

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und  
Kinderkardiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor/in: Univ.-Prof. Dr. med. Ertan Mayatepek

**Etablierung einer nicht-invasiven Methode der  
Schmerzmessung  
durch Analyse des Prostaglandin-E-  
Metaboliten, von Leukotrien-B4, Glutamat und  
17- $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron im Urin von  
Frühgeborenen und reifen Neugeborenen**

Dissertation

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

Maire Brasseler

2018

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Höhn

Zweitgutachter: Prof. Dr. Kojda

Diese Arbeit widme ich all den kleinen Patienten und ihren Familien, die mich bei der Durchführung der Studie so zahlreich unterstützt haben.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Bis zum jetzigen Zeitpunkt erfolgte keine Veröffentlichung.

# Zusammenfassung

## Deutsch

Schmerz ist ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis und das häufigste Symptom, das zu einer Konsultation eines Arztes führt. Anhand von visuellen Analogskalen, der kindlichen Unbehagens- und Schmerzskala sowie der Bieri Gesichterskala kann Schmerz gemessen werden. Die Skalen setzen eine Kommunikationsfähigkeit des Patienten voraus oder stützen sich auf die Einschätzung von Fremdbeobachtern. Aus diesem Grund ist die Schmerzerkennung bei Frühgeborenen und reifen Neugeborenen problembehaftet. Die Schmerzerkennung ist jedoch der erste wichtige Schritt in der Schmerzbekämpfung und stellt dadurch ein bedeutendes Forschungsgebiet dar. Diese Studie untersuchte eine nicht-invasive Methode der Schmerzmessung bei Frühgeborenen und reifen Neugeborenen. Dafür wurde Spontanurin von 88 Frühgeborenen und reifen Neugeborenen gesammelt. War der Urin von Kindern, die einem möglicherweise gewebeschädigenden Eingriff ausgesetzt waren, wurde er der Gruppe der Schmerzpatienten zugeordnet. Es wurden jeweils mit einem Teil der Urinproben vier verschiedene Analysen durchgeführt. Die Parameter Prostaglandin-E-Metabolit, Leukotrien-B<sub>4</sub>, Glutamat und 17- $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron wurden untersucht, da ein Zusammenhang dieser Metabolite mit der Nozizeption nachgewiesen ist. Die Konzentrationen der Eikosanoide und des Neurotransmitters Glutamat wurden mit *Enzyme Linked Immunosorbent Assays* bestimmt. Mit dem Tandemmassenspektrometer und der *Ultra Performance Liquid Chromatography* wurde die Konzentration von 17- $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron gemessen. Die Konzentrationen der Schmerzpatienten wurden denen der Probanden der Kontrollgruppe gegenübergestellt. Die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests und des T-Tests zeigten signifikant höhere 17- $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron-Konzentrationen im Urin der Schmerzpatienten (5030,68 pmol/mol Kreatinin) im Vergleich zu den Kontrollprobanden (189,36 pmol/mol Kreatinin). Zudem war eine leichte Tendenz zu höheren Konzentrationen des Prostaglandin-E-Metaboliten zu sehen. Der

Konzentrationsunterschied von 17- $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron im Urin ist ein Ansatz einer objektiven Schmerzerfassung bei Frühgeborenen und reifen Neugeborenen. Eine Studie mit einer größeren Rekrutierungszahl für die Optimierung der Methodik und eine genauere Eingrenzung des Normbereichs ist für die Zukunft denkbar.

## **Englisch**

*Pain is a subjective feeling and one of the most frequent reasons for the consultation of a doctor. Nearly every person in the world suffers pain during his life. Actually, we only have the possibility to discover pain by asking the patient or observing his reactions. Different scales like the visual analogue scale or the faces pain scale are used in the hospital. Especially the determination of pain in preterm and term infants is difficult. Despite the widespread use of pain scales on neonatal wards the quantification of pain in neonatal patients is fairly subjective. The inability of verbal communication with preterm or term infants adds to the problem. The discovery of pain is the first step of a good therapy. This is the reason why we are looking for a non-invasive method to measure pain in preterm babies and term neonates by analysing the urine. 88 preterm and term infants took part in this study. Urinary concentrations of prostaglandin-e, leukotriene-b<sub>4</sub>, glutamate and 17- $\alpha$ -hydroxy-progesterone of patients with any kind of tissue damage potentially causing pain were analysed and compared to those of a healthy control group. For quantification enzyme linked immunosorbent assays, tandem-mass-spectrometry and ultra performance liquid chromatography were applied. A significant higher concentration of 17- $\alpha$ -hydroxy-progesterone in the urine of preterm babies and term neonates who had pain was the result of the Mann-Whitney-U-Test and the T-Test (5030,68 pmol/mol creatinine compared to 189,36 pmol/mol creatinine,  $p < 0,04$ ). Besides, we could show a trend towards higher concentration of the prostaglandin-e-metabolite in the group of the patients. The measurements of glutamate and leukotriene-b<sub>4</sub> did show no correlation between the markers and the feeling of pain. 17- $\alpha$ -hydroxy-progesterone may have the potential to be used as an objective marker of pain in this age group. A study with a bigger recruitment is needed to improve the method of measurement, to analyse the confounder and to limit the normal concentration of*

*17- $\alpha$ -hydroxy-progesterone in the urine of preterm babies and term neonates. This could be the next step in research.*

## Abkürzungsverzeichnis

<u>Abkürzung</u>	<u>Erläuterung</u>
<b>AChE</b>	Acetylcholinesterase
<b>17-<math>\alpha</math>-OHP</b>	17- $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron
<b>B0</b>	Maximale Bindung des <i>Tracers</i> an die Antikörper
<b>Blank</b>	Hintergrundabsorption
<b>bzw.</b>	Beziehungsweise
<b>°C</b>	Celsius
<b>C</b>	Konzentration
<b>CGRP</b>	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>CPAP</b>	<i>Continuous positive airway pressure</i>
<b>d.h.</b>	Das heißt
<b>dl</b>	Deziliter
<b>dtn</b>	<i>Determination</i> ; Ein dtn ist die Menge an Reagenz, die pro Vertiefung verwendet wird.
<b>EIA</b>	<i>Enzyme Immunoassay</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>EP1-4</b>	Prostaglandinrezeptor
<b>FPS-R</b>	<i>Faces Pain Scale-Revised</i>
<b>GABA</b>	$\gamma$ -Aminobuttersäure
<b>G-Protein</b>	Guanosintriphosphatbindendes Protein
<b>h</b>	Stunde
<b>HRP-Conjugate</b>	<i>Horseradish Peroxidase- Conjugate</i>
<b>KUSS</b>	Kindliche Unbehagens- und Schmerzskala
<b>kV</b>	Kilovolt
<b>l</b>	Liter



<b>LTB4</b>	Leukotrien-B4
<b>M</b>	Molar
<b>Med.</b>	Medizinisch
<b>mg</b>	Milligramm
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b>mM</b>	Millimolar
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>m/z</b>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>nm</b>	Nanometer
<b>NMDA</b>	N-Methyl-D-Aspartat
<b>nmol</b>	Nanomol
<b>NSB</b>	<i>Non-Specific-Binding</i>
<b>p.c.</b>	Post Conceptionem
<b>pg</b>	Pikogramm
<b>PGE-M</b>	Prostaglandin-E-Metabolit
<b>pmol</b>	Pikomol
<b>Psi</b>	Maßeinheit für Druck
<b>RDS</b>	<i>Respiratory Distress Syndrome</i>
<b>s</b>	Sekunde
<b>SPE</b>	<i>Solid Phase Extraction</i>
<b>Spots</b>	Vertiefungen
<b>SSW</b>	Schwangerschaftswoche
<b>Sx</b>	Mittelwerte der jeweiligen Absorption der Standards und der Proben
<b>TRPV</b>	Vanilloid-Rezeptor-Unterfamilie der <i>transient receptor potential channels</i>

<b>UPLC</b>	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
<b>V</b>	Volt
<b>VI</b>	<i>Vial</i>
<b>v/v</b>	<i>Volume/Volume</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organisation</i>

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Schmerzen.....	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Epidemiologie.....	1
1.1.3 Klassifikation und Ätiologie.....	3
1.1.4 Klinische Präsentation.....	4
1.1.5 Diagnostik.....	4
1.1.6 Pathogenese.....	7
1.1.7 Therapie.....	10
1.1.8 Rolle des Metaboliten Prostaglandin-E, von Leukotrien-B <sub>4</sub> , Glutamat und 17- $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron bei der Nozizeption.....	11
1.2 Ziele der Arbeit und aktueller Stand der Forschung.....	15
2. Material und Methoden.....	17
2.1 Allgemeine Methodik.....	17
2.1.1 Materialien und Geräte.....	17
2.1.2 Software.....	18
2.1.3 Probenherkunft und Probandencharakteristik.....	19
2.2 Prostaglandin-E-Metabolit.....	21
2.2.1 Materialien.....	22
2.2.2 Vorbereitung.....	23
2.2.3 Durchführung.....	25
2.2.4 Berechnung.....	26
2.3 Leukotrien-B <sub>4</sub> .....	30
2.3.1 Materialien.....	30
2.3.2 Vorbereitung.....	31

2.3.3 Durchführung .....	31
2.3.4 Berechnung .....	31
2.4 Glutamat .....	34
2.4.1 Materialien .....	34
2.4.2 Vorbereitung .....	35
2.4.3 Durchführung .....	35
2.4.4 Berechnung .....	36
2.5 17- $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron .....	41
2.5.1 Materialien .....	41
2.5.2 Vorbereitung .....	41
2.5.3 Durchführung .....	42
2.5.4 Berechnung .....	44
2.5.5 Statistische Auswertung .....	47
2.5.5.1 Mann-Whitney-U-Test .....	47
2.5.5.2 T-Test .....	50
3. Ergebnisse .....	51
3.1 Prostaglandin-E-Metabolit .....	51
3.2 Leukotrien-B4 .....	54
3.3 Glutamat .....	56
3.4 17- $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron .....	58
3.4.1 Grafische Darstellung der Konzentration von 17- $\alpha$ -OHP im Urin der Schmerzpatienten im Vergleich zu den Konzentrationen der Kontrollprobanden .....	60
4. Diskussion .....	61
4.1 Einleitung in die Diskussion .....	61
4.2 Auswahl der Parameter .....	62

4.2.1 Prostaglandin-E-Metabolit und Leukotrien-B4 .....	63
4.2.2 Glutamat .....	64
4.2.3 17- $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron .....	65
4.3 Ergebnisdiskussion.....	65
4.3.1 Prostaglandin-E-Metabolit .....	65
4.3.2 Leukotrien-B4 .....	68
4.3.3 Glutamat .....	68
4.3.4 17- $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron .....	72
5. Schlussfolgerung/Ausblick .....	77
6. Literaturverzeichnis .....	79

# 1. Einleitung

## 1.1 Schmerzen

### 1.1.1 Definition

Schmerz ist ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit einer aktuellen oder potentiellen Gewebeschädigung in Zusammenhang steht (Merskey et al., 1979). Diese Definition des Schmerzes wurde erstmalig 1979 von 14 Wissenschaftlern verschiedener Disziplinen im Rahmen der *International Association for the Study of Pain* festgelegt und dient seitdem als Diskussionsgrundlage in der Schmerzforschung.

### 1.1.2 Epidemiologie

Schmerz ist eines der häufigsten Symptome, das zu einer Konsultation des Kinderarztes führt (Heinrich et al., 2010). 1999 wurde die Prävalenz von Schmerzen in der deutschen Bevölkerung anhand des Gießener Beschwerdebogens von Brähler und Scheer untersucht. Dabei erfolgten in der Bundesrepublik Deutschland zwei voneinander unabhängige Querschnittserhebungen zu den Zeitpunkten Mai/Juni 1975 und November 1994. Die Stichprobe der ersten Erhebung umfasste 1597 Probanden und die der zweiten Befragung 2182 Personen im Alter von 18 bis 60 Jahren. Die Ergebnisse der zwei Querschnittserhebungen lieferten eine relative Häufigkeit in Bezug auf das Symptom Rückenschmerzen von 60,7% im Jahr 1975 und 61,9% im Jahr 1994. Zudem zeigte sich ein signifikanter Anstieg (mit  $p < 0,001$ ) der relativen Häufigkeiten von Kopf-, Glieder- und Nackenschmerzen im Jahre 1994 im Vergleich zu den Häufigkeiten aus dem Jahr 1975. Zu dem Erhebungszeitpunkt 1994 litten 67,3% der Befragten an Kopfschmerzen, 57,2% an Nackenschmerzen und 49,4% an Gliederschmerzen. Im Vergleich dazu sind die relativen Häufigkeiten zu dem Zeitpunkt 1975 mit 59% bezüglich Kopf-, 42,3% hinsichtlich Nacken- und mit 41,2% bezogen auf Gliederschmerzen aufgeführt. Die Ätiologie und die Dauer der bestehenden Schmerzen wurden bei der Studie nicht erfasst (Schumacher und Brähler, 1999). Dennoch wird deutlich, dass Schmerz ein häufiges Symptom ist, das nahezu jeder Mitbürger unserer Bevölkerung bereits erlebt hat.

## Die zehn häufigsten Beschwerden in der deutschen Bevölkerung 1975 und 1994

Tabelle 2

### Die 10 häufigsten Beschwerden in der deutschen Bevölkerung 1975 und 1994

1975		1994	
GBB-Items <sup>a</sup> (Kurztext)	Relative Häufigkeit <sup>b</sup>	GBB-24-Items (Kurztext)	Relative Häufigkeit <sup>b</sup>
1. Müdigkeit	66,8% (13,1%)	Kopfschmerzen	67,3% (10,4%)
2. Rückenschmerzen	60,7% (19,0%)	Rückenschmerzen	61,9% (15,6%)
3. Kopfschmerzen	59,0% (13,8%)	Nackenschmerzen	57,2% (13,7%)
4. Schwitzen	50,4% (14,2%)	Müdigkeit	54,0% (7,6%)
5. Schlafbedürfnis	49,6% (15,4%)	Mattigkeit	50,8% (4,5%)
6. Herzklopfen	46,4% (11,1%)	Schlafbedürfnis	50,6% (10,3%)
7. Mattigkeit	43,1% (6,0%)	Gliederschmerzen	49,4% (10,9%)
8. Gewichtszunahme	42,9 % (8,3%)	Erschöpfbarkeit	39,8% (5,0%)
9. Nackenschmerzen	42,3% (12,9%)	Schwächegefühl	38,9% (2,3%)
10. Gliederschmerzen	41,2% (12,3%)	Völlegefühl	38,8% (4,4%)
...	...	...	...
12. ...	...	Magenschmerzen	36,3% (2,7%)
...	...	...	...
22. Magenschmerzen	32,4% (5,3%)	...	...

<sup>a</sup> Die Items „Schwitzen“ und „Gewichtszunahme“ sind nicht im GBB-24 enthalten und wurden deshalb 1994 nicht erhoben

<sup>b</sup> Summe der Antwortkategorien „kaum“, „einigermaßen“, „erheblich“ und „stark“ (in Klammern nur Summe von „erheblich“ und „stark“)

1975: n=1597 (18–60 Jahre)

1994: n=2182 (18–60 Jahre)

Abb.1, Die zehn häufigsten Beschwerden in der deutschen Bevölkerung 1975 und 1994 (Schumacher und Brähler, 1999)

Ebenso kommt es im Kindes- und Jugendalter zu Schmerzerleben. In einer explorativen-epidemiologischen Studie zu Schmerzen bei Kindern und Jugendlichen wurden 991 Fragebögen in Hinsicht auf die Dreimonatsprävalenz von Schmerzen bei Kindern und Jugendlichen im Alter zwischen null und 20 Jahren erhoben. Die

Dreimonatsprävalenzen betragen im Bereich von Kopfschmerzen 57%, 43,2% für Bauchschmerzen, 32,9% für Rückenschmerzen, 41,6% für Arm- und Beinschmerzen und 66,3% für Schmerzen mit mehreren Lokalisationen. 63,2% der Kinder, die ihre Schmerzen anhand der visuellen Analogskala als stark (7-10) einstufen, haben ärztliche Hilfe in Anspruch genommen und wurden in über der Hälfte der Fälle medikamentös behandelt. Die Studie lieferte zudem einen Hinweis auf eine mögliche Schmerzchronifizierung bereits im Kindes- und Jugendalter. Die höchsten Schmerzprävalenzraten wurden in der Altersgruppe zwischen 12 und 15 Jahren festgestellt. Dies kann auf die beginnenden Regelschmerzen der weiblichen Studienteilnehmer zurückzuführen sein (Roth-Isigkeit et al., 2003). Jedoch wurde die Schmerzbeurteilung rein subjektiv vorgenommen, weshalb besonders in der Altersgruppe zwischen null und drei Jahren die Aussagekraft eines Fragebogens kritisch zu bewerten ist.

### **1.1.3 Klassifikation und Ätiologie**

Das Symptom Schmerz wird nach unterschiedlichen Gesichtspunkten eingeteilt. Zeitlich unterscheidet man den akuten von dem chronischen Schmerz. Der akute Schmerz ist in der Regel an erkennbare Auslöser gekoppelt und dauert Sekunden bis Wochen, während der chronische Schmerz die Heilungszeit überdauert. Der chronische Schmerz wurde zum ersten Mal 1953 als ein Schmerz, der „*persists past the normal time of healing*“, definiert (Bonica, 1953). Aus dieser Definition wird jedoch nicht deutlich, wie die „*normal time*“ zeitlich konkret festgelegt ist. Deshalb wird in neueren Definitionen unter dem Begriff chronischer Schmerz ein über drei bis sechs Monate andauerndes Schmerzempfinden verstanden (Merskey, 1983). In der hier durchgeführten Studie zu der Etablierung einer nicht-invasiven Methode der Schmerzmessung wurden Kinder mit akuten Schmerzen untersucht.

Ätiologisch lässt sich der Schmerz in den nozizeptiven, den neuropathischen und den funktionellen Schmerz gliedern. In dieser Studie soll besonders der physiologische, d.h. der Nozizeptorenschmerz berücksichtigt werden.



### **1.1.4 Klinische Präsentation**

Laut Definition ist Schmerz ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, welches rein subjektiv beschrieben werden kann. Als Folge dessen präsentiert sich der Patient klinisch individuell unterschiedlich. Motorische und verbale Äußerungen sowie die Mimik und Gestik des Patienten können auf ein Schmerzempfinden hindeuten. Darauf bauen verschiedene Skalen, mit denen man die Stärke des Schmerzes beurteilen können soll, auf. Näheres dazu wird im folgenden Abschnitt der Diagnostik des Schmerzes erläutert.

### **1.1.5 Diagnostik**

Die Diagnostik des Schmerzes stellt seit je eine große Hürde dar. Im klinischen Alltag werden häufig Skalen verwendet. Hierbei spielt zum Beispiel die visuelle Analogskala eine große Rolle. Bei dieser Skala erstreckt sich eine Linie zwischen den zwei Endpunkten, überhaupt kein Schmerz bis zu unerträglichem Schmerz. Der Patient kann nach entsprechender Erläuterung sein subjektives Schmerzempfinden auf dieser Linie eintragen (Bangert und Tolksdorf, 1984). Anhand der Skala kann der klinische Verlauf als auch die Notwendigkeit medikamentöser Therapien beurteilt werden.

Im Kindesalter spielt die Schmerzerfassung eine besondere Rolle. Hier wird in Abhängigkeit vom Alter zwischen Skalen mit Selbsteinschätzung und Fremdbeobachtung unterschieden. Im Säuglings- und Kleinkindalter stützt man sich im Rahmen des postoperativen Managements auf die Kindliche Unbehagens- und Schmerzskala (KUSS) von Büttner. Bei dieser Skala werden, nach Befriedigung der Grundbedürfnisse, um weitere Ursachen für ein Unwohlsein auszuschalten, die fünf Aspekte, Weinen, Gesichtsausdruck, Rumpfhaltung, Beinhaltung und motorische Unruhe, über einen Zeitraum von 15s beurteilt und ein Punktwert zwischen null und zehn Punkten vergeben. Ab einem Punktwert von vier Punkten bestehe Therapiebedarf (Büttner, 1998).

<b>KUSS – Kindliche Unbehagens- und Schmerz-Skala</b>		
<b>Beobachtung</b>	<b>Bewertung</b>	<b>Punkte</b>
Weinen	Gar nicht	0
	Stöhnen, Jammern, Wimmern	1
	Schreien	2
Gesichtsausdruck	Entspannt, lächelnd	0
	Mund verzerrt	1
	Mund und Augen grimassieren	2
Rumpfhaltung	Neutral	0
	Unstet	1
	Aufbäumen, Krümmen	2
Beinhaltung	Neutral	0
	Strampelnd, tretend	1
	An den Körper gezogen	2
Motorische Unruhe	Nicht vorhanden	0
	Mäßig	1
	Ruhelos	2
Addition der Punkte:		

Abb.2, KUSS-Kindliche Unbehagens- und Schmerz-Skala (Büttner, 1998)

Ist das Kind vier Jahre oder älter und kann eine Selbsteinschätzung vornehmen, wird die Bieri-Gesichter-Skala verwendet (Hicks, 2001).

### ***Faces Pain Scale-Revised nach Hicks (FPS-R)***



Abb.3, *Faces Pain Scale-Revised nach Hicks (FPS-R)* (Hicks, 2001)

Ab dem zehnten Lebensjahr kann die Schmerzeinschätzung ähnlich wie bei den Erwachsenen anhand von Analogskalen erfolgen.

Neben der Schmerzerfassung anhand von Schmerzskalen gibt es bisher unterschiedliche Ansätze, um Schmerzen zu objektivieren. Diese konnten in der klinischen Routine aus verschiedenen Gründen jedoch nicht gefestigt werden. So bietet die alleinige Beobachtung von Vitalparametern, wie der Herz- und Atemfrequenz und/oder der Sauerstoffsättigung keine sichere Information über das Vorhandensein von Schmerzen. Die Parameter sind zu unspezifisch und unterliegen zahlreichen Einflussfaktoren. Anhand der Werte lässt sich vor allem eine Aussage in Bezug auf den Distress des Patienten treffen (Büttner und Finke, 2000). Zudem wurde erforscht, dass Operationen und Traumata zu einer Freisetzung von Stresshormonen in das Blut führen. Die routinemäßige Analyse dieser Werte im Labor konnte sich im klinischen Alltag wegen des hohen Aufwandes nicht etablieren. (Denecke und Hünseler, 2000). Die Stresshormone (Katecholamine und Kortikosteroide) sind außerdem, genau wie die Vitalparameter, zu unspezifisch in

Bezug auf das Symptom Schmerz und eine laborchemische Untersuchung des Blutes würde eine an sich schmerzhaftes Blutentnahme bedingen.

Alles in allem besteht die Diagnostik des Schmerzes aktuell aus einer subjektiven Selbst- und/oder Fremdeinschätzung.

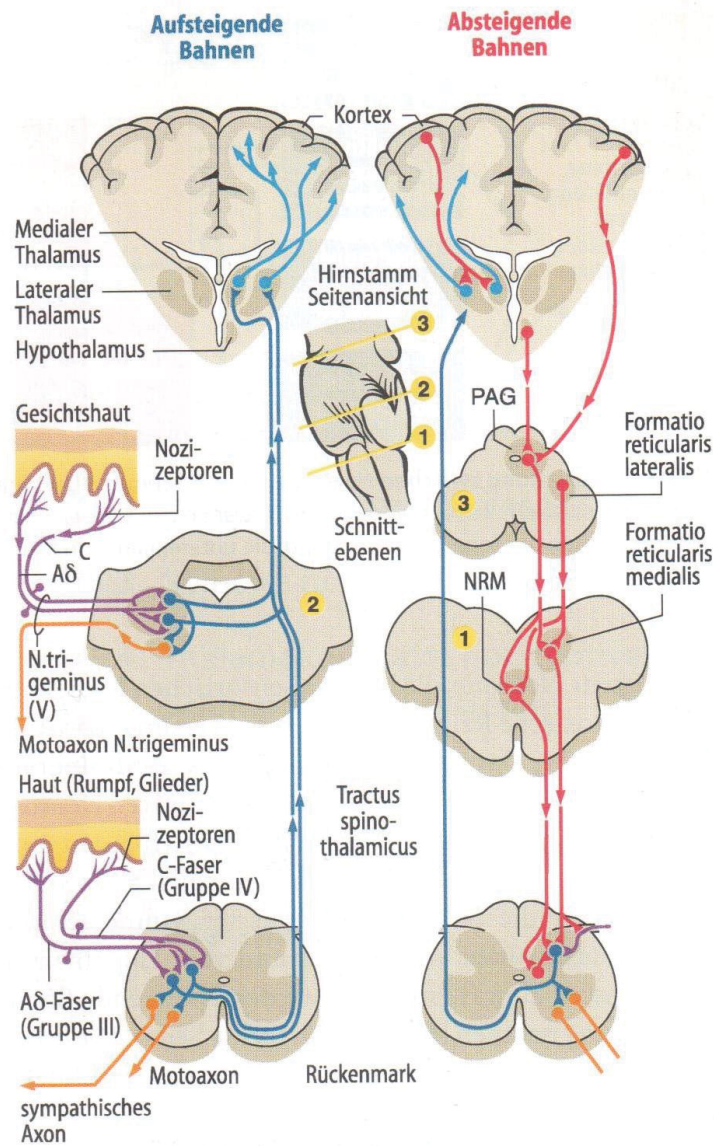
### **1.1.6 Pathogenese**

„Während Schmerz das bewusste subjektive Sinnes- und Gefühlserebnis ist, das durch gewebeschädigende Reize ausgelöst wird, umfasst der Ausdruck Nozizeption die objektiven Vorgänge, mit denen das Nervensystem noxische Reize aufnimmt und verarbeitet“ (Schmidt et al., 2010). In der Peripherie wird der mechanische, thermische oder chemische Reiz mit sensorischen Nervenendigungen wahrgenommen und in elektrische Potentiale umgewandelt. Dabei gibt es verschiedene Transduktionsmechanismen. Mechanische Reize führen über die Aktivierung von Kationenkanälen zu einer Depolarisation, thermische Reize aktivieren Rezeptoren der Vanilloid-Rezeptor-Unterfamilie der *transient receptor potential channels* (TRPV-Rezeptoren) und chemische Reize wirken über Guanosintriphosphat-Protein (G-Protein) -gekoppelte Rezeptoren. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren werden durch Bindung von Gewebsmediatoren wie Bradykinin und Prostaglandin aktiviert. Das elektrische Potential wird in unmyelinisierten C- sowie in dünn myelinisierten A $\delta$ -Fasern zu dem Rückenmark, beziehungsweise (bzw.) dem Trigeminskern geleitet. Die Transformation in ein Aktionspotential findet in den C- und den A $\delta$ -Fasern statt. Mechanorezeptoren und Nozizeptoren schütten an der Synapse den Neurotransmitter Glutamat aus. Zudem werden bei peptidergenen Nozizeptoren gleichzeitig die Peptide Substanz P und *Calcitonin Gene-Related Peptide* (CGRP) frei. Die Depolarisation des Rückenmarkneurons erfolgt nach Aktivierung der N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA-) und metabotropen Glutamatrezeptoren. Durch die Neuropeptide Substanz P und CGRP kann es zu einer verstärkten Wirkung des Glutamats kommen. Inhibitorische Interneurone, die als Transmitter  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) und/oder Glyzin oder hemmende Neuropeptide haben, wirken den erregenden Vorgängen entgegen. Die Tracti Spinothalamicus und Spinoreticularis kreuzen das Rückenmark auf Höhe der

Neuronen und leiten das Aktionspotential weiter an den Thalamus. Befindet sich das thalamokortikale System in einem Wachzustand, wird das Schmerzempfinden bewusst wahrgenommen und in Beziehung zu zahlreichen anderen neuronalen Funktionen gesetzt (Schmidt et al., 2010). „Der Hinterstrang ist das zweite wichtige aufsteigende Leitungssystem. Er spielt bei der Nozizeption keine wesentliche Rolle, hat aber wichtige Ergänzungsfunktionen für den Vorderseitenstrang. Unter anderem spielt er bei der afferenten Hemmung eine wichtige Rolle“ (Weckermann et al., 1999).

Des Weiteren beteiligt sich das endogene Schmerzkontrollsystem an der Schmerzverarbeitung. Dabei handelt es sich um deszendierende Bahnen des Hirnstamms. Sie führen über Mediatoren, wie endogene Opiode und inhibitorische Transmitter zu einer tonischen Hemmung der Rückenmarkszellen und beeinflussen dadurch die Wahrnehmung der Schmerzintensität (Schmidt et al., 2010).

## Das nozizeptive System



■ **Abb. 15.2. Das nozizeptive System.** Links: Nervenzellen und Nervenbahnen des peripheren und zentralen Nervensystems, die noxische Reize aufnehmen und verarbeiten. Rechts: Absteigende Systeme, die die nozizeptive Verarbeitung im Rückenmark hemmen (deszendierende Hemmung) oder bahnen. Die Einsatzfigur gibt in einer Seitenansicht des Hirnstamms die Lage der Hirnstammsschnitte an. (1) Kranialer Rand der unteren Olive. (2) Mitte des Pons. (3) unteres Mesenzephalon. PAG periaquäduktales Grau, NRM Nucleus raphe magnus

Abb.4, Das nozizeptive System (Schmidt et al., 2010)

### 1.1.7 Therapie

Die Therapie akuter Schmerzen sollte eine multimodale Therapie sein. Diese umfasst neben der medikamentösen Therapie physikalische sowie psychologische Maßnahmen (Heinrich et al., 2010). Das Stufenschema der *World Health Organisation (WHO)* bietet eine Grundlage für die medikamentöse Unterstützung, die individuell für jeden Patienten in Abhängigkeit von der Intensität und der Art der Schmerzen angepasst werden muss. „Die wesentlichen Prinzipien der perioperativen Schmerzdiagnostik und -therapie bei Erwachsenen gelten auch im Kindesalter“ (Jaksch et al., 2014). Dies bedeutet, dass, wie im *WHO*-Stufenschema vorgegeben, schwache Schmerzen mit einem Nicht-Opioid-Analgetikum, mittelstarke mit einer Kombination aus Nicht-Opioid-Analgetikum und einem schwachen Opioid und starke Schmerzen mit einem höher potenten Opioid in Kombination mit einem Nicht-Opioid-Analgetikum therapiert werden sollen (Heinrich et al., 2010).

Im Bereich der Schmerztherapie von Kindern und Jugendlichen ist aufgrund der teilweise unreifen Stoffwechselfvorgänge bei der Auswahl der Medikamente Vorsicht geboten. Zudem gibt es nur für einen Teil der bekannten Schmerztherapeutika eine Zulassung für die Altersgruppe unter 18 Jahren. Trotzdem ist eine adäquate Schmerztherapie in Widerspruch zur veralteten Meinung bereits ab der Geburt sinnvoll, da „selbst kleinste Frühgeborene (...) nach der Geburt auf nozizeptive Reize (reagieren) und (...) die Fähigkeit (haben), Schmerzen zu empfinden“ (Jaksch et al., 2014).

Paracetamol ist eine schwach wirkende analgetische Substanz, die bereits ab der Geburt zugelassen ist und über eine Hemmung der Prostaglandinbiosynthese die Nozizeption beeinflusst. Opioidanalgetika greifen auf verschiedenen Ebenen des nozizeptiven Systems an und wirken über die Opioidrezeptoren  $\mu$ ,  $\delta$  und  $\kappa$ . Eine verminderte Schmerzwahrnehmung wird erreicht durch die Aktivierung von hemmenden Interneuronen, eine verminderte Potentialweiterleitung im Hinterhorn des Rückenmarks, die Modulation des Schmerzerlebens sowie der Hemmung der Wahrnehmung von noxischen Reizen an den sensorischen Nervenenden. Von den

Opioiden ist Morphin das am besten untersuchte Opioid in der therapeutischen Anwendung bei Kindern (Heinrich et al., 2010).

### **1.1.8 Rolle des Metaboliten Prostaglandin-E, von Leukotrien-B4, Glutamat und 17- $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron bei der Nozizeption**

Prostaglandine und Leukotriene gehören zu der Gruppe der Eicosanoide und werden aus der vierfach ungesättigten C20-Fettsäure, der Arachidonsäure, hergestellt. Die Freisetzung erfolgt auf den Stimulus von Mediatoren, die bei einer Gewebeschädigung und/oder einer Entzündung aktiviert werden. Die Enzyme Cyclooxygenase und Lipoxygenase bilden aus der Arachidonsäure die Prostaglandine und Leukotriene.

Prostaglandine der Reihe E, besonders der Metabolit Prostaglandin-E2 können Nozizeptoren sensibilisieren. Deshalb setzt man schmerztherapeutisch Medikamente zur Hemmung des Enzyms Cyclooxygenase ein (Weckermann et al., 1999). Prostaglandin-E2 wirkt über vier verschiedene Rezeptoren. Die drei Gs-Protein-gekoppelten Rezeptoren EP1, EP2 und EP4 führen bei Bindung des Liganden zu einer vermehrten Freisetzung des cyclischen Adenosinmonophosphats und dadurch zu einer Sensibilisierung der Nervenfasern. Der Rezeptor EP3 ist dagegen Gi-Protein gekoppelt und beteiligt sich am Kontrollsystem der Nozizeption (Natura et al., 2013). Weiterhin findet nach Aktivierung von Prostaglandin-E2 eine vermehrte Natriumkanalbildung statt, wodurch die Weiterleitung von nozizeptiven Afferenzen positiv beeinflusst wird (Freye, 2008). In einigen Studien im Rahmen der Migräneforschung konnten bereits Zunahmen der PGE-Konzentrationen im Speichel, dem Blut oder in der Nasenlavage gezeigt werden. So wurde eine erhöhte Konzentration (C) des Parameters in der Nasenlavage nach tonischer Schmerzreizung mittels kalter, trockener Luft festgestellt (Mintsioglou, 2012).

Leukotrien-B4 (LTB4) ist ebenfalls am Entzündungsgeschehen beteiligt und sensibilisiert die Nozizeptoren (Schüllner und Mur, 2012). Bei 18 von 19 Patienten mit *painful dysfunctional temporomandibular joints* wurden erhöhte PGE2 und LTB4 Konzentrationen im Speichel gemessen (Quinn und Bazan, 1990).



## Ionenkanäle und Rezeptoren für Mediatoren in Nozizeptoren

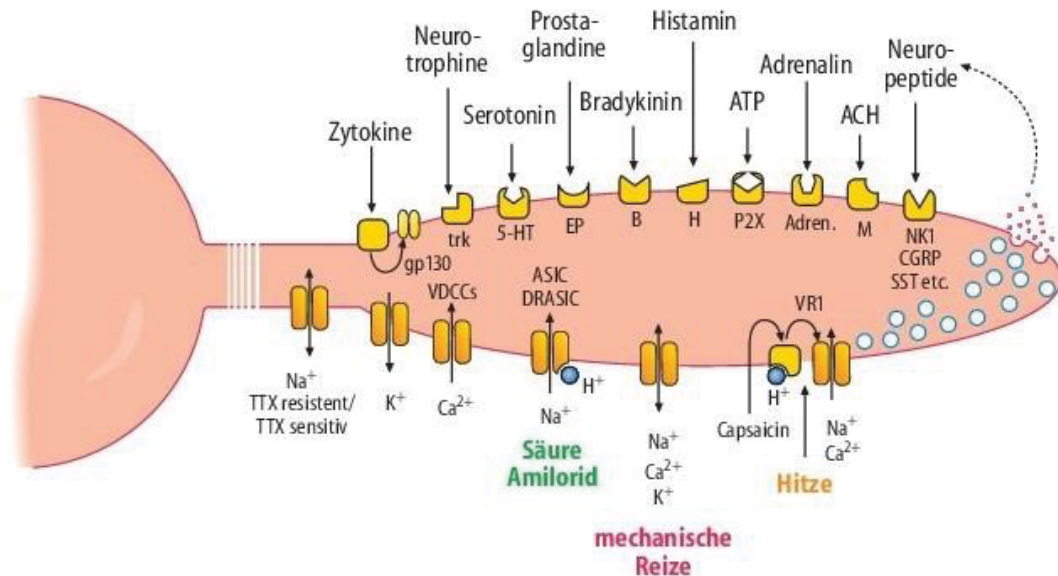
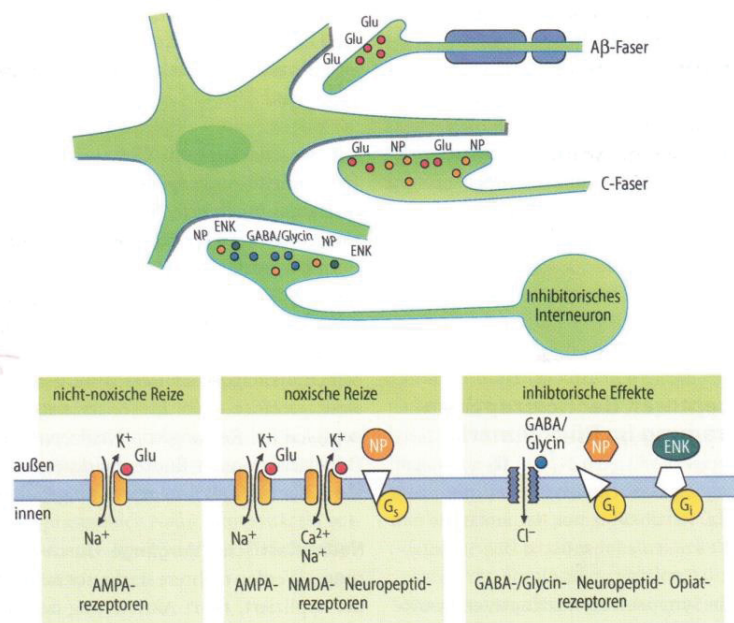


Abb.5, Ionenkanäle und Rezeptoren für Mediatoren in Nozizeptoren (Schmidt et al., 2010)

Glutamat ist der exzitatorische Neurotransmitter des aufsteigenden nozizeptiven Systems (Schmidt et al., 2010). Auf spinaler Ebene spielen die Glutamatrezeptoren eine wesentliche Rolle und dienen beispielsweise dem Narkotikum Ketamin als Angriffspunkt (Konrad und Schmelz, 2005). Bindet Glutamat an den postsynaptischen Rezeptor, kommt es zu einem Calciumeinstrom in die Nervenzelle und es erfolgt die Depolarisation dieser Zelle. Ist die Depolarisation der Nervenzelle stark genug, wird der Magnesiumblock des NMDA-Rezeptors aufgehoben. Dies geschieht bei starken Schmerzreizen durch die gleichzeitige Bindung von Glutamat und Substanz P (Sandkühler, 2001). Das Calcium kann intrazellulär verschiedene Signalwege starten und das Aktionspotential kann an den Thalamus weitergeleitet werden.

## Synaptische Übertragung im Rückenmark



■ **Abb. 15.8. Synaptische Übertragung im Rückenmark.** Eine Rückenmarkszelle erhält erregende Eingänge von einem Mechanorezeptor (Aβ-Faser), einem Nozizeptor (C-Faser) und hemmende Eingänge von einem Interneuron. Unten dargestellt sind Rezeptoren für diese Mediatoren in der postsynaptischen Membran. *Glu* Glutamat, *NP* Neuropeptid, *G<sub>s</sub>* stimulierendes G-Protein, *G<sub>i</sub>* G-Protein mit hemmender Wirkung, *Enk* Enkephalin

Abb.6, Synaptische Übertragung im Rückenmark (Schmidt et al., 2010)

In der Studie von Fayed wurden bei Patienten mit kognitiven Erkrankungen wie Alzheimer, aber auch bei Patienten mit schmerzassoziierten Krankheiten (Fibromyalgie, Migräne, Trigeminusneuralgie) erhöhte Glutamatlevel im posterioren cingulären Cortex beschrieben (Fayed et al., 2014). Außerdem wurde ein erhöhtes spinales Glutamat/GABA-Verhältnis bei neuropathischen Schmerzen in einem Tierversuch mit Mäusen bewiesen (Shen et al., 2014) und in Anwendung eines Hyperalgesiemodells an Ratten wurden erhöhte Konzentrationen von Stoffwechselprodukten des Glutamatmetabolismus im Urin nachgewiesen (Liu et al., 2016).

17- $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron (17- $\alpha$ -OHP) wird im Rahmen der Steroidbiosynthese in mehreren Schritten aus dem Cholesterin in der Nebennierenrinde gebildet und

weiter zu Cortisol verstoffwechselt. Das Enzym der Reaktion für die Herstellung des Produktes 17- $\alpha$ -OHP ist die 17 $\alpha$ -Hydroxylase.

## Steroidbiosynthese

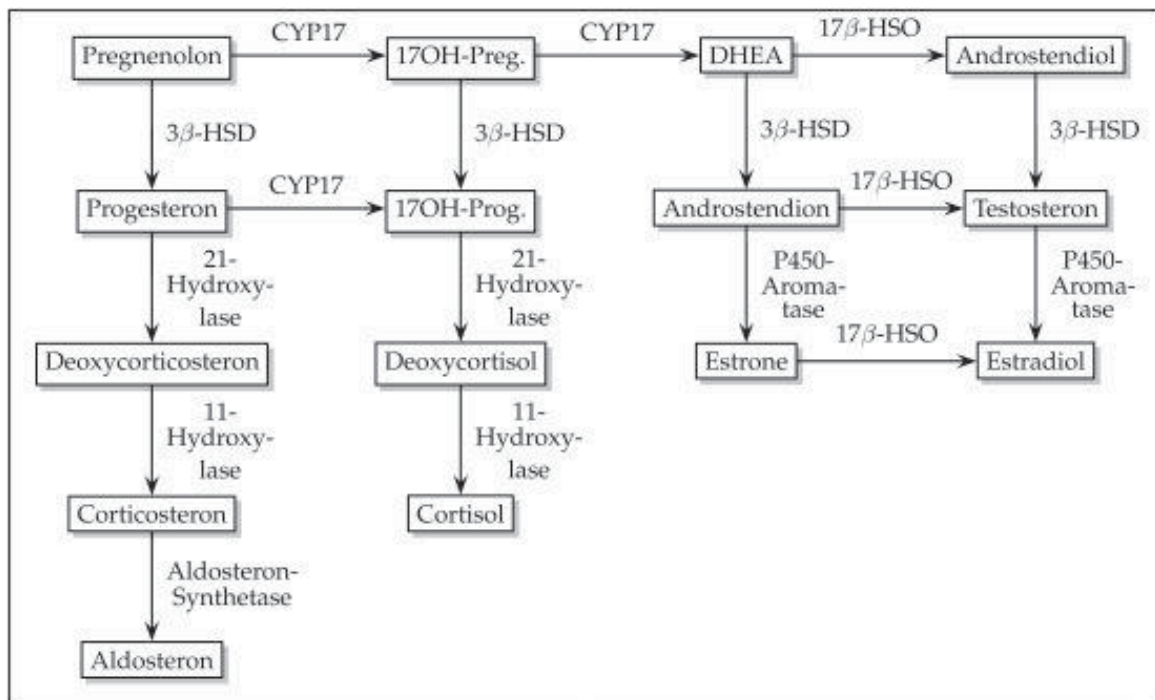


Abb.7, Steroidbiosynthese (Benninghoff, 1993)

Gesteuert wird die 17- $\alpha$ -OHP-Synthese über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse, deren Funktion für das extrauterine Leben unabdingbar ist. Cortisol ist als sogenanntes Stresshormon bekannt. „*Stress is the nonspecific response of the body to any demand. A stressor is an agent that produces stress at any time*“ (Selye, 1976). Die Nozizeption bzw. das Empfinden des Symptoms Schmerz ist ein möglicher Stressor mit Auswirkung auf die Hypothalamus-Hypophysen-Achse (Grunau et al., 2005). So zeigten humane Studien eine Deprivation der Glucocortikoidlevel sowohl bei Kindern, deren Mutter pränatal vermehrt Stress ausgesetzt war, als auch bei Kindern, die postnatal selber Stress durch Abwesenheit der Mutter erlebt haben (Lupien et al., 2009).

Basierend auf dem „*Life Cycle Model of Stress*“ (Lupien et al., 2009) wurde die Studie mit dem Titel „*Pain-Associated Stressor Exposure and Neuroendocrine Values for Premature Infants in Neonatal Intensive Care*“ aufgebaut. In dieser Studie wurde der Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von 17- $\alpha$ -OHP und Cortisol im Blut und den ausgesetzten Stressoren, wie der maschinellen Beatmung und gewebeverletzenden Eingriffen, untersucht. 59 Frühgeborene, die vor der 35. Schwangerschaftswoche (SSW) geboren und seit der Geburt für zwei Wochen auf der Intensivstation betreut wurden, wurden für die Studie rekrutiert. In der Studie wurde eine signifikante negative Korrelation zwischen den gewebebeschädigenden Eingriffen und der 17- $\alpha$ -OHP-Konzentration im Blut entdeckt (Rohan, 2016). Diese neue Erkenntnis in der Forschung in Bezug auf die Auswirkung von gewebeverletzenden Eingriffen auf Frühgeborene macht eine mögliche Korrelation der Konzentration von 17- $\alpha$ -OHP im Urin und einem Schmerzempfinden wahrscheinlich. Dass Metabolite von 17- $\alpha$ -OHP mit dem Urin ausgeschieden werden und dort messbar sind, ist aus verschiedenen Studien zu dem Neugeborenenenscreening auf einen 21-Hydroxylase-Defekt bekannt (Christakoudi et al., 2013; Kamrath et al., 2016; Alonso-Fernández, 2016).

## **1.2 Ziele der Arbeit und aktueller Stand der Forschung**

Das Symptom Schmerz ist eine der häufigsten Ursachen für die Konsultation des Arztes. Jeder Mensch verspürt im Laufe seines Lebens eine Art des Schmerzes. Dennoch hinkt die Schmerzforschung hinterher. Die Meinung der Mediziner in den 60er Jahren und früher, dass Neugeborene kein Schmerzempfinden haben, ist überholt. Anand, K. J. S. gilt als einer der Vorreiter der 80er Jahre, der ein Benefit der Schmerztherapie bei Frühgeborenen und reifen Neugeborenen beschrieb. Laut seiner Studie zu der Anästhesie mit Fentanyl während der Ligation des Ductus Arteriosus Botalli, zeigten sich sowohl signifikant höhere Konzentrationen von Adrenalin, Noradrenalin, Glukagon, Aldosteron, Kortikosteroiden, 11-Deoxycorticosteroid, Glukose, Laktat und Pyruvat im Plasma als auch ein signifikant erhöhter Wert des Verhältnisses von Dreimethylhistidine zu Kreatinin im Urin (Anand

et al., 1987). Im Verlauf der Jahre forderten immer mehr Wissenschaftler den Gebrauch der Analgesie bei Frühgeborenen und reifen Neugeborenen.

Eine weitere Studie befasste sich mit der Schmerzantwort von Neugeborenen im Rahmen einer Zirkumzision. Dabei wurde ebenfalls ein linearer Trend hinsichtlich des Schmerzscore und des prozentualen Anteils des Weins während der Operation zwischen den drei Gruppen festgestellt. Die beobachteten Neugeborenen wurden in die Placebo-, die nicht operierte und die analgesierte Gruppe untergliedert. Die Studie zeigte zudem, dass die Jungen mit einer Zirkumzision noch Monate nach der Operation signifikant stärker auf den Schmerzreiz einer Impfung reagierten. Inadäquat behandelte Schmerzen haben folglich langfristige Auswirkungen (Taddio et al., 1997).

Frühgeborene und reife Neugeborene besitzen ein Schmerzempfinden. Dabei ist die Entwicklung dieses Empfindens ein kontinuierlicher Prozess. Die Bundesärztekammer der Bundesrepublik Deutschland hat in einer Stellungnahme von 1991 folgende Befunde zusammengefasst: Vor der achten Woche post conceptionem (p.c.) bestehe keine morphologische Verbindung für die Schmerzleitung aus der Peripherie in Richtung spinaler Ebene. Anschließend entwickle sich eine funktionell wirksame Vernetzung bis zur 21. Woche p.c.. „Mit der Ausbildung thalamokortikaler Fasern und der Bildung entsprechender Synapsen mit Neurotransmittern von der 22. Woche p. c. an, ist die peripher beginnende Nozizeption auch neuro-physiologisch und neurochemisch „durchgeschaltet“ bis zur Großhirnrinde, sodass zu diesem Zeitpunkt ein (wie auch immer gestaltetes) Schmerzerlebnis des Feten zunehmend wahrscheinlich ist“ (Bachmann et al., 1991).

Besonders auf einer Intensivstation müssen viele der bereits körperlich beanspruchten Frühgeborenen und reifen Neugeborenen zahlreiche schmerzhaftes Prozeduren über sich ergehen lassen. Obwohl die medizinischen Eingriffe von einer ausreichenden Analgesie begleitet werden sollten, ist dies nicht immer der Fall (Carbajal et al., 2008).

In den letzten Jahren kam man weiterhin zu der Erkenntnis, dass Frühgeborene vulnerabler auf einen Schmerzreiz reagieren als reife Neugeborene (Grunau et al., 2006). Deshalb sind etablierte Richtlinien für den Einsatz der Schmerztherapie von

großer Bedeutung. Den ersten Schritt stellt dabei das Erkennen von Schmerzen dar. Dies ist bei Frühgeborenen und reifen Neugeborenen aufgrund ihrer sehr eingeschränkten Kommunikationsfähigkeit erschwert. Wie aus den bisherigen Ausführungen hervorgeht, können die Schmerzen anhand von Fremdbeurteilungsskalen wahrgenommen werden. Das Bewertungssystem ist dabei rein subjektiv. Die objektive Analyse von biochemischen Parametern wurde zum Beispiel in der Fentanylstudie von 1987 und in der aktuellen Studie in Bezug auf die Auswirkung von gewebeverletzenden Eingriffen auf 17- $\alpha$ -OHP im Blut untersucht. Bisher konnte jedoch noch kein schmerzspezifischer Parameter gefunden werden, der im klinischen Alltag verwendet werden kann, um Schmerzen bei Frühgeborenen und reifen Neugeborenen zu quantifizieren. Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung einer möglichen non-invasiven Schmerzmessung bei Frühgeborenen und reifen Neugeborenen, indem die Konzentrationen des Metaboliten Prostaglandin-E (PGE-M), von Leukotrien-B<sub>4</sub>, 17- $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron und Glutamat im Urin der Studienteilnehmer bestimmt und die in der Patientengruppe festgestellten Konzentrationen mit denen der Kontrollgruppe verglichen werden. Mit diesem Vorgehen soll die Schmerzforschung einen weiteren Schritt vorangetrieben werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Allgemeine Methodik

#### 2.1.1 Materialien und Geräte

Name, Hersteller, Geräte-ID
Urinbeutel: Dahlhausen, PZN 7485590, REF 76.380.42.0001
Kompressen: Medicomp extra, 7,5x7,5cm
Pipetten: Eppendorf <i>Research</i>
<i>UltraPure Water</i>
Zentrifuge: Labofuge 400, Heraeus <i>Instruments, function line</i> , Medizinische (Med.) Einrichtung der Heinrich-Heine-Universität, Geräte-ID: 50748; Eppendorf Zentrifuge 5424, Geräte-ID: 73011

<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) READER: infinite M200 von Tecan, Med. Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Geräte-ID: 55044</i>
<i>Prostaglandine E Metabolite Enzyme Immunoassay (EIA) Kit (514531), Cayman Chemical Company</i>
<i>Human Leukotriene-B4 ELISA Kit, Number: MBS017082, MyBioSource</i>
<i>Glutamate Assay Kit, Number: MAK004, Sigma-Aldrich</i>
<p><i>Plate Reader: Seriennummer: 608000026, Med. Einrichtung der Heinrich-Heine-Universität</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>PGE-M: Plate Description: Nunc 96 Transparent, Plate with Cover: No, Barcode: No, Part of Plate, Range: A1:H12, Absorbance, Measurement Wavelength: 405nm, Measurement Bandwidth: 9nm, Number of Reads: 5, Settle Time: 0ms, Label: 1, Move Plate, Action: Move out, Meas. Temperature: Raw data: 21,7°C, Date: 21.05.2014, Time: 10:38:07 Uhr</i></li> <li>- <i>Leukotrien-B4: Plate Description: Nunc 96 Transparent, Plate with Cover: No, Barcode: No, Part of Plate, Range: A1:H12, Shaking, Duration: 5s, Mode: linear, Amplitude: 1mm, Frequency: 173,9 rpm, Absorbance, Measurement Wavelength: 450nm, Measurement Bandwidth: 9nm, Number of Reads: 5, Settle Time: 0ms, Label: 1, Move Plate, Action: Move out, Meas. Temperature: Raw data: 20,7°C, Date: 04.12.2014, Time: 13:08:04 Uhr</i></li> <li>- <i>Glutamat: Plate Description: Nunc 96 Transparent, Plate with Cover: No, Barcode: No, Part of Plate, Range: A1:H12, Shaking, Duration: 5s, Mode: linear, Amplitude: 1mm, Frequency: 173,9 rpm, Absorbance, Measurement Wavelength: 450nm, Measurement Bandwidth: 9nm, Number of Reads: 5, Settle Time: 0ms, Label: 1, Move Plate, Action: Move out, Meas. Temperature: Raw data: 22,3°C, Date: 04.09.2014, Time: 13:10:33 Uhr</i></li> </ul>
<p><i>Tandemmassenspektrometer:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Xevo TQ-S Waters</i></li> <li>- <i>Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) I-Class Waters</i></li> <li>- <i>Trennsäule: Acquity UPLC HSS T3, 1,8µm, 2,1x100mm, Waters</i></li> </ul>

## 2.1.2 Software

<b>Programmname</b>
<i>Citavi 5.3.1.0</i>
<i>MassLynx 4.1 Waters</i>
<i>Microsoft Office 2016 (Word, Excel)</i>
<i>IBM SPSS Statistics Version 22</i>

### **2.1.3 Probenherkunft und Probandencharakteristik**

Für die Messung des Prostaglandin-E Metaboliten, des Leukotrien-B<sub>4</sub>, des Glutamats und von 17- $\alpha$ -OHP wurden Urinproben von Frühgeborenen und reifen Neugeborenen, deren Eltern zuvor in die Teilnahme an der Studie eingewilligt hatten, gesammelt. Die Düsseldorfer Ethikkommission hat ihre Zustimmung zu der Studie gegeben. Die Studiennummer lautet 4748R und die Registrierungsnummer ist 2014072649.

Das Auffangen des Urins erfolgte sowohl mittels Urinbeutel als auch mit Hilfe von Kompressen, die in die Windel gelegt und anschließend zentrifugiert wurden. Dazu wurden zwei Kompressen der Größe 7,5x7,5 cm verwendet. Außerdem wurde Urin aus Blasenkathetern, die den Patienten zuvor zu therapeutischen Zwecken gelegt worden waren, entnommen. Aufgrund der Altersgruppe der Studienteilnehmer konnte keine Gewinnung von Mittelstrahlurin und/oder 24-h-Urin erfolgen. Die Konzentrationsberechnungen beziehen sich deshalb auf die Kreatininkonzentrationen. Der Kreatininwert wurde im Zentrallabor des Universitätsklinikums Düsseldorf bestimmt. Die Urinproben wurden sofort nach der Entnahme bei -80°C eingefroren. Die Sammlung der Proben erfolgte über einen Zeitraum von zweieinhalb Jahren.

Das Patientenkollektiv umfasste insgesamt 88 Frühgeborene und reife Neugeborene, davon 65 Kontrollprobanden und 23 Patienten der Risikogruppe. Das Geburtsalter reichte von der Schwangerschaftswoche 23+0 bis 41+6. 51 der Probanden waren Frühgeborene. Als Frühgeborene werden Neugeborene bezeichnet, bei denen bei Geburt die 37. Schwangerschaftswoche nicht vollendet worden ist. Von den Frühgeborenen und reifen Neugeborenen der Studie waren 52 männlich und 36 weiblich. Zum Zeitpunkt der Abnahme der Urinproben lag das Alter der Probanden zwischen 0 und 108 Lebenstagen. Die Risikogruppe wurde dadurch definiert, dass die Patienten aufgrund von gewebeverletzenden Eingriffen, Operationen oder schmerzassoziierten Vorerkrankungen schmerztherapeutisch behandelt werden mussten. Unter den 23 Patienten der Risikogruppe befanden sich 18 Frühgeborene, von denen fünf in der 25. Schwangerschaftswoche oder früher geboren wurden. Nur vier der Frühgeborenen, die der Kontrollgruppe zugeordnet



waren, wurden in der 25. SSW geboren. Frühgeborene mit einem geringeren Geburtsalter waren in der Gruppe nicht vertreten. Als Kontrollprobanden wurden Frühgeborene und reife Neugeborene rekrutiert, die in der Klinik zur Welt kamen oder zu Beobachtungszwecken auf der neonatologischen Station lagen. Der Altersunterschied hinsichtlich des Gestationsalters in den beiden zu vergleichenden Gruppen begründet sich auf der Tatsache, dass sehr frühgeborene Kinder intensivmedizinische Unterstützung benötigen und anfälliger für Erkrankungen wie die nekrotisierende Enterokolitis sind. Dieser Heterogenität wurde in dem Versuch zu der Analyse von 17- $\alpha$ -OHP entgegengewirkt, indem die Gruppen, soweit dies möglich war, in Hinblick auf ihr Geburts- und Lebensalter *gematcht* wurden.

Insgesamt wurden deutlich mehr Kontrollprobanden (65) als Schmerzpatienten (23) rekrutiert. Dies begründet sich zum einen auf der Tatsache, dass mehr Kinder gesund zur Welt kommen und keine schmerztherapeutische Behandlung notwendig ist, auf der anderen Seite sind Eltern von Frühgeborenen und reifen Neugeborenen, die auf der Intensivstation behandelt werden müssen, zurückhaltender mit einer Einwilligung in eine klinische Studie. Die Uringewinnung selber gestaltete sich bei den sehr kleinen Frühgeborenen zudem schwieriger, da die Urinbeutel leichter verrutschten.

Die Ernährung aller Studienteilnehmer erfolgte nach dem gleichen klinischen Standard des Universitätsklinikums Düsseldorf, d.h. die Studienteilnehmer erhielten Muttermilch und/oder Formulanahrung. Bei der Notwendigkeit einer parenteralen Substitution erfolgte eine gewichts- und altersadaptierte Ernährung von Elektrolyten, Aminosäuren, Kohlenhydraten und Fetten. Dadurch minimiert sich der Einfluss der Ernährung auf die Ergebnisse der Studie. Dennoch muss man bedenken, dass aufgrund der Erkrankungen der Schmerzpatienten ein Großteil von ihnen vorübergehend teil- oder vollparenteral ernährt wurde, während die Kontrollprobanden zu der Zeit der Abnahme der Urinproben Muttermilch oder Formulanahrung bekamen.

Bei einigen Probanden wurde mehrfach Urin abgenommen und analysiert. Je nachdem, ob ein erneutes Schmerzereignis vorlag oder nicht, wurde die Urinprobe der Schmerz- oder der Kontrollgruppe zugeordnet.

## 2.2 Prostaglandin-E-Metabolit

Die Konzentrationsbestimmungen der drei biochemischen Parameter Prostaglandin-E-M, Leukotrien-B4 und Glutamat erfolgte anhand von *ELISA*. Bei dieser Methodik konnte nur ein Teil der Urinproben, die gesammelt wurden, analysiert werden. Die geringe Anzahl der untersuchten Proben erschwert eine Auswertung der Konzentrationen und den Vergleich der Werte von den beiden Gruppen in Hinsicht auf die Frage eines Konzentrationsunterschiedes. Mit dem *Prostaglandine E Metabolite EIA Kit (514531)* der Firma *Cayman Chemical* können Konzentrationen in Höhe von  $\geq 2\text{pg/ml}$  gemessen werden. Alle ermittelten Konzentrationen der Urinproben der Schmerzpatienten und der Probanden der Kontrollgruppe lagen in diesem Bereich. Der verwendete *ELISA* detektiert aufgrund von Kreuzreaktivitäten zu einem geringen Anteil weitere Metabolite der Eicosanoide. Die genauen prozentualen Angaben zu den Kreuzreaktivitäten sind aus der folgenden Abbildung zu entnehmen. Zugleich gibt die Abbildung die *Intra-* und *Inter-Assay-Variation* wieder.

## Spezifität und Präzision des *Prostaglandine E Metabolite EIA Kit*

### Precision:

The intra- and inter-assay CVs have been determined at multiple points on the standard curve. These data are summarized in the graph on page 29 and in the table below.

Dose (pg/ml)	%CV* Intra-assay variation	%CV* Inter-assay variation
50	8.1	18.2
25	5.4	7.2
12.5	5.9	8.3
6.25	5.5	11.2
3.13	12.8	8.0
1.56	25.1	13.4
0.78	23.7	39.3
0.39	N.D.	123

**Table 3. Intra- and inter-assay Variation**

\*%CV represents the variation in concentration (not absorbance) of 40 repetitions of each point on the standard curve as determined using a reference standard curve.

### Cross Reactivity:

Compound	Cross Reactivity
13,14-dihydro-15-keto PGE <sub>1</sub> *	100%
13,14-dihydro-15-keto PGE <sub>2</sub> *	100%
Bicyclo Prostaglandin E <sub>1</sub>	38%
13,14-dihydro-15-keto PGD <sub>2</sub> *	0.08%
13,14-dihydro-15-keto PGF <sub>2α</sub> *	0.02%
Arachidonic Acid	<0.01%
Leukotriene B <sub>4</sub>	<0.01%
tetranor-PGEM	<0.01%
tetranor-PGFM	<0.01%
Prostaglandin D <sub>2</sub>	<0.01%
Prostaglandin E <sub>1</sub>	<0.01%
6-keto Prostaglandin E <sub>1</sub>	<0.01%
Prostaglandin E <sub>2</sub>	<0.01%
Prostaglandin F <sub>1α</sub>	<0.01%
6-keto Prostaglandin F <sub>1α</sub>	<0.01%
Prostaglandin F <sub>2α</sub>	<0.01%
Thromboxane B <sub>2</sub>	<0.01%

**Table 4. Cross Reactivity of the PGEM ELISA**

\*Derivatized per Assay Protocol

Abb.8: Spezifität und Präzision des *Prostaglandine E Metabolite EIA Kit* (Cayman Chemical)

### 2.2.1 Materialien

Item	96 wells Quantity/Size
<i>Prostaglandine E Metabolite AIA Antiserum</i>	1 vial/ 100 dtn
<i>Prostaglandine E Metabolite Acetylcholinesterase (AChE) Tracer</i>	1 vial/ 100 dtn
<i>Prostaglandine E Metabolite EIA Standard</i>	1 vial
<i>EIA Buffer Concentrate (10X)</i>	2 vial/ 10 ml
<i>Wash Buffer Concentrate (400X)</i>	1 vial/ 5 ml
<i>Polysorbate 20</i>	1 vial/ 3 ml
<i>Mouse Anti-Rabbit IgG Coated Plate</i>	1 plate
<i>96-Well Cover Sheet</i>	1 cover
<i>Ellman's Reagent</i>	3 vial/ 100 dtn
<i>Phosphate Buffer</i>	1 vial/ 100 dtn
<i>Carbonate Buffer</i>	1 vial/ 100 dtn
<i>EIA Tracer Dye</i>	1 vial
<i>EIA Antiserum Dye</i>	1 vial

### 2.2.2 Vorbereitung

Die Vorbereitung, Durchführung und Berechnung der Konzentrationen von PGE-M erfolgte anhand der Anleitung des *Prostaglandine E Metabolite EIA Kit*. Zunächst wurden die Puffer, der *Tracer*, das Antiserum und das Reagenz hergestellt. Dafür wurden folgenden Verdünnungen erzeugt. Das *EIA* Pufferkonzentrat wurde mit 90ml *UltraPure Water* und der Polysorbatpuffer mit 2l *UltraPure Water* verdünnt. Die Verdünnung des Polysorbatpuffers diente der Herstellung des Waschpufferkonzentrats. Zudem wurde der Phosphatpuffer in 30ml *UltraPure Water* aufgelöst, um eine einmolare (M) Phosphatpufferlösung zu erhalten. Die einmolare Carbonatpufferlösung wurde durch Zugabe von 25ml *UltraPure Water* zu dem Carbonatpuffer erzeugt. Des Weiteren wurden 13ml *EIA*-Puffer mit 3ml Carbonatpuffer und 4ml Phosphatpuffer vermengt, sodass man 20ml *PGE-M-Assay-Puffer* erhielt.

Um den *Tracer* herzustellen, wurden 100dtn PGE-M AChE *Tracer* mit 6ml *EIA* Puffer vermischt. 100dtn PGE-M *EIA* Antiserum verdünnt mit 6ml *EIA* Puffer bildeten das PGE-M *EIA* Antiserum.

Zur Herstellung des Ellman's Reagenz wurden 100dtn Ellman's Reagenz mit 20ml *UltraPure Water* vermischt.

Die weitere Vorbereitung bestand aus der Derivatisierung der Standards und der einzelnen Urinproben. Im ersten Schritt wurden 100µl des PGE-M *EIA* Standards mit 900µl *UltraPure* Wasser verdünnt. Die Konzentration betrug 40ng/ml. 50µl der Lösung wurden in dem zweiten Schritt zu einem Gesamtvolumen von 1ml mit dem *EIA* Puffer vermengt. Dann wurden 300µl des Carbonatpuffers hinzugegeben und die Lösung über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden 400µl Phosphat- und 300µl *EIA* Puffer hinzugefügt. Die Konzentration der Lösung lag demnach bei 1,000pg/ml.

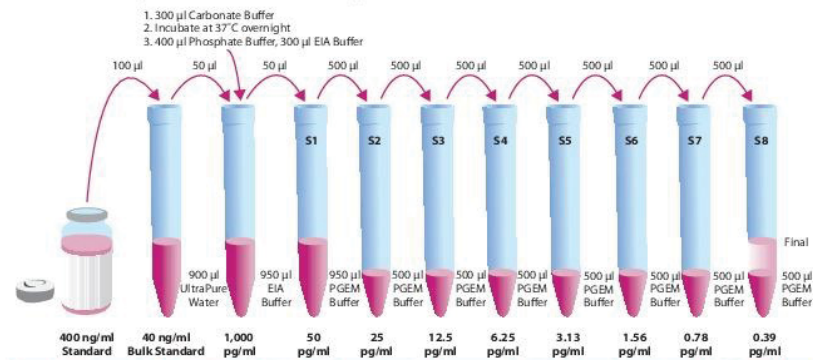
Von den Urinproben wurden je 500µl mit 150µl Carbonatpuffer verdünnt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am zweiten Tag wurden diesen Pufferlösungen weitere 200µl Phosphatpuffer und 150µl *EIA* Puffer hinzugefügt.

Um die Standardkurve vorzubereiten, wurden 950µl des *PGE-M Assay Puffer* in ein Reagenzglas gefüllt. In sieben weitere Reagenzgläser wurden je 500µl des *PGE-M Assay Puffer* pipettiert. Nun wurden in das erste Reagenzglas 50µl des Standards hinzugefügt und die Lösung wurde gut durchmischt. Aus dem ersten Reagenzglas wurden im nächsten Schritt 500µl der Lösung in das zweite Reagenzglas pipettiert. Von dem zweiten Reagenzglas wurden, nachdem die Lösung erneut gut durchmischt wurde, wiederum 500µl herausgenommen und in das dritte Reagenzglas gefüllt. So wurde weiter vorgegangen bis zu dem letzten der acht Reagenzgläser und es entstand die in der folgenden Grafik dargestellte Verdünnungsreihe.

## Prostaglandine E Metabolite EIA Short Protocol

### Prostaglandin E Metabolite EIA Short Protocol

- EIA Buffer** - Dilute with 90 ml of UltraPure water.
- Wash Buffer** - Dilute the 5 ml vial to 2 L and add 1 ml Polysorbate 20 or dilute the 12.5 ml vial to 5 L and add 2.5 ml Polysorbate 20.
- PGEM Assay Buffer** - Prepare 20 ml of PGEM Assay Buffer by combining 13 ml EIA Buffer, 3 ml Carbonate Buffer\*, and 4 ml Phosphate Buffer\*. (\*See booklet for details.)
- Tracer** - Reconstitute the 100 dtn vial with 6 ml of EIA Buffer or the 500 dtn vial with 30 ml EIA Buffer.
- Antiserum** - Reconstitute the 100 dtn vial with 6 ml of EIA Buffer or the 500 dtn vial with 30 ml EIA Buffer.



Steps	Reagent	Blank	TA	NSB	B <sub>0</sub>	Std./Sample
<b>1. Add Reagents</b>	EIA Buffer	--	--	50 µl	--	--
	Standard/Sample	--	--	--	--	50 µl
	Tracer	--	--	50 µl	50 µl	50 µl
	Antiserum	--	--	--	50 µl	50 µl
	PGEM Buffer	--	--	50 µl	50 µl	--
<b>2. Incubate</b>	<b>Cover plate and incubate 18 hours at room temperature (22°C)</b>					
<b>3. Wash</b>	<b>Wash all wells five times</b>					
<b>4. Add Reagents</b>	Tracer	--	5 µl	--	--	--
	Ellman's	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
<b>5. Incubate</b>	<b>Cover plate and incubate 60-90 minutes RT with gentle shaking</b>					
<b>6. Read</b>	<b>Read plate at a wavelength between 405-420 nm</b>					

Abb.9, Prostaglandine E Metabolite EIA Short Protocol

### 2.2.3 Durchführung

Bei jeder Messung mit dem *Prostaglandine E Metabolite EIA Kit* muss die Platte bestimmte Vorschriften erfüllen. Zwei Spots (Vertiefungen) durften nicht mit den Puffern, dem *Tracer* und den Antikörpern befüllt werden. Dies diente zur Messung der Hintergrundabsorption. Der dort gemessene Wert wurde im Nachhinein von der Absorption der Proben subtrahiert. Zusätzlich gab es zwei Vertiefungen der maximalen Bindung, die mit je 50µl PGE-M Puffer, *Tracer* und Antikörper befüllt wurden und zwei *Non-Specific-Binding-Spots*, in die wiederum je 50µl PGE-M

Puffer, 50µl *EIA* Puffer und 50µl *Tracer* pipettiert wurden. In zwei *Wells* der *Total Activity* wurden 5µl des *Tracers* gefüllt. Von jeder Konzentration der vorbereiteten Standardkurve pipettierte man jeweils in doppelter Ausführung 50µl in die entsprechende Vertiefung der Platte. Die Proben der Patienten und der Kontrollprobanden wurden ebenfalls in doppelter Ausführung bestimmt und dafür in je zwei *Wells* der Platte pipettiert. Zudem wurden zwei weitere *Spots* mit verdünnten Proben mit einem Verdünnungsfaktor von 1:4 befüllt. Im nächsten Schritt wurden 50µl des *Tracers* zu jedem *Well*, außer denen des *Blank* (Hintergrundabsorption) und der *Total Activity*, und 50µl des PGE-M *EIA* Antiserums zu jedem *Well*, bis auf die der *Total Activity*, der *Non-Specific-Binding* und des *Blank*, pipettiert. Anschließend wurde die gesamte Platte bei Raumtemperatur für 18h inkubiert. Nach 18-stündiger Inkubation wurden die *Wells* geleert und fünfmal mit Waschpuffer gereinigt. Es wurden 200µl Ellman's Reagenz zu jedem *Well* und 5µl des *Tracers* zu den zwei *Total Activity Spots* pipettiert. Nachdem die Platte mit einer Plastikfolie überzogen und von Fingerabdrücken befreit war, konnte sie gelesen und die Absorption bestimmt werden. Die Messung der Platte erfolgte im Tecan *plate reader* mit einer Wellenlänge von 405nm.

#### **2.2.4 Berechnung**

Für die Berechnung der Konzentrationen des Prostaglandin-E-Metaboliten in den Urinproben wurden zunächst die Mittelwerte der doppelten Absorptionsbestimmungen ermittelt und der Wert der *Non-Specific-Binding (NSB)* von dem des  $B_0$  (maximale Bindung des *Tracers* an die Antikörper) subtrahiert, um den wahren  $B_0$ -Wert zu erhalten. Die Standard- und Probenbindung wurde auf die maximale Bindung bezogen, indem für jeden Mittelwert der Messdaten ( $S_x$ ) die Formel  $[(S_x - NSB) / B_0]$  angewandt wurde. Im Anschluss wurde aus der Standardkurve der mathematische Zusammenhang zwischen Absorption und Konzentration berechnet, sodass im Folgenden die PGE-M-Konzentrationen der Studienteilnehmer ermittelt werden konnten.

Die Absorption verhielt sich linear zu der logarithmischen Konzentration von Prostaglandin-E-M. Daraus ergaben sich folgende Konzentrationen von Prostaglandin-E-M im Urin der Studienteilnehmer.

Standards:

Konzentration [pg/ml]	log(C)	Absorption
0,39	-0,409	0,978
0,78	-0,108	0,703
1,56	0,193	0,863
3,13	0,496	0,786
6,25	0,796	0,272
12,5	1,097	0,473
25	1,398	0,323
50	1,699	0,180

Berechnung der Konzentrationen der Studienteilnehmer:

Schmerz- Patient	Absorption unverdünnt	Log (C)	Konzentration [pg/ml]	Absorption x4,verdünnt	Log (C)	Konzentration [pg/ml]	Kreatinin [mg/dl]
S1	0,064	1,763	57,900	0,16	1,552	35,613	6,3
S1.1	0,041	1,813	65,050	0,171	1,527	33,684	4,6
S2	0,005	1,892	78,055	0,026	1,846	70,183	5,1
S2.1	0,561	0,670	4,677	0,723	0,314	2,059	zu wenig Material
S3	0,009	1,884	76,491	0,073	1,743	55,321	35,3
S4	0,031	1,835	68,428	0,123	1,633	42,949	6,1
S6	0,15	1,574	37,462	0,208	1,446	27,930	30,2
S7	0,13	1,618	41,454	0,131	1,615	41,245	11,5
S5	0,279	1,290	19,497	0,437	0,943	8,761	9,4

Probanden  
der

Kontroll- gruppe	Absorption unverdünnt	Log (C)	Konzentration [pg/ml]	Absorption x4,verdünnt	Log (C)	Konzentration [pg/ml]	Kreatinin [mg/dl]
K1	0,022	1,855	71,618	0,092	1,701	50,248	9,3
K1.1	0,016	1,868	73,827	0,073	1,743	55,321	18
K3	0,067	1,756	57,027	0,202	1,459	28,791	6,6
K9	0,03	1,837	68,776	0,141	1,593	39,208	30,1
K10	0,085	1,717	52,060	0,116	1,648	44,499	11,1



K11	0,017	1,866	73,454	0,118	1,644	44,050	14,5
K18	0,028	1,842	69,476	0,104	1,675	47,286	8,9
K18.1	0,018	1,864	73,084	0,068	1,754	56,739	13,8
K19	0,024	1,851	70,897	0,039	1,818	65,712	43,2

Da in der Studie Spontanurinproben der Frühgeborenen und reifen Neugeborenen analysiert wurden, wurden alle ermittelten Konzentrationen auf die Kreatininkonzentration der gleichen Urinprobe bezogen.

Prostaglandin-E-M-Konzentrationen im Urin der Schmerzpatienten:

Unverdünnte Urinproben:

Schmerzpatienten	PGE-M-Konzentration [pg/ml]	Kreatinin-Konzentration [mg/dl]	PGE-M-Konzentration bezogen auf Kreatinin [pg/mg Kreatinin]
S1	57,90	6,3	919,05
S1.1	65,05	4,6	1414,13
S2	78,06	5,1	1530,59
S2.1	4,68	Zu wenig Material	
S3	76,49	35,3	216,69
S4	68,43	6,1	1121,80
S6	37,46	30,2	124,04
S7	41,45	11,5	360,43
S5	19,497	9,4	207,41

Verdünnte Urinproben (1:4):

Schmerzpatienten	PGE-M-Konzentration [pg/ml]	Kreatinin-Konzentration [mg/dl]	PGE-M-Konzentration bezogen
------------------	-----------------------------	---------------------------------	-----------------------------

			auf Kreatinin [pg/mg Kreatinin]
S1	35,61	6,3	565,24
S1.1	33,68	4,6	732,17
S2	70,18	5,1	1376,08
S2.1	2,06	-	-
S3	55,32	35,3	156,71
S4	42,95	6,1	704,098
S6	27,93	30,2	92,48
S7	41,25	11,5	358,696
S5	8,76	9,4	93,19

Prostaglandin-E-M-Konzentrationen im Urin der Probanden der Kontrollgruppe:

Unverdünnte Urinproben:

Probanden der Kontrollgruppe	PGE-M- Konzentration [pg/ml]	Kreatinin- Konzentration [mg/dl]	PGE-M- Konzentration bezogen auf Kreatinin [pg/mg Kreatinin]
K1	71,62	9,3	770,11
K1.1	73,83	18	410,17
K3	57,03	6,6	864,09
K9	68,78	30,1	228,50
K10	52,06	11,1	469,01
K11	73,45	14,5	506,55
K18	69,48	8,9	780,67
K18.1	73,08	13,8	529,57
K19	70,897	43,2	164,11

Verdünnte Urinproben (1:4):

Probanden der Kontrollgruppe	PGE-M- Konzentration [pg/ml]	Kreatinin- Konzentration [mg/dl]	PGE-M- Konzentration bezogen auf Kreatinin [pg/mg Kreatinin]
K1	50,25	9,3	540,32
K1.1	55,32	18	307,33
K3	28,79	6,6	436,21
K9	39,21	30,1	130,27
K10	44,499	11,1	400,89
K11	44,05	14,5	303,79
K18	47,29	8,9	531,35
K18.1	56,74	13,8	411,16
K19	65,71	43,2	152,11

## 2.3 Leukotrien-B4

### 2.3.1 Materialien

<b>Item</b>	<b>Menge</b>
<i>Human Leukotriene-B4 ELISA Kit; Cat.No: MBS0117082</i>	1
<i>Microelisa Stripplate</i>	12 x 8 Strips
<i>Standards</i>	0,5 ml x 6 vial
<i>Sample Diluent</i>	6 ml
<i>Horseradish Peroxidase- Conjugate (HRP- Conjugate) Reagent</i>	10 ml
<i>Wash Solution</i>	25 ml
<i>Stop Solution</i>	6 ml
<i>Chromogen Solution A</i>	6 ml
<i>Chromogen Solution B</i>	6 ml
<i>Closure Plate Membrane</i>	2
<i>Sealed Bags</i>	1

### **2.3.2 Vorbereitung**

Vor der Durchführung des *Leukotriene-B4 ELISA Kits* wurden alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur erwärmt und die Waschlösung hergestellt, indem sie mit destilliertem und deionisiertem Wasser in einem Verhältnis 1:20 vermischt wurde. Die Vorbereitung, Durchführung und die Berechnung der Leukotrien-B4-Konzentrationen wurde anhand der Anleitung des *Leukotriene-B4 ELISA Kits* erarbeitet.

### **2.3.3 Durchführung**

Zunächst wurden für die Durchführung des *Leukotriene-B4 ELISA Kits* je 50µl der Standards und 50µl der jeweiligen Urinproben in die zuvor bestimmten Vertiefungen pipettiert. Alle zu untersuchenden Standards und Urinproben wurden als Doppelbestimmungen untersucht. Zudem wurden von den Urinproben je zwei 1:2 Verdünnungen mit dem *Kit* analysiert. Die Vertiefung der Negativkontrolle (ohne Leukotrien-B4) wurde mit 50µl der Probenverdünnungslösung aufgefüllt. Im nächsten Schritt wurden in jedes *Well* 100µl des *HRP-Conjugate* Reagenz pipettiert und es erfolgte die Inkubation der Platte bei 37°C für 60 Minuten. Anschließend wurde die Platte viermal gewaschen. Nachdem sowohl von dem *Chromogen Solution A-* als auch von dem *Chromogen Solution B-*Reagenz jeweils 50µl zu jeder Vertiefung hinzugefügt wurden, wurde die Platte erneut für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Dies geschah unter Lichtschutz. Im Anschluss konnte die Platte im Tecan *plate reader* mit einer Wellenlänge von 450nm gemessen werden.

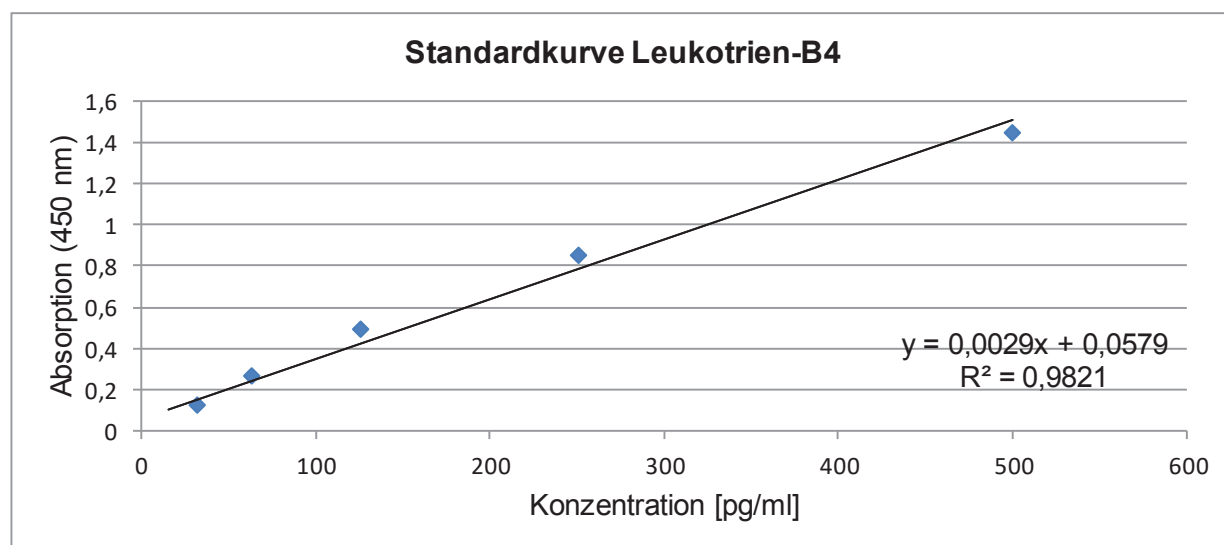
### **2.3.4 Berechnung**

Die Berechnung der Leukotrien-B4-Konzentrationen der jeweiligen Urinproben erfolgte folgendermaßen: Anhand der Absorptionsdoppelbestimmungen wurde der Mittelwert gebildet. Von dem Mittelwert wurde der *Blank* subtrahiert, um die Hintergrundaktivität zu eliminieren. Mit Hilfe der Absorptionsbestimmungen der Standards wurde die Standardkurve erstellt und anhand der Standardkurve die

Konzentrationen von Leukotrien-B4 im Urin der Studienteilnehmer und Teilnehmerinnen berechnet.

Standardkurve:

Standard	Konzentration [pg/ml]	Absorption
1	15,6	-0,0019
2	31,2	0,13015
3	62,5	0,2684
4	125	0,49615
5	250	0,85685
6	500	1,4537



Die Gleichung der Geraden,  $y = 0,0029x + 0,0579$ , stellte die Grundlage für die Berechnung der Konzentrationen von Leukotrien-B4 im Urin der Studienprobanden dar. Nur bei zehn der untersuchten Urinproben lag der Wert der LTB4-Konzentration im positiven Bereich und damit oberhalb des *Blank*. Bei den weiteren untersuchten Proben konnte nur die Hintergrundaktivität und keine LTB4-Konzentration gemessen werden. Insgesamt wurden in diesem Versuch zehn Urinproben von

Schmerzpatienten und elf von Kontrollprobanden analysiert. Die zehn positiv bestimmten Konzentrationen wurden auf die Kreatininkonzentration bezogen.

Leukotrien-B4-Konzentrationen im Urin der Schmerzpatienten:

Unverdünnte Urinproben:

Schmerzpatienten	Leukotrien-B4-Konzentration [pg/ml]	Kreatininkonzentration [mg/dl]	Leukotrien-B4-Konzentration bezogen auf Kreatinin [pg/mg Kreatinin]
S1	15,00	6,3	238,1
S10	4,45	10,3	43,2
S22	7,72	12,8	60,3

Verdünnte Urinproben (1:2):

Schmerzpatienten	Leukotrien-B4-Konzentration [pg/ml]	Kreatininkonzentration [mg/dl]	Leukotrien-B4-Konzentration bezogen auf Kreatinin [pg/mg Kreatinin]
S22	1.93	12,8	15,1

Leukotrien-B4-Konzentrationen im Urin der Probanden der Kontrollgruppe:

Unverdünnte Urinproben:

Probanden der Kontrollgruppe	Leukotrien-B4-Konzentration [pg/ml]	Kreatininkonzentration [mg/dl]	Leukotrien-B4-Konzentration bezogen auf Kreatinin [pg/mg Kreatinin]
------------------------------	-------------------------------------	--------------------------------	---

K22	86,28	9,3	927,7
K52	294,02	66,5	442,1
K53	0,45	8,9	5,1
K65	6,95	23,4	29,7

Verdünnte Urinproben (1:2):

Probanden der Kontrollgruppe	Leukotrien-B4- Konzentration [pg/ml]	Kreatininkonzentration [mg/dl]	Leukotrien-B4- Konzentration bezogen auf Kreatinin [pg/mg Kreatinin]
K22	73,34	9,3	788,6
K52	228,69	66,5	343,9

Die *Detection-Range* des *Human Leukotriene-B4 ELISA Kit*, No: MBS017082, von *MyBioSource* liegt im Bereich von 15,6 bis 500pg/ml. In der Versuchsreihe konnten nur bei zehn der untersuchten Urinproben Leukotrien-B4-Konzentrationen berechnet werden. Fünf der berechneten Konzentrationen lagen innerhalb der *Detection-Range*. Die Bestimmung von Leukotrien-B4 mittels Gas-Chromatographen und Massenspektrometer von 1984 lieferte eine ähnliche Sensitivität von zwei pg (MacDermot et al., 1984) und stellt kein besseres Verfahren für die Detektion des Parameters dar. Die aktuelle Literaturrecherche lieferte keine Informationen zu Normwerten von Leukotrien-B4 im Urin von Frühgeborenen und reifen Neugeborenen. Es besteht die Möglichkeit, dass die Höhe der Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze des Massenspektrometers und des *ELISA* liegen.

## 2.4 Glutamat

### 2.4.1 Materialien

Item	Menge
------	-------

96-Well-Platte	1
Glutamate Assay Buffer	25 ml
Glutamate Enzyme Mix	1 vial (vl)
Glutamate Developer	1 vl
Glutamate Standard 0,1M	0,1 ml

### 2.4.2 Vorbereitung

Die gesamte Arbeit mit dem *Glutamate Assay Kit*, von der Vorbereitung bis hin zu der Berechnung der Glutamat-Konzentrationen in den Urinproben, folgte der Anleitung des *Kits*. Der *Glutamate Assay Buffer* wurde vor der Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt. Ebenso wurden die Urinproben langsam bei Raumtemperatur aufgetaut. Der *Glutamate Developer* wurde mit 820µl Wasser verdünnt und die entstandene Lösung durchmischt. Um den *Glutamate Enzyme Mix* herzustellen, wurde er mit 220µl des *Glutamate Assay Buffer* gemischt.

### 2.4.3 Durchführung

Wenn man Glutamat mit Hilfe des *Glutamate Assay Kits* analysieren möchte, werden die Absorptionen jeweils in doppelter Ausführung bestimmt. Zunächst wurden Standardlösungen für die Standardkurve hergestellt. Dazu wurden 10µl des 0,1M *Glutamate Standards* mit 990µl des *Glutamate Assay Buffer* vermischt. Man erhielt eine 1mM Lösung. Anschließend wurden 0,2,4,6,8 und 10µl dieser Lösung in je zwei *Wells* pipettiert und die *Wells* auf ein Gesamtvolumen von 50µl mit dem *Glutamate Assay Puffer* aufgefüllt. Dadurch wurde eine Standardkurve von 0,2,4,6,8 und 10 nmol/*Well* generiert. Die verwendeten Urinproben der Probanden wurden für 5min mit 13.000 Umdrehungen zentrifugiert. Von jeder Probe wurden einmal 50µl in zwei *Spots* der Platte, zudem 12,5µl in zwei weitere *Spots* und ein weiteres Mal 25µl in zwei *Wells* pipettiert. Alle *Spots* wurden mit *Glutamate Assay Buffer* auf 50µl aufgefüllt. Die zwei Verdünnungen hatten dementsprechend einen Verdünnungsfaktor von 1:4 und 1:2. Im weiteren Verlauf wurden der Platte der *Glutamate Assay Buffer*, der *Developer* und der *Enzyme Mix* hinzugefügt. In die zwei *Spots* der Standardreihe mit einer Konzentration von 0,0 nmol/*Well* (*Blank*) wurden 92µl des Puffers und 8µl des *Developers* pipettiert. In jedes weitere *Well* wurden von



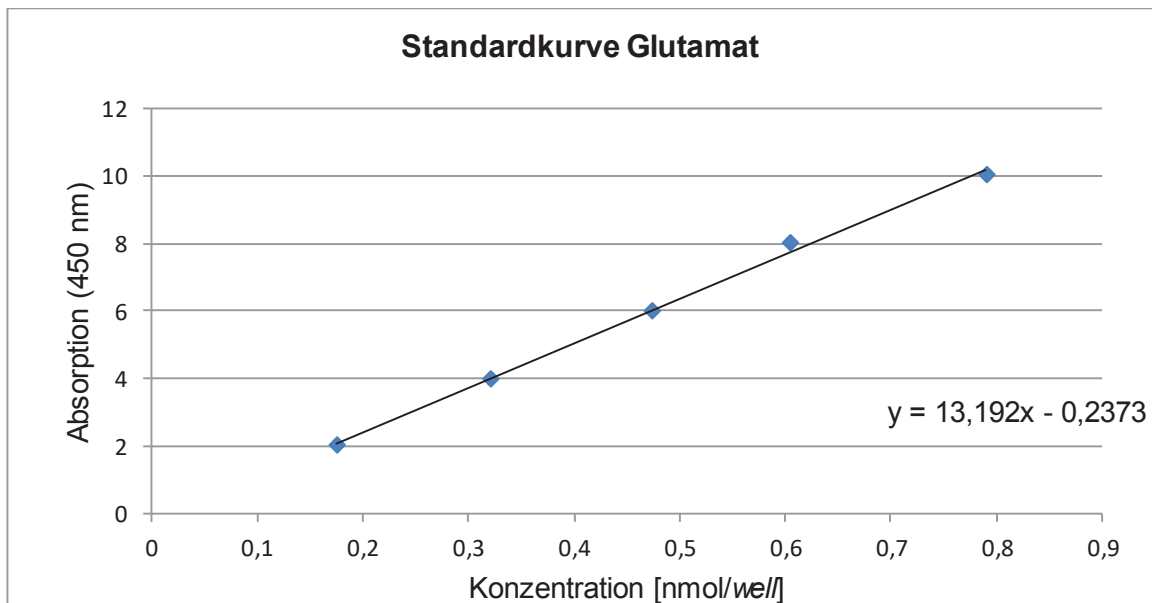
dem *Glutamate Assay Buffer* 90µl, 8µl von dem *Developer* und 2µl des *Enzyme Mix* gefüllt. Nachdem weitere 100µl des *Reaction Mix* jedem *Spot* hinzugefügt wurden, wurden die Lösungen auf einem horizontalen *Shaker* gut durchmischt und die Platte für 30min bei 37°C inkubiert. Nun konnte die Absorption abgelesen werden. Die Messung der Platte erfolgte bei dem *Glutamate Assay Kit* im Tecan *plate reader* mit einer Wellenlänge von 450nm.

#### 2.4.4 Berechnung

Die Glutamat-Konzentrationen der Urinproben wurden anhand der Absorption berechnet. Dafür wurden zunächst die Mittelwerte der doppelt bestimmten Absorptionen ermittelt und die gemessene Absorption des *Blank* von allen weiteren Werten subtrahiert. Dies diente der Elimination der Hintergrundaktivität. Anschließend wurde mit Hilfe der Standards eine Standardkurve erstellt und anhand der Standardkurve die Konzentrationen der Proben von den Studienteilnehmern berechnet.

Standardkurve:

Konzentration [nmol/well]	Absorption
2	0,1751
4	0,32125
6	0,4737
8	0,6045
10	0,7895



Berechnung der Glutamat-Konzentration im Urin der Studienteilnehmer anhand der Standardkurve:

1. Berechnung der x-Werte anhand der Absorption ( $y = 13,192x - 0,2373$ )
2. Division durch  $50\mu\text{l}$
3. Multiplikation mit 147,3, um die Masse von Glutamat zu berücksichtigen

Die ermittelten Konzentrationen wurden, wie in den Versuchen zuvor, auf die Kreatininkonzentration bezogen. Daraus ergaben sich folgende Glutamat-Konzentrationen im Urin der Schmerzpatienten und der Probanden der Kontrollgruppe.

Glutamat-Konzentrationen im Urin der Schmerzpatienten:

Unverdünnte Urinproben:

Schmerzpatienten	Glutamat-Konzentration	Kreatinin-Konzentration	Glutamat-Konzentration

	[ng/μl]	[mg/dl]	bezogen auf Kreatinin [mg/mg Kreatinin]
S1	7,62	4,6	0,17
S9	2,77	7,5	0,04
S10	15,04	10,3	0,15
S14	3,05	11,4	0,03
S15	5,42	11,1	0,05
S17	1,56	7,8	0,02

Verdünnte Urinproben (1:2):

Schmerzpatienten	Glutamat- Konzentration [ng/μl]	Kreatinin- Konzentration [mg/dl]	Glutamat- Konzentration bezogen auf Kreatinin [mg/mg Kreatinin]
S1	8,35	4,6	0,18
S9	4,04	7,5	0,05
S10	18,26	10,3	0,18
S14	3,098	11,4	0,03
S15	6,52	11,1	0,06
S17	1,27	7,8	0,02

Verdünnte Urinproben (1:4):

Schmerzpatienten	Glutamat- Konzentration [ng/μl]	Kreatinin- Konzentration [mg/dl]	Glutamat- Konzentration bezogen auf Kreatinin [mg/mg Kreatinin]
S1	6,5	4,6	0,14

S9	2,1	7,5	0,03
S10	18,0	10,3	0,17
S14	1,9	11,4	0,02
S15	3,98	11,1	0,04
S17	0,24	7,8	0,003

Glutamat-Konzentrationen im Urin der Probanden der Kontrollgruppe:

Unverdünnte Urinproben:

Probanden der Kontrollgruppe	Glutamat-Konzentration [ng/μl]	Kreatinin-Konzentration [mg/dl]	Glutamat-Konzentration bezogen auf Kreatinin [mg/mg Kreatinin]
K20	16,32	14,3	0,11
K22	10,83	9,3	0,12
K23	16,999	22,2	0,08
K28	3,88	12,5	0,03
K36	4,36	13,9	0,03
K38	12,43	8	0,16
K43	9,18	26,9	0,03
K45	4,61	17,2	0,03

Verdünnte Urinproben (1:2):

Probanden der Kontrollgruppe	Glutamat-Konzentration [ng/μl]	Kreatinin-Konzentration [mg/dl]	Glutamat-Konzentration bezogen auf Kreatinin [mg/mg Kreatinin]
K20	24,92	14,3	0,17
K22	10,46	9,3	0,11

K23	20,22	22,2	0,09
K28	4,10	12,5	0,03
K36	3,94	13,9	0,03
K38	13,79	8	0,17
K43	9,80	26,9	0,04
K45	5,85	17,2	0,03

Verdünnte Urinproben (1:4):

Probanden der Kontrollgruppe	Glutamat- Konzentration [ng/ $\mu$ l]	Kreatinin- Konzentration [mg/dl]	Glutamat- Konzentration bezogen auf Kreatinin [mg/mg Kreatinin]
K20	29,10	14,3	0,20
K22	8,16	9,3	0,09
K23	20,31	22,2	0,09
K28	3,67	12,5	0,03
K36	3,37	13,9	0,02
K38	13,77	8	0,17
K43	9,76	26,9	0,04
K45	5,75	17,2	0,03

Das *Sigma Aldrich Glutamate Assay Kit* MAK004 hat eine lineare *Detection Range* im Bereich von zwei bis zehn nmol. Bei sieben der analysierten Urinproben wurden weniger als zwei nmol/Well detektiert. Von diesen sieben Urinproben waren vier der Gruppe der Schmerzpatienten und drei den Probanden der Kontrollgruppe zugeordnet. Die Werte, die ermittelt wurden und innerhalb der *Detection Range* lagen, befanden sich am unteren Ende von dieser *Range* (2-5nmol/Well).

## 2.5 17- $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron

Die Konzentrationsbestimmung von 17- $\alpha$ -OHP erfolgte mit der *Ultra Performance* Flüssigkeitschromatographie (UPLC) gekoppelt mit dem Tandemmassenspektrometer. Insgesamt zeichnet sich die Methode der Massenspektrometrie durch eine hohe Präzision und eine minimale benötigte Menge der zu analysierenden Substanz aus (Nelson und Cox, 2005).

### 2.5.1 Materialien

Geräte	Menge
OASIS, <i>Solid Phase Extraction (SPE)</i> für 3ml Volumen, <i>Part Number</i> . WAT 094226, <i>Quantity</i> 10, 107431322B	1
<i>TurboVapLV Biotage</i>	1
Methanol ( <i>MS-Grade</i> )	
Acetonitril ( <i>MS-Grade</i> )	

### 2.5.2 Vorbereitung

Die Methode für die Bestimmung von 17- $\alpha$ -OHP im Urin der Frühgeborenen und reifen Neugeborenen wurde von Herrn Dr. Herebian aus dem Stoffwechsellabor der Kinderklinik für diese Studie auf Basis verschiedener Studien zur Messung des Metaboliten im Serum aufgebaut (Dhillon et al., 2011; Søbørg et al., 2013; Søbørg et al., 2017).

Vor der Durchführung der Analyse der Urinproben mit der Tandemmassenspektrometrie wurden die Proben auf Raumtemperatur erwärmt und 4min mit 14.000 Umdrehungen zentrifugiert. Die Salze wurden mit einer *Solid Phase Extraction* mit einer Kartusche Oasis HLB von Waters entfernt. Dazu wurde die Kartusche in einem ersten Schritt mit 3ml Methanol konditioniert und anschließend mit 3ml Wasser äquilibriert. Die Flüssigkeiten wurden unter dem Abzug mit Stickstoff durch die Kartusche gedrückt. Von den Proben wurde je 1ml durch die Kartusche gereinigt, die darauf folgend wiederum mit 3ml Wasser gespült wurde. Abschließend wurde die Probe in der Kartusche mit 1ml Methanol in ein neues Röhrchen eluiert, sodass die Messung störende Salze aus den Urinproben gefiltert waren. In einem nächsten Schritt wurden die gereinigten Proben für eineinhalb Stunden mit Stickstoff

eingedampft (30min mit 4 Psi und 37°C, 1h mit 6 Psi und 38°C). Die Urinproben wurden danach mit einer 70/30-prozentigen Lösung aus Acetonitril und Wasser in einem Verhältnis von 10:1 aufkonzentriert. Bei einigen Urinproben war das Gesamtvolumen geringer als ein Milliliter. Zu dem Eluieren wurde bei diesen Proben die gleiche geringere Menge Methanol verwendet. Das Verhältnis bei dem Aufkonzentrieren blieb 10:1.

### 2.5.3 Durchführung

Die Konzentration von 17- $\alpha$ -OHP in den Urinproben wurde mit der Tandemmassenspektrometrie analysiert. Diese war mit der UPLC gekoppelt. In einem Massenspektrometer erfolgt zunächst die Ionisation in einem Vakuum. Die geladenen Teilchen werden dann in einem elektrischen Feld anhand ihrer *Mass to Charge Ratio* selektiert. Bei einem Tandemmassenspektrometer sind zwei elektrische Felder hintereinandergeschaltet. Zwischen den zwei Quadrupolen gibt es eine Kollisionszelle mit einem Kollisionsgas. Dieses wird mit hoher Energie beschleunigt und führt zu spezifischen Brüchen der Moleküle (Nelson und Cox, 2005). Für die Bestimmung von 17- $\alpha$ -OHP im Urin der Frühgeborenen und reifen Neugeborenen wurden aus einem Endvolumen von 100 $\mu$ l je zwei Mikroliter der gereinigten Proben nach der Auftrennung mittels UPLC in dem Tandemmassenspektrometer analysiert. Bei der UPLC handelt es sich um ein chromatographisches Trennverfahren. Dies diente der selektiven Darstellung einzelner Fragmente bestimmter Massen. Die stationäre Phase der Trennsäule war HSS T3 der Firma Waters. Die weiteren Parameter der Trennsäule können aus der folgenden Tabelle abgelesen werden.

<b><i>Instrument parameters for Waters Acquity I-Class UPLC</i></b>	
<i>Solvent A</i>	<i>5 mM ammonium acetate + 0.05 % formic acid</i>
<i>Solvent B</i>	<i>Acetonitrile</i>
<i>Flow Mode</i>	<i>Isocratic (50:50, v/v)</i>
<i>Elution Time</i>	<i>3 min</i>

<i>Flow Rate</i>	<i>0,6 ml/min</i>
<i>Injection Volume</i>	<i>2 µl</i>
<i>Column Type</i>	<i>Acquity UPLC HSS T3 (100 mm x 2.1 mm x 1.8 µm)</i>
<i>Column Temperature</i>	<i>40 °C</i>
<i>Retention Time</i>	<i>1.73 min</i>

In dem Tandemmassenspektrometer erfolgte in der Quelle zunächst die Ionisation und Vernebelung der Proben. Die gefilterten Ionen wurden durch zwei Quadrupole, die über eine Gaskammer mit Argon für die Fragmentierung verbunden waren, geleitet. Das Argon stellte somit das Kollisionsgas dar. Nach der zweifachen Selektion wurden zwei der Tochterionen im Detektor gemessen. Die Geräteeinstellungen des Tandemmassenspektrometers sind aus der folgenden Tabelle zu entnehmen.

<b><i>Instrument parameters for Xevo TQ-S tandem mass spectrometer</i></b>	
<i>Polarity</i>	<i>Positive</i>
<i>Capillary Voltage</i>	<i>3.14 kV</i>
<i>Cone</i>	<i>35 V</i>
<i>Source Offset</i>	<i>50 V</i>
<i>Source Temperature</i>	<i>150 °C</i>
<i>Desolvation Temperature</i>	<i>600 °C</i>
<i>Cone Gas Flow</i>	<i>150 l/h</i>
<i>Desolvation Gas Flow</i>	<i>1000 l/h</i>
<i>Collision Gas Flow</i>	<i>0.15 ml/min</i>
<i>Nebuliser Gas Flow</i>	<i>7 bar</i>
<i>Multiple reaction monitoring of 2 channels</i>	<i>1: 331.2 &gt; 97.1 m/z (Quantifier, 0.163 s dwell time, collision energy 22 V) 2: 331.2 &gt; 109.1 m/z (Qualifier, 0.163 s dwell time, collision energy 22 V)</i>

Die Schemazeichnung gibt in vereinfachter Form die Messung in dem Tandemmassenspektrometer wieder.



## Schemazeichnung der Tandemmassenspektrometrie

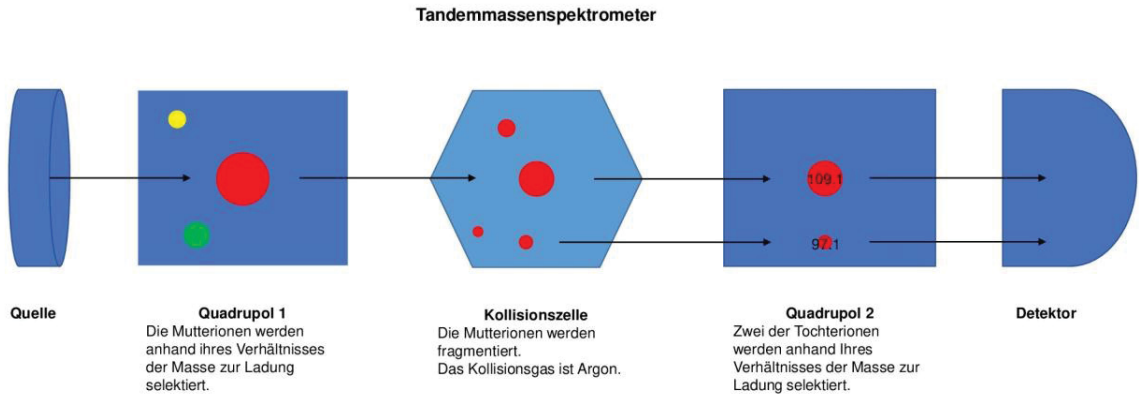
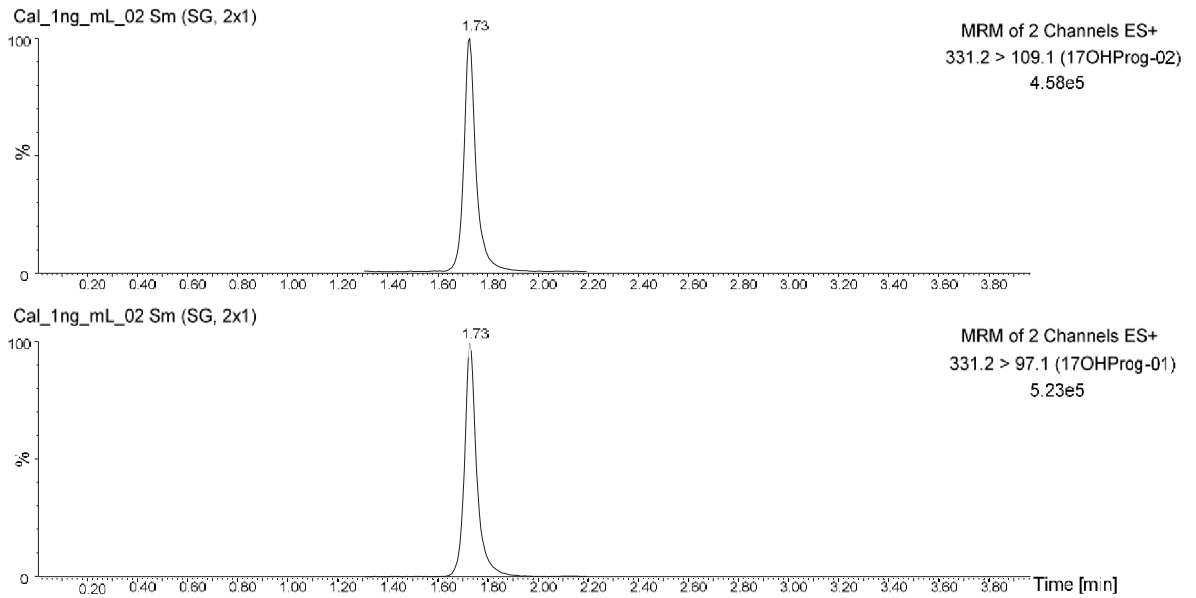


Abb.10, Schemazeichnung der Tandemmassenspektrometrie

Bei jeder Messung wurde gleichzeitig der *Blank* bestimmt. Die Kalibrierung erfolgte extern. Ein interner Standard würde die Qualität der Messgenauigkeit noch steigern. Die Messdauer für die Tandemmassenspektrometrie und die *UPLC* konnte auf weniger als 5 Minuten pro Urinprobe reduziert werden. Jedoch beansprucht die Vorbereitung vor Allem durch das Eindampfen der Proben eine Zeitspanne von etwa zwei Stunden.

### 2.5.4 Berechnung

Mit dem Programm *MassLynx 4.1 Waters* konnten die Chromatogramme erstellt und anhand der Chromatogramme die Konzentrationen von 17- $\alpha$ -OHP berechnet werden. Der ermittelte Wert wurde auf das Endvolumen und den gemessenen Kreatininwert bezogen.



Die Konzentration wurde in pmol/mol Kreatinin bestimmt.

Schmerzpatienten	Volumen [µl]	Kreatininkonzentration [mg/dl]	17-α-OHP- Konzentration [pmol/mol Kreatinin]
S1	50	6,3	1530
S1.1	100	4,6	2974
S9	100	7,5	14338
S14	100	11,4	2846
S15	100	11,1	5166
S17	100	7,8	824
S18	100	20,2	2142
S19	80	6,3	31217
S20	100	26,8	278
S21	100	15,9	259
S22	100	12,8	616

S23	100	14,6	620
S24	100	17,4	179
S25	100	14	10241
S26	100	13,7	2229

Probanden der Kontrollgruppe	Volumen [µl]	Kreatininkonzentration [mg/dl]	17-α-OHP-Konzentration [pmol/mol Kreatinin]
K24	100	15,8	361
K28	100	12,5	211
K29	100	17	173
K35	100	33,6	56
K44	100	30,1	171
K55	100	100,9	36
K56	100	41,9	116
K57	100	27,3	232
K61	90	52,2	100
K66	100	17,5	413
K67	100	40,6	298
(K70	100	9,2	2024)
K71	100	12,5	207
K73	90	7,4	87
(K74	35	7,1	5234)

Die ermittelte Konzentration von 17-α-OHP im Urin des Kontrollprobanden Nummer 74 konnte aufgrund einer fehlerhaften Kreatininzuordnung nicht in die weitere statistische Auswertung mit einbezogen werden. Zudem wurde der Wert für den Probanden Nummer 70 in den weiteren Berechnungen nicht beachtet, da dort eine relevante Ungewissheit in Bezug auf ein mögliches Schmerz- beziehungsweise Stressempfinden besteht. Aus den Akten des Patienten war ersichtlich, dass dieser

Studienteilnehmer zu der Zeit der Probenabnahme eine *continuous positive airway pressure*-Maske (CPAP) trug. Das Tragen einer CPAP-Maske stellt für die Neugeborenen und Frühgeborenen einen unangenehmen Reiz dar. Klinisch und anhand seiner Vitalparameter konnte ein Schmerzempfinden bei der zusätzlichen Beanspruchung nicht ausgeschlossen werden.

## **2.5.5 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der ermittelten Konzentrationen wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Ullrich von der Statistikberatung .05 in Düsseldorf durchgeführt. Als Programme wurden *Microsoft Office 2016 (Excel)* und *IBM SPSS Statistics Version 22* verwendet.

### **2.5.5.1 Mann-Whitney-U-Test**

Für die statistische Auswertung der ermittelten Konzentrationen wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen Test für Gruppenvergleiche. Die zu überprüfende Hypothese lautet, dass sich die Konzentrationen von 17- $\alpha$ -OHP im Urin der Schmerzpatienten von denen im Urin der Kontrollprobanden unterscheiden. Die Stichprobe setzte sich zusammen aus 15 Schmerzpatienten und 13 Kontrollprobanden. Diese wurde aufgrund einer ähnlichen Verteilung der Geburts- und Lebensalter ausgewählt. Die Probanden unterschieden sich in erster Linie in Hinsicht auf das Symptom Schmerz, da bei den Patienten der Schmerzgruppe aufgrund von gewebeschädigenden Eingriffen von der Tatsache ausgegangen werden muss, dass sie Schmerzen empfinden. Der Mann-Whitney-U-Test ist non-parametrisch. Er wird als ein verteilungsunabhängiger Test und als Gegenstück des T-Tests bezeichnet. Die Voraussetzung für diesen Test ist eine gleiche Verteilungsform in den beiden gegenübergestellten Stichproben (Sachs und Hedderich, 2006). Mit dem Mann-Whitney-U-Test lässt sich ermitteln, ob die Konzentrationen in einer Gruppe höher liegen, jedoch nicht wieviel höher. Die Konzentrationen werden in einer Rangfolge angeordnet. Im Anschluss kann der mittlere Rang sowie die Rangsumme für die beiden zu vergleichenden Gruppen

errechnet werden, um die Höhe der Konzentrationen zu vergleichen. Anschließend werden die U-Werte berechnet.

$$U1 = mn + \frac{m(m+1)}{2} - R1 \text{ und } U2 = mn + \frac{n(n+1)}{2} - R2$$

M und N stehen für die Anzahl der Stichproben der beiden Gruppen und R gibt die jeweilige Rangsumme an. Der kleinere der beiden U-Werte ist die Prüfgröße. Diese wird mit der kritischen Schranke aus der entsprechenden Mann-Whitney-U-Test-Tabelle verglichen. Ist die Prüfgröße kleiner als die kritische Schranke, so liegt ein signifikantes Ergebnis vor (Sachs und Hedderich, 2006). Zudem kann die asymptotische Signifikanz über den z-Wert berechnet werden. Liegt die asymptotische Signifikanz unter 0,05, gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen in Hinsicht auf die betrachtete Variable, die 17- $\alpha$ -OHP-Konzentration im Urin.

Rang	17- $\alpha$ -OHP-Konzentration [pmol/mol Kreatinin]	Patient(P)/ Kontrollproband(K)
1	36	K
2	56	K
3	87	K
4	100	K
5	116	K
6	171	K
7	173	K
8	179	P
9	207	K
10	211	K
11	232	K
12	259	P
13	278	P
14	298	K
15	361	K

16	413	K
17	616	P
18	620	P
19	824	P
20	1530	P
21	2142	P
22	2229	P
23	2846	P
24	2974	P
25	5166	P
26	10241	P
27	14338	P
28	31217	P

Aus der Rangliste war eine Rangsumme in Höhe von 303,00 für die Patientengruppe abzulesen. Die Rangsumme der Kontrollprobanden war 103,00. Der mittlere Rang der Patienten war der Rang 20,20 und der der Kontrollprobanden 7,92.

Daraus wurden folgende Werte ermittelt:

**17- $\alpha$ -OHP [pmol/mol Kreatinin]**

Mann-Whitney-U	Z	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
12,00	-3,94	0,000

In dem konkreten Fall zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen;  $U = 12,00$ ,  $z = -3,94$ ,  $p = 0,000$ , da die asymptotische Signifikanz unter 0,05 lag. Folglich liegen in der Patientengruppe signifikant (mehr) höhere Werte für die Konzentration von 17- $\alpha$ -OHP im Urin vor als in der Kontrollgruppe.

### 2.5.5.2 T-Test

Für die Hypothesenüberprüfung, ob sich die Konzentrationen von 17- $\alpha$ -OHP im Urin von Frühgeborenen und reifen Neugeborenen, die aufgrund von gewebeverletzenden Eingriffen Schmerzen haben, unterscheiden von den Konzentrationen des Hormons im Urin von gesunden Kontrollprobanden, wurde als parametrischer Test ein T-Test durchgeführt. Um einen T-Test anwenden zu können, müssen die Daten normalverteilt sein und es sollte eine etwa gleich große Stichprobenanzahl der zu vergleichenden Gruppen vorliegen. Mit Hilfe des T-Tests werden zwei Mittelwerte miteinander verglichen. Bei Vorliegen zweier unterschiedlicher Varianzen müssen sie in der Berechnung im Rahmen der Welch-Korrektur berücksichtigt werden (Sachs und Hedderich, 2006). Der Mittelwert der 17- $\alpha$ -OHP-Konzentration im Urin der Patienten ergab eine Konzentration in Höhe von 5030,68pmol/mol Kreatinin, während das arithmetische Mittel der Kontrollprobanden mit 189,36pmol/mol Kreatinin berechnet wurde. Die Berechnung der Standardabweichungen und Konfidenzintervalle ergab folgende Werte.

#### 17- $\alpha$ -OHP [pmol/mol Kreatinin]

		Gruppe	
		Patienten	Kontrollprobanden
N	Gültig	15	13
	Fehlend	0	0
Mittelwert		5030,68	189,36
Median		2142,37	172,56
Standardabweichung		8291,62	115,37
Minimum		179,42	35,76
Maximum		31217,23	413,37
Perzentile	25	615,64	93,69
	50	2142,37	172,56
	75	5166,36	265,20

Die Rechnung zeigte eine deutliche Varianzheterogenität der beiden Gruppen. Aufgrund dessen wurde die Welch-Korrektur angewandt.

### Test bei unabhängigen Stichproben

#### 17- $\alpha$ -OHP [pmol/mol Kreatinin]

Varianzen sind nicht gleich

T-Test für die Mittelwertgleichheit						
T	Df	Signifikanz (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
					Untere	Obere
2,26	14,01	0,040	4841,32	2141,13	249,25	9433,39

Der T-Wert kann mit der dazugehörigen T-Tabelle verglichen werden. Zudem lässt sich der p-Wert berechnen. Liegt der p-Wert unter 0,05, spricht man von einem signifikanten Ergebnis. Der p-Wert ist in der dargestellten Tabelle unter dem Begriff 2-seitige Signifikanz wiedergegeben. In dem konkreten Fall war der p-Wert mit 0,04 kleiner als 0,05 und folglich lag ein signifikant höherer Mittelwert in der Gruppe der Schmerzpatienten im Vergleich zu dem Mittelwert der Kontrollprobanden vor.

## 3. Ergebnisse

Um die Ausgangsfrage nach einer nicht-invasiven Möglichkeit der Schmerzmessung durch Analyse des PGE-M, des LTB<sub>4</sub>, des Glutamats und von 17- $\alpha$ -OHP im Urin von Frühgeborenen und reifen Neugeborenen zu beantworten, haben wir anhand der verschiedenen Versuche die jeweiligen Konzentrationen bestimmt, die Konzentrationen den Probanden der beiden Gruppen, der Schmerzpatienten und den Probanden der Kontrollgruppe, zugeordnet und gegenübergestellt.

### 3.1 Prostaglandin-E-Metabolit

Wie aus der Berechnung der Konzentrationen hervorgeht, wurden folgende Werte für die Konzentrationen des Metaboliten Prostaglandin-E im Urin der Studienteilnehmer bestimmt. Die Konzentrationen wurden jeweils in Beziehung zu den Kreatininkonzentrationen gesetzt. Die Berechnungen bezogen sich zum einen



auf die unverdünnten Urinproben und zum anderen auf die Urinproben mit einer Verdünnung im Verhältnis 1:4.

Prostaglandin-E-M-Konzentrationen im Urin der Schmerzpatienten im Vergleich zu den Prostaglandin-E-M-Konzentrationen der Probanden der Kontrollgruppe:

Unverdünnte Urinproben:

Schmerzpatienten	PGE-M-Konzentration bezogen auf Kreatinin [pg/mg Kreatinin]	Probanden der Kontrollgruppe	PGE-M-Konzentration bezogen auf Kreatinin [pg/mg Kreatinin]
S1	919,05	K1	770,11
S1.1	1414,13	K1.1	410,17
S2	1530,59	K3	864,09
S2.1		K9	228,50
S3	216,69	K10	469,01
S4	1121,80	K11	506,55
S6	124,04	K18	780,67
S7	360,43	K18.1	529,57
S5	207,41	K19	164,11

Verdünnte Urinproben (1:4):

Schmerzpatienten	PGE-M-Konzentration bezogen auf Kreatinin [pg/mg Kreatinin]	Probanden der Kontrollgruppe	PGE-M-Konzentration bezogen auf Kreatinin [pg/mg Kreatinin]
S1	565,24	K1	540,32
S1.1	732,17	K1.1	307,33

S2	1376,08	K3	436,21
S2.1	-	K9	130,27
S3	156,71	K10	400,89
S4	704,098	K11	303,79
S6	92,48	K18	531,35
S7	358,696	K18.1	411,16
S5	93,19	K19	152,11

Die Prostaglandin-E-M-Konzentration der neun untersuchten Urinproben der Schmerzpatienten umfasste eine Wertspanne zwischen 124,04 pg/mg Kreatinin und 1530,59 pg/mg Kreatinin. Der gebildete Mittelwert lag bei 736,77 pg/mg Kreatinin. Dabei konnte bei einer der neun Proben aufgrund eines fehlenden Kreatininspiegels keine Berechnung erfolgen. Diese wurde nicht in die Bildung des arithmetischen Mittels einbezogen. Wurden die Konzentrationen auf Basis der verdünnten Proben ermittelt, so erhielt man Werte zwischen 92,48 pg/mg Kreatinin und 1376,08 pg/mg Kreatinin und ein arithmetisches Mittel von 509,83 pg/mg Kreatinin. Bei sehr hohen Konzentrationen wurde ein deutlicher Konzentrationsunterschied in Abhängigkeit von der der Berechnung zugrunde liegenden Verdünnungsstufe gesehen.

Die Urinprobe des zweiten Zeitpunkts von dem ersten Studienteilnehmer sowie die des ersten Zeitpunkts des zweiten Studienteilnehmers und die des vierten Patienten der Schmerzgruppe enthielten die höchsten Konzentrationen an Prostaglandin-E-M und es wurden Werte von über 1000 pg/mg Kreatinin erreicht. Die niedrigste Konzentration wurde bei der Urinprobe des Schmerzpatienten Nummer 6 in Höhe von 124,04 pg/mg Kreatinin (92,48 pg/mg Kreatinin) ermittelt.

Bei den Berechnungen der Prostaglandin-E-M-Konzentrationen im Urin der neun Probanden der Kontrollgruppe wurden Werte zwischen 164,11 pg/mg Kreatinin und 864,09 pg/mg Kreatinin ausgehend von den unverdünnten Proben und 130,27 pg/mg Kreatinin und 540,32 pg/mg Kreatinin auf Basis der verdünnten Proben ermittelt. Die arithmetischen Mittel betragen 524,75 pg/mg Kreatinin innerhalb der unverdünnten Urinproben und 357,04 pg/mg Kreatinin bei der Gruppe der Urinproben der 1:4-Verdünnung.

Die Prostaglandin-E-M-Konzentrationen im Urin der Kontrollprobanden Nummer neun und 19 wichen von den Konzentrationen der anderen Teilnehmer dieser Gruppe ab und lagen mit den Werten von 228,50 pg/mg Kreatinin ( 130,27 pg/mg Kreatinin) und 164,11 pg/mg Kreatinin (152,11 pg/mg Kreatinin) deutlich niedriger.

Bei der Gegenüberstellung der Prostaglandin-E-M-Konzentrationen im Urin der Schmerzpatienten zu den Konzentrationen der Kontrollprobanden wurde eine größere Schwankung der Werte der Schmerzpatienten sichtbar. Zudem zeigte sich eine leichte Tendenz zu höheren Konzentrationen dieses Metaboliten in der Gruppe der Schmerzpatienten, von denen bei drei Patienten Werte über 1000 pg/mg Kreatinin ermittelt wurden. Eine statistisch sinnvolle Auswertung war jedoch nicht möglich.

### **3.2 Leukotrien-B4**

Die detaillierte Vorgehensweise der Berechnung der Leukotrien-B4-Konzentrationen im Urin der Studienteilnehmer ist im Abschnitt der Methodik (2.3.4) nachzulesen. Die Berechnungen dieses Versuchs stützten sich ebenfalls auf zwei verschiedene Verdünnungsstufen der Urinproben, die unverdünnten Urinproben und eine 1:2-Verdünnung der Proben. Die Konzentrationen wurden in Beziehung zu den Kreatininkonzentrationen gesetzt. Bei dem Versuch lagen nur 10 der Absorptionsbestimmungen oberhalb des *Blank* und konnten der weiteren Konzentrationsermittlung dienen. Vier dieser Werte waren Patienten der Schmerzgruppe und sechs den Probanden der Kontrollgruppe zugeordnet. Dabei ergaben sich insgesamt drei Konzentrationsbestimmungen aus den Berechnungen auf Basis der Urinproben der 1:2-Verdünnung.

Leukotrien-B4-Konzentrationen im Urin der Schmerzpatienten im Vergleich zu den Leukotrien-B4-Konzentrationen der Probanden der Kontrollgruppe:

Unverdünnte Urinproben:

Schmerzpatienten	Leukotrien-B4-Konzentration bezogen auf Kreatinin [pg/mg Kreatinin]	Probanden der Kontrollgruppe	Leukotrien-B4-Konzentration bezogen auf Kreatinin [pg/mg Kreatinin]
S1	238,1	K22	927,7
S10	43,2	K52	442,1
S22	60,3	K53	5,1
		K65	29,7

Verdünnte Urinproben (1:2):

Schmerzpatienten	Leukotrien-B4-Konzentration bezogen auf Kreatinin [pg/mg Kreatinin]	Probanden der Kontrollgruppe	Leukotrien-B4-Konzentration bezogen auf Kreatinin [pg/mg Kreatinin]
S22	15,1	K22	788,6
		K52	343,9

Die höchste Konzentration von Leukotrien-B4 im Urin innerhalb der Schmerzgruppe wurde bei dem Patienten unter dem Pseudonym S1 ermittelt. Diese lag bei 238,1 pg/mg Kreatinin. In den verdünnten Urinproben der Schmerzpatienten konnte nur bei dem Patienten Nummer 22 die Konzentration in Höhe von 15,1 pg/mg Kreatinin berechnet werden.

Die Leukotrien-B4-Konzentrationen in den unverdünnten Urinproben der Kontrollprobanden unterlagen einer starken Streuung (Cmin: 5,1 pg/mg Kreatinin bei K53; Cmax: 927,7 pg/mg Kreatinin bei K22). Das arithmetische Mittel wurde mit 351,15 pg/mg Kreatinin berechnet. Bei den Probanden K22 und K52 konnten die Konzentrationen von Leukotrien-B4 im 1:2-verdünnten Urin nachgewiesen werden. Sie betragen 788,6 pg/mg Kreatinin und 343,9 pg/mg Kreatinin.

Aufgrund der geringen Datenlage und der eingeschränkten Nachweisbarkeit von Leukotrien-B4 mit dem *Leukotriene-B4 ELISA Kit* konnte man keine detaillierten Analysen der Leukotrien-B4-Konzentrationen durchführen und folglich keine Schlussfolgerungen beziehungsweise Vergleiche zwischen den Konzentrationen der gegenübergestellten Gruppen ziehen.

### 3.3 Glutamat

Die Berechnungen der Glutamat-Konzentrationen der Studienteilnehmer stützen sich auf den Versuch mit dem *Glutamat Assay Kit*. In dem Versuch wurden sechs Urinproben von Schmerzpatienten und acht Urinproben von Probanden aus der Kontrollgruppe untersucht. Dabei wurden alle Proben unverdünnt sowie in einer 1:2- und einer 1:4-Verdünnung analysiert. Aus den jeweiligen Absorptionsbestimmungen wurden die folgenden Konzentrationen berechnet und in Beziehung zu den Kreatininkonzentrationen gesetzt.

Glutamat-Konzentrationen im Urin der Schmerzpatienten im Vergleich zu den Glutamat-Konzentrationen der Probanden der Kontrollgruppe:

Unverdünnte Urinproben

Schmerzpatienten	Glutamat-Konzentration bezogen auf Kreatinin [mg/mg Kreatinin]	Probanden der Kontrollgruppe	Glutamat-Konzentration bezogen auf Kreatinin [mg/mg Kreatinin]
S1	0,17	K20	0,11
S9	0,04	K22	0,12
S10	0,15	K23	0,08
S14	0,03	K28	0,03
S15	0,05	K36	0,03
S17	0,02	K38	0,16

		K43	0,03
		K45	0,03

Verdünnte Urinproben (1:2):

Schmerzpatienten	Glutamat-Konzentration bezogen auf Kreatinin [mg/mg Kreatinin]	Probanden der Kontrollgruppe	Glutamat-Konzentration bezogen auf Kreatinin [mg/mg Kreatinin]
S1	0,18	K20	0,17
S9	0,05	K22	0,11
S10	0,18	K23	0,09
S14	0,03	K28	0,03
S15	0,06	K36	0,03
S17	0,02	K38	0,17
		K43	0,04
		K45	0,03

Verdünnte Urinproben (1:4):

Schmerzpatienten	Glutamat-Konzentration bezogen auf Kreatinin [mg/mg Kreatinin]	Probanden der Kontrollgruppe	Glutamat-Konzentration bezogen auf Kreatinin [mg/mg Kreatinin]
S1	0,14	K20	0,20
S9	0,03	K22	0,09
S10	0,17	K23	0,09
S14	0,02	K28	0,03
S15	0,04	K36	0,02
S17	0,003	K38	0,17

		K43	0,04
		K45	0,03

Die Glutamat-Konzentrationen, die aus den unverdünnten Urinproben der sechs Schmerzpatienten ermittelt wurden, betragen zwischen 0,02 mg/mg Kreatinin und 0,17 mg/mg Kreatinin. Der Mittelwert lag bei 0,077 mg/mg Kreatinin. Dabei wurden bei den Schmerzpatienten S1 (0,17 mg/mg Kreatinin) und S10 (0,15 mg/mg Kreatinin) die höchsten Konzentrationen mit einem Abstand von  $\geq 0,1$  mg/mg Kreatinin zu den Konzentrationen der anderen Schmerzpatienten berechnet. Im Vergleich zu den Berechnungen anhand der unverdünnten Urinproben, ergaben sich gering abweichende Konzentrationen aus den Auswertungen der Urinproben, die 1:2, bzw. 1:4 verdünnt waren.

Innerhalb der Gruppe der Kontrollprobanden wurden Glutamat-Konzentrationen zwischen 0,03 mg/mg Kreatinin und 0,16 mg/mg Kreatinin und ein arithmetisches Mittel von 0,074 mg/mg Kreatinin berechnet.

Insgesamt zeigte sich bei dem Versuch mit dem Glutamat *Assay Kit* eine gute Nachweisbarkeit von Glutamat im Urin der untersuchten Frühgeborenen und reifen Neugeborenen. Der Vergleich der Konzentrationen der Schmerzpatienten mit den Glutamat-Konzentrationen im Urin der Kontrollprobanden lieferte keinen Hinweis auf eine Abhängigkeit der Höhe der Konzentration von dem Symptom Schmerz.

### **3.4 17- $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron**

In der folgenden Tabelle werden die Konzentrationen von 17- $\alpha$ -OHP im Urin der Schmerzpatienten den Konzentrationen im Urin der Kontrollprobanden gegenübergestellt. Dabei wurde in diesem Versuch darauf geachtet, dass den Schmerzpatienten Probanden eines ähnlichen Geburts- und Lebensalters als Kontrolle zugeordnet waren, um die Heterogenität der beiden Gruppen so gering wie möglich zu halten.

Schmerzpatienten	17- $\alpha$ -OHP-Konzentration [pmol/mol Kreatinin]	Probanden der Kontrollgruppe	17- $\alpha$ -OHP-Konzentration [pmol/mol Kreatinin]
S1	1530	K55*	36
S1.1	2974	K71*	207
S9	14338	K66	413
S14	2846	(K70	2024)
S15	5166	K67	298
S17	824	K29	173
S18	2142	K57*	232
S19	31217	K73*	87
S20	278	K24	361
S21	259	K56	116
S22	616	K28	211
S23	620	K61	100
S24	179	K35	56
S25	10241	(K74	5234)
S26	2229	K44	171

\*: keine exakte Adjustierung in Hinsicht auf Geburts- und Lebensalter möglich

Die statistische Auswertung der gemessenen Konzentrationen von 17- $\alpha$ -OHP im Urin der Frühgeborenen und reifen Neugeborenen ergab in dem Mann-Whitney-U-Test signifikant höhere Konzentrationen in der Gruppe der Schmerzpatienten im Vergleich zu der Gruppe der Kontrollprobanden. In die Berechnung wurden alle 15 gemessenen Konzentrationen der Schmerzpatienten und 13 Konzentrationen der Kontrollprobanden einbezogen. Der ermittelte Wert für p lag mit 0,000 sicher unter 0,05.

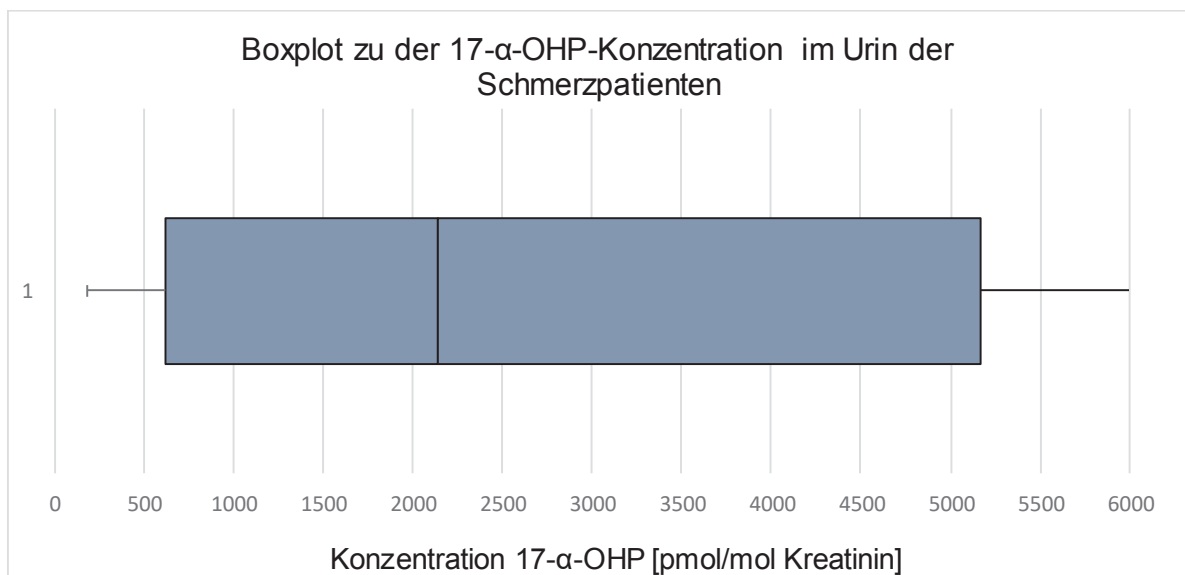
Ebenso konnte zu  $\alpha = 0,05$  im Mittel eine signifikant höhere 17- $\alpha$ -OHP-Konzentration im Urin der Schmerzpatienten anhand des T-Tests bestimmt werden. In dem T-Test

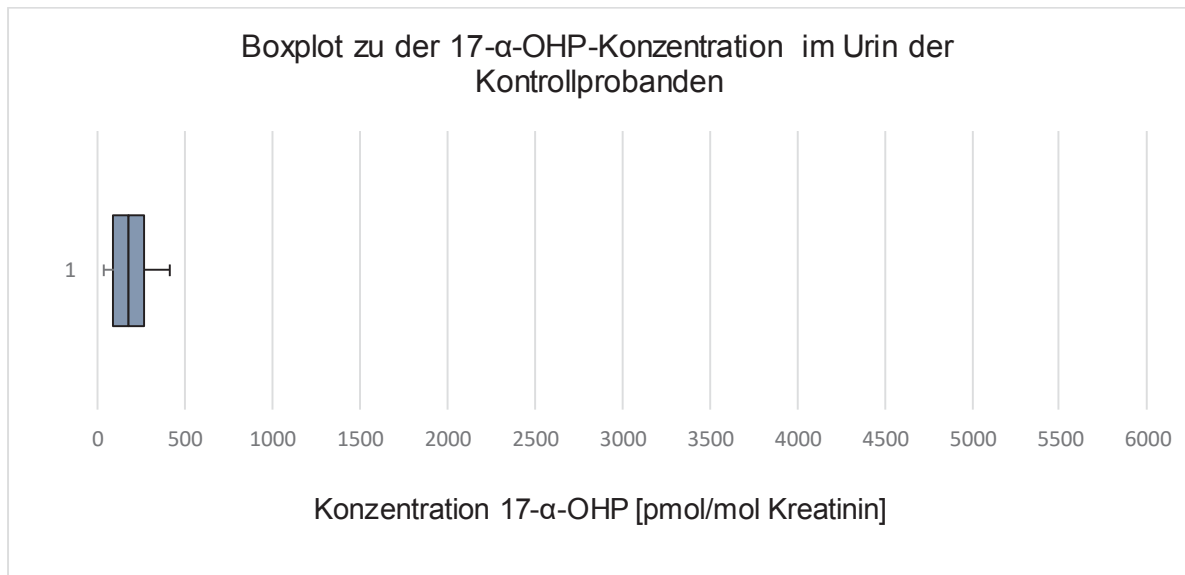


für unabhängige Stichproben mit ungleichen Varianzen wurde ein p-Wert von 0,04 berechnet.

Die ermittelten Konzentrationen der Probanden K74 und K70 konnten (wie bereits im Abschnitt der statistischen Auswertung 2.5.5 geschildert) wegen eines Kreatininzuordnungsfehlers und einer Ungewissheit in Hinsicht eines Schmerzempfindens nicht in der statistischen Auswertung berücksichtigt werden.

### 3.4.1 Grafische Darstellung der Konzentration von 17- $\alpha$ -OHP im Urin der Schmerzpatienten im Vergleich zu den Konzentrationen der Kontrollprobanden





Die Diagramme veranschaulichen deutlich, dass die Konzentrationen von 17- $\alpha$ -OHP im Urin der Schmerzpatienten höher liegen als im Urin der Kontrollprobanden. Zudem werden die große Spannweite und besonders der hohe positive Fehlerindikator in der Gruppe der Schmerzpatienten sichtbar. Die Konzentrationen im Urin der Kontrollprobanden unterliegen keiner so deutlichen Streuung. Um die gleiche Skalierung beider Diagramme zu ermöglichen, wird auf die Darstellung der drei höchsten Konzentrationen der Schmerzpatienten verzichtet. Diese liegen mit einem deutlichen Abstand über 6000 pmol/mol Kreatinin.

## 4. Diskussion

### 4.1 Einleitung in die Diskussion

Schmerz ist ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit einer aktuellen oder potentiellen Gewebeschädigung in Zusammenhang steht (Merskey et al., 1979). Ist es möglich, das subjektive Erlebnis von Schmerz im klinischen Alltag anhand von biochemischen Daten objektiv zu messen? Die Definition allein macht

die objektive Erfassung von Schmerzen schwierig. Zusätzlich erschwert wird die Messung bei Patienten, die sich nicht eindeutig zu ihren Empfindungen äußern können. Dies ist zum einen der Fall bei komatösen Patienten, zum anderen haben Frühgeborene und reife Neugeborene eine eingeschränkte Kommunikationsfähigkeit und können ihr Schmerzempfinden daher nur begrenzt mitteilen. Für die Entwicklung einer nicht-invasiven Methode der Schmerzmessung bei Frühgeborenen und reifen Neugeborenen wurden die Konzentrationen des Metaboliten Prostaglandin-E-M sowie des Leukotrien-B<sub>4</sub>, des Glutamats und des 17- $\alpha$ -OHP im Urin ermittelt und eine Gegenüberstellung der Konzentrationen der zu vergleichenden Gruppen, der Schmerzpatienten und der Probanden der Kontrollgruppe, wurde durchgeführt. In dieser Studie erfolgte die Zuordnung zu der Schmerzgruppe auf Basis einer schmerzhaften Intervention am Kind. Eine Intervention wurde als schmerzhaft eingestuft, wenn es dabei zu einer Gewebeschädigung kommen konnte. So galten Frühgeborene und reife Neugeborene postoperativ, nach erfolgter Intubation oder dem Legen einer Drainage als Schmerzpatienten. Die Analyse von 17- $\alpha$ -OHP im Urin mit dem Massenspektrometer und *UPLC* zeigte signifikant höhere Konzentrationen im Urin der Schmerzpatienten. Die Ergebnisse lieferten bei drei der untersuchten Urinproben der Schmerzpatienten erhöhte Prostaglandin-E-M-Konzentrationen im Urin von Frühgeborenen und reifen Neugeborenen, die aufgrund von gewebeverletzenden Eingriffen Schmerzen hatten, im Vergleich zu gesunden Probanden der Kontrollgruppe. Die Glutamat-Konzentrationen verhielten sich in beiden Gruppen gleich. Eine detaillierte Auswertung der Leukotrien-B<sub>4</sub>-Konzentrationen konnte aufgrund der schlechten Nachweisbarkeit nicht erfolgen.

## **4.2 Auswahl der Parameter**

Als zu untersuchende Parameter wurden die Eicosanoide Prostaglandin-E-M und Leukotrien-B<sub>4</sub> sowie der Neurotransmitter Glutamat und das Steroidhormon 17- $\alpha$ -OHP gewählt.

#### **4.2.1 Prostaglandin-E-Metabolit und Leukotrien-B4**

Leukotriene sind am Entzündungsgeschehen beteiligt und sensibilisieren die Nozizeptoren (Schüllner und Mur, 2012). Ebenfalls greift der Metabolit Prostaglandin-E in die Nozizeption durch Sensibilisierung der Rezeptoren ein. Wie bereits in der Einleitung geschildert, zeigten sich erhöhte Konzentrationen dieser Parameter im Speichel bei schmerzhaften Kiefergelenken (Quinn und Bazan, 1990). Leukotrien-B4 und PGE-M sind jedoch nicht schmerzspezifisch, sondern spielen bei zahlreichen Signalwegen im Körper eine Rolle. Mit Blick auf die vorgestellte Studie ist eine Beeinflussung der Ergebnisse aufgrund von Entzündungsgeschehen wahrscheinlich. Zytokine, Interleukine und der Wachstumsfaktor der Granulozyten fördern die Synthese des Leukotrien-B4 (Crooks und Stockley, 1998). Leukotrien-B4 aktiviert daraufhin die Chemotaxis der Leukozyten (Samuelsson, 1982). In humanen Studien wurde Leukotrien-B4 in Gewebe und Flüssigkeiten von Patienten mit Entzündungszellen entdeckt (Bray, 1983).

Aus ethischen Gründen wurde selbstverständlich keine zeitliche Verzögerung der Schmerztherapie bei den Schmerzpatienten akzeptiert, wodurch die Urinabnahme der Studienteilnehmer häufig bereits unter beginnender Therapie erfolgte. Die medikamentöse Therapie der Patienten bestand aus Opioiden, wie Morphin und Fentanyl sowie dem nicht-Opioid-Analgetikum Paracetamol. Die Wirkmechanismen von Paracetamol waren Jahre nach Entdeckung des Medikaments nicht sicher geklärt. Es wurde herausgefunden, dass die analgetische Wirkung zum Teil auf der Hemmung der Cyclooxygenasen beruht. In einem Tierversuch mit Ratten zeigte sich unter der oralen Einnahme von Paracetamol eine supprimierte Konzentration von Prostaglandin E2 im Hinterhorn sowie im Rückenmark. Eine vollständige Unterdrückung der Prostaglandin E2 Synthese konnte jedoch nicht mit der höchsten Paracetamoldosis (300mg/kg) erfolgen. In dem Tierversuch wurde keine Auswirkung des Paracetamols auf die Ausscheidung des Metaboliten Prostaglandin-E2 im Urin festgestellt (Muth-Selbach et al., 1999). Im Gegensatz dazu gibt es unterschiedliche Ergebnisse zu dem Einfluss von Paracetamol auf die Prostaglandinausscheidung bei dem Menschen. Die meisten Studien zeigen eine verminderte Prostaglandinausscheidung unter Einnahme von Paracetamol (Berg et

al., 1990). Dabei wurde jedoch auch postuliert, dass bei älteren Personen eine stärkere Suppression der Ausscheidung von Prostaglandinen und seinen Metaboliten stattfindet (Berg et al., 1990). Diese Erkenntnis unterstützt wiederum die Ausgangsthese des Vorhandenseins erhöhter Prostaglandin-E-M-Konzentrationen im Urin bei Frühgeborenen und reifen Neugeborenen, die Schmerzen haben.

Die Konzentrationen wurden aus Spontanurinproben, die zu unterschiedlichen Tageszeiten gewonnen wurden, ermittelt. In einer Studie zu der Erhebung von Normwerten von Eicosanoiden im Urin von Kindern aller Altersstufen wurde eine signifikante Abweichung der Konzentrationen im Spontanurin im Vergleich zu den Konzentrationen im 24-h-Sammelurin aufgezeigt. Hieraus lässt sich schließen, dass eine zirkadiane Rhythmik für die renale Ausscheidung von Leukotrien-E4 und Prostaglandin-E2 besteht. In dieser Studie wurden jedoch keine Frühgeborenen und reifen Neugeborenen rekrutiert, sondern Kinder im Alter von drei bis 17 Jahren untersucht (Zilonkovski und Seyberth, 2008). Im Gegensatz dazu wurde bei der Untersuchung von Wennmalm, bei der auch reife Neugeborene und Frühgeborene involviert waren, keine zirkadiane Rhythmik der Leukotrien-E4- und Prostaglandin-E2-Konzentrationen bezogen auf Kreatinin nachgewiesen (Wennmalm et al., 1992). Die Aussagekraft der Studie ist jedoch durch die niedrige Rekrutierungszahl von 15 Patienten reduziert.

#### **4.2.2 Glutamat**

Glutamat ist der exzitatorische Neurotransmitter des nozizeptiven Systems und dient sowohl der Schmerzweiterleitung als auch der Schmerzchronifizierung (Zimmermann, 2004). Bei neuropathischen Schmerzen wurde eine erhöhte Glutamat-GABA-Ratio im Rückenmark festgestellt (Shen et al., 2014). Eine humane Studie zu Glutamat-Konzentrationen im Urin ist bisher nicht erfolgt. Durch die standardisierte Ernährung der Studienteilnehmer reduziert sich der Einfluss dieses *Confounder* auf die Aminosäurekonzentration im Urin.

### **4.2.3 17- $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron**

17- $\alpha$ -OHP wurde in einer aktuellen Studie zum Einfluss von gewebeverletzenden Eingriffen untersucht. Es wurde eine negative Korrelation der Konzentration von 17- $\alpha$ -OHP im Blut mit der Anzahl der gewebeverletzenden Eingriffe gesehen (Rohan, 2016). Da 17- $\alpha$ -OHP ein Zwischenprodukt in der Cortisolsynthese darstellt und dadurch zu den so genannten Stresshormonen gezählt werden kann, muss der *Confounder* Stress im Zusammenhang mit dieser Studie untersucht werden. Stress triggert die Hypophysen-Hypothalamus-Achse und aktiviert dadurch die Steroidhormonsynthese der Nebenniere (Lupien et al., 2009). Viszerale Reize oder Hautreize führen zu einer Stressantwort. So sind auch schmerzassoziierte Reize Stressstimuli (Whitfield und Grunau R. E., 2000) und greifen in die Synthese der Steroidhormone ein. Es gibt jedoch viele weitere Stressoren. Jeder der 15 Schmerzpatienten lag auf der Intensivstation. Auf fast jeder Intensivstation sind eine Reihe von Stressoren wie künstliches Licht, Geräusche von Geräten, Manipulationen am Patienten selber oder an liegenden Kathetern zu sehen. Ein Einfluss von Medikamenten auf die Steroidhormonsynthese ist möglich. Viele der Patienten wurden mit Adrenalin, Dopamin und/oder Dobutamin therapiert. Die Medikamente führen zu einer Steigerung des Sympathikus. Die Folge ist eine vermehrte Stressreaktion. Zudem wird die Ausschüttung von Kortikotropin, das die Cholesterinmobilisierung und die Expression verschiedener Enzyme der Steroidhormonsynthese stimuliert, durch Noradrenalin getriggert (Lang und Lang P., 2007). Die Konzentrationsmessungen von 17- $\alpha$ -OHP im Blut in den bisherigen Studien zeigten eine geringe Variabilität und bis zu dem dritten Lebensmonat keine zirkadiane Rhythmik (Vermes et al., 1980). Selbst bei Frühgeborenen mit extrem niedrigem Geburtsgewicht sei die Variabilität der Konzentration von 17- $\alpha$ -OHP im Blut gering (Jett et al., 1997)

## **4.3 Ergebnisdiskussion**

### **4.3.1 Prostaglandin-E-Metabolit**

Die Ergebnisse der ermittelten Konzentrationen von dem Metaboliten Prostaglandin-E im Urin der Frühgeborenen und reifen Neugeborenen zeigten im Mittel eine leichte

Tendenz höherer Konzentrationen im Urin der Schmerzpatienten im Vergleich zu denen im Urin der Kontrollprobanden. Besonders herausgestochen sind dabei drei Konzentrationen. Diese lagen bei über Tausend pg Prostaglandin-E-M/mg Kreatinin (S1: 1414,13, S2: 1530,59, S4: 1121,80). Der Patient S1 war ein männliches Frühgeborenes der 24. Schwangerschaftswoche. Aufgrund der Unreife kam es zu Komplikationen wie einer fokalen intestinalen Perforation und im weiteren Verlauf zu einer nekrotisierenden Enterokolitis. Die nekrotisierende Enterokolitis ist eine entzündliche Erkrankung des Gastrointestinaltraktes, die besonders Frühgeborene auf der Intensivstation betrifft (Boccia et al., 2001). Der Studienteilnehmer S1 wurde mehrfach operiert. Bei der ersten Operation wurden 11cm des Dünndarms reseziert, im Verlauf musste viermal ein subhepatisches Extravasat punktiert werden und fünf Tage vor der zweiten Urinabnahme erfolgte eine explorative Laparotomie bei nekrotisierender Enterokolitis des kompletten Dünndarms. Der Patient bekam eine Sepsis sowie ein akutes Nierenversagen und verstarb einen Monat später. Über die Zeit der Operationen war der Patient intubiert und erhielt eine Schmerztherapie mit Morphin und Paracetamol. Zum Zeitpunkt der hier diskutierten Urinabnahme bestand die Schmerztherapie aus Fentanyl über den Perfusor. Im Vergleich zu den anderen Frühgeborenen und reifen Neugeborenen der Schmerzgruppe war dieser Fall ein besonders schwerer mit einem sehr starken und ausgebreitetem Entzündungsgeschehen. Bei einer Entzündung handelt es sich um einen biologischen Prozess des Immunsystems für die Elimination eines als fremd erkannten Antigens aus dem Organismus. Immunzellen setzen im Rahmen der Entzündungsreaktion Botenstoffe frei, woraufhin die Zytokine die Cyclooxygenase2 aktivieren. Das Produkt der Cyclooxygenase2 ist zum Teil das Prostaglandin-E2. Dieses führt zu einer Vasodilatation und somit zu einer Steigerung der Gefäßpermeabilität und zu einem Ödem (Kern, 2016). Die starke Entzündungsreaktion bei dem Patienten S1 kann die Ursache für die hohe Konzentration des Metaboliten Prostaglandin-E im Urin sein. Nicht zu vernachlässigen ist jedoch, dass eine Entzündung in aller Regel mit einem Schmerzempfinden auftritt. Die sensiblen Nervenendigungen werden von dem Prostaglandin-E2 depolarisiert und der Schmerzreiz wird über das nozizeptive System an den Cortex und den Thalamus geleitet (Kern, 2016). Andererseits kann

das Symptom Schmerz ohne eine Entzündungsreaktion auftreten. Die Prostaglandin-E-Konzentrationen im Urin der Patienten S2 und S4 können ebenfalls im Zusammenhang mit einer Entzündung stehen. In dem Fall S4 handelt es sich um einen weiblichen frühgeborenen Zwilling der 27. Schwangerschaftswoche bei Zustand nach einem fetofetalen Transfusionssyndrom mit intrauteriner Lasertherapie und Amnionauffüllung. Zudem wurde eine Colektomie und Ileumteilresektion bei Mesenterialinfarkt (differenzialdiagnostischer nekrotisierender Enterokolitis) durchgeführt. Im Anschluss entwickelte sich ein intrakranieller Abszess parietooccipital links, der drainiert und gespült werden musste. Die Beatmung erfolgte mit einer *CPAP*-Maske. Der für die Studie analysierte Urin wurde drei Tage nach der neurochirurgischen Operation abgenommen. Patient S2 ist ein männliches Neugeborenes, wurde in der 42. Schwangerschaftswoche geboren und lag auf der Intensivstation mit maschineller Beatmung bei Zustand nach Sepsis mit *Enterokokkus faecalis*. Zur Analgesie wurde Paracetamol verabreicht. Bei ihm wurde ein Stoffwechseldefekt mit einer vermehrten Ausscheidung von 2-Oxoglutarinsäure festgestellt. Ein Effekt dieser Erkrankung auf die Prostaglandinausscheidung ist bisher nicht bekannt. Patient S2 war zu der Zeit der Urinabnahme bereits im Säuglingsalter, weshalb er aus den Rahmenbedingungen der Studie fällt.

Die niedrigste Konzentration in Höhe von 124,04 pg/mg Kreatinin wurde bei dem Patienten S6 ermittelt. Dieser war ebenfalls kein Früh- bzw. Neugeborenes zum Zeitpunkt der Analyse. Leonhardt zeigte erhöhte Prostaglandin-E-M-Konzentrationen im Urin von Neugeborenen innerhalb der ersten 30 Lebenstage im Vergleich zu älteren Kindern (Leonhardt et al., 1992). Dies könnte die niedrige Prostaglandin-E-M-Konzentration im Urin des Patienten S6 begründen.

Um eine genauere Bewertung der Aussagekraft des Parameters PGE-M in Bezug auf das Schmerzempfinden eines Patienten treffen zu können, muss eine Studie mit einer höheren Rekrutierungszahl durchgeführt werden, bei der auf die hier beschriebenen *Confounder*, wie eine Entzündung geachtet wird. Aus der durchgeführten Studie lassen sich keine belastbaren Aussagen über den Einfluss von Schmerz auf die Konzentration von PGE-M im Urin treffen.



### 4.3.2 Leukotrien-B4

Der Nachweis der Konzentrationen von Leukotrien-B4 im Urin von Frühgeborenen und reifen Neugeborenen mit dem *Human Leukotriene-B4 ELISA Kit*, No: MBS017082, von *MyBioSource* ist missglückt. Bei  $\frac{3}{4}$  der analysierten Proben wurde eine Konzentration unterhalb des *Blank* festgestellt, sodass die Werte nicht weiterverwendet werden konnten. Die wenigen nachweisbaren Konzentrationen unterlagen einer deutlichen Streuung.

### 4.3.3 Glutamat

Die Analysen der Glutamat-Konzentrationen in der Studie zeigten die geringsten Abweichungen der ermittelten Konzentrationen ausgehend von den unverdünnten Urinproben im Vergleich zu denen, die auf Basis der verdünnten Urinproben berechnet wurden. Der Vergleich der Konzentrationen der gegenübergestellten zwei Gruppen lieferte keinen Hinweis auf eine Aussagekraft des Parameters in Hinsicht auf die Nozizeption. In beiden Gruppen wurde ein Mittelwert im Bereich von 0,07 bis 0,09 mg/mg Kreatinin berechnet. Die meisten Werte der Konzentrationen lagen in beiden Gruppen zwischen 0,02 und 0,07 mg/mg Kreatinin. In der Schmerzgruppe gab es zwei Konzentrationsabweichungen, bei denen Werte von über 0,14 mg/mg Kreatinin gemessen wurden (S1: 0,17 mg/mg Kreatinin, S10: 0,15 mg/mg Kreatinin). Ebenso wurden drei abweichende Glutamat-Konzentrationen in der Gruppe der Kontrollprobanden analysiert (K20: 0,11 mg /mg Kreatinin; K22: 0,12 mg /mg Kreatinin; K38: 0,16 mg /mg Kreatinin). Patient S1 ist das männliche Frühgeborene mit komplikationsreichem Verlauf bei nekrotisierender Enterokolitis. Er wurde bereits näher in der Ergebnisdiskussion der Prostaglandinkonzentrationen (4.3.1) vorgestellt. Bei dem Studienteilnehmer S10 handelt es sich um ein weibliches Frühgeborenes, geboren in der Schwangerschaftswoche 23+2. Das Frühgeborene hatte nach der Geburt ein *Respiratory Distress Syndrome* (RDS) Grad 2, einen persistierenden Ductus Arteriosus Botalli sowie eine Hyperbilirubinämie. In der ersten Lebenswoche kam es zu einer Colonperforation und Anlage eines Anus praeter. Der weitere Verlauf gestaltete sich komplikationsreich mit einer Re-

Operation bei Nahtinsuffizienz, einem prärenalen Nierenversagen, rezidivierenden Infekten, einer Thrombose der Vena Cava Inferior und der Nierenvene und einer periventrikulären Leukomalazie. Das Frühgeborene litt zusätzlich an einer Osteopenie und einer Hypothyreose. Die Patientin verstarb mit viereinhalb Monaten bei zunehmender respiratorischer und Nieren-Insuffizienz. Die analysierte Urinprobe wurde zu einem Zeitpunkt abgenommen, an dem eine Oberschenkelschafffraktur bei der Patientin festgestellt wurde. Die Fraktur wurde konservativ im Gips behandelt. Bis zu fünf Tage vor der Probenabnahme war die Patientin intubiert und unter Morphintherapie. Zum Zeitpunkt der Abnahme der Urinprobe wurde die Patientin mit Paracetamol oral therapiert.

Das weibliche Frühgeborene K22 ist ein Zwilling der 31. Schwangerschaftswoche und wurde per Sectio bei Amnioninfektionssyndrom und vorzeitigem Blasensprung geboren. Auf der Überwachungsstation erkrankte die Patientin an einer Colitis, die zu der Zeit der Urinabnahme ausgeheilt war. Die Urinabnahme erfolgte am 37. Lebenstag. Es zeigten sich keine Besonderheiten während der Urinabnahme und in einem zweiwöchigen Zeitraum um diesen Zeitpunkt herum in Bezug auf das Schmerzverhalten, die Ernährung, die medikamentöse Therapie und/oder die Laborwerte. Dem Pseudonym K20 ist ein weibliches Zwillingsfrühgeborenes zugeordnet. Dieses ist in der 30. Schwangerschaftswoche geboren und wurde auf der Neugeborenenstation wegen einer intrauterinen Wachstumsrestriktion beim fetofetalen Transfusionssyndrom, einer Nabelhernie, einem persistierenden Foramen ovale und einem Hämangiom überwacht. Klinisch und anhand der Vitalparameter zeigten sich keinerlei Besonderheiten und/oder Auffälligkeiten in Hinblick auf ein Schmerzempfinden. Therapeutisch erfolgte die Gabe von Eisen und Vitamin D. Bei dem Proband K38 handelt es sich um ein männliches Frühgeborenes der 25. Schwangerschaftswoche. Die primäre Sectio erfolgte bei pulmonalem Hypertonus der Mutter. Bereits in der Schwangerschaft erfolgte eine Therapie mit Acetylsalicylsäure und Heparin wegen eines Antiphospholipidsyndroms. Das Kind kam unreif mit einem RDS und intraventrikulären Hämorrhagien zweiten Grades zur Welt. Es entwickelte auf der Intensivstation eine Kathetersepsis sowie eine Niereninsuffizienz unter Ibuprofen-therapie bei persistierendem Ductus Arteriosus

Botalli. Der Ductus wurde daraufhin operativ verschlossen. Im dritten Lebensmonat erfolgten eine Laparotomie bei einem Volvulus und drei Wochen später ein operativer Verschluss einer Hernie. Nachdem die Operationen überstanden waren und der Patient weder intensivpflichtig war, noch schmerztherapeutisch behandelt werden musste, konnte er auf die Neugeborenenstation verlegt werden. Dort erfolgte unter der alleinigen Therapie mit Eisen und Simecon die Urinabnahme für die Studie als Teil der Kontrollgruppe. Dieser Patient war zu einem früheren Zeitpunkt (Ductusligatur) als Studienteilnehmer S9 der Schmerzgruppe zugeordnet. Die Glutamat-Konzentration in dem untersuchten Urin der Schmerzgruppe lag bei 0,037 mg/mg Kreatinin. Im intubierten Zustand wurde das Frühgeborene mit Morphin und Paracetamol therapiert.

Bei Betrachtung der Probanden und ihrer Krankengeschichten im Detail fällt auf, dass die erhöhten Glutamat-Konzentrationen im Urin besonders bei Frühgeborenen nach dem 30. Lebensstag auftreten. Die Pseudonyme S9 und K38 sind dem gleichen Probanden, jedoch zu unterschiedlichen Lebenszeitpunkten zugeordnet. Es ist interessant, dass zu dem ersten Zeitpunkt der Abnahme einer Urinprobe, an dem erhöhte Glutamat-Konzentrationen aufgrund eines Schmerzempfindens vermutet wurden, die Glutamat-Konzentration im Urin deutlich niedriger war als zu dem späteren Abnahmezeitpunkt für die Kontrollgruppe. Die erste Abnahme erfolgte am 27. Lebensstag, während die zweite Urinprobe erst am 104. Lebensstag aufgefangen wurde. Dieses Indiz für höhere Glutamat-Konzentrationen mit steigender Anzahl von Lebensstagen wird von den anderen Analysen unterstützt. Bei allen Probanden mit erhöhten Glutamat-Konzentrationen im Urin wurde der Urin, der untersucht wurde, am 37. oder einem späteren Lebensstag abgenommen. Dagegen erfolgten die Urinabnahmen der Studienteilnehmer mit niedrigeren Glutamat-Konzentrationen bereits vor dem 28. Lebensstag, bzw. bei sechs der acht Probanden am 6. Lebensstag oder früher. Zudem wurden die Studienteilnehmer, S1 (23+6), S10 (23+2), K20 (29+2), K22 (30+5) und K38 (24+2), alle vor der 32. SSW geboren. Demgegenüber stehen die Probanden, bei denen die Glutamat-Konzentrationen im Bereich zwischen 0,02 mg/mg Kreatinin und 0,06 mg/mg Kreatinin lagen. Bis auf zwei sind alle diese Probanden nach der 34. SSW geboren (S9 24+2, S14 25+1, S15 34+2,

S17 36+2, K28 39+4, K36 40+1, K43 40+1, K45 40+4). Der Studienteilnehmer K23 spielt eine besondere Rolle. Bei dem Probanden handelt es sich um ein männliches Zwillingsfrühgeborenes der 31. Schwangerschaftswoche, das bei Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom nach vorzeitigem Blasensprung per Sectio geholt wurde. Es bestanden eine Hyperbilirubinämie, die eine Fototherapie erforderlich machte, sowie ein persistierendes Foramen ovale und ein persistierender Ductus Arteriosus Botalli. Die Urinabnahme erfolgte am 37. Lebenstag auf der Neugeborenenstation. Es zeigten sich im Verlauf keine interventionsbedürftigen Erkrankungen und keine physiologischen Hinweise auf ein Schmerzverhalten. Die Glutamat-Konzentration im Urin lag abhängig von den Berechnungen ausgehend von den verdünnten und/oder der unverdünnten Urinprobe zwischen 0,07 und 0,09 mg/mg Kreatinin. Damit liegt die Konzentration weder in dem Wertebereich der erhöhten Konzentrationen, noch in dem der niedrigeren. Der Proband K23 ist der Zwilling von Studienteilnehmer K22. Die Zwillinge unterscheiden sich in Hinsicht auf das Geschlecht. Der stationäre Aufenthalt zeigte jedoch bis auf eine vorübergehende teilparenterale Ernährung des Probanden K23 einen gleichartigen Verlauf. Betrachtet man die Ernährung aller Studienteilnehmer, von denen Urin im Rahmen des Glutamatversuchs untersucht wurde, finden sich sowohl bei den Probanden mit erhöhten Konzentrationen im Urin als auch in der anderen Gruppe Teilnehmer mit teilparenterale oder vorübergehender parenterale Ernährung. In Hinblick auf den Einfluss der Ernährung auf die Höhe der Glutamat-Konzentration kann keine Schlussfolgerung gezogen werden. Die Verteilung der Geschlechter sieht so aus, dass drei von den fünf Probanden, bei denen die Glutamat-Konzentration über 0,1 mg/mg Kreatinin im Urin lag, weiblich sind. Dagegen sind fünf der acht Probanden mit Glutamat-Konzentrationen unter 0,06 mg/mg Kreatinin männlich. Da die Kreatininwerte der männlichen Frühgeborenen und reifen Neugeborenen häufig über denen der weiblichen liegen, ist es möglich, dass der absolute Wert der Glutamat-Konzentration im Spontanurin bei manchen Studienteilnehmern im Vergleich zu den anderen höher liegt, obwohl die Konzentration in Bezug auf das Kreatinin den niedrigeren Werten zugerechnet wird. Dies ist z.B. der Fall bei dem Proband K23. Dennoch, bzw. gerade aus diesem Grund, ist der Kreatininwert bei der Analyse und der Berechnung von Konzentrationen im Urin als Bezugsgröße bei Kindern äußerst

sinnvoll (Simonette und Konrad, 2006). Ein Einfluss von bestimmten Medikamenten oder Erkrankungen des Neugeborenen auf die Höhe der Glutamat-Konzentration konnte im Rahmen dieser Studie nicht entdeckt werden.

Die abweichende Konzentrationsbestimmung von 0,003mg/mg Kreatinin bei der 1:4-verdünnten Urinprobe des Patienten S17 könnte in einem Fehler bei dem Pipettieren begründet sein.

#### **4.3.4 17- $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron**

Die 17- $\alpha$ -OHP-Konzentrationen im Urin der Schmerzpatienten sind signifikant höher als die Konzentrationen im Urin der Kontrollprobanden. Diese Aussage bestätigen der Mann-Whitney-U- und der T-Test. Anhand des Mann-Whitney-U-Tests lässt sich jedoch keine Aussage machen, um welchen Wert die Konzentrationen in der Schmerzgruppe höher liegen. Die absoluten Differenzen zwischen den Konzentrationen spielen keine Rolle. Dadurch kann man keinen genauen Wert für den klinischen Alltag definieren, der ein Schmerzerleben definiert und eine Schmerztherapie einleiten lässt. Bei dem Mann-Whitney-U-Test muss man bedenken, dass es sich um einen non-parametrischen Test handelt, der weniger *powerful* ist (Woodward, 2005). Zudem ist er unempfindlich für Varianzunterschiede (Sachs und Hedderich, 2006). In den Lehrbüchern wird deshalb aus Evidenzgründen empfohlen, bei Möglichkeit einen parametrischen Test durchzuführen. Der T-Test ist aufgrund der geringen Datenmenge von  $n=28$ , der großen Spannbreite der Daten und den unterschiedlichen Varianzen in den zu vergleichenden Gruppen störanfällig. Eine nicht zufällige Auswahl der Probanden führt zu einer geringeren Standardabweichung und einer größeren Differenz der Mittelwerte, sodass das Ergebnis positiv beeinflusst wird (Sachs und Hedderich, 2006). Ein möglicher Ausreißer könnte die Aussage des T-Tests in die gegenteilige Richtung verändern und dadurch die Nullhypothese, gleich großer Mittelwerte der Konzentrationen von 17- $\alpha$ -OHP im Urin der Schmerzpatienten und Kontrollprobanden, unterstützen. Da in der statistischen Auswertung sehr große Varianzen berechnet wurden, wäre ein großer Stichprobenumfang sinnvoll, um eine sichere Aussage treffen zu können (Sachs und Hedderich, 2006). Anhand einer

Studie mit einer größeren Rekrutierungszahl könnte die Normalverteilung besser dargestellt und überprüft werden. Eine Normalverteilung ist Voraussetzung für den T-Test. Bei einem Zweifel sollte eine verteilungsfreie Auswertung stattfinden, wie dies mit dem Mann-Whitney-U-Test geschah (Gaus und Muche, 2014).

Aus den Tabellen sowie aus den Boxplot-Diagrammen geht hervor, dass sich die Wertebereiche der Konzentrationen von 17- $\alpha$ -OHP im Urin der Schmerzpatienten und der Kontrollprobanden überschneiden. Eine mögliche Ursache dafür kann die bereits eingesetzte Schmerztherapie sein. Durch die Therapie könnte das Schmerzempfinden reduziert oder sogar vollständig ausgeschaltet worden sein. Die Ergebnisse zeigen jedoch keinen linearen Zusammenhang zwischen der Dauer der Schmerztherapie und der Konzentration von 17- $\alpha$ -OHP im Urin der Patienten. Auch bei Frühgeborenen und reifen Neugeborenen, die bereits seit zwei Tagen analgesiert waren, wurden erhöhte 17- $\alpha$ -OHP-Konzentrationen im Urin gemessen. Dies würde laut unserer Hypothese eine insuffiziente Schmerztherapie bedingen.

In der Gruppe der Schmerzpatienten wurden drei sehr hohe 17- $\alpha$ -OHP-Konzentrationen gemessen. Der Patient mit dem Pseudonym S19 hatte im Urin mit einem Wert von 31217 pmol/mol Kreatinin die höchste Konzentration von 17- $\alpha$ -OHP. Der Patient war ein männliches Frühgeborenes. Er wurde in der SSW 23+0 geboren und hatte ein RDS. Im ersten Lebensmonat kam es zu einer Ileumperforation. Daraufhin mussten zehn Zentimeter des Ileums reseziert werden und es wurde ein Anus Praeter angelegt. Die Nahrung wurde enteral über eine Duodenalsonde zugeführt. Während der Intubation erhielt der Patient Fentanyl sowie Morphin und Paracetamol als Schmerzmedikation. Zudem wurde der Kreislauf mit Adrenalin unterstützt. Die untersuchte Urinprobe wurde am 37. Lebenstag unter weiterlaufender Schmerztherapie und CPAP-Maskenbeatmung abgenommen. Der Patient mit der Nummer S9 ist ebenfalls ein männliches Frühgeborenes und wurde in der 25. SSW geboren. Aufgrund einer Ductusligatur wurde er den Schmerzprobanden zugeordnet. Er wurde mit Morphin und Paracetamol therapiert und erhielt eine parenterale Ernährung. Die Abnahme der Urinprobe erfolgte am 27. Lebenstag. Das Pseudonym S25 ist einem männlichen Frühgeborenen der SSW 24+6 zugeordnet. Die Urinprobe wurde am fünften Lebenstag abgenommen. An

diesem Tag wurde die Pleuradrainage gezogen, die zuvor zur Therapie eines Pleuraergusses gelegt worden war. Der Patient wurde parenteral ernährt und mit Paracetamol sowie mit Morphin therapiert. Bei jedem der drei Patienten lag zu Beginn ein RDS vor. Dies war jedoch auch bei einigen anderen Schmerzpatienten der Fall. Eine Korrelation zwischen der Induktion der Lungenreife mit Glukokortikoiden und der Höhe der 17- $\alpha$ -OHP-Konzentration konnte in dieser Studie nicht festgestellt werden. In der Literatur ist kein Hinweis auf eine Untersuchung eines Zusammenhangs zu finden. Im Rahmen einer weiteren Studie könnte ein Einfluss der Induktion der Lungenreife auf die Höhe der 17- $\alpha$ -OHP-Konzentration analysiert werden.

Unter den 15 Schmerzpatienten, die in diesen Versuchsteil einbezogen wurden, waren sieben männliche und acht weibliche Patienten. Das Geburtsalter reichte von der SSW 23+0 bis 39+4. Der Lebenstag, an dem die Urinabnahme erfolgte, lag zwischen dem Tag nach der Geburt und dem 60. Lebenstag. Im Vergleich dazu wurden aus der Gruppe der Kontrollprobanden zehn männliche Studienteilnehmer und drei weibliche Probanden für die Konzentrationsbestimmung von 17- $\alpha$ -OHP im Urin untersucht. Das Geburtsalter reichte in dieser Gruppe von der SSW 24+6 bis zu der SSW 39+5 und die Tage, an denen Urin abgenommen wurde, lagen zwischen dem zweiten und dem 69. Lebenstag. Jedes der Frühgeborenen und reifen Neugeborenen der Gruppe der Kontrollprobanden war zu dem Zeitpunkt der Urinabnahme gesund.

Laut einer Studie von Kästner besteht eine große Spannbreite der 17- $\alpha$ -OHP-Konzentrationen im Plasma und es zeigten sich verschiedene 17- $\alpha$ -Hydroxylase-Aktivitäten je nach Geburts- und Lebensalter (Kästner, 2013). Die Ergebnisse in dieser Studie zeigen ebenfalls eine große Spannbreite der Konzentrationen. Dennoch konnten unabhängig von dem Geburts- und Lebensalter höhere Konzentrationen des Hormons im Urin der Probanden, bei denen ein Schmerzempfinden vorausgesetzt wurde, nachgewiesen werden. Frühgeborene haben eine geringere Sekretionsrate von Cortisol in das Blutplasma (Metzger et al., 1993). Diese Tatsache lässt auch einen Unterschied der Konzentration von 17- $\alpha$ -OHP im Urin von Frühgeborenen im Vergleich zu reifen Neugeborenen vermuten.

In der durchgeführten Studie zeigte sich, dass die Konzentration von 17- $\alpha$ -OHP im Urin bei Frühgeborenen tendenziell höher liegt. In der Gruppe der Schmerzpatienten sind alle Patienten, bei denen Konzentrationen  $>800$  pmol/mol Kreatinin gemessen wurden, Frühgeborene. Nur bei einem Frühgeborenen der SSW 35+0 lag die Konzentration bei 278 pmol/mol Kreatinin. In der Kontrollgruppe lässt sich keine eindeutige Aussage in Hinblick auf die Unterscheidung zwischen Frühgeborenen und reifen Neugeborenen treffen. Im Blut seien zudem in den ersten zwölf Stunden nach der Geburt ein Cortisoldip gesehen (Sippell et al., 1978) und anschließend in den ersten zwei Tagen erhöhte Werte des Cortisols gemessen worden (Vermes et al., 1980). Cortisol ist nicht gleichzusetzen mit 17- $\alpha$ -OHP. Dennoch lässt sich vermuten, dass wegen des gemeinsamen Syntheseweges die Konzentrationen von 17- $\alpha$ -OHP ähnliche Schwankungen durchlaufen. In der Patientengruppe wurde bei einem Patienten am Tag nach der Geburt eine Konzentration in Höhe von 2141 pmol/mol Kreatinin bestimmt und im Urin eines anderen Schmerzpatienten lag die Konzentration bei 278 pmol/mol Kreatinin. In der Kontrollgruppe gab es keinen Probanden zu dem Tag eins. Am zweiten Lebenstag wurden bei den Schmerzpatienten Konzentrationen von 620 pmol/mol Kreatinin und 179 pmol/mol Kreatinin gemessen, während die Kontrollprobanden 17- $\alpha$ -OHP in der Höhe von 36 pmol/mol Kreatinin, 56 pmol/mol Kreatinin und 100 pmol/mol Kreatinin im Urin aufwiesen. Insgesamt zeigen sich im Vergleich mit allen berechneten Konzentrationen am zweiten Lebenstag eher niedrige Werte. Die Konzentrationen der Schmerzpatienten liegen jedoch wiederum oberhalb der Konzentrationen der Kontrollprobanden. In den ersten Lebenstagen kann es theoretisch zu einer Verfälschung der Ergebnisse durch die Hormone der Mutter kommen. Im fetalen Kreislauf können die mütterlichen Hormone gemessen werden. Kortisol sei zu einem Großteil maternaler Herkunft (Mastorakos und Ilias, 2003). Andererseits zeigte die Studie zu der Messung der Konzentrationen von 17- $\alpha$ -OHP in der Nabelvene und den Nabelarterien höhere Konzentrationen in den Nabelarterien und bestätigt damit eine vorwiegende Bildung des Hormons im Feten (Runnebaum und Zander, 1962). Insgesamt bestätigt die hier durchgeführte Studie die Problematik hinsichtlich eines biochemischen, schmerzspezifischen Parameters. Eine non-invasive



Schmerzmessung anhand eines Metaboliten im Urin wäre für die Schmerzerfassung und Therapie von Frühgeborenen und reifen Neugeborenen äußerst hilfreich und wünschenswert. Einen ersten Schritt in diesem Forschungsgebiet haben wir mit der Analyse von 17- $\alpha$ -OHP im Urin und der Gegenüberstellung der Konzentrationen der beiden Gruppen, Schmerzpatienten und Kontrollprobanden, getätigt und einen signifikanten Konzentrationsunterschied aufgezeigt. Die Spezifität bezüglich des Schmerzempfindens ist durch den *Confounder* Stress eingeschränkt. Aufgrund der neuen Entdeckung des Hormons im Zusammenhang mit der Schmerzforschung bietet dieses Gebiet einen großen Raum für weitere Studien hinsichtlich möglicher Einflussfaktoren und weitergehender Verbesserung der Konzentrationsbestimmung im Urin. Es wäre möglich, dass die Methodik auch ohne Aufkonzentrierung der Urinproben funktionieren und dadurch die Messung alltagstauglicher für die Klinik werden könnte. Für die Analyse des PGE-M, des LTB4 und des Glutamats wurden verschiedene *ELISA* gewählt. Diese Methodik zeichnet sich durch eine gute Quantifizierbarkeit, eine hohe Sensitivität und Spezifität aus. Für den klinischen Alltag ist die Analyse mit einem solchen Verfahren jedoch nicht geeignet. Der hohe zeitliche Aufwand wäre für die Routine nachteilig und würde zu einer Verzögerung der Schmerztherapie führen. Dies wäre ethisch nicht vertretbar. Die Ergebnisse dieser Versuche lieferten keine signifikante Aussagekraft der Konzentrationen im Urin hinsichtlich eines Schmerzempfindens der Patienten.

## 5. Schlussfolgerung/Ausblick

Die Studie wurde mit dem Ziel der Etablierung einer nicht-invasiven Methode der Schmerzmessung bei Frühgeborenen und reifen Neugeborenen durch die Analyse von dem Metaboliten Prostaglandin-E, von Leukotrien-B<sub>4</sub>, Glutamat und 17- $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron durchgeführt. Bereits während der Durchführung der Studie wurde die Problematik dieses Forschungsgebiets erneut deutlich. Ein Schmerzempfinden ist rein subjektiv und die Schmerzerfassung dadurch an die Kommunikationsfähigkeit der Patienten gekoppelt. Dies erschwert eine Studie, in die Patienten eingebunden sind, die fast ausschließlich nonverbal kommunizieren können. Die Einstufung der Probanden als Schmerzpatienten erfolgte aus diesem Grund anhand potentiell gewebeschädigender Eingriffe. Ebenso ist die Urinabnahme bei den Frühgeborenen und reifen Neugeborenen nur bedingt möglich. Die Ergebnisse der ersten drei Versuche zu den Metaboliten Prostaglandin-E, Leukotrien-B<sub>4</sub> und Glutamat lieferten keine signifikante Aussagekraft der Höhe der Konzentrationen in Bezug auf das Symptom Schmerz. Obwohl eine geringe Tendenz zu höheren Prostaglandin-E-M-Konzentrationen im Urin der Schmerzpatienten zu sehen war, wurde diese Erhöhung stark von einem Entzündungsgeschehen beeinflusst. Die Messung mittels ELISA stellt jedoch kein taugliches Verfahren für den Klinikalltag dar. Ein signifikanter Unterschied der 17- $\alpha$ -OHP-Konzentrationen im Urin der Schmerzpatienten (5030,68 pmol/mol Kreatinin) im Vergleich zu den Konzentrationen der Probanden der Kontrollgruppe (189,36 pmol/mol Kreatinin) wurde aus den Ergebnissen deutlich. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Konzentration von 17- $\alpha$ -OHP im Urin steigt, wenn der Patient Schmerzen hat. Aufgrund der relativ kleinen Stichprobe ist eine detaillierte Aussage hinsichtlich eines Normbereichs der Konzentration sowie der Art des Zusammenhangs von der Konzentration und der Stärke des Schmerzempfinden nicht möglich. Es konnte kein Grenzwert für ein Schmerzempfinden und dem notwendigen Einleiten einer Schmerztherapie ermittelt werden. Zudem ist das untersuchte Hormon nicht schmerzspezifisch, sondern gehört zu der Gruppe der Stresshormone. In einer weiteren Studie mit einer höheren Rekrutierungszahl könnte der *Confounder* Stress näher betrachtet und die Ergebnisse des T-Tests

überprüft werden. Es sollte eine Normalverteilung der Konzentration von 17- $\alpha$ -OHP im Urin der Frühgeborenen und reifen Neugeborenen nachgewiesen werden. Außerdem könnte im Rahmen einer solchen Studie ein linearer Zusammenhang untersucht und die Methodik weiterhin verbessert werden, um eine gängige Analyse für den klinischen Alltag zu entwickeln. Das Hormon 17- $\alpha$ -OHP taucht in der Literatur im Rahmen der Schmerzforschung erst seit der Studie von Rohan im Jahr 2016 auf. Es handelt sich dementsprechend um ein neues Gebiet der Schmerzforschung, in dem Einflussfaktoren auf die Konzentration von 17- $\alpha$ -OHP, wie die Induktion der Lungenreife, bisher nicht untersucht wurden. 17- $\alpha$ -OHP wurde bis dato vor allem im Zusammenhang mit dem Adrenogenitalen Syndrom beschrieben.

Die Etablierung einer nicht-invasiven Methode der Schmerzmessung bei Frühgeborenen und reifen Neugeborenen ist mit dieser Studie zwar nicht gelungen, jedoch wurde mit der Bestimmung von 17- $\alpha$ -OHP im Urin der Studienteilnehmer ein erster Schritt hin zu einer objektiven Schmerzmessung gemacht. Für die Zukunft ist eine objektive Schmerzerfassung nicht nur für die Frühgeborenen und reifen Neugeborenen wünschenswert. Auch komatöse Patienten könnten von der Methode profitieren. Bis dahin bietet das Gebiet der Schmerzforschung noch viele weitere interessante Möglichkeiten.

## 6. Literaturverzeichnis

- Alonso-Fernández, J. R. (2016): Pregnanetriolone in paper-borne urine for neonatal screening for 21-hydroxylase deficiency: The place of urine in neonatal screening. In: *Elsevier, Molecular Genetics and Metabolism Reports* (8), S. 99–102.
- Anand, K. J.; Sippell, W. G.; Aynsley-Green, A. (1987): Randomised trial of fentanyl anaesthesia in preterm babies undergoing surgery: effects on the stress response. In: *The Lancet* (8527), S. 243–248.
- Bachmann, K. D.; Hecker, W.; Hepp, H.; Hinrichsen, K. V.; Jorch, G.; Jung, H. et al. (1991): Pränatale und perinatale Schmerzempfindung. Stellungnahme des Wissenschaftlichen Beirates der Bundesärztekammer. In: *Dt. Ärzteblatt* 88 (47), S. 95–107.
- Bangert, J.; Tolksdorf, W. (1984): Schmerzdiagnostik und Schmerzmessung. 11. Klinische Aspekte. In: *Anästh. Intensivth. Notfallmed.* (19), S. 226–230.
- Benninghoff, A. (1993): Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. 15. Auflage. München; Wien; Baltimore : Urban und Schwarzenberg.
- Berg, K. J.; Djøseland, O.; Gjellan, A.; Hundal, O.; Knudsen, E. R.; Rugstad, H. E.; Rønneberg, E. (1990): Acute effects of paracetamol on prostaglandin synthesis and renal function in normal man and in patients with renal failure. In: *Clin Nephrol.* (34(6)), S. 255–262.
- Boccia, D.; Stolfi, I.; Moro, M. L. (2001): Nosocomial necrotising enterocolitis outbreaks: epidemiology and control measures. In: *Eur J Pediatr* (160(6)), S. 385–391.
- Bonica, J. J. (1953): The management of pain. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Bray, M. A. (1983): THE PHARMACOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY OF LEUKOTRIENE B 4. In: *British Medical Bulletin* (39 (3)), S. 249–254.
- Büttner, W. (1998): Die Erfassung des postoperativen Schmerzes beim Kleinkind.
- Büttner, W.; Finke, W. (2000): Analysis of behaviour and physiological parameters for the assessment of postoperative analgesia demand in newborns infants and young children: a comprehensive report on seven consecutive studies. In: *Paediatr Anaesth* (10), S. 303–318.
- Carbajal, R.; Rousset, A.; Danan, C.; Coquery, S.; Nolent, P.; Ducrocq, S. et al. (2008): Epidemiology and Treatment of Painful Procedures in Neonates in Intensive Care Units. In: *JAMA* (1), S. 60–70.
- Christakoudi, S.; Cowan, D. A.; Taylor, N. F. (2013): Steroids excreted in urine by neonates with 21-hydroxylase deficiency. 4. Characterization, using GC–MS and GC–MS/MS, of 11oxo-pregnanes and 11oxo-pregnenes. In: *Elsevier, Steroids* (78), S. 468–475.

- Crooks, S. W.; Stockley, R. A. (1998): Molecules in focus. Leukotriene B4. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (30), S. 173–178.
- Denecke, H.; Hünslers, C. (2000): Messen und Erfassen von Schmerz. In: *Schmerz* (14(5)), S. 302–308.
- Dhillon, K.; Ho, T.; Rich, P.; Xu, D.; Lorey, F.; She, J.; Bhandal, A. (2011): An automated method on analysis of blood steroids using liquid chromatography tandem mass spectrometry: Application to population screening for congenital adrenal hyperplasia in newborns. In: *Clinica Chimica Acta* (412), S. 2076–2084. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2011.07.009>.
- Fayed, N.; Andrés, E.; Viguera, L.; Modrego, P. J.; Garcia-Campayo, J. (2014): Higher glutamate+glutamine and reduction of N-acetylaspartate in posterior cingulate according to age range in patients with cognitive impairment and/or pain. In: *Acad Radiol.* (21(9)), S. 1211–1217.
- Freye, E. (Hg.) (2008): Opiode in der Medizin. Neurophysiologische Grundlagen des Schmerzes. 7. Aufl.: Springer-Verlag.
- Gaus, W.; Mueche, R. (2014): Medizinische Statistik. Angewandte Biometrie für Ärzte und Gesundheitsberufe. 1. Band: Schattauer.
- Grunau, R. E.; Holsti, L.; Haley, D. W.; Oberlander, T.; Weinberg, J.; Solimano, A.; Yu, W. (2005): Neonatal procedural pain exposure predicts lower cortisol and behavioral reactivity in preterm infants in the NICU. In: *Pain* (113 (3)), S. 293–300.
- Grunau, R. E.; Holsti, L.; Peters J. W. B. (2006): Long-term consequences of pain in human neonates. In: *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* (11), S. 268–275.
- Heinrich, M.; Hoffmann, F.; Zernikow, B. (2010): Therapie akuter Schmerzen bei Kindern und Jugendlichen. In: *Monatsschr Kinderheilk* (158), S. 789–806.
- Hicks, C. L. (2001): The faces pain scale – revised toward a common metric in pediatric pain measurement. In: *Pain* (93), S. 173.
- Jaksch, W.; Messerer, B.; Baumgart, H.; Breschan, C.; Fasching, G.; Grögl, G. et al. (2014): Österreichische interdisziplinäre Handlungsempfehlungen zum perioperativen Schmerzmanagement bei Kindern. Hintergrund, Ziel, Methodik und Kernaussagen. In: *Schmerz* (28), S. 7–13.
- Jett, P. L.; Samuels, M. H.; McDaniel, P. A.; Benda, G. I.; Lafranchi, S. H.; Reynolds, J. W.; Hanna, C. E. (1997): Variability of Plasma Cortisol Levels in Extremely Low Birth Weight Infants. In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (82 (9)), S. 2921–2925.
- Kamrath, C.; Hartmann, M. F.; Boettcher, C.; Zimmer, K.-P.; Wudy, S. A. (2016): Diagnosis of 21-hydroxylase deficiency by urinary metabolite ratios using gas chromatography – mass spectrometry

analysis: Reference values for neonates and infants. In: *Elsevier, Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* (156), S. 10–16.

Kästner, L. (2013): Bedeutung der Steroidbiosyntheseenzyme für die adrenale Funktion Frühgeborener in Abhängigkeit vom Gestationsalter. VVB LAUFERSWEILER VERLAG. Online verfügbar unter [http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2013/9196/pdf/KaestnerLars\\_2012\\_12\\_11.pdf](http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2013/9196/pdf/KaestnerLars_2012_12_11.pdf).

Kern, P. M. (2016): Entzündung und Schmerz Inflammation and Pain. In: *Akt Rheumatol* (41), S. 306–309.

Konrad, C.; Schmelz, M. (2005): Mechanismen der Schmerzentstehung. Schwerpunkt Peripherie. In: *Internist* (46), S. 1115–1121.

Lang, F.; Lang P. (2007): Hormonale Regulation. Basiswissen Physiologie: Springer. Online verfügbar unter 10.1007/978-3-540-71402-6\_10.

Leonhardt, A.; Busch, C.; Schweer, H.; Seyberth, H. W. (1992): Reference intervals and developmental changes in urinary prostanoid excretion in healthy newborns, infants and children. In: *Acta Paediatr* (81(3)), S. 191–196.

Liu, Y.; Chen, H.; Lu, J.; Jiang, Y.; Yang, R.; Gao, S. et al. (2016): Urinary metabolomics of complete Freund's adjuvant-induced hyperalgesia in rats. *Hg. v. Biomedical Chromatography*. Online verfügbar unter e3886. doi: 10.1002/bmc.3886.

Lupien, S. J.; McEwen, B. S.; Gunnar, M. R.; Heim, C. (2009): Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. In: *Nature Reviews Neuroscience* (10), S. 434–445. Online verfügbar unter doi:10.1038/nrn2639.

MacDermot, J.; Kelsey, C. R.; Waddell, K. A.; Richmond, R.; Knight, R. K.; Cole, P. J. et al. (1984): Synthesis of leukotriene B4 and prostanoids by human alveolar macrophages: analysis by gas chromatography/mass spectrometry. In: *Prostaglandins* (27 (2)), S. 163–179.

Mastorakos, G.; Ilias, I. (2003): Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. In: *Ann N Y Acad Sci* (997), S. 136–149.

Merskey, H. (1983): Development of a universal language of pain syndromes. In: *Bonica J.J. (ed) Advances in pain research and therapy* (5).

Merskey, H.; Albe-Fessard, D. G.; Bonica, J. J. et al. (1979): Pain terms: a list with definitions and notes on usage: recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. In: *Pain* (6), S. 249–252.

Metzger, D. L.; Wright, N. M.; Veldhuis, J. D.; Rogol, A. D.; Kerrigan J. R. (1993): Characterization of pulsatile secretion and clearance of plasma cortisol in premature and term neonates using deconvolution analysis. In: *J Clin Endocrinol Metab* (77 (2)), S. 458–463.

- Mintsioglou, D. (2012): Untersuchung der prädisponierenden Faktoren für die Schmerzverarbeitung bei gesunden Probanden anhand eines experimentellen Schmerzmodells. Erlangen, Nürnberg. Online verfügbar unter <file:///C:/Users/maire/AppData/Local/Temp/DimitriosMintsioglouDissertation.pdf>.
- Muth-Selbach, U. S.; Tegeder, I.; Brune, K.; Geisslinger, G. (1999): Acetaminophen inhibits spinal prostaglandin E2 release after peripheral noxious stimulation. In: *Anesthesiology* (91(1)), S. 231–239.
- Natura, G.; Bär, K.-J.; Eitner, A.; Boettger, M. K.; Richter, F.; Hensellek, S. et al. (2013): Neuronal prostaglandin E2 receptor subtype EP3 mediates antinociception during inflammation. In: *PNAS* (33), S. 13648–13653.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. (2005): Principles of Biochemistry. 4. Aufl. 1. Band: Lehninger.
- Quinn, J. H.; Bazan, N. G. (1990): Identification of Prostaglandin E2 and Leukotriene B4 in the Synovial Fluid of Painful, Dysfunctional Temporomandibular Joints. In: *J Oral Maxillofac Surg* (48), S. 968–971.
- Rohan, A. J. (2016): Pain-Associated Stressor Exposure and Neuroendocrine Values for Premature Infants in Neonatal Intensive Care. In: *Wiley Periodicals, Inc. Dev Psychobiol* (58), S. 60–70.
- Roth-Isigkeit, A.; Raspe, H. H.; Stöven, H.; Thyen, U.; Schmucker, P. (2003): Schmerzen bei Kindern und Jugendlichen – Ergebnisse einer explorativen epidemiologischen Studie. In: *Schmerz* (17), S. 171–178.
- Runnebaum, B.; Zander, J. (1962): Progesteron,  $\Delta^4$ -Pregnen-20 $\alpha$ -ol-3-on,  $\Delta^4$ -Pregnen-20 $\beta$ -ol-3-on and 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron im Plasma der Nabelvene und der Nabelarterien. In: *klinische Wochenschrift* 40 (9), S. 453–456.
- Sachs, L.; Hedderich, J. (2006): Angewandte Statistik. Methodensammlung mit R. 12. vollständig neu bearbeitete Auflage. 1. Band: Springer.
- Samuelsson, B. (1982): Die Leukotriene, superaktive, an Allergie und Entzündung beteiligte Wirkstoffe. In: *Angewandte Chemie* 94 (12), S. 881–962.
- Sandkühler, J. (2001): Schmerzgedächtnis. Entstehung, Vermeidung und Löschung. In: *Deutsches Ärzteblatt* (42), S. 2725–2730.
- Schmidt, R. F.; Lang, F.; Heckmann, M. (Hg.) (2010): Physiologie des Menschen. mit Pathophysiologie. 31. Aufl.: Springerverlag.
- Schüllner, F.; Mur, E. (2012): Phytotherapie in der Rheumatologie. In: *Phytother* (33(4)), S. 158–167.

- Schumacher, J.; Brähler, E. (1999): Prävalenz von Schmerzen in der deutschen Bevölkerung. Ergebnisse repräsentativer Erhebungen mit dem Gießener Beschwerdebogen. In: *Schmerz* (13), S. 375–384.
- Selye, H. (1976): Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. In: *Canadian Medical Association Journal* (115 (1)), S. 53–56.
- Shen, X.; Liu, Y.; Xu, S.; Zhao, Q.; Wu, H.; Guo, X. et al. (2014): Menin regulates spinal glutamate-GABA balance through GAD65 contributing to neuropathic pain. In: *Pharmacological Reports* (66), S. 49–55.
- Simonette, G. D.; Konrad, M. (2006): Examination of the urine in the child. In: *Ther Umsch* (63, 9), S. 579–584.
- Sippell, W. G.; Becker, H.; Versmold, H. T.; Bidlingmaier, F.; Knorr, D. (1978): Longitudinal studies of plasma aldosterone, corticosterone, deoxycorticosterone, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, cortisol, and cortisone determined simultaneously in mother and child at birth and during the early neonatal period. I. Spontaneous Delivery. In: *J Clin Endocrinol Metab* (46 (6)), S. 971–985.
- Søeborg, T.; Frederiksen, H.; Fruekilde, P.; Johannsen, T. H.; Juul, A.; Andersson, A. M. (2013): Serum concentrations of DHEA, DHEAS, 17  $\alpha$ -hydroxyprogesterone,  $\Delta$  4-androstenedione and testosterone in children determined by TurboFlow-LC-MS/MS. In: *Clinica Chimica Acta* (419), S. 95–101. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2013.01.019>.
- Søeborg, T.; Frederiksen, H.; Johannsen, T. H.; Andersson, A. M.; Juul, A. (2017): Isotope-dilution TurboFlow-LC-MS/MS method for simultaneous quantification of ten steroid metabolites in serum. In: *Clinica Chimica Acta* (468), S. 180–186. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2017.03.002>.
- Taddio, A.; Joel, K.; Ilersich, A. L.; Koren, G. (1997): Effect of neonatal circumcision on pain response during subsequent routine vaccination. In: *The Lancet* (349), S. 599–603.
- Vermes, I.; Dohanics, J.; Tóth, G.; Pongrácz, J. (1980): Maturation of the circadian rhythm of the adrenocortical functions in human neonates and infants. In: *Horm Res* (12 (5)), S. 237–244.
- Weckermann, D.; Wawroschek, F.; Harzmann, R. (1999): Pathophysiologie des Schmerzes. Grundlagen der Tumorschmerztherapie. In: *Urologe* (39), S. 101–106.
- Wennmalm, A.; Benthin, G.; Granström, E. F.; 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. In: *Cli. Scie.* (83), S. 461–465.
- Whitfield, M. F.; Grunau R. E. (2000): Behavior, pain perception, and the extremely low-birth weight survivor. In: *Clin Perinatol.* (27 (2)), S. 363–379.



Woodward, M. (Hg.) (2005): Epidemiology. Study design and data analysis. 2. Aufl. 1. Band: Chapman & Hall/CRC.

Zilonkowski, I.; Seyberth, H. W. (2008): Erhebung von Normwerten für die Prostaglandin- und Leukotrien-Ausscheidung bezogen auf die Kreatinin-Ausscheidung im Spontanurin bei Kindern aller Altersstufen. Hg. v. Philipps-Universität Marburg. Marburg. Online verfügbar unter <http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2008/0997/cover.png>.

Zimmermann, M. (2004): Neuronale Mechanismen der Schmerzchronifizierung. In: *Orthopädie* (33), S. 515–524.

## Danksagung

In erster Linie gilt mein größter Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Thomas Höhn, der mir überhaupt erst ermöglicht hat, anhand dieses interessanten Themas meine Promotionsarbeit anzufertigen.

Weiterhin bedanke ich mich recht herzlich für die Mithilfe bei der Entwicklung der einzelnen Versuche der Studie bei Herrn Dr. rer. nat. Diran Herebian.

Zudem gilt mein großer Dank allen Familien, die mich durch Ihre aktive Teilnahme an der Studie unterstützt haben. Ohne jede Einzelne der Urinproben wäre die Studie nicht möglich gewesen. Ich bedanke mich ganz herzlich für das Vertrauen und die Aufgeschlossenheit.