

Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin des Klinikums
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Klinik für Kinderheilkunde III mit Schwerpunkt Pädiatrische Hämatologie
und Onkologie

Kommissarischer Leiter: Priv.-Doz. Dr. med Dirk Schwabe

Etablierung einer exakten Methode zur Messung der Glomerulären Filtrationsrate mit Inulin bei pädiatrisch- onkologischen Patienten

Inaugural Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin der Johann Wolfgang
Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von
Martin Gunkel
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2000

Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin des Klinikums
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Klinik für Kinderheilkunde III mit Schwerpunkt Pädiatrische Hämatologie
und Onkologie

Kommissarischer Leiter: Priv.-Doz. Dr. med Dirk Schwabe

Etablierung einer exakten Methode zur Messung der Glomerulären Filtrationsrate mit Inulin bei pädiatrisch- onkologischen Patienten

Inaugural Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin der Johann Wolfgang
Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von
Martin Gunkel
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2000

Dekan: Prof. Dr. med G. von Jagow
Referent: Priv.-Doz. Dr. med D. Schwabe
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med G. M. Oremek

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2001



Für meine Eltern

Danksagungen

Meinen klinischen und wissenschaftlichen Lehrern Prof. Dr. med B. Kornhuber, Priv.-Doz. Dr. med D. Schwabe und Dr. med H.-P. Grüttner möchte ich an erster Stelle danken. Mit großer Offenheit, Geduld und Toleranz fördern sie Mitarbeiter und neue Projekte, wie auch diese Studie, durch ein Klima der Offenheit und des gegenseitigen Vertrauens. Erst dieses Klima machte die vielen, stets fruchtbar geführten freundschaftlich-kritisch-konstruktiven Diskussionen und die Entwicklung neuer Ideen möglich. Nur durch Sie konnte diese Studie entstehen und wachsen, ohne den notwendigen klinischen Bezug zu verlieren.

Frau Dr. U. Köhl und Herr Dr. E. Rohrbach standen bei allen praktischen Fragen der Laborarbeit immer mit einem offenen Ohr zur Verfügung und haben das Manuskript kritisch durchgesehen.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht, ohne die Studium und Dissertation nicht möglich gewesen wären.

Herrn PD Dr. med E. Solem ist zu danken für seine Hilfe bei der Automatisierung der Inulinbestimmung.

Bei den an der Studie beteiligten Kindern und deren Eltern möchte ich mich besonders bedanken, da ohne ihre Mithilfe diese Arbeit nicht durchführbar gewesen wäre.

Die vorliegende Arbeit wurde von der Hilfe für krebskranke Kinder Frankfurt e.V¹. und von der Arthur und Margarete Ebert-Stiftung und der Dr. Paul und Cilli Weill Stiftung finanziell großzügig unterstützt, wofür ich mich an dieser Stelle ebenfalls sehr herzlich bedanken möchte.

Im übrigen danke ich Linus Torvalds für Linux² und Donald E. Knuth für T_EX³. Nachdem "Standard Office Software" vor der Komplexität des Textes kapitulieren mußte, hat T_EX völlig problemlos gearbeitet. Hätte ich von Anfang an T_EX zum Schreiben verwendet, hätte sich viel Zeit einsparen lassen.

¹ <http://www.hfkk.de>

² <http://www.suse.de>

³ <http://www.dante.de>

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | Einleitung | 12 |
| 1.1 | Nephrotoxizität in der Onkologie | 13 |
| 1.2 | Nephrologische Parameter | 14 |
| 1.2.1 | Marker für die GFR Bestimmung | 14 |
| 1.2.2 | Serumkreatinin | 14 |
| 1.2.3 | Kreatinin- und Harnstoffclearance | 14 |
| 1.2.4 | Inulin-clearance | 16 |
| 1.2.4.1 | Infusionstechnik mit steady state ("klassische Infusionstechnik") | 16 |
| 1.2.4.2 | Inulininfusion mit konstanter Infusionsrate | 18 |
| 1.2.4.3 | Single-Shot Techniken mit Inulin | 19 |
| 1.2.4.4 | Single-Sample Technik mit Inulin | 19 |
| 1.2.5 | Isotopenclearance | 20 |
| 1.2.6 | Marker für den Renalen Plasmafluß (RPF) | 20 |
| 1.2.7 | Marker für die Tubulusfunktionen | 20 |
| 1.3 | Chemie, Physiologie und Laborbestimmung des Inulins aus historischer Sicht | 21 |
| 1.3.1 | Säurehydrolysemethoden | 23 |
| 1.3.2 | Bestimmung mit HPLC | 24 |
| 1.3.3 | Enzymatische Bestimmungsmethoden | 24 |
| 1.4 | Aufgabenstellung | 25 |
| 2 | Probanden, Material, Methoden | 26 |
| 2.1 | Methodik | 26 |
| 2.1.1 | Allgemeines Vorgehen | 26 |
| 2.1.2 | Testprinzip der enzymatischen Inulinbestimmung | 26 |
| 2.1.3 | Bestimmung weiterer nephrologischer Parameter | 28 |
| 2.1.3.1 | Kreatininclearance | 29 |
| 2.1.3.2 | Harnstoff Clearance | 29 |
| 2.2 | Probandenkollektiv | 29 |
| 2.2.1 | Patientenkollektiv der Studie | 32 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.2.2 | Diagnoseverteilung der Probanden und Patienten und Aufteilung auf die Therapiestudien | 33 |
| 2.2.3 | Geschlechtsverteilung im Patienten- und Probandenkollektiv | 33 |
| 2.3 | Material | 34 |
| 2.3.1 | Inulin | 34 |
| 2.3.2 | Citratpuffer | 34 |
| 2.3.3 | Wasserstoffperoxid | 35 |
| 2.3.4 | Inulinase | 35 |
| 2.3.5 | Glucoseoxidase | 35 |
| 2.3.6 | Phosphoglucose-Isomerase | 35 |
| 2.3.7 | Testkit zur D-Glucose- und D-Fructosebestimmung in der Lebensmittelchemie | 35 |
| 2.3.8 | Testkit zur D-Glucosebestimmung in der klinischen Chemie | 36 |
| 2.3.9 | Kodak Ektachem Laborautomat | 36 |
| 2.3.10 | Mitsubishi Super Z 818 | 36 |
| 3 | Ergebnisse | 37 |
| 3.1 | Die Etablierung der enzymatischen Meßmethode für Inulin | 37 |
| 3.2 | Manuelle Inulinbestimmung nach Kühnle | 37 |
| 3.2.1 | Reagenzien | 37 |
| 3.2.2 | Durchführung der Bestimmung: | 38 |
| 3.3 | Manuelle Bestimmung mit Human Glucose Testkit | 38 |
| 3.3.1 | Reagenzien | 39 |
| 3.3.2 | Durchführung der Bestimmung | 39 |
| 3.3.3 | Einfluß der Reaktionstemperatur auf die Reaktionskinetik | 40 |
| 3.4 | Umsetzen der modifizierten Methode auf den Laborautomaten Mitsubishi Super Z | 40 |
| 3.4.1 | Vorinkubation | 41 |
| 3.4.2 | Automatisierte Verarbeitung | 43 |
| 3.4.2.1 | Reaktionskinetik der Fructosebestimmung | 43 |
| 3.4.2.2 | Ermittlung der richtigen Enzymmenge | 44 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.5 | Ermittlung der Konzentration aus der Extinktion | 45 |
| 3.5.1 | Manuelle Kalibrierung mit einer Eichkurve | 45 |
| 3.5.2 | Faktorberechnung | 48 |
| 3.5.2.1 | Faktor für die manuelle Bestimmung nach Kühnle | 48 |
| 3.5.2.2 | Faktor für die manuelle modifizierte Bestimmung mit dem Testkit von Human | 48 |
| 3.5.2.3 | Faktor für die maschinelle Bestimmung am Mitsubishi Super Z 818 | 48 |
| 3.5.2.4 | Automatische Standardkalibration | 50 |
| 3.6 | Validierung - Qualitätskontrolle | 50 |
| 3.6.1 | Vergleich wässriger Lösungen mit dotierten Plasmaproben | 50 |
| 3.6.2 | Standardaddition | 52 |
| 3.6.3 | Haltbarkeit der Reagenzien | 53 |
| 3.6.4 | Haltbarkeit des Inulins in menschlichem Probenmaterial | 55 |
| 3.6.5 | Variabilität von Tag zu Tag | 56 |
| 3.6.5.1 | Variationskoeffizienten und Standardabweichung | 56 |
| 3.6.6 | Störquellen | 60 |
| 3.6.6.1 | Blutglucose | 60 |
| 3.6.6.2 | Phosphoglucose-Isomerase i.S. | 60 |
| 3.6.6.3 | Hämolytische Seren | 61 |
| 3.6.6.4 | Lipämische Seren | 62 |
| 3.6.6.5 | Ikterische Seren | 62 |
| 3.6.6.6 | Antikoagulanzen | 64 |
| 3.7 | Aufwand im Labor | 67 |
| 3.8 | Kosten | 68 |
| 3.9 | Durchführung der Single-Shot Clearance | 68 |
| 3.9.1 | Inulinapplikation | 68 |
| 3.9.2 | Probengewinnung | 69 |
| 3.9.3 | Weiterverarbeitung | 70 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 3.10 | Berechnung der Single Shot Clearance | 72 |
| 3.10.1 | Berechnung unter alleiniger Berücksichtigung des 1-Kompartiment-Modells | 74 |
| 3.10.2 | Berechnung der Plasmaclearance für das 2-Kompartiment-Modell | 77 |
| 3.10.3 | Berechnung mit MS Excel | 78 |
| 3.10.4 | Berechnung über das World-Wide-Web auf www.zki.uni-frankfurt.de | 80 |
| 3.10.4.1 | Der Code von <code>single-shot.pl</code> | 84 |
| 3.11 | Durchführung der Single Sample Clearance | 89 |
| 3.11.1 | Inulinapplikation, Probengewinnung, Weiterverarbeitung | 90 |
| 3.11.2 | Berechnung der Single Sample Clearance mit einem QBASIC Programm unter DOS | 90 |
| 3.11.3 | Berechnung über das World-Wide-Web auf www.zki.uni-frankfurt.de | 91 |
| 3.12 | Versuche mit der klassischen Infusionstechnik | 97 |
| 3.13 | Ergebnisse der Clearances | 100 |
| 3.13.1 | Präzision der Single-Shot Clearance | 100 |
| 3.13.2 | Ergebnisse der Clearances | 100 |
| 3.13.3 | Statistische Auswertung der Ergebnisse | 104 |
| 3.14 | Aufwand der Durchführung der Single-Shot Clearance am Krankenbett, Erfahrungen mit Patienten und Eltern | 113 |
| 4 | Diskussion | 117 |
| 4.1 | Inulin-Bestimmung | 117 |
| 4.2 | Durchführung der Clearances | 119 |
| 4.2.1 | Single-Shot Inulin-clearance | 119 |
| 4.2.2 | Single-Sample Clearance nach Schumann | 122 |
| 4.2.3 | Kreatinin- und Harnstoffclearance | 123 |
| 4.2.3.1 | Urinsammlung | 124 |
| 4.2.4 | Neumeyer'sche Abschätzung der GFR | 125 |
| 4.2.5 | Akzeptanz bei Eltern und Patienten | 125 |
| 4.2.6 | Verträglichkeit von Inutest | 126 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 4.3 | Kritische Wertung der Single-Shot Inulin-clearance | 126 |
| 5 | Literaturverzeichnis | 128 |
| 6 | Abkürzungsverzeichnis | 136 |
| 7 | Lebenslauf | 142 |
| 8 | Ehrenwörtliche Erklärung | 143 |

1 Einleitung

Die etwa 2,5 Millionen Glomeruli der menschlichen Nieren filtrieren täglich etwa 170 Liter Plasma. Die Nierenfunktion ist entscheidend abhängig von der Güte des glomerulären Filters.

Die Glomeruläre Filtrationsrate kann mit Hilfe verschiedener Markersubstanzen bestimmt werden. Diese müssen in den Glomeruli der Nieren frei filtriert werden, sie dürfen im Tubulus nicht sezerniert oder rückresorbiert werden, sie dürfen nicht verstoffwechselt oder an anderer Stelle ausgeschieden werden und sie müssen stabil und nicht toxisch sein.

Inulin ist eine Substanz, die vielen Pflanzen als Energiespeicher dient. Sie kommt im menschlichen Organismus nicht vor. In der Diagnostik von Nierenerkrankungen eignet sie sich besonders zur Prüfung der glomerulären Filtrationsrate (GFR).

1934 und 1935 berichteten Richards und Shannon erstmals über Versuche mit Inulin an Tieren. Richards konnte nachweisen, daß Inulin nur durch freie Filtration im Glomerulum ausgeschieden wird und keine Veränderung der filtrierten Menge auf dem Weg durch den Tubulusapparat stattfindet. So kann man mit Inulin ideal die glomeruläre Filtrationsrate bestimmen, da es in den ableitenden Nierentubuli weder rückresorbiert noch sezerniert wird. Inulin wird im Glomerulum frei filtriert und unverändert in den Harn ausgeschieden. Es ist nicht toxisch und fast frei von Nebenwirkungen.

Inulin gilt bis heute als Mittel der Wahl für die exakte Bestimmung der GFR, an dem sich alle anderen und neueren Methoden zur Bestimmung der Filterfunktion der Niere messen lassen müssen.

Allerdings hat sich die Inulinclearance in der Vergangenheit als Nierenfunktionsprüfung nicht so recht durchsetzen können. Die Gründe hierfür waren:

1. Inulin war lange Zeit nur schwer intravenös applizierbar, da die Löslichkeit nur durch Erhitzen erreicht werden konnte.
2. Die Bestimmung des Inulins in Serum und Urin mit der häufig praktizierten Säurehydrolysemethode war sehr aufwendig und störanfällig.
3. Das körpereigene Abbauprodukt Kreatinin konnte ebenfalls zur Bestimmung der GFR verwendet werden, weil seine physiologischen Eigenschaften dem Inulin ähnlich waren. Die Untersuchung der Kreatininclearance war lange Zeit leichter durchführbar.

Seit 1972 (Ladegaard-Petersen) werden Single-Shot Clearances nicht nur für Inulin beschrieben. Dies war eine neue Methode, bei der der Marker einmalig intravenös appliziert wird und durch die Aufnahme einer Konzentrations-Zeit-Kurve im Serum die Clearance berechnet wird. Die Übereinstimmung der Single-Shot Clearance mit Inulin mit der klassischen Infusionstechnik mit Inulin ist breit belegt (Ladegaard-Petersen, 1972; Broberger, 1973; Fawer, 1979; Coulthardt, 1983; Bäcklund, 1983; Freestone, 1985; Gretz, 1990; Prescott, 1991).

1992 beschrieb Kühnle dann eine vollenzymatische Bestimmungsmethode für Inulin. Sie war viel einfacher durchzuführen und eröffnete der Diagnostik der GFR in Verbindung mit der Single-Shot Technik neue Perspektiven.

1.1 Nephrotoxizität in der Onkologie

Bei der heutigen Therapie von Tumoren und Leukämien werden Chemotherapeutika in Kombinationstherapien eingesetzt. Dabei kann die Funktion der Organe, die die Zytostatika ausscheiden, durch die Chemotherapie negativ beeinflusst werden. So können Leber- und Nierenfunktion durch akute oder chronische Toxizität der Zytostatika eingeschränkt werden. Es können therapiebedingte Schäden auftreten, die die Behandlungsmöglichkeit mit Zytostatika einschränken. Es ist wichtig, die Funktion der Organe regelmäßig vor, während und nach der Therapie zu überprüfen, um rechtzeitig therapiebedingte Schäden erfassen und darauf reagieren zu können.

Die Behandlungsergebnisse der in der pädiatrischen Onkologie üblichen multizentrischen Therapieoptimierungsstudien legen teilweise Dosissteigerungen der Zytostatika bis in den Grenzbereich der Organtoxizität nahe. Damit kann unter Umständen die Prognose der Patienten verbessert werden. Gleichzeitig können aber auch Organschäden auftreten, die die Ausscheidung der Chemotherapeutika herabsetzen und durch Kumulation ihre Toxizität noch erhöhen. Hierdurch kann die Ausscheidung eines Medikamentes noch weiter verschlechtert werden, was zu weiter gesteigerter Toxizität führt. Dieser Kreis kann, sofern die Wirkung nicht z.B. wie bei Methotrexat mit Folsäure antagonisiert werden kann, dann unter Umständen nur durch Reduktion oder Absetzen des Zytostatikums durchbrochen werden.

Jedoch führen Dosisreduktionen auch zu verminderter antitumoraler Wirksamkeit der Therapie. Die Prognose des Patienten ist dann möglicherweise schlechter.

Daher ist es wichtig, zu jedem Zeitpunkt der Therapie genaue Anhaltspunkte über die Funktionsfähigkeit der ausscheidenden Organe zu erhalten. Die onkologische Therapie benötigt deshalb exakte, unbestechliche Methoden zur Funktionsmessung der ausscheidenden Organe.

1.2 Nephrologische Parameter

1.2.1 Marker für die GFR Bestimmung

Mit dem Begriff der Glomerulären Filtrationsrate (GFR) wird diejenige Menge an Ultrafiltrat bezeichnet, die von den Glomeruli der Nieren pro Minute gebildet wird. Die GFR ist nicht als konstanter Wert anzusehen, sie unterliegt tageszeitlichen und ernährungsabhängigen Schwankungen. Die GFR läßt sich mit Hilfe einer Indikatorsubstanz nach dem Fick'schen Prinzip bestimmen. Die Indikatorsubstanz muß frei glomerulär filtriert werden, darf im Tubulssystem nicht rückresorbiert, sezerniert, metabolisiert oder synthetisiert werden. Sie darf außerdem nicht toxisch sein. Mit Ausnahme des Inulins erfüllt keiner der heute gebräuchlichen Marker diese Kriterien ideal.

1.2.2 Serumkreatinin

Kreatinin ist ein Abfallprodukt des Muskelstoffwechsels. Es entsteht beim Abbau von Kreatinphosphat, das im Muskel ähnlich dem ATP der Bereitstellung von Energieäquivalenten dient. Die Bestimmung des Serumkreatinins ist für die Nierenfunktion nur eine Screeningmethode, da ein Anstieg des Kreatinins im Serum erst dann erfolgt, wenn die glomeruläre Filtrationsrate bereits über 50% eingeschränkt ist. Den Kreatinin-blinden Bereich zeigt Abbildung 1.

Der Kreatininwert im Serum ist daher ungeeignet, um Veränderungen der Nierenfunktion frühzeitig zu erfassen. Eine genauere Bewertung ist mittels Nomogrammen und Alter, Größe und Geschlecht möglich, doch wird die Validität von vielen Autoren abgelehnt (Reubi, 1982)

1.2.3 Kreatinin- und Harnstoffclearance

Kreatinin wird über die Niere mittels glomerulärer Filtration und tubulärer Sekretion ausgeschieden. Der Anteil sezernierten Kreatinins an der gesamten ausgeschiedenen Menge ist bereits unter Normalbedingungen ein Störfaktor. Bei eingeschränkter GFR mit erhöhten Serumkreatininwerten steigt der Anteil des sezernierten Kreatinins weiter an.

Die Aussagekraft der Kreatinin- und Harnstoffclearance hängt außerdem sehr von einer zuverlässigen Urinsammlung ab. Diese ist in der Pädiatrie oft nur schwer zu gewährleisten. Die Urinsammlung stellt eine große Fehlerquelle in der Nierenfunktionsdiagnostik dar, besonders bei kleinen Kindern.

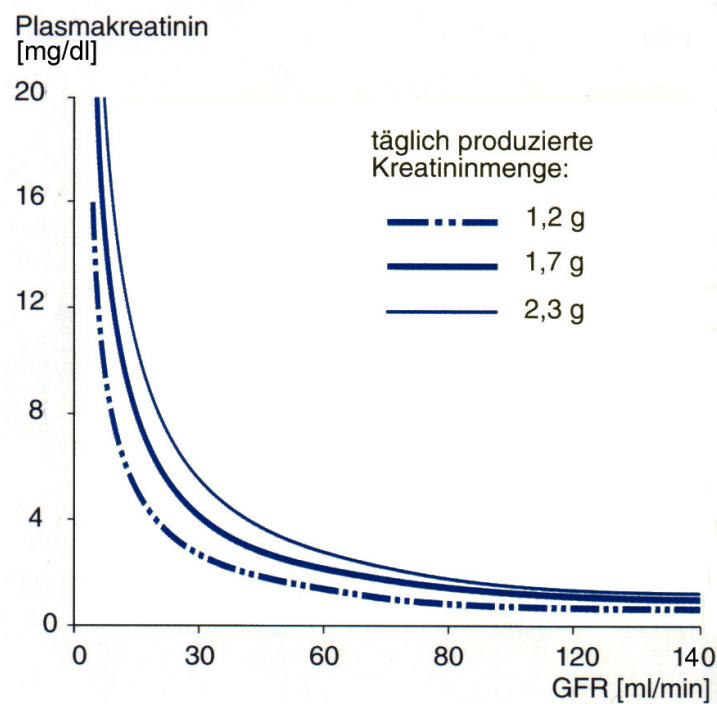


Fig. 1: Kreatinin-blinder Bereich von 60-120 ml/ $\frac{ml}{min \cdot 1,73m^2KOF}$ (aus: Deetjen, 1992)

Die Bestimmung der Kreatininclearance ist zwar einfach, weil kein Pharmakon zugeführt werden muß, aber aus obigen Gründen ungenau. Neumayer (1989) beschreibt Fehlschätzungen der Kreatininclearance zur GFR zwischen 30-100%

Die Berechnung der Kreatininclearance erfolgt nach der Formel (Erläuterung der Koeffizienten aller Formeln siehe Abkürzungsverzeichnis, Seite 136):

$$Cl_{Krea} = \frac{C_{Urin}}{C_{Plasma}} \cdot UZV \quad (1)$$

Die Referenzbereiche für die Kreatininclearance bei Erwachsenen werden von Poggitsch (1994) für Männer von 97-140 ml/min/1,73 m² Körperoberfläche (KOF) und für Frauen von 85-125 ml/min/1,73 m² KOF angegeben.

Harnstoff wird als kleines Molekül ebenfalls glomerulär frei filtriert, aber aufgrund seiner hervorragenden Diffusionsfähigkeit durch biologische Membranen zu 1/3 bis 2/3 - je nach Grad der Diurese - im Tubulus wieder resorbiert. Die Werte der Harnstoffclearance liegen daher theoretisch immer unter denjenigen der Kreatininclearance.

Neumayer (1989) empfiehlt eine mathematische Korrektur zur Berechnung der GFR aus Kreatinin- und Harnstoffclearance.

$$GFR = \frac{Cl_{Kreatinin} + Cl_{Harnstoff}}{2} \quad (2)$$

bzw. für Kinder:

$$GFR = \frac{2 \cdot Cl_{Kreatinin} + Cl_{Harnstoff}}{3} \quad (3)$$

1.2.4 Inulinclearance

1.2.4.1 Infusionstechnik mit steady state ("klassische Infusionstechnik") Das Polyfruktosan Inulin, das in Pflanzen als Energiespeicher dient, gilt seit Jahrzehnten als Standardstoff zur Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate. An der Inulinclearance mittels konstantem Plasmaspiegel müssen sich auch heute noch alle anderen Markersubstanzen zur Prüfung der GFR messen lassen. Abbildung 2 zeigt das Prinzip der GFR-Bestimmung mit Inulin.

Es ist bisher kein Marker bekannt, der die geforderten Kriterien zur GFR Prüfung besser erfüllt als Inulin. Es wird frei filtriert, im Nierentubulus

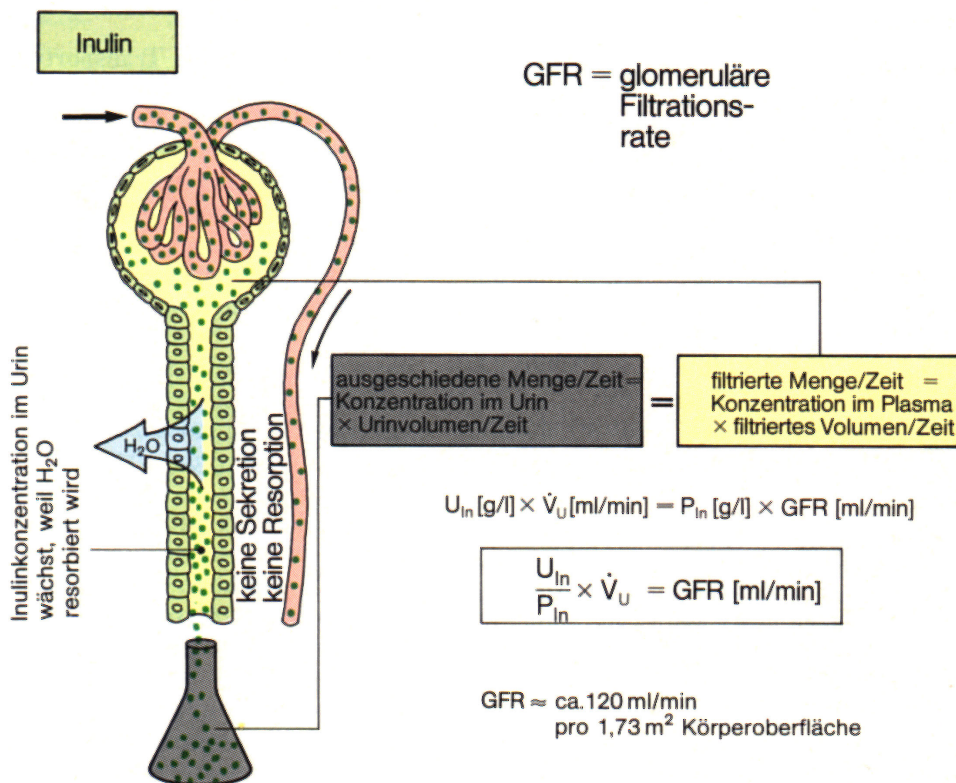


Fig. 2: Die Clearance von Inulin entspricht der Glomerulären Filtrationsrate (aus: Silbernagl, 1991)

nicht resorbiert, nicht sezerniert oder metabolisiert, praktisch nirgends sonst ausgeschieden, ist nicht toxisch und praktisch nebenwirkungsfrei.

In der Routinediagnostik konnte sich die Anwendung von Inulin zur GFR-Prüfung jedoch nie durchsetzen. Hierfür gibt es mehrere Gründe: Die endogene Kreatinin-clearance ließ sich leichter durchführen und ähnlich gut verwenden, wie man dachte. Die etablierten Bestimmungsmethoden, mit der Inulin lange Zeit bestimmt werden mußte, waren störanfällig und unspezifisch. Die Durchführung der klassischen Inulin-clearance, die oft auch als klassische Infusionstechnik bezeichnet wird, ist zeit- und personalaufwendig.

Diese klassische Inulin-clearance erfordert eine einmalige Bolusgabe und dann eine kontinuierliche Dauerinfusion von Inulin, um einen konstanten Plasmaspiegel zu erreichen. Die eigentliche Clearance kann erst begonnen werden, wenn sich ein konstanter Plasmaspiegel des Inulins nach einer Äquilibrationszeit unterschiedlicher Dauer eingestellt hat. Es sind dann mehrere Urinsammelperioden von jeweils 1 oder 2 Stunden und Blutentnahmen zwischen den Blasenentleerungszeitpunkten notwendig. Der Urin muß mittels Katheter gewonnen werden und die Blase am Ende jeder Sammelperiode retrograd mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gespült werden, um Sammelfehler so gering wie möglich zu halten. Die Clearance berechnet sich dann nach der Formel

$$Cl_{Inulin} = \frac{C_{Inulin(Urin)} \cdot UZV}{C_{Inulin(Plasma)}} \quad (4)$$

Die klassische Inulin-clearance bedient sich genau des gleichen Prinzips wie die Kreatinin-clearance. Der fehlerbehaftete Prozeß der Urinsammlung bleibt also bestehen. Die Äquilibrationszeit, um bei der Inulininfusion einen konstanten Plasmaspiegel zu erreichen, ist nicht konstant, sondern abhängig von der Nierenfunktion. Wird die Clearance zu früh begonnen, so hat sich noch kein konstanter Plasmaspiegel eingestellt und das Ergebnis wird verfälscht.

1.2.4.2 Inulininfusion mit konstanter Infusionsrate Der Ansatz der Clearancebestimmung mit konstanter Infusionsrate nach einer Bolusinjektion benötigt im Gegensatz zur klassischen Infusionstechnik keine Urinsammlung. Die Clearance wird aus der Plasmakonzentration nach einer Äquilibrationszeit und aus der Infusionsrate berechnet. Hierzu dient folgende Formel:

$$Cl = \frac{C_{Inulin-Infusionslg} \cdot v_{Infusion}}{C_{Plasma}} \quad (5)$$

Die Auswahl des Äquilibrierungszeitpunktes und die Infusionsdauer beeinflussen die Präzision der Methode wesentlich. (Neumayer, 1989). Auch diese Methode ist prinzipbedingt aufwendig und störanfällig. Es wird jedoch eine sehr gute Korrelation zur klassischen Inulin-clearance beschrieben, die auch für den pädiatrischen Bereich untersucht wurde.

1.2.4.3 Single-Shot Techniken mit Inulin Bei der Single Shot Inulin-clearance wird das Inulin im Bolus intravenös gespritzt und anschließend durch mehrere Blutentnahmen eine Konzentrations-Zeit-Kurve im Serum erstellt. Aus dieser wird die Clearance berechnet. Die Clearance ergibt sich aus der verabreichten Inulinmenge geteilt durch die Fläche unter der durch die Blutentnahmen bestimmten Konzentrations-Zeit-Kurve.

Bereits 1955 wurde von Sapirstein ein Modell zur Clearanceberechnung entwickelt.

Mit dieser Technik wird nur die Plasma-Clearance für Inulin bestimmt. Diese ist aber aufgrund der physiologischen Eigenschaften nahezu identisch mit der renalen Clearance. (Prescott, 1991) Daher erscheint die Aussage erlaubt, daß die Plasmaclearance in der Praxis identisch ist mit der renalen Clearance, da Inulin fast ausschließlich durch glomeruläre Filtration eliminiert wird. Auf eine explizite Unterscheidung wird aus diesem Grunde verzichtet. Die sehr gute Korrelation der Single Shot Inulin-clearance mit der klassischen Infusionstechnik ist in der Literatur sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern breit belegt (Ladegaard-Pedersen, 1972; Broberger, 1973; Fawer, 1979; Coulthard, 1983; Bäcklund, 1983; Freestone, 1985; Gretz, 1990; Prescott, 1991). Es bestehe allerdings eine Überschätzung der durch die klassische Infusionsmethode gemessenen GFR um 20-25%. Die Blutentnahmen dürfen auch kapillär erfolgen; Müller-Suur fand 1983 eine gute Übereinstimmung von kapillären und venösen Blutproben bei der Single-Shot-Inulin-clearance im Kindesalter.

1.2.4.4 Single-Sample Technik mit Inulin Immer wieder wurden auch Versuche beschrieben, die Single-Shot Clearance noch weiter zu einer Single-Sample Clearance zu vereinfachen, bei der nach Inulininjektion nur eine einzige Blutentnahme durchgeführt werden muß. Hierzu wurden Formeln veröffentlicht (Schumann, 1993), die viele, empirisch gewonnene Angaben voraussetzen und die Unwägbarkeiten für den pädiatrischen Anwendungsbereich beinhalten (Neumayer, 1989). Eine genaue Bestimmung der GFR erscheint hier nicht sicher möglich. Die vorliegende Arbeit wird anhand der gewonnenen Daten diese Formeln überprüfen.

1.2.5 Isotopenclearance

GFR Bestimmungen können auch mit radioaktiv markierten Substanzen, die die Kriterien zur Bestimmung der GFR erfüllen, durchgeführt werden. Die Messung erfolgt szintigraphisch. Es kann sowohl die externe Aktivitätsmessung in einer entnommenen Blutprobe als auch die quantitative Funktionsszintigraphie durchgeführt werden. Mit der szintigraphischen Methode lassen sich für beide Nieren getrennt oder gemeinsam die Clearancewerte ermitteln. Die Präzision dieser Methode unterliegt einer großen Zahl von Faktoren, die von verschiedenen Autoren unterschiedlich bewertet werden (Neumayer, 1989). Sie liegt, so Neumayer, bei normaler oder nur leicht eingeschränkter Nierenfunktion im Rahmen einer Single-Shot Clearance. Über das Verhalten bei fortgeschrittener Niereninsuffizienz liegen noch keine Untersuchungen vor. Wiederholungsuntersuchungen sind wegen der Strahlenbelastung jedoch nicht zu empfehlen (Neumayer, 1989). Marker, die bildgebende Eigenschaften haben, sind ^{99m}Tc -DTPA, ^{51}Cr -EDTA, ^{131}I -DTZ und ^{125}I -Iothalamat. Die Isotopenclearances können nicht am Krankenbett durchgeführt, sondern nur in speziellen, zum Umgang mit radioaktiven Stoffen ausgerüsteten Spezialabteilungen durchgeführt werden. Der hierfür erforderliche Transport ist bei den schwer kranken Patienten der pädiatrischen Onkologie problematisch und manchmal auch nicht durchführbar.

1.2.6 Marker für den Renalen Plasmafluß (RPF)

Referenzsubstanz für die Bestimmung des renalen Plasmaflusses ist Paraaminohippurat (PAH). PAH wird frei im Glomerulum filtriert, im Tubulus sezerniert, jedoch nicht rückresorbiert. Die Klärung des die Niere durchströmenden Plasmas von PAH in einem Durchlauf gelingt nur zu ca. 92%; der mit PAH erhaltene Wert wird daher auch als effektiver renaler Plasmafluß bezeichnet. PAH und seine Derivate Ortho-Jod Hippursäure und Iodopyracetat sind aufwendig zu bestimmen. Iodopyracetat wird extrarenal ausgeschieden und führt so zu Fehlern. o-Jod Hippursäure läßt sich radioaktiv mit ^{123}I und ^{131}I markieren. Dann läßt sich die Ausscheidung szintigraphisch überwachen. Alle diese Methoden führen zu einer Unterschätzung des realen RPF um bis zu 20-25% (Neumayer, 1989)

1.2.7 Marker für die Tubulusfunktionen

Die exkretorischen Leistungen der Niere beruhen nicht nur auf der Funktion des glomerulären Filters, sondern auch auf den komplizierten Regulationsvorgängen des Tubulussystems, die dazu dienen, den Salz-, Wasser-,

Säure-Basen-, Aminosäuren- und Glucosehaushalt zu regulieren. Die Regulation unterliegt nicht nur tageszeitlichen Schwankungen wie die GFR, sondern wird auch wesentlich von den Konzentrationen dieser Stoffe im Plasma bestimmt und ist von der Ernährung abhängig.

Die grobe Beurteilung der Tubulusfunktionen ist durch Messen der fraktionellen Natrium-Rückresorption, der fraktionellen Phosphatrückresorption und der Calcium-Ausscheidung über 24 h im 24 h Sammelurin, Spontanurin und/oder Serum recht einfach und kostengünstig möglich. Abbildung 3 zeigt die Tubulusfunktionen Sekretion und Resorption.

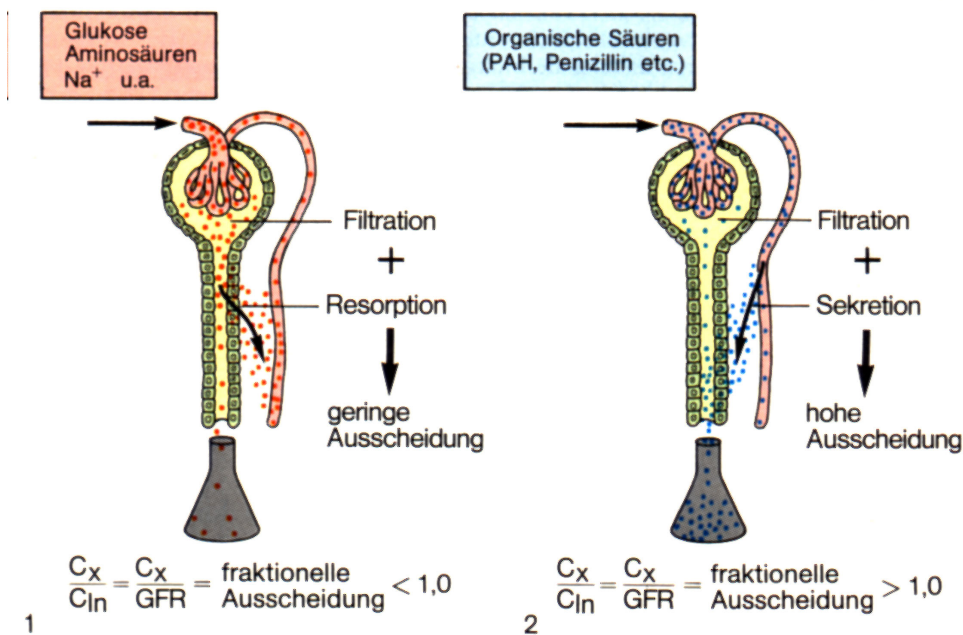


Fig. 3: Die Funktionen des Tubulus stellen durch selektive Sekretion bzw. Resorption einen weiteren wichtigen Teil der Nierenfunktion dar. (Aus Silbernagl, 1991)

Eine Bestimmung der Leitenzyme des tubulären Bürstensaums im Urin ergibt ebenfalls einen Hinweis auf eine gestörte Tubulusfunktion. Die Bestimmung ist bereits etabliert (Scherberich 1983, 1990; Heesen, 1991; Schwabe, 1992) und nicht Gegenstand dieser Arbeit.

1.3 Chemie, Physiologie und Laborbestimmung des Inulins aus historischer Sicht

Inulin ist ein Polysaccharid mit einem Molekulargewicht von ca. 5000 Dalton. Das Inulin-Analogon Sinistrin hat ein Molekulargewicht von 3000 Dal-

ton. Beide Stoffe bestehen aus D-Fruktose-Einheiten Abbildung 4 zeigt die Molekülstrukturen von Sinistrin und Inulin.

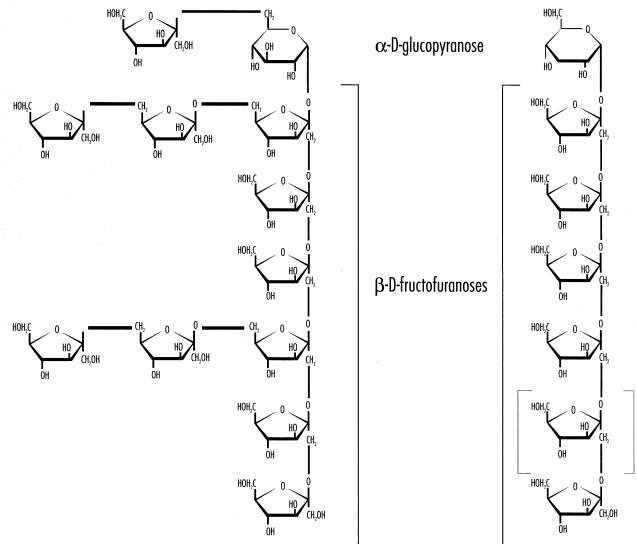


Fig. 4: Struktur von Sinistrin (links) und Inulin (rechts). Abdruck mit freundlicher Genehmigung durch S. Kamoun, Laevosan Gesellschaft, Linz.

Sinistrin, das unter dem Namen Inutest von der Laevosan Gesellschaft in Linz vertrieben wird, unterscheidet sich im Aufbau des Makromoleküls von Inulin. Sinistrin wird aus den Zwiebeln von *Urginea maritima* (L.) Baker gewonnen. Sinistrin hat ein niedrigeres Molekulargewicht und in die Kette eingefügte Fructose-Seitenketten, die die Löslichkeit, Konzentrierbarkeit und Alkalistabilität erhöhen. Daher können für Sinistrin Ampullen geliefert werden, die ohne weitere Vorbereitung zur Injektion bereit sind.

Für "Inulin purissimum pyrogenfrei", das vom gleichen Hersteller geliefert wird, trifft das nicht zu. Die Inulin-Ampulle muß vor der Verabreichung bei 56 °C erhitzt werden, um das Inulin in Lösung zu bringen.

Sinistrin läßt sich auch höher konzentrieren, die Inulinampullen enthalten 10%-ige Inulinlösung, Inutest hingegen 25%. Insbesondere im pädiatrischen Anwendungsbereich kann es vorteilhaft sein, wenn mit dem verabreichten Pharmakon nicht auch noch eine große Menge Flüssigkeit gegeben werden muß.

Sowohl Inulin als auch Sinistrin verhalten sich im Körper inert, werden nicht an Plasmaproteine gebunden, interagieren nicht mit anderen Arzneimitteln und werden fast vollständig renal durch glomeruläre Filtration ausgeschieden.

Inulin und Sinistrin unterscheiden sich in ihren chemischen und pharmakologischen Eigenschaften nicht. Man hat mit Sinistrin (Inutest) eine Möglichkeit gefunden, pharmakologische und chemische Nachteile von Inulin zu eliminieren, ohne an den erwünschten physiologischen Eigenschaften der freien glomerulären Filtration ohne tubuläre Sekretion, Resorption oder Metabolisierung etwas zu ändern.

Da sich die beiden Stoffe physiologisch und bestimmungstechnisch nicht unterscheiden und in der Literatur auch die Inutest-/Sinistrin-Clearance meist schlicht als Inulinclearance bezeichnet wird, wird auch in dieser Arbeit auf eine explizite Unterscheidung verzichtet. In dieser Studie wurde nur von der Laevosan Gesellschaft, Linz unter dem Namen Inutest verkauftes Sinistrin verwendet.

1.3.1 Säurehydrolysemethoden

Die ältesten und am häufigsten angewendeten Methoden der Inulinbestimmung basieren auf der Hydrolyse des Inulins zu Fructose. Hierzu muß die Probe enteiweißt werden. Wird dann die Hexose mit einer starken Säure erhitzt, so bildet sich Hydroximethylfurfural, das in einer Farbreaktion mit Diphenylamin oder Resorcinol einen blauen bzw. roten Farbstoff bildet, der sich photometrisch auswerten läßt. Resorcinol ist weniger Glucose-sensitiv und daher weniger störanfällig.

Alving (1941) und Corcoran (1939) erarbeiteten gleichzeitig eine Methode zur photometrischen Bestimmung von Inulin mittels Diphenylamin, die in der folgenden Zeit von anderen modifiziert wurden (Harrison, 1942; Bojesen, 1952; Kendrick, 1956)

Der Ansatz von Frank (1956) basiert auf einer Bestimmung der reduzierenden Anteile des Zuckers in der Probe. Der hierbei auftretende Störfaktor Glucose kann mittels Hefe vergoren werden (Smith, 1938), oder mittels Glucoseoxidase (Frösch, 1956) entfernt werden. Die Glucose kann durch Autooxidation durch Erhitzen in alkalischem Medium entfernt werden (Little, 1949), oder Inulin kann mittels Calciumhydroxid gefällt werden (Herz, 1947). Auch das Mitführen eines Serum-Leerwertes, der vor der Inulingabe gewonnen wurde, und nachfolgende mathematische oder chemische Korrektur durch Zufügen von äquivalenten Mengen Glucose zur Standardlösung werden beschrieben (Frank, 1956).

Handelsmann (1956) und Young (1954) beschreiben eine Farbreaktion von Fructose mit Anthron. Zur Elimination des Störfaktors Glucose wird der Abbau dieser Hexose in erhitztem alkalischen Medium (Young, 1952), Glucoseabbau mit Invertase (Young, 1970), Vergärung mit Hefe (White, 1954) oder die Durchführung der Reaktion bei einer Temperatur vorgeschlagen, bei der Fructose reagiert, Glucose aber nicht (Handelsmann, 1956).

Ranney beschreibt 1943 eine Farbreaktion mit Reinecke's Ethanol-HCl-Reagenz.

Heyrovsky entwickelte 1956 eine Farbreaktion, die aufgrund einer Verbindung der Fructose mit 3-Indolessigsäure in konzentrierter Salzsäure entsteht.

Levine fand 1959, daß Erhitzen von Inulin mit Vanillin in saurer Lösung eine rote Farbe ergibt.

Steinitz hat 1957 die verschiedenen, auf der Säurehydrolyse beruhenden Verfahren zur Inulinbestimmung verglichen. Seine Untersuchungen ergaben, daß die Heyrovskysche Methode mit 3-Indolessigsäure die zuverlässigste und sicherste ist, da eine starke und stabile Farbbildung vorliegt, die dem Lambert-Beerschen Gesetz gehorcht und die Störfaktoren durch Glucose im Vergleich zu den anderen Verfahren gering sind.

Verschiedene Automatenversionen dieser Bestimmungsmethoden wurden bereits veröffentlicht (Fjeldobo, 1968; Haff, 1968; Wright, 1966). Die Methode von Heyrovsky wurde auf einem Technicon Autoanalyzer adaptiert. Die notwendige Proteinentfernung geschieht in diesem Gerät mittels Dialyse. Inulin wird im Dialysat bestimmt.

1.3.2 Bestimmung mit HPLC

Ruo veröffentlichte 1991 eine Methode zur Inulinbestimmung mit High Pressure Liquid Chromatography, die weniger störanfällig als die Methode der Säurehydrolyse, aber zeitaufwendig ist. Sie erfordert ein großes Probenvolumen und eignet sich daher nicht für die klinische Routine.

1.3.3 Enzymatische Bestimmungsmethoden

Der erste Ansatz einer halbenzymatischen Bestimmungsmethode wurde 1963 von Renschler beschrieben. Der Ansatz basierte auf einer enzymatischen Bestimmung von Fructose, die 1961 von Schmidt publiziert worden war.

Die erste vollenzymatische Methode zur Inulinbestimmung wurde von Irie 1981 beschrieben. Diese Methode war allerdings nicht sehr erfolgreich, da die Reagenzien nur kurze Zeit haltbar waren und die Methode einen nur sehr kleinen linearen Extinktionsbereich hatte, was die Bestimmung durch häufiges Verdünnen der Proben erschwerte und für Ungenauigkeiten sorgte.

Eine weitere enzymatische Methode wurde von Degenaar 1987 publiziert. Delanghe (1991) verbesserte diese Methode durch Glucoseelimination mittels Glucose- Oxidase.

Kühnle (1992) verbesserte die Methode durch Zugabe von Wasserstoffperoxid, was die Oxidation der Glucose durch den in der Lösung freiwerdenden Sauerstoff stark beschleunigte. Die in dieser Arbeit veröffentlichte, enzymatische Bestimmungsmethode, die sich durch eine hohe Spezifität, Sensitivität und leichte Durchführbarkeit auszeichnet, eröffnete der Diagnostik der GFR neue Perspektiven.

Summerfield (1995) veränderte die Methode noch, indem sie entstehende Fructose mit der Sorbit-Dehydrogenase in Sorbitol umwandelt. Hierbei entsteht NADH_2 , das sich photometrisch messen läßt. Diese Methode wurde auch auf einem Cobas FARA II Analysenautomaten installiert.

Soper (1995) veränderte die Methode leicht, indem er höhere Enzymaktivitäten zugab und etablierte die Methode auf einem Cobas Mira.

1.4 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, eine Bestimmungsmethode für die Glomeruläre Filtrationsrate zu finden, die sich nicht nur für wissenschaftliche Fragestellungen eignet, sondern auch in der täglichen Routinediagnostik durchführbar ist. Für pädiatrisch-onkologische Patienten sollte ein spezifisches, sensitives und praktikables Programm erarbeitet werden, das die Nierenfunktion überwacht.

Die Patienten sollten durch die Durchführung einer Clearance möglichst wenig beeinträchtigt werden. Invasive Eingriffe zur GFR Bestimmung sollten, wenn möglich, bei den pädiatrisch-onkologischen Patienten vermieden werden. Die Durchführung der Clearance am Krankenbett sollte einfach sein und auch den durchführenden Arzt möglichst wenig belasten. Die Inulin-clearance sollte eine unzweifelhafte, reproduzierbare Messung der GFR gewährleisten. Es sollte zusätzlich geprüft werden, ob die in der Literatur beschriebene Single-Sample Methode von Schumann bei pädiatrisch-onkologischen Patienten zu verlässlichen Ergebnissen führt, oder ob die Single Shot Clearance mit Plasma-Abklingkurve, deren Übereinstimmung mit der GFR Bestimmung mittels klassischer Infusionstechnik gut belegt ist, durchgeführt werden muß, um zu reproduzierbaren Ergebnissen zu gelangen.

Die Messung der Blutproben im Labor sollte in einem mit der üblichen täglichen Laborroutine belasteten Labor möglich sein. Hierfür sollte die Methode auf einem Analysenautomaten etabliert werden und eine Möglichkeit für Berechnung und Befunddruck gefunden werden.

2 Probanden, Material, Methoden

2.1 Methodik

2.1.1 Allgemeines Vorgehen

Wesentlicher Teil der vorliegenden Arbeit war die Vereinfachung der bisherigen Methode der Inulin-clearance nach der klassischen Infusionstechnik. Es sollte eine Methode entwickelt werden, die sich bei hoher Präzision auch in der täglichen Routinediagnostik durchführen läßt und nicht aufgrund hohen zeitlichen und personellen Aufwands nur wissenschaftlichen Fragestellungen vorbehalten bleiben muß. Dies schließt alle Schritte ein von der Durchführung der Clearance am Krankenbett über die Messung im Labor bis zur Berechnung und zum Ausdruck des Befundes.

2.1.2 Testprinzip der enzymatischen Inulinbestimmung

Zur Laborbestimmung des Inulins in Serum oder Plasma wurde das Testprinzip der enzymatischen Methode gewählt, die von Kühnle 1992 vorgestellt wurde, da diese Methode eine vollständige Eliminierung des Störfaktors Glucose versprach und aufgrund ihres enzymatischen Ansatzes eine recht einfache Methode war, die sich prinzipiell auf einem Laborautomaten installieren ließ. Die Methode benötigt 4 Reagenzien, die im Laufe der Bestimmung eingesetzt werden. Es ist nicht notwendig, die Probe zu enteischen. Abbildung 5 zeigt die Molekülstruktur von Sinistrin.

Die Bestimmung läuft in folgenden Schritten ab (siehe Abbildung 6 und 7):

- Zuerst wird die in der Probe enthaltene Blutglucose mittels Glucoseoxidase und Wasserstoffperoxid in einem Citratpuffer (pH5, 0,2 M) entfernt, da sie die Bestimmung stört. Bei diesem Reaktionsschritt sind als Ausdruck der ablaufenden Reaktion Gasblasen im Ansatz zu beobachten. (Abbildung 6).
- Dem Medium I aus Citratpuffer, Wasserstoffperoxid und Glucoseoxidase wird noch die von Novo Nordisk vertriebene Inulinase zugegeben, die gleichzeitig das Sinistrin in Fructose spaltet, so daß Glucoseentfernung und Spaltung in Fructoseeinheiten in einem Arbeitsschritt ablaufen können. Der Ansatz wird 20 min bei 56 °C im Wärmelock inkubiert. (Abbildung 6).
- Jetzt wird die in der Reaktion entstandene, freie Fructose durch Hexokinase in einem NADP⁺/ATP Puffer phosphoryliert. Das entstehende Fructose-6-phosphat wird durch die Phosphoglucose-Isomerase

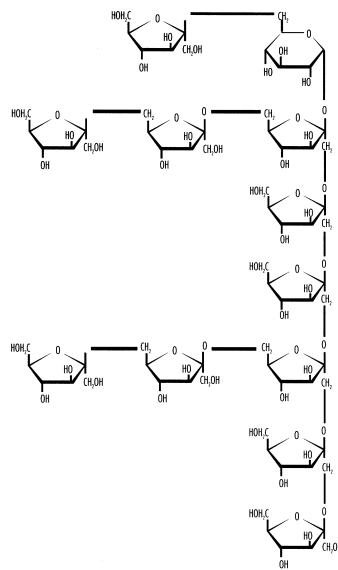
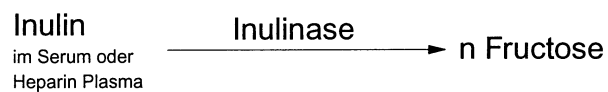


Fig. 5: Sinistrin. Abdruck mit freundlicher Genehmigung durch S. Kammoun, Laevosan Gesellschaft, Linz

in Glucose-6-phosphat isomerisiert. Glucose-6-phosphat wird durch die Glucose-6-phosphat-dehydrogenase oxidiert. Hierbei wird NADP⁺ reduziert zu NADPH⁺, das sich photometrisch nachweisen lässt. (Abbildung 7) NADPH⁺ hat drei Extinktionsmaxima: sie liegen bei 340 nm, 365 nm und bei 334 nm.

Inulinspaltung:



Elimination des Störfaktors Glucose:

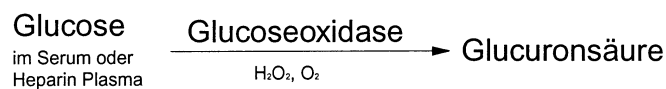


Fig. 6: Inulinspaltung in Fructose und Glucoseelimination

Die ermittelten Extinktionswerte können entweder mit einem theoretisch berechneten Faktor multipliziert werden, um eine Konzentration zu erhalten.

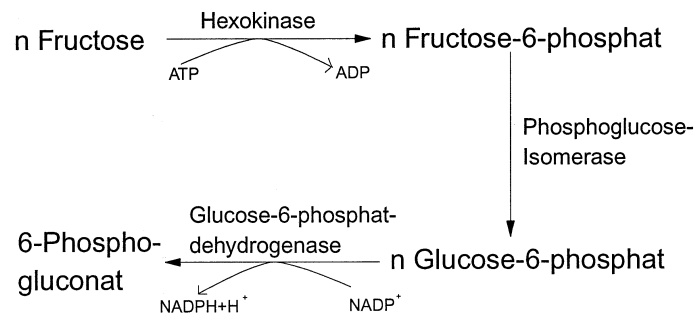


Fig. 7: Fructoseumsetzung zu 6-Phosphogluconat

ten. Es kann aber auch eine Standardkalibration mit einem Standard definierter Konzentration durchgeführt werden, auf den dann die Extinktionswerte bezogen werden.

Die Bestimmungsmethode ist ein Ergebnis dieser Arbeit und findet sich daher in Abschnitt 3 - Ergebnisse.

2.1.3 Bestimmung weiterer nephrologischer Parameter

Bei den onkologischen Patienten und bei der niereninsuffizienten Patientin wurden außer der Inulin-clearance weitere nephrologische Parameter bestimmt.

Grundlegende Maßnahme für viele nephrologische Untersuchungen ist die Urinsammlung über 24 h. Mit diesem Sammelurin können dann spezifische Nierenparameter ermittelt werden. Die Urinsammlung wurde von den Patienten bzw. deren Eltern zu Hause oder im stationären Umfeld vor oder während der Therapie durchgeführt. Die Technik der Urinsammlung wurde allen Patienten bzw. den Eltern genau erklärt, um sicher zu gehen, daß erst nach vollständiger Entleerung der Blase mit dem Sammeln begonnen wird und daß die letzte Portion nach 24 Stunden auch noch gesammelt werden muß. Es wurde ein Merkblatt zur Urinsammlung verteilt (Siehe Abbildung 8), das den Patienten mitgegeben wurde, um Sammelfehler möglichst zu vermeiden.

Bei einigen kleinen Kindern ist das Urinsammeln mittels Sammelgefäß oder Klebebeutel manchmal nicht möglich gewesen oder wurde von den Eltern wegen der Hautirritationen durch den Klebebeutel abgelehnt. Auch kamen Fälle mangelnder Mitarbeit vor. In diesen Fällen wurde unter sterilen Bedingungen ein Blasenkatheter gelegt, der meist nur während der Sammelperiode in der Blase verblieb.

2.1.3.1 Kreatininclearance Zur Kreatininbestimmung sammelte der Patient 24 Stunden Urin.

Während der Sammelperiode oder unmittelbar danach wurde für die Kreatininclearance Kreatinin im Serum bestimmt. Zur Blutentnahme wurde der bei den meisten Patienten vorhandene Hickman-Broviac Katheter verwendet, der zu Beginn der Chemotherapie operativ gelegt wird und bei entsprechender Pflege bis zum Ende der Intensivtherapie verbleibt. Dieses Vorgehen entspricht dem in der Klinik üblichen Vorgehen.

Die Kreatinin-Konzentrationen in Serum und Urin wurden im Labor für klinische Chemie der Universitäts-Kinderklinik mit der Trockenchemie Methode des Kodak-Analysenautomats bestimmt. Dort wurde auch die Clearance berechnet. Dies geschieht nach der Formel

$$Cl_{Krea} = \frac{C_{Urin}}{C_{Plasma}} \cdot UZV \quad (6)$$

Der erhaltene Wert wird auf die Standard-Körperoberfläche von $1,73 \text{ m}^2$ bezogen.

2.1.3.2 Harnstoff Clearance Die Harnstoffclearance wurde analog und zeitgleich zur Kreatininclearance aus der gleichen Urin- und Serumprobe bestimmt. Die Messung und Berechnung analog nach der bei der Kreatininclearance erwähnten Formel erfolgte ebenfalls im Labor für klinische Chemie mit der Kodak Trockenchemie Methode.

2.2 Probandenkollektiv

An den drei gesunden Probanden wurden 6 und an den 37 meist onkologischen Patienten wurden 73 Bestimmungen der Inulin-clearance durchgeführt. Das Alter der Patienten und Probanden reichte von 3 Wochen bis zu 32 Jahren; Der Mittelwert lag bei $10 \frac{2}{12}$ und der Median bei $7 \frac{6}{12}$ Jahren.

Der Beobachtungszeitraum bei mehrfach durchgeführten Clearances liegt zwischen 7 und 515 Tagen; der Median liegt bei 116 Tagen und der Mittelwert bei 145 Tagen.

Bei den Diagnosen überwogen die akuten lymphatischen Leukämien (6 mal), gefolgt von den 6 Patienten mit Hirntumoren unterschiedlicher Entität; es folgten 4 mal die Diagnose Neuroblastom, 3 mal Osteosarkom, 2 mal PNET, 2 mal Wilmstumor und je einmal eine akute myeloische Leukämie, ein Ewingsarkom, und ein Rezidiv einer akuten lymphatischen Leukämie und ein alveoläres Rhabdomyosarkom.

Bei allen Inulin-clearances wurde angestrebt, gleichzeitig eine Kreatinin-clearance und eine Harnstoffclearance zu bestimmen. Außerdem wurden, wenn möglich, die Natrium-Rückresorption, die Phosphat-Rückresorption und die Calcium-Exkretion bestimmt. Dies war allerdings an die Urinsammlung, möglichst über 24 Stunden, gebunden. In einigen Fällen sind Sammelversuche gescheitert oder wurden von den Eltern abgelehnt.

Bei kleinen Kindern ist den Eltern und dem Behandlungsteam weder die Urinsammlung per Klebebeutel noch per Blasenkatheter sehr sympathisch, da das Legen eines Blasenkatheters eine invasive Maßnahme darstellt, denen onkologische Patienten ohnehin häufig ausgesetzt sind. Klebebeutel verursachen Hautreizungen und ermöglichen trotzdem nur eine unzuverlässige Sammlung. Es ist bei der Urinsammlung bei Kindern nie auszusprechen, daß Urin verloren geht.

Den Eltern wurde der Vorgang der Urinsammlung genau erklärt und ein Merkblatt überreicht (Abbildung 8)

Bei insgesamt 14 Patienten konnten im Verlauf des Beobachtungszeitraumes mehrere Clearances durchgeführt werden, bei einem Patienten sogar 8 mal und bei einer Patientin 4 mal in einem Jahr.

Urinsammeln für die Kreatininclearance

Liebe Eltern, liebe Patienten

wir möchten bei Ihrem Kind/bei Ihnen zur Überprüfung der Nierenfunktion eine Kreatininclearance durchführen. Es handelt sich um eine Laboruntersuchung von Blut und dem sogenannten 24-Stunden-Sammelurin. 24 h-Sammelurin ist, wie der Name schon sagt, der gesammelte Urin eines Tages. Um diesen Sammelurin zu gewinnen benötigen wir Ihre Mithilfe! Sie erhalten hierfür von uns geeignete Sammelgefäße.

Die Niere produziert jede Minute etwa 1-2 ml Urin. Dieser wird in der Blase zwischengespeichert, bis sie entleert wird. Uns interessiert der Urin, den die Niere in 24 Stunden produziert. Daher soll das Urinsammeln folgendermaßen durchgeführt werden:

Sie beginnen mit der Sammelperiode zweckmäßigerweise einen Tag vor Besuch der Klinik, am besten morgens, wenn Ihr Kind zum ersten Mal zur Toilette muß. Notieren sie sich bitte den Zeitpunkt. Diesen Urin dürfen Sie aber **noch nicht sammeln**, er muß in die Toilette. Dieser Urin wurde nämlich nachts, genauer gesagt seit dem letzten Wasserlassen, von der Niere produziert und in der Blase nur zwischengespeichert. Das ist Urin, der vor der eigentlichen Sammelperiode hergestellt wurde. Er gehört nicht in den Sammeltopf!

Alle jetzt folgenden Urinmengen müssen gesammelt werden bis zum nächsten Morgen zur gleichen Uhrzeit. Wenn die Sammelzeit beendet ist muß Ihr Kind noch einmal die Blase entleeren. Dieser Urin gehört noch in den Sammeltopf, denn auch hier gilt wieder das Prinzip, daß Urin in der Blase nur zwischengespeichert wird. Der Urin, der sich am Ende der Sammelzeit in der Blase befindet, wurde also von der Niere noch in der Sammelzeit hergestellt. Sie müssen diese Menge also noch zur bereits vorhandenen hinzufügen.

Zur Verdeutlichung ein praktisches Beispiel:

Sie erwachen sonntags morgens um 8.00 Uhr. Um 8.13 Uhr öffnet sich die Kinderzimmertür und Ihr Sohn macht sich auf den Weg zur Toilette. Sie begleiten ihn, um festzustellen, daß er tatsächlich Urin läßt und merken sich die Urzeit: 8.15 Uhr. Alle weiteren Urinmengen am weiteren Sonntag und während der Nacht müssen in den Sammeltopf. Montag früh um 8.15 Uhr schicken sie Ihren Sohn wieder zur Toilette. Er entleert jetzt die Blase zum letzten Mal in den Sammeltopf. Sie nehmen den Sammeltopf mit in die Klinik.

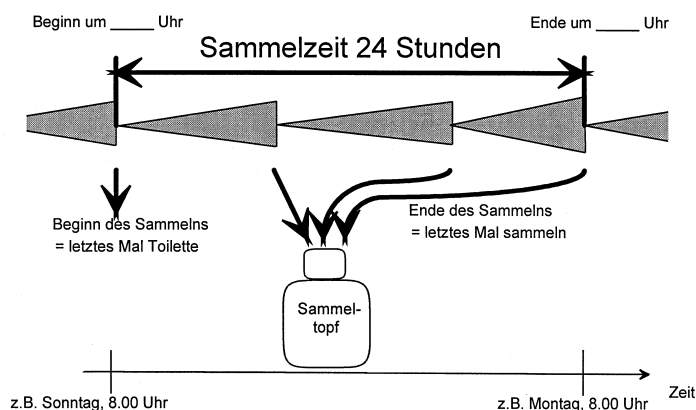


Fig. 8: Merkblatt zum korrekten Sammeln des 24-h Sammelurins

2.2.1 Patientenkollektiv der Studie

| ID | Initialen | geb. | Diagnose | Geschl. | Beob.- Zeit (d) | Zahl Inu- lincl. |
|----|-----------|----------|--|----------|-----------------------|------------------------|
| 1 | M.Be | 20.07.93 | ALL | männlich | 0 | 1 |
| 2 | S. B. | 03.07.69 | Osteosarkom | weiblich | 0 | 1 |
| 3 | M. Br | 08.12.76 | ALL | männlich | 0 | 1 |
| 4 | C. F. | 19.06.92 | ALL | weiblich | 94 | 2 |
| 5 | R. G. | 29.06.79 | Hybridleukämie, als ALL behan- delt | männlich | 111 | 2 |
| 6 | B. H. | 24.04.92 | Neuroblastom | weiblich | 0 | 1 |
| 7 | N. K. | 24.10.89 | ALL | weiblich | 0 | 1 |
| 8 | J. M. L | 11.01.94 | PNET | männlich | 64 | 2 |
| 9 | M. L. | 07.01.78 | AML | weiblich | 0 | 1 |
| 10 | J. Me. | 04.01.91 | ALL | männlich | 0 | 1 |
| 11 | N. Mü. | 10.02.84 | Astrozytom- Rezidiv | weiblich | 7 | 1 |
| 12 | S. N. | 06.11.75 | Ewingsarkom | weiblich | 0 | 1 |
| 13 | F. O. | 10.12.92 | Wilmstumor | weiblich | 0 | 1 |
| 14 | E. P. | 19.11.89 | Ependymom | weiblich | 255 | 2 |
| 15 | F. R. | 02.04.92 | Neuroblastom | männlich | 43 | 1 |
| 16 | A. R. | 30.12.78 | Pinealoblastom | männlich | 381 | 2 |
| 17 | M. S. | 01.05.90 | Neuroblastom | weiblich | 199 | 3 |
| 18 | P. S. | 12.11.89 | Wilmstumor | männlich | 0 | 1 |
| 19 | S. S. | 21.01.93 | Neuroblastom | männlich | 347 | 8 |
| 20 | T. W. | 19.04.88 | ALL-REZ | weiblich | 0 | 1 |
| 21 | S. W | 24.04.84 | Medulloblastom | männlich | 0 | 1 |
| 22 | N. B. | 12.02.82 | Niereninsuffizienz | weiblich | 0 | 1 |
| 23 | P. F. | 12.12.74 | Medulloblastom Rezidive, tubulä- re Nephropathie | männlich | 0 | 1 |
| 24 | H.-P. G. | 13.02.60 | gesund | männlich | 14 | 2 |
| 25 | M. G. | 01.01.69 | gesund | männlich | 515 | 1 |
| 26 | Y. K. | 04.04.80 | homozygote β -Thalassämie | weiblich | 0 | 1 |
| 27 | A. K. | 29.05.92 | Retinoblastom | weiblich | 297 | 4 |
| 28 | J. Mi. | 24.01.94 | alveoläres Rhab- domyosarkom | weiblich | 24 | 2 |
| 29 | N. Mu | 11.01.93 | ALL | männlich | 144 | 2 |
| 30 | M. Ö. | 17.10.70 | Osteosarkom | männlich | 12 | 1 |
| 31 | R. S. | 13.03.76 | PNET | weiblich | 70 | 2 |
| 32 | J. S. | 25.09.76 | Osteosarkom | weiblich | 0 | 1 |

2.2.2 Diagnoseverteilung der Probanden und Patienten und Aufteilung auf die Therapiestudien

| Anzahl | Diagnose | Behandlung nach Studie |
|--------|---|--|
| 6 | Akute Lymphoblastenleukämie | ALL-BFM 90 und ALL-BFM 95 |
| 1 | Hybridleukämie, als ALL behandelt | ALL-BFM 90 |
| 1 | Astrozytom | Frankfurter Pilotstudie für Hirntumore |
| 1 | Ependymom | Frankfurter Pilotstudie für Hirntumore |
| 1 | Pinealoblastom | Frankfurter Pilotstudie für Hirntumore |
| 2 | Medolloblastom | Frankfurter Pilotstudie für Hirntumore |
| 1 | Retinoblastom | Frankfurter Pilotstudie für Hirntumore |
| 4 | Neuroblastom | Nb 90 |
| 2 | Wilms-Tumoren | SIOP-Wilms-Studie |
| 2 | Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET) | CWS 91 |
| 1 | Alveoläres Rhabdomyosarkom | CWS 91 |
| 3 | Osteosarkom | COSS 91 |
| 1 | Ewing Sarkom | EICESS |
| 1 | Akute Myeloblastenleukämie | AML BFM |
| 1 | Akute Lymphoblastenleukämie, Rezidiv | ALL-BFM 90, ALL-REZ BFM 90 |
| 1 | β -Thalassämia major | Hochdosistransfusionsregime |
| 1 | Niereninsuffizienz | |
| 2 | gesunde Probanden | |

2.2.3 Geschlechtsverteilung im Patienten- und Probandenkollektiv

| | |
|------------------------------|----|
| Inulinclearances | 53 |
| männliche Patienten | 13 |
| weibliche Patienten | 15 |
| gesunde Probanden | 2 |
| nicht onkologische Patienten | 2 |

| Therapiestudie | Nephrotoxische Zytostatika |
|---|---|
| ALL-BFM 90 | Methotrexat, Cyclophosphamid |
| ALL-BFM 95 | Methotrexat, Cyclophosphamid |
| Frankfurter Pilotstudie für Hirntumoren | Methotrexat, Cyclophosphamid, Carboplatin |
| Nb 90 | Cisplatin, Ifosfamid |
| CWS 86 und CWS 91 | Ifosfamid, Carboplatin |
| COSS 86 | Ifosfamid, Cisplatin, Methotrexat |
| AML-BFM 90 | Cyclophosphamid |
| ALL-Rez BFM 90 | Methotrexat, Ifosfamid, Thiotepa |
| SIOP-Wilmstumorstudie | Tumornephrektomie |

Tab. 1: Nephrotoxische Substanzen in den Therapiestudien

2.3 Material

2.3.1 Inulin

Inutest Ampullen zu 20 ml

1 Ampulle zu 20 ml enthält 5,0 g Sinistrin purissimum pyrogenfrei, gelöst in Aqua ad inject.

Hersteller: Laevosan Gesellschaft m. b. H. Linz; Z. Nr. 12 687

2.3.2 Citratpuffer

- 0,2 M Citratpuffer, eingestellt auf pH 5,0
- 4,2 g Zitronensäure $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ werden in 100 ml Aqua dest gelöst;
- 5,88 g Natriumcitrat $C_6H_5Na_3O_7 \cdot H_2O$ werden in 100 ml Aqua dest gelöst.

60 ml dieser Natriumcitratlösung werden mit 25 ml der Zitronensäurelösung versetzt; die Lösung wird am pH Meter auf pH 5,0 eingestellt.

Hersteller:

- Zitronensäure, p.a.: Merck, Darmstadt
- Natriumcitrat, p.a.: Merck, Darmstadt

2.3.3 Wasserstoffperoxid

30 %-ige Lösung Wasserstoffperoxid "Perhydrol"

Hersteller: Merck, Darmstadt.

2.3.4 Inulinase

Inulinase NOVOZYM 230, Fructozym 230 (1800 IU/g, EC 3.2.1.7)

Hersteller Novo Nordisk, Bestell-Nr. 811 221

2.3.5 Glucoseoxidase

Glucoseoxidase aus *Aspergillus niger*, Reinheitsgrad I (EC 1.1.3.4)

Hersteller: Boehringer Mannheim GmbH, Bestell-Nr. 105 147

2.3.6 Phosphoglucose-Isomerase

Phosphoglucose-Isomerase, PGI 700 U/ml

Hersteller: Boehringer Mannheim GmbH, Bestell-Nr. 127 396

2.3.7 Testkit zur D-Glucose- und D-Fructosebestimmung in der Lebensmittelchemie

D-Glucose/ D-Fructose Testkit (Hexokinase-Methode) enthält:

- Flasche 1: 5 g Pulvergemisch aus Triethanolaminpuffer, pH 7,6; NADP, 64 mg; ATP 160 mg; Magnesiumsulfat.
- Flasche 2: 0,7 ml Enzymsuspension aus Hexokinase, 200 U; Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, 100 U
- Flasche 3: 0,7 ml Phosphoglucose-Isomerase, ca. 490 U.
- Flasche 4: Glucose-Standardlösung 50 mg/dl

Hersteller: Boehringer Mannheim GmbH, Bestell-Nr. 139 106

2.3.8 Testkit zur D-Glucosebestimmung in der klinischen Chemie

Glucose liqui-UV Testkit (Hexokinase-Methode) enthält:

- Flasche 1: Pufferlösung PIPES Puffer, 100 mmol/l, pH 7,6; ATP 4 mmol/l; NAD 3 mmol/l; Mg²⁺ 10 mmol/l; Natriumacid zur Konservierung: 0,05%
- Flasche 2: Enzymreagenz aus Hexokinase: > 25 U/ml, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase: >75 U/ml; Natriumacid zur Konservierung: 0,1 %
- Flasche 3: Glucose Standard, 100 mg/dl, Trichloressigsäure zur Konservierung: 0,5 mol/l

Hersteller: Firma Human, Taunusstein, Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Bestell-Nr. 10 780.

2.3.9 Kodak Ektachem Laborautomat

Am Kodak Ektachem 700 XR wurden folgende Parameter mit den originalen Testplättchen der Firma Kodak bestimmt:

- im Serum: Kreatinin, Harnstoff, Glucose
- im Urin: Kreatinin

2.3.10 Mitsubishi Super Z 818

Am Mitsubishi Analysator Super Z 818 (Rolf Greiner BioChemica, Flacht) wurden neben der Inulinkonzentration bestimmt:

- Harnstoff im Urin: Urease-GLDH-Methode, kinetisch. Testkithersteller: Firma Human, Taunusstein.

3 Ergebnisse

3.1 Die Etablierung der enzymatischen Meßmethode für Inulin

Ein Ergebnis dieser Arbeit ist die Entwicklung und Anpassung der enzymatischen Bestimmungsmethode für Inulin mit für die klinische Chemie zugelassenen Enzymen auf einem Analysenautomaten. Die Beschreibung dieser Schritte findet sich daher hier im Abschnitt Ergebnisse und nicht im Kapitel 2 - Probanden, Material, Methoden.

Die Entwicklung wurde zunächst mit einer manuellen Bestimmung am Photometer nach der Vorschrift von Kühnle begonnen. Anschließend wurde die Messung mit den anderen, für die klinische Chemie hergestellten Enzymen in Handarbeit getestet und erst dann haben wir begonnen, die Methode auf einen Analysenautomaten zu adaptieren.

3.2 Manuelle Inulinbestimmung nach Kühnle

Die ersten Versuche wurden in der von Kühnle (1992) veröffentlichten Versuchsanordnung mit den dort genannten Reagenzien an einem Photometer durchgeführt.

3.2.1 Reagenzien



Fig. 9: Testkit nach Kühnle

- Medium 1: 10 ml Citratpuffer, 0,2 M, pH 5,0 wurden mit 5 mg Glucoseoxidase und mit 200 μ l Inulinase versetzt.

3.3 Manuelle Bestimmung mit Human Glucose Testkit 3 ERGEBNISSE

- Medium 2: 5 ml Citratpuffer 0,2 M, pH 5,0 wurden mit 50 μ l H₂O₂ versetzt.
- Medium 3: Triäthanolaminpuffer, pH 7,6 Puffer mit MgSO₄, 6 mg/ml ATP und 2,4 mg/ml NADP⁺. Flasche Nr. 1 aus dem Glucose Fructose Testkit von Boehringer Mannheim
- Medium 4: Enzymgemisch: Ein Gemisch aus Hexokinase, Glucose-6-phosphat Dehydrogenase und Phosphoglucoseisomerase wurde durch 1:1 mischen der Flaschen Nr. 2 (Hexokinase und Glucose-6-phosphat Dehydrogenase) und Nr.3 (Phosphoglucoseisomerase) des Boehringer Testkits hergestellt. Enzymaktivitäten: Hexokinase: 143 U/ml; Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase: 71 U/ml; Phosphoglucose-Isomerase: 350 U/ml.

Abbildung 9 zeigt das vollständige Testkit nach Kühnle.

3.2.2 Durchführung der Bestimmung:

100 μ l Serum wurden mit 200 μ l Inkubationsmedium I und 100 μ l Inkubationsmedium II bei 37 °C 60 min lang inkubiert. Das Inkubat wurde in eine Küvette überführt. 1,0 ml des ATP/NAD Puffers wurde zugeführt und die Extinktion (E1) am Photometer bei 365 nm abgelesen. Jetzt wurden 20 μ l des Enzymgemischs aus HK, G6PDH und PGI zugeführt, gemischt und der Anstieg der Extinktion am Photometer beobachtet. Die Ablesung der Extinktion E2 erfolgte nach 20 min. E1 wurde dann von E2 subtrahiert.

3.3 Manuelle Bestimmung mit Human Glucose Testkit

Das von Boehringer Mannheim bezogene Testkit zur Glucose-Fructose Bestimmung wurde für die Lebensmittelchemie entwickelt. Die enthaltenen Enzyme sind nicht für den Einsatz in der klinischen Chemie zugelassen. Wir haben daher den Einsatz eines anderen Testkits mit für die klinische Chemie zugelassenen Enzymen bevorzugt. Die Wahl fiel auf das Testkit Glucose liqui-UV Hexokinase Methode von der Firma Human, Taunusstein, vertrieben durch Rolf Greiner Diagnostics.

Dieser Weg bietet zudem eine erhebliche Kosteneinsparung von etwa 70%. Die PGI wurde von Boehringer Mannheim separat bezogen. Dieses Testkit wurde zunächst ebenfalls in Handverarbeitung getestet:



Fig. 10: Testkit für Inulin mit dem Glucose Testkit für die klinische Chemie

3.3.1 Reagenzien

- Medium 1: 10 ml Citratpuffer, 0,2 M, pH 5,0 werden mit 5 mg Glucoseoxidase und mit 200 μl Inulinase versetzt.
- Medium 2: 5 ml Citratpuffer 0,2 M, pH 5,0 wurden mit 50 μl H_2O_2 versetzt.
- Medium 3: Puffer: 25 ml des im Testkit gelieferten NAD/ATP/Mg Puffers werden mit 1250 μl der beigefügten Enzymlösung (Hexokinase und Glucose-6-phosphat Dehydrogenase) versetzt.
- Medium 4: besteht aus der unverdünnten PGI-Stammlösung.

Abbildung 10 zeigt die in unserer Studie verwendeten Reagenzien.

3.3.2 Durchführung der Bestimmung

Zur manuellen Bestimmung wurden 100 μl Serum mit 200 μl Medium 1 und 100 μl Medium II bei 56 °C 20 min inkubiert. Das Inkubat wurde in eine Küvette überführt. 2,5 ml des ATP/NADP Puffers mit dem Enzymzusatz aus Hexokinase und Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (R1) wurde zugeführt und die Extinktion (E1) am Photometer bei 365 nm abgelesen. Jetzt wurden 4 μl der Phosphoglucose-Isomerase zugeführt, gemischt und der Anstieg der Extinktion am Photometer beobachtet. Die Ablesung der Extinktion E2 erfolgte nach 20 min. E1 wurde dann von E2 subtrahiert.

Die manuelle Kalibrierung anhand einer Eichkurve wird in Kapitel 3.5.1 auf Seite 45 beschrieben.

Mit den erhaltenen Extinktionen läßt sich eine Eichkurve erstellen und die Konzentration errechnen - die Einzelheiten sind in Kapitel 3.5.2 auf Seite 48 erläutert.

3.3.3 Einfluß der Reaktionstemperatur auf die Reaktionskinetik

Das Temperaturoptimum der für die Fructoseumsetzung verwendeten Enzyme liegt bei 37°C. Die Einhaltung dieser Temperatur hat entscheidenden Einfluß auf die Reaktionskinetik, die bei 20 °C erheblich langsamer abläuft.

In diesem Versuch wurde eine Inulinprobe, die 94 mg/l Inulin enthielt, bei 20 °C Umgebungstemperatur am Photometer gemessen. Nach Zugabe der Phosphoglucose-Isomerase wurde im Minutenabstand der aktuelle Extinktionswert erfaßt.

Im zweiten Versuch wurde eine Probe identischer Inulinkonzentration während der Messungen am Photometer auf 37°C gehalten. Abbildung 11 zeigt die deutlich schneller ablaufende Reaktion im Vergleich zu der Probe, die bei Zimmertemperatur reagieren muß.

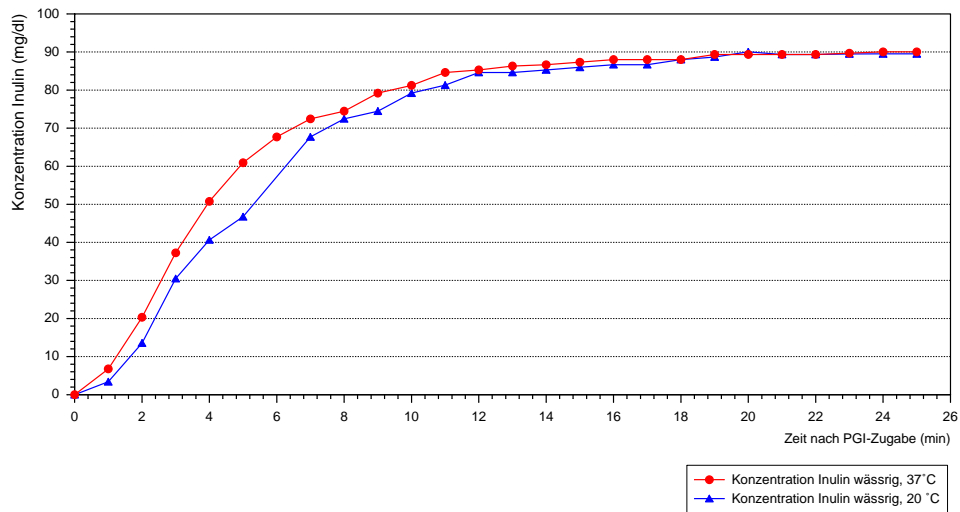


Fig. 11: Reaktionskinetik der NADPH-Reaktion bei 20 und 37 °C am Photometer in der Übersicht

3.4 Umsetzen der modifizierten Methode auf den Laborautomaten Mitsubishi Super Z

Nachdem die modifizierte Methode am Handphotometer getestet war, wurde die Methode auf einem automatischen Analysengerät Mitsubishi-Nittec

Super Z 818 adaptiert. Dieses Gerät arbeitet mit Quarzküvetten und kann bei 340 nm, aber nicht bei 365 nm die Extinktion von NADPH₂ messen. Zur Probe lassen sich wahlweise 1 oder 2 Reagenzien hinzufügen. Die Reaktionszeit steht mit je 5 min für jedes Reagenz ebenso wie die Temperatur mit 37 °C fest und läßt sich nicht beeinflussen. Eine Beschleunigung der Reaktion ist daher nur durch Variation der zugegebenen Enzymaktivität zu erzielen.

3.4.1 Vorinkubation

Um die Bestimmung zu vereinfachen und zu beschleunigen, wurde versucht, die von Kühnle beschriebene Reaktionszeit von 60 min bei 37 °C durch höhere Inkubationstemperatur zu verkürzen. Das Temperaturoptimum von Glucoseoxidase und Inulinase liegt bei 56 °C, so daß diese Temperatur geeignet erschien.

Bei dieser Temperatur wird auch die im Plasma vorhandene, endogene Phosphoglucose-Isomerase inaktiviert. Näheres im Kapitel 3.6.6.2- Störfaktoren auf Seite 60.

Es wurde ein Kontrollserum Qualitrol angesetzt und mit Inulin und Glucoselösung dotiert. Das Serum enthielt 1111 mg/l Inulin und 513 mg/dl Glucose. Die Glucosekonzentration dieses Serums und die Glucosekonzentration nach der Inkubation nach Kühnle (60 min bei 37 °C) wurde am Kodak Ektachem, die Inulinkonzentration ebenfalls mit einer Inkubation nach Kühnle (60 min bei 37°C) am Mitsubishi Super Z 818 gemessen.

Anschließend wurden die gleichen Proben 20 min bei 56 °C inkubiert. Die Ergebnisse zeigen die Tabellen 2 und 3 sowie Abbildung 12.

| Inulinkonzentration mg/l | Glucosekonzentration mg/dl |
|--------------------------|----------------------------|
| 1112 | 0 |
| 1130 | 1 |
| 1112 | 0 |
| 1098 | 2 |
| 1105 | 0 |

Tab. 2: Glucoseelimination und Inulinumsetzung bei 37°C für 60 min.

Zusätzlich wurde das Kontrollserum bei 56 °C für 10, 20, 30, 40, 50 und 60 min inkubiert. So erhält man eine Kinetik der Inkubationsreaktion - siehe Abbildung 13. Sofort nach Abschluß der Inkubation wurde die Inulin- und Glucosekonzentration im Inkubat gemessen. Allerdings vergeht vom Ende

| Inulinkonzentration mg/l | Glucosekonzentration mg/dl |
|--------------------------|----------------------------|
| 1186 | 1 |
| 1082 | 1 |
| 1098 | 0 |
| 1085 | 0 |
| 1115 | 2 |

Tab. 3: Glucoseelimination und Inulinumsetzung bei 56°C für 20 min

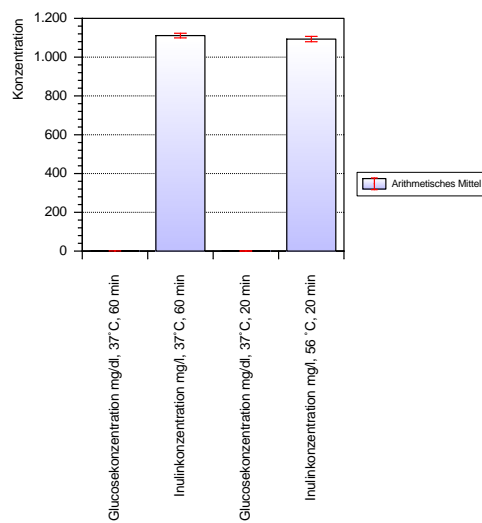


Fig. 12: Vergleich der Glucoseelimination und Inulinumsetzung bei 37° für 60 min und 56°C für 20 min.

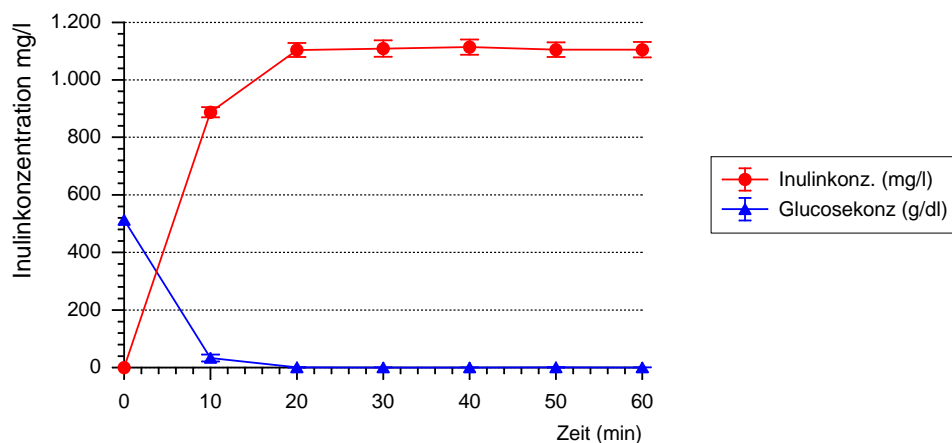


Fig. 13: Reaktionskinetik der Vorinkubation bei 56 °C; n=3

der Inkubation bis zum Messen der Probe im Automaten aus technischen Gründen eine Wartezeit von ca. 5 min.

Die Daten zeigen, daß bereits nach 10 min Inkubation eine weitgehende Elimination der Glucose und Spaltung des Inulins in Fructose stattgefunden hat. Die Reaktion ist jedoch noch nicht vollständig abgelaufen. Nach 20 min ist die Glucose vollständig eliminiert und die Inulinkonzentration entspricht der durch die vorgeschlagene Inkubation gewonnenen. Es erscheint daher ausreichend sicher, die Inkubation 20 min lang bei 56°C durchzuführen, da fast identische Ergebnisse erzielt werden konnten. Die Variationskoeffizienten lagen bei diesen Bestimmungen immer unter 3%. Eine kürzere Inkubationszeit als 20 min erwies sich hierbei als arbeitstechnisch schlecht durchführbar.

3.4.2 Automatisierte Verarbeitung

Nach der Vorinkubation wird die Probe in ein Probengefäß umgefüllt, das in den Analysenautomat paßt. Die weitere Bestimmung läuft jetzt automatisch ab: Der Analysenautomat pipettiert 40 µl des Inkubats in eine der Quarzküvetten und verdünnt es mit 40 µl Aqua dest. Anschließend werden hierzu 250 µl des Mediums 3 hinzugefügt und der Ansatz mit einem kleinen Mixer gerührt. Der Automat erwärmt die Küvette jetzt auf 37 °C und beobachtet 5 Minuten lang die Extinktion (E1). Anschließend werden 25 µl des Mediums 4 zugegeben und wieder 5 Minuten lang die Extinktion (E2) beobachtet. Der Automat berechnet die Differenz der Extinktion ΔE aus den Werten der Extinktion vor und nach der Zugabe der Phosphoglucose-Isomerase. Das Programm, das den Mitsubishi Super Z steuert, zeigt Abbildung 14.

Im Verlauf der Reaktion entsteht für jedes Molekül Fructose eine äquivalente Menge an NADH^+ , das photometrisch gemessen wird. Die Extinktion von NADH^+ folgt dem Lambert-Beerschen Gesetz, und sie ist proportional zur Konzentration.

Aus der gemessenen Extinktion kann daher durch Multiplikation mit einem Faktor die Konzentration der Probe errechnet werden. Die Möglichkeiten, die Konzentration auszurechnen finden sich ab Seite 45 in Kapitel 3.5.

Die Richtigkeit der Bestimmung wurde durch das Mitführen mehrerer Kontrollen vor und nach jeder kompletten Clearance (= 8 Proben) überprüft.

3.4.2.1 Reaktionskinetik der Fructosebestimmung Die Reaktionskinetik der Fructoseumsetzung am Analysenautomaten kann sehr einfach kontrolliert werden. Der Mitsubishi Super Z 818 mißt, sobald die Probe

```

ITEM NO. 15 PAGE 1
1.NAME : ZTT      6.SM VL : 40ul
2.METHD : UV-E    7.IJ VL : 40ul
3.MODE  : END-A   8.R1 VL : 250ul
4.WAV 1 : 340nm  9.R2 VL : 25ul
5.WAV 2 : 0nm    10.UNIT : ms/dl

INPUT...■

```

```

ITEM NO. 15 PAGE 2
11.F1   : 125.37  16.DEC-P : 2
12.F2   : 0.0000  17.ABS L : 0.000
13.F3   : 0.0000  18.ABS H : 2.000
14.F4   : 0.0000  19.N-R L : 0.00
15.F5   : 0.0000  20.N-R H : 2000.00

INPUT...■

```

```

ITEM NO. 15 PAGE 3
21.L CHK : 0      26.S BLK : 0.9296
22.M1STR : 1m40s  27.C BLK : 0N
23.M1STP : 4m40s  28.CRL-A : 1.0000
24.M2STR : 8m40s  29.CRL-B : 0.00
25.M2STP : 9m40s  30.M STD : LINE SEG

INPUT...■

```

Fig. 14: Das Programm, das den Mitsubishi Super Z steuert

in die Küvette pipettiert wurde, alle 30 Sekunden die Extinktion. Diese Daten lassen sich nach der Messung auf Papier ausdrucken. Die Reaktion ist abgeschlossen, wenn der Punkt der letzten Bestimmung eindeutig in einem Plateau liegt (Siehe Abbildung im folgenden Abschnitt).

3.4.2.2 Ermittlung der richtigen Enzymmenge Der Mitsubishi Super Z mißt grundsätzlich bei 37 °C. Die Inkubationsdauer für jedes Reagenz bei Bestimmungen mit zwei Reagenzien beträgt 5 Minuten und läßt sich nicht beeinflussen. Die Möglichkeiten, den Automaten an eine bestehende Methode anzupassen sind gering. Die Methode muß an den Automaten angepaßt werden. Dies kann nur noch durch eine Variation der zugegebenen Enzymaktivitäten geschehen. Die Enzyme sind teuer und es ist wünschenswert, mit möglichst geringen Mengen auszukommen.

Zunächst wurden zur Methode von Kühnle äquivalente Enzymmengen eingesetzt. Die Methode von Boehringer Mannheim geht aber von einer Reaktionszeit von 20 min für den letzten Reaktionsschritt aus. Diese Zeit ist bei unserem Automaten auf 5 min beschränkt. Die Kinetik zeigt noch keine deutliche Plateauphase, die Reaktion ist also noch nicht vollständig abgelaufen; die Werte werden zu niedrig gemessen.

3 ERGEBNISSE 3.5 Ermittlung der Konzentration aus der Extinktion

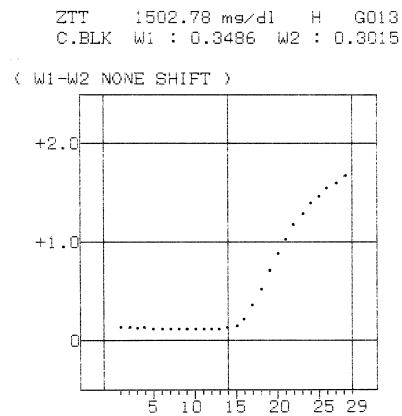


Fig. 15: Reaktionskinetik mit 9,5 IU Phosphoglucoseisomerase im Meßansatz im Laborautomaten: Diese Reaktion läuft nicht schnell genug ab. Am Ablesezeitpunkt existiert kein deutliches Plateau.

Die eingesetzte Enzymaktivität wurde verdoppelt und verdreifacht, bis eine Plateauphase erkennbar war und die erhaltenen Werte den Erwartungen entsprachen. Die Abbildungen 15 und 16 demonstrieren die unterschiedlichen Kinetiken.

Wir haben aufgrund der Ergebnisse die dreifache Enzymaktivität gewählt, um sicher gehen zu können, daß die Meßreaktion komplett abgelaufen ist.

3.5 Ermittlung der Konzentration aus der Extinktion

3.5.1 Manuelle Kalibrierung mit einer Eichkurve

Zur Standardkalibration bei der Handverarbeitung am Photometer wird eine Verdünnungsreihe eines bekannten Standards erstellt. Leider gibt es für Inulin keine käuflich erhältlichen Standardlösungen. Auf Anfrage beim Hersteller von Inutest, der Firma Laevosan Gesellschaft m.b.H. in Linz, wurde uns freundlicherweise eine wässrige Standardlösung mit der Inulinkonzentration von 992 mg/l zur Verfügung gestellt.

Anhand der Verdünnungsreihe wird eine Eichkurve erstellt. Aus dieser Kurve wird anhand der gemessenen Extinktion die Konzentration der Probe abgelesen.

Eine typische Verdünnungsreihe mit selbst hergestellten wässrigen Lösungen im Konzentrationsbereich von 0 bis 5000 mg/l sieht so aus:

3.5 Ermittlung der Konzentration aus der Extinktion 3 ERGEBNISSE

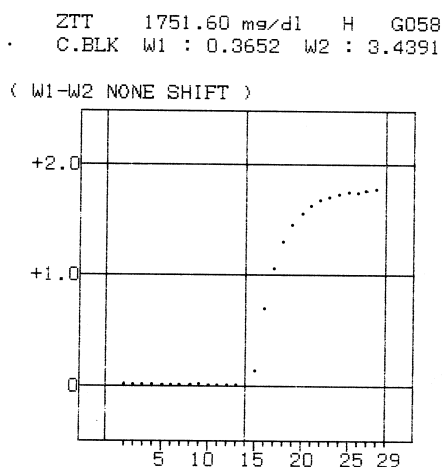


Fig. 16: Reaktionskinetik mit 28 IU Phosphoglucoseisomerase im Ansatz im Laborautomaten: Die Reaktion läuft schnell genug ab, es existiert ein eindeutiges Plateau.

| Inulin Soll Konzentration mg/l | E1 | E2 | E2-E1 | Inulin gemessene Konzentration mg/l |
|--------------------------------|----|--------|--------|-------------------------------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 0 | 0.0075 | 0.0075 | 5.482 |
| 5 | 0 | 0.001 | 0.001 | 7.309 |
| 10 | 0 | 0.0175 | 0.0175 | 12.791 |
| 50 | 0 | 0.072 | 0.072 | 52.627 |
| 100 | 0 | 0.135 | 0.135 | 98.676 |
| 250 | 0 | 0.34 | 0.34 | 248.518 |
| 500 | 0 | 0.67 | 0.67 | 489.726 |
| 1000 | 0 | 1.275 | 1.275 | 931.942 |
| 2500 | 0 | 2.5 | 2.5 | 1827.337 |
| 5000 | 0 | 3.5 | 3.5 | 2558.272 |

Die etwas zu hoch gemessenen Werte im Bereich bis 10 mg/l lassen sich auf den Pipettierfehler zurückführen; Die Inutest-Lösung mußte für eine Probe mit 1 mg/l 1:250.000 verdünnt werden. Die hieraus resultierende Eichkurve zeigt Abbildung 17.

Man erkennt, daß die Eichkurve bis etwa 1000 mg/l linear verläuft. In höheren Konzentrationsbereichen muß die Probe verdünnt werden.

3 ERGEBNISSE 3.5 Ermittlung der Konzentration aus der Extinktion

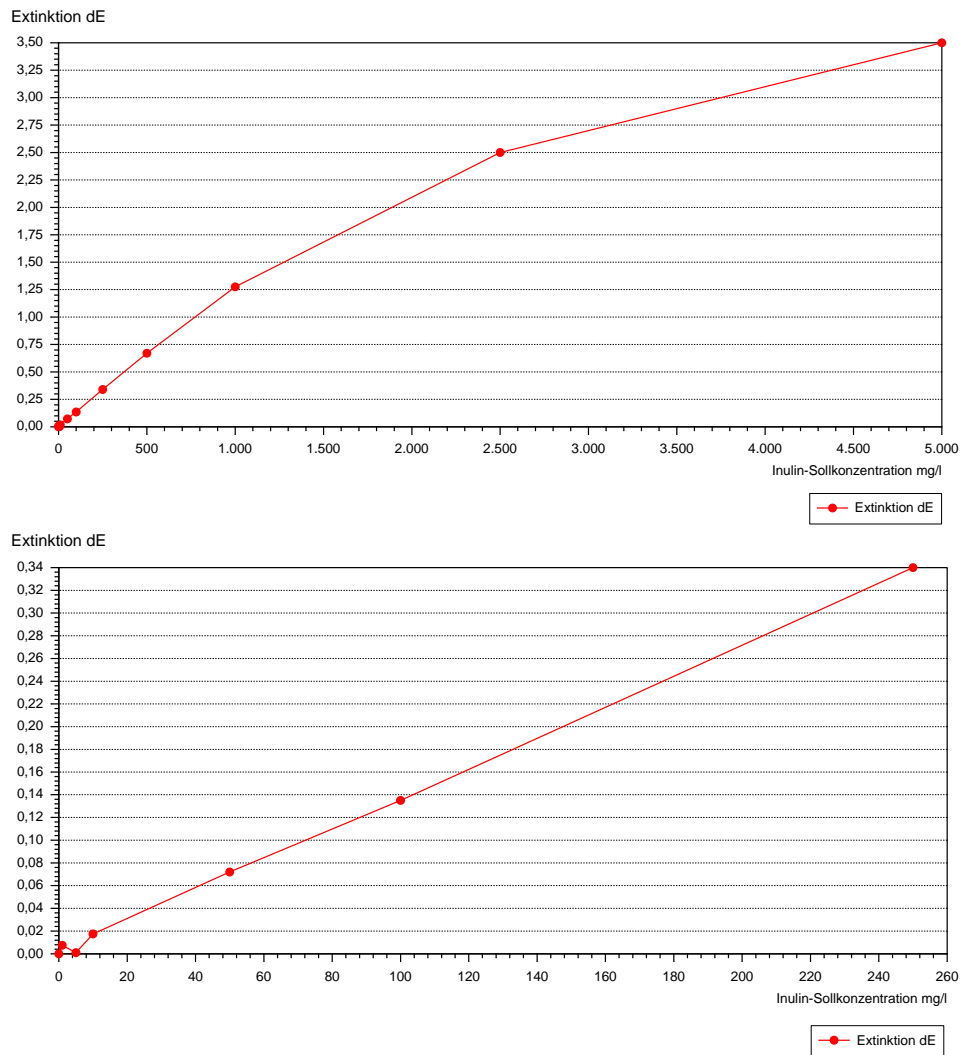


Fig. 17: Eichkurve für die Inulinmessung am Photometer; unten niedriger Konzentrationsbereich.

3.5.2 Faktorberechnung

Ein weiterer Weg, um von der Extinktion ΔE zur Konzentration C zu gelangen ist die Multiplikation mit einem Faktor, der sich empirisch bestimmen oder theoretisch berechnen läßt:

Für die Berechnung der Konzentration gilt:

$$C = k \cdot \Delta E \quad (7)$$

Der Faktor k berechnet sich theoretisch nach folgender Formel:

$$k = \frac{MG \cdot V_{gesamt} \cdot F}{\varepsilon \cdot d \cdot V_{Probe}}$$

3.5.2.1 Faktor für die manuelle Bestimmung nach Kühnle Für die Bestimmung mit dem Boehringer Testkit ergeben sich folgende Werte: Molekulargewicht von Fructose: $MG = 180,16 \frac{mg}{mmol}$; Küvettenvolumen: $V_{gesamt} = 1440 \mu l$; Verdünnungsfaktor $F = 1$; molarer Extinktionskoeffizient von $NADPH_2$ bei 365 nm Wellenlänge: $\varepsilon_{365nm} = 3,5 \frac{l}{mmol \cdot cm}$; Schichtdicke $d = 1$ cm, eingesetztes Probenvolumen $V_{Probe} = 100 \mu l$. Mit diesen Werten ergibt sich ein Faktor von $k = 741,23$ für die Handverarbeitung mit dem Testkit aus der Lebensmittelchemie.

3.5.2.2 Faktor für die manuelle modifizierte Bestimmung mit dem Testkit von Human Der Puffer des Testkits der Firma Human arbeitet mit NAD^+ als Protonenakzeptor. Die von Kühnle vorgeschlagene Methode mit dem Testkit der Firma Boehringer Mannheim benutzt $NADP^+$. Die molaren Extinktionskoeffizienten sind für $NADPH_2$ und $NADH_2$ nahezu identisch (Löffler, 1990).

Für die Bestimmung per Hand mit dem Testkit der Firma Human ergeben sich folgende Werte: Molekulargewicht von Fructose: $MG = 180,16 \frac{mg}{mmol}$; Küvettenvolumen: $V_{gesamt} = 2904 \mu l$; Verdünnungsfaktor $F = 1$; molarer Extinktionskoeffizient von $NADH$ bei 365 nm Wellenlänge: $\varepsilon_{365nm} = 3,5 \frac{l}{mmol \cdot cm}$; Schichtdicke $d = 1$ cm, eingesetztes Probenvolumen $V_{Probe} = 100 \mu l$. Mit diesen Werten ergibt sich ein Faktor von $k = 1494,81$.

3.5.2.3 Faktor für die maschinelle Bestimmung am Mitsubishi Super Z 818 Für die maschinelle Bestimmung von Inulin mit dem Testkit der Firma Human sollte gelten: Molekulargewicht von Fructose: $MG = 180,16$ mg/mmol; Küvettenvolumen: $V_{gesamt} = 355 \mu l$; Verdünnungsfaktor $F = 1$; molarer Extinktionskoeffizient von $NADH$ bei 340 nm Wellenlänge: ε_{340nm}

3 ERGEBNISSE 3.5 Ermittlung der Konzentration aus der Extinktion

= $6,3 \frac{l}{mmol \cdot cm}$; Schichtdicke $d = 0,6$ cm, eingesetztes Probenvolumen $V_{Probe} = 10 \mu l$. Mit diesen Werten ergibt sich ein Faktor von $k = 1691,98$.

Der Analysenautomat liefert jedoch keine echten Extinktionen; die ausgegebenen Werte sind lediglich der Extinktion proportional. Der Faktor $k = 1691,98$ führt zu einer etwa 30%-igen Überschätzung der tatsächlichen Konzentration. Prinzipiell ist es möglich, den Faktor anzupassen.

Es gilt die Formel:

$$k = \frac{C_{Soll}}{\Delta E} \quad (8)$$

Da zu Beginn der Messungen ein unabhängiger Standard bekannter Konzentration schlecht zu beschaffen war und nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stand, haben wir zunächst die Berechnung des Faktors zur Ermittlung der Konzentration benutzt. Hierbei wurden immer Richtigkeitskontrollen mitgeführt.

Eine Probe der wässrigen Standardlösung, die uns Laevosan zur Verfügung gestellt hat, wurde mehrfach an verschiedenen Tagen gemessen. Diese Standardlösung hatte eine von Laevosan angegebene Soll-Inulinkonzentration von 992 mg/l. Die "Extinktionswerte", die in den verschiedenen Meßreihen für diesen Standard gemessen wurden, hatten einen Mittelwert von 0,791. Die Soll-Konzentration, dividiert durch 0,791 ergibt 1254,11 als Faktor, der fortan im Automaten benutzt wurde, um die korrekte Konzentration zu ermitteln.

Zur Qualitätskontrolle sollten bei allen Messungen Präzisions- und Richtigkeitskontrollen mitgeführt werden. Da ausreichende Mengen Standardlösung nicht zur Verfügung standen, wurde eine solche Kontrolllösung selbst angesetzt. In einen 2000 ml Meßkolben wurden 8 ml Inutest-Lösung mit 1992 ml Aqua dest verdünnt (2 g Inutest auf 2000 ml Aqua dest.) . Die Lösung wurde gut gemischt, in 10 ml Portionen in Kunststoff-Reagenzröhrchen abgefüllt und bei $-18^{\circ}C$ für zukünftigen Gebrauch eingefroren. Die Konzentration dieser Kontrolllösung wurde in den Messreihen zur Ermittlung des Faktors mitbestimmt: Es wurde immer im Wechsel eine Probe der Standardlösung und eine Probe der selbst hergestellten Kontrolllösung gemessen. Unter Berücksichtigung des Faktors von 1254,11 ergab sich für die Kontrolllösung eine Konzentration von $C = 1111$ mg/l. Diese Lösung wurde als Präzisions- und Richtigkeitskontrolle bei den Bestimmungen eingesetzt. Lagen bei den Messungen die Werte dieser Kontrolllösung nicht innerhalb des Bereiches der dreifachen Standardabweichung, so wurden die Werte verworfen und die Messung wiederholt.

Die Richtigkeit dieser Konzentration hat uns Laevosan durch eigene Analysen bestätigt. Der Mittelwert einer Dreifachbestimmung lag in deren Labor bei 1098 mg/l. Ein weiterer Versuch, diese Kontrolllösung bei Bioscientia

in Ingelheim mit einer Anthron-Methode validieren zu lassen scheiterte, da laut Bioscientia die Konzentration in der Probe für die dort verwendete Methode zu gering sei.

Wir haben diese selbst hergestellte wässrige Kontrollösung nicht als Standard zur Kalibration des Gerätes eingesetzt, um keinen systematischen Fehler entstehen zu lassen. Wir mußten daher mit dem angepaßten Faktor arbeiten und haben die Funktion des Gerätes mit der Kontrollösung bei jeder Messung überprüft.

Nachdem uns Laevosan freundlicherweise ausreichend Standardproben zur Verfügung gestellt hat, wurde die Bestimmung am Automaten auf die automatische Standardkalibration umgestellt.

3.5.2.4 Automatische Standardkalibration Der Analysenautomat kann eine Standardkalibration automatisch bei der Bestimmung durchführen. Hierzu werden bei jeder Messung ein oder mehrere Standards definierter Konzentration mitgeführt. Der Automat mißt die Extinktion von Reagenzienleerwerten und den Standards und erstellt aus den ihm bekannten Konzentrationen eine Eichkurve. Die Extinktion der Proben wird dann bereits vom Automaten auf die Eichkurve bezogen und eine Konzentration für die Probe ausgegeben.

Eine automatische Standardkalibration, die bei jeder Bestimmung neu durchgeführt wird, ist jedoch die verlässlichere Alternative und einer rechnerischen Anpassung vorzuziehen.

Es wurde eine Eichkurve des Automaten mit 10-fach Bestimmung der gleichen Proben erstellt. Die Ergebnisse zeigen Tabelle 4 und Abbildung 18.

3.6 Validierung - Qualitätskontrolle

3.6.1 Vergleich wässriger Lösungen mit dotierten Plasmaproben

Es war zu klären, ob es systematische Unterschiede zwischen Serum- bzw. Plasmaproben und wässrigen Lösungen gibt. Das käuflich erhältliche Kontrollserum Qualitrol von Merck, Darmstadt und Humanserum wurde mit verschiedenen Mengen Inutest dotiert und eine Eichkurve erstellt. Diese wurde mit einer wässrigen Verdünnungsreihe verglichen. Anschließend wurde der Leerwert von Qualitrol mit dem Leerwert von Aqua dest. verglichen.

Aus Tabelle 5, 6,7 und 8 läßt sich ersehen, daß die Wiederfindung nicht beeinträchtigt ist. Die Schwankungen in der Konzentration von Qualitrol und wässriger Lösung sind auch hier als Pipettierfehler zu werten, da Inutest

| Sollkonz. (mg/l) | Mittelwert (mg/l) | Median (mg/l) | Standardabweichung | VK (%) |
|------------------|-------------------|---------------|--------------------|--------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 1 | 6.5 | 3.39 | 0.78 | 12.00 |
| 5 | 7.1 | 4.83 | 1.01 | 14.22 |
| 10 | 6.25 | 5.34 | 0.91 | 14.56 |
| 50 | 55.86 | 56.94 | 3.28 | 5.87 |
| 100 | 106.98 | 105.87 | 5.84 | 5.46 |
| 250 | 256.92 | 261.12 | 13.67 | 5.32 |
| 500 | 491.27 | 494.66 | 17.64 | 3.59 |
| 750 | 773.57 | 777.56 | 15.13 | 1.96 |
| 1000 | 984.18 | 987.53 | 41.5 | 4.22 |

Tab. 4: Meßwerte einer Inulin-Verdünnungsreihe (n=10)

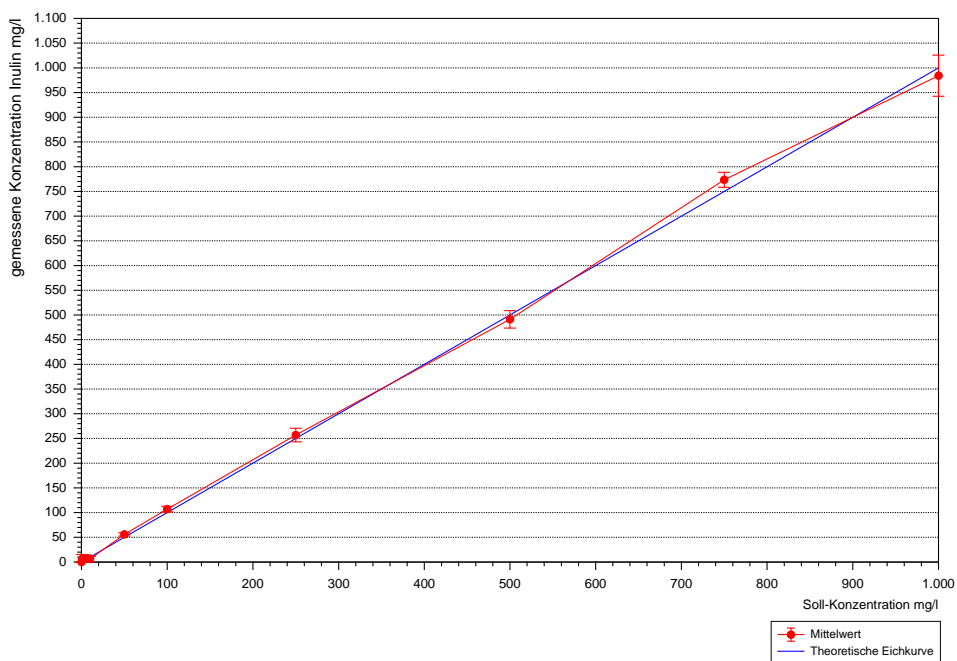


Fig. 18: Präzisionsmessung einer Eichkurve für Inulin mit Laborautomat Mitsubishi Super Z

für diesen Versuch von seiner Konzentration von 250.000 mg/l in der Ampulle stark verdünnt werden mußte.

| Inulin Soll Konzentration (mg/l) | Inulin gemessene Konzentration (mg/l) | Abweichung (%) |
|----------------------------------|---------------------------------------|----------------|
| 0 | 0.560 | |
| 10 | 13.458 | 34.6 |
| 50 | 52.089 | 4.2 |
| 100 | 103.974 | 4.0 |
| 500 | 495.416 | -0.9 |
| 1000 | 969.954 | -3.0 |

Tab. 5: Wiederfindung in wässriger Lösung

| Inulin Soll Konzentration (mg/l) | Inulin gemessene Konzentration (mg/l) | Abweichung (%) |
|----------------------------------|---------------------------------------|----------------|
| 0 | 1.37 | |
| 10 | 12.791 | 27.9 |
| 50 | 52.627 | 5.3 |
| 100 | 98.676 | -1.3 |
| 500 | 489.726 | -2.1 |
| 1000 | 976.354 | -2.4 |

Tab. 6: Wiederfindung in Humanserum

Der Leerwert von Qualitrol liegt mit 0,56 mg/l im Bereich des Reagenzienleerwertes, und damit im gleichen Bereich wie der Leerwert von Humanserum und Wasser.

3.6.2 Standardaddition

Um eine Eichkurve messen zu können, wurde eine Verdünnungsreihe von Inulin in Qualitrol Kontrollserum hergestellt und gemessen. Zu 150 μ l Probe der verschiedenen Konzentrationen wurden dann 50 μ l der von Laevosan gelieferten Standardlösung (Konzentration: 992 mg/l Inulin) hinzugefügt und diese Proben wiederum gemessen.

Da gleichzeitig mit dem Standard allerdings auch Flüssigkeit zugeführt wird, mit der die Probe verdünnt wird, und sich diese Verdünnung bei

| Inulin Soll Konzentration (mg/l) | Inulin gemessene Konzentration (mg/l) | Abweichung (%) |
|----------------------------------|---------------------------------------|----------------|
| 0 | 0.730 | |
| 10 | 14.120 | 41.2 |
| 50 | 50.954 | 1.9 |
| 100 | 103.058 | 3.1 |
| 500 | 515.364 | 3.1 |
| 1000 | 981.548 | -1.8 |

Tab. 7: Wiederfindung in Qualitrol N Kontrollserum

| Leerwerte von | Inulinkonz. (mg/l) |
|---------------|--------------------|
| Aqua dest. | 0.73 |
| Humanserum | 1.37 |
| Qualitrol N | 0.56 |

Tab. 8: Nullwerte von Aqua dest., Humanserum und Qualitrol N

kleineren Konzentrationsunterschieden (also im Bereich von 1000 mg/l) stärker bemerkbar macht als bei geringen Konzentrationen, ist zu erwarten, daß die Eichkurve mit addiertem Standard nicht parallel zu der ohne Standardaddition laufen wird. Sie wird sich dieser vielmehr bei höheren Konzentrationen nähern.

Korrigiert man die gemessenen Werte mit dem Verdünnungsfaktor, so laufen die Geraden parallel. Subtrahiert man den Standard rechnerisch, so liegt die Gerade, die man erhält, sehr dicht bei der Ausgangsgerade der Proben ohne Standardaddition.

Der gemessene Wert sollte bei den um den Verdünnungsfaktor korrigierten Werten theoretisch 248 mg/l höher liegen als in den Proben ohne Addition dieses Standards.

Die Ergebnisse zeigen Tabelle 9 und Abbildung 19.

3.6.3 Haltbarkeit der Reagenzien

Die angesetzten Reagenzienlösungen sind nach Kühnle (1992) und Kamoun (1995) etwa 14 Tage haltbar; Dies sollte für unsere modifizierten Lösungen verifiziert werden.

| Soll | ohne Addition | mit Addition | mit Addition, Verdünnungsfaktor korrigiert | mit Addition, Verdünnungsfaktor korrigiert und Standard subtrahiert | Abweichung Spalte 2 auf Spalte 5 (%) |
|------|---------------|--------------|--|---|--------------------------------------|
| 0 | 1 | 248.75 | 249 | 1 | 0 |
| 10 | 6.25 | 253.35 | 255.13 | 7.13 | 14.1 |
| 50 | 55.86 | 292.22 | 306.96 | 58.96 | 5.5 |
| 100 | 106.98 | 325.67 | 351.56 | 103.56 | -3.2 |
| 250 | 252.92 | 444.02 | 509.36 | 261.36 | 3.3 |
| 500 | 491.27 | 612.74 | 734.32 | 486.32 | -1.0 |
| 750 | 773.57 | 822.09 | 1013.45 | 765.45 | 1.1 |
| 1000 | 984.18 | 982.36 | 1227.14 | 989.14 | 0.6 |

Tab. 9: Standardaddition von 2,48 mg in 50 μ l zur Verdünnungsreihe; Alle Konzentrationen in mg/l

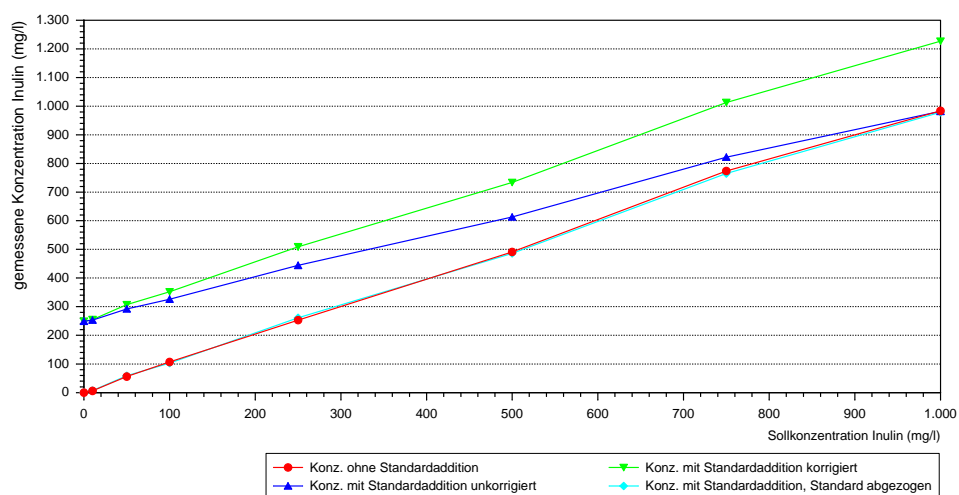


Fig. 19: Standardaddition von 2,48 mg in 50 μ l zur Verdünnungsreihe

Es wurde ein Qualitrol Kontrollserum mit Inulin dotiert, um eine Konzentration von ca. 1000 mg/l Inulin zu erhalten. Es wurde ein Reagenzienansatz frisch hergestellt und dieses Kontrollserum sofort gemessen. Der Reagenzienansatz wurde im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt, das Kontrollserum wurde bei -18°C eingefroren. Die Messung wurde nach 7, 10, 14, 17, 21 und 28 Tagen mit dem gleichen Kontrollserum und dem im Kühlschrank gelagerten Reagenziensatz wiederholt. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 20.

Die Wiederfindung ist nach 17 Tagen herabgesetzt. Nach 15 Tagen Lagerung zeigen sich noch keine Änderungen an der Konzentration. Es ist daher zu empfehlen, die angesetzten Reagenzien nicht länger als 14 Tage zu benutzen.

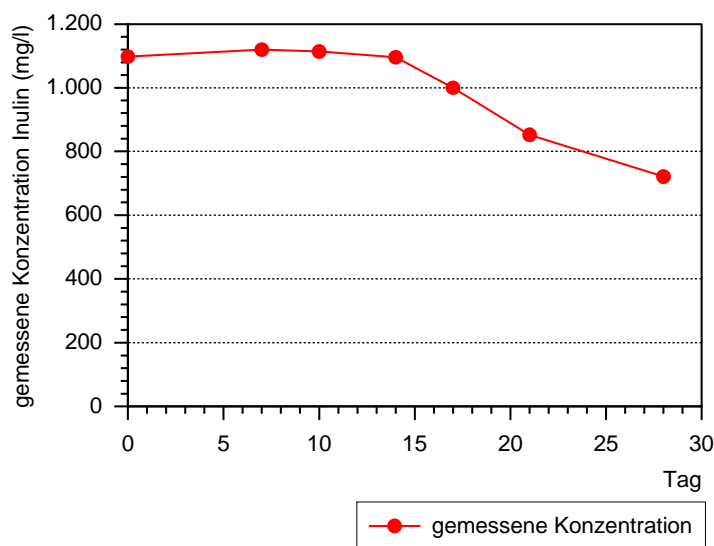


Fig. 20: Reagenzienhaltbarkeit im Kühlschrank bei +4°C

3.6.4 Haltbarkeit des Inulins in menschlichem Probenmaterial

Inulin ist ein chemisch inerte Stoff, der im Körper keiner Verstoffwechslung unterliegt. Die Haltbarkeit von Inulin in menschlichem Probenmaterial ist in der Vergangenheit gut untersucht worden (Gretz, 1992; Kühnle, 1992; Cheek, 1966). Alle Arbeiten kamen zu dem Schluß, daß Inulin in Serum, Urin oder wässriger Lösung fast unbegrenzt haltbar ist, wenn die Probe bei -18°C gelagert wird. Eine Inulinprobe hält sich auch bei +4°C im Kühlschrank mehrere Wochen. Hier muß man allerdings eine mögliche bakterielle Besiedelung des Serums berücksichtigen, durch die das Inulin möglicherweise abgebaut und die Probe getrübt wird. Probenmaterial

sollte daher immer bei -18°C eingefroren werden. Abbildung 21 zeigt die gemessenen Konzentrationen bei Lagerung bei -18°C über 4 Monate.

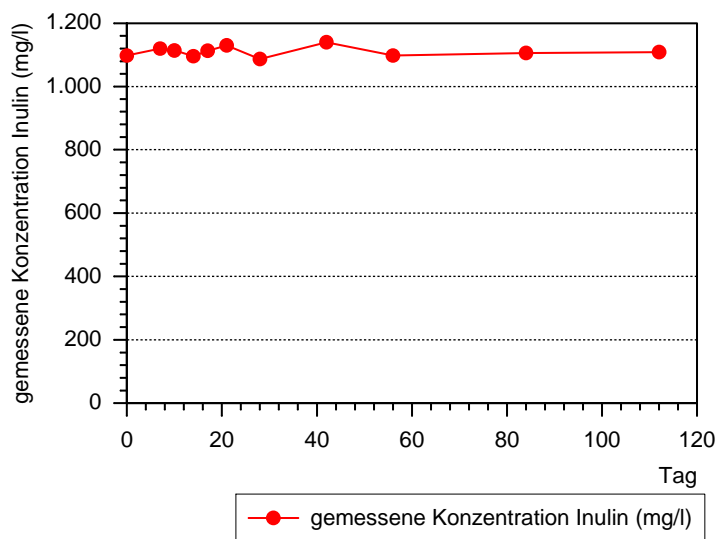


Fig. 21: Probenhaltbarkeit bei -18°C über 4 Monate

3.6.5 Variabilität von Tag zu Tag

Um für Untersuchungen möglicher Störungsquellen eine Probe gleicher Konzentration zu haben, wurde erneut die von Laevosan zur Verfügung gestellte Inulin-Kontrollösung mit einer Konzentration von 992 mg/l verwendet.

Die Konzentration dieser Kontrolle wurde bei allen Bestimmungen mit bestimmt. Tabelle 11 zeigt die gemessenen Konzentrationen dieser Probe an 40 aufeinanderfolgenden Meßtagen. Die Statistik dieser Messungen zeigt Tabelle 12.

Abbildung 22 zeigt die Variabilität von Tag zu Tag vom Mittelwert aus aufgetragen.

3.6.5.1 Variationskoeffizienten und Standardabweichung

Der Variationskoeffizient VK

$$VK = \frac{100s}{\bar{x}} \quad (9)$$

| Tag Nr | Konzentration |
|--------|---------------|
| 1 | 978 |
| 2 | 1043 |
| 3 | 995 |
| 4 | 1005 |
| 5 | 992 |
| 6 | 987 |
| 7 | 991 |
| 8 | 994 |
| 9 | 1008 |
| 10 | 1039 |
| 11 | 995 |
| 12 | 1030 |
| 13 | 1012 |
| 14 | 1001 |
| 15 | 978 |
| 16 | 968 |
| 17 | 978 |
| 18 | 1008 |
| 19 | 1031 |
| 20 | 1034 |
| 21 | 987 |
| 22 | 998 |
| 23 | 1006 |
| 24 | 1031 |
| 25 | 1034 |
| 26 | 987 |
| 27 | 994 |
| 28 | 1025 |
| 29 | 978 |
| 30 | 988 |
| 31 | 986 |
| 32 | 975 |
| 33 | 1012 |
| 34 | 998 |
| 35 | 996 |
| 36 | 1015 |
| 37 | 982 |
| 38 | 1042 |
| 39 | 1024 |
| 40 | 972 |

Tab. 11: Variabilität der Inulinkonzentration der 992 mg/l Laevosan-Kontrolle von Tag zu Tag 57

| | |
|------------------------|---------|
| Mittelwert \bar{x} | 1000.95 |
| Median | 997.00 |
| kleinster Wert | 968.00 |
| größter Wert | 1043.00 |
| Anzahl | 40 |
| Standardabweichung s | 20,29 |
| $\bar{x} - 2s$ | 960.37 |
| $\bar{x} + 2s$ | 1041.53 |

Tab. 12: Statistik der Variabilität von Tag zu Tag

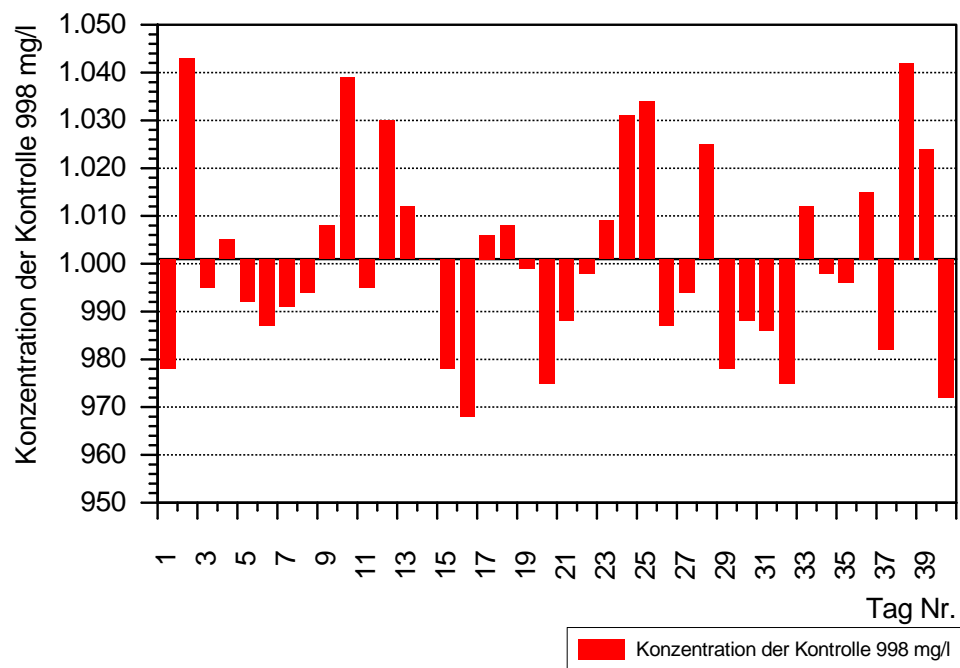


Fig. 22: Variabilität von Tag zu Tag der 998 mg/l Inulin-Kontrolle in der Übersicht (vom Mittelwert ausgehend)

ist zusammen mit der Standardabweichung ein Maß für die Präzision, mit der gemessen wird. Diese beiden Parameter beschreiben damit die Größe des zufälligen Fehlers bei der Bestimmung. Hierunter fallen alle technischen Mängel während der Analyse. Ungenau pipettieren, Photometerschwankungen durch Änderung der Netzspannung und andere Fehler führen zu einer verminderten Meßpräzision. Bei der Berechnung der Präzision von Tag zu Tag mit der wässrigen Kontrolllösung ergibt sich nach der nachfolgenden Tabelle ein Variationskoeffizient zwischen 1,96% und 14,56%. Die Werte unter 10 mg/l schwanken stärker als höhere Werte. Die Mittelwerte stimmen in diesem Bereich schlecht mit der Sollkonzentration überein, da es sich um dotierte Proben handelt, für die das Inulin teilweise 1:250.000 verdünnt werden mußte. Der Pipettierfehler dürfte hierbei erheblich sein.

Tabelle 13 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten 10-fach Bestimmungen von Inulin bei verschiedenen Entnahmezeiten, Abbildung 23 zeigt die Abnahme des Variationskoeffizienten bei steigender Inulin Plasmakonzentration.

| Sollkonz. (mg/l) | Mittelwert (mg/l) | Median (mg/l) | Standardabweichung | VK (%) |
|------------------|-------------------|---------------|--------------------|--------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 1 | 6.5 | 3.39 | 0.78 | 12.00 |
| 5 | 7.1 | 4.83 | 1.01 | 14.22 |
| 10 | 6.25 | 5.34 | 0.91 | 14.56 |
| 50 | 55.86 | 56.94 | 3.28 | 5.87 |
| 100 | 106.98 | 105.87 | 5.84 | 5.46 |
| 250 | 256.92 | 261.12 | 13.67 | 5.32 |
| 500 | 491.27 | 494.66 | 17.64 | 3.59 |
| 750 | 773.57 | 777.56 | 15.13 | 1.96 |
| 1000 | 984.18 | 987.53 | 41.5 | 4.22 |

Tab. 13: Variationskoeffizienten für verschiedene Konzentrationen: Meßwerte einer Inulin-Verdünnungsreihe (n=10)

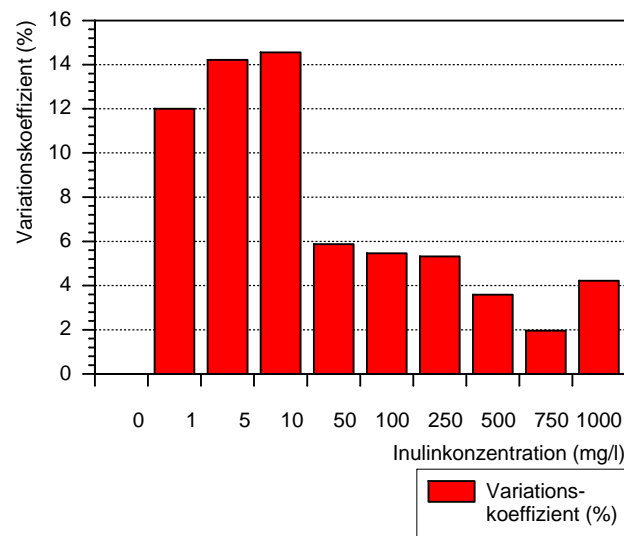


Fig. 23: Variationskoeffizienten in der Übersicht

3.6.6 Störquellen

3.6.6.1 Blutglucose Die im Blut vorhandene Glucose stört die Messung. Sie wird daher, wie in Kapitel 3.4.1 auf Seite 41 beschrieben, während der Vorinkubation durch die Glucoseoxidase entfernt. Es soll noch genauer untersucht werden, welche Blutglucosekonzentration im Serum gerade noch sicher durch diesen Oxidationsschritt entfernt werden kann. Hierzu wurde Qualitrol Kontrollserum, das kein Inulin enthielt, mit steigenden Mengen mit 5%-iger Glucose-Infusionslösung nach folgendem Pipettierschema versetzt. Der Glucosegehalt dieser Proben wurde am Kodak Ektachem gemessen und die Proben anschließend gemäß der Anleitung zur Inulinbestimmung inkubiert. Nach 20 min bei einer Temperatur von 56°C wurden die Proben am Kodak Ektachem wiederum auf ihren Glucosegehalt überprüft.

Tabelle 14 zeigt, daß in einer Probe bis zu 600 mg/dl Glucose enthalten darf, damit sie in der Vorinkubation noch sicher entfernt wird. Höhere Konzentrationen werden nicht komplett umgesetzt und somit gelangt Glucose in die Küvette, wird in NADH_2 umgesetzt und führt zu falsch hohen Werten.

3.6.6.2 Phosphoglucose-Isomerase i.S. Kamoun (1995) wies darauf hin, daß zur Vorinkubation des Inulins die 60-minütige Inkubation bei 37°C verlassen werden sollte, da durch die niedrigere Temperatur die physiologisch im Serum vorkommende Phosphoglucose-Isomerase nicht inaktiviert werde. Die Aktivität dieses Enzyms sei bei einigen malignen Erkrank-

| Glucosekonz. vor Inkub. (mg/dl) | Glucosekonz. nach Inkub.(mg/dl) |
|---------------------------------|---------------------------------|
| 100 | 0 |
| 200 | 1 |
| 300 | 0 |
| 400 | 2 |
| 500 | 0 |
| 600 | 2 |
| 700 | 10 |
| 800 | 31 |
| 900 | 33 |
| 1000 | 49 |

Tab. 14: Elimination des Störfaktors Glucose aus der Probe (Mittelwerte; n=3)

kungen erhöht und könne die Bestimmung stören. Durch Inkubation bei 56 °C wird dieses Enzym inaktiviert und der Störfaktor beseitigt.

Versuche mit identischen Proben, die bei 37°C und bei 56°C inkubiert wurden ergaben bei unserem Patientenkollektiv nahezu identische Werte. (Siehe Kapitel 3.4.1 Glucoseelimination auf Seite 41)

3.6.6.3 Hämolytische Seren Da in der Pädiatrie besonders bei kleinen Patienten die Blutentnahme schwierig sein kann, sind die Proben gelegentlich hämolytisch. Es ist daher wichtig zu untersuchen, ob freies Hämoglobin in der Probe die Bestimmung stört.

Eine mit Heparin ungerinnbar gemachte Blutprobe wurde zentrifugiert und der Überstand an Plasma verworfen. Die Erythrozyten wurden mit physiologischer Natriumchloridlösung versetzt und wieder zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt, der Überstand jeweils verworfen. 2 ml dieses Erythrozytenkonzentrates wurden daraufhin durch Zugabe von 2 ml Aqua dest hämolysiert. Der Hb-Gehalt dieses Hämolysats lag bei 4,4 g/dl (im hämatologischen Labor vom Abbot CD 1500 Zählgerät bestimmt).

Kontrollserum für Inulin (Soll 19,4 mg/l) wurde mit 0, 1, 5, 10, 15, 20 bzw. 30µl dieses Hämolysats versetzt. Es entstanden deutlich sichtbare, zum Teil dunkelrote Färbungen.

Die Proben wurden dann inkubiert und am Automaten vermessen. Nach Korrektur der Verdünnung durch die Zugabe der hämolytischen Lösung ergeben sich für die Proben die in Tabelle 15 aufgeführten Konzentrationen.

Der gleiche Versuch wurde mit Inulin-freiem Qualitrol durchgeführt um den Einfluß von Hämolyse auf den Nullwert zu erfassen.

| Hb i.S. (g/dl) | Nullwert Inulin (mg/l) | Wiederfindung Inulinkonz. (mg/l) |
|-------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| 0 | 0.9 | |
| 0.1 | 0.15 | 19.66 |
| 0.2 | 0 | |
| 0.4 | 0 | |
| 1 | 1.29 | |
| 1.1 | 0.23 | 18.88 |
| 1.7 | 0.19 | 19.90 |

Tab. 15: Nullwertbestimmung und Wiederfindung bei hämolytischen Proben; Inulinsollkonzentration in der Wiederfindung: 19,4 mg/l

Hämolyse beeinflusst offensichtlich weder den Nullwert noch die Wiederfindung und stellt somit keinen Störfaktor dar.

3.6.6.4 Lipämische Seren Um den Einfluß der Trübung durch im Plasma vorhandene Lipide überprüfen zu können, mußte ein Serum hergestellt werden, das bei definierter Inulinkonzentration in aufsteigender Konzentration mit Lipiden getrübt war. Ein Qualitrol-Kontrollserum (Sollkonzentration 19,4 mg/l) wurde nun mit steigenden Mengen Intralipid, einer milchigen Infusionslösung zur Fettsubstitution, versetzt. Tabelle 16 zeigt die Meßergebnisse.

| Intralipid 10 % + Qualitrol Verhältnis | Nullwert Inulin (mg/l) | Wiederfindung, Inulinkonz. (mg/l) |
|---|---------------------------|--------------------------------------|
| 1:10 | 0.22 | 19.09 |
| 1:100 | 0.3 | 18.47 |

Tab. 16: Nullwertbestimmung und Wiederfindung bei lipämischen Proben; Inulinsollkonzentration in der Wiederfindung (ohne Intralipid): 19,4 mg/l

Lipämie scheint ebenso keinen Einfluß auf die Bestimmung zu haben. Ein Grund ist hier möglicherweise auch, daß die Trübung durch die Micellen vor der Messung im Photometer durch die Reagenzien nochmals verdünnt wird, so daß sie sich nicht so stark bemerkbar machen kann.

3.6.6.5 Ikterische Seren Die Untersuchung, ob Gallenfarbstoffe die Bestimmung des Inulins stören, ist besonders wichtig für Untersuchungen bei kleinen Kindern. Frühgeborene und Neugeborenen haben ein noch nicht

voll ausgereiftes Enzymsystem zur Ausscheidung des Bilirubins. Die Glucuronyltransferase, die Bilirubin und andere Stoffe mit Glucuronsäure in der Phase 2 der Ausscheidung in der Leber konjugiert, hat noch nicht die volle Aktivität. Bilirubin steigt im Serum an. Ein physiologischer Ikterus tritt bei der Hälfte aller Reifgeborenen zwischen 2. und 3. Lebenstag auf und dauert 3-4 Tage.

Ein häufiges Problem der Neonatologie ist der Ikterus prolongatus. Gerade Früh- und unreife Neugeborene entwickeln oft einen behandlungsbedürftigen Ikterus.

Der Einfluß eines durch Gallenfarbstoffe verfärbten Serums auf die Bestimmung ist daher eine mögliche Fehlerquelle und sollte daher bekannt sein.

Um aufsteigende Konzentrationen eines ikterischen Serums zu erhalten wurde Qualitrol Kontrollserum mit verschiedenen Mengen des Serums eines kleinen Patienten mit Ikterus versetzt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 17.

| Bilirubin-ges. i.S. (mg/dl) | Nullwert Inulin (mg/l) | Wiederfindung Inulin (mg/l) |
|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|
| 18.08 | 1.29 | 19.92 |
| 15.08 | 5.44 | 18.45 |
| 14.74 | 0.93 | 19.96 |

Tab. 17: Nullwertbestimmung und Wiederfindung bei ikterischen Proben; Inulinsollkonzentration in der Wiederfindung bei normalem Bilirubin: 19,4 mg/l

Die Wiederfindung und der Nullwert scheinen nicht beeinträchtigt zu sein; die Schwankungen sind wiederum dem Pipettierfehler zuzurechnen.

Zum Vergleich zeigt die Nullwertbestimmung und Wiederfindung bei normalem Probenmaterial Tabelle 18.

| Probenmaterial | Nullwert Inulin (mg/l) | Wiederfindung Inulin (mg/l) |
|-----------------------|------------------------|-----------------------------|
| Qualitrol | 0.31 | 19.40 |
| Humanserum | 0.28 | 18.90 |
| Humanplasma (Heparin) | 0.35 | 19.30 |
| physiol. NaCl-Lösung | 0.22 | 19.70 |

Tab. 18: Nullwertbestimmung und Wiederfindung bei normalem Probenmaterial; Inulinsollkonzentration in der Wiederfindung: 19,4 mg/l

Zusammenfassend werden die Ergebnisse der Untersuchung der Störquellen Hämolyse, Bilirubin und Lipämie sowie Vergleiche zwischen Kontrollserum und Humanserum und -plasma in Abbildung 24 dargestellt.

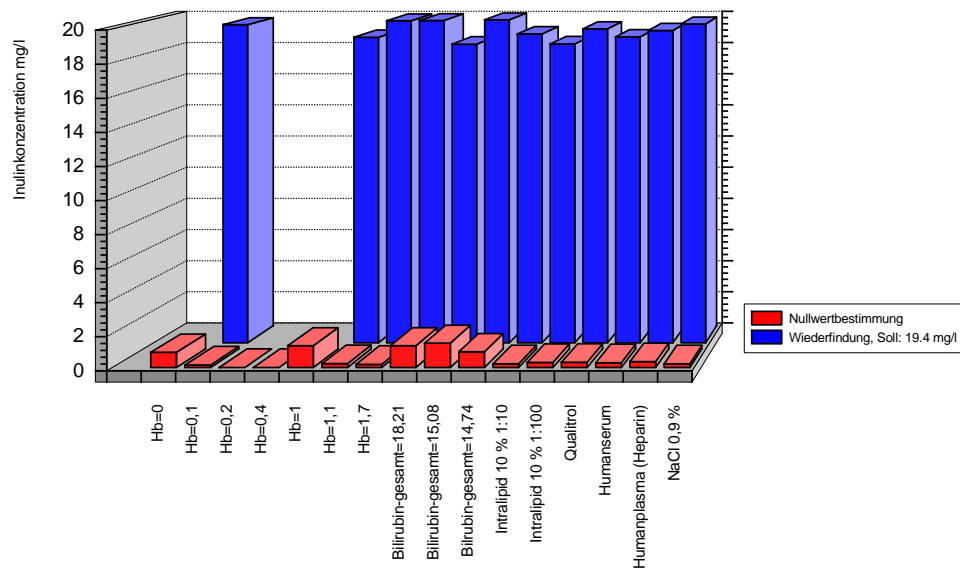


Fig. 24: Der Einfluß von Hämolyse, Lipämie, Bilirubin auf Wiederfindung und Nullwert

3.6.6.6 Antikoagulanzen Blutparameter werden heute in Vollblut, Serum oder Plasma bestimmt. Inulin kann in Serum oder Plasma bestimmt werden, Vollblut eignet sich aufgrund der festen Blutbestandteile nicht für eine direkte photometrische Untersuchung. Zur Plasmagewinnung wird die Blutprobe durch Verwendung von speziellen Blutentnahmeröhrchen (Saarstedt Monovetten, Vacutainer-System), die das Antikoagulans bereits enthalten, schon während der Blutentnahme ungerinnbar gemacht. Der Einfluß der Antikoagulanzen auf die Bestimmung ist also bei Bestimmungen aus Plasma sehr wichtig.

Es wurde für jedes Antikoagulans eine Inulin Verdünnungsreihe mit dem entsprechenden Plasma angefertigt und jede Probe 10 mal gemessen.

Um die Frage zu klären, ob diese Antikoagulanzen eventuell den Nullwert verändern, wurden neue, unbenutzte Röhrchen geöffnet und mit einer Pipette Antikoagulanzen entnommen.

50 μ l jedes dieser Antikoagulanzen werden direkt als Probe inkubiert und vermessen.

Die Ergebnisse zeigen die Tabelle 19, die Statistik findet sich in Tabelle 20. Abbildung 25 zeigt die gemessenen Plasmaspiegelverläufe graphisch.

Die Ergebnisse zeigen, daß diese Antikoagulanzen mit Ausnahme von ACD keine Fehlerquelle für die Bestimmung darstellen. Bei Citrat ist zu beachten, daß die Blutprobe durch das große Volumen an Natriumcitrat im Blutentnahmeröhrchen im Verhältnis 9+1 verdünnt wird, was bei der

| Sollkonz. | wässrig | Serum | ACD | EDTA | Heparin | Citrat |
|-----------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|
| 0 | 0 | 0 | 532.56 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 9.16 | 12.88 | 553.11 | 15.10 | 14.95 | 13.72 |
| 50 | 57.65 | 60.68 | 602.07 | 62.50 | 61.85 | 56.82 |
| 100 | 104.45 | 103.56 | 642.01 | 106.67 | 105.63 | 96.97 |
| 250 | 261.57 | 257.91 | 795.64 | 267.93 | 265.33 | 243.58 |
| 500 | 492.55 | 493.88 | 1029.97 | 508.70 | 503.76 | 462.45 |
| 750 | 751.84 | 784.28 | 1322.14 | 807.81 | 799.96 | 734.37 |
| 1000 | 988.62 | 955.94 | 1497.33 | 984.62 | 975.06 | 895.11 |

Tab. 19: Der Einfluß von Antikoagulanzen auf die gemessene Inulin Konzentration (Mittelwerte; n=10); Einheit mg/l

| Sollkonz. (mg/l) | wässrig | Serum | ACD | EDTA | Heparin | Citrat |
|------------------|---------|-------|------|------|---------|--------|
| 0 | 0 | 0 | 5.10 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0.58 | 0.61 | 2.62 | 2.70 | 2.67 | 3.03 |
| 50 | 0.51 | 0.48 | 5.31 | 0.50 | 0.49 | 0.56 |
| 100 | 1.02 | 2.35 | 2.35 | 2.43 | 2.4 | 2.72 |
| 250 | 2.04 | 2.47 | 2.68 | 4.89 | 4.84 | 5.48 |
| 500 | 4.67 | 1.59 | 5.35 | 1.64 | 1.62 | 1.84 |
| 750 | 1.47 | 2.73 | 1.74 | 2.81 | 2.78 | 3.15 |
| 1000 | 26.48 | 3.82 | 4.17 | 3.93 | 3.90 | 4.42 |

Tab. 20: Standardabweichungen bei den Messreihen mit verschiedenen Antikoagulanzen

Konzentrationsberechnung berücksichtigt werden muß.

Um hier Mißverständnisse zu vermeiden empfiehlt es sich, die Proben generell als Serum oder Heparinplasma abzunehmen und nur im Notfall auf EDTA-K oder gar Citrat auszuweichen.

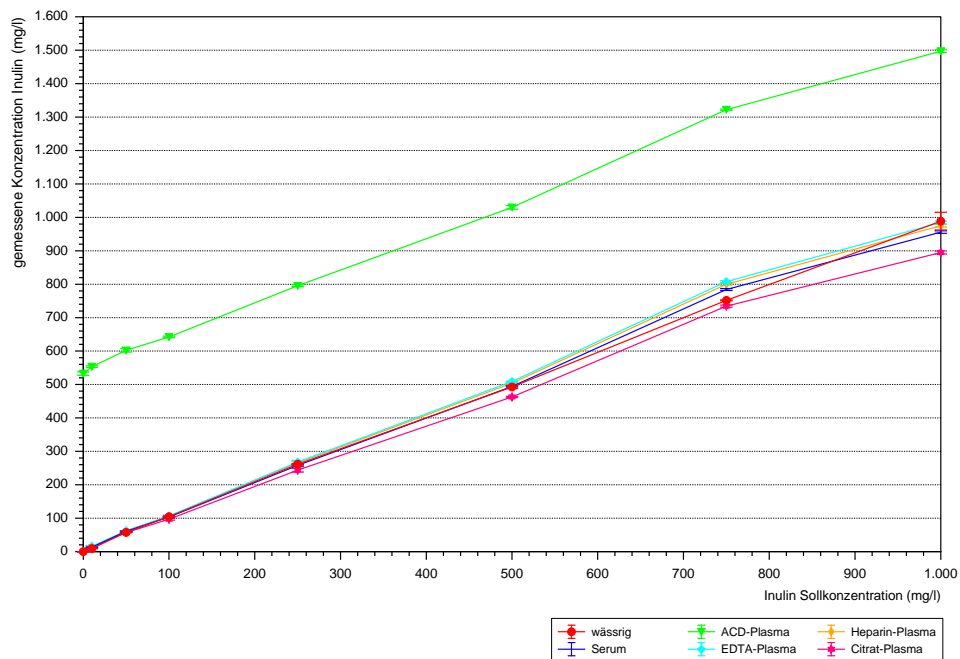


Fig. 25: Die Auswirkungen von Antikoagulanzen auf die Wiederfindung

ACD hingegen stört die Bestimmung. ACD wird von Blutspendediensten zur Gerinnungshemmung von Erythrozytenkonzentraten, Fresh-Frozen-Plasma (FFP), Thrombozytenkonzentraten und anderen Blutprodukten eingesetzt.

Die Blutspenden werden von den Blutspendediensten sorgfältig untersucht. Kleine Abweichungen von Normwerten bei Leberwerten oder ein positiver Lues-Screeningtest führen, obwohl sie unspezifisch sein können, ohne weitere Untersuchungen zum Ausschluß der Blutspende von der weiteren Verarbeitung und Verabreichung an Patienten.

Solche Blutspenden stehen aber prinzipiell experimentellen Laboruntersuchungen zur Verfügung. Wir haben, um den Verbrauch an teuren Kontrollseren zu vermeiden, den Blutspendedienst Hessen um eine ausgesonderte Plasma-Blutspende gebeten. Die Beeinflussung des Nullwertes führt zu einer Standardkurve, die parallel um etwa 500 mg/l in y-Richtung verschoben ist.

ACD stört die Messung und darf bei der Gewinnung der Probe nicht verwendet werden.

3.7 Aufwand im Labor

Im Labor sind zur Bestimmung folgende Arbeitsschritte nötig:

1. Zentrifugieren der Probe
2. Ansetzen der Reagenzien: Herstellung des Citratpuffers; Einwiegen von 5 mg Glucoseoxidase für Medium 1 zur Inkubation; Herstellung der Lösungen 1-4. Die Reagenzien halten sich ca. 14 Tage (Kühnle, 1992; Kamoun, 1995). Daher muß man etwa alle 14 Tage hierfür ca. 30-60 min. Zeitaufwand einplanen, wenn man keinen größeren Vorrat eingefroren hat.
3. Reaktionsgefäße beschriften
4. 50 μ l Probe oder Kontrolle in diese Reaktionsgefäße pipettieren
5. Reagenz 1 und 2 zu jedem Ansatz hinzufügen
6. 20 min bei 56 °C inkubieren
7. Umfüllen der Meßansätze in Probengefäße des Analysenautomats
8. Starten der Messung.
9. Berechnung der Clearance und Ausdruck des Befundblattes.

Als Richtwert für eine Bestimmung kann man, wenn keine Probleme auftreten, von einem zeitlichen Rahmen von etwa 2 Stunden vom Zentrifugieren bis zum Ausdruck des Befundes ausgehen. Für mehrere Bestimmungen liegt der Zeitaufwand allerdings nicht bei einem Vielfachen, da die meisten Arbeitsschritte parallel ausgeführt werden können. Eine weitere Clearance benötigt etwa 15 min mehr Zeit.

Die Bestimmung ist damit für Inulin komplizierter und zeitaufwendiger als für Standardparameter der klinischen Chemie, da eine Vorinkubation erfolgen muß und die Probe nicht direkt an einem Automaten gemessen werden kann. Der Aufwand ist jedoch vertretbar, wenn man ihn mit anderen GFR-Bestimmungsmethoden, insbesondere den nuklearmedizinischen vergleicht.

3.8 Kosten

Die Kosten der maschinellen Bestimmung wurden bereits von Grüttner (1995) berechnet; sie liegen pro Probe bei 0,75 DM.

Für die Messung einer kompletten Single-Shot Clearance aus 8 Proben und 2 Kontrollen bewegen sie sich je nach Ausnutzung eines Testkits zwischen 7,50 DM, wenn die Reagenzien optimal ausgenutzt werden und 70 DM, wenn ein Reagenziensatz angesetzt wird, mit diesem aber nur eine einzige Clearance Bestimmung durchgeführt wird.

Wird eine Single-Sample Clearance durchgeführt, so sind 8 Messungen zu veranschlagen (3-fach Bestimmung des Leerwertes und der Probe, sowie zwei Kontrollen), was zu Kosten von mindestens 6 DM führt. Auch hier gilt, daß die Bestimmung 70 DM kostet, wenn die Reagenzien nach 14 Tagen unbrauchbar werden weil bis dahin keine weiteren Proben gemessen wurden.

Die Personalkosten betragen für die Durchführung der Clearance am Krankenbett etwa 100 DM, legt man die Kosten für einen Assistenzarzt zugrunde, der während der 4 Stunden der Clearance etwa 50% seiner Arbeitszeit damit verbringt, den Patienten zu betreuen und die Blutentnahmen durchzuführen. Die Bestimmung einer Clearance kostet etwa 70 DM, wenn man die 2 Stunden Arbeitszeit einer MTA zugrundelegt.

Hinzu kommen die Kosten für Inutest, das 30 DM pro Ampulle (5 g/20 ml) kostet, sowie Einwegartikel (Spritzen, Kanülen, Dreiwegehähne, Infusionslösungen, Pipettenspitzen).

Die Gesamtkosten liegen also bei 220 bis 290 DM. Betrachtet man nur wirklich anfallende zusätzliche Materialkosten - die Personalkosten bleiben ohne Berücksichtigung, da das Personal auf jeden Fall bezahlt werden muß - , so kostet die Clearance zwischen 50 und 120 DM.

Diese Untersuchung ist damit wesentlich günstiger als nuklearmedizinische Verfahren.

3.9 Durchführung der Single-Shot Clearance

Die Single Shot Clearance mit Inutest erfüllt die geforderten Bedingungen nach guter Präzision zur klassischen Infusionstechnik mit Inulin bei vertretbarem Aufwand am besten.

3.9.1 Inulinapplikation

Inutest muß intravenös als rasche Bolusinjektion zugeführt werden. Um eine sichere Clearancebestimmung durchzuführen, darf es nicht als Kurzin-

fusion infundiert werden! Hierzu ist also ein sicherer venöser Zugang notwendig. Inutest, das paravenös appliziert wird, verursacht laut Hersteller zwar keine Gewebeschädigung, steht aber dem Verteilungs- und Ausscheidungsmechanismus nicht zur Verfügung. Dies ist eine Fehlerquelle, da aus diesem Depot freigesetztes Inulin den Plasmaspiegel erhöht, was bei der Berechnung aber nicht berücksichtigt werden kann.

Wir haben eine Dosis von 7,5 g Inulin /m² Körperoberfläche appliziert, was etwa 200 mg/kg Körpergewicht entspricht. Neumayer (1989) gibt als Dosierung 50-150 mg/kg Körpergewicht an. Müller-Suur (1983) verwendete für das Kindesalter Dosierungen von 250 mg/kg Körpergewicht. Wir haben uns für diese relativ hohe Dosierung entschieden, um am Ende der Clearancemessungen nach 4 Stunden noch ausreichend hohe Plasmaspiegel zu haben, die sich sicher präzise messen lassen.

3.9.2 Probengewinnung

Durch den venösen Zugang können auch die Blutentnahmen durchgeführt werden. Es ist jedoch unbedingt notwendig, das Leitungssystem gut mit physiologischer Kochsalzlösung zu spülen, da die Konzentrationsunterschiede der Inulinlösung zum Plasmaspiegel im Bereich des 50 bis 300-fachen liegen und auch nur kleine Reste im Katheter oder in der Braunüle zu einer falsch hohen Konzentration führen können. Zum Spülen wird eine 20 ml Spritze mit physiologischer Kochsalzlösung verwendet, die angesetzt und am besten ruckweise in kleinen Schüben injiziert wird. Hierdurch bilden sich Verwirbelungen im Schlauchsystem, wodurch Inulin, das evtl. der Schlauchwandung anhaftet, besser weggespült wird.

Die bessere Möglichkeit der Blutentnahme besteht in einem separaten venösen Zugang. Da fast alle onkologischen Patienten einen implantierten Hickman-Katheter mit zwei Lumina haben, haben wir die Inutestapplikation und die Probenentnahme an dessen zwei verschiedenen venösen Zugängen durchführen können. Allen anderen Patienten und Probanden wurde ein venöser Zugang gelegt, der nach Durchführung der Clearance wieder entfernt wurde. Über diesen Zugang wurde dann sowohl Inutest gespritzt als auch, nach entsprechender Spülung, die Probenentnahme durchgeführt.

Während der Clearance läuft an dem venösen Zugang, der zur Probenentnahme verwendet wird, eine 0,9%-Kochsalz Infusion, um den Zugang offen zu halten.

Zur Blutentnahme bedient man sich eines in die Leitung eingeschalteten Dreiwegehahnes. Zunächst aspiriert man mit einer 20 ml Spritze etwa 20 ml Blut. Dann wird diese Spritze steril abgelegt. Jetzt wird mit einer 2

ml Spritze ca. 1 ml Blut als Probe aspiriert. Das vorgezogene Blut wird schließlich wieder injiziert.

Mit diesem Vorgehen ist das Probenvolumen auf insgesamt ca. 8 ml in 4 Stunden beschränkt und stellt für die meisten Kinder keinen nennenswerten Blutverlust dar. Probleme sind hier allerdings bei Frühgeborenen zu erwarten. Die Probenmenge kann jedoch je nach Hämatokrit auch deutlich unter 1 ml liegen.

Die Blutentnahmezeiten richten sich nach den Gegebenheiten des 2-Kompartiment-Modells, mit dem sich die Elimination von Inulin aus dem Plasma beschreiben läßt:

- Probenleerwert: vor der Inutestinjektion, am günstigsten beim Legen des venösen Zugangs.
- nach 5 min und nach 30 min: Messungen in der ersten, schnellen α -Eliminationsphase (diese Phase ist bedingt durch die Verteilung des Inulins in den Extrazellulärraum)
- nach 120, 150, 180, 210 und 240 min: Messungen in der zweiten, langsamen β -Eliminationsphase (diese Phase ist bedingt durch die Ausscheidung des Inulins durch die Niere)

Die Blutentnahmezeiten müssen nicht auf die Minute genau eingehalten werden. Dies hat sich auch in der täglichen Arbeit als nicht durchführbar erwiesen. Es ist aber notwendig, den Zeitpunkt der Probenabnahme auf die Minute genau zu dokumentieren. Die Blutentnahme kann also statt bei 180 min auch bei 172 oder bei 188 min durchgeführt werden, sofern der Zeitpunkt genau aufgeschrieben wird, denn nur dann kann die Abklingkurve genau berechnet werden. Die Zeitpunkte der Probenentnahme lassen sich also den übrigen Arbeitsabläufen etwas anpassen. Zur Durchführung der Clearance wurde ein Laboranforderungsblatt (Abbildung 26) entworfen, das dem Durchführenden sowohl alle nötigen Informationen (Dosierung, Abnahmezeitpunkte) gibt, als auch alle zur Berechnung benötigten Werte erfragt, wie Größe, Gewicht, Körperoberfläche, verabreichte Dosis, Blutentnahmezeitpunkte.

3.9.3 Weiterverarbeitung

Die Proben werden nach Beendigung der Clearance ins Labor gebracht und dort zentrifugiert. Werden die Proben nicht am gleichen Tag vermessen, so wird das Plasma bei -18°C eingefroren.

Absender: Station: _____

Laboranforderungsbogen zur Inulin - Clearance - Bestimmung

(Bitte vollständig ausfüllen --- Vielen Dank)

Untersuchung am:

Name:
(bzw. Aufkleber)

Geburtsdatum:

Größe: cm Gewicht: kg KOF: m²

Inulindosis:ml - entsprichtg. Injektionsende:Uhr

| Zeit | SOLL-Uhrzeit | IST-Uhrzeit | Bemerkungen |
|---------------------|--------------|-------------|-------------|
| Leerwert vor Inulin | entfällt | | |
| 5 min nach Inulin | | | |
| 30 min nach Inulin | | | |
| 120 min nach Inulin | | | |
| 150 min nach Inulin | | | |
| 180 min nach Inulin | | | |
| 210 min nach Inulin | | | |
| 240 min nach Inulin | | | |

Checkliste für Begleituntersuchungen:

- Röhrchen richtig beschriftet? (Name, Datum, 5 min, 30 min etc.)
- 24 Stunden Urin gesammelt, kühl gelagert?
- Urinprobe vom Sammelurin und Blut abgenommen und ins Labor geschickt auf:
 - Krea
 - Harnstoff
 - Natrium
 - Calcium
 - Phosphat
- Menge des Sammelurins bitte hier angebenml/.....h
- frischen Spontanurin ins Labor geschickt(bzw. gestixt)auf:
 - Glucose
 - Eiweiß
 - spez. Gewicht
- Bei Stix auf Station bitte Ergebnis oben eintragen!
- alle Angaben auf dem Zettel richtig?

Fig. 26: Laboranforderungsblatt

Unsere Ergebnisse belegen, daß die Bestimmung gut in Serum oder Heparinplasma durchgeführt werden kann. Die Verwendung von Heparinplasma hat Vorteile bei kleinen Probevolumina, da die durch Zentrifugieren zu gewinnende Probenmenge bei Plasma größer ist als bei Serum - ein Vorteil, der vor allem bei Säuglingen und den hier zur Verfügung stehenden knappen Probenmengen ins Gewicht fällt.

Die Inulinclarence läßt sich in Anbetracht unserer minimalen Probenmenge von 50 μl Serum oder Plasma pro Bestimmung auch bei sehr kleinen Patienten durchführen. Müller-Suur (1983) fand eine gute Übereinstimmung der Konzentrationen von venös, arteriell und kapillär gewonnenen Blutproben. Arterielle und kapilläre Blutentnahmen wurden in unserer Studie jedoch nicht durchgeführt.

3.10 Berechnung der Single Shot Clearance

Die Single Shot Methode nach Sapirstein (1955) geht als 2-Kompartiment Modell näherungsweise davon aus, daß sich das Inulin nach der Bolusinjektion zunächst sehr schnell intravasal verteilt und dann in den Extravascularraum diffundiert. Inulin wird nicht intrazellulär aufgenommen, da entsprechende Transportmechanismen fehlen. Inulin ist daher auch als Marker zur Bestimmung des Extrazellulärspaces verwendbar. Eine typische Abklingkurve von Inulin im Serum nach einer Injektion zeigt Abbildung 27.

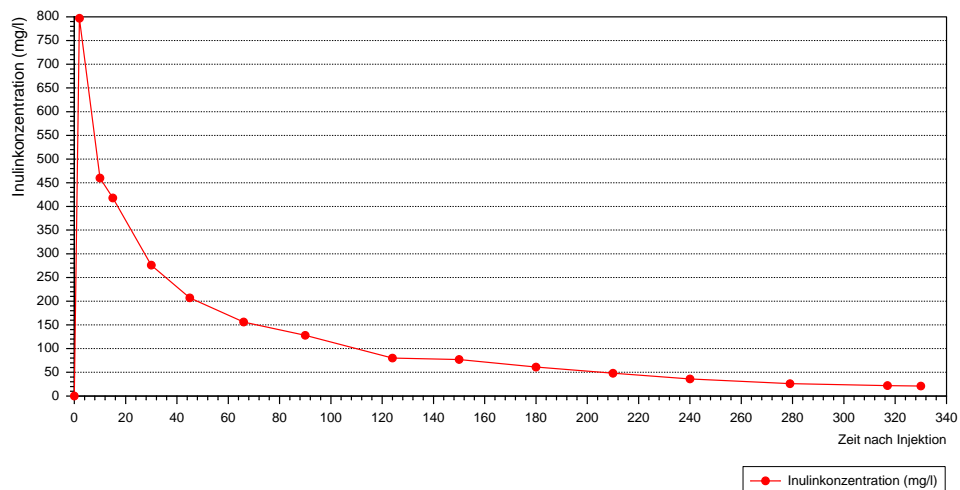


Fig. 27: Typische Abklingkurve Inulin im Serum, y-Achse linear geteilt; Zeit nach Injektion in min.

Diese Abklingkurve von Inulin im Serum ist in Abbildung 28 noch einmal

halblogarithmisch dargestellt. Man kann hier eine frühe α -Verteilungsphase von einer späten β -Verteilungsphase unterscheiden.

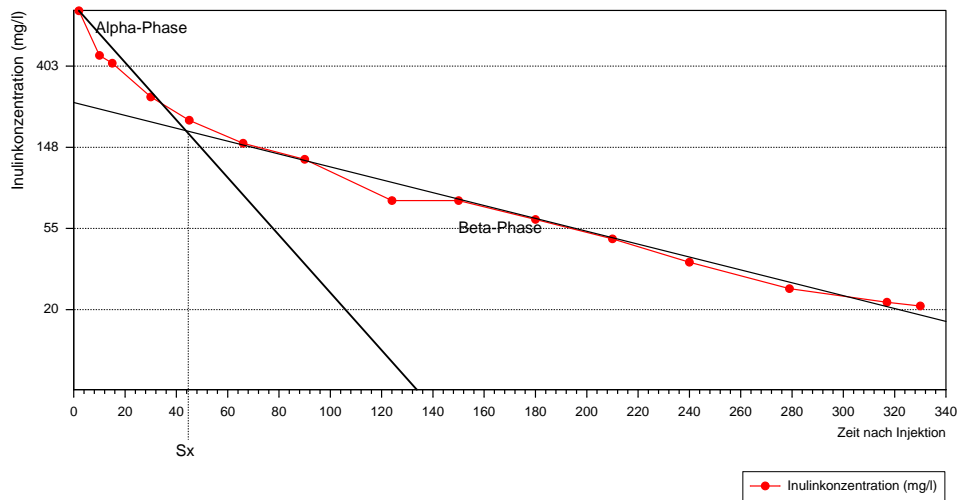


Fig. 28: Abklingkurve Inulin im Serum, y-Achse logarithmisch geteilt

Die erste, schnelle α -Phase entsteht durch die Verteilung des Inulins in den Extrazellulärraum nach der Injektion. Die zweite, langsamere β -Phase entsteht durch Elimination des Inulins aus dem Plasma durch die Nierenfunktion. Beide Phasen folgen in dieser Darstellung jeweils einer Geraden, die sich am Schnittpunkt S_x schneiden. Diese Tatsache kann man sich bei der Berechnung der Clearance zu nutze machen.

Die Plasmaclearance einer beliebigen Substanz, also die Größe des Plasmavolumens, das pro Minute von dieser Substanz durch Ausscheidungs- und/oder Abbauprozesse geklärt wird, lässt sich allgemein berechnen nach der Formel

$$Cl = \frac{D}{AUC} \quad (10)$$

Bei der Single Shot Clearance ist die verabreichte Dosis bekannt. Die mathematische Berechnung wird sich also darauf konzentrieren, die Fläche unter der Konzentrations-Zeit Kurve zu ermitteln. Dieser Ansatz ist erlaubt, da die Plasmaclearance des Inulins mit der renalen Clearance fast identisch ist, weil die Substanz fast ausschließlich durch glomeruläre Filtration ausgeschieden wird.

3.10.1 Berechnung unter alleiniger Berücksichtigung des 1-Kompartiment-Modells

Berücksichtigt man zunächst nur die langsame, 2. , durch die Nierenfunktion hervorgerufene β -Phase der Verteilung, so stellt man fest, daß es sich hierbei um eine Exponentialfunktion zur Basis e handelt. Durch Logarithmieren dieser e -Funktion mit dem natürlichen Logarithmus erhält man eine Gerade, die ihrerseits der üblichen Geradengleichung

$$y = B \cdot x + A \quad (11)$$

gehört. Die zugehörige e -Funktion hat also die allgemeine Formel

$$\hat{y} = e^y = e^{B \cdot x + A} \quad (12)$$

Sie beschreibt die Tatsache, daß die zugrundeliegende Funktion einer Exponentialfunktion zur Basis e folgt.

Vernachlässigt man die e -Funktion für einen Moment und betrachtet die Geradengleichung $y=Bx+A$, so kann man mit zwei Meßwerten diese Formel durch Einsetzen der Werte in die Formel und Gleichsetzen auflösen und damit eine allgemeine Geradengleichung erhalten. Dadurch würden aber alle anderen gemessenen Werte nicht in die Berechnung eingehen und wegfallen.

Folgende Berechnungen tragen dem Rechnung, indem sie alle Meßwerte miteinbeziehen und den Kurvenverlauf entsprechend anpassen. Es gilt für die Koeffizienten A und B :

$$A = \frac{\sum y - B \cdot \sum x}{n} \quad (13)$$

und

$$B = \frac{n \cdot \sum_{m=1}^n x \cdot y - \sum x \cdot \sum y}{n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad (14)$$

Die Korrelation einer angeglichenen Geraden mit diesen Koeffizienten zum tatsächlichen Kurvenverlauf ergibt sich zu:

$$r = \frac{n \cdot \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{\sqrt{[n \sum x^2 - (\sum x)^2] \cdot [n \sum y^2 - (\sum y)^2]}} \quad (15)$$

Für den Korrelationskoeffizient r gilt $-1 < r < 1$.

Aus der Eingangsformel

$$y = \ln \hat{y} = B \cdot x + A \quad (16)$$

ergibt sich durch Potenzieren zur Basis e:

$$e^y = \hat{y} = e^{A+Bx} \quad (17)$$

Die Fläche unter dieser Kurve ergibt sich durch Integration:

$$AUC = \int_0^{\infty} e^{A+Bx} \cdot dx \quad (18)$$

Zur Auflösung dient die Substitutionsregel: Wir setzen gleich:

$$u = A + Bx \quad (19)$$

Die Ableitung hiervon:

$$u' = B = \frac{du}{dx} \quad (20)$$

Diese Gleichung wird aufgelöst nach dx:

$$dx = \frac{du}{B} \quad (21)$$

Man kann also für

$$AUC = \int_0^{\infty} e^{A+Bx} \cdot dx \quad (22)$$

auch schreiben:

$$AUC = \int_0^{\infty} e^u \cdot dx \quad (23)$$

Ersetzt man dx jetzt durch $\frac{du}{B}$ (Formel 13) so erhält man:

$$AUC = \int_0^{\infty} \frac{e^u}{B} \cdot du \quad (24)$$

und nach Auflösen des Integrals:

$$AUC = \frac{1}{B} [e^u]_0^\infty \quad (25)$$

Jetzt wird u wieder gemäß Formel 11 ersetzt durch A+Bx:

$$AUC = \frac{1}{B} [e^{A+Bx}]_0^\infty \quad (26)$$

Jetzt führt man den Grenzübergang

$$AUC = \frac{1}{B} \cdot [\lim_{k \rightarrow \infty} e^{A+Bk} - e^A] \quad (27)$$

aus:

$$AUC = \frac{1}{B} \cdot [0 - e^A] \quad (28)$$

$$AUC = \frac{1}{B} \cdot e^A \quad (29)$$

In diese Formel können jetzt die oben angeführten Formeln für die Koeffizienten A und B eingesetzt werden:

$$A = \frac{\sum y - B \cdot \sum x}{n} \quad (30)$$

und

$$B = \frac{n \cdot \sum_{m=1}^n x \cdot y - \sum x \cdot \sum y}{n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad (31)$$

Die Fläche unter der Kurve für das 1-Kompartiment-Modell mit der langsamen β -Phase der Plasma-Abklingkurve für Inutest berechnet sich also zu:

$$AUC_{1-Komp} = \frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n \cdot \sum_{m=1}^n xy - \sum x \cdot \sum y} \cdot e^{\frac{1}{n} \cdot \left[\sum y - \left\langle \frac{n \cdot \sum_{m=1}^n xy - \sum x \cdot \sum y}{n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2} \right\rangle \cdot \sum x \right]} \quad (32)$$

Die Clearance für das 1-Kompartiment-Modell berechnet sich dann nach der Formel

$$Cl_{1-Komp} = \frac{D}{AUC} \quad (33)$$

3.10.2 Berechnung der Plasmaclearance für das 2-Kompartiment-Modell

Betrachtet man sich die α -Verteilungsphase, die wir bisher nicht beachtet haben, so läßt sich sagen, daß diese Phase ebenfalls einer Exponentialfunktion zur Basis e folgt. Auch für diese Funktion gilt die allgemeine Formel

$$\hat{y} = e^y = e^{B \cdot x + A} \quad (34)$$

Zur Berechnung der AUC ist es nötig, die Koeffizienten für die Geradengleichungen der α und β Phase der Verteilung zu berechnen um somit für beide Verteilungsphasen Formeln zu haben, die die Meßwerte korrekt beschreiben. Aus beiden Gleichungen mit lediglich zwei Variablen (x und y -Werte) läßt sich der Schnittpunkt der beiden Geraden durch Gleichsetzung berechnen. (Die Koeffizienten A und B sind zur eindeutigen Unterscheidung ihrer Zugehörigkeit zur α oder zur β -Phase mit entsprechenden Indices versehen.):

$$e^{(A_\alpha + B_\alpha x)} = e^{(A_\beta + B_\beta x)} \quad (35)$$

Durch Logarithmieren mit dem natürlichen Logarithmus \ln erhält man aus dieser Gleichung:

$$A_\alpha + B_\alpha x = A_\beta + B_\beta x \quad (36)$$

Löst man diese Gleichung nach x auf so erhält man:

$$B_\alpha x - B_\beta x = A_\beta - A_\alpha \quad (37)$$

und

$$x = \frac{A_\beta - A_\alpha}{B_\alpha - B_\beta} = S_x \quad (38)$$

Der Schnittpunkt der beiden Funktionen befindet sich an dieser Stelle S_x . Der zugehörige y -Wert kann berechnet werden durch Einsetzen dieses S_x -Wertes in eine der beiden Formeln, die die Abklingkurven α und β beschreiben. Es ist unerheblich, welcher Formel man sich bedient, da der Schnittpunkt zu beiden Funktionen gehört.

Die AUC des 2-Kompartiment-Modells setzt sich aus der AUC der α - und der AUC der β -Phase zusammen:

$$AUC_{2-Komp} = AUC_{\alpha} + AUC_{\beta} \quad (39)$$

Zur Berechnung der Flächen unter beiden Kurven bedienen wir uns wieder unserer oben hergeleiteten Formel 18 für die AUC; Jetzt wird allerdings für die α -Phase nur von 0 bis zum Schnittpunkt S_x der Funktionen und für die β -Phase vom Schnittpunkt S_x bis ∞ integriert:

$$AUC_{2-Komp} = \frac{1}{B_{\alpha}} \left[e^{A_{\alpha} + B_{\alpha}x} \right]_0^{S_x} + \frac{1}{B_{\beta}} \left[e^{A_{\beta} + B_{\beta}x} \right]_{S_x}^{\infty} \quad (40)$$

$$AUC_{2-Komp} = \frac{1}{B_{\alpha}} \left[e^{A_{\alpha} + B_{\alpha} \cdot S_x} - e^{A_{\alpha}} \right] + \frac{1}{B_{\beta}} \left[\lim_{k \rightarrow \infty} \cdot e^{A_{\beta} + B_{\beta}k} - e^{A_{\beta} + B_{\beta} \cdot S_x} \right] \quad (41)$$

Es handelt sich immer um eine abfallende e-Funktion; B_{β} als Steigung der Funktion wird daher immer negativ sein. Der Ausdruck bewegt sich daher gegen $-\infty$ wenn k gegen ∞ geht. Negative Konzentrationen sind natürlich nicht sinnvoll. In der Praxis wird sich diese Funktion dem Wert 0 annähern, aber nicht negativ werden. Der Ausdruck wird also in der Realität gegen 0 gehen. Es gilt daher für das Integral der Konzentrations-Zeit-Kurve nach dem 2-Kompartiment-Modell:

$$AUC_{2-Komp} = \frac{1}{B_{\alpha}} \left[e^{A_{\alpha} + B_{\alpha} \cdot S_x} - e^{A_{\alpha}} \right] + \frac{1}{B_{\beta}} \left[-e^{A_{\beta} + B_{\beta} \cdot S_x} \right] \quad (42)$$

Eine Berechnung nach dem 2-Kompartiment-Modell ist notwendig, rechnet man nur nach dem 1-Kompartiment-Modell, so unterschätzt man die Clearance (Prescott, 1991; Poggitsch; Neumayer, 1989; Müller-Suur, 1983; Freestone, 1986

Für die Berechnung der 2-Kompartiment Clearance mit dem Computer gibt es 2 Möglichkeiten. Diese wurden im Rahmen dieser Doktorarbeiten entwickelt. Die eine Möglichkeit besteht in einem MS Excel Arbeitsblatt, die andere in einer Berechnung über das World-Wide-Web.

3.10.3 Berechnung mit MS Excel

Die Inulin Clearance kann z.B. mit einem mit Microsoft Excel 5.0 erstellten Arbeitsblatt errechnet werden, das die nötigen Angaben "erfragt" und die Clearance berechnet. Das Blatt kann dann als Befund ausgedruckt werden (Abbildung 29)

Universitäts-Kinderklinik Frankfurt/MainAbteilung für pädiatrische Hämatologie und Onkologie
Abteilungsleiter: Prof. Dr. B. KornhuberTheodor-Stern-Kai 7
6000 Frankfurt/Main
Tel. 069/6301-5040**Befundmitteilung Inulinclearance**

| | | | |
|--------------------|--------------|---------------|---------|
| Name des Patienten | Geburtsdatum | Alter (Jahre) | Station |
| Patient 4 | 19.06.1992 | 1 | 32-4 |

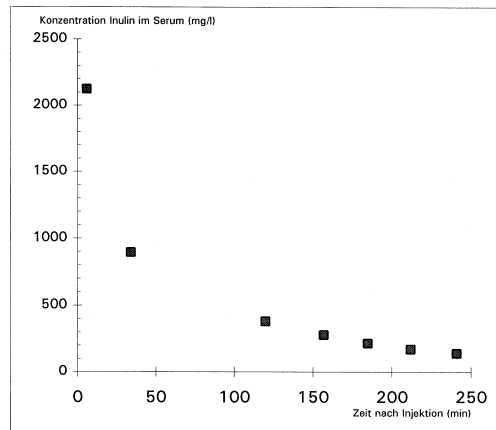
Die Inulin-Clearance wurde durchgeführt am 20.06.1993

| | | | |
|--------------------|---------------------|----------------------------|------------------------------------|
| Größe (cm): | Gewicht (kg) | KOF (m²) | gegebene Dosis Inulin (mg): |
| 69 | 8,4 | 0,38 | 3000 |

| | |
|-------------------------|----------------------|
| Zeiten der Blut- | Konzentration |
| entnahmen (min) | Inulin (mg/l) |
| Leerwert | 0 |
| 6 | 2123 |
| 34 | 894,65 |
| 120 | 380,91 |
| 157 | 278,02 |
| 185 | 214,02 |
| 212 | 168,92 |
| 241 | 138,64 |

Inulinclearance

bezogen auf die Standardkörperoberfläche

$$92,7 \frac{\text{ml}}{\text{min}} \cdot 1,73 \text{ m}^2$$
Korrelationskoeffizient der genäherten Werte mit den Meßwerten
 $r = 0,9988$

Frankfurt am Main, den 20.06.1993

Mit freundlichen Grüßen

Fig. 29: Befund mit Microsoft Excel berechnet und erstellt

Zur Berechnung wird ein Computer benötigt, auf dem Windows 3.1 und Excel 5.0 läuft. Hierzu eignen sich alle Computer, die auf Intel 80486DX-Prozessoren basieren und über 8 MB Arbeitsspeicher verfügen.

Das Excel Rechenblatt steht allen Interessierten zur Verfügung. Es kann jederzeit über das Internet vom FTP-Server des Zentrums für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Universität Frankfurt geladen werden. Die URL hierfür lautet: <http://www.zki.uni-frankfurt.de/inulin/inulin-excel-sheet.zip>.

3.10.4 Berechnung über das World-Wide-Web auf www.zki.uni-frankfurt.de

Als zweite Möglichkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Online Berechnung auf dem Webserver des Zentrums für Kinderheilkunde und Jugendmedizin implementiert. Hierzu braucht man einen Internetzugang und einen Webbrowser. Der Vorteil dieser Methode ist, daß man keine spezielle Software installieren muß und die Berechnung von jeder Hard- und Softwareplattform möglich ist. Die entsprechenden Berechnungsformulare finden sich unter <http://www.zki.uni-frankfurt.de/inulin>. Dort findet man zunächst eine Einleitung und Beschreibung des Verfahrens. Hier kann man auch zwischen deutscher oder englischer Sprache wählen, wenn die vom System automatisch getroffene Vorauswahl geändert werden soll. Deutsch wird bei Zugriff aus einem deutschsprachigen Land (Deutschland, Österreich oder Schweiz) zunächst als Standard gewählt.

Will man dann eine Clearance berechnen und klickt auf den entsprechenden Link, erhält man ein kleines Formular, das man ausfüllen muß. (Abbildung 30 und 31). Aus Sicherheitsgründen kann man bei einem Zugriff, der nicht direkt aus dem Netzwerk der Universitäts-Kinderklinik Frankfurt kommt, keine Patientendaten, sondern nur Initialen eingeben. So wird sichergestellt, daß keine vertraulichen Patienteninformationen offen und unverschlüsselt über das Internet übertragen werden.

Sind alle Daten in das Formular eingetragen, so muß man auf den Knopf "Clearance berechnen" klicken. Die eingegebenen Daten werden dann an den Webserver nach Frankfurt übermittelt. Dieser startet mit diesen Daten ein Perl-cgi-Skript, das die Berechnung durchführt und das Ergebnis in einer HTML Seite zurückliefert (Abbildungen 32 und 33)

Diese Befundseite kann nun einfach mit der Druckfunktion des Webbrowsers ausgedruckt werden (Abbildung 34).

Das cgi-Skript `single-shot.pl`, das diese Berechnung durchführt, ist in der Skriptsprache Perl geschrieben. Mit dieser Sprache sind sehr einfache und effektiv Textoperationen durchführbar und sie eignen sich daher gut für interaktive HTML-Seiten.

Kinderklinik der Johann-Wolfgang-Goethe Universität

Single Shot Inulin-clearance - Berechnung nach der AUC-Methode

Patienten- und Clearance-daten:

Patienten-ID:

Name:

Geburtsdatum:

Größe: cm

Gewicht: kg

Durchführung der Clearance am:

gegebene Dosis Inulin: mg

Entnahmezeit und Konzentration der Blutproben:

| Ideal-Zeiten der Blutentnahmen | tatsächliche Entnahmezeit nach der Injektion | gemessene Inulinkonzentration |
|--------------------------------|--|--|
| Leerwert | vor Injektion | <input type="text" value="0"/> mg/l |
| 5 min | <input type="text" value="6"/> min | <input type="text" value="2123"/> mg/l |
| 30 min | <input type="text" value="34"/> min | <input type="text" value="895"/> mg/l |
| 120 min | <input type="text" value="120"/> min | <input type="text" value="381"/> mg/l |

Fig. 30: WWW-Seite zur Berechnung der Inulin-clearance (1)

Entnahmezeit und Konzentration der Blutproben:

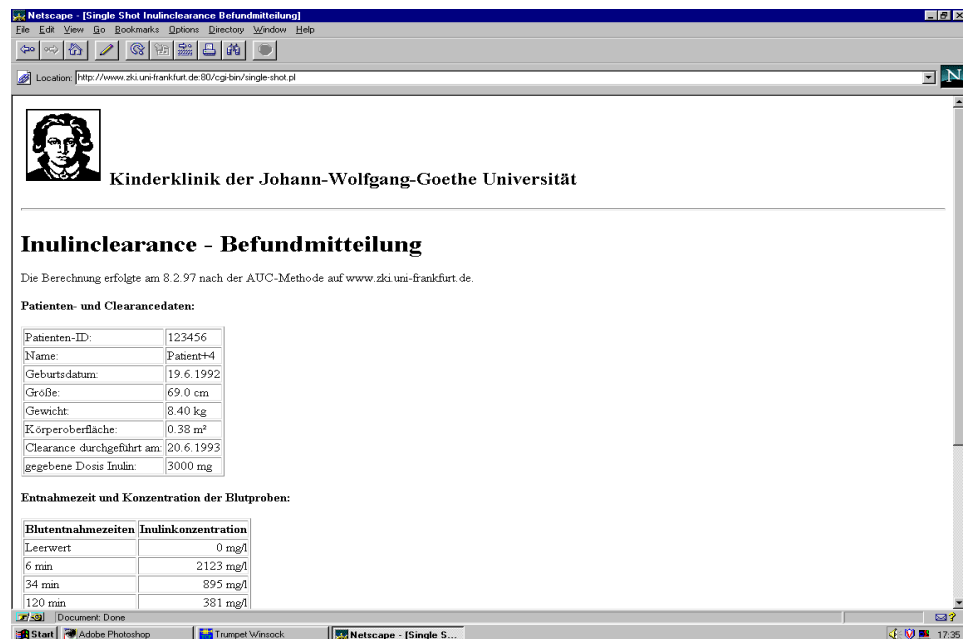
| Ideal-Zeiten der Blutentnahmen | tatsächliche Entnahmezeit nach der Injektion | gemessene Inulinkonzentration |
|--------------------------------|--|--|
| Leerwert | vor Injektion | <input type="text" value="0"/> mg/l |
| 5 min | <input type="text" value="6"/> min | <input type="text" value="2123"/> mg/l |
| 30 min | <input type="text" value="34"/> min | <input type="text" value="895"/> mg/l |
| 120 min | <input type="text" value="120"/> min | <input type="text" value="381"/> mg/l |
| 150 min | <input type="text" value="157"/> min | <input type="text" value="278"/> mg/l |
| 180 min | <input type="text" value="185"/> min | <input type="text" value="214"/> mg/l |
| 210 min | <input type="text" value="212"/> min | <input type="text" value="169"/> mg/l |
| 240 min | <input type="text" value="241"/> min | <input type="text" value="139"/> mg/l |

Wenn weniger als 8 Blutentnahmen durchgeführt wurden, lassen Sie bitte die Felder für Zeit und Konzentration am Ende am Ende der Clearance frei

Feedback willkommen: Bitte per eMail an
[Martin Cunkel \(mcunkel@zki.uni-frankfurt.de\)](mailto:Martin.Cunkel@zki.uni-frankfurt.de)

Zurück zur [Startseite](#)

Fig. 31: WWW-Seite zur Berechnung der Inulin-clearance (2)



Inulin-clearance - Befundmitteilung

Die Berechnung erfolgte am 8.2.97 nach der AUC-Methode auf www.zki.uni-frankfurt.de.

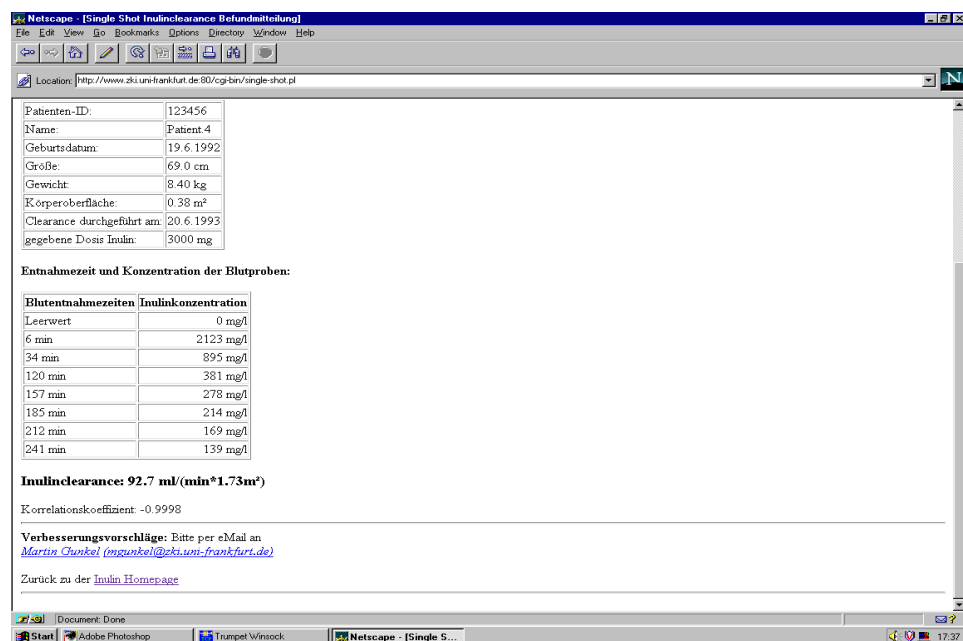
Patienten- und Clearance-daten:

| | |
|----------------------------|---------------------|
| Patienten-ID: | 123456 |
| Name: | Patient+4 |
| Geburtsdatum: | 19.6.1992 |
| Größe: | 69.0 cm |
| Gewicht: | 8.40 kg |
| Körperoberfläche: | 0.38 m ² |
| Clearance durchgeführt am: | 20.6.1993 |
| gegebene Dosis Inulin: | 3000 mg |

Entnahmezeit und Konzentration der Blutproben:

| Blutentnahmezeiten | Inulinkonzentration |
|--------------------|---------------------|
| Leerwert | 0 mg/l |
| 6 min | 2123 mg/l |
| 34 min | 895 mg/l |
| 120 min | 381 mg/l |

Fig. 32: Befundseite der Berechnung (1)



| | |
|----------------------------|---------------------|
| Patienten-ID: | 123456 |
| Name: | Patient 4 |
| Geburtsdatum: | 19.6.1992 |
| Größe: | 69.0 cm |
| Gewicht: | 8.40 kg |
| Körperoberfläche: | 0.38 m ² |
| Clearance durchgeführt am: | 20.6.1993 |
| gegebene Dosis Inulin: | 3000 mg |

Entnahmezeit und Konzentration der Blutproben:

| Blutentnahmezeiten | Inulinkonzentration |
|--------------------|---------------------|
| Leerwert | 0 mg/l |
| 6 min | 2123 mg/l |
| 34 min | 895 mg/l |
| 120 min | 381 mg/l |
| 157 min | 278 mg/l |
| 185 min | 214 mg/l |
| 212 min | 169 mg/l |
| 241 min | 139 mg/l |

Inulin-clearance: 92.7 ml/(min*1.73m²)

Korrelationskoeffizient: -0.9998

Verbesserungsvorschläge: Bitte per eMail an [Martin Gunkei \(msgunkei@zki.uni-frankfurt.de\)](mailto:msgunkei@zki.uni-frankfurt.de)

Zurück zu der [Inulin Homepage](#)

Fig. 33: Befundseite der Berechnung (2)

Single Shot Inulinclearance Befundmitteilung

<http://www.zki.uni-frankfurt.de:80/cgi-bin/single-shot.pl>

**Kinderklinik der Johann-Wolfgang-Goethe
Universität**

Inulinclearance - Befundmitteilung

Die Berechnung erfolgte am 8.2.97 nach der AUC-Methode auf www.zki.uni-frankfurt.de.

Patienten- und Clearance-daten:

| | |
|----------------------------|---------------------|
| Patienten-ID: | 123456 |
| Name: | Patient.4 |
| Geburtsdatum: | 19.6.1992 |
| Größe: | 69.0 cm |
| Gewicht: | 8.40 kg |
| Körperoberfläche: | 0.38 m ² |
| Clearance durchgeführt am: | 20.6.1993 |
| gegebene Dosis Inulin: | 3000 mg |

Entnahmezeit und Konzentration der Blutproben:

| Blutentnahmezeiten | Inulinkonzentration |
|--------------------|---------------------|
| Leerwert | 0 mg/l |
| 6 min | 2123 mg/l |
| 34 min | 895 mg/l |
| 120 min | 381 mg/l |
| 157 min | 278 mg/l |
| 185 min | 214 mg/l |
| 212 min | 169 mg/l |
| 241 min | 139 mg/l |

Inulinclearance: 92.7 ml/(min*1.73m²)

Korrelationskoeffizient: -0.9998

Verbesserungsvorschläge: Bitte per eMail an
Martin Gunkel (mgunkel@zki.uni-frankfurt.de)

Zurück zu der [Inulin Homepage](#)

Fig. 34: Schriftlicher Befund der Berechnung

3.10.4.1 Der Code von single-shot.pl

```
#!/usr/bin/perl
# (c) Martin Gunkel 1996
#
# general routine to compute a least-squares error regression
# on a consecutive series in an array.
# use the arrays x and y from index start to index end to run a
# linear regression, returning intercept, slope and r
#
sub regress{
    local(*x,*y,$start,$end,*intercept,*slope,*r) = @_ ;
    local($i);
    local($n,$sum_y,$sum_yy,$sum_x,$sum_xx,$sum_xy);

    $n = $end - $start + 1;

    # Summenbildung
    $sum_y = 0;
    $sum_yy = 0;
    $sum_x = 0;
    $sum_xx = 0;
    $sum_xy = 0;
    foreach $i ($start .. $end){
        $sum_y += @y[$i];
        $sum_yy += @y[$i] * @y[$i];
        $sum_x += @x[$i];
        $sum_xx += @x[$i] * @x[$i];
        $sum_xy += @x[$i] * @y[$i];
    }

    $slope = ($n * $sum_xy - $sum_x * $sum_y) / ($n * $sum_xx - $sum_x *
$sum_x);
    $intercept = ($sum_y - $slope * $sum_x) / $n;
    $r      = ($n * $sum_xy - $sum_x * $sum_y) /
        sqrt( ($n * $sum_xx - $sum_x * $sum_x) * ($n * $sum_yy - $sum_y *
$sum_y) );
}

#
# The calculation
#
sub inulin{
    $kof = ($gewicht**0.425 * $groesse**0.725 * 7.184) / 1000;

    foreach $i (1 .. $#c){
        @y[$i] = log($c[$i]-$c[0]);
    }

    # run the two regressions, pass arrays and variables as names
    &regress(*x,*y,
        1,$alpha,
        *a_alpha,*b_alpha,*r_alpha);
    &regress(*x,*y,
```

```

    $alpha+1, $alpha+$beta,
    *a_beta, *b_beta, *r_beta);

$sx = ($a_beta - $a_alpha) / ($b_alpha - $b_beta);

$auc_2_comp = (1 / $b_alpha) *
    (exp($a_alpha+$b_alpha*$sx) - exp($a_alpha)) +
    (1 / $b_beta) * (-exp($a_beta+$b_beta*$sx));

$clearance_abs = 1000 * $dosis / $auc_2_comp;
$clearance_rel = $clearance_abs * 1.73 / $kof;

print "Content-type: text/html\n\n";
print "<HTML>\n";
print "<TITLE>Single Shot Inulinclearance Befundmitteilung</TITLE>\n" if
$isgerman;
print "<TITLE>Single Shot Inulinclearance Results</TITLE>\n" if
$isenglish;
print "<BODY>\n";
print "<H2><IMG ALIGN=bottom SRC=\"/icons/goethe3.gif\"> Kinderklinik
der ";
print "Johann-Wolfgang-Goethe Universit&auml;t</H2>\n<HR>\n";

print "<H1>Inulinclearance - Ergebnisblatt</H1>\n" if $isgerman;
print "<H1>Inulinclearance - Results</H1>\n" if $isenglish;

if( $isgerman ){
    printf "<P>Die Berechnung erfolgte am %d.%d.%d nach der
AUC-Methode auf %s.\n",
    (localtime)[3], (localtime)[4]+1, (localtime)[5], $ENV{'SERVER_NAME'};
    print "<P><B>Patienten- und Clearancedaten:</B>";
}
if( $isenglish ){
    printf "<P>The Result was calculated on %d/%d/%d using the
AUC-Method on host %s.\n",
    (localtime)[4]+1, (localtime)[3], (localtime)[5], $ENV{'SERVER_NAME'};
    print "<P><B>Patient- und Clearancedetails:</B>";
}

print "</P>\n<table border=1>\n";
# safeguard against users sending us patient information over the net,
# make sure that we do not make this worse by sending the whole string
# back
$pid = substr($pid,0,3) if !$islocal;

if( $isgerman ){
    print "<tr><td>Patienten-ID:</td><td>$pid</td></tr>\n";
    if( $islocal ){
        print "<tr><td>Name:</td><td>$name</td></tr>\n";
        print "<tr><td>Geburtsdatum:</td><td>$gebdat</td></tr>\n";
    }
    printf "<tr><td>Gr&ouml;&szlig;e:</td><td>%8.1f cm</td></tr>\n",
$groesse;
    printf "<tr><td>Gewicht:</td><td>%8.2f kg</td></tr>\n", $gewicht;

```

```

        printf "<tr><td>K&ouml;rperoberfl&auml;che:</td><td>%8.2f
m&#178;</td></tr>\n", $kof;
        printf "<tr><td>Clearance durchgef&uuml;hrt
am:</td><td>%s</td></tr>\n", $datum;
        printf "<tr><td>gegebene Dosis Inulin:</td><td>%8.0f mg</td></tr>\n",
$dosis;
    }
    if( $isenglish ){
        print "<tr><td>Patient-ID:</td><td>$pid</td></tr>\n";
        printf "<tr><td>Height:</td><td>%8.1f cm</td></tr>\n", $groesse;
        printf "<tr><td>Weight:</td><td>%8.2f kg</td></tr>\n", $gewicht;
        printf "<tr><td>Body Surface Area:</td><td>%8.2f
m&#178;</td></tr>\n", $kof;
        printf "<tr><td>Clearance performed on:</td><td>%s</td></tr>\n",
$datum;
        printf "<tr><td>Dose:</td><td>%8.0f mg</td></tr>\n", $dosis;
    }
    print "</table>\n";

    print "<p><b>Entnahmezeit und Konzentration der Blutproben:</b></p>\n"
if $isgerman;
    print "<p><b>Times and Concentrations of Blood Samples:</b></p>\n" if
$isenglish;

    print "<table border=1>\n";
    print
"<tr><th>Blutentnahmezeiten</th><th>Inulinkonzentration</th></tr>\n" if
$isgerman;
    print "<tr><th>Blood Sampling
Times</th><th>Inulinconcentration</th></tr>\n" if $isenglish;

    print "<tr><td align=left>Leerwert</td><td align=right>$c[0] mg/l</td>\n" if
$isgerman;
    print "<tr><td align=left>Blank</td><td align=right>$c[0] mg/l</td>\n" if
$isenglish;
    foreach $i (1 .. $#c){
        print "<tr><td align=left>$x[$i] min</td><td align=right>$c[$i]
mg/l</td></tr>\n";
    }
    print "</table>\n";

    printf "<h3>Inulinclearance: %8.1f ml/(min*1.73m&#178;)</h3>\n",
$clearance_rel;
    printf "Korrelationskoeffizient: %8.4f\n", $r_beta if $isgerman;
    printf "Correlation Coefficient: %8.4f\n", $r_beta if $isenglish;

    print "<HR>\n";
    print "<b>Verbesserungsvorschl&auml;ge:</b> Bitte per eMail an\n" if
$isgerman;
    print "<b>Feedback welcome:</b> Please send eMail to\n" if $isenglish;
    print "<address>\n<a
href=\"http://www.zki.uni-frankfurt.de/~mgunkel\">Martin Gunkel</a>\n";

```

```

print "<a href=\"mailto:mgunke\@zki.uni-
frankfurt.de\">(mgunke\@zki.uni-frankfurt.de)</a>\n";
print "</address>\n";

print "<br>Zurück zu der " if $isgerman;
print "<br>Back to the " if $isenglish;
print "<a href=\"/inulin/\">Inulin Homepage</a>\n";

print "<hr>\n</body>\n</html>\n";
}

#
# Main program starts here
#

#
# try to determine whether the script is run in local, german or english mode
# local is automatically german.
#
$islocal = $ENV{'REMOTE_ADDR'} =~ /^141\.\.2\.\.119\./;
$isgerman = $ENV{'REMOTE_HOST'} =~ /\.(de|\.at|\.ch)$/;
$isgerman = 1 if $islocal;
$isenglish = !$isgerman;

# all other methods result in an entry form being returned
# to avoid problems
if( !($ENV{'REQUEST_METHOD'} =~ /POST/) ){
    # Return an appropriate entry form if the script is not called from
    # a submit button.
    print "Location: /inulin/single-shot-l.html\n\n" if $islocal;
    print "Location: /inulin/single-shot-d.html\n\n" if $isgerman;
    print "Location: /inulin/single-shot-e.html\n\n" if $isenglish;
    exit;
}

# check for proper CONTENT_TYPE from server i.e. posted data from a
HTML form
if( !($ENV{'CONTENT_TYPE'} =~ /application\/x-www-form-urlencoded/) ){
    print "Content-type: text/html\n\n";
    print "<HTML>\n";
    print "<TITLE>Error Message</TITLE>\n";
    print "<BODY>This script can only be used to decode form
results.</BODY>\n";
    print "</HTML>\n";
    exit;
}

# now we are in the POST operation, read all values from STDIN
$len = $ENV{'CONTENT_LENGTH'};
read(STDIN, $_, $len);

# split them into a list
@vars = split(/&|=/, $_);

```

```

# interpret the list and assign the values to the proper variables
while( $i< $#vars ){

    @x[1] = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /t1/;
    @x[2] = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /t2/;
    @x[3] = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /t3/;
    @x[4] = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /t4/;
    @x[5] = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /t5/;
    @x[6] = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /t6/;
    @x[7] = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /t7/;

    @c[0] = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /c0/;
    @c[1] = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /c1/;
    @c[2] = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /c2/;
    @c[3] = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /c3/;
    @c[4] = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /c4/;
    @c[5] = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /c5/;
    @c[6] = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /c6/;
    @c[7] = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /c7/;

    $pid   = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /patienten\-id/;
    $name  = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /name/;
    $gebdat = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /geburtsdatum/;
    $groesse = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /groesse/;
    $gewicht = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /gewicht/;
    $datum  = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /datum/;
    $dosis  = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /dosis/;

    $mode = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /mode/;

    $i+=2;
}
@x[0] = 0; # Zeitpunkt der Leerwertmessung

# Loosley check user data entries for correct number format
$lastok = 7;
$i = 8;
while( -$i >= 0 ){
    if( (@c[$i] =~ /\[d\.]+\$/ ) && (@x[$i] =~ /\[d\.]+\$/ ) ){
        ;
    }else{
        #print "falsch: @x[$i] min @c[$i] mg/\n";
        $lastok = $i-1;
    }
}

# override the $islocal, $isgerman and $isenglish variables if a variable
# mode was specified in the script
if( $mode =~ /german/ ){
    $islocal = 0;
    $isgerman = 1;
    $isenglish = 0;
}

```



```

if( $mode =~ /english/ ){
    $islocal = 0;
    $isgerman = 0;
    $isenglish = 1;
}
if( $mode =~ /local/ ){
    $islocal = 1;
    $isgerman = 1;
    $isenglish = 0;
}

#
# AUC Starts here
#

$alpha = 2; # Number of sample values for the alpha phase
$beta = $lastok - $alpha;

if( $beta < 2 ){
    $lastok++;
    if( $lastok == 0 ){
        print "<P>Das System hat keinen der Eingabewerte korrekt lesen
k&ouml;nne.\n";
    }else{
        print "<P>Das System hat nur $lastok Eingabewerte korrekt lesen
k&ouml;nne.\n";
    }
    print "<P>F&uuml;r die zweite Phase m&uuml;ssen mindestens 2 Werte, ";
    print "im Ganzen minimal also 5 Werte (inkl. des Leerwertes), eingegeben
werden.\n";
    print "</BODY>\n";
    exit;
}

# That's it folkes - Now let's go!
&inulin;

```

3.11 Durchführung der Single Sample Clearance

Jacobson (1983) konnte zeigen, daß die Clearance aus einer einzigen Blutprobe berechnet werden kann, wenn das Verteilungsvolumen des Filtrationsmarkers bekannt ist oder abgeschätzt werden kann und daß empirisch gewonnene Korrekturen für die Verteilung erlaubt sind. Diese Methode wurde in der Vergangenheit von vielen Autoren untersucht, da sie eine für Personal und Patienten sehr angenehme, weil nicht aufwendige Methode darstellt. Die Single Sample Clearance zeichnet sich durch eine wesentlich bessere Praktikabilität bei vergleichbarer Korrelation zur Standard-Infusionstechnik und zur Single-Shot Technik aus. (Jacobsson, 1983; Groth, 1984; Groth und Aasted, 1984; Christiansen, 1986; Neumayer,

1989; Schumann, 1993)

Die Nachteile der Single Sample Methode liegen jedoch darin, daß Parameter, die durch das Verteilungsmuster von Inulin bestimmt werden, rechnerisch vorausgesetzt wurden und nicht individuell bei jedem Test neu ermittelt werden. Hierdurch wird vorausgesetzt, daß diese Parameter immer gleich sind, was beispielsweise im Zustand der Hyperhydratation nicht zutrifft. Auch ist die Größe des Extrazellulärraumes, in dem sich Inulin verteilt, im Kindesalter stark vom Alter abhängig.

3.11.1 Inulinapplikation, Probengewinnung, Weiterverarbeitung

Die Durchführung der Single Sample Clearance wurde analog und zeitgleich zur Single Shot Clearance durchgeführt. Die Probanden wurden wie unter 2.6 beschrieben vorbereitet und das Inulin in der üblichen Dosierung injiziert. Die durch die Single-Shot Methode gewonnenen Daten wurden zur Berechnung der Single Sample Clearance herangezogen.

3.11.2 Berechnung der Single Sample Clearance mit einem QBASIC Programm unter DOS

Die Berechnung der Single Sample Clearance erfolgt mittels eines eines in QBASIC geschriebenen Programmes, dessen Algorithmus 1986 von Christiansen veröffentlicht und von Schumann (1993) in ein einfaches Basic Programm umgesetzt wurde:

```

100 REM ----- Variablenabfrage -----
110 CLS
120 INPUT "Dosis Inulin (mg) "; DoseInulin
130 INPUT "Blutentnahmezeit p.i. (min) "; SampleTime
140 INPUT "Plasmakonzentration Inulin (mg/l) "; ConcentrationPlasma
150 INPUT "Körperoberfläche (m2) "; BodySurface
160 REM
170 REM ----- Programm -----
180 REM
190 ConcentrationPlasma = ConcentrationPlasma / 1000
200 ecv = 8116.6 * BodySurface - 28.2: REM ecv in ml
210 a = EXP(-0.0336 * SampleTime)
220 b = EXP(-0.000461 * SampleTime)
230 k = 9.55 * a + 1.18 * b
240 f = -LOG(ConcentrationPlasma * ecv / DoseInulin) * ecv / SampleTime
250 h = 0.0000017 * SampleTime - 0.0012
260 l = 1.31 - SampleTime * 0.000775
270 gfr = f / k
280 i = 1
290 k = h * gfr + l
300 gfr = f / k

```

```

310 i = i + 1
320 IF i < 5 THEN 290
330 gfr1 = gfr * 1.73 / BodySurface
340 gfr2 = 4.46 + .763 * gfr1
350 PRINT "GFR (1S) ="; gfr1; : PRINT "ml/min/1,73 m2"
360 PRINT "GFR (2CM) ="; gfr2; : PRINT "ml/min/1,73 m2"
370 END

```

In Zeile 120-150 werden zunächst die Variablen Körperoberfläche, Inulindosis, Blutentnahmezeit und gemessene Konzentration erfragt. In Zeile 200 wird aus diesen Angaben das Extrazellulärvolumen, also der Verteilungsraum des Inulins berechnet. In Zeile 210-270 werden Zwischenrechnungen für die endgültige Iteration in Zeile 290-320. Nach 5 Intervallen wird die Prozedur abgebrochen und die GFR für die Single Sample Methode [GFR (1S)] auf die Standardkörperoberfläche von 1,73 m² bezogen, auf den Bildschirm ausgegeben. Schumann beschreibt in seinem Artikel eine Abschätzung Korrelation zur Single-Shot Clearance (2-Kompartiment-Modell) nach der Formel

$$GFR_{2-Komp} = 4,46 + 0,763 \cdot GFR_{Single-Shot} \quad (43)$$

In Zeile 340 bzw. 360 erfolgt mittels dieser Formel die Berechnung bzw. Ausgabe einer Abschätzung für eine Clearance, die mittels Single-Shot nach dem 2-Kompartiment-Modell gewonnen wird. Schumann gibt für diese Gleichung eine Korrelation mit den tatsächlich gemessenen Werten von $r = 0,985$ bei $n=31$ Probanden an.

3.11.3 Berechnung über das World-Wide-Web auf www.zki.uni-frankfurt.de

Auch für die Single-Sample Clearance ist eine Online-Berechnung auf dem Webserver des Zentrums für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Universität Frankfurt möglich. Die entsprechenden Berechnungsformulare finden sich ebenfalls unter <http://www.zki.uni-frankfurt.de/inulin>.

Will man eine Single-Sample Clearance berechnen und klickt auf den entsprechenden Link, erhält man auch ein kleines Formular, das dem der Single-Shot Clearanceberechnung sehr ähnlich ist. Aus Sicherheitsgründen kann man auch hier bei einem Zugriff, der nicht direkt aus dem Netzwerk der Universitäts-Kinderklinik Frankfurt kommt, keine Patientendaten, sondern nur Initialen eingeben. So wird sichergestellt, daß keine vertraulichen Patienteninformationen offen und unverschlüsselt über das Internet übertragen werden. Das Eingabeformular unterscheidet sich im wesentlichen darin, daß man außer den Patientendaten nur einen einziges Zeit-Konzentrationswertepaar angeben kann.

Sind alle Daten in das Formular eingetragen, so muß man auf den Knopf "Clearance berechnen" klicken. Die eingegebenen Daten werden dann auch hier nach Frankfurt übermittelt und dort mit einem zweiten Perl-Skript berechnet. Das Ergebnis wird als HTML Seite zurückgegeben.

Abbildung 35 demonstriert gleichzeitig auch die Möglichkeit, die Seiten in englischer Sprache zu benutzen.

Da die Berechnung weniger kompliziert ist, ist das zugehörige Perl-Skript auch kürzer:

```
#!/usr/bin/perl
#
# (c) Martin Gunkel 1996
#

# The calculation
sub inulin{
    $kof = ($gewicht**0.425 * $groesse**0.725 * 7.184) / 1000;

    $concentration_plasma = (@c[1] - @c[0]) / 1000;
    $sample_time = @x[1];

    $ecv = 8116.6 * $kof - 28.2;
    $a = exp(-0.0336 * $sample_time);
    $b = exp(-0.000461 * $sample_time);
    $k = 9.55 * $a + 1.18 * $b;
    $f = -log($concentration_plasma * $ecv / $dosis) * $ecv / $sample_time;
    $h = 0.000017 * $sample_time - 0.0012;
    $l = 1.31 - $sample_time * 0.000775;
    $gfr = $f / $k;
    for (1..4){
        $k = $h * $gfr + $l;
        $gfr = $f / $k;
    }

    $gfr1 = $gfr * 1.73 / $kof;
    $gfr2 = 4.46 + .763 * $gfr1;

    print "Content-type: text/html\n\n";
    print "<HTML>\n";
    print "<TITLE>Single Sample Inulinclearance
Befundmitteilung</TITLE>\n" if $isgerman;
    print "<TITLE>Single Sample Inulinclearance Results</TITLE>\n" if
$isenglish;
    print "<BODY>\n";

    print "<h2><img align=bottom src=\"/icons/goethe3.gif\"> Kinderklinik der
.",
    print "Johann-Wolfgang-Goethe Universit&auml;t</h2>\n<hr>\n";

    print "<H1>Inulinclearance Befundmitteilung</H1>\n" if $isgerman;
    print "<H1>Inulinclearance Results</H1>\n" if $isenglish;
```



Kinderklinik der Johann-Wolfgang-Goethe Universität

Inulin-clearance Results

The Result was calculated on 10/13/99 using the Single Sample Method on host sauerbruch.zki.uni-frankfurt.de.

Patient- and Clearance details:

| | |
|-------------------------|---------------------|
| Patient-ID: | 123 |
| Height: | 69.0 cm |
| Weight: | 8.40 kg |
| Body Surface Area | 0.38 m ² |
| Clearance performed on: | 20.06.1993 |
| Dose | 3000 mg |

Times and Concentrations of Blood Samples:

| Blood Sampling Times | Inulinconcentration |
|----------------------|---------------------|
| Blank | 0 mg/l |
| 241 min | 139 mg/l |

Inulin-clearance using the Single-Sample Method: 101.8 ml/(min*1.73m²)

Dr. Schumann proposes the following approximation for a comparison with the 2-compartment Single-Shot Method: **82.1 ml/(min*1.73m²)**

The algorithm for this calculation has been developed and published by Lutz Schumann et al., University of Rostock. Further Information is available on request.

Feedback welcome: Please send eMail to
Martin Gunkel (mgunkel@zki.uni-frankfurt.de)

[Back to the Inulin Homepage](#)

Fig. 35: Schriftlicher Befund der Berechnung

```

if( $isgerman ){
    printf "Die Berechnung erfolgte am %d.%d.%d nach der Single Sample
Methode auf %s.\n",
        (localtime)[3], (localtime)[4]+1, (localtime)[5], $ENV{'SERVER_NAME'};
    print "<p><b>Patienten- und Clearancedaten:</b>";
}
if( $isenglish ){
    printf "The Result was calculated on %d/%d/%d using the Single
Sample Method on host %s.\n",
        (localtime)[4]+1, (localtime)[3], (localtime)[5], $ENV{'SERVER_NAME'};
    print "<p><b>Patient- and Clearancedetails:</b>";
}

print "</p>\n<table border=1>\n";
# safeguard against users sending us patient information over the net,
# make sure that we do not make this worse by sending the whole string
# back
$pid = substr($pid,0,3) if !$islocal;

if( $isgerman ){
    print "<tr><td>Patienten-ID:</td><td>$pid</td></tr>\n";
    if( $islocal ){
        print "<tr><td>Name:</td><td>$name</td></tr>\n";
        print "<tr><td>Geburtsdatum:</td><td>$gebdat</td></tr>\n";
    }
    printf "<tr><td>Gr&ouml;&szlig;e:</td><td>%8.1f cm</td></tr>\n",
$groesse;
    printf "<tr><td>Gewicht:</td><td>%8.2f kg</td></tr>\n", $gewicht;
    printf "<tr><td>K&ouml;rperoberfl&auml;che:</td><td>%8.2f
m&#178;</td></tr>\n", $kof;
    printf "<tr><td>Clearance durchgef&uuml;hrt
am:</td><td>%s</td></tr>\n", $datum;
    printf "<tr><td>Gegebene Dosis Inulin:</td><td>%8.0f mg</td></tr>\n",
$dosis;
}
if( $isenglish ){
    print "<tr><td>Patient-ID:</td><td>$pid</td></tr>\n";
    printf "<tr><td>Height:</td><td>%8.1f cm</td></tr>\n", $groesse;
    printf "<tr><td>Weight:</td><td>%8.2f kg</td></tr>\n", $gewicht;
    printf "<tr><td>Body Surface Area</td><td>%8.2f
m&#178;</td></tr>\n", $kof;
    printf "<tr><td>Clearance performed on:</td><td>%s</td></tr>\n",
$datum;
    printf "<tr><td>Dose</td><td>%8.0f mg</td>\n", $dosis;
}
print "</table>\n";

print "<p><b>Entnahmezeit und Konzentration der Blutproben:</b></p>\n"
if $isgerman;
print "<p><b>Times and Concentrations of Blood Samples:</b></p>\n" if
$isenglish;

print "<table border=1>\n";

```

```

print
"<tr><th>Blutentnahmezeiten</th><th>Inulinkonzentration</th></tr>\n" if
$isgerman;
print "<tr><th>Blood Sampling
Times</th><th>Inulinconcentration</th></tr>\n" if $isenglish;

print "<tr><td>Leerwert</td><td align=right>${c[0]} mg/l</td>\n" if
$isgerman;
print "<tr><td>Blank</td><td align=right>${c[0]} mg/l</td>\n" if $isenglish;

foreach $i (1 .. $#c){
print "<tr><td>${x[$i]} min</td><td align=right>${c[$i]} mg/l</td>\n";
}
print "</table>\n";

if( $isgerman ){
printf "<h3>Inulinclearance nach der Single-Sample Methode: %8.1f
ml/(min*1.73m&#178;)</H3>\n", $gfr1;
print "<p>Für das normalerweise durchgef&uuml;hrte
2-Kompartiment-Modell empfiehlt\n";
printf "Dr. Schumann folgende Absch&uuml;tzung: <b>%8.1f
ml/(min*1.73m&#178;)</b>\n", $gfr2;
print "Dieser Wert erlaubt einen Vergleich mit der Single-Shot
Inulinclearance.\n";

print "<p>Der Algorithmus zur Berechnung wurde von Lutz Schumann
et al.\n";
print "an der Universit&uuml;t Rostock, entwickelt und
ver&ouml;ffentlicht.\n";
print "N&uuml;here Informationen sind auf Anfrage erh&uuml;ltlich.\n";
}
if( $isenglish ){
printf "<h3>Inulinclearance using the Single-Sample Method: %8.1f
ml/(min*1.73m&#178;)</H3>\n", $gfr1;
print "<p>Dr. Schumann proposes the following approximation for a
comparison with the \n";
printf "2-compartment Single-Shot Method: <b>%8.1f
ml/(min*1.73m&#178;)</b>\n", $gfr2;

print "<p>The algorithm for this calculation has been developed and
published by \n";
print "Lutz Schumann et al., University of Rostock.\n";
print "Further Information is available on request.\n";
}

print "<HR>\n";
print "<b>Verbesserungsvorschl&uuml;ge:</b> Bitte per eMail an\n" if
$isgerman;
print "<b>Feedback welcome:</b> Please send eMail to\n" if $isenglish;
print "<address>\n<a
href=\`http://www.zki.uni-frankfurt.de/~mgunkel\`>Martin Gunkel</a>\n";
print "<a href=\`mailto:mgunkel\@zki.uni-
frankfurt.de\`>(mgunkel\@zki.uni-frankfurt.de)</a>\n";
print "</address>\n";

```

```

print "<br>Zurück zu der " if $isgerman;
print "<br>Back to the " if $isenglish;
print "<a href=\"/inulin/\">Inulin Homepage</a>\n";

print "<hr>\n</body>\n</html>\n";
}

#
# Main program starts here
#

#
# try to determine whether the script is run in local, german or english mode
# local is automatically german.
#
$islocal = $ENV{'REMOTE_ADDR'} =~ /^141\.2\.[119]\./;
$isgerman = $ENV{'REMOTE_HOST'} =~ /\.(de|at|ch)$/;
$isgerman = 1 if $islocal;
$isenglish = !$german;

# all other methods result in an entry form being returned
# to avoid problems
if( !($ENV{'REQUEST_METHOD'} =~ /POST/) ){
  # Return an appropriate entry form if the script is not called from
  # a submit button.
  print "Location: /inulin/single-sample-l.html\n\n" if $islocal;
  print "Location: /inulin/single-sample-d.html\n\n" if $isgerman;
  print "Location: /inulin/single-sample-e.html\n\n" if $isenglish;
  exit;
}

# check for proper CONTENT_TYPE from server i.e. posted data from a
HTML form
if( !($ENV{'CONTENT_TYPE'} =~ /application\/x-www-form-urlencoded/) ){
  print "Content-type: text/html\n\n";
  print "<HTML>\n";
  print "<TITLE>Error Message</TITLE>\n";
  print "<BODY>This script can only be used to decode form
results.</BODY>\n";
  print "</HTML>\n";
  exit;
}

# now we are in the POST operation, read all values from STDIN
$len = $ENV{'CONTENT_LENGTH'};
read(STDIN, $_, $len);

# split them into a list
@vars = split(/&|=/, $_);

# interpret the list and assign the values to the proper variables
while( ${#vars} ){

```



```

    @x[1] = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /t1/;

    @c[0] = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /c0/;
    @c[1] = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /c1/;

    $pid = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /patienten\-id/;
    $name = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /name/;
    $gebdat = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /geburtsdatum/;
    $groesse = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /groesse/;
    $gewicht = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /gewicht/;
    $datum = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /datum/;
    $dosis = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /dosis/;

    $mode = @vars[$i+1] if @vars[$i] =~ /mode/;

    $i+=2;
}
    @x[0] = 0; # Zeitpunkt der Leerwertmessung

# override the $islocal, $isgerman and $isenglish variables if a variable
# mode was specified in the script
if( $mode =~ /german/ ){
    $islocal = 0;
    $isgerman = 1;
    $isenglish = 0;
}
if( $mode =~ /english/ ){
    $islocal = 0;
    $isgerman = 0;
    $isenglish = 1;
}
if( $mode =~ /local/ ){
    $islocal = 1;
    $isgerman = 1;
    $isenglish = 0;
}

    &inulin;

```

3.12 Versuche mit der klassischen Infusionstechnik

An 2 Probanden (PID 24 und 25) wurden Versuche mit der klassischen Infusionstechnik durchgeführt.

Es sollte eine Inulinclearance und eine Kreatininclearance über den gleichen Zeitraum durchgeführt werden.

Die Probanden wurden zunächst gebeten, die Blase zu entleeren. Eine Probe davon wurde in ein Röhrchen, markiert als U1, abgefüllt und der Rest gesammelt. Dieses ist der Urinleerwert. Anschließend wurde ein venöser

Zugang gelegt, eine Leerwert-Blutprobe (B1) gewonnen und eine Dauertropfinfusion mit $125 \text{ ml/m}^2/\text{h}$ gestartet, um die Probanden vor Beginn der Clearance ausgiebig zu wässern. Diese Infusionsrate wurde während der gesamten Clearance beibehalten.

Nach 30 min Vorwässerungszeit wurde Inutest hinzugegeben: Über einen Injektomaten wurde zunächst die Bolusgabe von 10 ml/m^2 über 12 min durchgeführt und anschließend die Erhaltungsinfusion von $3 \text{ ml/m}^2/\text{h}$

60 min nach Beginn der Bolusgabe wurden die Probanden aufgefordert, die Blase wieder zu entleeren, die Menge wurde wieder gemessen, eine Probe (U2) abgefüllt. und der Rest gesammelt. Anschließend folgte eine Blutentnahme (B2).

Es folgten zwei Urinsammelperioden von ca. 60 min. Die Blutentnahmen (B3 und B4) wurden unmittelbar nach dem Entleeren der Blase gewonnen. Die Urinmengen wurden wieder gemessen, eine Probe abgefüllt (U3 und U4) und der Rest gesammelt.

Die Berechnung erfolgt analog zur Kreatininclearance nach der Formel

$$Cl_{Inulin} = \frac{C_{Urin}}{C_{Plasma}} \cdot UZV \quad (44)$$

die sich aus dem Fick'schen Prinzip herleitet. Dieses besagt allgemein, daß für einen Stoff 1 in zwei Flüssigkeitsräumen, die sich durch eine Membran im Konzentrationsausgleich befinden, gilt:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad (45)$$

Da die gesamte Menge Inulin, die durch die Filtration in den Tubulus gelangt, auch quantitativ im Endharn erscheinen muß, ist die pro Zeit ausgeschiedene Menge der in der gleichen Zeit filtrierte Menge gleich. Da gilt:

$$Menge = Volumen \cdot Konzentration \quad (46)$$

läßt sich die Bilanzgleichung aufschreiben:

$$UZV \cdot C_{Urin} = GFR \cdot C_{Plasma} \quad (47)$$

oder:

$$GFR = \frac{C_{Urin}}{C_{Plasma}} \cdot UZV \quad (48)$$

Das Urinzeitvolumen (UZV) berechnet sich aus den gemessenen Urinmengen in den Sammelperioden.

Die allgemeine Formel

$$Cl = \frac{C_{Urin}}{C_{Plasma}} \cdot UZV \quad (49)$$

wird auch als Clearanceformel bezeichnet. Sie beschreibt das Plasmavolumen, das pro Minute von der Testsubstanz geklärt wird. Im Falle einer Substanz wie Inulin ist diese Clearance mit der GFR identisch, da Inulin nur durch die glomeruläre Filtration eliminiert wird.

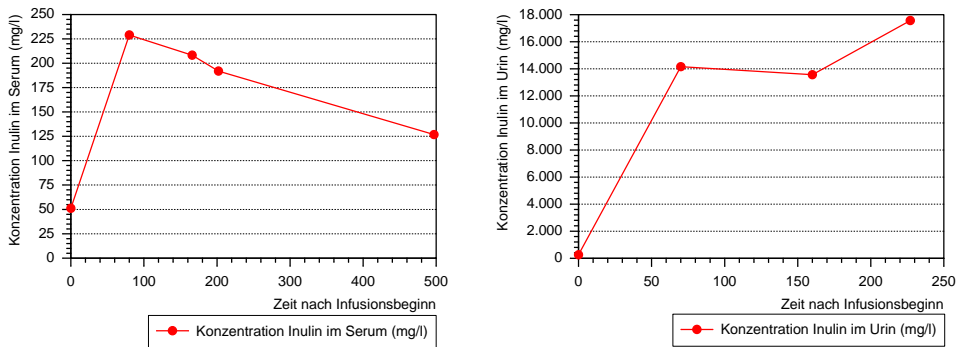


Fig. 36: Verlauf des Plasmaspiegels und Inulinausscheidung im Urin bei Proband 24

Ergebnis der Inulin-clearance nach der klassischen Infusionstechnik bei Proband 24: $84,8 \text{ ml/min}/1,73 \text{ m}^2$ nach der ersten Sammelzeit und $94,3 \frac{\text{ml}}{\text{min} \cdot 1,73 \text{ m}^2}$ nach der zweiten Sammelzeit. Den Serumspiegelverlauf zeigt Abbildung 36.

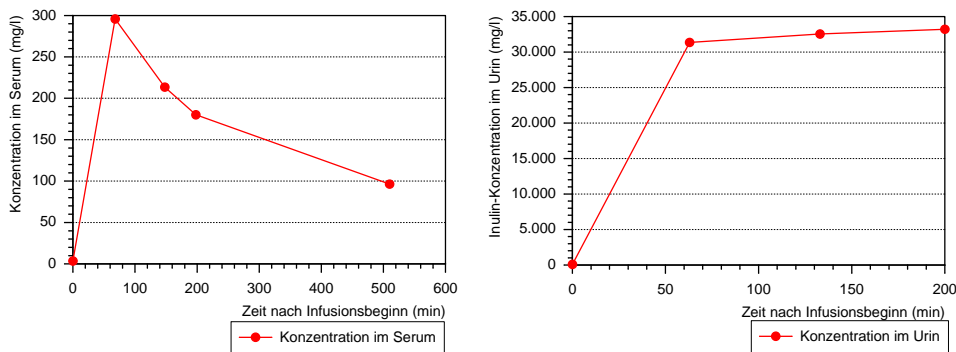


Fig. 37: Verlauf des Plasmaspiegels und Inulinausscheidung im Urin bei Proband 25

Ergebnis der Inulin-clearance nach der klassischen Infusionstechnik bei Proband 25: $109,5 \frac{ml}{min \cdot 1,73m^2}$ nach der ersten Sammelzeit und $52,9 \frac{ml}{min \cdot 1,73m^2}$ nach der zweiten Sammelzeit. Den Serumspiegelverlauf zeigt Abbildung 37.

Die Verläufe zeigen, daß sich mit diesem Regime während 6 Stunden kein sicher konstanter Plasmaspiegel hat etablieren lassen. Auch die Ausscheidung von Inulin im Urin war nicht konstant. Die Grundbedingung für eine Clearance war damit nicht erfüllt. Auch hat sich bei diesen Versuchen herausgestellt, daß der Aufwand des ständigen Urinsammelns bei Kindern so nicht möglich wäre.

3.13 Ergebnisse der Clearances

3.13.1 Präzision der Single-Shot Clearance

Die gesamte Clearance wird aus 8 Blutproben berechnet. Der Variationskoeffizient für die einzelne Probe liegt bei ca. 2 %. Für die gesamte Clearance muß der Variationskoeffizient höher liegen, da sich die Fehler der 8 Messungen addieren.

Die 8 Proben der Clearance von zwei Probanden wurden 10 mal gemessen und 10 einzelne Clearancewerte berechnet. Die statistische Auswertung der Messungen zeigt Tabelle 21.

| | Proband1 | Proband 2 |
|--|----------|-----------|
| Mittelwert Cl_{Inulin} in $\frac{ml}{min \cdot 1,73m^2}$ | 152.76 | 158.70 |
| Standardabweichung | 6,31 | 2.456 |
| Variationskoeffizient (%) | 4.13 | 1.55 |

Tab. 21: Präzision der Bestimmung einer Single-Shot Inulin-clearance

Der Variationskoeffizient für die Single Shot Clearance liegt bei 4.13 % bzw. 1.55 %. Dies ist deutlich weniger als die Variationskoeffizienten, die mit der Säurehydrolysemethode erreicht werden können. Die Angaben hierfür liegen nicht unter 13 %.

3.13.2 Ergebnisse der Clearances

Die Ergebnisse der Clearances finden sich in den folgenden zwei Tabellen.

| PID | Datum | Alter | Größe (cm) | Gewicht (kg) | KOF (m ²) | Urinmenge (ml) | Sammelzeit (min) | Cl Inulin (Single Shot) | Cl Kreatinin | Cl Harnstoff |
|-----|-----------|-------|------------|--------------|-----------------------|----------------|------------------|-------------------------|--------------|--------------|
| 1 | 19-Mai-94 | 0.8 | 72.5 | 9.2 | 0.41 | 80 | 24 | 90.4 | 29.9 | 22.5 |
| 2 | 18-Jul-94 | 25.1 | 164 | 62.7 | 1.68 | 390 | 14.5 | 96.6 | 109.9 | 24.3 |
| 3 | 17-Aug-93 | 16.7 | 185 | 66 | 1.88 | 5900 | 24 | 93.6 | 106.2 | 55.0 |
| 4 | 20-Jun-93 | 1.0 | 73.5 | 8.4 | 0.38 | 760 | 23.8 | 92.7 | 184.5 | 169.8 |
| 4 | 22-Sep-93 | 1.3 | 73 | 8.44 | 0.4 | | | 116.1 | | |
| 5 | 29-Mrz-94 | 14.8 | 172.2 | 52 | 1.61 | 1570 | 24 | 83.8 | 64.1 | |
| 5 | 18-Jul-94 | 15.1 | 173 | 55.5 | 1.66 | 1415 | 24 | 99.8 | 136.1 | 26.6 |
| 6 | 30-Aug-93 | 1.4 | 77.6 | 10.9 | 0.46 | 980 | 24 | 80.9 | 80.6 | 58.4 |
| 7 | 20-Dez-93 | 4.2 | 101 | 16.4 | 0.67 | 790 | 24 | 182.9 | 179.9 | |
| 8 | 05-Mai-94 | 0.3 | 61 | 6.18 | 0.31 | 290 | 24 | 64.1 | 24.4 | 29.5 |
| 8 | 08-Jul-94 | 0.5 | 64 | 6.6 | 0.33 | 110 | 19.3 | 49.3 | 85.2 | |
| 9 | 24-Mrz-94 | 16.2 | 168.5 | 71.1 | 1.81 | 270 | 5.5 | 88.5 | 91.4 | |
| 10 | 12-Jul-93 | 2.5 | 93.1 | 18.1 | 0.66 | 345 | 24 | 139.8 | 131.0 | 115.1 |
| 11 | 19-Jul-94 | 10.4 | 142 | 46.7 | 1.34 | 1130 | 24 | 115.7 | 120.6 | 56.5 |
| 12 | 23-Mrz-94 | 18.4 | 165 | 74 | 1.81 | 2450 | 22 | 144.7 | 127.5 | 43.8 |
| 13 | 05-Dez-93 | 1.0 | 71.5 | 8 | 0.38 | 480 | 24 | 67.1 | 58.5 | 182.1 |
| 14 | 04-Jul-93 | 3.6 | 105 | 17 | 0.7 | 1135 | 24.5 | 130.2 | 102.6 | 65.7 |
| 14 | 16-Mrz-94 | 4.3 | 108 | 19.3 | 0.75 | 1020 | 24 | 182.1 | 154.8 | 120.4 |
| 15 | 28-Apr-94 | 2.1 | 88.5 | 11 | 0.51 | 280 | 24 | 91.3 | 70.9 | |
| 16 | 20-Aug-93 | 14.6 | 162.5 | 53.5 | 1.56 | 1950 | 24 | 83.7 | 99.1 | 60.1 |
| 16 | 05-Sep-94 | 15.7 | 168 | 55 | 1.62 | 1210 | 32 | 87 | 123.3 | 44.1 |
| 17 | 30-Aug-93 | 3.3 | 100 | 13.5 | 0.61 | 1060 | 24 | 77.7 | 45.9 | 41.6 |
| 17 | 17-Dez-93 | 3.6 | 100 | 15 | 0.64 | 420 | 24 | 80.1 | 60.3 | |
| 17 | 17-Mrz-94 | 3.9 | 100 | 14.1 | 0.62 | 1020 | 12 | 111 | 140.3 | |
| 18 | 21-Jun-93 | 3.6 | 100.8 | 15 | 0.64 | 150 | 16 | 82.9 | 76.1 | 32.5 |
| 19 | 26-Aug-93 | 0.6 | 72 | 8.15 | 0.39 | 660 | 23 | 97.6 | 74.4 | 36.5 |
| 19 | 21-Okt-93 | 0.7 | 76 | 8.9 | 0.42 | | | 80.2 | | |
| 19 | 16-Dez-93 | 0.9 | 79 | 9 | 0.43 | | | 103.3 | | |
| 19 | 29-Mrz-94 | 1.2 | 82 | 10.7 | 0.48 | 450 | 24 | 122 | 92.7 | |
| 19 | 05-Mai-94 | 1.3 | 83 | 10.4 | 0.48 | 170 | 12 | 118 | 36.6 | |
| 19 | 06-Jun-94 | 1.4 | 83.1 | 10.7 | 0.48 | 140 | 8 | 99.9 | 58.8 | 37.8 |

| PID | Datum | Alter | Größe (cm) | Gewicht (kg) | KOF (m ²) | Urinmenge (ml) | Sammelzeit (min) | Cl Inulin (Single Shot) | Cl Kreatinin | Cl Harnstoff |
|-----|-----------|-------|------------|--------------|-----------------------|----------------|------------------|-------------------------|--------------|--------------|
| 19 | 01-Jul-94 | 1.4 | 83.1 | 11 | 0.49 | 110 | 12 | 120.5 | 178.0 | |
| 19 | 08-Aug-94 | 1.5 | 82 | 11.1 | 0.49 | | | 98.9 | | |
| 20 | 02-Jul-93 | 5.2 | 108.9 | 18.8 | 0.75 | 930 | 24 | 81 | 55.9 | 40.6 |
| 21 | 17-Mrz-94 | 9.9 | 140 | 30.8 | 1.11 | 1240 | 24 | 122.2 | 101.5 | 112.7 |
| 22 | 16-Sep-93 | 11.6 | 135 | 38 | 1.18 | 1130 | 12 | 12.3 | 12.3 | 8.6 |
| 23 | 26-Sep-94 | 19.8 | 151 | 40 | 1.31 | | | 75.9 | | |
| 24 | 01-Feb-93 | 32 | 187 | 96 | 2.21 | | | 124.8 | | |
| 24 | 15-Feb-93 | 32 | 187 | 96 | 2.21 | | | 108.2 | | |
| 25 | 15-Mai-93 | 24 | 186 | 96 | 2.21 | | | 182.7 | | |
| 26 | 19-Sep-94 | 14.6 | 139.9 | 39 | 1.23 | | | 96.4 | | |
| 27 | 24-Aug-94 | 2.7 | 90 | 13.1 | 0.56 | | | 89.8 | | |
| 27 | 19-Sep-94 | 2.3 | 89 | 12 | 0.53 | | | 123.3 | | |
| 27 | 24-Aug-94 | 2.2 | 89 | 12 | 0.53 | | | 120.7 | | |
| 27 | 02-Mai-95 | 2.9 | 89 | 12.8 | 0.55 | | | 102.6 | | |
| 28 | 10-Apr-95 | 1.2 | 76 | 9.4 | 0.43 | | | 115.8 | | |
| 28 | 04-Mai-95 | 1.3 | 76 | 9.4 | 0.43 | | | 114.9 | | |
| 29 | 21-Feb-95 | 2.1 | 82 | 12 | 0.5 | | | 92.6 | | |
| 29 | 30-Sep-94 | 1.7 | 76 | 9.9 | 0.44 | | | 123.1 | | |
| 30 | 22-Dez-94 | 24.2 | 178 | 58 | 1.73 | | | 100.4 | | |
| 31 | 09-Dez-94 | 18.8 | 168.7 | 65.6 | 1.75 | | | 74.6 | | |
| 31 | 30-Sep-94 | 18.6 | 168.1 | 64.7 | 1.74 | | | 76.4 | | |
| 32 | 18-Jul-94 | 17.8 | 168 | 41.6 | 1.44 | | | 97.4 | | |

| PID | Datum | Alter | Cl Inulin (Single Shot) | Cl Inulin (Single-Sample 120 min) | Cl Inulin (Single-Sample 120 min, korr.) | Cl Inulin (Single-Sample 240 min) | Cl Inulin (Single-Sample 240 min, korr.) | Cl Abschätzung nach Neumeyer |
|-----|-----------|-------|-------------------------|-----------------------------------|--|-----------------------------------|--|------------------------------|
| 1 | 19-Mai-94 | 0.8 | 90.4 | 88.6 | 72.1 | 106.5 | 85.7 | 27.4 |
| 2 | 18-Jul-94 | 25.1 | 96.6 | 113.2 | 90.8 | 96.1 | 77.8 | 81.4 |
| 3 | 17-Aug-93 | 16.7 | 93.6 | 96.6 | 78.2 | 108.4 | 87.2 | 89.1 |
| 4 | 20-Jun-93 | 1.0 | 92.7 | 91.7 | 74.4 | 102.2 | 82.4 | 179.6 |
| 4 | 22-Sep-93 | 1.3 | 116.1 | 149.4 | 118.5 | 145 | 115.1 | |
| 5 | 29-Mrz-94 | 14.8 | 83.8 | 74.6 | 64.4 | 94.3 | 76.4 | |

| PID | Datum | Alter | Cl Inulin (Single Shot) | Cl Inulin (Single-Sample 120 min) | Cl Inulin (Single-Sample 120 min, korr.) | Cl Inulin (Single-Sample 240 min) | Cl Inulin (Single-Sample 240 min, korr.) | Cl Abschätzung nach Neumeyer |
|-----|-----------|-------|-------------------------|-----------------------------------|--|-----------------------------------|--|------------------------------|
| 5 | 18-Jul-94 | 15.1 | 99.8 | 98.6 | 79.7 | 109.7 | 88.2 | 99.7 |
| 6 | 30-Aug-93 | 1.4 | 80.9 | 85.1 | 69.4 | 94.6 | 76.6 | 73.2 |
| 7 | 20-Dez-93 | 4.2 | 182.9 | 209.6 | 164.4 | 173.9 | 137.1 | |
| 8 | 05-Mai-94 | 0.3 | 64.1 | 119.7 | 95.79 | 83.2 | 67.9 | 26.1 |
| 8 | 08-Jul-94 | 0.5 | 49.3 | 49.7 | 42.4 | 76.9 | 63.1 | |
| 9 | 24-Mrz-94 | 16.2 | 88.5 | 134 | 106.7 | 104.1 | 83.9 | |
| 10 | 12-Jul-93 | 2.5 | 139.8 | 176.6 | 139.2 | 166.2 | 131.3 | 125.7 |
| 11 | 19-Jul-94 | 10.4 | 115.7 | 109.9 | 88.3 | 124.2 | 99.2 | 99.2 |
| 12 | 23-Mrz-94 | 18.4 | 144.7 | 169.8 | 134.0 | 157.4 | 124.6 | 99.6 |
| 13 | 05-Dez-93 | 1.0 | 67.1 | 69 | 57.1 | 78.9 | 64.7 | 99.7 |
| 14 | 04-Jul-93 | 3.6 | 130.2 | 217.4 | 170.3 | 227.2 | 177.8 | 90.3 |
| 14 | 16-Mrz-94 | 4.3 | 182.1 | 207.1 | 162.5 | 219.6 | 172.0 | 143.4 |
| 15 | 28-Apr-94 | 2.1 | 91.3 | 125.1 | 99.9 | 102.2 | 82.4 | |
| 16 | 20-Aug-93 | 14.6 | 83.7 | 145.6 | 115.6 | 121.4 | 97.1 | 86.1 |
| 16 | 05-Sep-94 | 15.7 | 87 | 106.7 | 85.9 | 117.5 | 94.1 | 96.9 |
| 17 | 30-Aug-93 | 3.3 | 77.7 | 67.4 | 55.9 | 82.2 | 67.2 | 44.5 |
| 17 | 17-Dez-93 | 3.6 | 80.1 | 79.6 | 65.2 | 84 | 68.6 | |
| 17 | 17-Mrz-94 | 3.9 | 111 | 116.7 | 93.5 | 126.2 | 100.8 | |
| 18 | 21-Jun-93 | 3.6 | 82.9 | 76.1 | 62.5 | 92.7 | 75.2 | 61.6 |
| 19 | 26-Aug-93 | 0.6 | 97.6 | 102.1 | 82.4 | 118.3 | 94.7 | 61.8 |
| 19 | 21-Okt-93 | 0.7 | 80.2 | 106.7 | 85.9 | 103.5 | 83.4 | |
| 19 | 16-Dez-93 | 0.9 | 103.3 | 118.1 | 94.6 | 111.3 | 89.4 | |
| 19 | 29-Mrz-94 | 1.2 | 122 | 123.6 | 98.8 | 145.5 | 115.5 | |
| 19 | 05-Mai-94 | 1.3 | 118 | 117.1 | 93.8 | 127.3 | 101.6 | |

| PID | Datum | Alter | Cl In- ulin (Sin- gle Shot) | Cl In- ulin (Single- Sample 120 min) | Cl In- ulin (Single- Sample 120 min, korr.) | Cl In- ulin (Single- Sample 240 min) | Cl In- ulin (Single- Sample 240 min, korr.) | Cl Ab- schät- zung nach Neu- mey- er |
|-----|-----------|-------|---|---|---|---|---|---|
| 19 | 06-Jun-94 | 1.4 | 99.9 | 105.4 | 84.9 | 107.3 | 86.3 | 51.8 |
| 19 | 01-Jul-94 | 1.4 | 120.5 | 123 | 98.3 | 129.8 | 103.5 | |
| 19 | 08-Aug-94 | 1.5 | 98.9 | 87.5 | 71.2 | 103.2 | 83.2 | |
| 20 | 02-Jul-93 | 5.2 | 81 | 98.1 | 79.3 | 105.9 | 85.3 | 50.8 |
| 21 | 17-Mrz-94 | 9.9 | 122.2 | 129.2 | 103 | 130.6 | 104.1 | 105.2 |
| 22 | 16-Sep-93 | 11.6 | 12.3 | 48.8 | 41.7 | -10 | -3.17 | 11.1 |
| 23 | 26-Sep-94 | 19.8 | 75.9 | 89.9 | 73.1 | 99 | 80.0 | |
| 24 | 01-Feb-93 | 32 | 124.8 | 140.5 | 111.7 | 119.1 | 95.3 | |
| 24 | 15-Feb-93 | 32 | 108.2 | 127.7 | 101.9 | 119.1 | 95.3 | |
| 25 | 15-Mai-93 | 24 | 182.7 | 173.1 | 136.5 | 128.6 | 102.6 | |
| 26 | 19-Sep-94 | 14.6 | 96.4 | 136.3 | 108.5 | 145.9 | 115.8 | |
| 27 | 24-Aug-94 | 2.7 | 89.8 | 112.8 | 90.5 | 124.5 | 99.5 | |
| 27 | 19-Sep-94 | 2.3 | 123.3 | 1139.6 | 111.0 | 150.5 | 119.3 | |
| 27 | 24-Aug-94 | 2.2 | 120.7 | 141.7 | 112.6 | 149.7 | 118.7 | |
| 27 | 02-Mai-95 | 2.9 | 102.6 | 103.2 | 83.2 | 106.4 | 85.6 | |
| 28 | 10-Apr-95 | 1.2 | 115.8 | 137.8 | 109.6 | 141.7 | 112.6 | |
| 28 | 04-Mai-95 | 1.3 | 114.9 | 121.8 | 98.39 | 126.9 | 101.3 | |
| 29 | 21-Feb-95 | 2.1 | 92.6 | 95.4 | 77.3 | 124 | 99.1 | |
| 29 | 30-Sep-94 | 1.7 | 123.1 | 141.9 | 112.7 | 156.1 | 123.6 | |
| 30 | 22-Dez-94 | 24.2 | 100.4 | 123.8 | 98.9 | 141.2 | 112.2 | |
| 31 | 09-Dez-94 | 18.8 | 74.6 | 72.8 | 60.0 | 99.9 | 80.7 | |
| 31 | 30-Sep-94 | 18.6 | 76.4 | 85.3 | 69.5 | 85.3 | 69.5 | |
| 32 | 18-Jul-94 | 17.8 | 97.4 | 99.1 | 80.1 | 107.7 | 86.6 | |

3.13.3 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung dieser Werte zeigen die folgenden drei Tabellen:

| | Alter (Jahre) | Größe (cm) | Gewicht (kg) | KOF (m ²) | Sam- mel- urin- menge (ml) | Sammel- zeit (Std.) |
|--------------|------------------|---------------|-----------------|--------------------------|--|---------------------------|
| Mittelwert | 8.27 | 115.37 | 29.97 | 0.94 | 938.59 | 20.89 |
| Median | 3.61 | 100.0 | 15.00 | 0.64 | 775.00 | 24.00 |
| Standardabw. | 8.94 | 41.76 | 29.57 | 0.60 | 1071.92 | 5.99 |
| Maximum | 32.00 | 187.0 | 96.00 | 2.21 | 5900.00 | 32.00 |
| Minimum | 0.31 | 61.00 | 6.18 | 0.31 | 80.00 | 5.50 |
| Anzahl | 53.00 | 53.00 | 53.00 | 53.00 | 32.00 | 32.00 |

| | Cl Krea- tinin | Cl Harn- stoff | Neu- meyer Ab- schätz- ung |
|--------------|-------------------|----------------------|--|
| Mittelwert | 94.17 | 62.92 | 82.01 |
| Median | 92.04 | 43.95 | 87.62 |
| Standardabw. | 45.29 | 47.16 | 39.44 |
| Maximum | 184.53 | 182.11 | 179.62 |
| Minimum | 12.32 | 8.62 | 11.09 |
| Anzahl | 32.00 | 22.00 | 22.00 |

| | Cl Inulin Single- Shot | Cl Inulin Single- Sample 120 min | Cl Inulin Single- Sample 240 min | Cl Inulin Single- Sample 120 min korr. | Cl Inulin Single- Sample 240 min korr. |
|--------------|---------------------------------|--|--|---|---|
| Mittelwert | 102.03 | 116.61 | 118.73 | 93.43 | 95.05 |
| Median | 97.60 | 113.20 | 117.50 | 90.83 | 94.11 |
| Standardabw. | 30.31 | 36.84 | 35.84 | 28.11 | 27.20 |
| Maximum | 182.90 | 217.40 | 227.20 | 170.34 | 177.81 |
| Minimum | 12.30 | 43.80 | -10.00 | 41.69 | -3.17 |
| Anzahl | 53.00 | 53.00 | 53.00 | 53.00 | 53.00 |

Von den 49 an onkologischen Patienten durchgeführten Single-Shot Inulin-clearances lag nur eine Clearance im Bereich von 36,9 bis 61,5 ml/min/1,73 m²; 13 lagen zwischen 61,5 und 86,1 ml/min/1,73 m², 18 lagen zwischen 86,1 und 110,7 ml/min/1,73 m² und 16 lagen über 110,7 ml/min/1,73 m².

Die Abbildungen 38 und 39 zeigen diese Werte in der graphischen Übersicht:

Die Werte der verschiedenen Clearances korrelieren nach folgender Tabelle

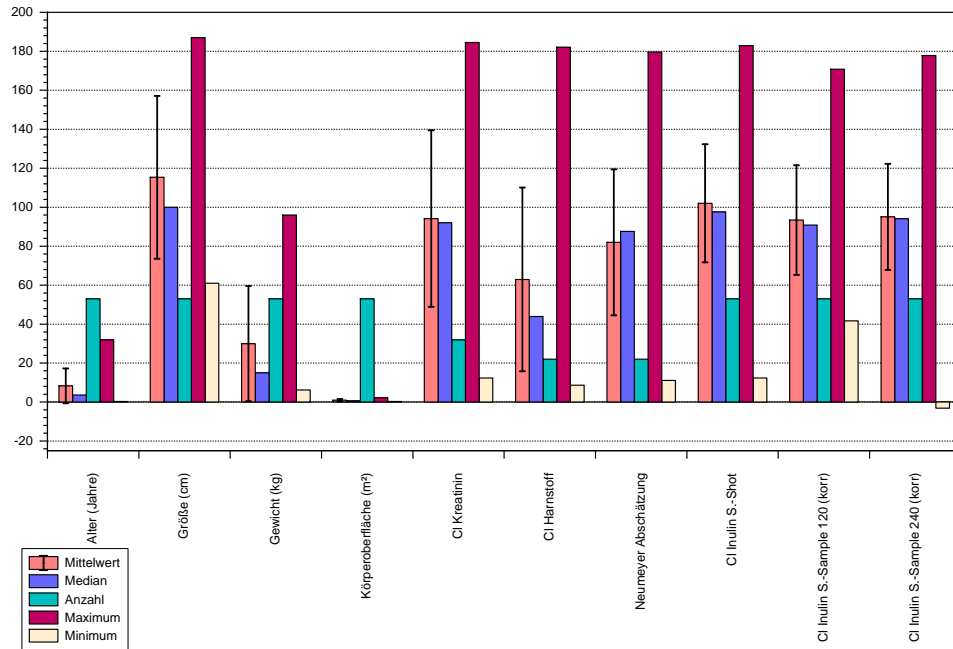


Fig. 38: Übersicht über die Statistik

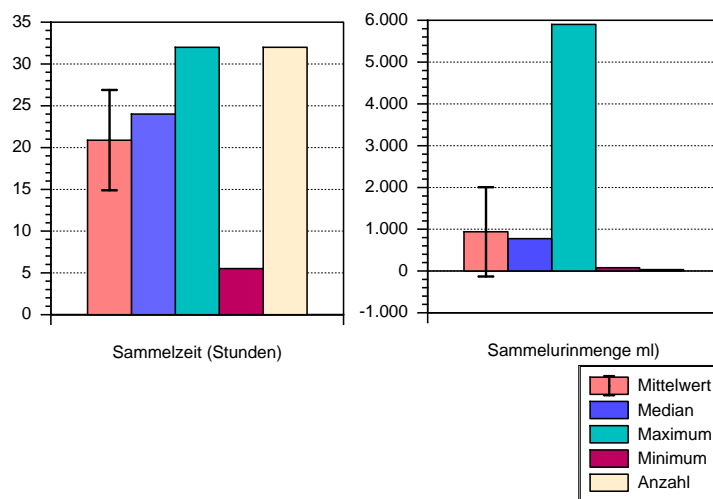


Fig. 39: Qualität der Urinsammlung

miteinander:

| Korrelation | Ergebnis |
|--|----------|
| Single-Shot Inulin-clearance – Single-Sample Inulin-clearance nach 2 Stunden | 0.85 |
| Single-Shot Inulin-clearance – Single-Sample Inulin-clearance nach 2 Stunden mit Korrektur | 0.85 |
| Single-Shot Inulin-clearance – Single-Sample Inulin-clearance nach 4 Stunden | 0.83 |
| Single-Shot Inulin-clearance – Single-Sample Inulin-clearance nach 4 Stunden mit Korrektur | 0.83 |
| Single-Shot Inulin-clearance – Kreatinin-clearance | 0.66 |
| Single-Shot Inulin-clearance – Harnstoffclearance | 0.32 |
| Single-Shot Inulin-clearance – GFR-Abschätzung nach Neumeyer | 0.63 |

Die Abbildung 40 zeigt die Verteilung der Single-Shot Inulin-clearance und Kreatinin- und Harnstoffclearance. Abbildung 41 zeigt die Übersicht (so weit gemessen) für jede einzelne Clearance jedes einzelnen Patienten graphisch dargestellt. Es ist auf den ersten Blick zu erkennen, daß die Werte im individuellen Vergleich sehr heterogen sind.

Vergleicht man die gemessenen Single-Shot Inulin-clearances mit direkt den Kreatinin-clearances, so sieht man auch hier gut, daß Inulin- und Kreatinin-clearance im Einzelfall oft weit auseinander liegen und daß große Abweichungen sowohl nach oben als auch nach unten vorkommen (Abbildung 42).

Die Harnstoffclearance liefert häufig niedrigere Werte als die Single-Shot Inulin-clearance, wie es auch theoretisch zu erwarten wäre. Es kommen aber auch zwei Messungen vor, bei denen die Harnstoffclearance deutlich größer ist als die Single-Shot Inulin-clearance (Abbildung 43)

Stellt man die gemessenen Single-Shot Inulin-clearances mit den Abschätzungen der GFR aus Kreatinin- und Harnstoffclearance nach Neumeyer gegenüber, so ergibt sich kein besseres Bild als mit der Kreatinin-clearance alleine (Abbildung 44).

Vergleicht man die Single-Shot Inulin-clearance mit den berechneten Single-Sample Clearances nach 2 und 4 Stunden (mit und ohne Korrektur nach Schumann für den Vergleich mit der Single-Shot Clearance), so sieht man, daß die Werte der Single-Sample Clearances die der Single Shot Clearance gelegentlich unterschätzen, aber das Profil ist homogener als beim Vergleich Single-Shot Inulin-clearance - Kreatinin/Harnstoffclearance.

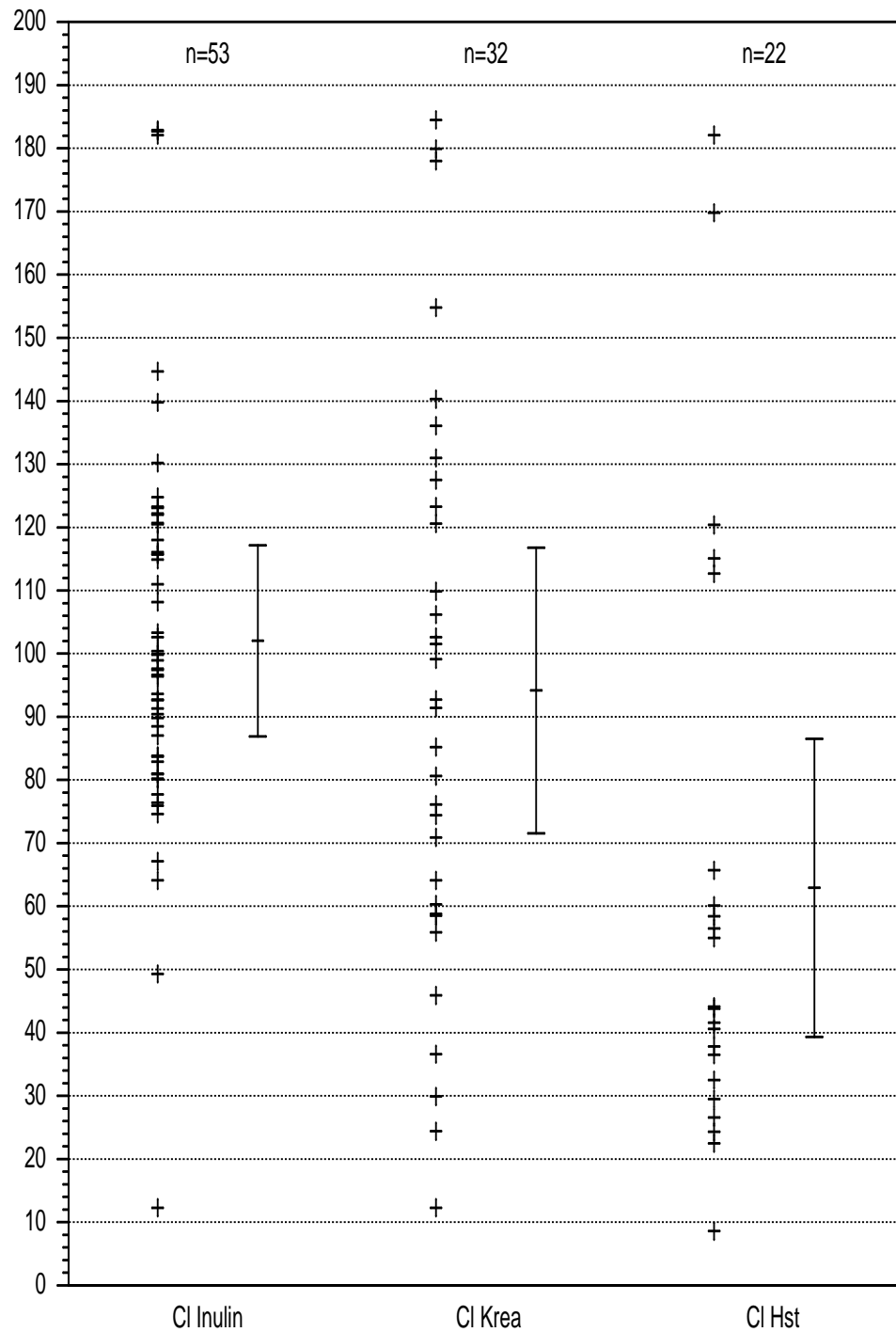


Fig. 40: Verteilung der gemessenen Single-Shot Inulin-, Kreatinin- und Harnstoffclearances.

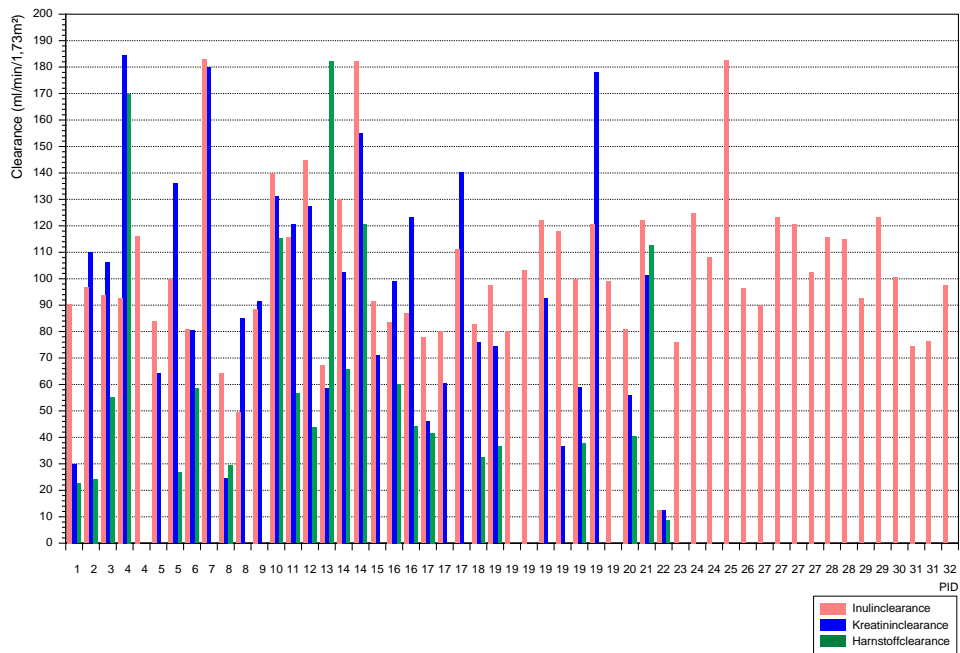


Fig. 41: Übersicht der gemessenen Single-Shot Inulin-, Kreatinin- und Harnstoffclearances im individuellen Vergleich.

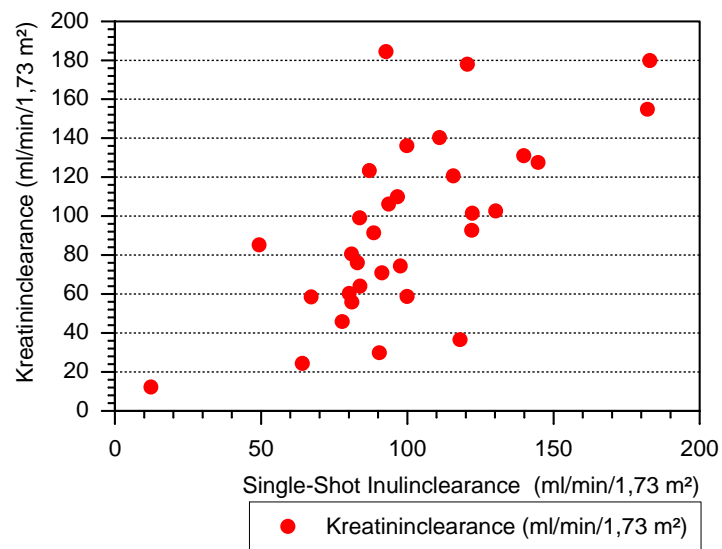


Fig. 42: Korrelation der Single-Shot Inulin clearance mit der Kreatinin clearance ($r=0,66$)

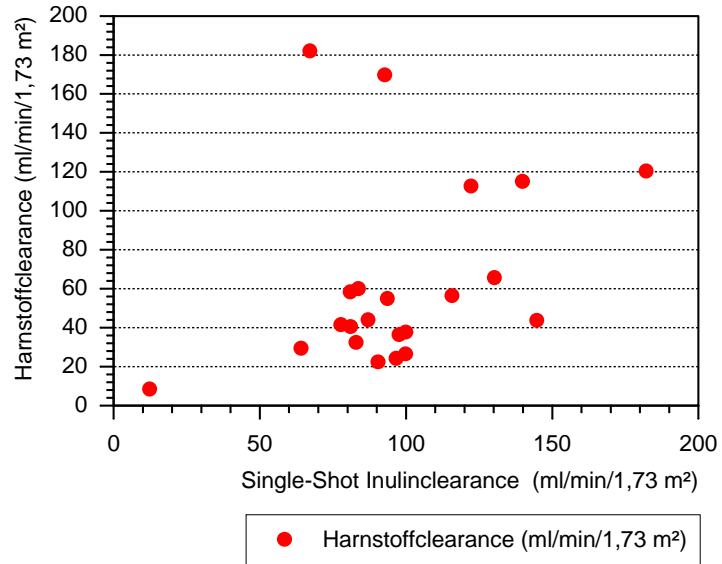


Fig. 43: Korrelation der Single-Shot Inulin clearance mit der Harnstoffclearance ($r=0,32$)

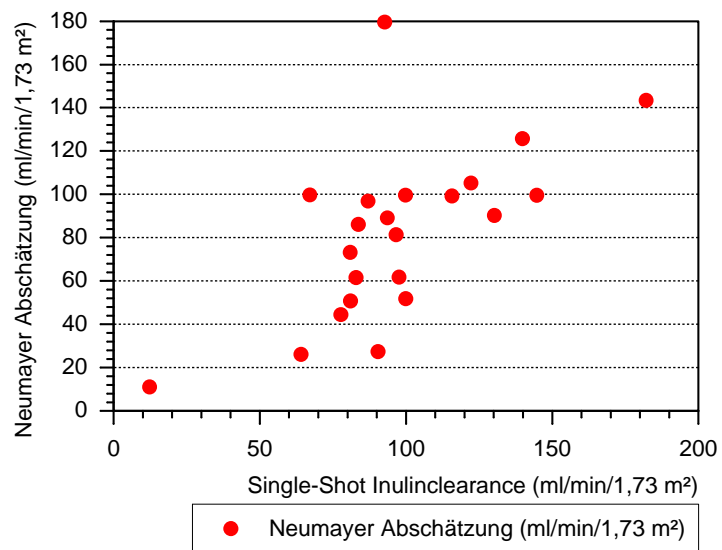


Fig. 44: Korrelation der Single-Shot Inulin clearance mit der Abschätzung der GFR nach Neumeyer ($r=0,63$)

Bei den Single-Sample Berechnungen, die nicht für den Vergleich mit der Single-Shot Clearance korrigiert wurden, findet man bei der Berechnung für den 4 Stunden-Wert eher eine Überschätzung. Der 2 Stunden Wert stimmt hier oft gut überein.

Zur Verdeutlichung zeigen die Abbildungen 45, 46, 47 und 48 Einzeldarstellungen für die Korrelation der vier berechneten Single-Sample Clearance-Methoden im Vergleich mit der Single-Shot Inulin-clearance. Man sieht auch hier deutlich, daß es viele übereinstimmende Werte gibt, aber auch Ausreißer nach oben und nach unten vorkommen. Abbildung 49 und 50

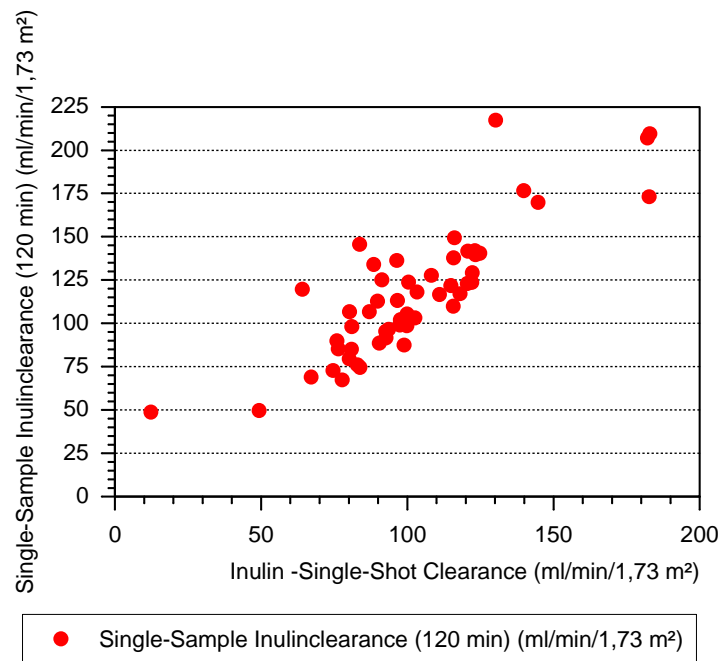


Fig. 45: Korrelation Inulin Single-Shot und Single-Sample Clearance unkorrigiert, nach 2 Stunden ($r=0,85$)

zeigen als direkten Vergleich die Verteilung aller gemessenen und berechneten Clearances nebeneinander.

Betrachtet man nur die Single-Shot Inulin-clearances von Patienten, die mehr als eine Untersuchung hatten, so zeigen sich zwischen den verschiedenen Untersuchungen zwar Schwankungen, die jedoch geringer sind als die Schwankungen in der Kreatinin-Clearance (Abbildung 50).

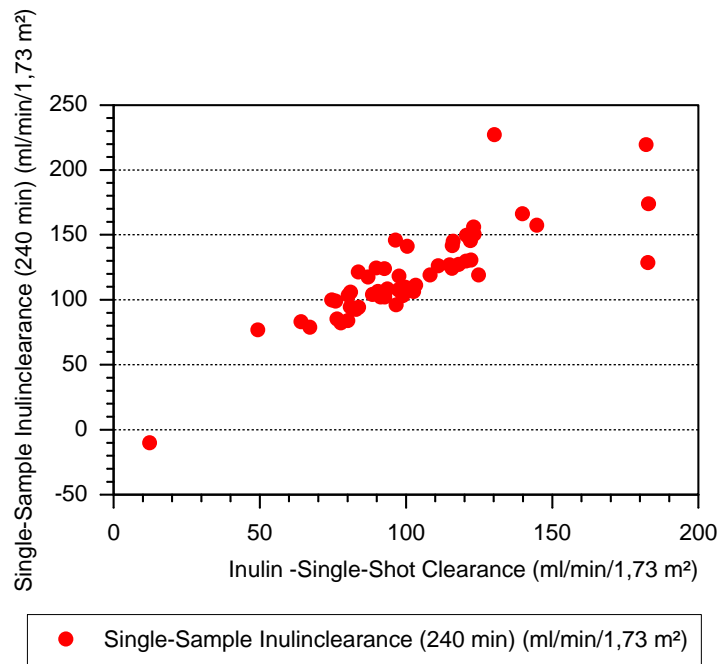


Fig. 46: Korrelation Inulin Single-Shot und Single-Sample Clearance unkorrigiert, nach 4 Stunden ($r=0,83$)

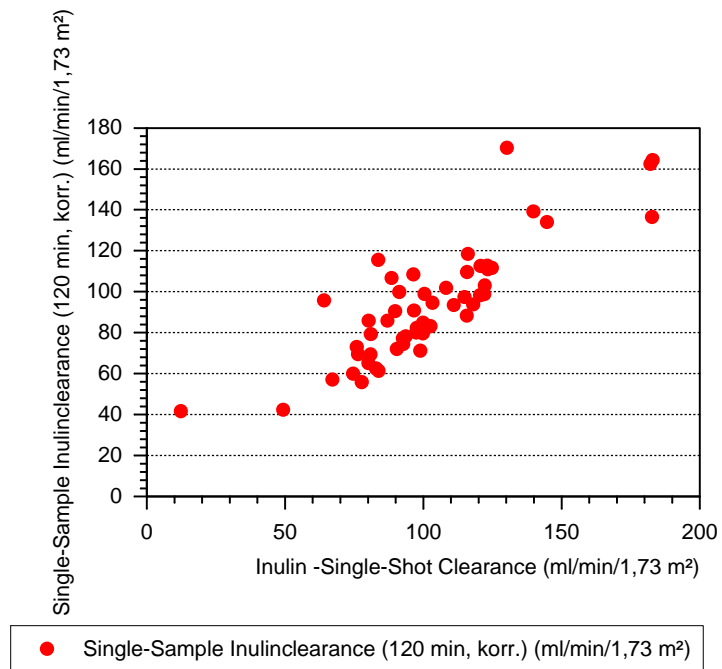


Fig. 47: Korrelation Inulin Single-Shot und Single-Sample Clearance korrigiert, nach 2 Stunden ($r=0,85$)

3.14 Aufwand der Durchführung der Single-Shot Clearance am
3 ERGEBNISSE Krankenbett, Erfahrungen mit Patienten und Eltern

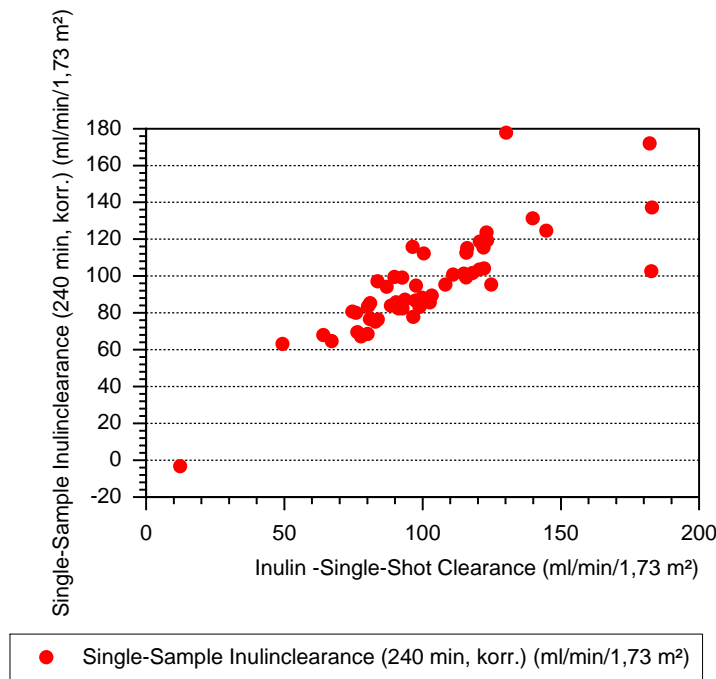


Fig. 48: Korrelation Inulin Single-Shot und Single-Sample Clearance korrigiert, nach 4 Stunden ($r=0,83$)

3.14 Aufwand der Durchführung der Single-Shot Clearance am Krankenbett, Erfahrungen mit Patienten und Eltern

Um die Clearance am Krankenbett durchführen zu können, sind folgende Arbeitsschritte nötig:

1. Legen eines venösen Zugangs, sofern nicht Katheter vorhanden.
2. Blutentnahme eines Serum- oder Heparin-Plasma Leerwertes.
3. Spritzen der Inutest-Lösung in der Dosierung von $7,5 \text{ g/m}^2$, Uhrzeit und die daraus resultierenden Entnahmezeiten auf dem Anforderungsblatt notieren.
4. 5 min nach der Injektion folgt die erste Blutentnahme: 20 ml vorziehen, 1 ml Probe entnehmen, vorgezogenes Blut wieder zurückgeben, Zugang mit physiologischer Natriumchloridlösung spülen und verschließen.
5. Genauso wird 30 min, 120 min, 150 min, 180 min, 210 min und 240 min nach der Injektion verfahren. Die Patienten haben also 30 min nach der Injektion 90 min "Freizeit".

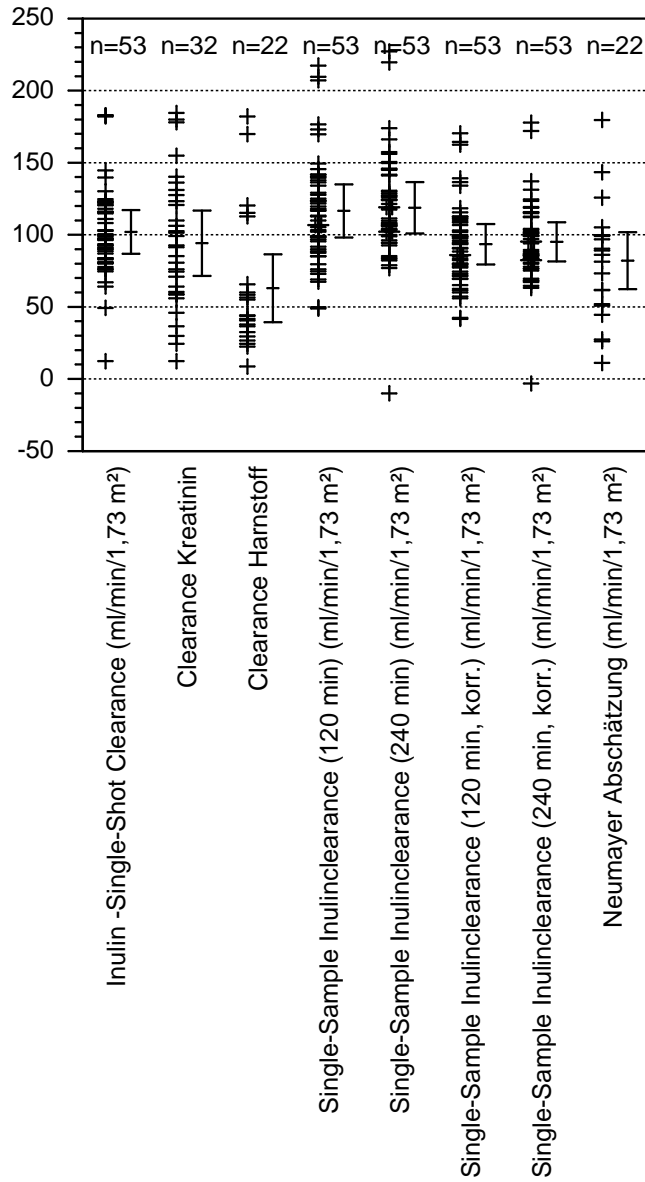


Fig. 49: Verteilung aller gemessenen Clearances

3.14 Aufwand der Durchführung der Single-Shot Clearance am
3 ERGEBNISSE Krankenbett, Erfahrungen mit Patienten und Eltern

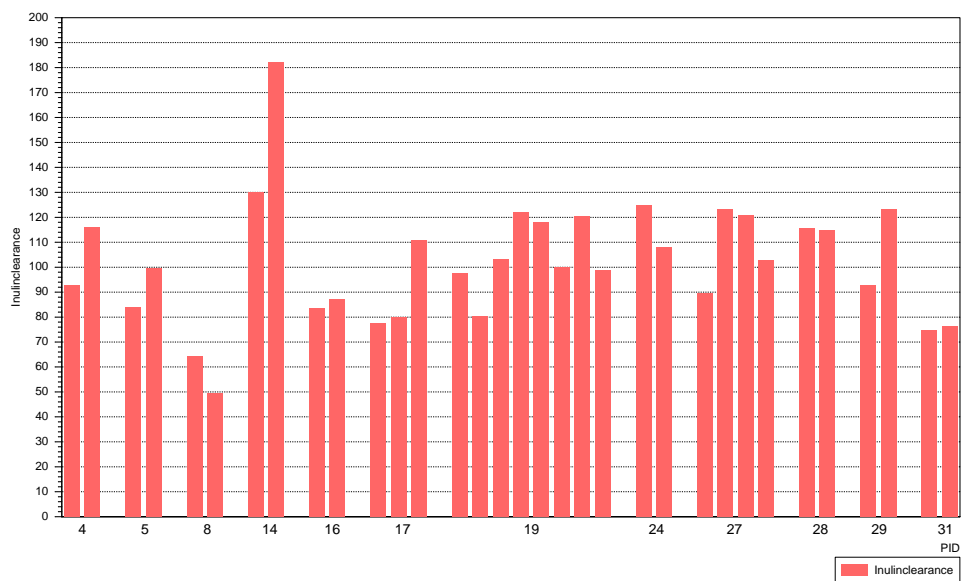


Fig. 50: Übersicht über die Patienten, deren Single-Shot Inulin-clearance mehrfach gemessen werden konnte

Pro Blutentnahme muß man in der Pädiatrie mit einem Zeitaufwand von ca. 10 min rechnen. In der langsamen Phase der Verteilung hat man also zwischen zwei Blutentnahmen 20 min Zeit. Dies ist knapp, wenn zwischendurch noch ein weiterer Patient behandelt oder untersucht werden soll. Da die Methode aber toleriert, wenn die Blutentnahmen nicht exakt erfolgen, kann man die Durchführung der Clearance etwas an die Arbeitssituation anpassen.

Inulin ist im allgemeinen gut verträglich. Der Beipackzettel von Inutest führt keine Nebenwirkungen auf, insbesondere Hinweise auf Unverträglichkeitsreaktionen finden sich weder im Beipackzettel noch in der Literatur.

Wir hatten allerdings bei zwei Patienten eine leichte Unverträglichkeitsreaktion, die im Sinne einer allergischen Reaktion vom Typ IV bereits während bzw. kurz nach dem Spritzen von Inutest aufgetreten ist.

Ein 10 jähriger Junge mit Medulloblastom reagierte kurz nach dem Spritzen von Inutest mit Lidödemen und Quaddeln an Armen und Beinen. Er blieb auch ohne Antihistaminika kreislaufstabil. Dieser Junge erhielt Inutest zum ersten Mal, und war als starker Allergiker bekannt, er reagierte auch auf diverse andere Medikamente.

Der zweite Patient, der auf die Inutest-Lösung allergisch reagierte, war ein 16 jähriger Junge mit einem Pinealoblastom. Er berichtete bereits während der Injektion der Inutest-Lösung über ein Jucken im Gesicht, am Gaumen

und an der Zunge. Er entwickelte keine Hauteffloreszenzen und auch bei ihm stellten sich keine Kreislaufwirkungen ein, so daß keine Antihistaminika eingesetzt wurden. Auch er hat vorher niemals Inutest erhalten.

Unsere Recherchen, die wir bereits nach dem ersten Fall durchführten, ergaben, daß beim Hersteller solche Nebenwirkungen nicht bekannt sind. Gretz (1993) berichtete allerdings über einen ähnlichen Fall in einer Studie mit 300 Patienten. Da beide Patienten vor dem Ereignis nie Inutest erhalten haben und nicht sensibilisiert werden konnten, ist eine Allergie gegen einen Hilfsstoff der Inutest-Lösung möglich.

4 Diskussion

4.1 Inulin-Bestimmung

Die enzymatische Bestimmungsmethode für Inulin ist noch recht neu. Daher ist sie einerseits noch nicht sehr verbreitet, andererseits gibt es zu diesem Thema bisher wenig Literatur.

Die von Kühnle beschriebene und von uns modifizierte Methode zur Inulinmessung hat sich, von einigen Schwierigkeiten abgesehen, gut auf ein automatisches System adaptieren lassen. Die feststehenden Reaktionszeiten machen den Einsatz recht hoher Enzymaktivitäten notwendig, damit die Reaktionen vollständig ablaufen können. Die Kinetiken belegen jedoch, daß die Reaktionen in der zur Verfügung stehenden Zeit komplett ablaufen.

In den Versuchen hat sich gezeigt, daß mögliche Störfaktoren (Hämolyse, Lipämie, Hyperbilirubinämie, Glucose) als solche nicht relevant sind bzw. durch geeignete Reaktionsschritte eliminiert werden können. Glucose wird sicher bis zu einem Gehalt von 600 mg/l entfernt. Eine solch hohe Blutglucose sollte auch bei schlecht eingestellten Diabetikern in der klinischen Routine nicht vorkommen.

Die gängigen Antikoagulanzen stören bis auf ACD die Bestimmung nicht. ACD ist ein dextroshaltiger Citratpuffer, der eigentlich nur bei der Verarbeitung von Blut und Blutprodukten in Blutspendediensten und ähnlichen Einrichtungen eingesetzt wird. ACD wird in der Regel nicht zur Gerinnungshemmung im Rahmen der Labordiagnostik verwendet. Der Einfluß von ACD auf die Ergebnisse ist daher zwar wichtig zu wissen, aber in der Regel praktisch irrelevant.

Die Vorinkubation erfolgt besser bei 56 °C als bei 37 °C, da die Reaktion bei nahezu gleichen Meßergebnissen und sicherer Glucoseelimination schneller abläuft und die mögliche Störung durch eine erhöhte endogene Phosphoglucoseisomerase eliminiert wird. Die Einhaltung der angegebenen Zeit von 20 min ist jedoch kritisch. Die Inkubation darf nicht kürzer sein, da erst nach 20 min. die Glucose sicher ganz eliminiert und das Inulin komplett in Fructose umgesetzt ist.

Das bei der Messung entstehende NADH_2 wird häufig in der klinischen Chemie als photometrisch auswertbares Reaktionsergebnis verwendet, da es sich gut messen läßt und seine Konzentration dem Lambert-Beerschen Gesetz folgt, d.h. pro Molekül des Ausgangsstoffs entsteht eine proportionale Menge NADH_2 .

Um die Konzentration der gemessenen Probe aus der Extinktion zu ermitteln, ist die Erstellung einer Eichkurve sicher die einfachste, aber auch die ungenaueste Methode.

Die Berechnung der Konzentration mittels eines theoretisch errechneten Faktors erweist sich zwar als hinreichend genau, sie funktioniert jedoch nur, wenn auch wirklich Extinktionen vom Gerät ausgegeben werden. Der Mitsubishi Super Z tut dieses nicht. Der Faktor muß daher anhand der Meßergebnisse angepaßt werden.

Die genaueste Möglichkeit stellt die automatische Standardkalibration, die direkt durch die Maschine durchgeführt wird, dar. Hierbei werden systematische Fehler teilweise eliminiert, da auch der Standard für die Messung den gleichen Bedingungen unterworfen wird, wie die einzelnen Proben. Es muß jedoch gewährleistet sein, daß die Standardkonzentration immer gleich ist. Da unsere Versuche gezeigt haben, daß Inulin bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ lange zu lagern ist, empfiehlt es sich, den Standard aliquotiert bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ einzufrieren und bei jeder Messung eine neue Probe davon aufzutauen.

Der lineare Bereich der Messung liegt nach unseren Messungen bis 1000 mg/l. Der 2000 mg/l-Wert liegt nach den Kurven eindeutig nicht mehr im linearen Bereich. 1000 mg/l entspricht in unserem Ansatz einer Extinktion von etwa 1,25; 2000 mg liegen bei etwa 2.1. In diesem Bereich können Photometer keine feinen Schwankungen mehr detektieren. Sugita (1996) beschreibt einen linearen Extinktionsbereich für eine vergleichbare vollenzymatische Bestimmungsmethode bis 2000 mg/l.

Der untere Meßbereich ist schwierig zu bestimmen. Nimmt man den dreifachen Nullwert, so liegt die Nachweisgrenze bei

$$3 \cdot 1,37\text{mg/l} = 4,11\text{mg/l}$$

Dies hat sich in unseren Versuchen mit verdünnter Injektionslösung jedoch nicht verifizieren lassen. Da hier, wie bereits erwähnt, der Pipettierfehler eine erhebliche Rolle spielt, ist eine so bestimmte Nachweisgrenze vermutlich korrekt. Den Nachweis hierüber müssen wir jedoch schuldig bleiben.

Summerfield (1995) beschreibt in ihrer Adaptation einer vollenzymatischen Methode auf Sorbitol Basis auf einen Cobas FARA II einen linearen Extinktionsbereich bis lediglich 300 mg/l. Dies macht es oft unmöglich, Proben zu verdünnen. Aber auch diese Methode läuft vollenzymatisch ab und Summerfield kommt zu dem Schluß, daß die automatisierte enzymatische Bestimmung von Inulin schneller ist als die klassische Anthron-Methode und die Ergebnisse gut übereinstimmen.

In der vorliegenden Arbeit liegen die Variationskoeffizienten in dotierten Proben im Bereich von 50 bis 1000 mg/l bei durchschnittlich 4,40%. Sugita (1996) beschreibt bei seinem Verfahren Variationskoeffizienten von 2,3 %.

Unsere Untersuchungen zeigten, daß die Wiederfindung dotierter Proben von 50 bis 1000 mg/l in wässriger Lösung 97 - 104.2 %, in Humanserum 97.6 - 105.3% und in Qualitrol N Kontrollserum 98.2 - 103.1 % beträgt.

Die Standardaddition liefert konsistente Werte, die nach rechnerischem Abzug des addierten Standards Abweichungen im Bereich von 96.8 bis 105.5 % für die Proben von 50 bis 1000 mg/l ergibt. Dies belegt, daß für die Bestimmung Substrate im Überschuß vorhanden sind und daß die Reaktionen nicht durch Substratmangel zum Stillstand kommen.

Sugita (1996) findet in seinem Ansatz eine Wiederfindung von 98-102%, schließt eine Störung der Messungen durch Glucose, Mannose und endogener Fructose aus und kommt zu dem Schluß, daß diese Methode eine einfache und spezifische Messung von Inulin ermöglicht.

Die dotierten Proben im Konzentrationsbereich bis 50 mg/l haben deutlich schlechtere Präzisionen als die darüber. Die Problematik dieser Proben mit niedrigen Konzentrationen liegt einerseits darin, daß die Meßmethode in diesen niedrigen Bereichen sicher an ihre Grenzen stößt. Andererseits mußten diese Versuche mit Proben gemacht werden, deren Konzentration bekannt ist. Es konnten keine Patientenproben benutzt werden, sondern Kontrollserum oder wässrige Lösung mußte durch Zugabe von Inutest aus der Ampulle selbst hergestellt werden. Der bereits erwähnte große Konzentrationsunterschied der Stammlösung aus den Inutest Ampullen (250.000 mg/l) gegenüber den niedrigen Konzentrationen der Verdünnungsreihen (1-1000 mg/l) führt sicherlich zu Pipettierfehlern bei den niedrigen Konzentrationen, besonders, wenn keine großen Mengen dieser Verdünnung hergestellt werden sollen oder können.

Die Informationen von Kühnle über die Haltbarkeit der Reagenzien ließ sich bestätigen: Die Reagenzien können 2 Wochen im Kühlschrank gelagert werden.

Inulin hält sich bei -18°C mindestens 3 Monate. In der Regel werden die Proben innerhalb weniger Tage vermessen.

4.2 Durchführung der Clearances

4.2.1 Single-Shot Inulinclearance

Die Single-Shot Inulinclearance ist von den benutzten Methoden zur Ermittlung der GFR diejenige, die am ehesten konsistente, reproduzierbare und am wenigsten schwankende Werte ergibt. Da die theoretischen Grundlagen der einzelnen Nierenfunktionsprüfungen unterschiedlich sind, ist natürlich auch zu erwarten, daß die verschiedenen Techniken unterschiedliche Ergebnisse liefern. Dies macht die Interpretation schwierig.

Eine besondere Anmerkung muß man jedoch zu den vielen in der Literatur beschriebenen Versuchen machen, zu verschiedensten physiologischen

Untersuchungen der GFR Korrekturfaktoren zu ermitteln, die "Nachteile" der einzelnen Methoden ausgleichen sollen.

Hier werden Ergebnisse unter Annahme physiologischer Konstanten aus den eigentlichen Messungen generiert. Die Konstanten geben jedoch variable physiologische Prozesse wieder. Diese Ansätze existieren sowohl für Single-Shot und Single-Sample Inulin-clearance Bestimmungen als auch für Kreatinin- und/oder Harnstoffclearance.

Ein erheblicher Teil der in letzter Zeit entstandenen Arbeiten beschäftigt sich beispielsweise damit, eine 1-Kompartiment Single-Shot Inulin-clearance zu berechnen und anschließend Korrekturfaktoren zu ermitteln, da so die GFR überschätzt wird (Peters, 1999; Jung 1992). Ein solches Vorgehen birgt systematische Risiken. Diese Ansätze gehen explizit davon aus, daß die α -Phase der Verteilung für eine Substanz bei einem Individuum immer identisch ist, da sie die Verteilung in den Extrazellulärraum beschreibt. Mit der Berechnung und Publikation eines allgemeinen Faktors gehen die Autoren noch einen Schritt weiter und implizieren, ohne es zu sagen, daß diese α -Phase bei allen Individuen für eine gleiche Substanz identisch sein muß.

Es leuchtet ein, daß die zweite Annahme nicht richtig sein kann, denn man kann sicher nicht behaupten, daß dann alle Menschen einen definierten, identischen Extrazellulärraum haben.

Aber auch die erste Annahme ist nicht erlaubt, da der Extrazellulärraum auch intraindividuell nicht konstant groß ist. Seine Größe ist schon beim Erwachsenen vom Hydratationsgrad und vom Alter abhängig. Gerade in der Pädiatrie trifft es aber erst recht nicht zu, daß alle Kinder einen relativ gesehen gleich großen Extrazellulärraum haben. Der Extrazellulärraum nimmt bei Kindern während des Wachstums kontinuierlich ab. Bei Säuglingen beträgt er noch 38%, beim Erwachsenen nur noch 17%.

Jegliche Versuche, die GFR mit einer Methode zu bestimmen, die eine Konstante benutzt, um ein physiologisches Meßergebnis anzupassen, ist daher in der Pädiatrie aus prinzipiellen Überlegungen unbrauchbar. Kinder sind keine kleinen Erwachsenen.

Die Single-Shot Inulin-clearance hat aber nicht nur die am wenigsten schwankenden, sondern auch die klinisch plausibelsten Ergebnisse ergeben. Die Ergebnisse der Probanden lagen im erwarteten Normbereich, die Clearances der Patienten waren eingeschränkt, die der niereninsuffizienten Patientin lag im anurischen Bereich und bei den mehrfach durchgeführten Clearances gab es in der Regel geringe intraindividuelle Schwankungen.

Bei dem Probandenkollektiv dienen 2 Patienten mit nicht-onkologischer Erkrankung und 2 gesunde Probanden als Kontrollgruppe. Die Ergebnisse zeigen, daß nur ein Patient des bei den Diagnosen durchaus heterogenen

Kollektivs eine Single-Shot Inulinclarence von unter $60 \text{ ml/min}/1.73 \text{ m}^2$ hatte. Diese Grenze wird häufig für die Durchführbarkeit einer Chemotherapie gesetzt.

Die niereninsuffiziente Patientin hatte eine Single-Shot Inulinclarence von $12.3 \text{ ml/min}/1.73 \text{ m}^2$, was wie die Werte der beiden gesunden Probanden von 124 bzw. $108 \text{ ml/min}/1.73 \text{ m}^2$ den Erwartungen entsprach.

Die Ergebnisse der Single-Shot Inulinclarence zeigen, daß die GFR unter Chemotherapie zwar eingeschränkt ist, aber sie zeigt auch, daß die Werte in der Regel nicht so niedrig sind, daß die nächste Chemotherapie verschoben werden müßte.

Bei der Single-Shot Inulinclarence wird streng genommen die Plasma-Clearance von Inulin gemessen. Die Übereinstimmung einer Single-Shot Inulinclarence mit der Inulinclarence nach der klassischen Infusionstechnik ist in der Literatur belegt. Florijn (1994) berichtet, daß die Plasmaclearance mit der renalen Clearance von Inulin sehr gut korreliere. Er habe allerdings einen besseren Variationskoeffizienten von 7.8% für die Single-Shot Methode im Vergleich zur klassischen Infusionstechnik (11.3%). Prescott (1990) hat ähnliche Ergebnisse gefunden (9.5% für die klassische Clearance gegenüber 3.9% für die Single-Shot Clearance). Die Single-Shot Inulinclarence besitze die beste Reproduzierbarkeit und zeige eine gute Übereinstimmung mit der konventionellen Urinclearance für Inulin (Florijn (1994)).

Orlando (1998) hat in einer Studie explizit den Unterschied zwischen systemischer und renaler Clearance von Inulin untersucht. Man kam zu dem Schluß, daß die Ergebnisse bei gesunden Probanden für systemische und renale Clearance sehr gut übereinstimmen ($96,1 \pm 10 \text{ ml/min}/1.73 \text{ m}^2$ gegenüber $94,6 \pm 12,5 \text{ ml/min}/1.73 \text{ m}^2$). Gleiches gelte für Patienten mit Ascites ($104,6 \pm 16,3 \text{ ml/min}/1.73 \text{ m}^2$ bzw. $102,6 \pm 18,5 \text{ ml/min}/1.73 \text{ m}^2$). Außerdem korrelierten die Werte untereinander sehr gut - $r=0.96$, $p<0,001$ bei gesunden Probanden und $r=0,98$, $p<0,001$ bei den Patienten mit Ascites. Orlando kommt zu dem Schluß, daß die Methode der Single-Shot Inulinclarence einen einfacheren und präziseren Ansatz als die Standard-Infusionsmethode darstellt, um die renale Inulinclarence zu messen, da sie Urinsammelfehler vermeide. Man habe zeigen können, daß die renale und systemische Inulinclarence bei gesunden Probanden und Patienten mit einem erhöhten Extrazellulärvolumen fast identisch seien. Die Messung einer systemischen Inulinclarence mit der Single-Shot Inulinclarence ohne Urinsammlung sei generell valide.

Van Acker (1995) berichtet, man habe in keinem Fall bei der Clearance mit der klassischen Infusionstechnik im Urin das gesamte Inulin wiedergefunden, das der Proband erhalten hat. Dieser Umstand ist auf die Problematik des Urinsammelns zurückzuführen.

Diese Erfahrungen decken sich mit unseren. Die Versuche an den beiden Probanden (PID 24 und 25), eine Inulin-clearance nach der klassischen Infusionstechnik durchzuführen, muß man als gescheitert betrachten. Es war trotz langer Äquilibrationszeit nicht möglich, einen konstanten Plasmaspiegel und eine konstante Ausscheidung im Urin zu erhalten. Leider weiß man erst nach der Durchführung, wenn die Messungen aus dem Labor vorliegen, ob der Inulin-Plasmaspiegel auch wirklich konstant war. Man kann sich nur blind darauf verlassen, daß sich ein konstanter Spiegel etabliert hat. Diese Bedingung war nicht gegeben. Die Werte, die errechnet wurden, waren nicht plausibel und unbrauchbar.

Immer wieder wird die Überschätzung der GFR (ermittelt nach der klassischen Infusionstechnik) durch die Single-Shot Inulin-clearance berichtet. Florijn fand $13.1 \text{ ml/min/1.73 m}^2$. Auch theoretisch muß die Single-Shot Inulin-clearance die tatsächlich GFR etwas überschätzen, da Inulin eben nur fast ausschließlich glomerulär eliminiert wird. Hierdurch wird die AUC etwas kleiner und die Clearance etwas größer. Es muß aber auch diskutiert werden, ob diese Abweichungen nicht viel mehr durch die Ungenauigkeiten der GFR Bestimmung nach der klassischen Infusionstechnik entstehen.

Die Single-Shot Inulin-clearance benötigt weniger standardisierte Laborbedingungen zur Messung. Die Kreatinin Clearance ist beispielsweise von dem Grad der Hydratation abhängig, die Single-Shot Inulin-clearance benötigt ausdrücklich keine besondere Hydratation. (Prescott (1990)).

4.2.2 Single-Sample Clearance nach Schumann

Schumann beschreibt 1993 die Berechnung der GFR aus der Inulinkonzentration einer einzigen Blutprobe und einen entsprechenden Faktor, mit dem die Werte mit denen einer Single-Shot Clearance verglichen werden können. Er schreibt, die Single-Sample Methode korreliere bei 40 Patienten mit Nierenerkrankungen und 2 gesunden Probanden gut mit der Single-Shot Inulin-clearance, sie sei aber für Personal und Patienten sehr viel einfacher durchzuführen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen für den pädiatrischen-onkologischen Bereich bessere Übereinstimmungen mit der Single-Shot Clearance wenn man den Korrekturfaktor, den Schumann beschreibt, nicht anwendet. Es gibt trotzdem bei einigen Patienten erhebliche Ausreißer sowohl nach oben als auch nach unten.

Besonders die Abweichungen nach oben, die eine bessere Clearance vorspiegeln, machen die Methode für die pädiatrische Onkologie ungeeignet, da die Toxizität der Chemotherapie steigt und möglicherweise sogar das Leben des Patienten gefährdet ist, wenn es durch eine unzureichende Ausscheidung zur Akkumulation eines Zytostatikums kommt.

Die Methode ist sicher zur Routineüberwachung von nephrologischen Patienten gut geeignet, da weniger Konsequenzen aus den Werten gezogen werden, für die Onkologie erscheint sie auch aus obigen Gründen nicht sicher und spezifisch genug.

4.2.3 Kreatinin- und Harnstoffclearance

Die Kreatinin-Clearance hat in dieser Studie im Vergleich mit der Single-Shot Inulinclerance schlecht abgeschnitten, was eigentlich erstaunlich ist, da sich die Kreatinin-Clearance im klinischen Alltag als Standardmethode zur Messung der GFR etabliert hat. Der Grund hierfür scheint jedoch mehr an der leichten Durchführbarkeit zu liegen als an der Spezifität und Sensitivität der Methode.

Die endogenen GFR-Markersubstanzen Kreatinin und Harnstoff erfüllen die geforderten Kriterien eines Markers zur GFR Bestimmung jedoch so schlecht, daß ein sicherer Rückschluß von Kreatinin- oder Harnstoffclearance auf die tatsächliche GFR nicht möglich ist. (Hagstam, 1974; Shemesh, 1985; Laville, 1989; Grüttner, 1995). Außerdem unterliegen sie physiologischen Schwankungen. Dodge kam bereits 1967 in einer Studie mit Kindern zu dem Schluß, daß die Kreatininclerance abhängig von Tageszeit und Alter so stark schwankt, daß die gefundenen Werte nichts über die GFR aussagen, die Methode daher als ungenügend anzusehen sei und verlassen werden sollte.

Trotz der Nachteile und Unwägbarkeiten der Kreatininclerance wird sie von einigen Autoren verteidigt, zumal bei Kindern auch immer wieder eine Übereinstimmung mit der Inulinclerance in nicht oligurischen Bereichen nachgewiesen werden konnte.

Giovannetti analysierte 1991 Daten aus 14 Veröffentlichungen der vergangenen 42 Jahre und kam zu dem Schluß, daß die Kreatininclerance die wahre GFR, bestimmt durch die klassische Infusionstechnik mittels Inulin, mit abnehmenden absoluten Werten überschätzt. Gleichzeitig konnte er in diesem Rohmaterial finden, daß die Kreatininclerance sich der tatsächlichen GFR bei Werten der GFR unter $18 \text{ ml/min/1,73m}^2$ wieder mehr annähert. Nach seiner Auswertung sei die Aussagekraft einer absoluten Differenz genauso aussagekräftig wie bei der Inulinclerance, intraindividuelle Änderungen ließen sich daher mit der Kreatininclerance gut dokumentieren. Schwankungen bei Messungen an 3-5 aufeinanderfolgenden Tagen gibt er, unabhängig von der tatsächlichen Höhe der GFR, mit 11-13% an, was dem Variationskoeffizienten der Inulinclerance durch andere Untersucher entspreche. Aber auch Giovannetti gibt zu, daß die Kreatinin-Clearance niemals die GFR messe, meint jedoch, daß intraindividuelle Veränderungen ebenso sicher erkannt werden könnten.

Auch andere Autoren finden gute Übereinstimmungen zwischen Inulin- und Kreatininclearance. Arant beschreibt 1972 in einer Stichprobe von 224 an 80 männlichen und 95 weiblichen Probanden und Patienten simultan durchgeführten Inulin- und Kreatininclearanceuntersuchungen eine fast vollständige Übereinstimmung (98%) zwischen Kreatinin- und Inulin-clearance über 100 ml/min/1,73 m², und eine 11%-ige Überschätzung durch die Kreatininclearance zwischen 21 und 100 ml/min/1,73 m² bzw. eine 18%-ige Überschätzung unter 21 ml/min/1,73 m².

Caregaro berichtet 1994 darüber, daß bei 56 Erwachsenen Patienten mit Leberzirrhose die Entstehung eines Nierenversagens mit dem Serum-Kreatinin und der Kreatinin-Clearance mit 18.5% bzw. 74% Wahrscheinlichkeit bei weitem nicht sicher erfaßt wird und warnt vor den klinischen Implikationen einer Arzneimitteltherapie mit potentiell nephrotoxischen Substanzen, da der behandelnde Arzt die Nierenfunktion für ausreichend hält, sich aber in falscher Sicherheit wiegt. Der pädiatrische Onkologe befindet sich in einer ähnlichen Situation.

Rowe fand 1976 eine konstantes Verhältnis von Kreatinin- zur Inulin-clearance von 1,29 unabhängig vom Lebensalter.

Das Argument der einfachen Durchführbarkeit einer Kreatininclearance findet sich in der Literatur immer wieder. Den Autoren erscheinen die Nachteile der Methode nicht als gravierend. Die Clearancewerte sind jedoch meist unter optimalen Laborbedingungen gewonnen. Diese Bedingungen sind in der täglichen Routine und besonders in der Pädiatrie, nicht vorzufinden und nur sehr schwierig zu schaffen.

Ich muß daher noch einmal darauf hinweisen, daß die Werte der Kreatinin-Clearance in dieser Studie nicht unter diesen optimalen Laborbedingungen ermittelt wurden, sondern in der klinischen Praxis. Dies gilt jedoch auch für alle anderen Clearanceuntersuchungen im Rahmen dieser Studie, so daß es erlaubt erscheint, im Rahmen einer Pilotstudie, die die Praktikabilität der Methode untersuchen soll, von einer strengen Standardisierung abzusehen.

Die Ungenauigkeiten bei der Kreatinin-Clearance könnten daher rühren, daß wir hier strenge Standardbedingungen nicht eingehalten haben, die man für die Single-Shot Inulin-clearance nicht einhalten muß, um zu verlässlichen Ergebnissen zu kommen, die für eine verlässliche Kreatinin-Clearance aber essentiell sind (Hydratationszustand des Patienten, Urinsammlung).

4.2.3.1 Urinsammlung Trotz genauer Aufklärung gab es immer wieder Ungenauigkeiten bei der Urinsammlung. Zum einen hatten die Eltern vergessen, daß die erste Portion bei Sammelbeginn noch nicht gesammelt werden darf. Auch kam es vor, daß die Kinder zwischendurch selbständig,

ohne Eltern, zur Toilette gingen, oder daß bei Säuglingen der Klebebeutel an der Haut schlecht klebte und undicht war.

Die Urinsammlung stellt nicht nur in der Pädiatrie eine der größten Fehlerquellen bei der Messung der Kreatininclearance dar. Dieses Problem wird in der Literatur immer wieder angesprochen. Die Erfahrungen von van Acker (1995) mit der unvollkommenen Wiederfindung des Inulins im Urin bei der klassischen Infusionstechnik-Clearance belegen dies.

4.2.4 Neumeyer'sche Abschätzung der GFR

Neumayer (1989) empfiehlt eine mathematische Korrektur zur Berechnung der GFR aus Kreatinin- und Harnstoffclearance.

Der berechnete Wert gleiche die Fehler der Kreatinin- und Harnstoffclearance aus und habe eine gute Korrelation mit der Inulinclearance. Grüttner konnte dieses bereits 1995 nicht verifizieren. Aus unseren Daten läßt sich eine solche Korrelation nicht ableiten.

4.2.5 Akzeptanz bei Eltern und Patienten

Noch ein Wort zur Akzeptanz bei Eltern und Kindern: Die Untersuchung selbst wurde von den onkologischen Patienten bzw. deren Eltern durchweg positiv aufgenommen.

Diese wissen durch die bisherige Behandlung, daß keine Chemotherapie ohne die Gewißheit durchgeführt wird, daß die Nierenfunktion hierfür ausreichend ist.

Das bedeutete, daß bisher 24 Stunden lang der Urin für die Kreatininclearance gesammelt werden mußte. Bei kleinen Kindern mußten noch dazu entweder Klebebeutel verwendet oder ein Blasenkatether gelegt werden. Die Patienten und deren Eltern waren daher dankbar für eine Methode, für die sie zwar ca. $4\frac{1}{2}$ Stunden in der Klinik anwesend sein mußten, die aber auf die Urinsammlung völlig verzichten konnte und Klebebeutel oder Blasenkatether nicht mehr benötigte.

Die Eltern fragten oft vor späteren Chemotherapiezyklen nach einer Inulinclearance nach.

Die Befürchtung, daß Eltern das Angebot ablehnen würden, da ja ein weiteres Medikament verabreicht werden muß, erwies sich als völlig ungegründet; im Gegenteil: Wiederholungen der Untersuchung wurden oft von Patienten und Eltern erbeten, weil kein Urinsammeln notwendig ist.

4.2.6 Verträglichkeit von Inutest

Die Inutestapplikation hat keine klinisch relevanten Probleme verursacht. Die beiden beschriebenen allergischen Reaktionen waren leicht und mußten nicht behandelt werden.

4.3 Kritische Wertung der Single-Shot Inulin-clearance

Die Single Shot Inulin-clearance ist eine Methode, die reproduzierbare und plausible Ergebnisse bei geringer Belastung für den Patienten und akzeptablem Aufwand für das Personal im Routinebetrieb erbringt. Auch wenn die Inulin-clearance mit der klassischen Infusionstechnik als Goldstandard für die Messung der glomerulären Filtrationsrate gilt, so hat sie doch erhebliche Nachteile, die besonders die mögliche Präzision empfindlich leiden lassen, führt man die Untersuchung nicht unter streng standardisierten Bedingungen durch.

Die Single-Shot Inulin-clearance ist nicht nur das Mittel der Wahl, wenn es auf Praktikabilität im Routinebetrieb ankommt, sondern auch, wenn exakte, reproduzierbare und plausible Ergebnisse erforderlich sind. Der finanzielle und personelle Aufwand lohnt sich, da sich die Versorgung der Patienten hierdurch verbessert. Invasive Eingriffe (Blasenkatheter) werden unnötig, Wiederholungen der Kreatinin-Clearance wegen schlechter Werte werden reduziert und hierdurch gibt es weniger Therapieverzögerungen.

Trotzdem bleiben noch einige Fragen offen, die diese Studie nicht beantworten kann:

- Die Korrelationen mit den anderen Methoden, insbesondere der Kreatinin-Clearance ist schlecht. Die erwähnten Vorteile sind zwar sehr offensichtlich, aber letztlich nicht bewiesen, da für die Single-Shot Inulin-clearance noch keine Normwertstudie für die Pädiatrie existiert. Diese ist derzeit Gegenstand der Forschung (Emde, Dissertation in Vorbereitung)
- Die Langzeittoxizität von Chemotherapie auf die Niere wird immer wieder untersucht und beschrieben. Hauptsächlich wird über die Wirkung von Cisplatin, Ifosfamid, Cyclophosphamid und Methotrexat berichtet. (Schwabe (1992); Arndt (1994); Brillet (1994); Schell (1995); Arndt (1999). Die meisten Studien kommen zu dem Schluß, daß die Einschränkung der GFR durch Zytostatika reversibel ist. Die Gesellschaft für pädiatrische Hämatologie und Onkologie hat unter Leitung von Prof. Dr. J. Beck aus Erlangen eine Arbeitsgruppe gebildet, die die Langzeittoxizität von Chemotherapie im Kindesalter allgemein

dokumentieren soll.

Die Akuttoxizität während und kurz nach dem Einlaufen des Medikaments wurde bisher jedoch kaum untersucht. Nur eine Studie von Abelson (1983) kommt für das Methotrexat zum Schluß, daß während eines Hochdosis-MTX Kurses ein subklinischer Abfall der GFR um 43 % auftritt.

Kenntnis der akuten Wirkungen nephrotoxischer Zytostatika auf die Niere ermöglicht aber in Zukunft vielleicht auch durch besseres Verständnis der Pathogenese der Prävention der Nephrotoxizität. Dies würde vielleicht eine Therapieintensivierung mit potentiell nephrotoxischen Substanzen ermöglichen, die möglicherweise die Rate des Event-Free Survival in der pädiatrischen Onkologie verbessern könnte.

5 Literaturverzeichnis

- Abelson HT, Fosburg MT, Beardsley GP, Goorin AM, Gorka C, Link M, Link D-Methotrexate induced renal impairment: clinical studies and rescue from systemic toxicity with high-dose leucovorine and thymidine-J Clin Oncol 1993 Mar; 1(3):208-16
- Arant BS, Edelmann CM, Spitzer A.-The congruence of creatinine and inuline clearances in children: Use of the Technicon Auto Analyzer.- Journal of Pediatrics, 81(3): 559 -561, 1972.
- Arndt C, Morgenstern B, Wilson D, Liedtke R, Miser J-Renal function in children and adolescents following 72 g/m^2 of ifosfamide-Cancer Chemother Pharmacol 1994;34(5):431-3
- Arndt C; Morgenstern B, Hawkins D, Wilson D, Liedtke R, Miser J- Renal function following combination chemotherapy with ifosfamide and cisplatin in patients with osteogenic sarcoma-Med Pediatr Oncol 1999 Feb; 32(2):93-6
- Backlund L, Göransson M, Müller-Suur R, Olsen L, Backlund G.-Evaluation of glomerular filtration rate in infants.-Acta Paediatr Scand, Suppl 305: 305-306, 1983.
- Brandt, Laura J.; Broadbent, Valerie-Nephrotoxicity following Carboplatin use in Children: is routine monitoring of renal function necessary?- Medical and Pediatric Oncology 21:p. 31-35 (1993)
- Brillet G, Deray G, Jacquiaud C, Mignot L, Bunker D, Meillet D, Raymond F, Jacobs C-Long term renal effect of cisplatin in man-Am J Nephrol 1994; 14(2): 81-4
- Broberger U.-Determination of glomerular filtration rate in the newborn.- Act Paed Scand 62: 625-629, 1973.
- Bröchner-Mortensen J.-Selection of Routine Method for Determination of Glomerular Filtration Rate in Adult Patients.-Scandinavian Journal of clinical Laboratory Investigation 36: 35-43, 1976.
- Bröchner-Mortensen, J-A simple method for the determination of glomerular filtration rate-The Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 30: p. 271-274, 1972
- Caregaro L, Menon F, Angeli P, Amodio P, Merkel C, Bortoluzzi A, Alberino F, Gatta A-Limitations of serum creatinine level and creatinine clearance as filtration markers in cirrhosis-Arch Intern Med 1994 Jan 24;154(2):201-5

- Cheek RJ, Nicols JC, Warren BH-Inulin and PAH stability in frozen plasma utilizing an improved automated inulin technic-Tech Rep SAM-TR 1966 Nov : 1-10
- Chevallier C, Hadj-Aissa A, Brunat-Mentigny M, Faraj G, Schell M, Cochat P-Fonction renale apres nephrectomie pour tumeur de Wilms-Arch Paediatr 1997 Jul; 4(7):639-44
- Chiou, Win L.-Critical Evaluation of the Potential Error in Pharmacokinetic Studies of Using the Linear TrapezoidalRule Method for the Calculation of the Area Under the Plasma Level-Time Curve-Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, 6(6); p. 539-546; 1978
- Coulthard MG, Ruddock V.-Validation of inulin as a marker for glomerular filtration in preterm babies.-Kidney International 23: 407-409, 1983.
- Coulthard MG.-Comparison of methods of measuring renal function in preterm babies using inulin.-The Journal of Pediatrics 102: 923-930, 1983.
- Deetjen P, Speckmann EJ-Physiologie-Urban und Schwarzenberg, München 1. Auflage 1992; ISBN 3-541-11751-6
- Degenaar CP Frenken LA, von Hooff JP-Enzymatic method for determination of inulin-Clin Chem 1987 Jun; 33(6):1070-1
- Delanghe J, Bellon J, De Buyzere M, Van Daele G, Leroux-Roels G-Elimination of glucose interference in enzymatic determination of inulin-Clin Chem 1991 Nov; 37(11):2017-8
- Dodge WF, Travis LB, Daeschner CW.-Comparison of endogenous Creatinine Clearance with Inulin Clearance.-American Journal of Diseases of Children 113: 683-692, 1967.
- Dopfer RE, Ranke MB.-Betreuung von Kindern und Jugendlichen nach Knochenmarktransplantation - Vorschläge zu einer standardisierten Nachsorge-in: Dopfer RE, Ranke MB.Betreuung von Kindern und Jugendlichen ... - Verlag Haller, Fürth: 26, 1994
- Dost, F. H.-Grundlagen der Pharmakokinetik, Kapitel Inulin-Grundlagen der Pharmakokinetik, 2. Aufl. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart
- Ehrich, J. H.H.; Kirschstein, M.; Kehring, N.; Wurster, U.; Volkmann, A. Külpmann, W.R.-Proteinurie und Enzymurie als Leitsymptom renaler und extrarenaler Erkrankungen im Kindesalter-Monatsschrift Kinderheilkunde 141: p. 59-69; 1993

- Emde B-Normwertkollektiv der Inulin-clearance im Kindesalter-Dissertation Universität Frankfurt, in Vorbereitung
- Estelberger W, Petek W, Zitta S, Maruc A, Horn S, Holzer H, Poggitsch H-Determination of the glomerular Filtration Rate by Identification of Sinistrin Kinetics-Eur J Clin Chem Clin Biochem 1995; 33:201-9
- Estelberger, W.; Petek, W.-Model-based determination of renal clearance from temporal venous plasma profiles of markers-Cybernetics and Systems Research 2: p. 893-900, 1992
- Fawer CL, Torrado A, Guignard JP.-Single Injection Clearance in the Neonate.-Biol Neonate 35: 321-324, 1979.
- Florijn KW Barendregt JN, Lentjes EG, van Dam W, Prodjosudjadi W, van Saase JL, van Es LA, Chang PC-Glomerular filtration rate measurement by "single-shot" injection of inulin-Kidney Int 1994 Jul; 46(1):252-9
- Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W.; Starke, K.;-Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie - Kapitel Arzneimittelkonzentration im Organismus in Abhängigkeit von der Zeit (Pharmakokinetik)-Wissenschaftsverlag Mannheim 1992
- Freestone S, Mc Auslane JAN, Mackkay IG, Cowie J, Watson ML, Prescott LF.-Inulin clearance after single intravenous injection: a re-evaluation.-Br J clin Pharmac, 21(1): 97p, 1986.
- Giovannetti S, Barsotti G.-In defense of Creatinine Clearance.-Nephron 59: 11-14, 1991.
- GPOH-CESS 86 Therapieprotokoll
- GPOH-Therapieprotokoll CWS 90 der GPOH: 39-40, 1990.
- GPOH-CWS-86 Studienprotokoll
- GPOH/SIOP-Wilmstumor-Therapieprotokoll
- GPOH-COSS 86 Studienprotokoll
- GPOH-Dauertherapie bei NB-ALL und NB-NHL BFM 83
- GPOH-CWS 91 Therapieprotokoll
- Gretz N, Ecker-Tschirner KH, Kühnle HF, v Dahl K, Kirschfink M, Drescher P, Lasserre JJ, Strauch M.-Practicability of Inulin plasma Single-Shot Clearance.-Contrib Nephrol 81: 220-228, 1990.

- Groth S-Calculatoin of 51 Cr-EDTA clearance in children from the activity in one plasma sample by transformation of the biexpoential plasma time-activity curve into a momoexponential with identical integral area below the time activity curve-Clin Physiol 1984 Feb; 4(1):61-74
- Groth S, Aasted M-51-Cr-EDTA clearance determined by one plasma sample in children-Clin Physiol 1984 Feb; 4(1):75-83
- Grumbrecht, Uta; Rohmeiss, P.; Strauch, M.; Gretz, N.;-Normalwerte für die Plasmaclearance nach Inulinbolusgabe in Abhängigkeit von Proteinzufuhr und Alter-Nieren- und Hochdruckkrankheiten, 21(9), p. 382; 1992
- Grüttner, Hans-Peter-Inulin Clearance Messung bei Kindern und Jugendlichen mit Malignomen unter zytostatischer Behandlung-Dissertation, Universität Frankfurt, 1994
- Gunkel, Martin-Aktennotiz: Telefongespräch mit Dr. Gretz (Klinikum Mannheim der Univ. Heidelberg am 18.3.94.-Telefongespräch
- Hagstam KE, Nordenfelt I, Svensson L, Svensson SE.-Comparison of different methods for determination of glomerular filtration rate in renal disease.-The Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 34: 31-36, 1974.
- Hall JE, Guyton AC, Farr BM.-A single injection method for measuring glomerular filtration rate-American Journal of Physiology 232: F 72, 1977.
- Heesen M.-Zur Pharmakokinetik und Nephrotoxizität von Cis-Platin bei Tumorerkrankungen im Kindesalter.-Medizinische Dissertation an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt, 1991.
- Hellerstein S, Alon U, Warady BA.-Creatinine for estimation of glomerular filtration rate-Pediatr Nephrol 6 (6): 507-511, 1992.
- Henry, Connon, Winkelmann, Harper, Row-Inulin in: Clinical Chemistry - Prinziples and Techniques. Bio Science Laboratories, 2. Aufl-Clinical Chemistry - Prinziples and Techniques. Bio Science Laboratories, 2. Aufl
- Heyrowski A-Clin Chim Acta 1: 470, 1956
- Jung K, Henke W, Schulze BD, Sydow K, Precht K-Practical approach for determining glomerular filtration rate by single-injection inulin clearance-Clin Chem 1992 Mar; 38(3):403-7

- Kassirer, Jerome P.-Clinical Assessment of the Kidneys-Progress in clinical pathology 1978 (7); p. 33-43
- Kother M, Schindler J, Oette K, Berthold F.-Abnormalities in serum osteocalcin values in children receiveing chemotherapy including ifosfamide- In Vivo 6 (2): 219-221, 1992.
- Kühnle HF, v Dahl K, Schmidt FH.-Fully enzymatic Inulin determination in small volume samples without deproteinization.-Nephron 62: 104-107, 1992.
- Ladegaard-Pedersen HJ.-Measurement of extracellular volume and renal clearance by a single injection of Inulin.-Scand J clin Lab Invest 29: 145-153, 1972.
- Laville M, Hadj-Aissa A, Pozet N, Le Bras JH, Labeeuw M, Zech P.-Restrictions on Use of Creatinin Clearance for Measurement of Renal Funcitonal Reserve.-Nephron 51: 233-236, 1989.
- Liedtke, Robert R.; Duarte, Cristobal G.-Laboratory protocols and methods for the measurement of glomerular filtration rate and renal plasma flow-Duarte C.G.(ed): Renal Function Tests: Clinical Laboratory Procedures and Diagnosis; Boston,1980
- Löffler G, Petrides PE - Physiologische Chemie Springer Verlag Berlin 4. Auflage 1988, ISBN 3-540-18163-6
- Mak RHK, Al Dahhan J, Azzopardi D, Bosque M, Chantler C, Haycock GB.-Measurement of glomerular filtration rate in children after renal transplantation.-Kidney International 23: 410-413, 1983.
- Materson BJ.-Measurement of Glomerular Filtration Rate.-CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences: 1-39, 1971.
- Müller-Suur R, Göransson M, Olsen L, Bäcklund G, Bäcklund L.-Inulin single injection clearance. Microsample technique useful in children for determination of glomerular filtration rate-Clinical Physiology 3: 19-27, 1983.
- Neumayer HH, Kallweit A.-Clearancetechniken für die klinische Diagnostik.-Schattauer Verlag, Stuttgart: 1989. ISBN 3-7945-1338-X.
- Orlando R, Floreani M, Padrini R, Palatini P-Determination of inulin clearance by bolus intravenous injection in healthy subjects and ascitic patients: equivalence of systemic and renal clearances as glomerular filtration markers-Br J Pharmacol 1998 Dec; 46(6):605-9

- Peters AM, Henderson BL, Lui D, Blunkett M, Cosgriff PS, Myers MJ-Appropriate corrections to glomerular filtration rate and volume of distribution based on the bolus injection and single compartment technique-Physiol Meas 1999 Aug; 20(3):313-27
- Poggliutsch-The Determination of Glomerular Filtration Rate by Inu-test Clearance-
- Prescott LF, Freestone S, McAuslane JAN.-Reassessment of the single intravenous injection method with inulin for measurement of the glomerular filtration rate in man.-Clinical Science 80: 167-176, 1991.
- Rossi R, Rath B, Ullrich K, Ehrich JH.-Ifosfamid-induzierte Nephrotoxizität-Monatschrift für Kinderheilkunde 141 (7): 594-601, 1993.
- Rowe JW, Andres R, Tobin JD, Norris AH, Shock NW.-The Effect of Age on Creatinine Clearance in Men: A Cross Sectional and Logitudinal Study.-Journal of Gerontology 31(2): 155-163, 1976.
- Ruo TI, Wang Z, Dordal MS, Atkinson AJ Jr-Assay of inulin in biological fluids by high performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection-Clin Chim Acta 1991 Dec 31; 204(1-3):217-22
- Sapirstein LA, Vidt DG, Mandel MJ, Hanusek G.-Volumes of distribution and clearances of intravenously injected creatinine in the dog-American Journal of Physiology 181: 330-336 1955.
- Schell M, Cochat P, Hadj-Aissa A, Bouffet E-Renal function following unilateral nephrectomy for neuroblastoma and Wilms tumor-Paediatr Nephrol 1995 Oct; 9(5):579-82
- Scherberich JE, Mondorf WA.-Beurteilung der Nephrotoxizität von Pharmaka über die Ausscheidung tubulusspezifischer Membranantigene und Enzyme.-Zeitschrift für die gesamte Innere Medizin 38 (21): 571-580, 1983.
- Scherberich JE, Wolf G, Schoeppe W.-Shedding and repair of renal cell membranes following drug-induced nephrotoxicity in humans.-Eur J Clin Pharmacol 44, Suppl 1: 33-38, 1993.
- Schumann L, Wüstenberg, PW, Hortian B, Kühnle HF-Determination of glomerular filtration rate (GFR) on two consecutive days using inulin in a single sample plasma clearance method-Clin Nephrol 1993 Feb; 39(2):65-9
- Schumann, Lutz; Esther, Gisela; Wüstenberg, P.-W.; Hortian, Barbara-Simultane Bestimmung der GFR und des ERPF durch nur eine Blutprobe bei der Slope-Clearance mit ^{99m}Tc-DTPA und ¹³¹J-Hippurat-Z. Urol. Nephrol. 83: p. 391-397, 1990

- Schwabe D.-Cis-Platin Therapie bei Kindern und Jugendlichen. Pharmakokinetik und akute Nephrotoxizität.-Habilitationsschrift für das Fach Kinderheilkunde. Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt, 1992.
- Schwartz GJ, Haycock GB, Edelmann Jr CM, Spitzer A.-A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine-Pediatrics 58: 259-263, 1976.
- Shemesh O, Golbetz H, Kriss JP, Myers BD.-Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients.-Kidney International 28: 830-838, 1985.
- Siegenthaler, Walter; Eigler, J.; Deetjen, P.; Buchborn, E.;-Niere und ableitende Harnwege (Kap. 36 aus Siegenthaler: Klinische Pathophysiologie)-Klinische Pathophysiologie 6. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, 1987
- Silbernagl S, Despopouls A-Taschenatlas der Physiologie-Georg-Thieme Verlag München, 4. Auflage 1991 ISBN 3-13-567704-0
- Skinner R, Pearson AD, Coulthard MG, Skillen AW, Hodson AW, Goldfinch ME, Gibb I, Craft AW.-Assessment of chemotherapy-associated nephrotoxicity in children with cancer-Cancer Chemother Pharmacol 28 (2): 81-92, 1991.
- Smith MA-An interactive introduction on the WWW - CGI-Scripts-<http://snowwhite.it.brighton.ac.uk/courses/HTML/HTML3.HTML>; 1995
- Soper CP, Bending MR, Barron JL-An automated enzymatic inulin assay, capable of full sinistrin hydrolysis-Eur J Clin Chem Clin Biochem 1995 Aug; 33(8): 497-501
- Stonestreet, Barbara S.; Bell, Edward F.; Oh, William-Validity of endogenous Creatinine Clearance in low birthweight Infants-Pediatric Research 13: p. 1012-1014; 1979
- Sugita O, Tomiyama Y, Matsuto T, Okada M, Gejyo F, Arakwa M, Takahashi S, Watazu Y, Kenada N-A new enzymatic method for the determination of inulin-Ann Clin Biochem 1995 Nov; 32 (Pt6): 561-5
- Summerfield AL, Hortin GL, Smith CH, Wilhite TR, Landt M-Automated enzymatic analysis of inulin-Clin Chem 1993 Nov; 39(11 Pt 1):2333-7
- van Acker BA, Koomen GC, Arisz L-Drawbacks of the constant infusion technique for measurement of renal function-Am J Physiol 1995 Apr; 268(4 Pt 2): F543-52

- Walker, Ernest M. Jr; Gale, Glen R.-Methods of Reduction of Cisplatin Nephrotoxicity-Annals of clinical and laboratory science 11 (5) p. 397-410
- Wilkins, Barry H.-The glomerular filterability of polyfructosan-S (Inutest) in immature infants-Pediatric Nephrology, 6: p. 319-322; 1992
- Wilkins, Barry H.-A reappraisal of the measurement of glomerular filtration rate in pre-term infants-Pediatric Nephrology 6: p. 323-327; 1992
- Zender R, Bugant P, Falbriard A.-Étude statistique des causes d'erreur dans la mesure d'une clearance rénale conventionnelle.-Clinica chimica acta 20: 85-88, 1968.
- Zittan, L-Enzymatic hydrolysis of Inulin - an alternative way to Fructose production-Starch/Stärke 33(11); p. 373-377; 1981

6 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------|--|
| AUC | Area under the curve - Fläche unter der Kurve |
| Cl | Clearance; der Index bezeichnet die Art (Kreatinin, Inulin o.a. immer in ml/min/1,73 m ²) |
| C | Konzentration; der Index bezeichnet das Substrat (Inulin, o.a.); Inulinkonzentration immer in mg/l |
| cgi | Common Gateway Interface |
| d | Schichtdicke (cm) |
| D | Dosis |
| ΔE , dE | Differenz der Nullwertextinktion von der Endextinktion |
| ε | Molarer Extinktionskoeffizient |
| F | Verdünnungsfaktor |
| GFR | Glomeruläre Filtrationsrate, immer in ml/min/1,73 m ² |
| KOF | Körperoberfläche in m ² . Die GFR wird immer auf die Standardkörperoberfläche eines Erwachsenen (1,73 m ²) bezogen. |
| i.S., i.P. | im Serum; im Plasma |
| MG | Molekulargewicht |
| UZV | Urinzeitvolumen (ml/min) |
| V | Volumen; der Index bezeichnet das Substrat |
| $v_{\text{Infusions}}$ | Geschwindigkeit v der Infusionlösung pro Zeit |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----|--|----|
| 1 | Kreatinin-blinder Bereich von 60-120 ml/ $\frac{ml}{min \cdot 1,73m^2 KOF}$ (aus: Deetjen, 1992) | 15 |
| 2 | Die Clearance von Inulin entspricht der Glomerulären Filtrationsrate (aus: Silbernagl, 1991) | 17 |
| 3 | Die Funktionen des Tubulus stellen durch selektive Sekretion bzw. Resorption einen weiteren wichtigen Teil der Nierenfunktion dar. (Aus Silbernagl, 1991) | 21 |
| 4 | Struktur von Sinistrin (links) und Inulin (rechts). Abdruck mit freundlicher Genehmigung durch S. Kamoun, Laevosan Gesellschaft, Linz. | 22 |
| 5 | Sinistrin. Abdruck mit freundlicher Genehmigung durch S. Kamoun, Laevosan Gesellschaft, Linz | 27 |
| 6 | Inulinspaltung in Fruktose und Glucoseelimination | 27 |
| 7 | Fructoseumsetzung zu 6-Phosphogluconat | 28 |
| 8 | Merkblatt zum korrekten Sammeln des 24-h Sammelurins | 31 |
| 9 | Testkit nach Kühnle | 37 |
| 10 | Testkit für Inulin mit dem Glucose Testkit für die klinische Chemie | 39 |
| 11 | Reaktionskinetik der NADPH-Reaktion bei 20 und 37 °C am Photometer in der Übersicht | 40 |
| 12 | Vergleich der Glucoseelimination und Inulinumsetzung bei 37° für 60 min und 56°C für 20 min. | 42 |
| 13 | Reaktionskinetik der Vorinkubation bei 56 °C; n=3 | 42 |
| 14 | Das Programm, das den Mitsubishi Super Z steuert | 44 |
| 15 | Reaktionskinetik mit 9,5 IU Phosphoglucoseisomerase im Meßansatz im Laborautomaten: Diese Reaktion läuft nicht schnell genug ab. Am Ablesezeitpunkt existiert kein deutliches Plateau. | 45 |
| 16 | Reaktionskinetik mit 28 IU Phosphoglucoseisomerase im Ansatz im Laborautomaten: Die Reaktion läuft schnell genug ab, es existiert ein eindeutiges Plateau. | 46 |
| 17 | Eichkurve für die Inulinmessung am Photometer; unten niedrigerer Konzentrationsbereich. | 47 |
| 18 | Präzisionsmessung einer Eichkurve für Inulin mit Laborautomat Mitsubishi Super Z | 51 |

| | | |
|----|--|-----|
| 19 | Standardaddition von 2,48 mg in 50 μ l zur Verdünnungsreihe | 54 |
| 20 | Reagenzienhaltbarkeit im Kühlschrank bei +4°C | 55 |
| 21 | Probenhaltbarkeit bei -18 °C über 4 Monate | 56 |
| 22 | Variabilität von Tag zu Tag der 998 mg/l Inulin-Kontrolle in der Übersicht (vom Mittelwert ausgehend) | 58 |
| 23 | Variationskoeffizienten in der Übersicht | 60 |
| 24 | Der Einfluß von Hämolyse, Lipämie, Bilirubin auf Wiederfindung und Nullwert | 64 |
| 25 | Die Auswirkungen von Antikoagulanzen auf die Wiederfindung | 66 |
| 26 | Laboranforderungsblatt | 71 |
| 27 | Typische Abklingkurve Inulin im Serum, y-Achse linear geteilt; Zeit nach Injektion in min. | 72 |
| 28 | Abklingkurve Inulin im Serum, y-Achse logarithmisch geteilt | 73 |
| 29 | Befund mit Microsoft Excel berechnet und erstellt | 79 |
| 30 | WWW-Seite zur Berechnung der Inulin-clearance (1) | 81 |
| 31 | WWW-Seite zur Berechnung der Inulin-clearance (2) | 81 |
| 32 | Befundseite der Berechnung (1) | 82 |
| 33 | Befundseite der Berechnung (2) | 82 |
| 34 | Schriftlicher Befund der Berechnung | 83 |
| 35 | Schriftlicher Befund der Berechnung | 93 |
| 36 | Verlauf des Plasmaspiegels und Inulinausscheidung im Urin bei Proband 24 | 99 |
| 37 | Verlauf des Plasmaspiegels und Inulinausscheidung im Urin bei Proband 25 | 99 |
| 38 | Übersicht über die Statistik | 106 |
| 39 | Qualität der Urinsammlung | 106 |
| 40 | Verteilung der gemessenen Single-Shot Inulin-, Kreatinin- und Harnstoffclearances. | 108 |
| 41 | Übersicht der gemessenen Single-Shot Inulin-, Kreatinin- und Harnstoffclearances im individuellen Vergleich. | 109 |
| 42 | Korrelation der Single-Shot Inulin-clearance mit der Kreatinin-clearance (r=0,66) | 109 |

| | | |
|----|--|-----|
| 43 | Korrelation der Single-Shot Inulin-clearance mit der Harnstoffclearance ($r=0,32$) | 110 |
| 44 | Korrelation der Single-Shot Inulin-clearance mit der Abschätzung der GFR nach Neumeyer ($r=0,63$) | 110 |
| 45 | Korrelation Inulin Single-Shot und Single-Sample Clearance unkorrigiert, nach 2 Stunden ($r=0,85$) | 111 |
| 46 | Korrelation Inulin Single-Shot und Single-Sample Clearance unkorrigiert, nach 4 Stunden ($r=0,83$) | 112 |
| 47 | Korrelation Inulin Single-Shot und Single-Sample Clearance korrigiert, nach 2 Stunden ($r=0,85$) | 112 |
| 48 | Korrelation Inulin Single-Shot und Single-Sample Clearance korrigiert, nach 4 Stunden ($r=0,83$) | 113 |
| 49 | Verteilung aller gemessenen Clearances | 114 |
| 50 | Übersicht über die Patienten, deren Single-Shot Inulin-clearance mehrfach gemessen werden konnte | 115 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|----|---|-----|
| 1 | Nephrotoxische Substanzen in den Therapiestudien | 34 |
| 2 | Glucoseelimination und Inulinumsetzung bei 37° C für 60 min. 41 | |
| 3 | Glucoseelimination und Inulinumsetzung bei 56° C für 20 min | 42 |
| 4 | Meßwerte einer Inulin-Verdünnungsreihe (n=10) | 51 |
| 5 | Wiederfindung in wässriger Lösung | 52 |
| 6 | Wiederfindung in Humanserum | 52 |
| 7 | Wiederfindung in Qualitrol N Kontrollserum | 53 |
| 8 | Nullwerte von Aqua dest., Humanserum und Qualitrol N . | 53 |
| 9 | Standardaddition von 2,48 mg in 50 µl zur Verdünnungsreihe; Alle Konzentrationen in mg/l | 54 |
| 11 | Variabilität der Inulinkonzentration der 992 mg/l Laevosan- Kontrolle von Tag zu Tag | 57 |
| 12 | Statistik der Variabilität von Tag zu Tag | 58 |
| 13 | Variationskoeffizienten für verschiedene Konzentrationen: Meß- werte einer Inulin-Verdünnungsreihe (n=10) | 59 |
| 14 | Elimination des Störfaktors Glucose aus der Probe (Mittel- werte; n=3) | 61 |
| 15 | Nullwertbestimmung und Wiederfindung bei hämolytischen Proben; Inulinsollkonzentration in der Wiederfindung: 19,4 mg/l | 62 |
| 16 | Nullwertbestimmung und Wiederfindung bei lipämischen Proben; Inulinsollkonzentration in der Wiederfindung (ohne Intralipid): 19,4 mg/l | 62 |
| 17 | Nullwertbestimmung und Wiederfindung bei ikterischen Pro- ben; Inulinsollkonzentration in der Wiederfindung bei nor- malem Bilirubin: 19,4 mg/l | 63 |
| 18 | Nullwertbestimmung und Wiederfindung bei normalem Pro- benmaterial; Inulinsollkonzentration in der Wiederfindung: 19,4 mg/l | 63 |
| 19 | Der Einfluß von Antikoagulanzen auf die gemessene Inulin Konzentration (Mittelwerte; n=10); Einheit mg/l | 65 |
| 20 | Standardabweichungen bei den Messreihen mit verschiede- nen Antikoagulanzen | 65 |
| 21 | Präzision der Bestimmung einer Single-Shot Inulinclerance . | 100 |

7 Lebenslauf

| | |
|----------------------|--|
| 1. Januar 1969 | geboren in Frankfurt am Main als Sohn des Arztes Dr. Ulrich Peter Gunkel und der Lehrerin Karin Gunkel |
| 1975-1988 | Schulbildung Braunshardter Grundschule, Wilhelm-Leuschner-Schule, Pfungstadt, Ludwig-Georgs-Gymnasium, Darmstadt |
| 14.6.1988 | Abitur |
| 1.7.1988-30.9.1989 | Grundwehrdienst |
| 1.10.1989-22.11.1996 | Medizinstudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main; Auslandsaufenthalte in Columbia, Missouri, USA und Taunton, England. |
| 22.11.1996 | Erlaubnis über die Tätigkeit als Arzt im Praktikum |
| 1.1.1997-31.7.1998 | Arzt im Praktikum in der Klinik für Kinderheilkunde III mit Schwerpunkt pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Universitäts-Kinderklinik Frankfurt am Main bei Prof. Dr. med B. Kornhuber. |
| 1.8.1998 | Erteilung der Approbation als Arzt |
| 1.8.1998-31.12.1999 | Wissenschaftlicher Angestellter an der Klinik für Kinderheilkunde III mit Schwerpunkt pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Universitäts-Kinderklinik Frankfurt am Main bei Prof. Dr. med B. Kornhuber |
| seit 1.1.2000 | Assistenzarzt am Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin |

Frankfurt am Main, den 1.5.2000



8 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Etablierung einer exakten Methode zur Messung der Glomerulären Filtrationsrate mit Inulin bei pädiatrisch-onkologischen Patienten

im Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin (Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. med H. Böhles) der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main in der Klinik für Kinderheilkunde III mit Schwerpunkt Pädiatrische Hämatologie und Onkologie (Kommissarischer Direktor: Priv.-Doz. Dr. med D. Schwabe) unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. med D. Schwabe mit Unterstützung durch Dr. E. Rohrbach, Dr. U. Köhl und Priv. Doz. Dr. E. Solem ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 01.05.2000

