

Untersuchung der Nebennierenrindenfunktion bei
Frühgeborenen eines Gestationsalters
unter 30 Schwangerschaftswochen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Birgit Kampschulte
aus Berlin
Gießen 2009

Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin,
Abteilung für Allgemeinpädiatrie und Neonatologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Klaus-Peter Zimmer

Gutachter: PD Dr. med. Matthias Heckmann

Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. H.-R. Tinneberg

Tag der Disputation: 05.10.2009

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Birgit Kampschulte

*Die Praxis sollte das Ergebnis des Nachdenkens sein,
nicht umgekehrt.*

Hermann Hesse

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	8 -
1. Einleitung	10 -
2. Hauptziele	17 -
2.1 Gewinnung eines 24-Stunden-Sammelurins	17 -
2.2 Kortisol und Metabolite	17 -
2.3 Fetalzonensteroid (3 β -Hydroxy-5-en-Steroide)	18 -
3. Patienten und Methoden	19 -
3.1. Patienten	19 -
3.1.1. Zeitplan und Zielgruppe	19 -
3.1.2. Ausschlusskriterien	19 -
3.1.3. Gruppenbildung	20 -
3.2. Methoden	22 -
3.2.1. Gewinnung des 24-Stunden-Sammelurins	23 -
3.2.2. Laboranalyse	26 -
3.3. Evaluation der Sammelmethode	28 -
3.3.1 Evaluation der Methode	28 -
3.4 Stammdaten	28 -
3.5 Verlaufsdaten	29 -
3.7 Erhebungsbögen	30 -
3.8 Untersuchungszeitpunkte	32 -
3.9 Ethische Gesichtspunkte	33 -
3.10 Statistik.....	34 -
4. Ergebnisse	35 -
4.1 Beschreibung der Population	35 -
4.2 Vergleich der perinatalen Parameter zwischen den Gruppen	35 -
4.3 Vergleich der Häufigkeit neonataler Komplikationen zwischen den Gruppen.....	37 -

4.4 Untersuchung der Population auf geschlechtsspezifische Unterschiede	- 39 -
4.5 Evaluation der Sammelmethode	- 41 -
4.5.1 Rückgewinnungsraten für Glukokortikoidmetabolite	- 41 -
4.5.2 Rückgewinnungsraten für Fetalzonensteroiden	- 43 -
4.6 Exkretionsraten der Nebennierensteroiden im Urin.....	- 45 -
4.6.1 Exkretionsraten der Glukokortikoidmetabolite im Urin	- 45 -
4.6.2 Exkretionsraten der Fetalzonenmetabolite im Urin	- 46 -
4.6.3 Berücksichtigung der Nierenfunktion	- 48 -
4.7 Einfluss der Schwere der Erkrankung auf die Kortisolproduktion.....	- 50 -
4.8 Kortisolproduktion und Wachstum.....	- 58 -
4.9 Ausscheidungsraten der Fetalzonensteroiden (3 β -Hydroxy-5-en-Steroide)	- 58 -
5. Diskussion	- 61 -
5.1 Gewinnung eines 24-Stunden-Sammelurins	- 61 -
5.1.1 Wahl der verwendeten Methoden	- 61 -
5.1.2 Gewinnung des 24-Stunden-Sammelurins	- 62 -
5.1.3 Steroidmessung	- 64 -
5.2 Kortisol und Metabolite	- 66 -
5.2.1 Bestimmung der Glukokortikoidexkretionsraten.....	- 66 -
Berücksichtigung der Nierenfunktion.....	- 66 -
Bestimmung der Kortisolproduktionsraten	- 67 -
Einfluss perinataler Parameter auf die Kortisolproduktionsraten	- 68 -
5.2.2 Modulation der Kortisolproduktionsraten durch Erkrankung	- 68 -
5.3 3 β -Hydroxy-5-en-Steroide	- 71 -
5.3.1 Bestimmung der Exkretionsraten der Fetalzonensteroiden	- 71 -
5.3.2 Einfluss schwerer Erkrankung auf die Exkretionsraten der Fetalzonensteroiden	- 72 -
6. Zusammenfassung.....	- 75 -
6.1 Abstract	- 77 -
7. Anhang	- 79 -
7.1 Definitionen	- 79 -

7.1.1 Atemnotsyndrom.....	- 79 -
7.1.2 Bronchopulmonale Dysplasie.....	- 79 -
7.1.3 Chronic Lung Disease.....	- 79 -
7.1.4 Harnsteroid bei Frühgeborenen und Neonaten.....	- 80 -
7.2 Schema der Steroidbiosynthese	- 81 -
7.3 Abbau von Kortisol und Kortison im adulten Steroidstoffwechsel	- 82 -
7.4 Wichtigste Vertreter typischer Steroide des fetalen und neonatalen Steroidstoffwechsels.....	- 83 -
7.5 Score for Neonatal Acute Physiology (SNAP).....	- 84 -
7.6 Elterninformation zur Studie	- 85 -
7.7 Schriftliche Einverständniserklärung	- 86 -
8. Abbildungsverzeichnis	- 87 -
9. Tabellenverzeichnis	- 87 -
10. Literatur	- 88 -
11. Danksagung	- 95 -

Abkürzungen

Abb	Abbildung
AGA	appropriate for gestational age (eutrophes Frühgeborenes mit einem Geburtsgewicht zwischen 10. und 90. Perzentile)
ANS	Atemnotsyndrom
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
°C	Grad Celsius
CLD	chronic lung disease
cm	Zentimeter
CRP	C-reaktives Protein
CTG	Kardiotokogramm
d	Tag
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
FG	Frühgeborenes
FiO ₂	Sauerstoffanteil in der Inspirationsluft
FS	Fetalzonensteroid
g	Gramm
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GG	Geburtsgewicht
h	Stunde
IQR	Interquartilenintervall
IVH	intraventrikuläre Hämorrhagie
KFI	Konfidenzintervall
kg	Kilogramm
Kpa	Kilopascal
KPR	Kortisolproduktionsrate
l	Liter
LM	Lebensmonat
LT	Lebenstag
LW	Lebenswoche
m	Meter
MAD	mittlerer arterieller Blutdruck
Med	Median

mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Milimeter
µm	Mikrometer
n	Anzahl
NAPH	Nabelarterien-pH-Wert
NEC	nekrotisierende Enterokolitis
NG	Neugeborenes
NNR	Nebennierenrinde
ns	nicht signifikant
OH	Hydroxy-
OR	Odds Ratio
PDA	persistierender Ductus arteriosus
PVL	periventrikuläre Leukomalazie
ROP	Retinopathia praematurorum
SF	Surfactanttherapie
SGA	small for gestational age (dystrophes Frühgeborenes mit einem Geburtsgewicht unterhalb der 10. Perzentile)
SNAP	Score for Neonatal Acute Physiology
SNAP-PE	Score for Neonatal Acute Physiology-Perinatal Extension
SSW	Schwangerschaftswoche
Tab	Tabelle
Wo	Woche

1. Einleitung

Als Ort der Katecholamin- und Steroidhormonbiosynthese nimmt die Nebenniere im menschlichen Organismus eine zentrale Stellung in der Regulation nahezu aller Stoffwechselfvorgänge ein. Schwere Erkrankung, ein erlittenes Trauma oder Operationen machen die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse unbedingt erforderlich. Ihre Metabolite regulieren Blutdruck, Blutzucker, Elektrolyte und schützen den Körper vor einer überschießenden Stressantwort durch Regulierung des Immunsystems¹.

Die Nebenniere des Erwachsenen wiegt etwa 4g, wobei die Rinde einen Anteil von 80% ausmacht. Interessanterweise besitzt das reife Neugeborene eine ähnlich schwere Nebenniere. Hierfür ist das Vorhandensein der Fetalzone der Nebennierenrinde verantwortlich. Diese macht den größten Volumenanteil der Nebenniere des Neugeborenen aus und bildet sich im postnatalen Verlauf durch Involution zurück. Insgesamt durchläuft die Nebenniere während der Embryonal- und Fetalzeit sowie während der Neugeborenenperiode in Größe, Morphologie und Funktion eine bemerkenswerte Entwicklung².

Während der Schwangerschaft bildet die Nebennierenrinde des Feten einen wichtigen Bestandteil der fetoplazentaren Einheit und steht in enger Beziehung zur mütterlichen Plazenta. In ihrer Fetalzone werden 3 β -Hydroxy-5-en-Steroide produziert, welche der Plazenta als Androgenvorstufen zur Östrogensynthese dienen. Dehydroepiandrosteron (DHEA) und sein Sulfat (DHEAS) sind die mengenmäßig wichtigsten Substrate der plazentaren Östriolsynthese³. Andererseits bedient sich der Fetus des durch die Plazenta zur Verfügung gestellten Progesterons zur Kortisolsynthese. Denn in Folge eines Enzymblocks, welcher die 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 betrifft, wird die direkte Kortisolsynthese aus Pregnenolon für den Fetus verhindert. Gleichzeitig führt die Blockade dieses Stoffwechselschritts aber auch zum vermehrten Anfall von 17-Hydroxy-Pregnenolon, welches wiederum in der Fetalzone

der Nebennierenrinde zu Dehydroepiandrosteron und seinen Metaboliten verstoffwechselt wird.

Der Steroidhormonstoffwechsel von Fetus und Plazenta ist demnach engstens miteinander verknüpft, aufeinander abgestimmt und angewiesen⁴.

Mit der Geburt wird die fetoplazentare Einheit beendet, die zuvor aufeinander abgestimmten Stoffwechselwege werden unterbrochen: Die in der Fetalzone produzierten 3 β -Hydroxy-5-en-Steroide werden nicht mehr zur plazentaren Östriolsynthese benötigt.

Die postnatale Bedeutung der Fetalzonenmetabolite ist aktuell noch Gegenstand der Forschung. Sicherlich dürfte aber die bisherige Aussage, die Fetalzonensteroiden haben postnatal keinerlei biologische Funktion, als gänzlich überholt zu betrachten sein².

Besonders interessant erscheint aus neonatologischer Sicht der Einfluss des schwachen Androgens Dehydroepiandrosteron (DHEA) auf das fetale Lungengewebe und seinen Reifungsprozess, denn hemmende Einflüsse der Fetalzonenmetabolite auf die Lungenreifung wurden bereits mehrfach beschrieben^{5, 6}. Außerdem sind männliche Frühgeborene häufiger von schweren Lungenerkrankungen betroffen als weibliche Frühgeborene. Hieraus ergibt sich zwangsläufig die Frage, ob und inwiefern sich geschlechtsspezifische klinische Einflüsse der Fetalzonenmetabolite auf die Lungenreifung beim unreifen Frühgeborenen nachweisen lassen^{7, 8}.

Auch die postnatale Glukokortikoidsynthese muss ohne die durch die Plazenta zur Verfügung gestellten Substrate auskommen.

Funktionell und anatomisch lassen sich an der adulten Nebenniere Mark und Rinde unterscheiden. Während sich das Nebennierenmark aus neuroektodermalen Zellen der Neuralleiste, so genannten Sympathikogonien, entwickelt und die Katecholaminbiosynthese beherbergt, entsteht die Nebennierenrinde bereits in der vierten Woche der Embryonalentwicklung aus dem Zölomepithel der hinteren

Leibeswand⁹. Nebennierenmark und –rinde stellen also gewissermaßen zwei voneinander unabhängige, wenn auch benachbarte und interagierende endokrine Organe dar.

Die adulte Nebennierenrinde gliedert sich funktionell und anatomisch in drei Zonen. Als kleinste besitzt die Zona reticularis, in der Androgene synthetisiert werden, einen Volumenanteil von etwa 7%. Die Zona glomerulosa macht etwa 15% des Gesamtvolumens der Nebennierenrinde aus. In ihr werden Mineralokortikoide mit vorwiegender Wirkung auf den Kalium-, Natrium- und Wasserhaushalt gebildet, z.B. Aldosteron. Glukokortikoide entstehen in der Zona fasciculata, welche etwa 70% der Nebennierenrinde einnimmt. Kortisol, Kortison und Kortikosteron sind die wichtigsten Vertreter der Glukokortikoide.

Glukokortikoide fördern die Glukoneogenese, hemmen eine Vielzahl von Immunprozessen, besitzen mineralokortikoide Wirkung sowie einen permissiven Effekt. Sie erhöhen z.B. die Empfindlichkeit von Adrenorezeptoren gegenüber Katecholaminen und spielen somit eine wichtige Rolle im Rahmen akuter Stressreaktionen. Hierzu gehören beispielsweise schwere Erkrankungen.

Auch zur postnatalen Adaptation ist eine funktionstüchtige Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse für das Neugeborene unverzichtbar, wenngleich diese in den ersten Lebensmonaten weitere Reifungsprozesse durchläuft. So entwickelt sich der später vorhandene zirkadiane Rhythmus der Kortisolausschüttung beispielsweise erst innerhalb der ersten drei bis sechs Lebensmonate^{10, 11}. Dennoch gleicht die Reaktion der Nebennierenrinde auf Stress beim reifen Neugeborenen in wichtigen Aspekten der des Erwachsenen.

Bei erwachsenen, kritisch kranken Patienten konnte ein deutlicher Anstieg der adrenalen Glukokortikoide, als notwendiger Faktor zur Bewältigung kritischer Erkrankung benannt werden. Andererseits war eine ausbleibende adäquate adrenale Hormonausschüttung mit einem negativen prädiktiven Wert für das Outcome der Patienten verbunden¹².

Hierzu passend konnten auch bei reifen Neugeborenen nach Stress in Form einer schmerzhaften Venenpunktion bis zu elffach höhere Kortisolspiegel im Blut bestimmt werden als ohne vorhergehenden Stresstrigger¹³. Auch nach operativen Eingriffen konnten, ähnlich wie beim Erwachsenen, zwei- bis dreifach erhöhte Glukokortikoidspiegel gemessen werden, welche für etwa 48 Stunden anhielten¹⁴. Jedoch lagen die gemessenen Plasmakortisolspiegel bei jüngeren Neugeborenen (vor dem 9. Lebenstag) niedriger als bei älteren, weshalb genaueres Augenmerk auf die adrenale Stressreaktion in der frühen postnatalen Phase gelegt werden sollte¹⁵.

So finden sich Arbeiten, die im Tierversuch eine passagere Nebenniereninsuffizienz in den ersten Lebenswochen belegen. Bekanntermaßen ist die adrenale Stressreaktion bei neugeborenen Ratten in den ersten zwei Lebenswochen vermindert¹⁶. Inwieweit es sich dabei um einen physiologischen Vorgang handelt, bleibt angesichts eventuell kontraproduktiver kataboler Glukokortikideffekte während der Organogenese zu diskutieren. Belegt wurde im Tierversuch an neugeborenen Ratten, die in den ersten Lebenswochen wegen adrener Insuffizienz mit Steroiden behandelt wurden, eine mangelnde Gewichtszunahme und ein reduzierter DNA-Gehalt des Gehirns¹⁷.

Vor diesem Hintergrund kann auch bei Frühgeborenen eine passagere Insuffizienz der Nebennierenrinde in der frühen postnatalen Phase angenommen werden. Besonders in der ersten Lebenswoche sind extrem unreife Frühgeborene mit einem Gestationsalter von weniger als 30 Schwangerschaftswochen von schwerer Erkrankung betroffen. Zu nennen sind das Atemnotsyndrom des Frühgeborenen, arterielle Hypotension, Temperatur- und (Zucker-) Stoffwechselregulationsstörungen, zerebrale Blutungen sowie Infektionen. In kleinen Studien wurde gezeigt, dass sich Symptome einer adrener Insuffizienz wie arterielle Hypotension oder Oligurie auf die Gabe von Hydrokortison bessern^{18, 19, 20}.

Bei Frühgeborenen unter 30 Schwangerschaftswochen wurde im Gegensatz zu reiferen Kindern bereits ein geringerer Anstieg der Plasmakortisolspiegel im Rahmen schwerer Erkrankung beschrieben. Auch fielen bei kränkeren Frühgeborenen signifikant niedrigere Plasmakortisolspiegel als bei gesünderen Frühgeborenen auf²¹.

Insgesamt schwierig erscheint aber die Unterscheidung zwischen kranken und gesunden Frühgeborenen. Eine Frühgeburt vor der 30. Gestationswoche stellt per se einen unphysiologischen Zustand dar. Ein solch unreifes Kind ist nicht gesund sondern bestenfalls wenig beeinträchtigt.

Um die Schwere der Erkrankung eines Frühgeborenen zu objektivieren, stehen verschiedene Scores zur Verfügung, welche mit den Einschätzungen erfahrener Neonatologen korrelieren^{22, 23, 24}. Der Score for Neonatal Acute Physiology (SNAP) zeigte im Rahmen einer Vorläuferstudie signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen schwer erkrankter Frühgeborener mit katecholaminpflichtiger Hypotension, kranker Frühgeborener ohne katecholaminpflichtige Hypotension und wenig beeinträchtigten Frühgeborenen^{25, 26}. Während sich für die Schwere der Erkrankung signifikante Unterschiede zwischen den beschriebenen Gruppen fanden, zeigten die Plasmakortisolspiegel der schwer kranken Frühgeborenen mit katecholaminpflichtiger Hypotension ein recht uneinheitliches Bild. So hatten 29% der Kinder dieser Gruppe sehr hohe Werte, 71% lagen signifikant niedriger als die Kinder der Kontrollgruppe. Zwischen diesen Gruppen fanden sich keine Unterschiede hinsichtlich der Morbidität, Mortalität oder Häufigkeit einer präpartalen Steroidtherapie der Mutter.

All dieses verdeutlicht die Vielschichtigkeit des Problems und relativiert, angesichts der zahllosen Einflussfaktoren, die Bedeutung eines einzelnen Plasmakortisolwertes zur Beurteilung der Funktion der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse beim Frühgeborenen^{27, 28, 29, 30}.

Ein bei Weitem geeigneteres Maß der Nebennierenrindenfunktion ist die Bestimmung der Steroidexkretionsraten im 24-Stunden-Sammelurin. Eine

hervorragende Korrelation der Gesamtglukokortikoidausscheidung im 24-Stunden-Sammelurin mit den invasiv bestimmten Kortisolproduktionsraten konnte bei gesunden Erwachsenen bereits gezeigt werden³¹.

Bislang liegen jedoch nur wenige Daten über Steroidexkretionsraten im 24-Stunden-Sammelurin bei Früh- und Neugeborenen vor^{32, 33, 34, 35}.

Referenzdaten einer Kontrollgruppe fehlen ebenso wie Daten zur Glukokortikoidexkretion bei Erkrankung. Auch der genaue Involutionsmechanismus und -zeitpunkt der Fetalzone der Nebennierenrinde beim Frühgeborenen ist bislang wenig untersucht. Über eine klinische Bedeutung der nicht mehr über die Plazenta verstoffwechselten Fetalzonenmetabolite des Frühgeborenen ist nichts bekannt.

Nicht zuletzt spielt in der Steroidhormonbiochemie des Früh- und Neugeborenen die Spezifität der radiochemischen Bestimmungsmethode eine wichtige Rolle. In der Mehrzahl der vorliegenden Studien wurden immunologische Laborverfahren verwendet, welche Fehlerquellen im Sinne einer Kreuzreaktivität zwischen den einzelnen Steroidmetaboliten bergen.

Erster Schritt zur Entwicklung einer zuverlässigen Methode zur Bestimmung der Steroidexkretionsraten beim Früh- oder Neugeborenen ist die nichtinvasive Gewinnung eines 24-Stunden-Sammelurins. Für gewöhnlich werden zur nichtinvasiven Uringewinnung beim Neonaten spezielle Plastikbeutel verwendet, welche über das Genital des Kindes geklebt werden. Diese Standardmethode birgt jedoch mehrere Schwierigkeiten. Zum einen fehlt bei sehr unreifen Kindern die Hornhaut, so dass das Ablösen des auf die Haut aufgeklebten Beutels beim Wechseln desselben Schäden an der Cutis verursachen kann. Außerdem können Bewegungen des Kindes zum Ablösen des Beutels und somit zum Verlust des aufgefangenen Urins führen. Auch eine Verunreinigung des aufgefangenen Urins durch Stuhl im Sammelbeutel ist möglich. Die Etablierung einer nichtinvasiven Sammelmethode zur Gewinnung eines

24-Stunden-Sammelurins aus reinen Zellulosewindeln stellte somit ein notwendigerweise erstes Ziel der vorliegenden Studie dar.

Der gewonnene Sammelurin sollte der Bestimmung eines Steroidprofils mit den dafür bestgeeigneten Labormethoden zugeführt werden. In der vorliegenden Studie stand dafür die gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung des Urinsteroidprofils im Steroidforschungslabor des Zentrums für Kinderheilkunde (Leiter: Prof. Dr. S.A. Wudy) zur Verfügung.

2. Hauptziele

Ziel der vorliegenden Studie ist die Untersuchung der postnatalen Nebennierenrindenfunktion bei Frühgeborenen eines Gestationsalters unter 30 Schwangerschaftswochen.

Als Maß der Nebennierenrindenfunktion dient die gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung der Steroidexkretionsraten im Sammelurin, welche eine etablierte, nichtinvasive Methode zur Abbildung der Nebennierenrindenfunktion darstellt. Die vorherige Etablierung einer nichtinvasiven Methode zur Gewinnung eines Sammelurins bei Frühgeborenen ist Voraussetzung für die Anwendbarkeit des Verfahrens in dieser Patientenpopulation.

Außerdem soll die krankheitsbedingte Modulation der Steroidexkretionsraten sowie eine mögliche klinische Relevanz der Fetalzonensteroiden bei Frühgeborenen untersucht werden. Die Hauptziele sind demnach wie folgt zu formulieren:

2.1 Gewinnung eines 24-Stunden-Sammelurins

Etablierung einer noninvasiven Methode zur Gewinnung eines 24-Stunden-Sammelurins von unreifen Frühgeborenen.

2.2 Kortisol und Metabolite

- 1) Erstellung von „Referenzwerten“ für die im 24-Stunden-Sammelurin ermittelten Ausscheidungsraten von Kortisol und seinen Metaboliten bei Frühgeborenen im longitudinalen Verlauf (unmittelbar postnatal bis zu einem Alter von sechs Monaten)

Untersucht werden sollen dabei der Einfluss des Gestationsalters, des postnatalen Alters, des Geburtsmodus, des Geschlechts, einer

intrauterinen Wachstumsretardierung und einer pränatalen Steroidtherapie des Feten.

- 2) Unterscheiden sich die Exkretionsniveaus kranker Frühgeborener von denen des Referenzkollektivs?

Insbesondere interessiert die Frage, ob bei kranken Frühgeborenen eine relative adrenale Insuffizienz besteht oder nicht. Gibt es eine Phase einer verminderten Kortisolsekretion bei kranken Frühgeborenen mit und ohne klinische Zeichen einer Nebennierenrindeninsuffizienz in der frühen postnatalen Phase durch wochenweisen Vergleich der Kortisolsekretion mit den Referenzwerten?

2.3 Fetalzonensteroid (3 β -Hydroxy-5-en-Steroide)

- 1) Im Referenzkollektiv sollen die Ausscheidungsraten der 3 β -Hydroxy-5-en-Steroide longitudinal beschrieben werden, um die Involution der Fetalzone der Nebennierenrinde zu charakterisieren.

Auch hier sollen der Einfluss des Gestationsalters, des postnatalen Alters, des Geburtsmodus, des Geschlechts, einer intrauterinen Wachstumsretardierung und einer pränatalen Steroidtherapie berücksichtigt werden.

- 2) Der Einfluss von Erkrankung auf die Ausscheidungsraten der 3 β -Hydroxy-5-en-Steroide (insbesondere DHEA-Metabolite) soll untersucht werden. Insbesondere sollen dabei geschlechtsspezifische Unterschiede berücksichtigt werden.

3. Patienten und Methoden

3.1. Patienten

3.1.1. Zeitplan und Zielgruppe

Frühgeborene mit einem Gestationsalter unter 30 Schwangerschaftswochen wurden im Zeitraum zwischen Juni 2001 und September 2002 auf den neonatologischen Stationen des Zentrums für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der JLU Gießen in die Studie aufgenommen. Das Gestationsalter wurde anhand des Ballard-Scores³⁶ und/oder geburtshilflicher Datierungsmethoden ermittelt.

3.1.2. Ausschlusskriterien

Patienten mit schweren Fehlbildungssyndromen, chromosomalen Aberrationen, Vitium cordis (mit Ausnahme des persistierenden Ductus arteriosus botalli oder eines Vorhofseptumdefekts), Hydrops fetalis, familienanamnestischen bzw. manifesten Störungen der Nebennierenfunktion bzw. der endokrinen Organe (Hypothyreose, Intersex, Adrenogenitales Syndrom etc.) wurden von der Untersuchung ausgeschlossen. Ein weiteres wichtiges Ausschlusskriterium war eine postnatale Steroidtherapie.

Die präpartale Betamethasonbehandlung der Mutter zur Lungenreifeinduktion stellte dagegen kein Ausschlusskriterium dar. Die Betamethasonprophylaxe wurde als komplett bezeichnet, wenn spätestens 24 Stunden präpartal zwei Applikationen zu je 12mg Betamethason verabreicht worden waren. Der Status der pränatalen Steroidtherapie wurde im Rahmen der Stammdatenerhebung miterfasst (siehe unten).

3.1.3. Gruppenbildung

Die Frühgeborenen der Stichprobe wurden anhand bereits veröffentlichter Kriterien^{25, 26} als gesund bzw. krank klassifiziert. Kranke Frühgeborene zeigten dabei mindestens eine der folgenden Erkrankungen:

- Atemnotsyndrom mit Notwendigkeit einer Surfactanttherapie (Einteilung nach Gideon³⁷)
- konnatale Infektion (C-reaktives Protein > 10mg/l und klinische Zeichen einer Infektion in den ersten 72 Lebensstunden)
- nosokomiale Infektion (C-reaktives Protein > 10mg/l und klinische Zeichen einer Infektion nach den ersten 72 Lebensstunden)
- intraventrikuläre Hämorrhagie > II° (nach Papile³⁸)

Als gesund galten wenig beeinträchtigte Frühgeborene, welche sämtliche der folgenden Kriterien erfüllten:

- kein Atemnotsyndrom bzw. Atemnotsyndrom ohne Notwendigkeit einer Surfactanttherapie (Einteilung nach Gideon³⁷)
- keine klinischen oder laborchemischen Zeichen einer Infektion (C-reaktives Protein > 10mg/l)
- keine oder höchstens zweitgradige intraventrikuläre Hämorrhagie (nach Papile³⁸)

Zur Objektivierung der Ernsthaftigkeit der Erkrankung wurde in jeder Sammelperiode für jedes Kind der Score of Neonatal Acute Physiology (SNAP)²⁴ bestimmt (siehe Anhang 7.5). Ein Atemnotsyndrom wurde gemäß den Kriterien von Giedion³⁷ und der Notwendigkeit einer Surfactanttherapie klassifiziert. Die Indikation zur Surfactantapplikation wurde bei einem - trotz Anpassung der Beatmungsdrücke - notwendigen $\text{FiO}_2 > 0,4$ zur Erlangung einer Sauerstoffsättigung von 88-96% gestellt.

3.2. Methoden

Glukokortikoidmetabolite und Metabolite der Fetalzone der Nebenniere wurden zur Beschreibung der Nebennierenrindenfunktion aus 24-Stunden-Sammelurinproben bestimmt. Probengewinnung und Datenerhebung erfolgten zu festgelegten Messzeitpunkten. Das Sammelintervall betrug jeweils 24 Stunden.

Abbildung 1 zeigt schematisch den Ablauf der Probengewinnung und Urinsteroidmessung.

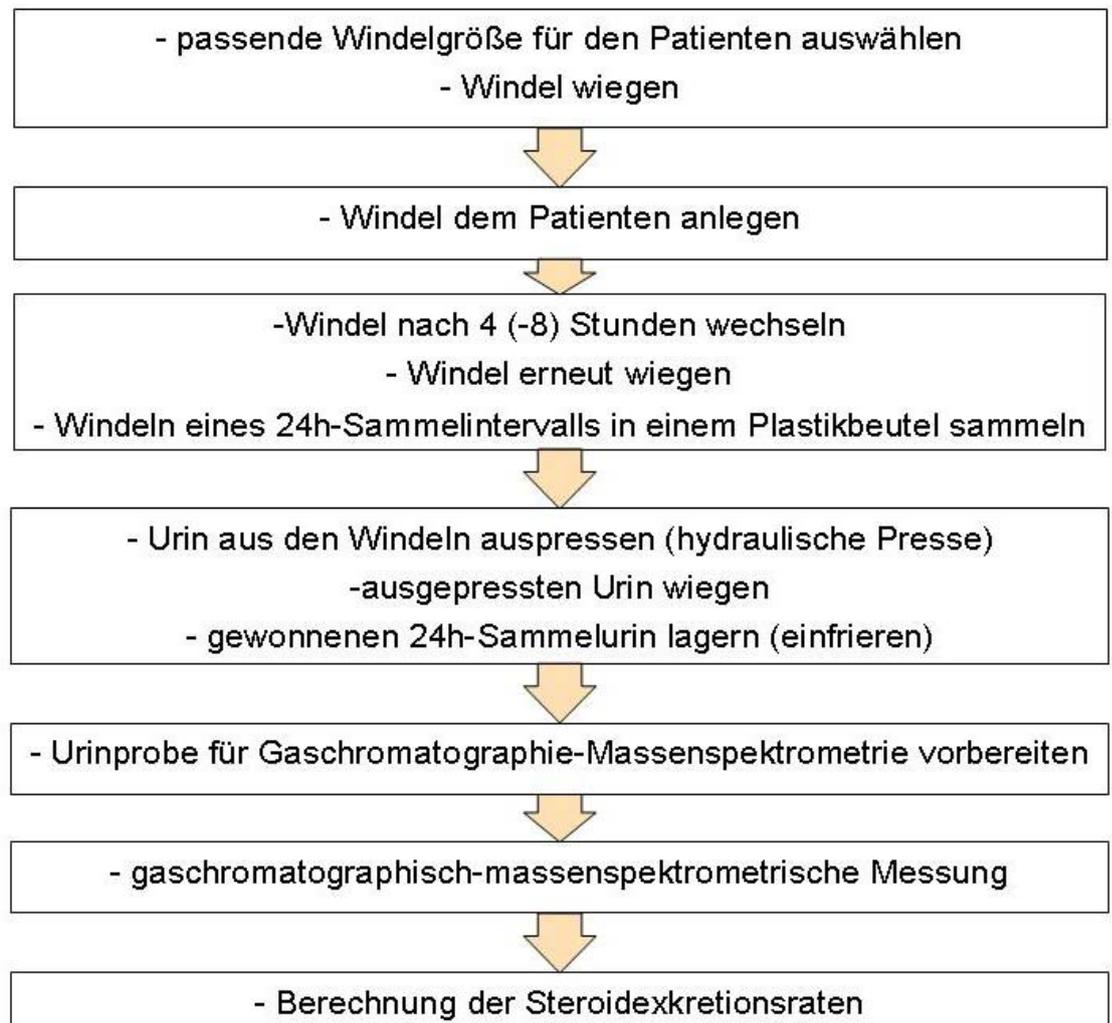


Abbildung 1: Flussdiagramm der Methodik zur Bestimmung der Steroidexkretionsraten

3.2.1. Gewinnung des 24-Stunden-Sammelurins

Der 24-Stunden-Sammelurin konnte mittels einer eigens entwickelten Sammelmethode nichtinvasiv gewonnen werden. Hierzu wurden spezielle Einmalwindeln der Firma Pampers (Procter&Gamble, Schwalbach, Deutschland) aus reiner Zellulose verwendet, die in zwei unterschiedlichen Größen zur Verfügung standen: eine kleine Größe aus der regulären Serienproduktion für Kinder mit einem Gewicht bis 2,3kg (Pampers P) sowie eine eigens für unsere Studie produzierte Windel mittlerer Größe für Kinder mit einem Gewicht von 2,3-6kg.

Zu Beginn des 24-Stunden-Sammelintervalls wurde die passende Windelgröße für den Patienten ausgewählt. Vor dem Anlegen wurde das Leergewicht der Windel zu Bilanzierungszwecken notiert. Um eine Verunreinigung der Urinprobe durch Stuhlbeimengung zu minimieren, wurde eine urindurchlässige Gaze zwischen der Haut des Frühgeborenen und der Windelzellulose platziert, welche Stuhl zurückhielt und vor der anschließenden Probengewinnung aus der Windel entfernt wurde.

Auch bei gleichzeitig applizierter Phototherapie wurde die Windel beim Anlegen gut verschlossen, um eine mögliche Verdunstung als Fehlerquelle zu minimieren.

Die Windeln wurden den üblichen Pflegeintervallen entsprechend nach vier Stunden gewechselt, erneut gewogen und anschließend bis zur Beendigung des 24-Stunden-Intervalls bei Raumtemperatur in einem Plastikbeutel gesammelt. Bei sehr kleinen Patienten wurden die Windeln teilweise erst nach acht Stunden gewechselt, um ausreichend große Urinportionen zur anschließenden Probengewinnung aus den Windeln zu erhalten.

Das neonatologische Pflegepersonal wurde dazu entsprechend geschult.

Im Anschluss an das Sammelintervall wurden die Windeln bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C tiefgefroren.

Einmal wöchentlich wurden die gesammelten Windeln aufgetaut und der Probengewinnung zugeführt. Hierzu stand eine speziell konstruierte

hydraulische Presse mit einer Spitzendruckleistung von $120\text{Kpa}/\text{cm}^2$ zur Verfügung (Abb. 2).



Abbildung 2: Hydraulische Presse zur Urinextraktion aus Windeln

Die aufgetauten Windeln wurden mit der Innenseite nach außen gekehrt. Die die Windelzellulose überragenden Plastikbündchen wurden nach innen umgeschlagen, so dass nach außen hin ausnahmslos eine doppelte Lage der Windelzellulose entstand. Diese wurde in einen Plastikgefrierbeutel (Melitta, Minden, Deutschland) platziert, der durch einen doppelten Knoten dicht verschlossen wurde. Während sich die Windel nahe der Schweißnaht des Gefrierbeutels befand, hingen der Knoten und der übrige Anteil des Gefrierbeutels aus der Presse heraus. So konnte der Urin, der bei der Kompression aus der Windelzellulose austrat, der Schwerkraft folgend nach unten abfließen. Gleichzeitig wurde auf diese Weise verhindert, dass die Windel bei nachlassendem Anpressdruck erneut mit dem gewonnenen Urin in Kontakt kam.

Nach einem ersten Auspressen, wurde die nun in Folge der Kompression flacher und breiter gewordene Windel erneut auf die halbe Größe zusammengefaltet. Dies war problemlos bei geschlossenem Gefrierbeutel möglich. Das verdichtete Windelmaterial wurde einem zweiten Pressvorgang unterzogen, wodurch eine maximale Probenausbeute erreicht wurde. Mit einer sauberen Schere wurde der Gefrierbeutel zwischen dem nach unten abgelaufenen, über dem Knoten stehenden Urin und der im oberen Teil befindlichen Windel durchtrennt und der gewonnene Urin in ein steriles Sammelgefäß umgefüllt. Die Urinportionen aus den Windeln eines 24-Stunden-Sammelintervalls wurden gepoolt, anschließend abzentrifugiert und bis zur weiteren Verarbeitung im Labor bei -80°C tiefgefroren.

Zur Kalkulation der 24-Stunden-Ausscheidungsrate der Steroide im Urin wurde auch derjenige Anteil des Urins berücksichtigt, der nach dem beschriebenen Pressvorgang in der Windel verblieben war. Durch das Wiegen der Windel wurde die 24-Stunden-Urinausscheidung bestimmt und die im Labor ermittelten Steroidkonzentrationen anschließend auf diese Urinmenge bezogen.

3.2.2. Laboranalyse

Urinsteroidprofile wurden anhand quantitativer Analysedaten aus der Gaschromatographie-Massenspektrometrie nach der Methode von Shackleton et al.^{39,40} bestimmt.

Die Analytik wurde folgendermaßen durchgeführt: Freie, konjugierte Urinsteroide wurden mittels Festphasenextraktion aus einer 5ml Portion des 24-Stunden-Sammelurins eliminiert (Sep-Pak[®] C18 Kartusche, Fa. Waters, Milford, USA). Die Konjugate wurden enzymatisch hydrolysiert (Aryl-Sulfatase aus *Helix Promatia*, Fa. SIGMA, Taufkirchen bei München, Deutschland). Anschließend wurden die hydrolysierten Steroide in einem zweiten Festphasenextraktion-Schritt zurückgewonnen und jeder Portion des Extraktes drei interne Standards (5 α -Androstan-3 α ,17 α -diol, Stigmasterol und Cholesterylbutyrat) zugesetzt, woraufhin die Derivatisierung der Harnsteroiden zu Methyloxim-Trimethylsilyl-Ethern erfolgte.

Im Anschluss daran wurde die Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Analyse durchgeführt. Der Gaschromatograph (GC-Serie 6890, Agilent Technologie GmbH, Böblingen, Deutschland), der eine OV-1 fused silica Kapillare (Optima-1-MS, 25m x 0,2mm innerer Durchmesser, Filmdicke 0,1 μ m, Fa. Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) enthielt und mit einem Agilent Injektor der Serie 7683 ausgestattet war, war direkt an ein Massenspektrometer (Agilent 5973N MSD) angeschlossen. Dieses führte die Detektion massenspektrometrisch (Agilent 5973N MSD) mittels des "selected ion monitoring" ("SIM"-Modus, Einzelmassenregistrierung, Massenfragmentographie) durch. Als Trägergas wurde Helium verwendet. Die Injektion wurde bei einer Temperatur des Gaschromatographen-Ofens von 80°C für zwei Minuten durchgeführt. Die Temperatur wurde schrittweise um 20°C/min erhöht bis zu einem Wert von 190°C (für eine Minute). Zur Trennung der Steroide wurde die Temperatur bis auf 272°C erhöht und zwar mit einer Steigerung von 2,5°C/min.

Die folgenden C21-Steroide, bei denen es sich um Glukokortikoidmetabolite handelt, wurden bestimmt (Abkürzungen siehe

7.1.4 Harnsteroiden bei Frühgeborenen und Neonaten): THE, α -CL, β -CL, 6α -OH-THE, 1β -OH-THE, 6α -OH- α -CL, 6α -OH- β -CL, 1β -OH- β -CL, THF, aTHF, α -C, β -C, F und 6β -OH-F. Die Interassay-Präzision (n = 8) schwankte zwischen 1,3% für 6α -OH- β -CL und 7,0% für 1β -OH- β -CL.

Die Intraassay-Präzision (n = 8) schwankte zwischen 0,5% für THE und 5,3% für 1β -OH- β -CL. Zur Bestimmung der gesamten renalen Glukokortikoidexkretionsraten wurden die 14 gemessenen Glukokortikoidmetabolite quantifiziert und summiert.

Die folgenden 3β -Hydroxy-5-en-Steroide (Fetalzonensteroiden) wurden mittels "selected ion monitoring" identifiziert (Abkürzungen siehe 7.1.4 Harnsteroiden bei Frühgeborenen und Neonaten): A^5 - 3β , 17α , 16α -OH-DHEA, 16β -OH-DHEA, A^5 T- 16α , 15β 16α -OH-DHEA, 16 -O- A^5 D, 16α , 18 -OH-DHEA, 15β , 17α -OH- P^5 -olon, 16α -OH- P^5 -olon, A^5 - 3β , 16α , 17β , 18 -tetrol, A^5 - 3β , 15β , 16α , 17β -tetrol, 15β -OH- P^5 -tetrol, 21 -OH- P^5 -olon, P^5 - 3β , 20α , 21 -triol und P^5 -tetrol.

Die Interassay-Präzision (n = 8) schwankte zwischen 1,54% für A^5 T- 16α und 8,20% für 16 -O- A^5 D. Die Intraassay-Präzision (n = 8) schwankte zwischen 0,48% für A^5 T- 16α und 3,54% für A^5 - 3β , 17α . Zur Bestimmung der gesamten renalen Exkretionsraten der Fetalzonensteroiden wurden die 15 gemessenen 3β -Hydroxy-5-en-Steroide quantifiziert und summiert.

Neben diesen Zielionen wurde für jeden Analyten ein zweites Ion (qualifizierendes Ion) bestimmt, um die Spezifität sicherzustellen. Die Kalibrationskurven zeigten eine ausgezeichnete Linearität ($r^2 = 0,982$ - $1,000$).

Wie für die Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Steroid-Analyse üblich wurde jede Urinprobe durch eine Einzelmessung analysiert.

Kreatinin wurde nach der Jaffé-Methode bestimmt. Die tägliche Ausscheidungsrate von Glukokortikoiden oder Fetalzonensteroiden im Urin wurde auf das Körpergewicht und die Kreatininausscheidung in Mikromol bezogen.

3.3. Evaluation der Sammelmethode

3.3.1 Evaluation der Methode

Im Vorfeld der klinischen Studie wurde die im Vorherigen beschriebene Sammelmethode einer eingehenden Evaluation unterzogen.

Auf der Intensivstation des Zentrums für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der JLU Gießen wurde Urin von Neu- und Frühgeborenen gewonnen, die mit einem Blasenkatheter versorgt waren. So konnte ein ausreichend großer Probenpool zur Evaluation der Methode gewonnen werden.

Die Testsituation wurde wie folgt simuliert: Aus dem gewonnenen Poolurin wurden Proben zur „Leerwertbestimmung“ direkt der Gaschromatographie-Massenspektrometrie zugeführt. Der übrige Urin wurde in die zur Verfügung stehenden Studienwindeln gegeben und zwar in Portionen von 15ml, 30ml bzw. 45ml in die kleinen und 30ml, 50ml bzw. 70ml in die mittelgroßen Windeln. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 36 Stunden wurden die Windeln bei -20°C eingefroren, bis sie der Probengewinnung und Labordiagnostik zugeführt wurden, deren Ablauf im Absatz „Gewinnung des 24-Stunden-Sammelurins“ und „Laboranalyse“ ausführlich dargestellt ist. Die Konzentrationen der Urinsteroidmetabolite im Ausgangsurin und nach Auspressen aus den Windeln wurden verglichen.

3.4 Stammdaten

Bei allen Frühgeborenen wurden folgende Stammdaten erfasst:

Gestationsalter anhand des Frühschalls und des expanded Ballard Score³⁶, Geburtsgewicht, Geschlecht, Nabelschnur-pH, Apgar bei 5 Minuten, Geburtsmodus, SGA (Geburtsgewicht < 10. Perzentile)⁴¹, Körpertemperatur bei Aufnahme, Status der Betamethasonprophylaxe, endokrinologische Erkrankungen in der (Familien-) Anamnese (Diabetes mellitus, Gestationsdiabetes etc.) und SNAP²⁴-Perinatal Extension (PE)²³.

Außerdem wurden von allen Frühgeborenen folgende Diagnosen miterfasst:

Atemnotsyndrom³⁷, intraventrikuläre Hämorrhagie³⁸, persistierender Ductus arteriosus sowie dessen Therapie, Retinopathia praematororum⁴², nekrotisierende Enterokolitis⁴³, konnatale Infektion (C-reaktives Protein > 10mg/l und klinische Zeichen einer Infektion in den ersten 72 Lebensstunden), nosokomiale Infektion (C-reaktives Protein > 10mg/l und klinische Zeichen einer Infektion nach den ersten 72 Lebensstunden), nachgewiesene Keime (in der Blutkultur), Bronchopulmonale Dysplasie⁴⁴, Chronic Lung Disease⁴⁵ und periventrikuläre Leukomalazie⁴⁶.

3.5 Verlaufsdaten

In jedem 24-Stunden-Sammelintervall wurden neben der Gewinnung des Sammelurins folgende Verlaufsdaten erhoben: Körpergewicht und Körperlänge, Medikamentenanamnese (in Hinblick auf Surfactant, Steroide, Hormone, Katecholamine, kreislaufdepressive Medikamente), CRP-Wert, I/T-Quotient, Neuauftreten einer intraventrikulären Hämorrhagie, Blutzuckerentgleisungen (Mittelwert < 40 oder > 200mg/dl), Entgleisungen des Säure-Basen-Haushaltes (Base Excess < -10), Score of Neonatal Acute Physiology (SNAP)²⁴.

3.7 Erhebungsbögen

Zur systematischen Erhebung der Stamm- und Verlaufsdaten, wurden die im Folgenden abgebildeten Untersuchungsbögen entwickelt und verwendet:

Stammdaten		Diagnosen bei Entlassung	
Patienten-Nr.:			
Gruppe:			
Gestationsalter (Woche)			
Geburtsgewicht (g)			
Geschlecht	<input type="checkbox"/> weiblich <input type="checkbox"/> männlich		<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Nabelschnur-pH (art.)			<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Apgar 5Min		28. Leberstag	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Geburtsmodus	<input type="checkbox"/> spontan <input type="checkbox"/> Sectio	36. SSW	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Indikation für die vorzeitige Entbindung	<input type="checkbox"/> vorzeitiger Blasensprung		<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
	<input type="checkbox"/> Mehrlingsschwangerschaft		<input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> G I
	<input type="checkbox"/> Gestose/Eklampsie		<input type="checkbox"/> G II <input type="checkbox"/> G III
	<input type="checkbox"/> Zn Sectio/Uterus-Op	<input type="checkbox"/> vorzeitige Plazentalösung	<input type="checkbox"/> G IV
	<input type="checkbox"/> sonstige uterine Blutungen	<input type="checkbox"/> Plazenta praevia	
	<input type="checkbox"/> Amnion-Infektionssyndrom	<input type="checkbox"/> mütterliche Erkrankung	
	<input type="checkbox"/> pathologisches CTG	<input type="checkbox"/> grünes Fruchtwasser	
SGA	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	Intraventrikuläre Hämorrhagie	<input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> G I <input type="checkbox"/> G II <input type="checkbox"/> G III <input type="checkbox"/> G IV
Temp. bei Aufnahme (°C)		Retinopathia praematorum	<input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> G I <input type="checkbox"/> G II <input type="checkbox"/> G III <input type="checkbox"/> G IV <input type="checkbox"/> G V
Celestan Datum und Dosis der Celestangaben	<input type="checkbox"/> keine <input type="checkbox"/> inkomplett <input type="checkbox"/> komplett	Nekrotisierende Enterokolitis	<input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> G I <input type="checkbox"/> G II <input type="checkbox"/> G III
Endokrinologische Erkrankung i.d. Anamnese	<input type="checkbox"/> Diabetes mellitus Typ I <input type="checkbox"/> Gestationsdiabetes <input type="checkbox"/> Diabetes mellitus Typ II <input type="checkbox"/> sonstiges	Bemerkungen:	<input type="checkbox"/> G II <input type="checkbox"/> G III

Abbildung 3: Erhebungsbogen Stammdaten

Verlaufsbogen		T1	T2	T3	T5
Patienten-Nr.:		<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Operation		<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Beatmungsparameter erfüllen die Kriterien zur Surfactantgabe		<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
MAD Mittelwert (mmHG)					
PE					
CRP (mg/l)					
ITQ					
ICH > II°, ICH neu aufgetreten		<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
BZ <40 >200(mg/dl) MW		<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Base Excess < -10		<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Hyperbilirubinämie > Austauschgrenze		<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Steroide		nein 0 , Hydrocortison 1 ,	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
(Dosis!)		Dexamethason 2 , Fortecortin 3	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Hormone		nein 0 , L-Thyroxin 1	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Kathecholamine		nein 0 , Adrenalin 1 ,	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
		Noradrenalin 2 , Dopamin 3 , Dobutamin 4	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
RR(-)		nein 0 , Fentanyl 1 , Phenobarbital 2 ,	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
		Vecoronium 3 , Midazolam 4 , Diazepam 5 , Morphin 6	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
SNAP		<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein

Abbildung 4: Erhebungsbogen Verlaufsdaten

3.8 Untersuchungszeitpunkte

Die Studie umfasste sowohl eine Längs- als auch Querschnittuntersuchung. Probengewinnung und Datenerhebung erfolgten zu den folgenden Messzeitpunkten. Das Sammelintervall betrug jeweils 24 Stunden:

1., 2., 3. und 5. Lebenstag

2., 3. und 4. Lebenswoche und

1x monatlich bis zu Entlassung ab dem Alter von 4 Wochen

Ausschlaggebend für die Wahl dieser definierten Messzeitpunkte war die Tatsache, dass sich schwerwiegende Erkrankungen während der Neonatalperiode vorrangig im Laufe der ersten Lebenswoche manifestieren²⁵, weshalb diese von besonderem Interesse ist und eine hohe Dichte an Messzeitpunkten enthalten sollte. Um den weiteren Verlauf der Nebennierenreifung zu dokumentieren, wählten wir während der restlichen Neonatalperiode wöchentliche Intervalle zur Probengewinnung und anschließend monatliche bis hin zur Entlassung aus der stationären Behandlung.

Bestimmt wurden zu jedem Messzeitpunkt die genannten Verlaufsdaten (siehe oben) sowie aus dem 24-Stunden-Sammelurin:

- Glukokortikoidmetabolite (siehe Labormethodik)
- Fetale Steroide (= Metabolite der Fetalzone der Nebenniere) (siehe Labormethodik)
- Kreatininkonzentration im Urin

3.9 Ethische Gesichtspunkte

Im Vorfeld der Studie wurde die Zustimmung der Ethik-Kommission für Ärztliche Forschung am Fachbereich Humanmedizin der JLU Gießen eingeholt (Aktenzeichen 04/02). Die eigens entwickelte, nichtinvasive Methode zur Gewinnung von 24-Stunden-Sammelurin-Proben beeinträchtigt das Frühgeborene in keiner Weise, umfasst die Methode am Kind direkt doch lediglich das passgerechte Anlegen der Zellulosewindel. Die üblichen Pflegeintervalle und die Methode des minimal-handling konnten auch während der Sammelintervalle eingehalten werden. Lediglich bei sehr kleinen Frühgeborenen wurden die Windeln zum Erhalt eines größeren inokulierten Urinvolumens zeitweise über das übliche Pflegeintervall hinaus belassen, was jedoch zu keiner registrierbaren Beeinträchtigung des Kindes führte.

Die Eltern wurden vor Aufnahme ihres Kindes in die Studie aufgeklärt und ihr schriftliches Einverständnis wurde eingeholt (Informationsmaterial und Einverständniserklärung siehe Anhang 7.6 und 7.7).

3.10 Statistik

Alle (erhobenen) Daten wurden in eine Excel-Datei eingegeben und anschließend in Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Statistik ausgewertet (Version 8 statistical package, SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Die statistische Beratung und Bearbeitung erfolgte durch Herrn Dr. R.-H. Bödeker (Leiter der Arbeitsgruppe Medizinische Statistik) und Frau C. Scheibelhut.

Zur Beschreibung der Unterschiede zwischen den gebildeten Gruppen verwendeten wir den Mann-Whitney-U-Test für quantitative und den exakten Test auf Unabhängigkeit nach Fisher (Fisher's exact test) für qualitative Merkmale. Da es sich um nicht normalverteilte Merkmale handelte, wählten wir diese nichtparametrischen Testverfahren.

Zur Untersuchung des Einflusses schwerer Erkrankung (durch den SNAP messbar gemacht) oder anderer Faktoren auf die Kortisolproduktionsrate wurden Logistische Regressionsanalysen verwendet. Pearson's Korrelationstest wurde zur Beschreibung der sinkenden Kortisolproduktionsraten während des Wachstums verwendet. Das Signifikanzniveau wählten wir bei $p < 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1 Beschreibung der Population

67 Frühgeborene mit einem Gestationsalter unter 30 Schwangerschaftswochen wurden zwischen Juni 2001 und September 2002 in die Studie aufgenommen. 61 von ihnen erfüllten die Einschlusskriterien. Gründe für den Ausschluss von der Studie waren postnatale Steroidtherapie (n = 5) und numerische chromosomale Aberrationen (Trisomie 21, n = 1).

4.2 Vergleich der perinatalen Parameter zwischen den Gruppen

Wir werteten die erhobenen Stammdaten der Population hinsichtlich Strukturgleichheit der perinatalen Parameter aus. Die kranken Frühgeborenen zeigten dabei im Vergleich zur Kontrollgruppe der gesunden Frühgeborenen im Alter von 5 Minuten signifikant niedrigere Apgar-Werte ($p = 0,023$).

Bezüglich der weiteren perinatalen Parameter zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Das Gestationsalter lag bei den kranken Frühgeborenen tendenziell niedriger als bei den gesunden Frühgeborenen der Kontrollgruppe ($p = 0,11$).

Tabelle 1 zeigt die perinatalen Parameter der Gruppen im Vergleich.

Tabelle 1: Perinatale Parameter

		krank (n = 44)	gesund (n = 17)	p
Gestationsalter [Wochen]*		27,6 (26-28,4)	28,6 (27-29)	0,11 [#]
Geburtsgewicht [g]*		970 (800-1135)	1080 (800-1240)	0,34 [#]
Geschlecht	weiblich	21 (48%)	9 (53%)	0,78 ^{##}
	männlich	23 (52%)	8 (47%)	
Geburtsmodus	Sectio	39 (89%)	13 (76%)	0,25 ^{##}
	Spontangeburt	5 (11%)	4 (24%)	
SGA		3 (7%)	1 (6%)	1,0 ^{##}
pränatale Steroide	komplett	24 (55%)	9 (53%)	1,0 ^{##}
	jegliche Behandlung	38 (86%)	13 (76%)	0,44 ^{##}
NAPH*		7,3 (7,24-7,36)	7,32 (7,29-7,37)	0,16 [#]
APGAR bei 5 min*		8 (8-9)	9 (8-9)	0,023 [#]

* Angabe als Median (25-75er Perzentile), # Mann-Withney- U-Test,
Fisher´s exact test, SGA = small for gestational age, NAPH = Nabelarterien pH

4.3 Vergleich der Häufigkeit neonataler Komplikationen zwischen den Gruppen

Tabelle 2 charakterisiert die untersuchte Stichprobe von 44 kranken und 17 gesunden Frühgeborenen und stellt die Häufigkeit typischer neonataler Komplikationen dar. Anhand der Diagnosen wurden die Frühgeborenen wie oben beschrieben als krank oder gesund klassifiziert.

Die Differenzierung zwischen einem Atemnotsyndrom ohne oder mit notwendiger Surfactanttherapie erfolgte zur genaueren Kategorisierung der Schwere und Relevanz des Atemnotsyndroms. Auch die Unterscheidung zwischen intraventrikulären Hämorrhagien ersten und zweiten Grades gegenüber dritt- oder viertgradigen Blutungen erklärt sich aus dem zumeist unterschiedlichen Outcome der Kinder. So sind bei Blutungen dritten oder vierten Grades mit hoher Wahrscheinlichkeit bleibende neurologische Schäden zu erwarten.

Tabelle 2: Häufigkeit neonataler Komplikationen

	krank (n = 44)	gesund (n = 17)
Tod	5 (11%)	0
Koninatale Infektion	20 (45%)	0
Nosokomiale Infektion	27 (61%)	0
IVH	17 (39%)	4 (24%)
IVH > II°	7 (16%)	0
ANS	43 (98%)	11 (65%)
ANS mit SF	35 (80%)	0
ANS ohne SF	8 (18%)	11 (65%)
BPD	21 (48%)	2 (12%)
PDA	26 (59%)	6 (35%)
PDA-Therapie chirurgisch	5 (11%)	0
PDA-Therapie medikamentös	18 (41%)	3 (18%)
ROP	8 (18%)	2 (12%)
NEC	5 (11%)	0

*Angabe als Median (25-75er Perzentile), ## Fisher's exact test, IVH = intraventrikuläre Hämorrhagie, ANS = Atemnotsyndrom, SF = Surfactanttherapie, BPD = bronchopulmonale Dysplasie, PDA = persistierender Ductus arteriosus, ROP = Retinopathia praematurorum, NEC = nekrotisierende Enterokolitis

4.4 Untersuchung der Population auf geschlechtsspezifische Unterschiede

Neben dem Vergleich der definierten Gruppen hinsichtlich Strukturgleichheit

bezüglich perinataler Parameter und neonataler Komplikationen bzw. zu erwartender, da definitionsgemäßer Unterschiede, untersuchten wir die Population auch auf geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich der Verteilung perinataler Parameter und neonataler Komplikationen (Tab. 3).

Signifikant mehr weibliche Frühgeborene (23% gegenüber 3% bei den männlichen Frühgeborenen ($p = 0,026$)) zeigten ein für das Gestationsalter zu niedriges Geburtsgewicht (SGA). Die SGA-Gesamtinzidenz lag aber mit 13% in der untersuchten Population sehr niedrig, was bei der Interpretation dieses Ergebnisses Berücksichtigung finden sollte.

Es fanden sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bezüglich der Schwere der Erkrankung objektiviert durch SNAP. Ein tendenzieller, wenn auch nicht signifikanter, Unterschied ließ sich bezüglich der pulmonalen Erkrankung der Frühgeborenen finden: Die Inzidenz eines Atemnotsyndroms mit notwendiger Surfactanttherapie lag bei den weiblichen Frühgeborenen bei 47% gegenüber 71% bei den männlichen ($p = 0,07$). Die Inzidenz einer Bronchopulmonalen Dysplasie ($FiO_2 > 0,21$ am 28. Lebenstag) betrug 27% für die weiblichen und 48% für die männlichen Probanden ($p = 0,11$).

Tabelle 3: Geschlechtsspezifische perinatale Parameter

	Weiblich (n = 30)	Männlich (n = 31)	p
Gestationsalter [Wochen]*	28 (26,6-28,7)	27 (25,9-28,6)	0,17 #
Geburtsgewicht [g]*	963 (740-1120)	1020 (850-1270)	0,28 #
SGA	7 (23%)	1 (3%)	0,026 ##
präinatale Steroide komplett	18 (60%)	15 (48%)	0,44 ##
jegliche Behandlung	23 (77%)	28 (90%)	0,18 ##
Sectio caesarea	26 (87%)	26 (84%)	1,0 ##
NAPH*	7,3 (7,2-7,4)	7,32 (7,3-7,4)	0,87 #
APGAR bei 5 min*	9 (8-9)	8 (8-9)	0,023 #
ANS mit SF	14 (47%)	22 (71%)	0,07 ##
PDA therapiebedürftig	12 (40%)	13 (42%)	1,0 ##
IVH > II°	3 (10%)	4 (13%)	1,0 ##
Konnatale Infektion	10 (33%)	10 (32%)	1,0 ##
BDP	8 (27%)	15 (48%)	0,11 ##
Tod	2 (7%)	3 (10%)	1,0 ##

*Angabe als Median (Interquartilenintervall), # Mann-Withney- U-Test, ## Fisher´s exact test, SGA = small for gestational age, NAPH = Nabelarterien pH, ANS = Atemnotsyndrom, SF = Surfactanttherapie, PDA = persistierender Ductus arteriosus, IVH = intraventrikuläre Hämorrhagie, BPD = bronchopulmonale Dysplasie

4.5 Evaluation der Sammelmethode

4.5.1 Rückgewinnungsraten für Glukokortikoidmetabolite

Tabelle 4 zeigt die Urinvolumina sowie die Summe der Glukokortikoidmetabolite, die durch die hydraulische Kompression der Windeln gewonnen werden konnten.

Tabelle 4: Rückgewinnung der Glukokortikoidmetabolite

		aus den Windeln extrahierter Urin			
inokulierter Urin (Pool)		extrahiertes Volumen (ml)	relative Volumengewinnung (%)	Menge der Glukokortikoidmetabolite (µg)	relative Metabolit-rückgewinnung (%)
Kleine Windeln (n=5 für jedes Inokulationsvolumen)	Volumen (ml)	15	37	82 (+/-4)	104
	Menge der Glukokortikoidmetabolite (µg)	79 (+/-1)			
		5,6 (+/-1,6)			
Große Windeln (n=5 für jedes Inokulationsvolumen)	Volumen (ml)	30	59	167 (+/-9)	105
	Menge der Glukokortikoidmetabolite (µg)	158 (+/-2)			
		17,6 (+/-3,1)			
Große Windeln (n=5 für jedes Inokulationsvolumen)	Volumen (ml)	45	72	256 (+/-11)	108
	Menge der Glukokortikoidmetabolite (µg)	237 (+/-3)			
		32,6 (+/-1,0)			
Große Windeln (n=5 für jedes Inokulationsvolumen)	Volumen (ml)	30	53	164 (+/-7)	104
	Menge der Glukokortikoidmetabolite (µg)	158 (+/-2)			
		15,8 (+/-1,0)			
Große Windeln (n=5 für jedes Inokulationsvolumen)	Volumen (ml)	50	73	282 (+/-8)	107
	Menge der Glukokortikoidmetabolite (µg)	264 (+/-3)			
		36,4 (+/-2,2)			
Große Windeln (n=5 für jedes Inokulationsvolumen)	Volumen (ml)	70	79	398 (+/-12)	108
	Menge der Glukokortikoidmetabolite (µg)	369 (+/-4)			
		55,2 (+/-2,5)			

Die Summe der Glukokortikoidmetabolite wurde aus dem Poolurin sowie aus den Urinproben, die aus den Windeln gewonnen worden waren, bestimmt und anschließend verglichen. Zur Korrektur der Differenz zwischen inokuliertem und extrahiertem Urinvolumen wurde die aus der Urinprobe bestimmte Steroidkonzentration mit dem inokulierten Volumen multipliziert und so eine exakte Kalkulation der ausgeschiedenen Steroidmenge ermöglicht. Das inokulierte Volumen war durch das Wiegen der Windel bestimmt worden.

Die relativen Rückgewinnungsraten für die einzelnen Glukokortikoidmetabolite nach hydraulischer Kompression der Windeln sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Relative Rückgewinnungsraten der Glukokortikoidmetabolite

	<u>Kleine Windeln (n = 5 je Inokulationsvolumen (ml))</u>		
	15	30	45
Rückgewinnung von 11Hydroxy-Metaboliten (%)			
F	85	93	97
6 β -OH-F	59	70	90
THF	112	112	112
α THF	115	117	119
β -C	104	101	109
Summe 11Hydroxy-Metabolite	90	96	104
Rückgewinnung von 11Keto-Metaboliten (%)			
THE	101	100	105
1 β -OH-THE	108	109	121
6 α -OH-THE	115	116	118
α -Cl	110	112	116
6 α -OH- α -Cl	108	109	110
β -Cl	109	109	110
1 β -OH- β -Cl	93	99	105
6 α -OH- β -Cl	107	110	106
Summe 11Keto-Metabolite	107	107	109

Fortsetzung Tabelle 5:

	<u>Große Windeln (n = 5 je Inokulationsvolumen (ml))</u>		
	30	50	70
Rückgewinnung von 11Hydroxy-Metaboliten (%)			
F	90	97	101
6 β -OH-F	66	70	93
THF	101	99	101
α THF	100	102	104
β -C	96	101	102
Summe 11Hydroxy-Metabolite	87	91	100
Rückgewinnung von 11Keto-Metaboliten (%)			
THE	97	99	101
1 β -OH-THE	109	107	108
6 α -OH-THE	111	111	112
α -Cl	103	115	111
6 α -OH- α -Cl	107	111	112
β -Cl	102	107	104
1 β -OH- β -Cl	96	105	102
6 α -OH- β -Cl	114	118	114
Summe 11Keto-Metabolite	107	111	110

Weder die Größe der verwendeten Windel, noch die Menge des inokulierten Urins hatten signifikanten Einfluss auf die Rückgewinnungsraten der Glukokortikoidmetabolite.

4.5.2 Rückgewinnungsraten für Fetalzonensteroid

In der oben beschriebenen Versuchsanordnung wurden, wie bereits erwähnt, neben den Glukokortikoidmetaboliten auch die Steroide der Fetalzone mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie bestimmt. In gleicher Art und Weise wie für die Glukokortikoidmetabolite konnten so auch Rückgewinnungsraten für die Fetalzonensteroid bestimmt werden. Durch die oben bereits beschriebene Vorgehensweise unter Verwendung

eines Poolurins wurde die Sammelmethode auch für die Bestimmung der Rückgewinnungsraten für Fetalzonensteroiden evaluiert.

Die relativen Rückgewinnungsraten der Fetalzonensteroiden (bestimmt als Summe von 15 im Urin ausgeschiedenen 3 β -Hydroxy-5-en-Steroiden) sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Relative Rückgewinnungsraten der Fetalzonensteroiden

Rückgewinnung von Fetalzonensteroiden (%)	<u>Kleine Windeln (n = 5 je Inokulationsvolumen (ml))</u>		
	15	30	45
Summe der Fetalzonensteroiden	91	95	101
	<u>Große Windeln (n = 5 je Inokulationsvolumen (ml))</u>		
	30	50	70
Summe der Fetalzonensteroiden	91	97	100

Weder die Größe der verwendeten Windel, noch die Menge des inokulierten Urins hatten einen signifikanten Einfluss auf die Rückgewinnungsraten der Fetalzonensteroiden.

4.6 Exkretionsraten der Nebennierensteroiden im Urin

4.6.1 Exkretionsraten der Glukokortikoidmetabolite im Urin

Die Glukokortikoidausscheidungsraten im Urin wurden als Summe der 14 gemessenen Einzelmetabolite (C21-Steroide) bestimmt und als Maß für die Kortisolproduktionsraten der Frühgeborenen verwendet³¹.

Abbildung 5 zeigt die Glukokortikoidausscheidungsraten im Urin der 61 Frühgeborenen als Funktion des postnatalen Alters.

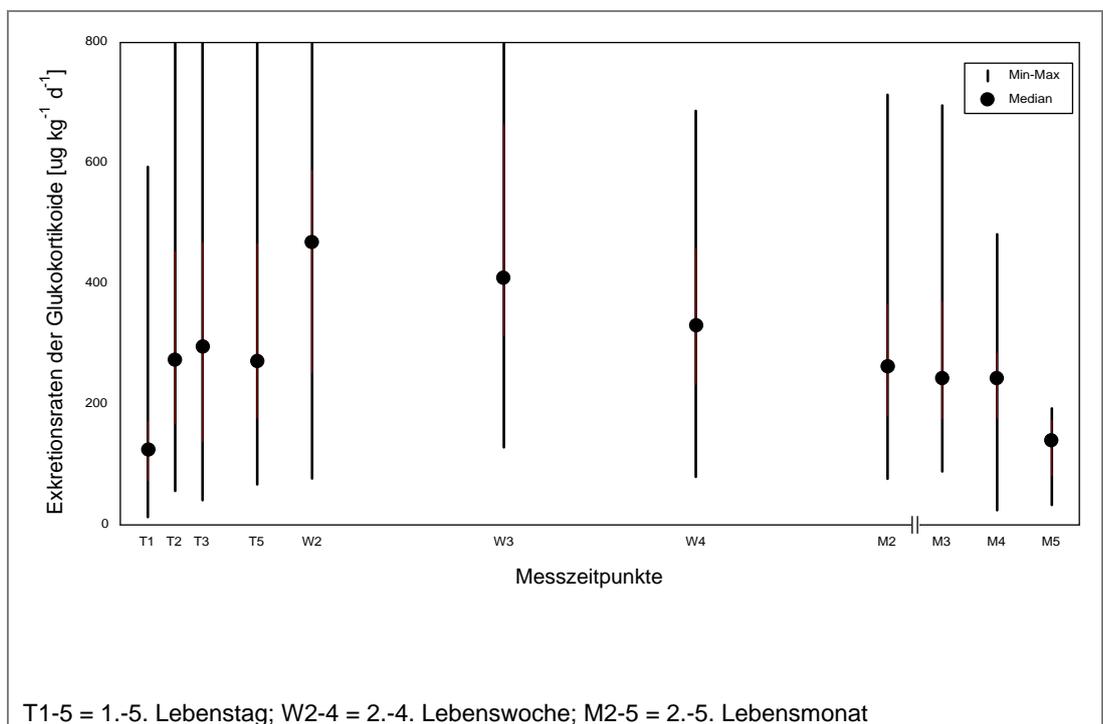


Abbildung 5: Exkretionsraten der Glukokortikoidmetabolite im postnatalen Verlauf

Bezogen auf das Körpergewicht stieg die mediane Glukokortikoidexkretionsrate im Urin in der ersten Lebenswoche signifikant an.

4.6.2 Exkretionsraten der Fetalzonenmetabolite im Urin

Exkretionsraten der Fetalzonensteroiden (3β -OH-5-en-Steroide) im Urin wurden als Summe von 15 Einzelmetaboliten ermittelt.

Androstentetrole (5-androsten- 3β , 16α , 17β , 18 -tetrol, 5-androsten- 3β , 15β , 16α , 17β -tetrol) stellen dabei mit 11-53% die mengenanteilig wichtigsten Einzelmetabolite dar.

Abbildung 6 veranschaulicht den Anteil von 90% der Fetalzonensteroiden an der gesamten Steroidausscheidung im Urin bis zum fünften Lebensmonat. Erst nach dem fünften Lebensmonat sank ihr Anteil auf 78% der gesamten Steroidausscheidung im Urin ab.

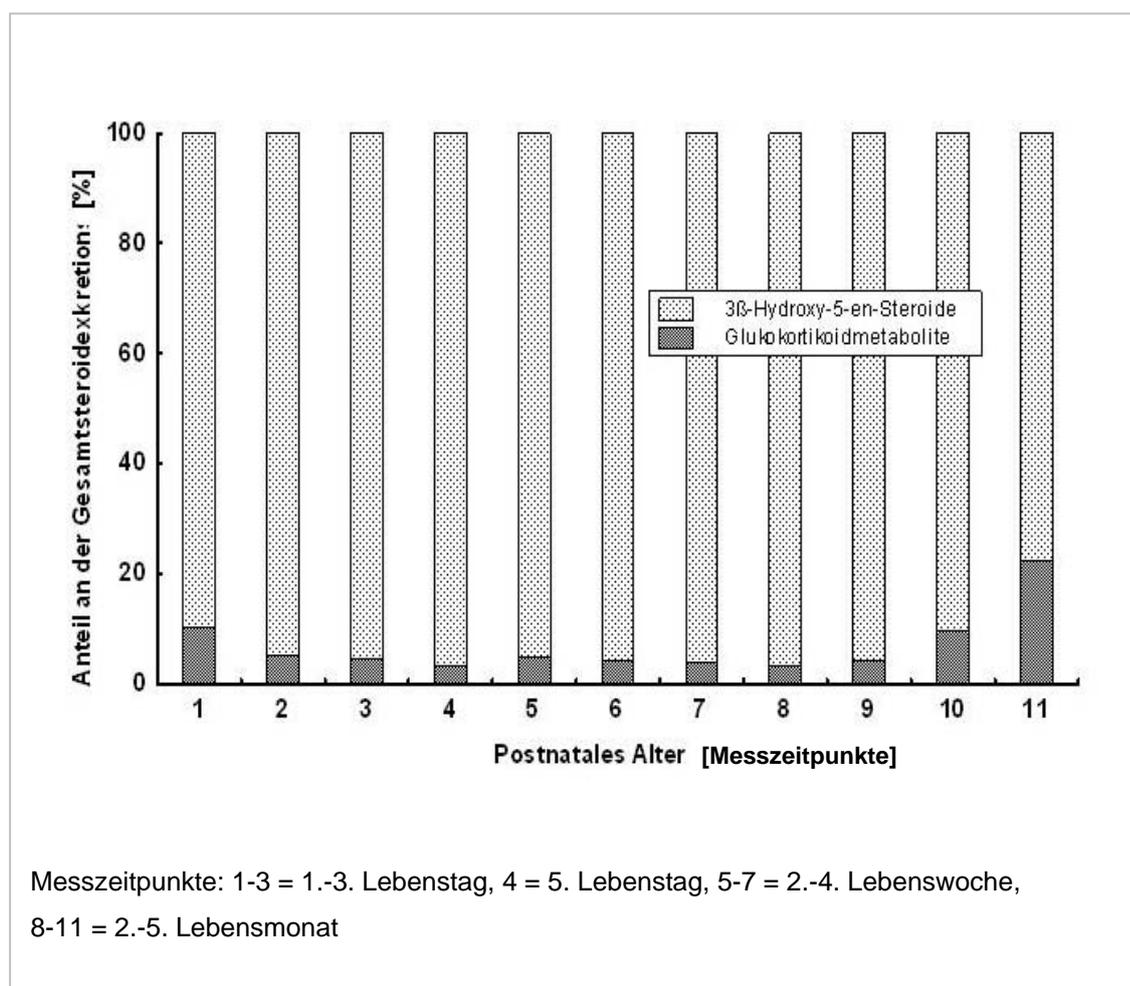


Abbildung 6: Relative Ausscheidungsraten der Fetalzonensteroiden und Glukokortikoidmetabolite im Urin

Wie Abbildung 7 zeigt, stiegen die Exkretionsraten der Fetalzonensteroidoide während der ersten Lebenswoche signifikant an von $1.097\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ ($302\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ - $2.934\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$) auf maximal $9.018\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ ($6.766\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ - $13.999\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$) in der zweiten Lebenswoche ($p = 0,000001$), gefolgt von persistierend hohen Werten von $7.722\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ bis $8.983\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ bis zum zweiten Lebensmonat und anschließend rückläufigen Werten. Es wurde kein Einfluss einer pränatalen Steroidtherapie auf die summierten Exkretionsraten der $3\beta\text{-OH-5}\alpha\text{-Steroide}$ in der ersten Lebenswoche gefunden ($p = 0,48$).

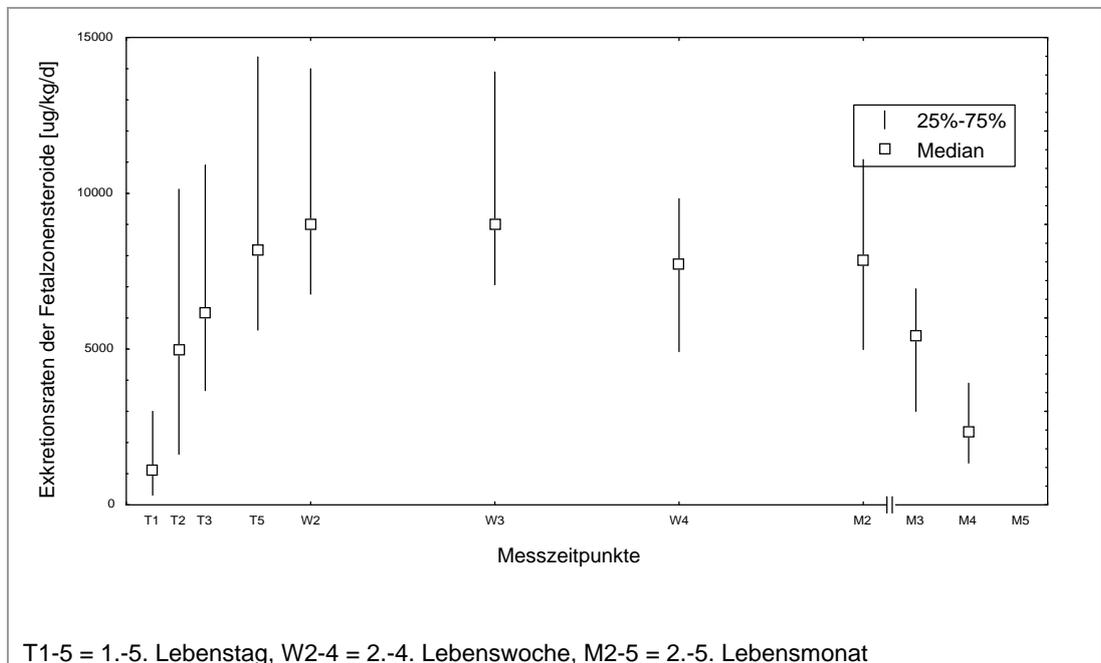


Abbildung 7: Exkretionsraten der Fetalzonensteroidoide postnatal

Bezogen auf das postmenstruelle Alter der Frühgeborenen zeigten sich initial sehr hohe, dann mit zunehmendem postmenstruellem Alter kontinuierlich abnehmende Exkretionsraten der Fetalzonensteroide im Urin (Abb. 8).

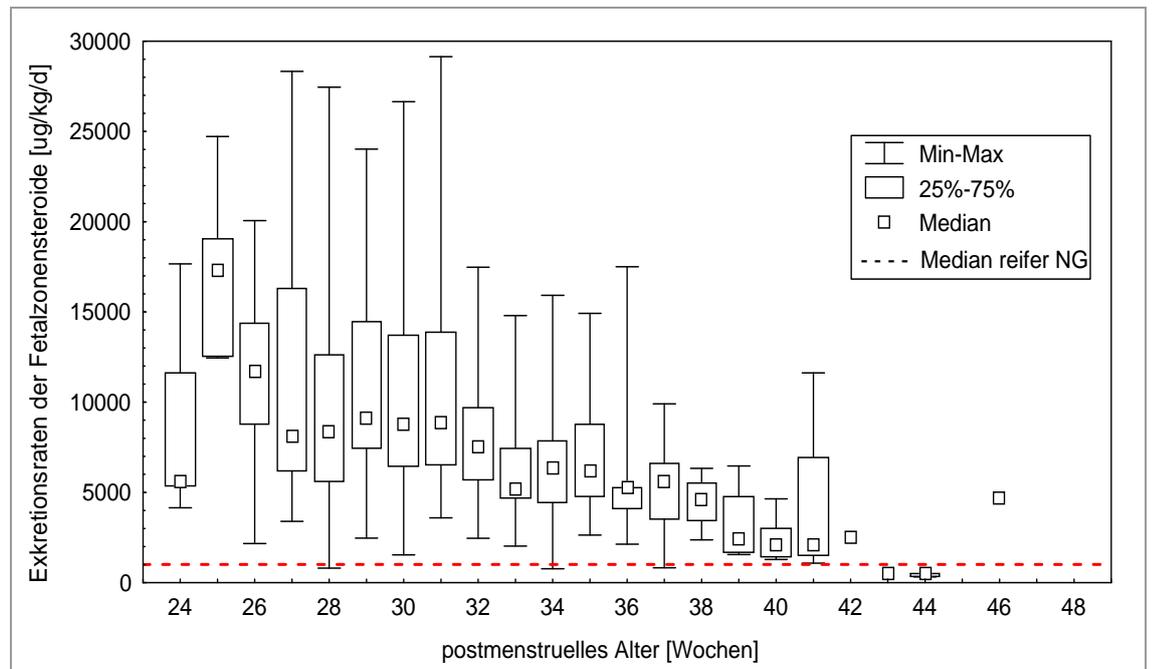


Abbildung 8: Exkretionsraten der Fetalzonensteroide

Im postmenstruellen Alter von 40 Wochen erreichten die Exkretionsraten der Fetalzonensteroide der Frühgeborenen das Niveau der Exkretionsraten reifer Neugeborener⁴⁷.

4.6.3 Berücksichtigung der Nierenfunktion

Um die Veränderung und Reifung der Nierenfunktion im postnatalen Verlauf zu berücksichtigen, wurde die Kreatininausscheidung als Parameter der Nierenfunktion mitbestimmt und wie folgt in die Auswertung einbezogen. Als Maß der glomerulären Filtrationsrate diente die Kreatininmenge im gewonnenen 24-Stunden-Sammelurin.

Bezogen auf die Kreatininausscheidung im Urin zeigte sich der Anstieg der Glukokortikoidausscheidungsraten vom ersten bis zum dritten Lebenstag geglättet und imponierte nur noch als leichter, nicht signifikanter Anstieg (Abb.9). Im weiteren Verlauf nahmen die Glukokortikoidausscheidungsraten im Urin bezogen auf die Kreatininausscheidung im Urin ab: von $5,3\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ pro μmol Kreatinin am dritten Lebenstag bis zu $2,8\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ pro μmol Kreatinin in der vierten Lebenswoche ($p < 0,02$).

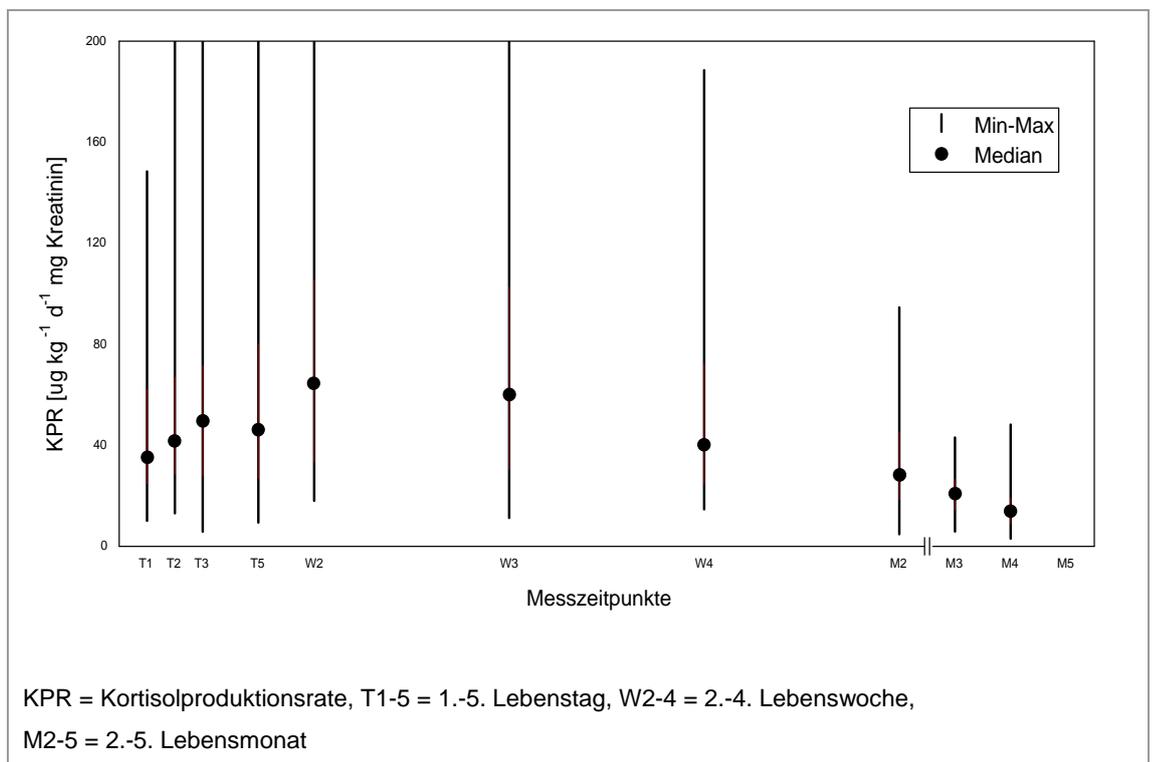


Abbildung 9: Postnataler Verlauf der Kortisolproduktionsraten korrigiert für Kreatinin im Urin

Zur besseren Vergleichbarkeit mit Kortisolproduktionsraten bei Kindern und Erwachsenen wurden die Glukokortikoidausscheidungsraten im Urin bezogen auf die Körperoberfläche errechnet: Es ergaben sich mediane Ausscheidungsraten von $5,1\text{mg}/\text{m}^2/\text{d}$ am 5. Lebenstag sowie $4,2\text{mg}/\text{m}^2/\text{d}$; $4,1\text{mg}/\text{m}^2/\text{d}$ und $3,7\text{mg}/\text{m}^2/\text{d}$ in der zweiten; dritten und vierten Lebenswoche.

4.7 Einfluss der Schwere der Erkrankung auf die Kortisolproduktion

Die Schwere der Erkrankung, objektiviert durch den SNAP²⁴ lag bei der Gruppe der kranken Frühgeborenen während der ersten vier Lebenswochen signifikant höher als bei der wenig beeinträchtigten Kontrollgruppe, welche im Folgenden auch als gesund benannt wird (s.u.).

Tabelle 7: Ergebnisse des Wilcoxon-Tests

SNAP	T1	T2	T3	T5	W2	W3	W4	M2	M3	M4
p-Niveau	0,0005	0,0002	0,0001	0,0147	0,0437	0,0333	0,0272	0,0546	0,3080	0,7366

Die höchsten Werte und somit gleichzeitig die ernsthaftesten Erkrankungen fanden sich in der ersten Lebenswoche.

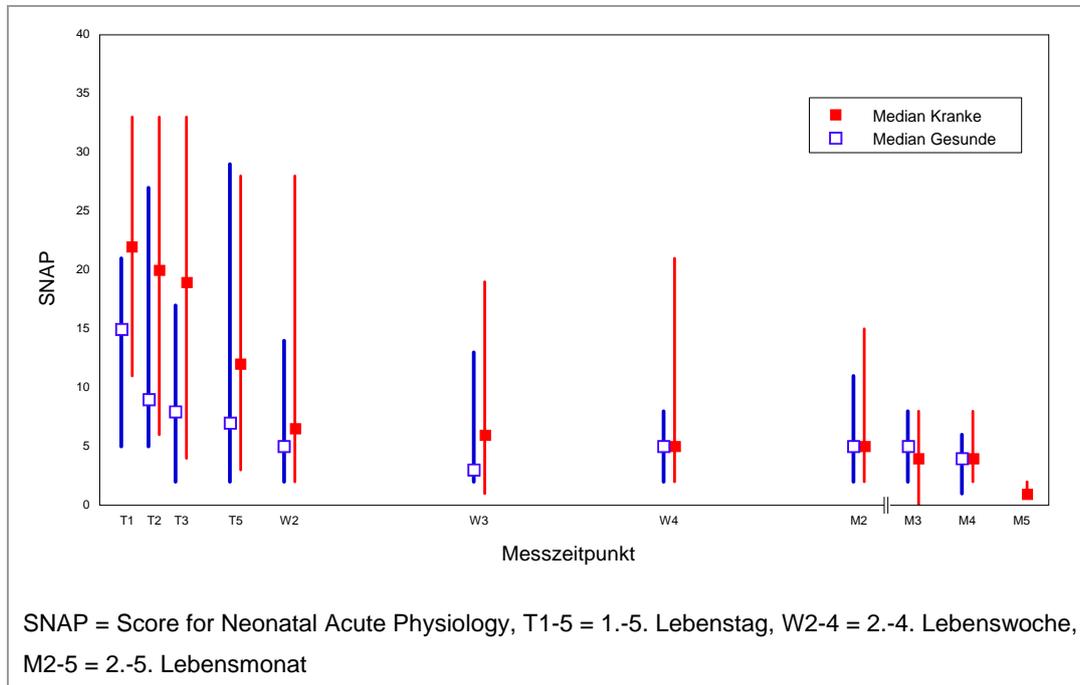


Abbildung 10: Postnataler Verlauf SNAP bei kranken und gesunden Frühgeborenen

Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich für den Gewichtsverlauf der beiden Gruppen.

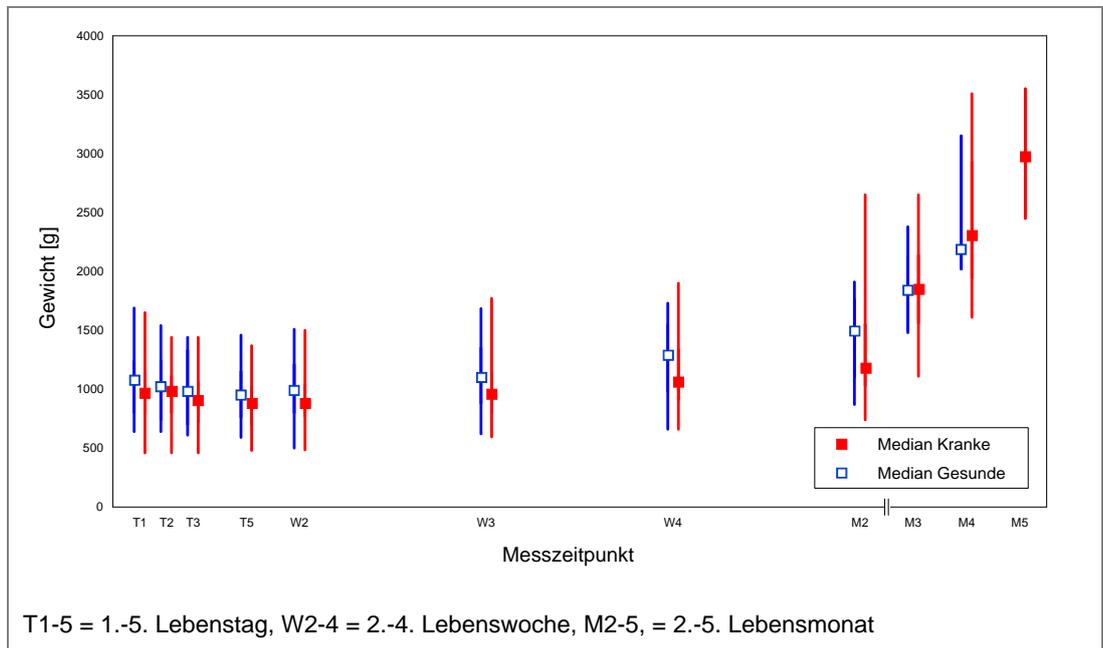


Abbildung 11: Gewichtsverlauf bei kranken und gesunden Frühgeborenen

Die bezogen auf die Kreatininausscheidung korrigierten Kortisolproduktionsraten der beiden Gruppen zeigten (bis auf Woche 3) keinen signifikanten Unterschied.

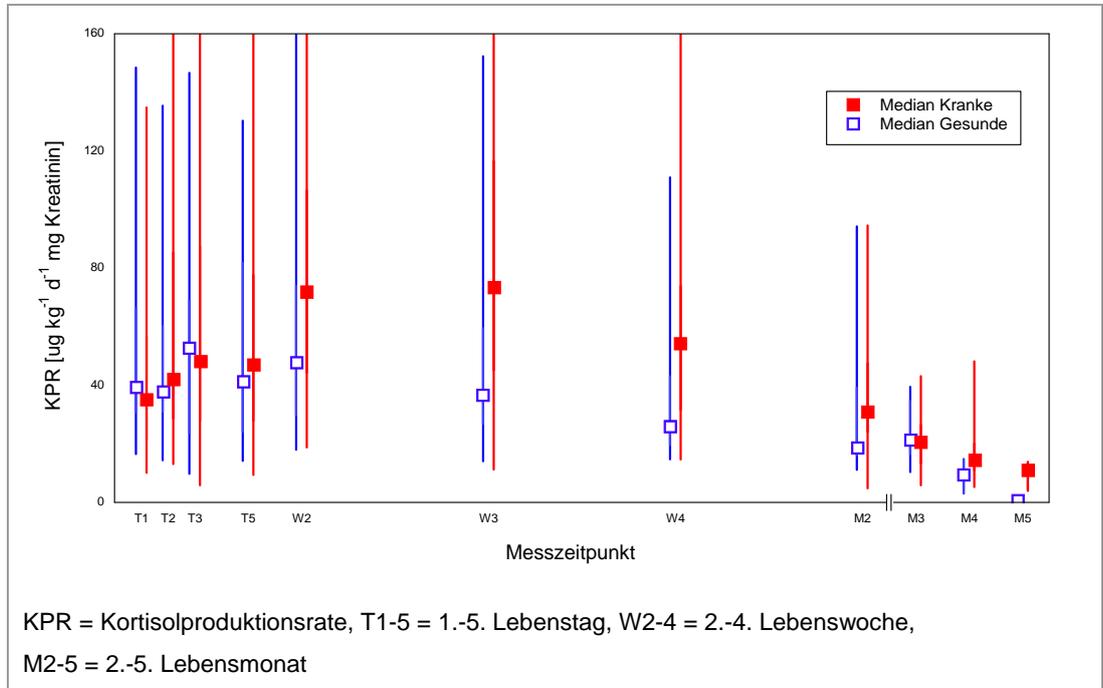


Abbildung 12: Verlauf der Kortisolproduktionsraten korrigiert für Kreatinin im Urin bei gesunden und kranken Frühgeborenen

Nach der ersten Lebenswoche schien sich insbesondere bei den kranken Frühgeborenen ein Anstieg der Kortisolproduktionsraten abzuzeichnen. Bemerkenswerterweise verhielt sich dies antizyklisch zu den in der ersten Lebenswoche hohen und im Verlauf fallenden SNAP-Werten (Abb. 13). Wir untersuchten daraufhin die Verteilung der Maxima von Kortisolproduktionsraten und SNAP eingehender. Hierbei ließ sich das gegensätzliche zeitliche Verteilungsmuster der Maximalwerte für die Kortisolproduktionsraten und SNAP deutlich darstellen. Während die Phase der schwersten Erkrankung in die erste Lebenswoche, insbesondere die ersten Lebenstage fiel, fanden sich die maximalen Kortisolproduktionsraten in der zweiten oder dritten Lebenswoche. Beide Gruppen zeigten diesbezüglich einen sehr ähnlichen Verlauf.

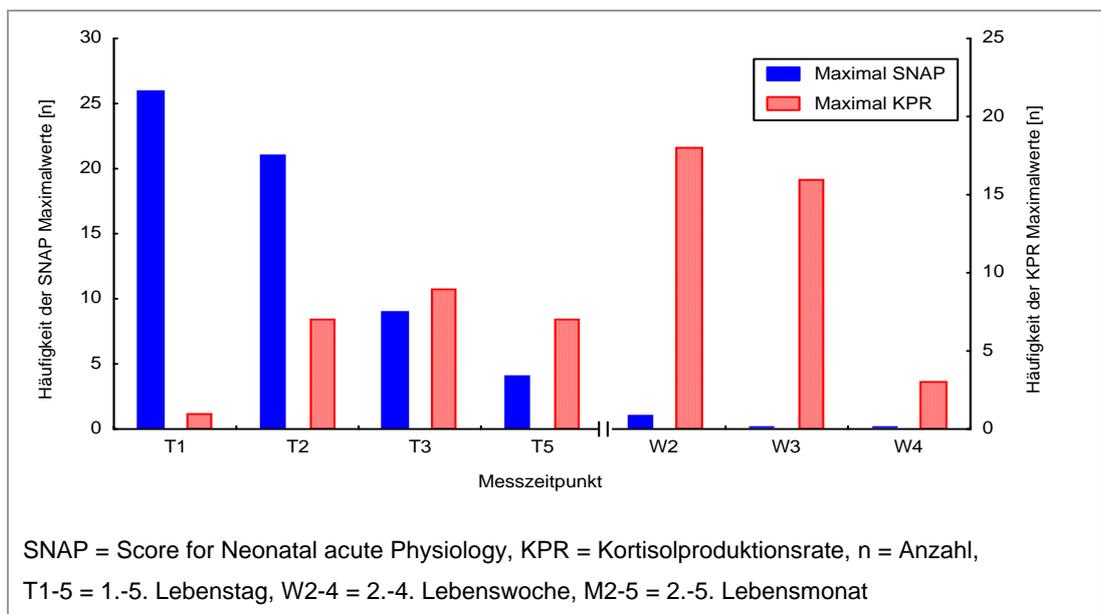


Abbildung 13: Zeitliche Verteilung der Maximalwerte

Unter der Annahme, es handele sich bei dem beobachteten Effekt möglicherweise um eine verspätete Form der adrenalen Stressantwort auf die Erkrankung führten wir eine nonparametrische Regressionsanalyse durch. Diese sollte den Einflusses verschiedener Kovariablen auf die am Median dichotomisierte, bezogen auf die Kreatininausscheidung korrigierte, maximale Kortisolproduktionsrate innerhalb der ersten vier Lebenswochen klären. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Einfluss der Kovariablen auf die maximale Kortisolproduktionsrate

	OR	95% KFI	p
Geschlecht (männlich vs. weiblich)	1,36	0,36-5,12	0,65
Gestationsalter (26 < x < oder = 28 vs. > 28 SSW)	0,12	0,03-0,51	0,004
(< oder = 26 vs. > 28 SSW)	0,05	0,01-0,33	0,0015
Pränatale Steroide (inkomplett vs. keine)	5,99	0,69-52,14	0,1
(komplett vs. keine)	1,89	0,31-11,66	0,49
Sectio	0,65	0,10-4,11	0,64
Maximaler SNAP (am Median dichotomisiert)	1,25	0,36-4,35	0,72

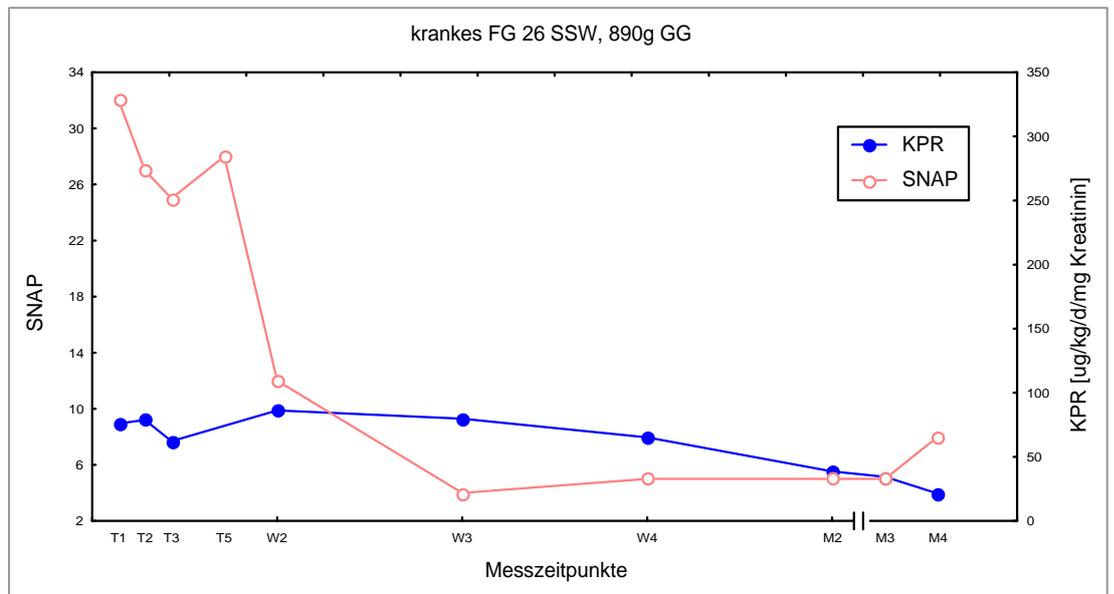
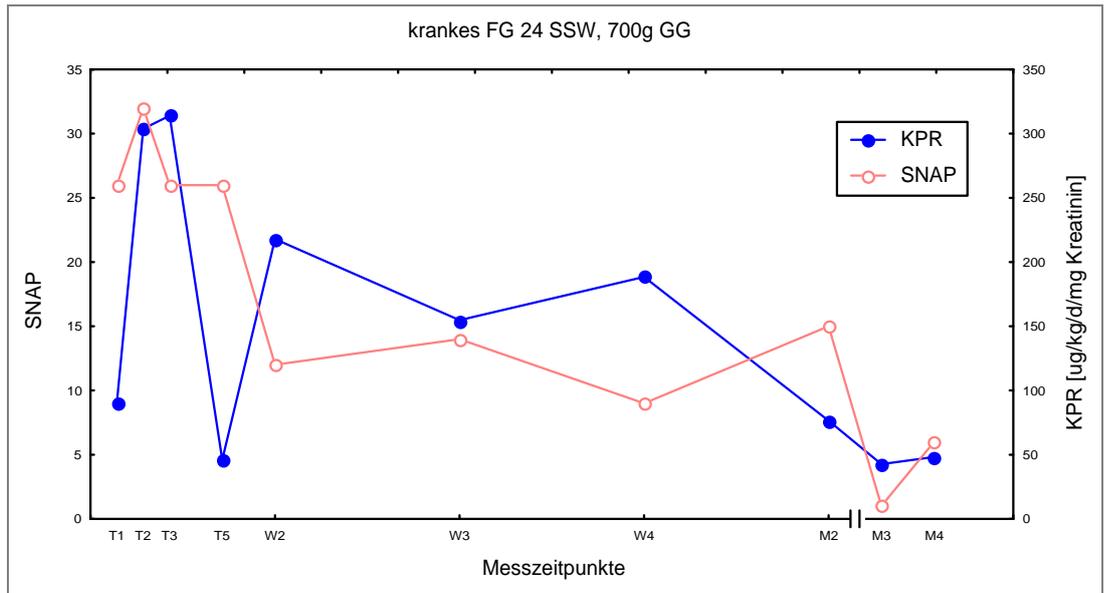
OR = Odds Ratio, KFI = Konfidenzintervall, SSW = Schwangerschaftswoche, SNAP = Score for Neonatal acute Physiology

Als abhängige Variable diente in dem verwendeten Modell die am Median dichotomisierte, bezogen auf die Kreatininausscheidung korrigierte, maximale Kortisolproduktionsrate innerhalb der ersten vier Lebenswochen.

Für die Kovariable Gestationsalter zeigte sich ein signifikanter Einfluss auf die maximale Kortisolproduktionsrate (siehe Tab. 8), nach dem die unreifsten Kinder die höchsten Kortisolproduktionsraten aufwiesen. Die Schwere der Erkrankung (SNAP) hingegen besaß keinen signifikanten Einfluss, weder auf den Zeitpunkt, noch auf die Höhe (Differenz zwischen minimaler und maximaler Kortisolproduktionsrate, $p = 0,84$) oder die Geschwindigkeit des Anstieges der maximalen Kortisolproduktionsrate (Zeit zwischen Tag 1 und dem Tag des Maximums der Kortisolproduktionsrate, $p = 0,48$), wie zusätzliche Analysen zeigten.

Zwischen kranken und gesunden Frühgeborenen konnten keine signifikanten Unterschiede der bezogen auf die Kreatininausscheidung korrigierten Kortisolproduktionsraten gefunden werden. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die Kortisolproduktionsraten eine ausgesprochen große Streuung zeigten.

Beispielhaft für diese Varianz zeigt Abbildung 14 die Verläufe von SNAP und Kortisolproduktionsraten zweier schwer kranker Frühgeborener. Bei initial ähnlich hohen SNAP-Werten stellen sich die adrenalen Antworten und damit die Kortisolproduktionsraten der beiden Kinder in ihrer Ausprägung äußerst unterschiedlich dar.



FG = Frühgeborenes, SSW = Schwangerschaftswoche, GG = Geburtsgewicht, SNAP = Score for Neonatal acute Physiology, KPR = Kortisolproduktionsrate, T1-5 = 1.-5. Lebenstag, W2-4 = 2.-4. Lebenswoche, M2-5 = 2.-5. Lebensmonat

Abbildung 14: postnatale Verläufe von SNAP und Kortisolproduktionsraten zweier schwer kranker Frühgeborener

Um zu analysieren, ob kranke Frühgeborene von einer hohen Kortisolproduktionsrate profitieren, wurde ein reifes Muster der adrenalen Reaktion auf schwere Erkrankung definiert. Kranken Frühgeborenen wurde zugesprochen, eine reife adrenale Reaktion zu besitzen, sofern ihre Kortisolproduktionsrate das dreifache des Mittelwertes der medianen Kortisolproduktionsraten gesunder Frühgeborener während schwerster Erkrankung (höchster SNAP), also während der ersten Lebenswoche, überstieg.

Tabelle 9: Auswirkung einer reifen adrenalen Reaktion

	< 3-facher Median der KPR der Kontrollgruppe (n = 32)	> 3-facher Median der KPR der Kontrollgruppe (n = 12)	p
Gestationsalter [Wochen]	27,6 +/- 1,5	26,5 +/- 1,5	ns
ANS mit SF	26 (81%)	11 (92%)	ns
Hirnblutung (alle)	8 (25%)	9 (75%)	0,003
Hirnblutung (schwere, > II°)	2 (6%)	5 (42%)	0,011
Infektion	15 (47%)	5 (42%)	ns
BPD	16 (50%)	5 (42%)	ns
SNAP (alle Messzeitpunkte)			ns

ns = nicht signifikant, KPR = Kortisolproduktionsrate, ANS = Atemnotsyndrom, SF = Surfactanttherapie, BPD = bronchopulmonale Dysplasie, SNAP = Score for Neonatal acute Physiology

Bei den kranken Frühgeborenen mit reifer adrener Reaktion (12 [27%] von 44 kranken Kindern) lag die Inzidenz von intraventrikulären Hämorrhagien höher (9/12 [75%] gegenüber 8/32 [25%]; p = 0,003) und das Gestationsalter war geringer (Median 26,6 Schwangerschaftswochen [IQR 25,3-27,8] gegenüber 27,7 [IQR 26,2-28,6]) als bei denen mit geringerer adrener Reaktion.

4.8 Kortisolproduktion und Wachstum

Im Anschluss an die Neonatalperiode nahm die Kortisolproduktionsrate im weiteren postnatalen Verlauf signifikant ab, wenn eine deutliche Gewichtszunahme einsetzte (siehe Abb. 12). So zeigte sich beispielsweise eine signifikante, negative Korrelation zwischen der Gewichtszunahme und der Abnahme der Kortisolproduktionsrate bei den kranken Frühgeborenen im Zeitraum zwischen der vierten Lebenswoche und dem dritten Lebensmonat ($r = -0,48, p = 0,027$).

4.9 Ausscheidungsraten der Fetalzonensteroiden (3β -Hydroxy-5-en-Steroide)

Die Ausscheidungsraten der Fetalzonensteroiden, welche während der Neonatalperiode im Urin der Frühgeborenen bestimmt worden waren, untersuchten wir auf geschlechtsspezifische Unterschiede. Die männlichen Frühgeborenen in unserer Population zeigten ein tendenziell, wenn auch nicht signifikant, häufigeres Auftreten pulmonaler Erkrankungen.

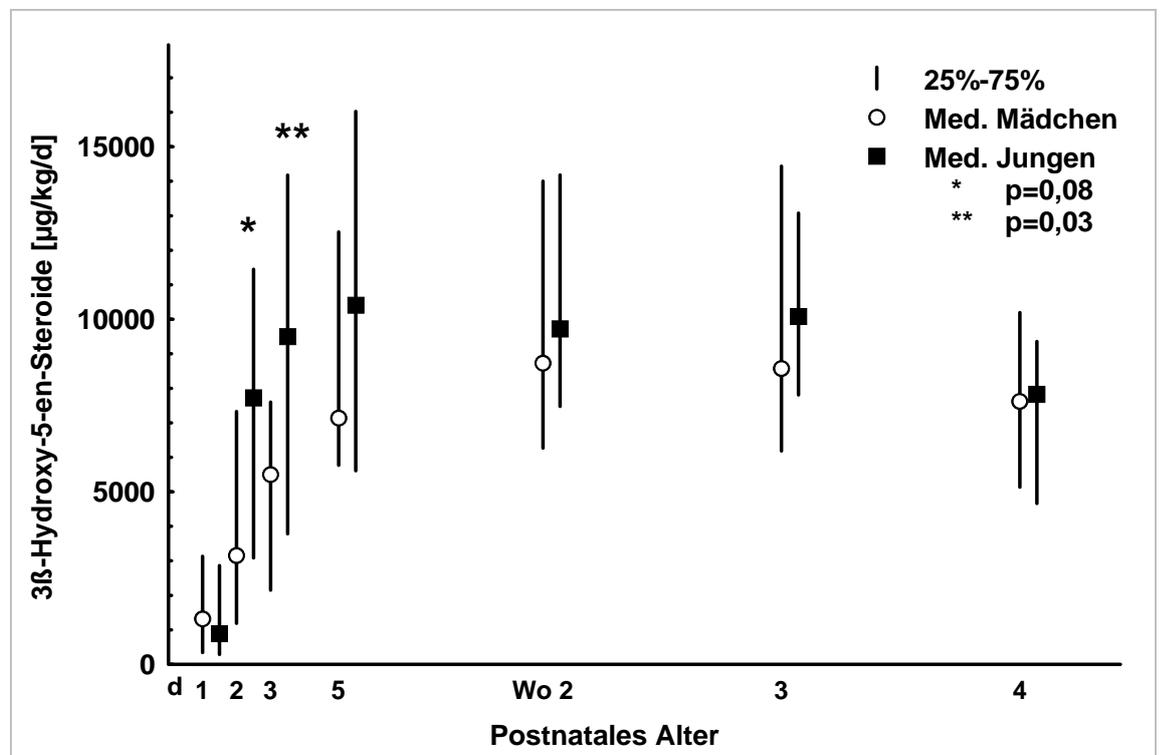


Abbildung 15: Exkretionsraten der Fetalzonensteroiden bei weiblichen und männlichen Frühgeborenen im postnatalen Verlauf

Abbildung 15 zeigt die Exkretionsraten der 3 β -OH-5 α -Steroide unter Berücksichtigung des Geschlechts. Obgleich die Exkretionsraten der Fetalzonensteroiden bei den männlichen Frühgeborenen vom zweiten Lebenstag bis zur vierten Lebenswoche jeweils etwas höher lagen als bei den weiblichen, zeigte sich lediglich am dritten Lebenstag eine statistisch signifikante ($p = 0,03$) und am zweiten Lebenstag nur im Trend ($p = 0,08$) um den Faktor 1,8-2,2 höhere Ausscheidungsrate der Fetalzonensteroiden im Vergleich zu den weiblichen Frühgeborenen (Wilcoxon-Test).

Den Einfluss verschiedener Variablen auf das Auftreten eines surfactantpflichtigen Atemnotsyndroms untersuchten wir mittels logistischer Regressionsanalyse genauer, wobei das Auftreten des surfactantpflichtigen Atemnotsyndroms die abhängige Variable darstellte.

Tabelle 10: Ergebnisse der Regressionsanalyse

		OR	95% KFI	p
Geschlecht	(männlich vs. weiblich)	1,71	0,43-6,83	0,45
Gestationsalter	(26 < x <= 28 vs. > 28 SSW)	3,73	0,61-18,67	0,16
	(x <= 26 vs. > 28 SSW)	0,33	0,03-3,34	0,35
Pränatale Steroide	(inkomplett vs. keine)	2,21	0,21-22,96	0,51
	(komplett vs. keine)	0,17	0,02-1,79	0,14
Maximale KPR		1,02	1-1,04	0,036
Maximale Exkretionsrate Fetalzonensteroiden		1	0,99-1	0,36

OR = Odds Ratio, KFI = Konfidenzintervall, SSW = Schwangerschaftswoche, KPR = Kortisolproduktionsrate

Wie in Tabelle 10 dargestellt, zeigten die maximalen Ausscheidungsraten der Fetalzonensteroiden, das Geschlecht, eine pränatale Steroidtherapie der Mutter oder das Gestationsalter jeweils keinen signifikanten Effekt auf die Inzidenz eines surfactantpflichtigen Atemnotsyndroms. Lediglich für die maximale Kortisolproduktionsrate zeigte sich ein zwar signifikanter aber geringer Einfluss auf das Auftreten eines surfactantpflichtigen Atemnotsyndroms.

In den angeschlossenen Analyseschritten mit kongenitaler Infektion als abhängiger Variable fand sich kein Einfluss der maximalen Ausscheidungsrate der Fetalzonensteroiden (Tag 1: $p = 0,47$, $n = 34$; Tag 2 $p = 0,77$, $n = 50$; Tag 3 $p = 0,92$, $n = 53$) oder der übrigen Kovariablen. Zuletzt wurde der Einfluss von SNAP auf die maximale Ausscheidungsrate der Fetalzonensteroiden in der ersten Lebenswoche unter Berücksichtigung potentieller Einflussvariablen (Gestationsalter, Geschlecht, pränatale Steroide) mittels logistischer Regressionsanalyse untersucht. Ein Effekt der Schwere der Erkrankung (SNAP) zeigte sich nicht ($p = 0,48$).

Es fand sich also kein Zusammenhang zwischen der Schwere eines auftretenden Atemnotsyndroms, der Schwere der neonatalen Erkrankung oder dem Bestehen einer Infektion und den maximalen Ausscheidungsraten der Fetalzonensteroiden bei Frühgeborenen.

5. Diskussion

Das erste Ziel dieser Studie war es, eine praktikable Methode zu entwickeln, um die Nebennierenrindenfunktion beim Frühgeborenen mit einem Gestationsalter unter 30 Schwangerschaftswochen beurteilen zu können. Diese sollte zuverlässig und noninvasiv die Ermittlung der Kortisolproduktionsraten bei Frühgeborenen erlauben.

5.1 Gewinnung eines 24-Stunden-Sammelurins

5.1.1 Wahl der verwendeten Methoden

Als Maß der Nebennierenrindenfunktion diente die Bestimmung der Steroidexkretionsraten im Urin. Diese korreliert, bestimmt als Gesamtglukokortikoidausscheidung im 24-Stunden-Sammelurin, wie beim gesunden Erwachsenen bereits gezeigt wurde, gut mit invasiv gemessenen Kortisolproduktionsraten³¹.

Um die renalen Steroidausscheidungsraten bestimmen zu können, entwickelten wir eine Methode zur schonenden Gewinnung eines 24-Stunden-Sammelurins von Frühgeborenen, wie in Abschnitt 5.1.2 dargestellt. Um drohende analytische Probleme in Folge der Verwendung eines Immunoassays abzuwenden, entschieden wir uns für die Verwendung der hochspezifischen und nichtselektiven Gaschromatographie-Massenspektrometrie, welche es ermöglichen sollte, die charakteristischen Glukosteroidmetabolite im Urin von Frühgeborenen zu analysieren (Abschnitt 5.1.3).

5.1.2 Gewinnung des 24-Stunden-Sammelurins

Ziel der vorliegenden Studie war die Etablierung einer noninvasiven Methode zur Gewinnung eines 24-Stunden-Sammelurins von unreifen Frühgeborenen.

Zur Bestimmung der Steroidexkretionsraten im Urin ist eine verlässliche Methode zur sicheren Gewinnung des gesamten Urins im Sammelintervall von entscheidender Bedeutung.

Die in der vorliegenden Studie verwendete Urinprobengewinnung aus Einmalwindeln durch Kompression ist eine brauchbare Alternative zu invasiven Methoden, um die 24-Stunden-Urinausscheidung⁴⁸ zu messen und verschiedene Urinbestandteile^{49,50} zu bestimmen, sofern eine Minimierung der Verdunstung während des Sammelintervalls und eine Verlustkorrektur durch das Wiegen der Windel gewährleistet sind.

Die Evaluation unserer Urinsammelmethode zeigte, dass die Verwendung einer hydraulischen Presse eine suffiziente Probengewinnung aus Zellulosewindeln auch bei kleinen inkulierten Urinvolumina ermöglichte (siehe oben). Dies ist von entscheidender Wichtigkeit, insbesondere bei extrem unreifen Frühgeborenen mit niedrigem Geburtsgewicht und geringer Urinausscheidung während der ersten Lebensstage.

Die in der Studie verwendeten Windeln wurden aus reiner Zellulose hergestellt. Die handelsüblichen hochabsorbierenden Windelsorten waren für die Urinprobengewinnung durch hydraulisches Auspressen gänzlich ungeeignet, da die ausgepressten Proben bei Verwendung dieser Windeln stets Anteile des gelähnlichen Absorbtionsmaterials enthielten.

Der beim Neonaten sonst vielfach übliche Gebrauch von Plastikurinbeuteln, die auf das Perineum aufgeklebt werden, erscheint beim Frühgeborenen und zur Gewinnung eines vollständigen Sammelurins in mehrfacher Hinsicht problematisch. So kann es beim Ablösen des benutzten Beutels vom Perineum zu Abrasionen oder Einrissen in der sehr vulnerablen Haut des Frühgeborenen kommen. Außerdem muss gerade bei weiblichen Frühgeborenen damit gerechnet

werden, dass in Folge Leckage des Sammelsystems keine ausreichend zuverlässige Gewinnung des gesamten Urins möglich ist.

Darüber hinaus sind die Eigenbewegung des Kindes und eine daraus resultierende Ablösung des Beutels mit Verlust von Probenanteilen oder eine mögliche Verunreinigung der Urinprobe durch Stuhlbeimengungen im Plastikbeutel als mögliche Fehlerquellen dieser Methode zu bedenken.

Eine alternativ zur Verfügung stehende Methode nutzt ein speziell entwickeltes Bett mit Nylonlaken, welches für Urin durchlässig ist^{51,52}. Wird das Kind auf dem Laken platziert, gelangt der ausgeschiedene Urin durch das Laken über ein Ableitungssystem in einen Sammelbehälter. Nachteile dieses Verfahrens betreffen die notwendige Hautpflege bei schwer kranken, immobilisierten Frühgeborenen sowie die Inpraktikabilität der Methode bei älteren, mobileren Kindern. Die Verwendung eines Blasenkatheters zur Uringewinnung stellt ein zuverlässiges, jedoch invasives Verfahren dar und ist somit für Studienzwecke inakzeptabel.

Die Gewinnung eines 24-Stunden-Sammelurins nach unserer Methode ist noninvasiv und stressfrei für das Frühgeborene und stört den üblichen Pflegeablauf nicht. Eine stressfreie Methode ist zur Untersuchung der Nebennierenfunktion per se von eminenter Wichtigkeit. Bei gesunden reifen Neugeborenen konnte bereits gezeigt werden, dass der Plasmakortisolspiegel eine halbe Stunde nach einer einfachen Venenpunktion auf das elffache angestiegen war¹³. Darüber hinaus erlaubt unsere Methode die Gewinnung von Urinproben über einen großen Zeitraum, was longitudinale Studien zur Beschreibung der Veränderung des Kortisolmetabolismus vom neonatalen hin zum adulten Muster ermöglicht.

5.1.3 Steroidmessung

Steroidmetabolite der Nebennierenrinde wurden mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie aus in Einmalwindeln gewonnenem Sammelurin mit hohen Rückgewinnungsraten identifiziert und quantifiziert.

Im Rahmen der Evaluation der Sammelmethode zeigten sich exzellente Rückgewinnungsraten der Steroidmetabolite aus den verwendeten Windeln mit durchschnittlich 105% (Standardabweichung 12,3%) für die Glukokortikoidmetabolite und 91% (Standardabweichung 8%) für die Metabolite der Fetalzone.

Die Menge der in den Urinproben bestimmten Steroide, die aus den Windeln durch hydraulische Kompression zurückgewonnen wurden, machte deutlich, dass bei dem verwendeten Verfahren weder Spaltung der Steroide durch Bakterien, noch Absorption durch das Füllmaterial der Windeln auftraten. Tatsächlich beobachteten wir einen geringfügigen Konzentrationseffekt, welcher die exzellenten Rückgewinnungsraten von etwas mehr als 100% erklärt und eventuell auf Verdunstung oder Absorption von Wasser durch die Windel basiert. Diese hohen Rückgewinnungsraten der Steroide zeigen, dass es in der Windel, die für 36 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurde, zu keiner relevanten Steroidabsorption oder –degeneration kam.

Zur Bestimmung und Identifikation von Steroiden aus komplexen Gemischen wie neonatalem Urin sind nichtselektive Methoden wie die Gaschromatographie oder Gaschromatographie-Massenspektrometrie notwendig. Die Gaschromatographie-Massenspektrometrie besitzt die größte Spezifität, da sie gleichzeitig strukturelle Informationen über die analysierten Substanzen liefert. Die Anfertigung eines Urinsteroidprofils mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie ist ein nichtselektives Verfahren von höchster diagnostischer Potenz bezüglich der Erkennung von Störungen im menschlichen Steroidmetabolismus⁴⁷.

Im Gegensatz zu Studien, deren quantitative Bestimmung neonataler Uringlukokortikoide auf reiner Gaschromatographie basierte, erforderte die Bestimmung mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie und selektivem Ionenmonitoring keine Separation der Steroidsulfate von den freien oder glukuroniert vorliegenden Konjugaten durch Chromatographie mittels Sephadex-LH-20 Säule, ein zeit-, arbeits- und kostenintensiver Präparationsschritt⁴⁰. Die Liste unserer Analyte umfasste alle wichtigen neonatalen neutralen Kortisolmetabolite, die entweder frei oder glukuroniert mit zusätzlichen Hydroxylgruppen an den Positionen 1 β und 6 α ausgeschieden werden. Darüber hinaus beinhaltete die Bestimmung alle repräsentativen Metabolite des adulten Kortisolkatabolismus. Im Unterschied zu Studien, die auf reiner Gaschromatographie basierten³⁵, war es uns möglich, auch 11-Hydroxysteroiden wie THF oder 5 α -THF zu bestimmen, trotz deren postnatal niedriger Konzentration bei Frühgeborenen.

Unsere Ergebnisse demonstrieren, dass man Glukokortikoidmetabolite und Metabolite der Fetalzone der Nebennierenrinde mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie aus in Einmalwindeln gewonnenem Sammelurin mit hohen Rückgewinnungsraten identifizieren und quantifizieren kann.

Dies stellt eine praktikable nichtinvasive Methode zur zuverlässigen Untersuchung der Nebennierenfunktion beim Früh- oder Neugeborenen dar.

5.2 Kortisol und Metabolite

Die Erstellung von „Referenzwerten“ für die im 24-Stunden-Sammelurin ermittelten Ausscheidungsraten von Kortisol und seinen Metaboliten als Maß der Nebennierenrindenfunktion bei Frühgeborenen eines Gestationsalters unter 30 Schwangerschaftswochen war Ziel der vorliegenden Arbeit. Die Exkretionsraten sollten im longitudinalen Verlauf direkt postnatal bis zu einem Alter von sechs Monaten untersucht werden. Außerdem sollten mögliche Einflussfaktoren wie das Gestationsalter, postnatales Alter, Geburtsmodus, Geschlecht, intrauterine Wachstumsretardierung oder präpartale Steroidtherapie der Mutter berücksichtigt werden.

5.2.1 Bestimmung der Glukokortikoidexkretionsraten

Die Glukokortikoidausscheidungsraten im Urin wurden als Summe von 14 mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie gemessenen C21-Steroid-Einzelmetaboliten aus dem 24-Stunden-Sammelurin der Frühgeborenen bestimmt.

Die mediane Ausscheidungsrate der Glukokortikoidmetabolite im Urin variierte bei den untersuchten Kindern zwischen $170\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ und $566\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ und lag damit vier- bis sechsmal höher als die von Midgeley et al.³⁵ berichteten Werte. Die Ursache hierfür dürfte in der unterschiedlichen Urinsammelmethode und der verwendeten Analysetechnik im Labor zu suchen sein.

Berücksichtigung der Nierenfunktion

In unserer Kohorte von gesunden Frühgeborenen verdreifachte sich die mediane Glukokortikoidausscheidungsrate im Urin innerhalb der ersten fünf Lebenstage. Diese Tatsache mag in der direkt postnatal ansteigenden glomerulären Filtrationsrate seine Ursache finden. Da die unmittelbar postnatale Periode bezüglich der Nebennierenfunktion beim

Frühgeborenen von besonderem Interesse ist, muss der Einfluss der Nierenfunktion genau berücksichtigt werden. Hierzu wurden die Glukokortikoidausscheidungsraten anhand der im Urin bestimmten Kreatininwerte korrigiert.

Es war bereits hinlänglich gezeigt worden, dass die Bestimmung von Kreatinin, das ausschließlich renal ausgeschieden wird, aus Urinproben, welche aus Zellulosewindeln gewonnen worden waren, zuverlässig und genau ist^{49,50}. Die Kreatininausscheidungsraten unserer Stichprobe lagen im für Frühgeborene erwarteten Referenzbereich⁵³. Dies ist wichtig hervorzuheben, da die Kreatininausscheidung im 24-Stunden-Sammelurin ein Maß für die Vollständigkeit der Urinsammlung ist.

Nach Korrektur der Steroidausscheidungsraten auf die Kreatininausscheidung fand sich kein signifikanter Anstieg mehr innerhalb der ersten Lebenstage. Da besonders diese Phase die höchste Morbidität aufweist, wurden in den weiteren Analysen kreatininkorrigierte Steroidausscheidungsraten verwendet.

Bestimmung der Kortisolproduktionsraten

Bei gesunden Erwachsenen wurde gezeigt, dass die im 24-Stunden-Sammelurin nichtinvasiv bestimmte Gesamtglukokortikoidausscheidung 75% der Kortisolproduktionsrate entsprach, die invasiv mittels stabiler Isotope ermittelt wurde³¹. Dagegen ist die Ausscheidungsrate des freien Kortisols im Urin kein geeigneter Parameter, um die Kortisolproduktionsrate abzubilden^{54,55}.

Bezogen auf die Körperoberfläche ergaben sich bei den untersuchten Frühgeborenen mediane Glukokortikoidausscheidungsraten im Urin von 5,1 mg/m²/d am 5. Lebenstag sowie 4,2 mg/m²/d; 4,1 mg/m²/d und 3,7 mg/m²/d in der zweiten; dritten und vierten Lebenswoche. Diese nichtinvasiv bestimmte mediane Glukokortikoidausscheidung im Urin erreichte bei den untersuchten Kindern also bis zu 70% der Kortisolproduktionsraten, die invasiv bei älteren Kindern⁵⁵ (6,8±1,9 mg/m²/d) und Erwachsenen³¹ (7,7 mg/m²/d -11,4 mg/m²/d) mittels stabiler Isotopen Verdünnungsmethode erhoben wurden.

Damit war das Ziel, eine nichtinvasive Methode zur Bestimmung der Kortisolproduktionsraten bei sehr unreifen Frühgeborenen zu entwickeln, erreicht.

Einfluss perinataler Parameter auf die Kortisolproduktionsraten

Inwieweit perinatale Einflussfaktoren (Gestationsalter, postnatales Alter, Geburtsmodus, Geschlecht, intrauterine Wachstumsretardierung oder präpartale Steroidtherapie der Mutter) auf die maximalen Kortisolproduktionsraten der Frühgeborenen wirken, wurde mittels nonparametrischer Regressionsanalyse untersucht. Diese zeigte für die Kovariable Gestationsalter einen signifikanten Einfluss auf die maximale Kortisolproduktionsrate. Die Kortisolproduktionsraten korrelierten negativ zum postmenstruellen Alter, wie es auch für Plasmakortisolmessungen bei Frühgeborenen berichtet wurde^{29, 35, 56}.

5.2.2 Modulation der Kortisolproduktionsraten durch Erkrankung

Eine reife adrenale Stressantwort zeichnet sich durch einen bis zu sechsfachen Kortisolanstieg bei schwerer Erkrankung oder Trauma aus¹². Dagegen fand sich im untersuchten Kollektiv von sehr unreifen Frühgeborenen mit einem Gestationsalter unter 30 Wochen keine Modulation der Kortisolproduktionsraten durch Erkrankung.

Die renalen Glukokortikoidausscheidungsraten erreichten bei den untersuchten Frühgeborenen in den ersten vier Lebenswochen die Kortisolproduktionsraten von Kindern⁵⁵ und Erwachsenen^{31, 57}.

Obwohl die basale Kortisolproduktionsrate also keinesfalls erniedrigt ist, fand sich bei den kranken Frühgeborenen kein signifikanter Anstieg der Kortisolproduktionsrate im Vergleich zu den gesunden. Allerdings ist das Frühgeborene im Vergleich zum Feten desselben Gestationsalters durchaus zu einer Steigerung seines Plasmakortisolspiegels in der Lage. Denn postnatal liegen die Plasmakortisolspiegel bei Frühgeborenen um

das fünf- bis zehnfache höher als bei Feten desselben Gestationsalters, wie verschiedene Studien bestätigen^{21,25,26,35}.

Dies erklärt sich nicht durch eine niedrige intrauterine Kortisolproduktion. In vivo Tierversuche am Rhesusaffen zeigten gleiche oder sogar höhere Kortisolproduktionsraten für Feten gegenüber adulten Tieren^{58, 59}.

Die niedrigen intrauterinen Spiegel sind Folge einer bis zu 80-prozentigen Inaktivierung des Kortisols zu Kortison durch die 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2⁶⁰, so dass die Plasmakortisolspiegel menschlicher Feten nach Studien von Gitau et al.⁶¹ sowie Nahoul et al.⁶² im Niedrigbereich von 20-50nmol l⁻¹ liegen. Die Inaktivierung dient dem Schutz des Feten vor den katabolen Effekten des Kortisols.

Insgesamt sind für eine fehlende adrenale Reaktion auf kritische Erkrankungen beim Frühgeborenen zwei Ursachen denkbar: zum einen das Konzept der relativen adrenalen Insuffizienz, welches wir vom erwachsenen Intensivpatienten kennen⁶³, zum anderen die unreife Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse. Die letztere beinhaltet zwei Hypothesen: erstens eine reduzierte Kortisolproduktionskapazität in Folge 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Mangels oder zweitens den Versuch, sich selbst vor exzessiv hohen Kortisolspiegeln zu schützen, indem einige der fetalen Regulationsmechanismen der Glukokortikoidhomöostase postnatal zunächst erhalten bleiben. Die Beobachtung, dass die Reifung der adrenalen Stressantwort mit dem Gestationsalter zunahm, stützt die erste Hypothese⁶¹.

Die Resultate unserer Studie jedoch bestärken die zweite Hypothese. Bei großer Streuung der Kortisolproduktionsraten, was sich auch in Untersuchungen zu Plasmakortisolspiegeln bei Frühgeborenen fand^{25,26}, untersuchten wir, ob kranke Frühgeborene mit einer dreifach höheren Kortisolproduktionsrate als das Referenzkollektiv einen klinischen Vorteil gegenüber kranken Frühgeborenen mit einer niedrigen Kortisolproduktionsrate hatten. Für kranke Frühgeborene mit hoher Kortisolproduktionsrate konnte keinerlei Vorteil festgestellt werden. Auch stützen unsere longitudinalen Datenverläufe die zweite Hypothese. Denn

nach der unmittelbaren postnatalen Phase kam es mit der einsetzenden Gewichtszunahme zu einer Abnahme der Kortisolproduktionsrate. Diese Beobachtung gilt uns als Indiz für die Fähigkeit des Frühgeborenen, das katabole Hormon Kortisol während der Wachstumsphase herunterzuregulieren.

Eine kürzlich veröffentlichte Multicenter-Studie^{64,65}, die den Effekt einer niedrig dosierten Hydrokortisontherapie bei Frühgeborenen untersuchte, ließ keinen Vorteil oder Nutzen erkennen. Darüber hinaus zeigte unsere Studie eine erhöhte Inzidenz von intraventrikulären Hämorrhagien (9/12 [75%] gegenüber 8/32 [25%]; $p = 0,003$) bei den kranken Frühgeborenen mit reifer adrener Reaktion (12 [27%] von 44 kranken Kindern) gegenüber denen mit geringerer adrener Reaktion⁶⁶.

Insgesamt muss man sich angesichts nachteiliger Effekte einer postnatalen Steroidtherapie für Frühgeborene⁶⁷ also die eindringliche Frage stellen, ob es sich bei der ausbleibenden adrener Stressreaktion tatsächlich um eine inadäquate Insuffizienz handelt, oder vielmehr um den Versuch, sich vor einer überschießenden adrener Stressantwort zu schützen.

Von einer kompletten adrener Insuffizienz des Frühgeborenen in der frühen postnatalen Phase kann aber wohl keinesfalls ausgegangen werden.

Mit anderen Worten: Niedrige Kortisolproduktionsraten bei kranken Frühgeborenen sagten kein schlechtes Outcome im Vergleich zu kranken Frühgeborenen mit hohen Kortisolproduktionsraten voraus. Im Gegenteil, bei kranken Frühgeborenen mit hohen Kortisolproduktionsraten fand sich eine deutlich erhöhte Rate von Hirnblutungen.

5.3 3 β -Hydroxy-5-en-Steroide

Im Referenzkollektiv sollten im Rahmen der vorliegenden Studie die Ausscheidungsraten der 3 β -Hydroxy-5-en-Steroide longitudinal beschrieben werden. Unter Berücksichtigung des Einflusses des Gestationsalters, des postnatalen Alters, des Geburtsmodus, des Geschlechts, einer intrauterinen Wachstumsretardierung und einer pränatalen Steroidtherapie der Mutter sollte so die Involution der Fetalzone der Nebennierenrinde untersucht werden.

5.3.1 Bestimmung der Exkretionsraten der Fetalzonensteroid

Exkretionsraten der Fetalzonensteroid (3 β -OH-5-en-Steroide) im Urin wurden als Summe von 15 Einzelmetaboliten ermittelt. Sie machten in den ersten Lebensmonaten den immensen Anteil von 90% der gesamten Steroidausscheidung im Urin aus.

Im Vergleich zu der einzig vorhandenen Studie von Midgley et al^{33,34}, welche ebenfalls Frühgeborene mit einem Gestationsalter unter 30 Schwangerschaftswochen untersuchte, lagen unsere Messwerte für die Exkretionsraten der Fetalzonensteroid der Nebennierenrinde im Urin - ähnlich wie für die gemessenen Glukokortikoidmetabolite - im Median um das vierfache höher. Hierfür dürften die beschriebenen methodischen Unterschiede verantwortlich sein.

Es wurde kein Einfluss einer pränatalen Steroidtherapie auf die Exkretionsraten der 3 β -OH-5en-Steroide in der ersten Lebenswoche gefunden ($p = 0,48$).

Unsere Ergebnisse zeigten eine deutlich anhaltende postnatale Aktivität der Fetalzone der Nebennierenrinde bei Frühgeborenen eines Gestationsalters unter 30 Schwangerschaftswochen. Betrachtet im postmenstruellen Verlauf zeigten sich initial sehr hohe, dann mit

zunehmendem postmenstruellen Alter kontinuierlich abnehmende Exkretionsraten der Fetalzonensteroiden im Urin.

So konnte durch unsere Studie gezeigt werden, dass die Aktivität der Fetalzone der Nebennierenrinde bei Frühgeborenen auch postnatal bis zum eigentlichen Geburtstermin anhält. Dies bestätigt die Ergebnisse vorangegangener Untersuchungen bei Frühgeborenen^{33,34, 68, 69}.

Die anhaltend hohen Konzentrationen der Fetalzonensteroiden im Urin der Frühgeborenen legen den Schluss nahe, dass es sich bei der Involution der Fetalzone der Nebennierenrinde um einen gestationsaltersabhängigen und damit vom Geburtszeitpunkt unabhängigen Prozess handelt^{33,34}.

5.3.2 Einfluss schwerer Erkrankung auf die Exkretionsraten der Fetalzonensteroiden

Der Einfluss von Erkrankung auf die Ausscheidungsraten der 3 β -Hydroxy-5-en-Steroide (insbesondere DHEA-Metabolite) sollte untersucht werden. Dabei sollte geklärt werden, inwieweit unterschiedlich hohe Exkretionsraten der Fetalzonenmetabolite einen Einfluss auf die Schwere der Erkrankung des Frühgeborenen, eine schwere Lungenerkrankung, eine Infektion oder Hirnblutung haben. Insbesondere sollten geschlechtsspezifische Unterschiede berücksichtigt werden.

In unserer Population fanden sich signifikant um den Faktor 1,8-2,2 höhere Exkretionsraten der Fetalzonensteroiden im Urin der männlichen Frühgeborenen gegenüber den weiblichen am dritten und tendenziell am zweiten Lebenstag.

Es zeigte sich kein statistischer Zusammenhang zwischen den maximalen Exkretionsraten der Fetalzonensteroiden und der Schwere der neonatalen Erkrankung oder dem Auftreten einer Infektion.

Zur klinischen Bedeutung der postnatal anhaltend hohen Fetalzonenmetabolitspiegel ist insgesamt recht wenig bekannt. Mehrere Arbeiten beschreiben aber übereinstimmend einen hemmenden Effekt der Fetalzonensteroiden auf die Lungenreifung. So wiesen Torday et al.⁵ in vitro eine Hemmung der Surfactantsynthese in kultiviertem fetalem Lungengewebe durch Androgene nach. Auch in vivo konnte durch Nielsen et al.⁶ eine verzögerte Lungenreifung in Folge gestörter Surfactantsynthese durch Androgene gezeigt werden. Die Inzidenz akuter und chronischer pulmonaler Erkrankungen ist bei männlichen Frühgeborenen höher als bei weiblichen Frühgeborenen^{7,8}. Sowohl geschlechtsspezifische Unterschiede in der Konzentration von Androgenen im Plasma^{70,71} als auch im Rezeptorstatus⁷² werden als Ursache dieser geschlechtsgebunden unterschiedlichen Inzidenz diskutiert.

Die männlichen Frühgeborenen in unserer Studie zeigten eine tendenziell, wenn auch nicht statistisch signifikant, höhere Inzidenz eines Atemnotsyndroms mit notwendiger Surfactanttherapie bei 71% gegenüber 47% bei den weiblichen Frühgeborenen ($p = 0,07$). Auch eine Bronchopulmonale Dysplasie ($FiO_2 > 0,21$ am 28. Lebenstag) wurde häufiger bei den männlichen Frühgeborenen diagnostiziert (48% gegenüber 27%; $p = 0,11$). Inwieweit dies mit den erhöhten Fetalzonensteroiden der männlichen Frühgeborenen zusammenhängt, wurde anschließend untersucht.

Die durchgeführte Regressionsanalyse zeigte keinen signifikanten Zusammenhang der Exkretionsraten der Fetalzonensteroiden im Urin mit dem Auftreten einer akuten oder chronischen Lungenerkrankung. Sicherlich sollte dieses Ergebnis unter Berücksichtigung unseres relativ „lungengesunden“ Kollektivs betrachtet werden. Die Gesamtinzidenz eines Atemnotsyndroms war in unserer Population gering, eine chronische Lungenerkrankung im Sinne einer Sauerstofftherapie im Alter von 36

Wochen trat nicht auf. Diesbezüglich mag die Aussagekraft unserer Ergebnisse daher limitiert sein.

Die Bestimmung der Exkretionsraten der Fetalzonensteroiden im 24-Stunden-Sammelurin aus reinen Zellulosewindeln konnte durch unsere Studie als geeignete Methode zur Untersuchung der Aktivität der Fetalzone der Nebennierenrinde beim unreifen Frühgeborenen etabliert werden. Zur genaueren Untersuchung der klinischen Bedeutung der im postnatalen Verlauf anhaltend hohen Fetalzonenmetabolite sollten größere Populationen von Frühgeborenen mittels der beschriebenen Methode untersucht werden⁷³.

6. Zusammenfassung

Hintergrund: Die Funktion der Nebennierenrinde (NNR) ist intrauterin Teil der plazento-fetalen-maternalen Einheit. Fetales DHEAS (Fetalzonensteroid FS) dient als Vorstufe der mütterlichen Östrogensynthese, die Plazenta hingegen liefert Progesteron für die fetale Kortisolsynthese. Die zu frühe Geburt zerstört dieses Zusammenspiel. Klinische Untersuchungen des Steroidhormonstoffwechsels bei sehr unreifen Frühgeborenen (FG) eines Gestationsalters unter 30 Schwangerschaftswochen (SSW) erfordern zuverlässige und wenig- oder nichtinvasive Untersuchungsmethoden.

Fragestellung: Ziel der Studie war zunächst die Entwicklung einer geeigneten noninvasiven Methode zur Untersuchung der NNR-Funktion bei FG unter 30 SSW. Die zwei Hauptfragen lauteten: Findet sich bei unreifen FG eine adäquate adrenale Kortisolproduktion angesichts schwerer neonataler Erkrankung? Haben die postnatal persistierend hohen Konzentrationen der FS eine klinische Bedeutung?

Methoden: Bei FG unter 30 SSW wurden longitudinal die Ausscheidungsraten der adrenalen Steroide als integraler Parameter der Steroidhormonfunktion untersucht. 24-Stunden-Sammelurin (SU) wurde nichtinvasiv in reinen Zellulosewindeln gesammelt und durch hydraulische Extraktion gewonnen. Die Urinsteroidprofile wurden mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) bestimmt.

Ergebnisse: Unsere Sammelmethode besaß Steroidrückgewinnungsraten von 105%. Mediane Ausscheidungsraten der GS im Urin betragen 170-566 µg/kg/d; bzw. 5,1 mg/m²/d am 5. Lebenstag sowie 4,2 mg/m²/d; 4,1 mg/m²/d und 3,7 mg/m²/d in der zweiten; dritten und vierten Lebenswoche. Ein Einfluss von Erkrankung auf die Kortisolproduktionsrate (KPR) ließ sich nicht nachweisen. Bei großer Streuung der KPR waren die höchsten KPR mit einer deutlich erhöhten Hirnblutungsrate assoziiert. Nach dem ersten Lebensmonat fand sich eine inverse Korrelation von Wachstum und KPR. Bis zum fünften Lebensmonat machten die FS 90% der gesamten Steroidausscheidung aus. Im postmenstruellen Verlauf sank ihre Ausscheidungsrate im Alter von 40 Wochen auf das Niveau reifer

Neugeborener ab. Exkretionsraten der FS lagen bei männlichen FG am dritten signifikant und am zweiten Lebenstag im Trend höher als bei weiblichen. Es fand sich kein Zusammenhang zwischen der Schwere der neonatalen Erkrankung, einer Infektion oder Inzidenz eines Atemnotsyndroms und den Ausscheidungsraten der FS.

Schlussfolgerung: Die Gewinnung von 24-Stunden-SU-Proben mit Hilfe von Einmalwindeln in Kombination mit der GC-MS-Steroidprofilbestimmung ist eine zuverlässige nichtinvasive Methode zur Bestimmung der NNR-Aktivität bei FG. Zwar lagen die bestimmten KPR im Bereich derer von Kindern und Erwachsenen. Allerdings fand sich keine krankheitsbedingte Modulation der KPR bei sehr unreifen FG. Niedrige KPR bei kranken FG sagten dabei kein schlechtes Outcome im Vergleich zu kranken FG mit hohen KPR voraus. Letztere waren mit einer deutlich erhöhte Rate von Hirnblutungen verbunden. Die Ergebnisse sprechen damit nicht für eine Hydrokortison-Substitutionstherapie bei kranken FG mit niedriger KPR.

Die Involution der Fetalzone ist abhängig vom postmenstruellen Alter und nicht vom Tag der Geburt. FS machen 90% der Steroidproduktion der NNR bei FG nach der Geburt aus. Es fand sich ein Trend zu höherer postnataler Konzentration der FS bei Jungen. Ob dies die ebenfalls im Trend höhere Inzidenz pulmonaler Erkrankung bei männlichen FG über eine Hemmung der Surfactantproduktion erklärt, muss Gegenstand zukünftiger Untersuchungen zur klinisch Bedeutung der postnatal persistierend hohen Konzentration der FS bei FG sein.

6.1 Abstract

Background: Preterm birth means a complete change of regulation mechanisms and demands of hormone balance of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. During fetal life dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS), produced in the fetal adrenal cortex, is the main substrate for placental synthesis of estrogens, while placental progesterone is needed as substrate of fetal synthesis of cortisol. Preterm birth gives a limit to this interaction. To determine steroid metabolism in fragile preterm infants with a gestational age of less than 30 weeks reliable and noninvasive methods are needed.

Objective: The aim of this prospective study was to develop a practical, reliable and noninvasive method to determine adrenal cortical function in preterm infants with a gestational age of less than 30 weeks: 1. to investigate the adrenal stress response (cortisol production rates) in preterm infants during early life with extreme illness. 2. to investigate the clinical significance of persistent high levels of fetal zone steroids.

Methods: Urinary excretion rates of adrenal steroids were determined as a parameter for adrenal cortical function in preterm infants with a gestational age of less than 30 weeks in a longitudinal observation. 24-hour urinary specimens were collected in disposable nappies composed of pure cellulose and extracted by hydraulic press. Steroid metabolites were profiled by gas chromatography-mass spectrometry.

Results: Our urine collection procedure showed recovery of steroids of 105%. Median urinary excretion rates of glucocorticoid steroids remained between 170-566 μ g/kg/d, respectively 5,1mg/m²/d at the fifth day of life and 4,2 mg/m²/d, 4,1 mg/m²/d and 3,7 mg/m²/d in the second, third and fourth week of life. The severity of illness had no significant influence on the cortisol production rate. High cortisol production rates were associated with a significantly higher incidence of cerebral bleeding. After the first month of life there was an inverse correlation of growth and cortisol production rates. Excretion rates of fetal zone steroids comprised more than 90% of total urinary steroid excretion until the fifth month of life. Plotted by postmenstrual age there was a continuous decrease of

excretion rates of fetal zone steroids, approaching those of term infants by 40 weeks of postmenstrual age. Excretion rates of fetal zone steroids were significantly higher for male preterm infants than for female at the third day of life, but regression analysis did not reveal a significant influence of maximum excretion rates of fetal zone steroids or gender on the incidence of respiratory distress syndrome treated with surfactant, infection or severity of neonatal illness.

Conclusions: 24-hour urinary collection using disposable nappies in combination with gas chromatography-mass spectrometry steroid profiling proved to be a reliable, noninvasive, non-stressful procedure to assess adrenal cortical function in preterm infants. An immature adrenal stress response to critical illness was found because severity of illness did not have a significant influence on cortisol production rates in preterm infants. However, low cortisol production rates in ill infants were not associated with a worse outcome of those children, but highest cortisol production rates were associated with a significantly higher incidence of cerebral bleeding. Logically consistent these results do not support glucocorticoid substitution therapy for ill preterm infants with low cortisol production rates. Involution of the fetal adrenal cortex depends on gestational age rather than the day of birth. Fetal zone steroids comprise more than 90% of total urinary steroid excretion in preterm infants. Excretion rates of fetal zone steroids were by trend higher in male preterm infants than in female. To determine how far this might explain the by trend higher incidence of pulmonary disease in male preterm infants further evidence is needed.

7. Anhang

7.1 Definitionen

7.1.1 Atemnotsyndrom

Einteilung des Atemnotsyndroms nach Schweregraden^{37,74}

- Grad 1: Schleierige Lungeneintrübung mit retikulogranulärer Lungenstruktur, bedingt durch variable Atelektasen der Alveolarsäcke und Überblähung der Ductuli alveolares und der Bronchioli terminales
- Grad 2: Zusätzlich Aerobronchogramm, welches die Herzgrenzen überschreitet, bedingt durch Atelektasen entlang der Bronchien, so dass deren Wände verdickt erscheinen und strahlendurchlässig werden. Somit wird Luft in den Bronchien auf dem Röntgenbild erkennbar.
- Grad 3: Zusätzlich Verschwimmen der Lungen-Zwerchfell- und der Herz-Lungengrenze, bedingt durch ausgedehnte Atelektasen
- Grad 4: Totale homogene Verschattung beider unbelüfteter Lungen, so genannte „weiße Lunge“

7.1.2 Bronchopulmonale Dysplasie

Bronchopulmonale Dysplasie nach Bancalari bedeutet einen Sauerstoffbedarf von $FiO_2 > 0,21$ am 28. Lebenstag⁴⁴.

7.1.3 Chronic Lung Disease

Als Chronic Lung Disease wird ein anhaltender Sauerstoffbedarf von $FiO_2 > 0,21$ in Folge einer perinatalen Lungenschädigung bei einem postmenstruellen Alter von 36 Wochen bezeichnet⁴⁵.

7.1.4 Harnsterioide bei Frühgeborenen und Neonaten

Die aufgeführten Harnsteroidmetaboliten können sämtlich mittels der in diesem Forschungsvorhaben beschriebenen GC-MS-Analysenmethode in einem einzigen Steroidprofil erfasst werden.

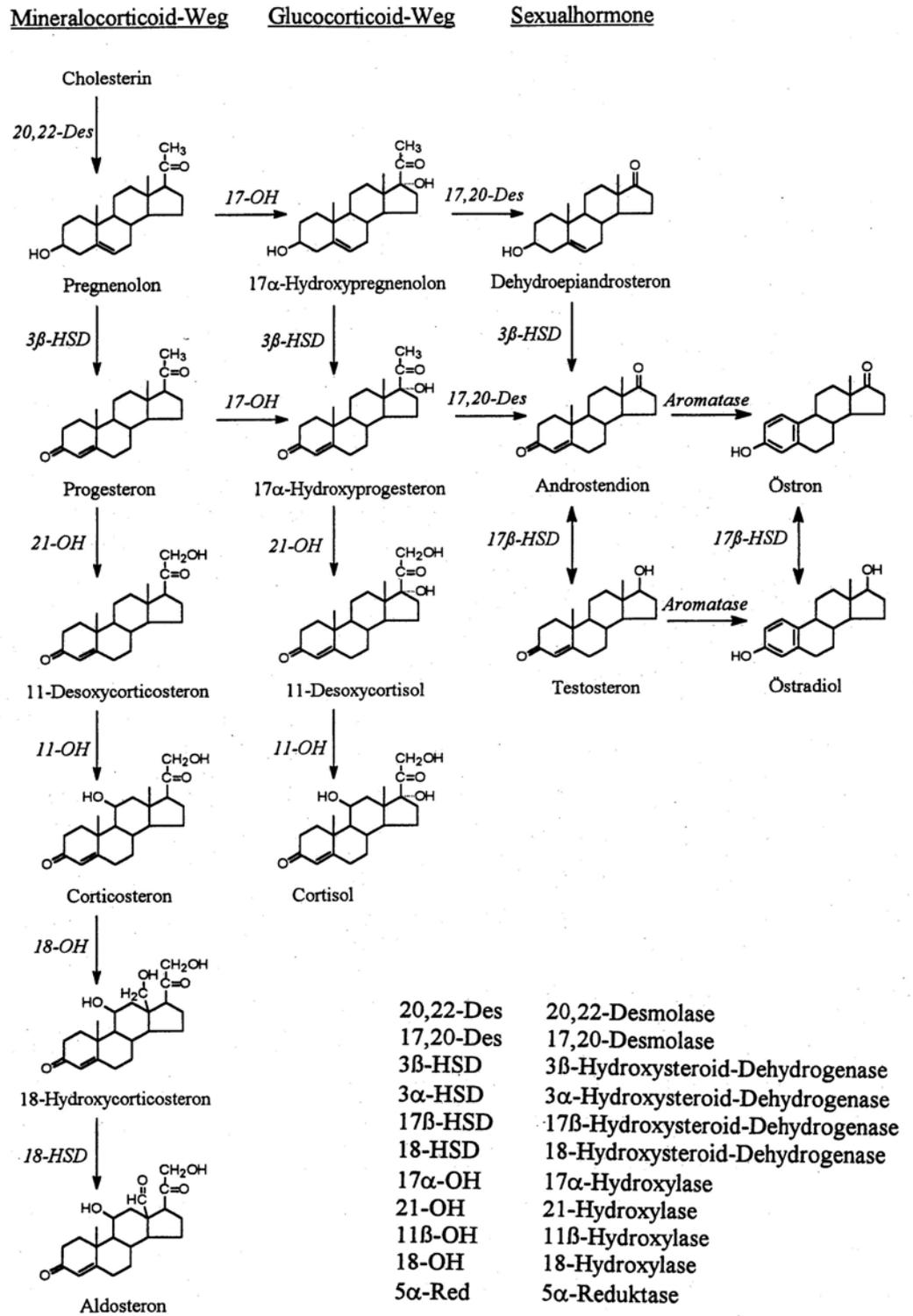
Kortisol-Metabolite (Adultzone):

Trivialname	Abkürzung	Systematische Bezeichnung
Kortisol	F	4-pregnen-11 β ,17,21-triol-3,20-dion
6 β -OH-Cortisol	6 β -OH-F	4-pregnen-6 β ,11 β ,17,21-tetrol-3,20-dion
Tetrahydrokortisol	THF	5 β -pregnan-3 α ,11 β ,17 α ,21-tetrol-20-on
Allo-Tetrahydrokortisol	aTHF	5 α -pregnan-3 α ,11 β ,17 α ,21-tetrol-20-on
Tetrahydrokortison	THE	5 β -pregnan-3 α ,17 α ,21-triol-11,20-dion
1 β -OH-Tetrahydrokortison dion	1 β -OH-THE	5 β -pregnan-1 β ,3 α ,17 α ,21-tetrol-11,20
6 α -OH-Tetrahydrokortison dion	6 α -OH-THE	5 β -pregnan-3 α ,6 α ,17 α ,21-tetrol-11,20-
α -Cortolon	α -CL	5 β -pregnan-3 α ,17 α ,20 α ,21-tetrol-11-on
6 α -OH- α -Cortolon on	6 α -OH- α -CL	5 β -pregnan-3 α ,6 α ,17 α ,20 α ,21-pentol-11-
β -Cortolon	β -CL	5 β -pregnan-3 α ,17 α ,20 β ,21-tetrol-11-on
1 β -OH- β -Cortolon on	1 β -OH- β -CL	5 β -pregnan-1 β ,3 α ,17 α ,20 β ,21-pentol-11-
6 α -OH- β -Cortolon	6 α -OH- β -CL	5 β -pregnan-3 α ,6 α ,17 α ,20 β ,21-pentol-11-on

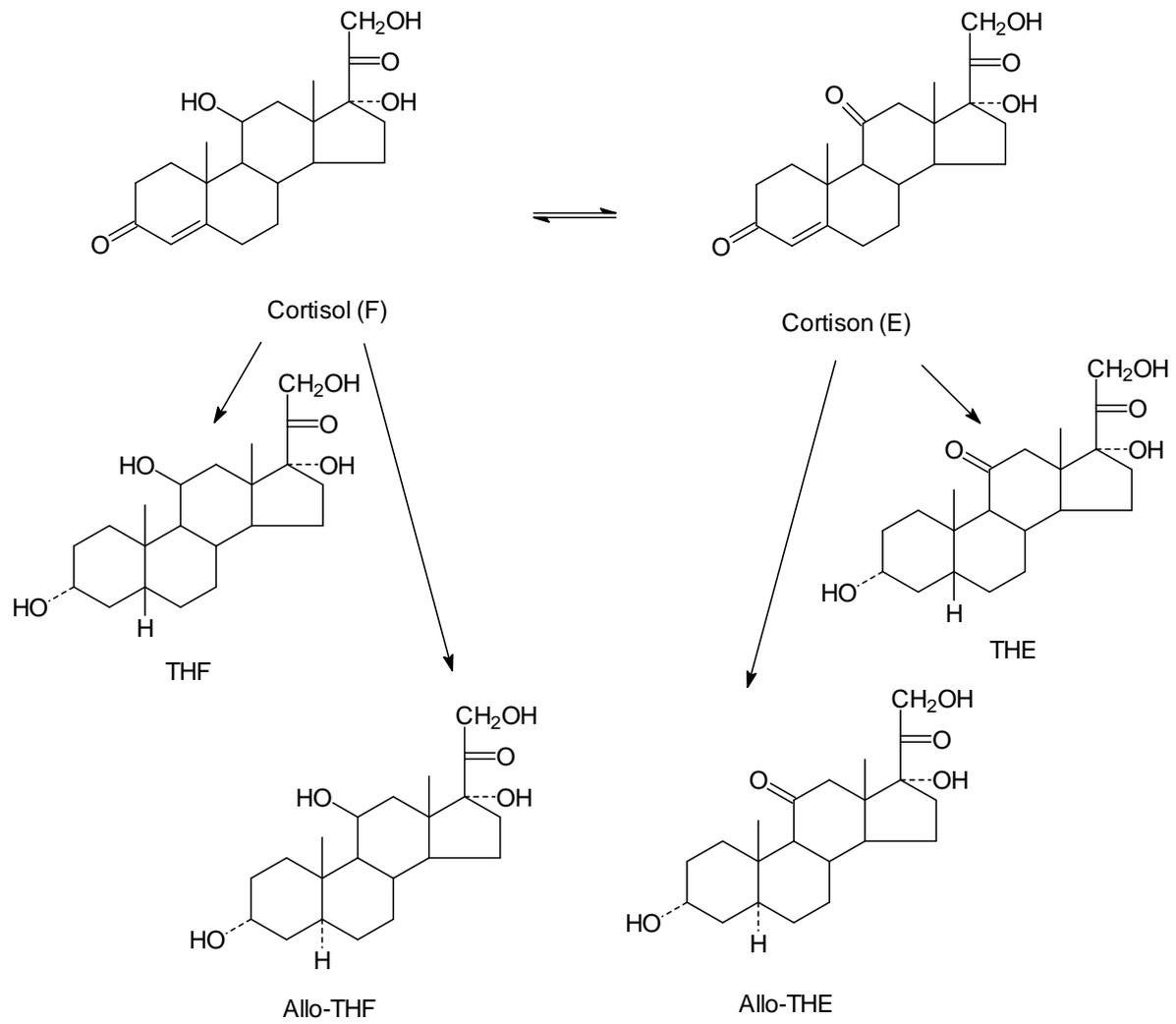
3 β -Hydroxy-5-en-Steroide (Fetalzone):

Trivialname	Abkürzung	Systematische Bezeichnung
5-Androsten-3 β ,17 α -diol	A ⁵ -3 β ,17 α	5-androsten-3 β ,17 α -diol
16 α -OH-Dehydroepiandrosteron	6 α -OH-DHEA	5-androsten-3 β ,16 α -diol-17-on
16 β -OH-Dehydroepiandrosteron	16 β -OH-DHEA	5-androsten-3 β ,16 β -diol-17-on
Androstetriol-16 α	A ⁵ T-16 α	5-androsten-3 β ,16 α ,17 β -triol
Androstetriol-16 β	A ⁵ T-16 β	5-androsten-3 β ,16 β ,17 β -triol
15 β ,16 α -OH-Dehydroepiandrosteron	15 β ,16 α -OH-DHEA	5-androsten-3 β ,15 β ,16 α -triol-17-on
16-O-Androstendiol	16-O-A ⁵ D	5-androsten-3 β ,17 β -diol-16-on
16 α ,18-OH-Dehydroepiandrosteron	16 α ,18-OH-DHEA	5-androsten-3 β ,16 α ,18-triol-17-on
15 β ,17 α -OH-Pregnenolon	15 β ,17 α -OH-P ⁵ -olon	5-pregnen-3 β ,15 β ,17 α -triol-20-on
16 α -OH-Pregnenolon	16 α -OH-P ⁵ -olon	5-pregnen-3 β ,16 α -diol-20-on
Androstentetrole	A ⁵ -tetrole	5-androsten-3 β ,16 α ,17 β ,18-tetrol
		5-androsten-3 β ,15 β ,16 α ,17 β -tetrol
15 β -OH-Pregnentetrol	15 β -OH-P ⁵ -tetrol	5-pregnen-3 β ,15 β ,17 α ,20 α -tetrol
21-OH-Pregnenolon	P5-3 β ,20 α ,21-triol	5-pregnen-3 β ,20 α ,21-triol

7.2 Schema der Steroidbiosynthese

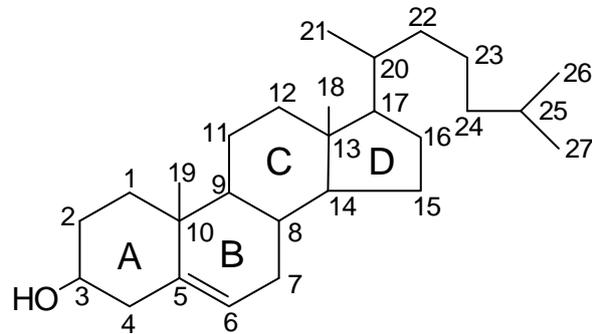


7.3 Abbau von Kortisol und Kortison im adulten Steroidstoffwechsel



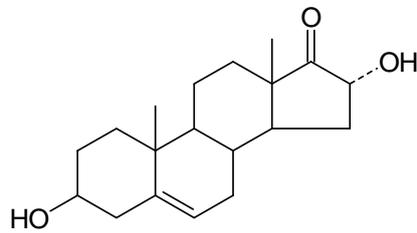
7.4 Wichtigste Vertreter typischer Steroide des fetalen und neonatalen Steroidstoffwechsels

(Abkürzungen siehe. 7.1.4)

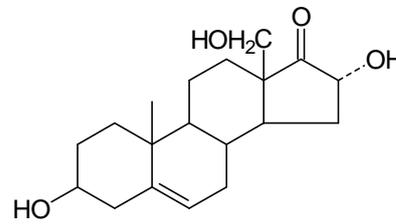


Nummerierung der C-Atome im Steroidgerüst (Cholesterin)

3 β -Hydroxy-5-en-Steroide (Fötalzone der fetalen Nebennierenrinde)

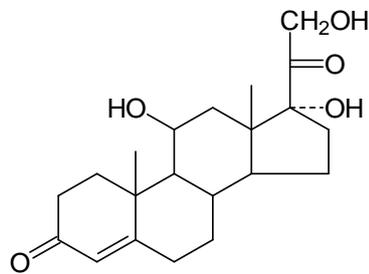


16 α -Hydroxy-DHEA

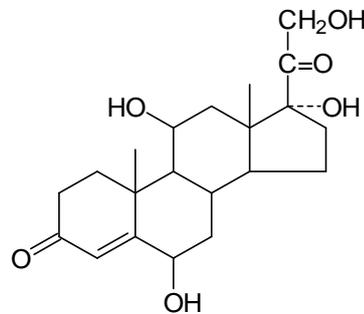


16 α ,18-Dihydroxy-DHEA

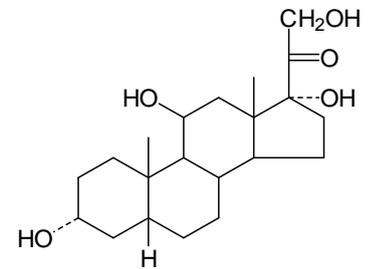
Kortisolmetaboliten (Adultzone)



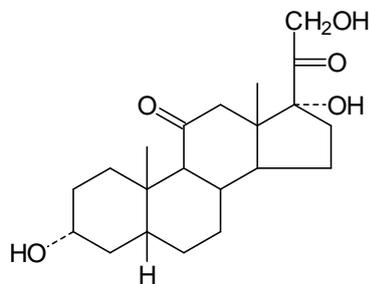
Kortisol (F)



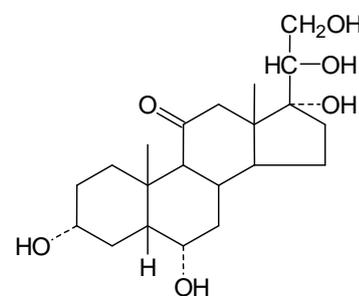
6 β -Hydroxykortisol



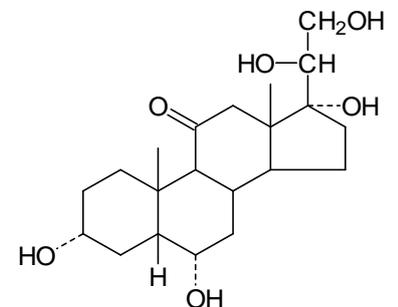
THF



THE



6 α -Hydroxy- α -Cortolon



6 α -Hydroxy- β -Cortolon

7.5 Score for Neonatal Acute Physiology (SNAP)

TABLE 1. Score for Neonatal Acute Physiology

Parameter	1-Point Range	3-Point Range	5-Point Range
Blood pressure (mean), mm Hg			
High	66–80	81–100	>100
Low	30–35	20–29	<20
Heart rate			
High	180–200	201–250	>250
Low	80–90	40–79	<40
Respiratory rate	60–100	>100	...
Temperature, °F	95–96	92–94.9	<92
Po ₂ , mm Hg	50–65	30–50	<30
Po ₂ /Fio ₂ ratio*	2.5–3.5	0.3–2.49	<0.3
Pco ₂ , mm Hg	50–65	66–90	>90
Oxygenation index	0.07–0.20	0.21–0.40	>0.40
Hematocrit, %			
High	66–70	>70	...
Low	30–35	20–29	<20
White blood cell count (× 1000)	2.0–5.0	<2.0	...
Immature total ratio	>0.21
Absolute neutrophil count	500–999	<500	...
Platelet count (× 1000)	30–100	0–29	...
Blood urea nitrogen, mg/dL	40–80	>80	...
Creatinine, mg/dL	1.2–2.4	2.5–4.0	>4.0
Urine output, mL/kg/h	0.5–0.9	0.1–0.49	<0.1
Indirect bilirubin (by birth weight)			
>2 kg: mg/dL ¹	15–20	>20	...
≤2 kg: mg/dL/kg ¹	5–10	>10	...
Direct bilirubin, mg/dL	≥2.0
Sodium, mEq/L			
High	150–160	161–180	>180
Low	120–130	<120	...
Potassium, mEq/L			
High	6.6–7.5	7.6–9.0	>9.0
Low	2.0–2.9	<2.0	...
Calcium (ionized), ² mg/dL			
High	≥1.4
Low	0.8–1.0	<0.8	...
Calcium (total), ² mg/dL			
High	≥12
Low	5.0–6.9	<5.0	...
Glucose (or reagent strip), mg/dL			
High	150–250	>250	...
Low	30–40	<30	...
Serum bicarbonate, mEq/L			
High	≥33
Low	11–15	≤10	...
Serum pH	7.20–7.30	7.10–7.19	<7.10
Seizure	Single	Multiple	...
Apnea	Responsive to stimulation	Unresponsive to stimulation	Complete apnea
Stool guaiac	Positive

Fio₂, fraction of inspired oxygen as a percent.

²Mutually exclusive items.

Originaltabelle aus Richardson et al.²⁴

7.6 Elterninformation zur Studie

Elterninformation zur Studie „Ontogenese und krankheitsbedingte Modulation der Urinsteroidexkretion bei Frühgeborenen“

Liebe Eltern,
die Nebenniere ist ein kleines aber sehr wichtiges Organ. Sie produziert das lebenswichtige Hormon Cortisol. Cortisol braucht unser Körper, um mit Streß durch Krankheit oder Operation fertig zu werden. Ein Mangel an Cortisol im Streß kann sogar lebensgefährlich sein. In der Medizin herrscht zur Zeit Unsicherheit darüber, ob Frühgeborene ausreichend Cortisol im Streß produzieren. Zusätzlich erfährt die Nebenniere in den ersten Lebensmonaten einen erheblichen Umbau, der sie auf ihre Funktionen für das Leben außerhalb der Mutter vorbereitet. Auch dieser Prozeß ist vor allem beim Frühgeborenen nicht endgültig untersucht.

Uns stehen heute moderne Methoden zur Verfügung, die Funktion der Nebenniere im Urin sehr genau zu messen. Wir hoffen damit Klarheit in die erwähnten Fragen zu bringen und vor allem die Kinder herauszufinden, die bei Streß zu wenig Cortisol produzieren. Dazu benötigen wir nur die Windeln Ihres Kindes, aus denen wir den Urin gewinnen können. Ihrem Kind entstehen also aus dieser Untersuchung keinerlei Belastungen.

Um schnell herauszufinden, ob ein Frühgeborenes zu wenig Cortisol produziert, wäre eine Messung aus dem Blut praktisch. Wir wissen jedoch nicht, ob dies den Ausscheidungsraten im Urin entspricht. Dafür wollen wir an 4 Tagen Cortisol auch im Blut messen. Diese Untersuchungen aus einer sehr geringen Menge Blut werden immer mit einer sowieso nötigen Routineblutentnahme kombiniert, um ihrem Kind eine Blutentnahme nur für eine Studie zu ersparen. In vielen Fällen kann das Blut über einen schon liegenden Katheter schmerzfrei gewonnen werden. Der Blutverlust ist gering und beträgt maximal 1,6 ml. Sämtliche Untersuchungen erfolgen anonym. Wann immer Sie Bedenken oder Fragen haben, sprechen Sie uns an. Sie können das heute gegebene Einverständnis auch jederzeit zurückziehen, ohne daß Ihrem Kind dadurch ein Nachteil entsteht.

Dr. M. Heckmann

Prof. Dr. L. Gortner

7.7 Schriftliche Einverständniserklärung

EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG ZUR STUDIE "Ontogenese und krankheitsbedingte Modulation der Urinsteroid- exkretion bei Früh- und Neugeborenen"

Name:..... Vorname:.....

Geburtsdatum:.....

Ich bin damit einverstanden, dass mein Kind

1) an der Urinsammelstudie teilnimmt: ja } nein } .

2) an der Cortisolbestimmung im Blut teilnimmt: ja } nein } .

Ich bin schriftlich und mündlich aufgeklärt worden über ihr Ziel, die praktische Durchführung, den zu erwartenden Nutzen, die möglichen Risiken und die mit ihr verbundenen Belastungen.

Ich bin berechtigt, jederzeit ohne Nachteile oder Angabe von Gründen aus der Studie auszuscheiden.

Ich bin darüber informiert worden, daß die erhaltenen Daten den Bestimmungen des Datenschutzgesetzes unterliegen. Ich stimme ihrer Veröffentlichung unter der Voraussetzung zu, daß jeder Bezug zu meiner Person unkenntlich gemacht ist.

Ich bin damit einverstanden, daß die im Rahmen der Studie erhobenen Daten aufgezeichnet, von einem zur Verschwiegenheit verpflichteten Mitarbeiter oder Beauftragten der fördernden Einrichtung eingesehen bzw. abgefragt und in anonymisierter Form an die zuständige Überwachungsbehörde oder die zuständige Bundesoberbehörde weitergegeben, wissenschaftlich ausgewertet und den gesetzlichen Bestimmungen entsprechend archiviert werden. Mir ist außerdem bekannt, daß in seltenen Ausnahmefällen und nur unter Wahrung meiner Persönlichkeitsrechte eine Weitergabe nicht anonymisierter Daten erforderlich sein kann.

Ich konnte Fragen stellen. Sie wurden zu meiner Zufriedenheit beantwortet.

Ich habe keine weiteren Fragen mehr.

Ich habe eine Kopie der schriftlichen Aufklärung und dieser Einverständniserklärung erhalten.

Ort/Datum

Unterschrift des Patienten / Zeugen / Probanden

.....

Unterschrift des Studienleiters
bzw. seines Stellvertreters

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Flussdiagramm der Methodik zur Bestimmung der Steroidexkretionsraten.....	- 22 -
Abbildung 2: Hydraulische Presse zur Urinextraktion aus Windeln	- 24 -
Abbildung 3: Erhebungsbogen Stammdaten	- 30 -
Abbildung 4: Erhebungsbogen Verlaufsdaten	- 31 -
Abbildung 5: Exkretionsraten der Glukokortikoidmetabolite im postnatalen Verlauf	- 45 -
Abbildung 6: Relative Ausscheidungsraten der Fetalzonensteroiden und Glukokortikoidmetabolite im Urin.....	- 46 -
Abbildung 7: Exkretionsraten der Fetalzonensteroiden postnatal.....	- 47 -
Abbildung 8: Exkretionsraten der Fetalzonensteroiden	- 48 -
Abbildung 9: Postnataler Verlauf der Kortisolproduktionsraten korrigiert für Kreatinin im Urin	- 49 -
Abbildung 10: Postnataler Verlauf SNAP bei kranken und gesunden Frühgeborenen	- 50 -
Abbildung 11: Gewichtsverlauf bei kranken und gesunden Frühgeborenen..	- 51 -
Abbildung 12: Verlauf der Kortisolproduktionsraten korrigiert für Kreatinin im Urin bei gesunden und kranken Frühgeborenen	- 52 -
Abbildung 13: Zeitliche Verteilung der Maximalwerte	- 53 -
Abbildung 14: postnatale Verläufe von SNAP und Kortisolproduktionsraten zweier schwer kranker Frühgeborener	- 56 -
Abbildung 15: Exkretionsraten der Fetalzonensteroiden bei weiblichen und männlichen Frühgeborenen im postnatalen Verlauf	- 58 -

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Perinatale Parameter	- 36 -
Tabelle 2: Häufigkeit neonataler Komplikationen	- 38 -
Tabelle 3: Geschlechtsspezifische perinatale Parameter	- 40 -
Tabelle 4: Rückgewinnung der Glukokortikoidmetabolite	- 41 -
Tabelle 5: Relative Rückgewinnungsraten der Glukokortikoidmetabolite	- 42 -
Tabelle 6: Relative Rückgewinnungsraten der Fetalzonensteroiden	- 44 -
Tabelle 7: Ergebnisse des Wilcoxon-Tests.....	- 50 -
Tabelle 8: Einfluss der Kovariablen auf die maximale Kortisolproduktionsrate	- 54 -
Tabelle 9: Auswirkung einer reifen adrenalen Reaktion	- 57 -
Tabelle 10: Ergebnisse der Regressionsanalyse	- 59 -

10. Literatur

¹ **Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ** 1984 Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev*;5(1):25-44

² **Winter SDW** 1998 Fetal and neonatal adrenocortical physiology. In Polin RA, Fox WW, eds. *Fetal and Neonatal Physiology*. Philadelphia, PA: WB Saunders, 2447-2459

³ **Siiteri PK, MacDonald PC** 1966 Placental estrogen biosynthesis during human pregnancy. *J Endocrinol Metab* 26: 751-761

⁴ **Ng PC** 2000 The fetal and neonatal hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 82(3): F250-4

⁵ **Torday JS** 1990 Androgens delay human fetal lung maturation in vitro. *Endocrinology*126: 3240-3244

⁶ **Nielsen HC** 1992 Testosterone regulation of sex differences in fetal lung development. *Proc Soc Exp Biol Med* 199: 446-452

⁷ **Elsmen E, Hansen Pupp I, Hellstrom-Westas L** 2004 Preterm male infants need more initial respiratory and circulatory support than female infants. *Acta Paediatr* 93: 529-533

⁸ **Torday JS, Nielsen HC, Fencel Mde M, Avery ME** 1981 Sex differences in fetal lung maturation. *Am Rev Respir Dis* 123: 205-208

⁹ **Fleischhauer K, Groscurth P** 1994 Endokrine Drüsen in Benninghoff Anatomie, Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen, Band 2 herausgegeben von Drenckhahn d und Zenker W, 15. Auflage, Urban&Schwarzenberg, 200-208

¹⁰ **Onishi S, Miyazawa G, Nishimura Y, Sugiyama S, Yamakawa T, Inagaki H, et al.** 1983 Postnatal development of circadian rhythm in serum cortisol levels in children. *Pediatrics* 72(3):399-404.

¹¹ **Vermes I, Dohanics J, Toth G, Pongracz J** 1980 Maturation of the circadian rhythm of the adrenocortical functions in human neonates and infants. *Horm Res*12(5):237-44.

- ¹² **Cooper MS, Stewart PM** 2003 Corticosteroid insufficiency in acutely ill patients. *N Engl J Med* 348:727-734
- ¹³ **Mantagos S, Koulouris A, Vagenakis A** 1991 A simple stress test for the evaluation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis during the first 6 months of life. *J Clin Endocrinol Metab* 72:214-216
- ¹⁴ **Okur H, Kucukaydin M, Ustidal KM** 1995 The endocrine and metabolic response to surgical stress in the neonate. *J Pediatr Surg* 30(4):626-5.
- ¹⁵ **Boix-Ochoa J** 1987 Cortisol response to surgical stress in neonates. *Pediatr Surg Int* 2:267-270.
- ¹⁶ **Sapolsky RM, Meaney MJ** 1986 Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res* 396(1):64-76.
- ¹⁷ **Howard E, Benjamins JA** 1975 DNA, ganglioside and sulfatide in brains of rats given corticosterone in infancy, with an estimate of cell loss during development. *Brain Res* 92(1):73-87.
- ¹⁸ **Helbock HJ, Insoft RM, Conte FA** 1993 Glucocorticoid-responsive hypotension in extremely low birth weight newborns. *Pediatrics* 92(5):715-7.
- ¹⁹ **Colasurdo MA, Hanna CE, Gilhooly JT, Reynolds JW** 1989 Hydrocortisone Replacement in Extremely Premature Infants with Cortisol Insufficiency. *Clin Res* 37:180A.
- ²⁰ **Ward MR, Kimura RE, Rich-Denson C** 1991 Addisonian Crisis in Extremely Premature Neonates. *Clin Res* 39:11A.
- ²¹ **Scott SM, Watterberg KL** 1995 Effects of gestational age, postnatal age, and illness on plasma cortisol concentrations in premature infants. *Pediatr Res* 37:112-116
- ²² **Gray JE, Richardson DK, McCormick MC, Workman-Daniels K, Goldmann DA** 1992 Neonatal therapeutic intervention scoring system: a therapy-based severity-of-illness index. *Pediatrics* 90(4):561-7.
- ²³ **Richardson DK, Phibbs CS, Gray JE, McCormick MC, Workman-Daniels K, Goldmann DA** 1993 Birth Weight and Illness Severity: Independent Predictors of Neonatal Mortality. *Pediatrics* 91:969-975

- ²⁴ **RichardsonDK, Gray JE, McCormick MC, Workman K, Goldmann DA** 1993 Score for Neonatal Acute Physiology: a physiologic severity index for neonatal intensive care. *Pediatrics* 91:617-623
- ²⁵ **Heckmann M, Wudy SA, Haack D, Pohlandt F** 2000 Serum cortisol concentrations in ill preterm infants less than 30 weeks gestational age. *Acta Paediatr* 89:1098-1103
- ²⁶ **Heckmann M, Wudy SA, Haack D, Pohlandt F** 1999 Reference range for serum cortisol in well preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 81:F171-F174
- ²⁷ **Homoki J** 1990 Influence of Maternal Antenatal Treatment with Betamethasone on the Postnatal Adrenal Status in Pretrem Infants. Görög S. (edt) *Proceedings of the 4th Symposium on the Analysis of Steroids*. *Academiai Kiado, Budapest* 333-337.
- ²⁸ **Economou G, Andronikou S, Challa A, Cholevas V, Lapatsanis PD** 1993 Cortisol secretion in stressed babies during the neonatal period. *Horm Res* 40(5-6):217-21.
- ²⁹ **Wittekind CA, Arnold JD, Leslie GI, Luttrell B, Jones MP** 1993 Longitudinal study of plasma ACTH and cortisol in very low birth weight infants in the first 8 weeks of life. *Early Hum Dev* 33(3):191-200.
- ³⁰ **Dorr HG, Versmold HT, Sippell WG, Bidlingmaier F, Knorr D** 1986 Antenatal betamethasone therapy: effects on maternal, fetal, and neonatal mineralocorticoids, glucocorticoids, and progestins. *J Pediatr* 108(6):990-3.
- ³¹ **Kraan GP, Dullaart RP, Pratt JJ, Wolthers BG, Drayer NM, De Bruin R** 1998 The daily cortisol production reinvestigates the healthy men. The serum and urinary cortisol production rates are not significantly different. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1247-1252
- ³² **Zadik Z, Amer R, Dolfon Z, Arnon S, Cohen D, Mogilner B, et al.** 1999 Urinary free cortisol (UFC) values in newborns under stress. *J Pediatr Endocrinol Metab* 12(4):543-7.
- ³³ **Midgley PC, Russell K, Oates N, Shaw JC, Honour JW** 1996 Activity of the adrenal fetal zone in preterm infants continues to term. *Endocr Res* 22: 729-733

- ³⁴ **Midgley PC, Russell K, Oates N, Holownia P, Shaw JC, Honour JW** 1998 Adrenal function in preterm infants: ACTH may not be the sole regulator of the fetal zone. *Pediatr Res* 44: 887-893
- ³⁵ **Midgley PC, Holownia P, Smith J, Moore M, Russell K, Oates N, Shaw JC, Honour JW** 2001 Plasma cortisol, cortisone and urinary glucocorticoid metabolites in preterm infants. *Biol Neonate* 79:79-86
- ³⁶ **Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Eilers-Walsmann BL, Lipp R** 1991 New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr* 119:417-23
- ³⁷ **Giedion A, Haefliger H, Dangel P** 1973 Acute pulmonary X-ray changes in hyaline membrane disease treated with artificial ventilation and positive end-expiratory pressure (PEP). *Pediatr Radiol* 1:145-52
- ³⁸ **Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H** 1978 Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *J Pediatr* 92(4):529-34.
- ³⁹ **Caulfield MP, Lynn T, Gottschalk ME, Jones KL, Taylor NF, Malunowicz EM, Shackleton CH, Reitz RE, Fisher DA** 2002 The diagnosis of congenital adrenal hyperplasia in the newborn by gas chromatography/mass spectrometry analysis of random urine specimens. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3682-3690
- ⁴⁰ **Honour JW, Kent J, Shackleton CH** 1983 Improved recoveries in the extraction of steroids from neonatal urine. *Clin Chim Acta* 129:229-232
- ⁴¹ **Voigt M, Schneider KT, Jahrig K** 1996 Analysis of a 1992 birth sample in Germany: New percentile values of the body weight of newborn infants. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 56:550-8
- ⁴² 1984 An international classification of retinopathy of prematurity. The Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity. *Arch Ophthalmol* 102(8):1130-4.
- ⁴³ **Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, Keating JP, Marshall R, Barton L, et al.** 1978 Neonatal necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging. *Ann Surg* 187(1):1-7

- ⁴⁴ **Bancalari E, Abdenour GE, Feller R, Gannon J** 1979
Bronchopulmonary dysplasia: clinical presentation. *J Pediatr* 95(5 Pt 2):819-23
- ⁴⁵ **Shennan AT, Dunn MS, Ohlsson A, Lennox K, Hoskins EM** 1988
Abnormal pulmonary outcomes in premature infants: prediction from oxygen requirement in the neonatal period. *Pediatrics* 82(4):527-32
- ⁴⁶ **Volpe JJ** 1995 *Neurology of the Newborn*. Philadelphia: WB Saunders 314-369
- ⁴⁷ **Wudy SA, Homoki J, Teller WM** 2001 Clinical steroid analysis by gas chromatography-mass spectrometry. In: Niessen WMA (ed) *Current Practice of Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. Marcel Dekker, New York pp 309-339
- ⁴⁸ **Gouyon JB, Sonveau N, d'Athis P, Chaillot B** 1994 Accuracy of urineoutput measurement with regular disposable nappies. *Pediatr Nephrol* 8:88-90
- ⁴⁹ **Ahmad T, Vickers D, Campbell S, Coulthard MG, Pedler S** 1991
Urine collection from disposable nappies. *Lancet* 338:674-676
- ⁵⁰ **Roberts SB, Lucas A** 1985 Measurement of urinary constituents and output using disposable napkins. *Arch Dis Child* 60:1021-1024
- ⁵¹ **Coulthard MG** 1982 Device for continuousurine collectionin the newborn. *Arch Dis Child* 57:322
- ⁵² **Lund RJ, Valman HB, Platt A** 1981 Device for continuousurine collectionin the newborn. *Arch Dis Child* 56:880-882
- ⁵³ **Wilkins BH** 1992 Renal function in sick very low birthweight infants: 2.Urea and creatinine excretion. *Arch Dis Child* 67:1146-1153
- ⁵⁴ **Kerrigan JR, Veldhuis JD, Leyo SA, Iranmanesh A, Rogol AD** 1993
Estimation of daily cortisol production and clearance rates in normal pubertal males by deconvolution analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 76:1505-1510

- ⁵⁵ **Linder BL, Esteban NV, Yergey AL, Winterer JC, Loriaux DL, Cassorla F** 1990 Cortisol production rate in childhood and adolescence. *J Pediatr* 117:892-896
- ⁵⁶ **Arnold J, Leslie G, Bowen J, Watters S, Kreutzmann D, Silink M** 1997 Longitudinal study of plasma cortisol and 17-hydroxyprogesterone in very-low-birth-weight infants during the first 16 weeks of life. *Biol Neonate* 72(3):148-55.
- ⁵⁷ **Esteban NV, Loughlin T, Yergey AL, Zawadzki JK, Booth JD, Winterer JC, Loriaux DL** 1991 Daily cortisol production rate in man determined by stable isotope dilution/ mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 72:39-45
- ⁵⁸ **Jaffe RB, Seron-Ferre M, Crickard K, Koritnik D, Mitchell BF, Huhtaniemi IT** 1981 Regulation and function of the primate fetal adrenal gland and gonad. *Recent Prog Horm Res* 37:41-103
- ⁵⁹ **Walsh SW, Norman RL, Novy MJ** 1979 In utero regulation of rhesus monkey fetal adrenals: effects of dexamethasone, adrenocorticotropin, thyrotropinreleasing hormone, prolactin, human chorionic gonadotropin, and α -melanocyte-stimulating hormone on fetal and maternal plasma steroids. *Endocrinology* 104:1805-1813
- ⁶⁰ **Beitins IZ, Bayard F, Ances IG, Kowarski A, Migeon CJ** 1973 The metabolic clearance rate, blood production, interconversion and transplacental passage of cortisol and cortisone in pregnancy near term. *Pediatr Res* 7:509-519
- ⁶¹ **Gitau R, Fisk NM, Teixeira JM, Cameron A, Glover V** 2001 Fetal hypothalamic-pituitary-adrenal stress response to invasive procedures are independent of maternal responses. *J Clin Endocrinol Metab* 86:104-109
- ⁶² **Nahoul K, Daffos F, Forestier F, Chartier M, Scholler R** 1988 Plasma corticosteroid patterns in the fetus. *J Steroid Biochem* 29:635-640
- ⁶³ **Lamberts SW, Bruining HA, de Jong FH** 1997 Corticosteroid therapy in severe illness. *N Engl J Med* 337:1285-1292

- ⁶⁴ **Watterberg KL, Gerdes JS, Cole CH, Aucott SW, Thilo EH, Mammel MC, Couser RJ, Garland JS, Rozycki HJ, Leach CL, Backstrom C, Shaffer ML** 2004 Prophylaxis of early adrenal insufficiency to prevent bronchopulmonary dysplasia: a multicenter trial. *Pediatrics* 114:1649-1657
- ⁶⁵ **Biswas S, Buffery J, Enoch H, Bland M, Markiewicz M, Walters D** 2003 Pulmonary effects of triiodothyronine (T3) and Hydrocortisone (HC) supplementation in preterm infants less than 30 weeks gestation: results of the THORN trial-thyroid hormone replacement in neonates. *Pediatr Res* 53:48-56
- ⁶⁶ **Aucott SW, Watterberg KL, Shaffer ML, Donohue PK; PROPHET Study Group** 2008 Do cortisol concentrations predict short-term outcomes in extremely low birth weight infants? *Pediatrics*. Oct;122(4):775-81.
- ⁶⁷ **Jobe AH** 2004 Postnatal corticosteroids for preterm infants-do what we say, not what we do. *N Engl J Med* 350:1349-1351
- ⁶⁸ **Reynolds JW** 1966 Excretion of 16-alpha-hydrosteroids by premature infants. *J Clin Endocrinol Metab* 26: 1251-1256
- ⁶⁹ **Wallace AM, Beesley J, Thomson M, Giles CA, Ross AM, Taylor NF** 1987 Adrenal status during the first month of life in mature and premature human infants. *J Endocrinol* 112: 473-480
- ⁷⁰ **Rodriguez A, Viscardi RM, Torday JS** 2001 Fetal androgen exposure inhibits fetal rat lung fibroblast lipid uptake and release. *Exp Lung Res* 27:13-24
- ⁷¹ **Habert R, Picon R** 1984 Testosterone, dihydrotestosterone and estradiol-17 beta levels in maternal and fetal plasma and in fetal testes in the rat. *J Steroid Biochem* 21:193-198
- ⁷² **Wilson CM, McPhaul MJ** 1996 A and B forms of the androgen receptor are expressed in a variety of human tissues. *Mol Cell Endocrinol*120:51-57
- ⁷³ **Merke DP, Stratakis CA** 2006 The adrenal life cycle: the fetal and adult cortex and the remaining questions. *J Pediatr Endocrinol Metab*. Nov;19(11):1299-302.
- ⁷⁴ **Tchou CS, et al.** 1972 Asymmetric distribution of the roentgen pattern in hyaline membrane disease. *J Can Assoc Radiol* 23:85-90

11. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. med. Matthias Heckmann für die Überlassung des Themas, die gute Zusammenarbeit während der Datenerhebung und seine nicht enden wollende Geduld und Unterstützung während der Auswertung und Ausarbeitung der vorliegenden Arbeit. Ohne seine Unterstützung wäre die vorliegende Arbeit in dieser Weise nicht möglich gewesen.

Ich danke den Ärzten und dem Pflegepersonal der neonatologischen Stationen des Zentrums für Kinderheilkunde und Jugendmedizin des Uniklinikums Gießen für die ausdauernde Mitarbeit bei der Probengewinnung. Ebenso danke ich dem Team des Steroidforschungslabors des Zentrums für Kinderheilkunde und Jugendmedizin des Uniklinikums Gießen (Leiter: Prof. Dr. S.A. Wudy) für die gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung der Urinsteroidprofile. Herrn Dr. R.-H. Bödeker (Leiter der Arbeitsgruppe Medizinische Statistik) und Frau C. Scheibelhut danke ich für die statistische Bearbeitung und die ausführlichen Beratungen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mir Ausbildung und Studium ermöglicht haben und mich beharrlich in der Ausarbeitung der Arbeit unterstützt haben. Meinen Freunden danke ich für Geduld und moralische Unterstützung. Mein verbundener Dank gilt meiner Schwester Anne für die wiederholt unermüdliche Korrektur der Arbeit. Und dir Marian, Danke für Alles.