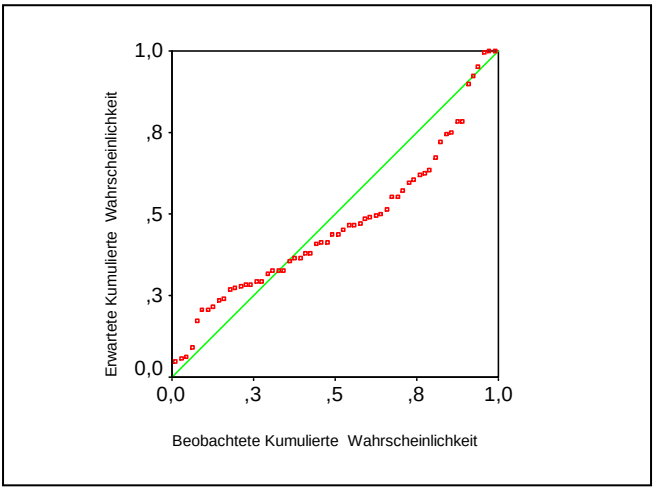


Abb. Nr. 24: **6-keto-PGF$_{1\alpha}$** 24 h Wert in ng/h/1,73m^2 zum Zeitintervall 9:00-12:00 Uhr in ng/mg Kreatinin

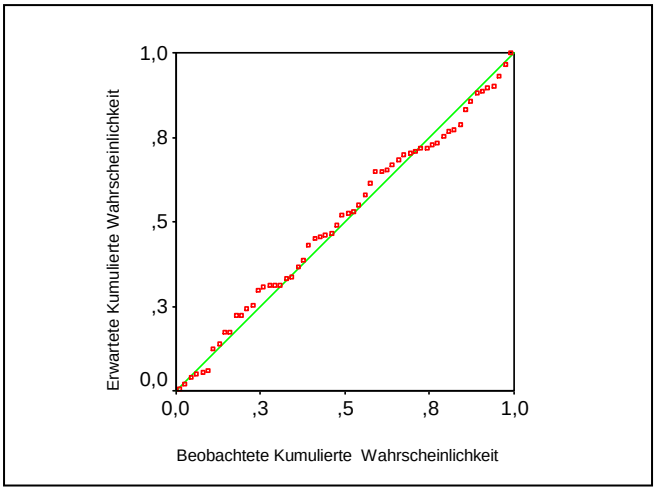


Abb. Nr. 25: **2,3-dinor-6-keto-PGF$_{1\alpha}$** 24 h Wert in ng/h/1,73m^2 zum Zeitintervall 9:00-12:00 Uhr in ng/mg Kreatinin

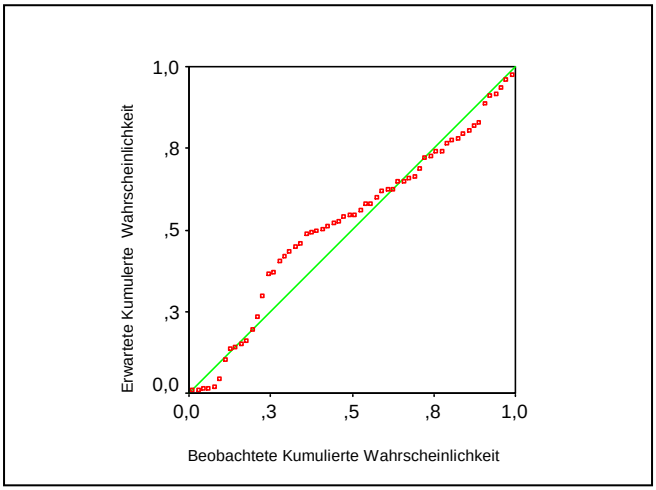


Abb. Nr. 26: **TxB_2** 24 h Wert in n/h/1,73m^2 zum Zeitintervall 9:00-12:00 Uhr in ng/mg Kreatinin

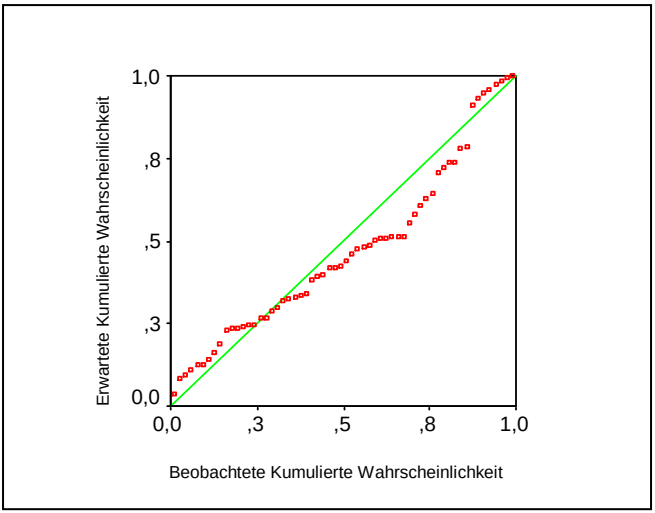


Abb. Nr. 27: **2,3-dinor-TxB_2** 24 h Wert in n/h/1,73m^2 zum Zeitintervall 9:00-12:00 Uhr in ng/mg Kreatinin

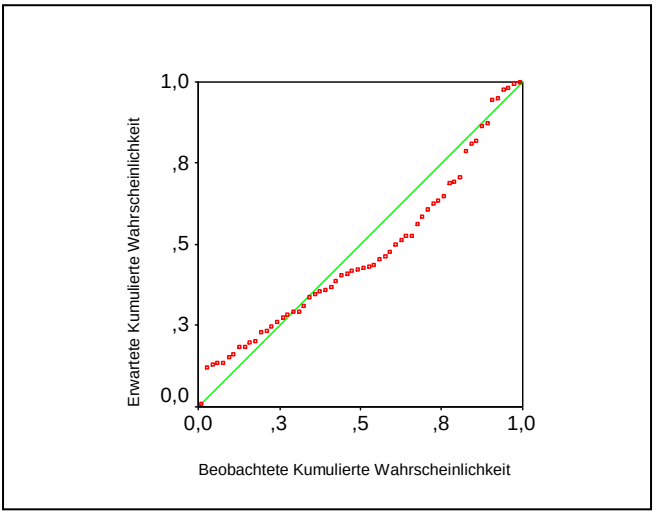


Abb. Nr. 28: **11-dehydro-TxB$_2$** 24 h Wert in n/h/1,73m^2 zum Zeitintervall 9:00-12:00 Uhr in ng/mg Kreatinin

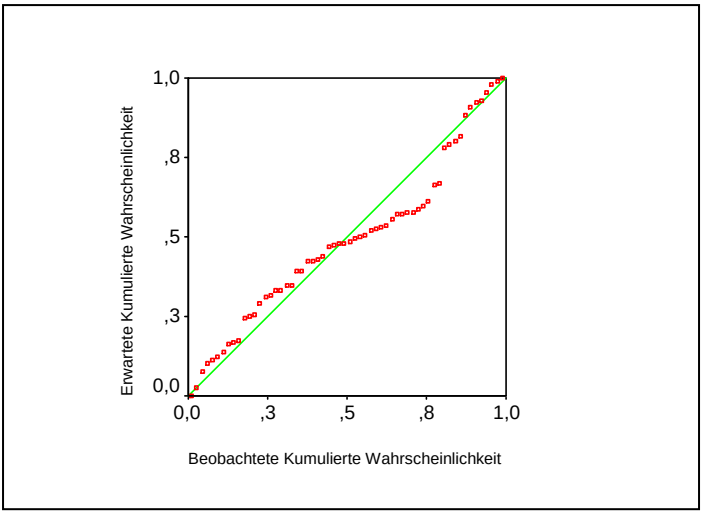
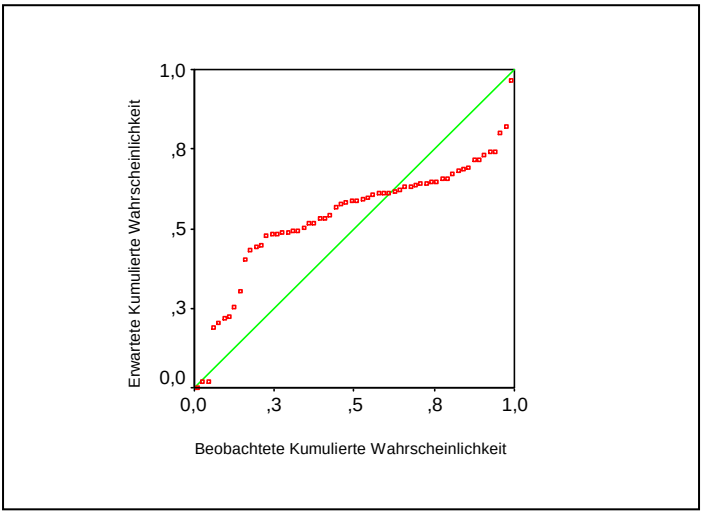


Abb. Nr. 29: **Leukotrien E$_4$** 24 h Wert in n/h/1,73m^2 zum Zeitintervall 9:00-12:00 Uhr in ng/mg Kreatinin



3.2. Phase I und II

3.2.1. Altersunterschiede

Mittels Mann-Whitney U-Test wurden die erhaltenen Eicosanoid-Daten beider Phasen auf bestehende Altersunterschiede getestet. Die Berechnung erfolgte speziell für das von uns favorisierte Sammelintervall von 9:00-12:00 in ng/mg Kreatinin als neue Bezugseinheit. Zur Auswertung der Altersunterschiede wurden zwei Altersgruppen gebildet, Altersgruppe 1 beinhaltet alle Probandendaten < 11 Jahre zum Zeitpunkt der Untersuchung und Altersgruppe 2 beinhaltet alle Probandendaten > 11 Jahre und inklusive 11 Jahre zum Zeitpunkt der Untersuchung.

Für 2,3-dinor-6-keto-$PGF_{1\alpha}$ (p=0,015), 2,3-dinor-TxB_2 (p=0,002) und 11-dehydro-TxB_2 (p= 0,00) ergaben sich signifikante Altersunterschiede in der verwendeten Datenreihe. Bei den übrigen Prostanoiden konnten statistisch keine signifikanten Altersunterschiede gefunden werden. Zum Vergleich mit den aktuell gültigen Referenzwerten in ng/h/1,73m^2 im 24 h Sammelurin wurden auch die Eicosanoid-Daten der Phase I in genannter Einheit des 24 h Wertes auf Altersunterschiede getestet. Dort ergaben sich in denen von uns definierten Altersgruppen keine signifikanten Unterschiede. Allerdings konnten in Phase I im 24 h Wert in ng/mg Kreatinin für 2,3-dinor-6-keto-$PGF_{1\alpha}$ (p=0,047) und 11-dehydro-TxB_2 (p=0,049) grenzwertig signifikante Altersunterschiede dargestellt werden. Die erhaltenen Urin-Kreatinin-Daten in mg/dl wurden ebenfalls auf vorhandene Altersunterschiede mittels Mann-Whitney U-Test überprüft. Die statistische Analyse ergab für die Kreatinin-Daten im 24 h Sammelurin keinen signifikanten Altersunterschied (p=0,15). Die Testung der einzelnen

Intervalldaten für Kreatinin ergab lediglich für das Zeitintervall zwischen 15:00- 18:00 Uhr eine Signifikanz (p=0,047).

3.2.2. Geschlechtsunterschiede

Zur Untersuchung eventuell vorhandener Geschlechtsunterschiede wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Entsprechend der Berechnungen für die Altersunterschiede wurde auch hier das entsprechende Sammelintervall der Eicosanoide in ng/mg Kreatinin herangezogen. Für alle untersuchten Eicosanoide konnten in diesem definierten Bereich keine signifikanten Geschlechtsunterschiede ermittelt werden. In weiteren Berechnungen der 24 h Werte ergab sich ausschließlich für 2,3-dinor-6-keto-$PGF_{1\alpha}$ (p=0,025) in ng/h/1,73m^2 ein signifikanter Geschlechtsunterschied.

Bei der Untersuchung der Kreatinindaten in mg/dl ergaben sich weder für den 24 h Sammelurinwert noch für die einzelnen Intervalldaten signifikante Altersunterschiede.

3.2.3. Normwertbestimmung

Zur Errechnung der Normwerte wurden die erhaltenen Daten der untersuchten Prostanoide bezogen auf Kreatinin im gesammelten Zeitintervall von 9:00-12:00 Uhr für beide Phasen zusammengeführt und mittels deskriptiver Statistik (Minimum, Maximum, Mittelwert) ausgewertet. Für die Eicosanoid-Metaboliten mit ermitteltem signifikanten

Altersunterschied wurden die Normwerte jeweils für beide definierten Altersbereiche bestimmt (Tab. Nr. 8-10).
Der Normwertbereich wurde im Bereich der 10. - 90. Perzentile definiert.

Tabelle Nr. 9: Normwertberechnung der altersunabhängigen Eicosanoide

	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard Abweichung	10. Perzentile	90. Perzentile
PGE_2	0,17	8,83	1,0729	1,189	0,40	2,07
PGE-M	2,34	43,44	9,9257	6,782	4,74	18,01
6-keto-$PG-F_{1\alpha}$	0,00	1,80	0,2149	0,200	0,06	0,38
TxB_2	0,00	0,51	0,1546	0,09861	0,05	0,29

(Eicosanoid-Daten bezogen auf Kreatinin mg/dl im Intervall 9:00-12:00 Uhr)

Somit ergeben sich für die altersunabhängigen Eicosanoide folgende Normwertbereiche:

PGE_2:	**0,40 - 2,07**	**ng/mg Kreatinin**
PGE-M:	**4,74 - 18,01**	**ng/mg Kreatinin**
6-keto-$PGF_{1\alpha}$:	**0,06 - 0,38**	**ng/mg Kreatinin**
TxB_2:	**0,05 - 0,29**	**ng/mg Kreatinin**

Tabelle Nr. 10: Normwerte der altersabhängigen Eicosanoide für Alterstufe 1

	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard Abweichung	Perzentile 10.	Perzentile 90.
2,3-dinor-6-keto-$PGF_{1\alpha}$	0,00	1,52	0,45	0,28	0,13	0,85
2,3-dinor-TxB_2	0,20	2,00	0,70	0,39	0,32	1,23
11-dehydro-TxB_2	0,67	11,33	2,86	1,73	1,40	5,10
Leukotrien E_4	0,01	1881,85	64,0	239,66	0,02	107,7

(Eicosanoid-Daten bezogen auf Kreatinin mg/dl im Intervall 9:00-12:00 Uhr)

Somit ergeben sich folgende Normwertbereiche für die altersabhängigen Eicosanoide im Altersbereich < 11 Jahre.

2,3-dinor-6-keto-$PGF_{1\alpha}$: 0,13- 0,85ng/mg Kreatinin

2,3-dinor-TxB_2: 0,32 - 1,23 ng/mg Kreatinin

11-dhydro-TxB_2: 1,40 - 5,10 ng/mg Kreatinin

Leukotrien E_4: 0,02 - 107,7 ng/mg Kreatinin

Tabelle Nr. 11: Normwerte der altersabhängigen Eicosanoide für Alterstufe 2

	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard Abweichung	Perzentile 10.	Perzentile 90.
2,3-dinor-6-keto-$PGF_{1\alpha}$	0,04	3,24	0,40	0,46	0,12	0,80
2,3-dinor-TxB_2	0,08	2,24	0,52	0,32	0,26	0,82
11-dehydro-TxB_2	0,48	8,07	1,97	1,20	0,82	3,27
Leukotrien E_4	0,02	295,86	41,58	51,59	0,04	91,5

(Eicosanoid-Daten bezogen auf Kreatinin mg/dl im Intervall 9:00-12:00 Uhr)

Somit ergeben sich folgende Normwertbereiche für die altersabhängigen Eicosanoide im Altersbereich > 11 Jahren:

2,3-dinor-6-keto-$PGF_{1\alpha}$: 0,12 - 0,80 ng/mg Kreatinin
2,3-dinor-TxB_2: 0,26 - 0,82 ng/mg Kreatinin
11-dhydro TxB_2: 0,82 - 3,27 ng/mg Kreatinin
Leukotrien E_4: 0,04 - 91,5 ng/mg Kreatinin

Trotz statistisch nachgewiesener signifikanter Altersunterschiede sind die Normwertbereiche der altersabhängigen Eicosanoide vergleichbar. Erkennbar wird, dass mit Ausnahme des Leukotrien E_4, die Normwerte der Altersgruppe 2 niedriger sind als in Altersgruppe 1.

4. Diskussion

In der durchgeführten Studie wurde die Ausscheidung von primären Eicosanoiden und deren Metaboliten im Urin von insgesamt 119 gesunden Kindern und Jugendlichen im Alter von 1 bis 17 Jahren mittels GC-MS-MS bestimmt, mit dem Ziel Normwerte bezogen auf Kreatinin in einer einzigen Spontanurinprobe zu ermitteln.

In der ersten Phase sammelten insgesamt 60 Probanden in häuslicher Umgebung fraktioniert einen 24 h Sammelurin. Die fraktionierte Urinsammung gestaltete sich bei Kleinkindern unter drei Jahren bzw. Kindern die noch nicht "trocken" waren als äußerst schwierig. Selbst bei einer Mindestanforderung von drei Urinfraktionen innerhalb der untersuchten 24 Stunden, konnte nicht sicher gestellt werden, dass die Urinsammlung in diesen Fällen vollständig war. Da kein Proband unter klinischen Bedingungen bzw. aufgrund klinischer Indikation Urin sammelte, konnte auf die Methode der Urinsammlung mittels geklebtem Urinbeutel bzw. Urinkatheter bei Kleinkindern und Säuglingen nicht zurückgegriffen werden. Somit ist die Altersgruppe zwischen 0-3 Jahren nur mit zwei Probanden in Phase I vertreten. Dies verdeutlicht die nicht alltagstaugliche und oft unpräzise Methode der 24 h Urinsammlung in häuslicher Umgebung vor allem bei Kleinkindern bis drei Jahren [34,35,37,41,52]. Gleiche Ergebnisse in bezug auf die 24 h Sammlung brachte die Untersuchung von Stanley Hellerstein et al. 2001, welche signifikante Unterschiede bei der Messung von Kreatinin im Urin fanden, im Vergleich von häuslicher Sammlung und Sammlung in klinischer Umgebung [18]. Nicht zuletzt deswegen liegt die Präferenz bei Kindern auf

der Untersuchung von Spontanurinproben mit Bezug auf Kreatinin [52]. Da das Sammeln einer Spontanurinprobe bei Kindern dieser Altersklasse ebenso schwierig sein kann, wird diese Möglichkeit jedoch ebenfalls kontrovers diskutiert. Es muss davon ausgegangen werden, dass bei Kindern dieser Altersklasse am aussagekräftigsten die Sammlung von 24 h Sammelurin in klinischer Umgebung mittels Urinkatheter bzw. geklebtem Urinbeutel ist. Da dieses Vorgehen eine hohe Belastung aufgrund der Invasivität und nötigem Krankenhausaufenthalt darstellt, besteht aktuell ein wissenschaftlicher Bedarf an alternativen Untersuchungsmethoden des Urins bei Kindern [52].

In der zweiten Phase wurde von insgesamt 59 Probanden lediglich ein Spontanurin im Zeitraum zwischen 9:00-12:00 gesammelt.

Kreatinin entsteht als Endprodukt aus den intrazellulären Vorstufen Kreatin und Phosphokreatin des Muskelstoffwechsels durch nicht enzymatische Dehydration. Unter stabilen Ernährungsgewohnheiten und normaler Nierenfunktion wird Kreatinin ausschließlich glomerulär filtriert und weder tubulär sezerniert noch rückresorbiert. Bis zu 98% des renal ausgeschiedenen Kreatinins stammt aus der Muskelmasse des Körpers. Diese Begebenheiten ermöglichen anhand der Kreatininausscheidung sowohl Rückschlüsse auf die Nierenfunktion, als auch die Konstitution der Probanden [18,34,37,44,58]. Aufgrund dieser Eigenschaften hat sich Kreatinin als Bezugsgröße bei Normwertbestimmungen für renal ausgeschiedene Substanzen in vielen klinischen Studien bewährt [10,34,41,43,57,61]. Die Kreatininausscheidung unterliegt ferner zahlreichen internen und externen Einflüssen, die unter Umständen ausgeprägte interindividuelle Schwankungen hervorrufen [2,58,60]. Neben nachgewiesenen Altersunterschieden, mit steigender Kreatininausscheidung bei zunehmendem Alter aufgrund der sich verändernden

Körpermuskelmasse, können vor allem Ernährungsgewohnheiten mit hohem Proteinanteil und extreme körperliche Aktivität die Kreatininausscheidung erhöhen [3,5,17,18,32,34,37,43,58,60,61]. Ebenso haben vorliegende Infektionen, Fieber, Einschränkungen der Nierenfunktion und zahlreiche Medikamente Einfluss auf die Kreatininausscheidung. Diese Faktoren wurden daher bei den Probanden dieser Studie erfragt und als Ausschlusskriterien festgelegt [34]. Trotz der beschriebenen Interferenzen wurde in zahlreichen Studien, vor allem bei stabilen Ernährungsgewohnheiten und gleichbleibender körperlicher Aktivität, die Aussagkraft von Kreatinin als Bezugsparameter bestätigt. Bei gleichbleibenden Gewohnheiten kann die Varianz der Kreatininausscheidung vernachlässigt werden [3,34,35,43,61]. In der Studie wurde bewusst auf eine vorgegebene Diät bzw. Einschränkungen der üblichen körperlichen Aktivitäten verzichtet, um das Ziel eines einfachen, alltagstauglichen und praktikablen diagnostischen Mittels zu forcieren. Eine gesonderte Ausnahme bilden Neugeborene in den ersten Lebenswochen bei denen eine besonders ausgeprägte Varianz der Kreatininausscheidung mehrfach beschrieben wurde. Aufgrund zusätzlicher Faktoren wie z.B. mütterliches Kreatinin und noch nicht voll ausgereifter Nierenfunktion eignet sich bei diesen Probanden Kreatinin nicht als Referenzparameter [31,35,55]. Ebenfalls konnte das Vorliegen von Altersunterschieden der Kreatininausscheidung bei fehlenden signifikanten Geschlechtsunterschieden auch in unserer Studie bestätigt werden [54,56,57,58,59].

Bei weiblichen Probanden wurde eine vernachlässigbare Schwankung in der Kreatininausscheidung während des Menstruationszyklusses beschrieben [40], so dass aufgrund fehlender Geschlechtsunterschiede unserer Kreatinindaten diese Betrachtungsweise vernachlässigt wurde. Mit

Ausnahme von Kindern bis zu drei Lebensjahren ergibt sich auch aus unserer Untersuchung die Anwendbarkeit von Kreatinin als Bezugsgröße für Spontanurinproben. Besonders die hohe Korrelation zwischen den Eicosanoid-Daten des 24 h Sammelurin in ng/h/1,73m^2 und den Eicosanoid-Daten im Spontanurin bezogen auf Kreatinin bestätigt uns in der Aussagekraft der erhobenen Normalwerte in neuer Bezugseinheit.

Zur Findung eines geeigneten Sammelzeitraumes für die Spontanurinproben wurde zunächst ein 24 h Sammelurin fraktioniert gesammelt. Im Gegensatz zu anderen klinischen Studien wurde bei dieser Untersuchung gezeigt, das einige Eicosanoide signifikant vom errechneten 24 h Sammelurinwert abweichen und somit eine zirkadiane Rhythmik vermutet werden muss. Im Gegensatz zur Untersuchung von Wennmalm et al. 1992**,** bei der keine zirkadiane Rhythmik für die renale Ausscheidung von Eicosanoid-Metaboliten aufgezeigt hat, wurde in dieser Studie eine zirkadiane für Leukotrien E_4 ($p = 0{,}001$), PGE_2 ($p = 0{,}001$), 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ ($p = 0{,}004$), 2,3-dinor-TxB_2 ($p = 0{,}029$) und 11-dehydro-TxB_2 ($p = 0{,}018$) jeweils bezogen auf Kreatinin nachgewiesen. Allerdings untersuchte diese Studie nur insgesamt 15 Probanden auf und es worden Metaboliten des TxA_2 untersucht. Der einzige in beiden Studien untersuchte Metabolit ist 2,3-dinor-6-keto-$PGF_{1\alpha}$ der sowohl in unserer Studie, als auch bei der Untersuchung von Wennmalm et al. 1992 keine zirkadiane Rhythmik aufwies [62]. Die nachgewiesene signifikante tageszeitliche Schwankung der Urinkreatininausscheidung wurde schon in früheren Studien belegt. Allerdings wurde bei unserer Studie eine nächtliche Erhöhung nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde bei der Untersuchung von Hellerstein et al. 2001 eine nächtliche Reduktion der Kreatininausscheidung nachgewiesen [18]. In der Studie von Erwachsenen Indern konnte ebenso

eine zirkadiane Rhythmik für die Kreatininausscheidung mit einem Peak um 15:00-18:00 Uhr nachgewiesen werden [53]. Allerdings beruhen diese Daten auf Urin-Sammelintervalle von 6 Stunden und zum Vergleich wurden keine Probanden unter 16 Jahren untersucht. Somit kann ein idealer Zeitpunkt zur Gewinnung einer Spontanurinprobe zur Ermittlung der Eicosanoide nicht angegeben werden. Eine jedoch hohe Korrelation der einzelnen Fraktionswerte zum 24 h Wert lässt den zweiten Morgenurin im Zeitraum zwischen 9:00-12:00 aus verschiedenen Gründen als geeignet erscheinen [8,9,10,33,63]. Dieser Zeitraum hat im Gegensatz zum ersten Morgenurin mit zum Teil erheblichen divergierenden Sammelstunden über Nacht, je nach Miktionsfrequenz der Probanden, einen überschaubaren Sammelzeitraum über maximal sechs Stunden. Die diätetischen und körperlichen Einflüsse auf die Eicosanoid- und Kreatinin-Ausscheidung sind in diesem Zeitraum begrenzt. Nicht außer acht zu lassen ist vor allem die hohe Praktikabilität im Alltag in diesem Zeitraum unter klinischen oder ambulanten Bedingungen als Methode der Wahl für die Gewinnung einer Urinprobe bei zu diagnostizierenden oder im Verlauf zu kontrollierenden Patienten.

Viele Studien die sich ebenso mit renal ausgeschiedenen Substanzen beschäftigten, haben die Problematik des Vergleiches von der Erhebung eines 24 h Sammelurin und einer Spontanurinprobe mit entsprechender Bezugsgröße beschäftigt [8,9,10] Allen behaftet ist eine fehlende endgültige Aussage zum eindeutigen Beweis der Aussagekraft von Spontanurinproben. In den meisten Untersuchungen konnte allerdings gezeigt werden, das Spontanurinproben mit geeigneter Bezugsgröße durchaus aussagkräftig sind. Große intraindividuelle Schwankungen hervorgerufen durch Flüssigkeitshaushalt und Miktionsfrequenz mindern die Wertigkeit von

Spontanurinproben im Vergleich zum 24 h Sammelurin, vor allem bei Substanzen bei denen eine zirkadiane Rhythmik sicher nachgewiesen ist oder nicht sicher auszuschließen ist [24,25]. Allerdings im Wissen um einen geeigneten Sammelzeitraum sind die Werte anwendbar und aussagekräftig. Der Bezug auf Kreatinin korreliert signifikant mit dem 24 h Sammelurin bei renal ausgeschiedenen Substanzen und ist eine geeignete Bezugsgröße im Spontanurin [34,37,61,63]. Bei einigen Studien konnte der Einfluss von zirkadianer Rhythmik mit Bezug auf Kreatinin vermindert werden [23,24,25,28,33]. Dem entgegen stehen ebenso Studien mit speziellen Fragestellungen, wo eindeutig gezeigt werden konnte, das der Bezug auf Kreatinin kein geeigneter Ersatz für 24 h Sammelurin ist [38]. Eine anhand unserer Studiendaten vorliegende hohe Korrelation zwischen 24 h Sammelurinproben und Spontanurinproben, erlaubt die Vermutung dass bei Bezug auf Kreatinin die Aussagekraft von einzelnen Urinproben zur Bestimmung der Eicosanoid-Ausscheidung im klinischen Alltag signifikant ist.

Die bisher geltenden Normwerte für Eicosanoide beziehen sich auf die Sammlung von 24 h Urin und werden in der Einheit ng/h/1,73m^2 angegeben. Die Normwerte werden als Perzentilen angegeben, da renal ausgeschiedenen Substanzen eine höhere Variabilität vorweisen, als im Blut untersuchte Substanzen. Um die Methodik unserer verwendeten Analytik bzw. die Aussagekraft unserer erhobenen Daten zu verifizieren haben wir unsere Eicosanoid-Daten mit den aktuell gültigen Referenzwerten verglichen.

Tab. Nr.12: Eicosanoid-Referenzwerte in ng/h/1,73m^2 10. – 90. Perzentile

	Gültige Referenzwerte 24h Sammelurin	Studiendaten 24h Sammelurin
PGE_2	4-27	14-54
TxB_2	1-21	3-15
2,3-dinor-TxB_2	8-36	11-35
2,3-dinor-6-keto-$PGF_{1\alpha}$	4-19	4-22
11-dehydro-TxB_2	15-87	48-152
PGE-M < 30 Tage	110-1140	
PGE-M > 30 Tage	62-482	194 -616
6-keto-$PGF_{1\alpha}$ < 30 Tage	7-23	
6-keto-$PGF_{1\alpha}$ > 30 Tage	2-12	4-18

Es zeigt sich nicht nur eine eindeutige Bestätigung der bisher gültigen Referenzwerte, sondern ebenfalls die Aussagekraft unserer Studiendaten. Die erkennbaren Abweichungen sind sehr wahrscheinlich auf die unterschiedliche Alterszeitspanne der Probanden zurückzuführen. In ersterer Studie zur Erhebung der aktuellen Referenzwerte wurden Probanden im Alter von einem Tag bis zu 37 Jahren einbezogen [19].

In dem für uns favorisiertem Zeitintervall zwischen 9:00-12:00 Uhr in der Einheit ng/mg Kreatinin wurden für die definierten Altersbereiche signifikante Altersunterschiede für 2,3-dinor-6-keto-$PGF_{1\alpha}$, 2,3-dinor-TxB_2 und 11-dehydro-TxB_2 ermittelt. Allerdings sind diese Altersunterschiede im

24 h Sammelurin mit Bezug auf die Körperoberfläche (ng/h/1,73m^2) nicht nachzuweisen. Möglicherweise handelt es sich dabei um einen Einfluss der altersabhängigen Kreatininausscheidung ist. Dem entgegen konnten keine Altersunterschiede für PGE_2, PGE-M, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ und Leukotrien E_4 beschrieben werden. Ein vergleichbares Ergebnis wurde bei der Untersuchung zur Normwerterhebung von Elektrolytausscheidungen im Urin bezogen auf Kreatinin beschrieben [20]. Diese Untersuchung betrachtete ausschließlich weibliche Erwachsene Probanden, bei denen ebenfalls erst nach Bezug auf Kreatinin statistisch signifikante Altersunterschiede nachzuweisen waren.

Bei Erhebung von Referenzwerten im 24 h Sammelurin bei Neugeborenen wurden Altersunterschiede für die Eicosanoid-Metaboliten 2,3-dinor-TxB_2 und 11-dehydro-TxB_2 in ng/h/1,73m^2 gefunden [19]. Zu gleichen Ergebnissen kam eine Studie zur Erhebung von Referenzwerten für die renale Eicosanoid-Ausscheidung bei Kindern. In dieser Studie waren Probanden eingeschlossen im Altersbereich von einem Tag bis 37 Jahren [31]. Die Bestimmung der Eicosanoide erfolgte im 24 h Sammelurin mit Bezug auf die Körperoberfläche. Es konnten signifikante Altersunterschiede für 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ und für PGE-M aufgezeigt werden. Diese Altersunterschiede zeigten sich bei uns nicht. Allerdings kann dieser Einfluss auf eine altersabhängige Eicosanoidausscheidung nicht weiter verifiziert werden, da in unserer Studie keine Probanden unter einem Jahr einbezogen wurden. Da Altersunterschiede in der Eicosanoidausscheidung aufgrund steigender Enzymkapazität im COX-System während der postnatalen Phase als gesichert gelten und ein rein rechnerischer Einfluss der zunehmenden Kreatininausscheidung als Ursache der ermittelten Altersunterschiede zu vermuten ist, können unsere Referenzwerte im Spontanurin nicht für Säuglinge empfohlen werden [19,31]. Weder in

unserer noch in anderen Studien konnten statistisch signifikante Geschlechtsunterschiede für die Eicosanoid-Ausscheidung ermittelt werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei renal ausgeschiedenen Substanzen, nachdem die Daten auf Kreatinin bezogen wurden [16]. Ebenso wurden bisher keine Unterschiede bei der Eicosanoid-Ausscheidung bei Frauen während des Menstruationszyklusses beschrieben [11,31].

Von bedeutender Relevanz zur Erhebung von Referenzwerten für die renale Ausscheidung von Eicosanoiden sind neben einer gesunden Nierenfunktion ebenso das Fehlen von Faktoren, welche die Eicosanoid-Ausscheidung beeinflussen. Die Möglichkeit zur Ermittlung dieser definierten Ausschlusskriterien blieb auf eine Befragung der Probanden beschränkt.
Bisher gibt es Versuche, die Eicosanoid-Ausscheidung im Urin als Konzentration mit Bezug auf die Körperoberfläche bezogen auf Kreatinin oder auf die Kreatininclearance zu beschreiben. Die renale Eicosanoid-Ausscheidung wird allerdings schon allein durch die Urinausscheidung selbst beeinflusst, die wiederum von verschiedenen Faktoren wie dem totalen Körperwasser, dem Hydratationszustand, der Flüssigkeitszufuhr und dem Wirken von Eicosanoiden beeinflusst ist. Somit kann die Darstellung von Eicosanoid- Referenzwerten im Urin selbst, trotz der vorherrschenden erhöhten Aussagekraft gegenüber der Aktivitätsbestimmung im Blut, als optimale Methode diskutiert werden [22,31]. Das gleiche gilt für Kreatinin als Bezugsparameter zur Referenzwerterhebung. Schwankungen in der Kreatinin-Ausscheidung mit Vortäuschung eines zirkadianen Rhythmus können aufgrund fehlender Einschränkungen des Alltagslebens der Probanden hervorgerufen worden sein, da sowohl körperliche Aktivität und eine proteinreiche Nahrung die Kreatinin-Ausscheidung verändern. Schlussfolgernd muss betont werden, dass ebenso die ermittelten

Altersunterschiede in der Eicosanoid-Ausscheidung auf einen Kreatinineinfluss zurück zuführen sein können.

Bei vor allem häuslicher Sammlung des fraktionierten 24 h Urin fehlt die Kontrolle sowohl einer vollständigen Urinsammlung als auch der vom Probanden angegebenen Sammelintervalle, mit der Möglichkeit einer unzureichenden Darstellung bzw. Ermittlung des geeigneten Sammelintervalls zur Sammlung der Spontanurinprobe.

Zusammenfassend haben wir altersabhängige Normwertbereiche im Spontanurin für die Eicosanoid-Ausscheidung bei Kindern ermittelt. Unter Einbeziehung von Kreatinin und Definition eines bestimmten Sammelzeitraumes erlauben sie die diagnostische Eicosanoid Bestimmung im Spontanurin. Die erhaltenen Referenzwerte können erst bei Kindern ab dem dritten Lebensjahr mit ausreichender Aussagekraft verwendet werden. Als überaus geeignetes und nicht invasives diagnostisches Mittel können die erhobenen Referenzwerte in der alltäglichen Praxis zur Diagnostik und Therapiekontrolle eingesetzt werden. Die endgültige Positionierung von Eicosanoid-Normwerten im Spontanurin mit Bezug auf Kreatinin müssen durch den klinischen Einsatz unter wissenschaftlicher Betrachtungsweise verifiziert werden.

5. Zusammenfassung

Eicosanoide sind natürliche hormonähnliche Substanzen, die in ihrer Struktur geringfügig variieren und chemisch gesehen Derivate der Arachidonsäure sind. Prostaglandine und Leukotriene als Metabolite der Arachidonsäure, spielen bei den unterschiedlichsten physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen eine entscheidende Rolle in unserem Organismus. Referenzwerte, welche die endogene Synthese von Eicosanoiden wiederspiegeln, haben neben diagnostischer Relevanz einen hohen Stellenwert für Therapiekontrollen unterschiedlichster Krankheitsbilder, bei denen eine Veränderung der Eicosanoid-Synthese vorliegt oder vermutet wird. Die bisher verwendeten Referenzwerte für Kinder, in ng/h/1,73m^2, beziehen sich ausschließlich auf Messmethoden, bei denen es notwendig ist, den Urin über 24 h zu sammeln. Mit dem Ziel Normwerte bezogen auf Kreatinin in einer einzigen Spontanurinprobe zu ermitteln, wurde in der durchgeführten Studie die Ausscheidung von primären Eicosanoiden und deren Metaboliten im Urin von insgesamt 119 gesunden Kindern und Jugendlichen im Alter von 1 bis 17 Jahren mittels GC-MS-MS bestimmt. In der ersten Phase der Studie wurde bei insgesamt 60 Probanden die Eicosanoid-Ausscheidung eines fraktioniert gesammelten 24 h Urin bestimmt. Die Eicosanoid-Daten in ng/mg Kreatin zeigten keine signifikanten tageszeitlichen Schwankungen für PGE-M (p=0,08), 2,3-dinor-6-keto-$PGF_{1\alpha}$ (p=0,168) und TxB_2 (p=0,96). Allen weiteren untersuchten Eicosanoide wie PGE_2 (p=0,001), 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ (p=0,004), 2,3-dinor-TxB_2 (p=0,029), 11-dehydro-TxB_2 (p=0,018) und LTE_4 (p=0,001)

konnte eine signifikante zirkadiane Rhythmik nachgewiesen werden. Eine Korrelationsanalyse zwischen jedem Zeitintervall der Prostanoide in ng/mg Kreatinin zum entsprechendem 24 h Sammelurinwert in ng/h/1,73m² diente der Findung eines für alle Prostanoide geeigneten Zeitintervalls zur Sammlung des Spontanurin. Der Zeitraum zwischen 9:00 Uhr und 12:00 Uhr wurde bei generell hoher Korrelation und einfacher Anwendbarkeit im Alltag zur Spontanurinsammlung festgelegt. In der zweiten Phase wurde von insgesamt 59 Probanden lediglich ein Spontanurin im Zeitraum zwischen 9:00-12:00 Uhr gesammelt und die Eicosanoid-Ausscheidung bestimmt. Mittels Kruskal-Wallis-Test konnten für alle Eicosanoid-Daten (Phase I und II) in ng/mg Kreatinin im favorisiertem Zeitintervall keine signifikanten Geschlechtsunterschiede ermittelt werden. Zur Auswertung von Altersunterschieden wurden zwei Altersgruppen gebildet (Altersgruppe 1 < 11 Jahre, Altersgruppe 2 > 11 Jahre) und mittels Mann-Whitney U-Test die Eicosanoid-Daten in ng/mg Kreatinin (Phase I und II) im favorisierten Zeitintervall untersucht. Für 2,3-dinor-6-keto-$PGF_{1\alpha}$ (p= 0,015), 2,3-dinor-TxB_2 (p= 0,002) und 11-dehydro-TxB_2 (p= 0,00) ergaben sich signifikante Altersunterschiede in der verwendeten Datenreihe. Bei den übrigen Prostanoiden konnten statistisch keine signifikanten Altersunterschiede gefunden werden. Die Referenzwerte der untersuchten Eicosanoide in ng/mg Kreatinin im Spontanurin wurden aus beiden Phasen im Zeitintervall 9:00-12:00 Uhr ermittelt und als 10.-90. Perzentile angegeben. Referenzwerte altersunabhängige Eicosanoide: PGE_2: 0,40 - 2,07 ; PGE-M: 4,74 – 18,01 ; 6-keto-$PGF_{1\alpha}$: 0,06 - 0,38 ; TxB_2: 0,05 - 0,29. Referenzwerte altersabhängige Eicosanoide für die Altersgruppe 1: 2,3-dinor-6-keto-$PGF_{1\alpha}$: 0,13 - 0,85 ; 2,3-dinor-TxB_2: 0,32 - 1,23; 11-dhydro-TxB_2: 1,40-5,10 ; Leukotrien E_4: 0,02-107,7. Referenzwerte altersabhängige Eicosanoide für Altersgruppe 2: 2,3-dinor-6-keto-$PGF_{1\alpha}$: 0,12 - 0,80 ; 2,3-dinor-TxB_2: 0,26 -

0,82 ; 11-dhydro-TxB_2: 0,82 - 3,27 ; Leukotrien E_4: 0,04-91,5. Es wurden altersabhängige Normwertbereiche im Spontanurin für die Eicosanoid-Ausscheidung bei Kindern ermittelt. Unter Einbeziehung von Kreatinin und Definition eines bestimmten Sammelzeitraumes erlauben sie die diagnostische Eicosanoid Bestimmung im Spontanurin. Die erhaltenen Referenzwerte können erst bei Kindern ab dem dritten Lebensjahr mit ausreichender Aussagekraft verwendet werden. Als überaus geeignetes und nicht invasives diagnostisches Mittel können die erhobenen Referenzwerte in der alltäglichen Praxis zur Diagnostik und Therapiekontrolle eingesetzt werden. Die endgültige Positionierung von Eicosanoid-Normwerten im Spontanurin mit Bezug auf Kreatinin, muss durch den klinischen Einsatz unter wissenschaftlicher Betrachtungsweise noch weiter verifiziert werden.

6. Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. H.W. Seyberth, danke ich für die Überlassung des Themas und die vielen Gespräche sowie die finanzielle Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Großer Dank gebührt Herrn Bernhard Watzer für die Unterstützung bei den Labortätigkeiten, für die vielen kleinen Aufmunterungen und die freundliche Atmosphäre, die er zusammen mit Dr. Horst Schweer und seinen Mitarbeitern, die die Bestimmung der Eicosanoide übernahmen, im „Prostaglandin-Labor" verbreitet hat.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch beim Pflegepersonal der Kinderklinik und den Mitarbeitern des klinisch-chemischen Labors auf den Lahnbergen, ohne sie wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Dr. Stephan Reinalter möchte ich danken für die konstruktive Kritik und die Hilfe bei der Strukturierung der Ergebnisse.

Bei den Mitarbeitern des Biomathematischen Instituts Frau Astrid Dempfle und Herrn Tillmann Görg möchte ich mich für die Beratung bei der statistischen Planung dieser Studie bedanken.

Dank schulde ich auch meinem Lebensgefährten Markus Kisiala, der mich seit langer Zeit durch alle Höhen und Tiefen begleitet und mich auch in Stunden der Frustration zum Lachen gebracht hat.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, denen ich zusammen mit meinem Freund diese Arbeit widme. Sie haben meine berufliche Entwicklung entscheidend gefördert – Danke für alles.

7. Literaturverzeichnis

1. Amirlak I, Dawson KP (2000) **Bartter Syndrome: an overview**. Q J Med 93: 207- 215

2. Bauch K, Seitz W (1985) **Zur Problematik der Bestimmung des Kreatinins im Harn als Bezugsgröße renal ausgeschiedener Substanzen**. Inn Med. 40: 201-205

3. Bingham SA, Cumings JH (1985) **The use of creatinine output as a check on the completeness of 24 hour urine collections**. Clin Nutrition 39C: 343-353

4. Brochhausen C, Seyberth HW (2003) **Arzneimitteltherapie im Kindes- und Jugendalter: Eine Herausforderung zwischen Patientenschutz und Therapiesicherheit.** Kinderkrankenschwester 22: 8-11

5. Calles-Escandon J, Cunningham JJ, Snyder P, Jacob R, Huszar G, Loke J, Felig P (1984) **Influence of exercise on urea, creatinine and 3-methylhistidine excretion in normal human subjects**. Am J Physiol Endocrin Metabol 246, 4: 334- 338

6. Brock TG, McNish RW, Peters-Golden M (1999) **Arachidonic Acid is Preferntally Metabolized by Cyclooxygenase-2 to Prostacyclin and Prostaglandin E2**. J Biol Chem, Vol. 274, Issue 17: 11660-11666

7. Cawello W, Leonhardt A, Schweer H, Seyberth HW, Bonn R, Lomeli L (1995) **Dose proportional pharmacokinetics of alprostadil (prostaglandin E 1) in healthy volunteers following intravenous infusion**. Br J Clin Pharmacol 40: 273-276

8. Claudi T, Cooper JG (2001) **Comparison of urinary albumine excretion rate in overnight urine and albumin creatinine ratio in spot urine in diabetic patients in general practice.** Scand J Prim Health Care 19, 4: 247- 248

9. Colosio C, Visentin S, Birindelli S, Campo L, Fustinoni S, Mariani F, Tiramani M, Tommasini M, Brambilla G, Maroni M (2006) **Reference values for ethylenthiourea in urine in Northern Italy**. Toxicol Lett. 162, 2-3: 153- 157

10. Demaurex A, Küng HL, Wirz H (1983) **Creatinine and urine density as reference values in biological monitoring**. Soz Praventivmed 28, 2: 88- 94

11. Farker K, Merkel U, Schweer H, Haerting J, Madani SF, Eggers R, Müller UA, Seyberth HW, Hoffmann A (2002) **Effects of short-term treatment with diclofenac-colestyramine on renal function and urinary prostanoid excretion in patients with type-2-diabetes**. Eur J Clin Pharmacol 58: 85-91

12. Farker K, Schweer H, Vollandt R, Nassr N, Nagel U, Seyberth HW, Hoffmann A, Oettel M (1997) **Measurements of urinary prostaglandins in young ovulatory women during the menstrual cycle and postmenopausal women**. Prostaglandins 54: 655-664

13. Funk Colin D (2001) **Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology.** Science Mag, Vol. 294; 1871-1875

14. Girschick HJ, Schneider P, Haubitz I, Hiort O, Collmann H, Beer M, Shin YS, Seyberth HW (2006) **Effective NSAID Treatment indicates that hyperprostaglandism is affecting the clinical severity of childhood hypophosphatasia**. Orphanet Journal of Rare Diseases 1:24

15. Girschick HJ, Seyberth HW, Huppertz HI (1999) **Treatment of Childhood Hypophosphatasia With Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs.** Bone No. 5: 603-607

16. Granerus G, Lönnquist B, Stenström M (1999) **No sex difference in the urinary excretion of the histamine metabolite methylimidazoleacetic when corrected for creatinine excretion**. Inflamm Res. 48, 1: 92-93

17. Hellerstein S, Hunter JL, Warady BA (1988) **Creatinine excretion rates for evaluation of kidney function in children**. Pediatr Nephrol 2: 419-424

18. Hellerstein S, Sion SD, Berenbom M, Erwin P, Nickell E (2001) **Creatinine excretion rates for renal clearance studies**. Pediatr Nephrol 16: 637-643

19. Hoch B, Bernhard M, Seyberth HW, Watzer B, Schweer H (1999) **Neonatal urinary prostanoid excretion**. Prostaglandins and other Lipid Mediators Vol. 60: 9-14

20. Jeck N, Konrad M, Hess M, Seyberth HW (2000) **The diuretic- and Bartter- like-salt- losing tubulopathies**. Nephrol Dial Transplant 15: 19-20

21. Kammerl MC, Nüsing RM, Seyberth HW, Riegger GAJ, Kurtz A, Krämer BK (2001) **Inhibition of cyclooxygenase-2 attenuates urinary prostanoid excretion without effecting renal rennin expression**. Eur J Physiol 442: 842-847

22. Kleta R, Kuwertz-Bröking E (2000) **New Treatment Options for Bartter`s Syndrome**. NEJM Vol. 343: 661-662

23. Knudsen N, Christiansen E, Brandt-Christensen M, Nygaard B, Perrild H (2000) **Age- and sex-adjusted iodine/ creatinine ratio. A new standard in epidemiological surveys ? Evaluation of three different estimates of iodine excretion based on casual urine samples and comparison to 24 hour values**. European Journal of Clinical Nutrition 54: 361-363

24. Knuiman JT, Hautvast JGAJ, Heijden Lvd. Geboers J, Joossens JV, Tornqvist H, Isaksson B, Pietinen P, Tuomilehto T, Flynn A, Shortt C, Böing H, Yomtov B, Angelico F, Ricci G (1986) **A Multi-Centre Study on Within-Person Variability in the Urinary Excretion of Sodium, Potassium, Calcium, Magnesium and Creatinine in 8 European Centres**. Clinical Nutrition 40 C: 343-348

25. Knuiman JT, Poppel Gv, Burema J, Heijden Lvd, Hautvast JGAJ (1988) **Multiple Overnight Urine Collections may be Used for Estimating the Excretion of Electrolytes and Creatinine.** Clin Chem 34: 135-138

26. Kömhoff M, Tekesin I, Peters M, Leonhardt A, Seyberth HW (2005) **Perinatal management of a preterm neonate affected by hyperprostaglandin E 2 syndrome (HPS).** Acta Paediatr 94: 1690-1693

27. Konrad M, Leonhardt A, Hensen P, Seyberth HW, Köckerling A (1999) **Prenatal and Postnatal Management of Hyperprostaglandin E Syndrome After Genetic Diagnosis From Amniocytes**. Pediatrics 103: 678-683

28. Lane C, Brown M, Dunsmuir W, Kelly J, Mangos G (2006) **Can spot urine/ creatinine ratio replace 24 hour urine protein in usual clinical nephrology**. Nephrology 11: 245-249

29. Leonhardt A, Kühl PG, Schweer H, Wolf D, Seyberth HW (1989) **Pharmacologically Active Levels of PG E1 in Neonates with Congenital Heart Disease**. Acta Paediatr Scand 78: 853-857

30. Leonhardt A, Schweer H, Wolf D, Seyberth HW (1992) **Formation of biologically active 13, 14-dihydro-prostaglanin E1 during intravenous infusion of prostaglandin E1 in newborns with ductus arteriosus-dependent congenital heart diseas.** Br J Clin Pharmacol 33: 323- 325

31. Leonhardt A, Busch C, Schweer H, Seyberth HW (1992) **Reference intervals and developmental changes in urinary prostanoid excretion in healthy newborns, infants and children**. Acta Paediatr 81: 191-196

32. Lew SQ, Bosch JP (1991) **Effect of Diet on Creatinine Clearance and Excretion in Young and Elderly Healthy Subjects and in Patients with Renal Disease**. J Am Soc Nephrol 2: 856-865

33. Martin MD, McCann T, Naleway C, Woods JS, Leroux BG, Bollen AM (1996) **The Validity of Spot Urine Samples for Low-Level Occupational Mercury Exposure Assessment and Relationship to Porphyrin and Creatinine Excretion Rates**. J Pharmacol Exp Ther 277: 239- 244

34. Matos V, Melle Gv, Boulat O, Markert M, Bachmann C, Guignard JP (1996) **Urinary phosphate/ creatinine, calcium/ creatinine, and magnesium/ creatinine ratios in healthy pediatric population.** The Journal of Pediatrics, Vol. 131: 252-257

35. Matos V, Drukker A, Guignard JP (1999) **Spot urine samples for evaluating solute excretion in the first week of life**. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 80: 240-242

36. Moeller A, Lehmann A, Knauer N, Albisetti M, Rochat M, Johannes W (2007) **Effects of montelukast on subjective and objective outcome measures in preschool asthmatic children**. Pediatr Pulmonol. 43: 179-186

37. Mori Y, Hiraoka M, Suganuma N, Tsukahar H, Yoshida H, Mayumi M (2006) **Urinary creatinine excretion and protein/ creatinine ratios vary body size and gender in children**. Pediatr Nephrol 21: 683-687

38. Moriwaki Y, Yamamoto T, Takahashi S, Yamakita J, Tsutsumi Z, Hada T (2001) **Spot urine uric acid to creatinine ratio used in the estimation of uric acid excretion in primary gout**. J Rheumatol 28: 1306-1310

39. Nüsing RM, Reinalter SC, Peters M, Kömhoff M, Seyberth HW (2001) **Pathogenetic role of cyclooxygenase-2 in hyperprostaglandin E syndrome/ antenatal Bartter syndrome: Therapeutic use of the cyclooxygenase- 2 inhibitor nimesulide**. Clin Pharmacol Ther 70: 384-390

40. Phipps WR, Duncan AM, Merz BE, Kurzer MS (1998) **Effect of the Menstrual Cycle on Creatinine Clearance in Normally Cycling Women**. Obstetric and Gynecology 92: 585-588

41. Rahmann MM, Azad K, Ahmed N, Haquq MM, Wahab MA, Asad HB, Mollah FH, Arslan MI (2006) **Spot morning urine protein creatinine ratio and 24 hour urinary total protein excretion rate**. Mymensingh Med J 15: 146- 149

42. Raskovic S, Bogic M, Peric-Popadic A, Jovcic Z, Tomic-Spiric V (1998) **The role of prostaglandins in allergic inflammation.** Srp Ach Celok Lek, 126: 9-10

43. Reinalter SC (1999) **Furosemid- Resistenz bei Hyperprostaglandin E Syndrom als Hinweis auf die Molekularbiologische Pathophysiologie**, Dissertationsarbeit

44. Remer T, Neubert A, Maser-Gluth C (2001) **Anthropometry-based reference values for 24-h urinary creatinine excretion during growth and their use in endocrine and nutritional research**. Am J Clin Nutr 75: 561-569

45. Schlingmann KP, Konrad M, Jeck N, Waldegger P, Reinalter SC, Holder M, Seyberth HW, Waldegger S (2004) **Salt Wasting and Deafness Resulting from mutations in Two Chloride Channels**. NEJM : 350: 1324-1319

46. Schweer H, Seyberth HW (1986) **Determination of Prostaglandin E2, Prostaglandin F2α and 6-Oxo-prostaglandin F1α in Urine by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry and Gas Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry; A Comparison**. Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, Vol. 13: 611-619

47. Schweer H, Soeding K, Kammer J, Seyberth HW (1987) **Quantitation of Prostanoids in Biological Fluids by Gas Chromatography/ Triple Stage Quadrupole Mass Spectrometry**. Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research, Vol. 388-93

48. Schweer H, Watzer B, Seyberth HW (1993) **Determination of seven prostanoids in 1ml urine by gas chromatography-negative ion chemical ionization triple stage quadrupole mass spectrometry**. Journal of Chromatography B, 652: 221-227

49. Seyberth HW, Kühl PG (1988) **The role of eicosanoids in paediatrics**. Eur J Pediatr 147: 341- 349

50. Seyberth HW, Schweer H (1988) **Clinical Assessment of Renal and Systemic Prostanoid Activity**. Contr. Nephrol 67: 17-21

51. Seyberth HW, Schweer H, Tönshoff B, Leonhardt A (1992) **The role of prostanoids in pediatric diseases employing mass spectrometric techniques.** Eicosanoids 5: 4-6

52. Simonette GD, Konrad M (2006) **Examination of the urine in the child**. Ther Umsch Vol. 63, 9: 579-584

53. Singh R, Singh RK, Mahdi AA, Saxena SP, Cornelissen G, Halberg F (1999) **Circadian Periodicity of Urinary Volume, Creatinine and 5-Hydroxyindole Acetic Acid Excretion in Healthy Indians**. Life Sciences Vol. 66, No. 3: 209-214

54. Skinner AM, Addison GM, Price DA (1996) **Changes in the urinary excretion of creatinine, albumine and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase with increasing age and maturity in healthy schoolchildren**. Eur J Pediatr 155, 7: 596- 602

55. Sonntag J, Prankel B, Waltz S (1996) **Serum creatinine concentration, urinary creatinine concentration and creatinine clearance during the first 9 weeks in preterm infants with a birth weight below 1500g**. Eur J Pediatr. 155, 9: 815 – 819

56. Speek AJ, Thissen JTNM, Shrijver J (1986) **Urinary excretion of 3-Methylhistidine and creatinine by healthy dutch children during day and night. The influence of age and sex**. J. Clin. Chem. Vol. 24: 465 – 470

57. Tamura S, Shimizu T, Kawakatsu H, Tateishi S (2004) **Correlation between 24-hour urinary protein excretion and protein/creatinine ratio in the first voided morning urine samples**. Nippon Jinzo Gakkai Shi. 46, 1: 26- 34

58. Trowbridge FL, Hiner CD, Robertson AD (1982) **Arm muscle indicators and creatinine excretion in children**. The American J of Clin Nutrition 36: 691-696

59. Webster J, Garrow JS (1985) **Creatinine excretion over 24 hours as a measurement of body composition or of completeness of urine collection**. Clinical Nutrition 39C: 101-106

60. Whiteley P, Waring R, Williams L, Klovrza L, Nolan F, Smith S, Farrow M, Dodou K, Lough WJ, Shattock P (2006) **Spot urinary creatinine excretion in pervasive developmental disorders**. Pediatr International 48: 292-297

61. Valongo C, Cardoso ML, Domingues P, Almeida L, Verhoeven N, Salomons G, Jakobs C, Vilarinho L (2004) **Age related reference values for urine creatinine and guanidinoacetic acid concentration in children and adolescents by gas chromatography- mass- spectrometry**. Clin Chim Acta 348, 1-2: 155-161

62. Wennmalm A, Benthin G, Granström EF, Persson L, Winell S (1992) **2,3-dinor metabolites of thromboxane A2 and prostacyclin in urine from healthy human subjects: diurnal variation and relation to 24 hour excretion**. Cli. Scie. 83:461-4655

63. Zohouri FV, Swinbank CM, Maguire A, Moynihan PJ (2006) **Is the fluoride / creatinine ratio of a spot urine sample indicative of 24-h urinary fluoride**. Community Dent Oal Epidemiol. 34, 2: 130- 138

8. Anhang

8.1. Aufklärungsbögen

8.1.1. Aufklärungsbogen Phase I für Eltern

K L I N I K U M
der Philipps-Universität Marburg
Anstalt des öffentlichen Rechts, Sitz Marburg

Zentrum für Kinderheilkunde

GESCHÄFTSFÜHRENDER DIREKTOR:
PROF. DR. H.W.SEYBERTH

Studienleiter:
DR. A. LEONHARDT (☎ 06421-28-62691)
DR. S. REINALTER (☎ 06421-28-62650)

Wissenschaftliche Mitarbeiterin:
CAND. MED. INA ZILONKOVSKI (☎ 06421-982467)

Für Phase I

Aufklärungsbogen für Eltern zur Studie:

Erhebung von Normalwerten für die Prostaglandin- und Leukotrien-Ausscheidung bezogen auf die Kreatinin-Ausscheidung im Spontanurin bei Kindern und Jugendlichen aller Altersstufen

Liebe Eltern,
derzeit wird an unserer Klinik eine Untersuchung zur normalen Ausscheidung von sog. „Prostaglandinen und Leukotrienen " im Urin durchgeführt. Prostaglandine sind Botenstoffe, die von verschiedenen Organen gebildet werden und an vielen unterschiedlichen normalen (gesunden) und krankhaften Vorgängen im Körper eine wichtige Rolle spielen, z.B. bei der normalen Blutgerinnung oder bei Fieber und Entzündungen.
Im Moment haben wir für die Messung dieser Botenstoffe nur Normalwerte Kinder, die in einer Urinprobe bestimmt werden, die über 24 h gesammelt wurde. Wie Sie sich wahrscheinlich vorstellen können, ist eine Urinsammlung über 24 h relativ aufwendig und bei Kindern, die nicht im Krankenhaus schlafen sehr schwierig durchzuführen. Deshalb möchten wir untersuchen, ob die Bestimmung der Prostaglandine und Leukotriene in einer einzigen, spontan abgegebenen Urinprobe ausreichend genau Rückschlüsse auf das Vorliegen einer Erkrankung erlaubt. Deswegen möchten wir mit Ihrem Kind eine Urinsammlung über 24 h durchführen, bei der jedoch die einzelnen Urin-Portionen in getrennten Gefäßen im

Kühlschrank gesammelt werden. Von den Schwestern oder von Ihnen selbst sollte nur die Uhrzeit der jeweiligen Urinprobe aufgeschrieben werden.
Eine Blutentnahme ist für diese Untersuchung nicht erforderlich. Sollte jedoch aus anderen Gründen bei Ihrem Kind eine Blutentnahme in selben Zeitraum wie die Urinsammlung stattfinden, würden wir gerne einen einzigen im Blut bestimmten Laborwert (das Serum Kreatinin, ein Marker für die Nierenfunktion) in unseren Unterlagen vermerken. An sonstigen Daten zu Ihrem Kind benötigen wir nur eine kurze Angabe über die eventuell vorliegende Erkrankung und über Medikamente, die Ihr Kind einnimmt. Außerdem müssten wir das Alter, die Körpergröße, das Körpergewicht und das Geschlecht Ihres Kindes notieren. Vor der Speicherung der Daten in einem Computer werden alle Daten anonymisiert, so dass keine Verbindung zu Ihrem Kind mehr herstellbar sein wird.

Die Aufklärung wurde durchgeführt von _____
Name der aufklärenden Ärztin / des aufklärenden Arztes

Mir ist bewusst, dass die Teilnahme an dieser Untersuchung freiwillig ist und ich jederzeit die Möglichkeit habe ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für mein Kind die Teilnahme an der Studie zu beenden.

_____
Unterschrift des Erziehungsberechtigten

Der Aufklärungsbogen wird in der Universitäts- Kinderklinik unter Verschluß aufbewahrt. Eine Verbindung zur Urinprobe wird nicht hergestellt

Bei Rückfragen: Dr. S. Reinalter oder Dr. A. Leonhardt (erreichbar über die Stationsmitarbeiter oder die Pforte der Kinderklinik)

K L I N I K U M
d e r P h i l i p p s - U n i v e r s i t ä t
M a r b u r g
Anstalt des öffentlichen Rechts,
Sitz Marburg

Zentrum für
Kinderheilkunde

GESCHÄFTSFÜHRENDER
DIREKTOR:
PROF. DR. H.W.SEYBERTH

Studienleiter:
DR. A. LEONHARDT (☎ 06421-28-62691)
DR. S. REINALTER (☎ 06421-28-62650)
Wissenschaftliche
Mitarbeiterin:
CAND. MED. INA ZILONKOVSKI
(☎ 06421-982467)

Für Phase II

Aufklärungsbogen für Eltern zur Studie:

Erhebung von Normalwerten für die Prostaglandin- und Leukotrien-Ausscheidung bezogen auf die Kreatinin-Ausscheidung im Spontanurin bei Kindern und Jugendlichen aller Altersstufen

Liebe Eltern,
derzeit wird an der Universitäts-Kinderklinik in Marburg eine Untersuchung zur normalen Ausscheidung von sog. „Prostaglandinen und Leukotrienen " im Urin durchgeführt. Prostaglandine sind Botenstoffe, die von verschiedenen Organen gebildet werden und an vielen unterschiedlichen normalen (gesunden) und krankhaften Vorgängen im Körper eine wichtige Rolle spielen, z.B. bei der normalen Blutgerinnung oder bei Fieber und Entzündungen.
Im Moment haben wir für die Messung dieser Botenstoffe nur Normalwerte Kinder, die in einer Urinprobe bestimmt werden, die über 24 h gesammelt wurde. Wie Sie sich wahrscheinlich vorstellen können, ist eine Urinsammlung über 24 h relativ aufwendig und bei Kindern, die nicht im Krankenhaus schlafen sehr schwierig durchzuführen. Deshalb möchten wir untersuchen, ob die Bestimmung der Prostaglandine und Leukotriene in einer einzigen Urinprobe ausreichend genau Rückschlüsse auf das Vorliegen einer Erkrankung erlaubt. In einer ersten Untersuchung wurden bereits die Zusammenhänge zwischen der Prostaglandin / Leukotrien-Bestimmung im24 h Sammelurin und den einzelnen Portionen der Urinsammlung untersucht. Jetzt möchten wir einzelne Urinproben von gesunden Kindern der verschiedenen Altersstufen untersuchen um neue Normalwerte zu erheben. Deswegen möchten wir von Ihrem Kind eine einzelne Urinprobe untersuchen. Zur Urinprobe muss notiert werden, um welche Uhrzeit diese abgegeben wurde.
Eine Blutentnahme ist für diese Untersuchung nicht erforderlich.
An sonstigen Daten zu Ihrem Kind benötigen wir nur eine kurze Angabe über eventuell vorliegende Erkrankung und über Medikamente, die Ihr Kind einnimmt. Hierzu erhalten Sie einen kurzen Fragebogen. Außerdem müssten wir das Alter, die Körpergröße, das

Körpergewicht und das Geschlecht Ihres Kindes notieren. Die Dokumentation und Speicherung der Daten in einem Computer erfolgt anonym, so dass keine Verbindung zu Ihrem Kind mehr herstellbar sein wird.

Die Aufklärung wurde durchgeführt von _____
Name der aufklärenden Person

Mir ist bewusst, dass die Teilnahme an dieser Untersuchung freiwillig ist und ich jederzeit die Möglichkeit habe ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für mein Kind die Teilnahme an der Studie zu beenden.

_____
Unterschrift des Erziehungsberechtigten

Dieser Aufklärungsbogen wird in der Universitäts-Kinderklinik unter Verschluss aufbewahrt. Eine Verbindung zur Urinprobe wird nicht hergestellt.

Bei Rückfragen: Dr. A. Leonhardt oder Dr. S. Reinalter(erreichbar über die Stationsmitarbeiter oder die Pforte der Kinderklinik)

8.1.3. Aufklärungsbogen Phase I für Studienteilnehmer/ innen

K L I N I K U M
der Philipps-Universität Marburg
Anstalt des öffentlichen Rechts, Sitz Marburg

Zentrum für Kinderheilkunde

GESCHÄFTSFÜHRENDER DIREKTOR:
PROF. DR. H.W.SEYBERTH

Studienleiter:
DR. A. LEONHARDT (☎ 06421-28-62691)
DR. S. REINALTER (☎ 06421-28-62650)
Wissenschaftliche Mitarbeiterin:
CAND. MED. INA ZILONKOVSKI (☎ 06421-982467)

Für Phase I

Aufklärungsbogen für Jugendliche zur Studie:

Erhebung von Normalwerten für die Prostaglandin- und Leukotrien-Ausscheidung bezogen auf die Kreatinin-Ausscheidung im Spontanurin bei Kindern und Jugendlichen aller Altersstufen

Liebe Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer,
derzeit wird an unserer Klinik eine Untersuchung zur normalen Ausscheidung von sog. „Prostaglandinen und Leukotrienen " im Urin durchgeführt. Prostaglandine sind Botenstoffe, die von verschiedenen Organen gebildet werden und an vielen unterschiedlichen normalen (gesunden) und krankhaften Vorgängen im Körper eine wichtige Rolle spielen, z.B. bei der normalen Blutgerinnung oder bei Fieber und Entzündungen.
Im Moment haben wir für die Messung dieser Botenstoffe nur Normalwerte Kinder, die in einer Urinprobe bestimmt werden, die über 24 h gesammelt wurde. Wie Du Dir wahrscheinlich vorstellen kannst, ist eine Urinsammlung über 24 h relativ aufwendig und bei Kindern, die nicht im Krankenhaus schlafen sehr schwierig durchzuführen. Deshalb möchten wir untersuchen, ob die Messung der Prostaglandin / Leukotrien-Konzentration in einer normalen Urinprobe ausreicht um Rückschlüsse auf das Vorliegen einer Erkrankung zu ziehen. Deswegen möchten wir mit Dir eine Urinsammlung über 24 h durchführen, bei der jedoch die einzelnen Urin-Portionen in getrennten Gefäßen im Kühlschrank gesammelt werden. Von den Schwestern oder von Dir selbst muss nur die Uhrzeit der jeweiligen Urinprobe aufgeschrieben werden.
Eine Blutentnahme ist für diese Untersuchung nicht erforderlich. Sollte jedoch aus anderen Gründen bei Dir eine Blutentnahme in selben Zeitraum wie die Urinsammlung stattfinden, würden wir gerne einen einzigen im Blut bestimmten Laborwert (das Serum Kreatinin, ein Marker für die Nierenfunktion) in unseren Unterlagen vermerken. Ansonsten benötigen wir von Dir nur eine kurze Angabe über die bei Dir eventuell vorliegende Erkrankung und über Medikamente, die Du einnimmst. Außerdem müssten wir Dein Alter, die Körpergröße, das

Körpergewicht und Dein Geschlecht notieren. Vor der Speicherung der Daten in einem Computer werden alle Daten so verschlüsselt, dass keine Verbindung zu Deiner Krankenakte mehr herstellbar sein wird.

Die Aufklärung wurde durchgeführt von _____
Name der aufklärenden Ärztin / des aufklärenden Arztes

Ich habe den Sinn der Untersuchung verstanden, hatte ausreichend Gelegenheit Fragen zu stellen und bin mit der Durchführung einer

fraktionierten Urinsammlung einverstanden.

Mir ist bewusst, dass die Teilnahme an dieser Untersuchung freiwillig ist und ich jederzeit die Möglichkeit habe ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile die Teilnahme an der Studie zu beenden.

_____Unterschrift der Studienteilnehmerin / des Studienteilnehmers

Dieser Aufklärungsbogen wird in der Universitäts-Kinderklinik unter Verschluss aufbewahrt. Eine Verbindung zur Urinprobe wird nicht hergestellt.

Bei Rückfragen: Dr. S. Reinalter oder Dr. A. Leonhardt (erreichbar über die Stationsmitarbeiter oder die Pforte der Kinderklinik

8.1.4. Aufklärungsbogen Phase II für Studienteilnehmer/ innen

K L I N I K U M
der Philipps-Universität Marburg
Anstalt des öffentlichen Rechts, Sitz Marburg

Zentrum für Kinderheilkunde

GESCHÄFTSFÜHRENDER DIREKTOR:
PROF. DR. H.W.SEYBERTH

Studienleiter:
DR. A. LEONHARDT (☎ 06421-28-62691)
DR. S. REINALTER (☎ 06421-28-62650)
Wissenschaftliche Mitarbeiterin:
CAND. MED. INA ZILONKOVSKI (☎ 06421-982467)

Für Phase II

Aufklärungsbogen für Jugendliche zur Studie:

Erhebung von Normalwerten für die Prostaglandin- und Leukotrien-Ausscheidung bezogen auf die Kreatinin-Ausscheidung im Spontanurin bei Kindern und Jugendlichen aller Altersstufen

Liebe Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer,
derzeit wird an unserer Klinik eine Untersuchung zur normalen Ausscheidung von sog. „Prostaglandinen und Leukotrienen " im Urin durchgeführt. Prostaglandine sind Botenstoffe, die von verschiedenen Organen gebildet werden und an vielen unterschiedlichen normalen (gesunden) und krankhaften Vorgängen im Körper eine wichtige Rolle spielen, z.B. bei der normalen Blutgerinnung oder bei Fieber und Entzündungen.
Im Moment haben wir für die Messung dieser Botenstoffe nur Normalwerte Kinder, die in einer Urinprobe bestimmt werden, die über 24 h gesammelt wurde. Wie Du Dir wahrscheinlich vorstellen kannst, ist eine Urinsammlung über 24 h relativ aufwendig und bei Kindern, die nicht im Krankenhaus schlafen sehr schwierig durchzuführen. Deshalb möchten wir untersuchen, ob die Messung der Prostaglandin / Leukotrien-Konzentration in einer normalen Urinprobe ausreicht um Rückschlüsse auf das Vorliegen einer Erkrankung zu ziehen. Deswegen möchten wir mit Dir eine Urinsammlung von einer einzigen Spontanurinprobe durchführen.
Eine Blutentnahme ist für diese Untersuchung nicht erforderlich. Sollte jedoch aus anderen Gründen bei Dir eine Blutentnahme in selben Zeitraum wie die Urinsammlung stattfinden, würden wir gerne einen einzigen im Blut bestimmten Laborwert (das Serum Kreatinin, ein Marker für die Nierenfunktion) in unseren Unterlagen vermerken. Ansonsten benötigen wir von Dir nur eine kurze Angabe über die bei Dir eventuell vorliegende Erkrankung und über Medikamente, die Du einnimmst. Außerdem müssten wir Dein Alter, die Körpergröße, das Körpergewicht und Dein Geschlecht notieren. Vor der Speicherung der Daten in einem

Computer werden alle Daten so verschlüsselt, dass keine Verbindung zu Deiner Krankenakte mehr herstellbar sein wird.

Die Aufklärung wurde durchgeführt von _____
Name der aufklärenden Ärztin / des aufklärenden Arztes

Ich habe den Sinn der Untersuchung verstanden, hatte ausreichend Gelegenheit Fragen zu stellen und bin mit der Durchführung einer

fraktionierten Urinsammlung einverstanden.

Mir ist bewusst, dass die Teilnahme an dieser Untersuchung freiwillig ist und ich jederzeit die Möglichkeit habe ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile die Teilnahme an der Studie zu beenden.

_____Unterschrift der Studienteilnehmerin / des Studienteilnehmers

Dieser Aufklärungsbogen wird in der Universitäts-Kinderklinik unter Verschluss aufbewahrt. Eine Verbindung zur Urinprobe wird nicht hergestellt.

Bei Rückfragen: Dr. S. Reinalter oder Dr. A. Leonhardt (erreichbar über die Stationsmitarbeiter oder die Pforte der Kinderklinik

8.2. Urinsammelprotokoll für fraktionierte 24 h Urinsammlung

Erhebung neuer pädiatrischer Normwerte der Prostaglandin- und Leukotrienausscheidung im Spontanurin

Phase 1: Fraktionierte Urinsammlung zur Untersuchung der zirkadianen Prostaglandin- Sekretion im Kindesalter bei gesunden Probanden

Datum:
Alter:
Geschlecht:
Größe:
Gewicht:

Urinsammlung gekühlt !			
	Uhrzeit	Volumen der Urinprobe	**Besonderheiten**
Beginn der Urinsammlung (Blasenentleerung)			
1. Portion			
2. Portion			
3. Portion			
4. Portion			
5. Portion			
6. Portion			
7. Portion			
8. Portion			
9. Portion			
10.Portion			

Urinprobe: - bei „ trockenen “ Kindern erfolgt die Urinsammlung aus jeder spontan abgesetzten Urinprobe: - bei „ nicht trockenen “ Kindern erfolgt die Urinsammlung nur bei aus gegebener Indikation liegendem Blasenkatheter alle 3 Stunden

8.3. Fragebogen Phase I und II für Eltern und Studienteilnehmer/ innen

K L I N I K U M
der Philipps-Universität Marburg
Anstalt des öffentlichen Rechts, Sitz Marburg

Zentrum für Kinderheilkunde

GESCHÄFTSFÜHRENDER DIREKTOR:
PROF. DR. H.W.SEYBERTH

Studienleiter:
DR. A. LEONHARDT (☎ 06421-28-62691)
DR. S. REINALTER (☎ 06421-28-62650)
Wissenschaftliche Mitarbeiterin:
CAND. MED. INA ZILONKOVSKI (☎ 06421-982467)

Für Phase I und II

Fragebogen für Eltern / Jugendliche der Studie :

Erhebung von Normalwerten für die Prostaglandin- und Leukotrien- Ausscheidung bezogen auf die Kreatinin-und Leukotrienausscheidung im Spontanurin bei Kindern und Jugendlichen aller Altersstufen

Wir bitten sie uns folgende Fragen bzw. Daten zu ihrem Sohn / ihrer Tochter so genau wie möglich zu beantworten.

Probanden Nr.:
Untersuchungsdatum :
Geburtsdatum:
Geschlecht:
Momentanes Gewicht:
Momentane Größe:

Krankheiten

Leidet ihr Sohn/ ihre Tochter seit der Geburt an einer bestimmten Erkrankung (z.B. Stoffwechselkrankheit),
leidet er/ sie an einer chronischen Erkrankung oder hat er/ sie kürzlich eine Erkrankung (jeglicher Art)
durchgemacht?

Medikamente

- nimmt ihr Sohn/ ihre Tochter regelmäßig Medikamente aufgrund einer Krankheit ein
- hat er/ sie kürzlich aufgrund einer durchgemachten Krankheit Medikamente eingenommen
  z. B. Schmerzmittel , Fiebersenkende Mittel (Aspirin, Diclofenac, Ibuprofen, Paracetamol)
  z. B. entwässernde Medikamente (Furosemid, ..) oder andere Medikamente / Drogen jeglicher Art (auch Medikamente auf pflanzlicher Basis angeben)

_____
Unterschrift des Erziehungsberechtigten

8.4. Datentabellen

8.4.1. Friedman Test

Tab. Nr. 13: Darstellung der Signifikanz p= <0,05 eines zirkadianem Rhythmus mittels Friedman Test der Eicosanoid-Daten

	pg/ml	ng/h/1,73m^2	ng/mg Kreatinin
PGE_2	0,474	0,142	0,00
PGE M	0,00	0,00	0,084
$6kPGF_{1\alpha}$	0,00	0,001	0,004
$2,3dn6kPGF_{1\alpha}$	0,001	0,001	0,168
TxB_2	0,00	0,00	0,969
$2,3dnTxB_2$	0,00	0,00	0,029
$11dhTxB_2$	0,00	0,00	0,02
LT E_4	0,00	0,00	0,00

Tab. Nr. 14: Datentabelle der berechneten Altersunterschiede aller Eicosanoid-Daten mittels Mann-Whitney U -Test

	Phase I			Alle Phasen
	24 h Wert pg/ml	24 h Wert ng/h/1,73m^2	24 h Wert in ng/mg Kreatinin	4. Fraktion ng/mgKreatinin
PGE_2	0,150	0,293	0,988	0,094
PGE M	0,959	0,871	0,382	0,052
$6kPGF_{1\alpha}$	0,276	0,495	0,836	0,224
$2,3dn6kPGF_{1\alpha}$	0,573	0,599	**0,047**	**0,015**
TxB_2	0,667	0,279	0,953	0,968
$2,3dnTxB_2$	0,678	0,917	0,382	**0,002**
$11dhTxB_2$	0,248	0,646	**0,049**	**0,000**
LT E_4	0,929	0,824	0,614	0,114

Tab. Nr. 15: Datentabelle der berechneten Altersunterschiede aller Urin-Kreatinindaten in mg/dl mittels Mann-Whitney U-Test

Zeitintervall	p
00:00-03:00	0,744
03:00-06:00	0,784
06:00-09:00	0,487
09:00-12:00	0,407
12:00-15:00	0,086
15:00-18:00	0,047
18:00-21:00	0,120
21:00-24:00	0,208
24h Sammelurin	0,151

Tab. Nr. 16: Datentabelle der berechneten Geschlechtsunterschiede der Eicosanoid-Daten mittels Kruskal-Wallis-Test

	Phase I			Alle Phasen
	24 h Wert pg/ml	24 h Wert ng/h/1,73m^2	24 h Wert in ng/mg Kreatinin	4. Fraktion ng/mg Kreatinin
PGE_2	0,129	0,558	0,689	0,676
PGE M	0,491	0,358	0,859	0,788
$6kPGF_{1\alpha}$	0,558	0,339	0,563	0,278
$2,3dn6kPGF_{1\alpha}$	0,129	**0,025**	0,635	0,185
TxB_2	0,906	0,876	0,224	0,252
$2,3dnTxB_2$	0,210	0,175	0,965	0,563
$11dhTxB_2$	0,102	0,135	0,976	0,989
LT E_4	0,054	0,056	0,335	0,802

Tab. Nr. 17: Datentabelle der berechneten Geschlechtsunterschiede der Urin-Kreatinindaten in mg/dl mittels Kruskal-Wallis-Test

Zeitintervall	p
00:00-03:00	0,291
03:00-06:00	0,298
06:00-09:00	0,05
09:00-12:00	0,118
12:00-15:00	0,106
15:00-18:00	0,155
18:00-21:00	0,293
21:00-24:00	0,390
24h Sammelurin	0,307

8.5. Lebenslauf

Name:	Ina Zilonkovski
Geb. Datum:	05.03.1980
Geb. Ort:	Gotha
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Mutter:	Sigrun Zilonkovski, 06.01.1953, Dipl. Agraringenieur
Vater:	Klaus Zilonkovski, 03.07.1953, Vermessungstechniker
Geschwister:	Jonas Zilonkovski, 15.06.1984, IT-Elektroniker

Schulausbildung

1986-1990	Grundschule Halberstadt
1990-1998	Gymnasium Martineum Halberstadt
10.07.1998	Abitur

Beruflicher Werdegang

01.07.1998	Eintritt in die Bundeswehr, in die Laufbahn der Sanitätsoffiziere
07/1998-03/1999	Militärische Ausbildung

Studium

10.03. 1999	Studium der Humanmedizin an der Philipps Universität Marburg
04.05.2005	Abschluss des Studiums mit dem 3. Staatsexamen

Berufliche Laufbahn

18.05.05-31.07.07	Assistenzärztin für Anästhesie im Bundeswehrkrankenhaus Hamburg
Seit 01.08.07	Verwendung als Truppenarzt im Sanitätszentrum des 3. Marinefliegergeschwaders in Nordholz
02.07.2007	Erlangen der Fachkunde Strahlenschutz
17.12.2007	Erlangen der Zusatzbezeichnung Notfallmedizin
28.08.06-30.10.06	Auslandseinsatz EUFOR RD CONGO als Weiterbildungsassistent Anästhesie
20.10.08-01.12.08	Auslandseinsatz ORF Btl. Kosovo als Rettungsmediziner

8.6. Meine akademischen Lehrer

Damen und Herren Professoren	Fachgebiet	Damen und Herren Professoren	Fachgebiet
Arnold	Innere Medizin/ Gastroenterologie	Kuhlmann	Innere Medizin
Aumüller	Anatomie	Lang	Physiologie
Bach	Physik	Lill	Zytologie/ Immunologie
Barth	Pathologie	Lorenz	Theoretische Chirurgie
Basler	Medizinische Psychologie	Maier	Kinderheilkunde
Baum	Allgemeinmedizin	Maisch	Innere Medizin
Behr	Nuklearmedizin	Moll	Pathologie
Beyer	HNO	Mueller	Sozialmedizin
Bien	Neuroradiologie	Mutters	Mikrobiologie
Cetin	Anatomie	Neubauer	Innere Medizin
Daut	Klinische Medizin	Oertel	Neurologie
Eilers	Biochemie	Radsak	Virologie
Feuser	Physik	Remschmidt	Psychiatrie
Geus	Medizinische Terminologie	Renz	Labormedizin
Görg	Innere Medizin/ Gastroenterologie	Richter	Innere Medizin
Gotzen	Unfallchirurgie/ Notfallmedizin	Röhm	Biochemie
Griss	Orthopädie	Rothmund	Allgemeinchirurgie
Grzeschik	Humangenetik	Schäfer	Biomathe
Gudermann	Pharmakologie	Schmidt	Gynäkologie
Happle	Dermatologie	Seitz	Anatomie
Hofmann	Urologie	Seyberth	Kinderheilkunde
Holst	Tropenmedizin	Steiniger	Anatomie
Jungclas	Nuklearmedizin	Vogelmaier	Innere Medizin
Kern	Biologie/ Zytologie	Vohland	Pharmakologie
Klenk	Mikrobiologie/ Immunologie	Voigt	Physiologie
Kloose	Radiologie	Wagner	Radiologie
Koolmann	Biochemie	Weihe	Anatomie
Kretschmer	Transfusionsmedizin	Werner	HNO
Krieg	Psychosomatik/ Psychotherapie	Westermann	Anatomie
Kroll	Augenheilkunde	Wulf	Anästhesie

8.7. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps- Universität in Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Erhebung von Normwerten für die Prostaglandin- und Leukotrien-Ausscheidung bezogen auf die Kreatinin-Ausscheidung im Spontanurin bei Kindern aller Altersstufen

im Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde, unter Leitung von Prof. Dr. H. W. Seyberth ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.
Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 25.07.2008

Ina Zilonkovski