Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. H.-J. Möller

Etablierung einer Methode für die High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC) mit elektrochemischer Detektion (ECD) zur gleichzeitigen Messung von 3-Methoxy-4-hydroxyphenolglycol, 5-Hydroxyindolessigsäure und Homovanillinsäure im Liquor von Patienten mit Fibromyalgiesyndrom und neurologischen Erkrankungen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christoph Bentele
aus Augsburg
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. M. Ackenheil
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. M. Vogeser
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. M. Schwarz
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2004

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 6

1.1 Wesentliche anatomische, physiologische und biochemische Eigenschaften des zentralen Nervensystems (ZNS) 6

1.1.1 Anatomie 6
1.1.2 Nervenzelle und Erregungsübertragung 7
1.1.3 Dopamin 8
1.1.4 Noradrenalin 10
1.1.5 Serotonin 12
1.1.6 Funktionen und Pathologie des dopaminergen, noradrenergen und serotonergen Systems 14
1.1.7 Liquor cerebrospinalis 15

1.2 Das Fibromyalgiesyndrom (FMS) 17

1.2.1 Klinik/Symptomatik 17
1.2.2 Epidemiologie 17
1.2.3 Diagnostik 18
1.2.4 Therapie 19
1.2.5 Prognose 20
1.2.6 Ergebnisse von Studien über Veränderungen beim Fibromyalgiesyndrom (FMS) 20

1.3 Ziel der Arbeit 22

2. Etablierung einer Methode für die High Performance Liquid Chromatography (HPLC) mit elektrochemischer Detektion (ECD) zur gleichzeitigen Messung von MHPG, 5-HIAA und HVA im Liquor von Patienten mit Fibromyalgiesyndrom (FMS) und neurologischen Erkrankungen 23

2.1 Funktionsprinzip der HPLC 23

2.2 Verwendetes Material und statistische Methoden 24

2.2.1 HPLC-Säule 24
2.2.2 mobile Phase 24
2.2.3 Detektor 24
2.2.4 Computer und Software 25
2.2.5 Injektor 25
2.2.6 Pumpe 25

2.2.7 Säulenthermostat 25
2.2.8 Liquor cerebrospinalis 26
2.2.9 Analyselauf 26
2.2.10 statistische Methoden 26

2.3 HPLC-Methode zur gleichzeitigen Messung von MHPG, 5-HIAA und HVA im Liquor cerebrospinalis 27

2.3.1 physikalisch-chemische Parameter 27

2.3.1.1 Chromatogramm 27
2.3.1.2 Modifikation der mobilen Phase 27
2.3.1.3 Arbeitspotential des Detektors 28
2.3.1.4 Test des Injektionsvolumens 28
2.3.1.5 Verarbeitung des Liquors 29
2.3.1.6 Modifikation des Analyselaufs 30

2.3.2 Validierung der Methode 31

2.3.2.1 Selektivität und Retentionszeiten 31
2.3.2.2 Wiederfindung (Recovery) 33
2.3.2.3 Präzision 33
2.3.2.4 Kalibrationskurven und Linearität 37
2.3.2.5 Richtigkeit 42
2.3.2.6 Nachweisgrenzen 42
2.3.2.7 Bestimmungsgrenzen 44
2.3.2.8 Arbeitsbereich 45

3 Diskussion der Ergebnisse der Methodenetablierung 48

3.1 Diskussion der physikalisch-chemischen Parameter 48
3.2 Diskussion der Validierung 49

4 Bestimmung von MHPG, 5-HIAA und HVA in Liquores von Patienten mit FMS und neurologischen Erkrankungen 55

4.1 Verwendetes Material, beteiligte Patienten und statistische Methoden 55

4.1.1 Probenmaterial 55
4.1.2 Patientengruppierung 56
4.1.3 statistische Methoden 57

4.2 Qualitätskontrolle 58

4.3 Vergleich von Patienten mit FMS, neurologischen Erkrankungen/PNP und neurologischen Erkrankungen/Rückenschmerzen (Studiengruppen 1, 2 und 3) 60

4.3.1 Verteilung der Meßwerte 60
4.3.2 t-Test 61
4.3.3 Korrelation 62

4.4 Vergleich von Patienten mit FMS und neurologischen Erkrankungen ohne Einnahme von interferierenden Pharmaka (Studiengruppen 4 und 5) 64

4.4.1 Verteilung der Meßwerte 64
4.4.2 t-Test 65
4.4.3 Korrelation 66

5 Diskussion des Vergleichs von MHPG, 5-HIAA und HVA in den Studiengruppen 67

5.1 Diskussion des Vergleichs von Patienten mit FMS, neurologischen Erkrankungen/PNP und neurologischen Erkrankungen/ Rückenschmerzen (Studiengruppen 1, 2 und 3) 69

5.2 Diskussion des Vergleichs von Patienten mit FMS und neurologischen Erkrankungen/PNP ohne Einnahme von interferierenden Pharmaka (Studiengruppen 4 und 5) 71

6. Zusammenfassung 75

7. Literaturverzeichnis 77

8. Anhang 89

A Verwendete Patientendaten 89
B Verwendetes Material 93

Danksagung 95

Lebenslauf 96

1. Einleitung

In den letzten Jahrzehnten wuchs das Wissen über den Aufbau des zentralen Nervensystems (ZNS), dessen Funktionsweise und Zusammenhang mit seelischen und psychischen Vorgängen immens an. Diese Wissenserweiterung wurde vor allem durch das Aufkommen immer empfindlicherer und genauerer Meßverfahren erreicht, die Einsichten in Vorgänge auf Zellebene und auf molekularer Ebene ermöglichen. Ein Beispiel ist die Bestimmung von Substanzen des Zellstoffwechsels, deren physiologische Konzentrationen sich in Bereichen von Piko(10^{-12})- oder Nano(10^{-9})gramm pro ml bewegen, mittels High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC) - ein Verfahren, welches auch in dieser Arbeit zur Messung der Abbauprodukte von Neurotransmittern im zentralen Nervensystem verwendet wurde.
Zum besseren Verständnis der Hintergründe folgt ein kurzer Überblick über die für diese Arbeit wesentlichen anatomischen und physiologischen Gegebenheiten im ZNS.

1.1 Wesentliche anatomische, physiologische und biochemische Eigenschaften des zentralen Nervensystems (ZNS)

1.1.1 Anatomie

Das ZNS gliedert sich in Rückenmark und Gehirn. Dieses setzt sich aus Medulla oblongata (verlängertes Mark), Pons (Brücke), Mesenzephalon (Mittelhirn), Dienzephalon (Zwischenhirn), Cerebellum (Kleinhirn) und Telenzephalon (Groß- oder Endhirn) zusammen [108].
Das Gehirn besteht aus Milliarden von Nervenzellen (Neuronen), welche durchschnittlich mit 1000 anderen direkt kommunizieren [40].
Es wird von drei Meningen (Hirnhäuten) umhüllt. Von außen nach innen sind dies Dura mater (harte Hirnhaut), Arachnoidea und Pia mater (beide zusammen werden als weiche Hirnhaut bezeichnet).
Das ZNS liegt weiterhin in einem Flüssigkeitskissen aus Liquor cerebrospinalis zwischen Arachnoidea und Pia mater im Subarachnoidalraum [108].

1.1.2 Nervenzelle und Erregungsübertragung

Die einzelne Nervenzelle besteht aus dem Zellkörper (Soma) mit dem Zellkern und zwei verschiedenen Arten von Zellfortsätzen: einerseits meist sehr zahlreiche Dendriten, Ausläufer des Somas, die wie das Soma selbst zur Erregungsaufnahme dienen, und andererseits meistens nur einem Neurit (Axon) zur Erregungsweitergabe, welches sich jedoch in diverse Seitenzweige (Kollateralen) aufspalten kann.
An den Enden des Axons befinden sich die synaptischen Endknöpfe (boutons termineaux). Zwischen den letztgenannten und der Zellmembran der nachfolgenden Zelle liegt der sog. synaptische Spalt von 20-30 nm Breite; alle drei zusammen bilden die Synapse, den Ort der Erregungsübertragung zwischen zwei Nervenzellen [21].

Durch die Depolarisation der Zellmembran durch ein ankommendes Aktionspotential werden spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle geöffnet, woraufhin Ca^{2+}-Ionen ins Zellinnere einströmen und die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration erhöhen. Dies führt unter Beteiligung von Proteinen wie Synapsin, Synaptotagmin oder rab3 zur Verschmelzung von Vesikeln angefüllt mit Transmitter, der vor Ort in der Endigung [47] produziert wurde, mit der Zellmembran. Dabei geben sie ihren Inhalt in den synaptischen Spalt ab [104].
Die Transmittersubstanz diffundiert in hoher Konzentration zur postsynaptischen Membran und bindet an dort vorhandene Rezeptoren, die entweder selbst Ionenkanäle sind oder über G-Protein an diese gekoppelt [47].

Dort erfolgt die chemische Transmission auf zwei Arten: einerseits schnell (<1 ms) durch direkte Öffnung von Liganden gesteuerten Ionenkanälen und andererseits langsam (mehrere Hundertstel Millisekunden bis Minuten) durch ein zwischengeschaltetes Second-messenger System (z.B. cAMP, cGMP, Calcium oder Diacylglycerol).
Dieses letztgenannte wiederum aktiviert Proteinkinasen, die ihrerseits über Kaskaden verschiedene Effekte in der Nervenzelle hervorrufen wie z.B. De-/Aktivierung von Neurotransmitterrezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Ionenpumpen und -kanälen [40].

Nach der Öffnung von Ionenkanälen erzeugt der Einstrom von Natrium- bzw. Chloridionen ein exzitatorisches postsynaptisches Potential, welches bei Überschreiten einer bestimmten Schwelle wieder ein Aktionspotential auslöst, das in diesem Neuron weitergeleitet wird, bzw. ein inhibitorisches Potential, das die Erregbarkeit der Zelle herabsetzt [29].

Der im synaptischen Spalt befindliche Neurotransmitter diffundiert entweder aus diesem hinaus, wird durch Enzyme abgebaut oder durch

Transportproteine in die Nerventerminale oder umliegenden Zellen wiederaufgenommen [47].
Im Neuron wird der wiederaufgenommene Transmitter in Vesikeln gespeichert oder wie auch in den benachbarten Gliazellen durch Enzyme abgebaut [104].

Im ZNS des Menschen existieren Ansammlungen von Neuronen mit der gleichen Transmittersubstanz (u.a. Acetylcholin, Monoamine wie Dopamin, Noradrenalin, Serotonin und Histamin, Aminosäuren wie γ-Aminobuttersäure (GABA) und Glutamat, neuroaktive Peptide wie Substanz P und Stickoxide wie Stickstoffmonoxid), die z.T. bestimmten funktionellen Systemen zugeordnet werden können [19].

Für diese Arbeit wichtige Transmitter sind die Monoamine Dopamin, Noradrenalin und Serotonin.

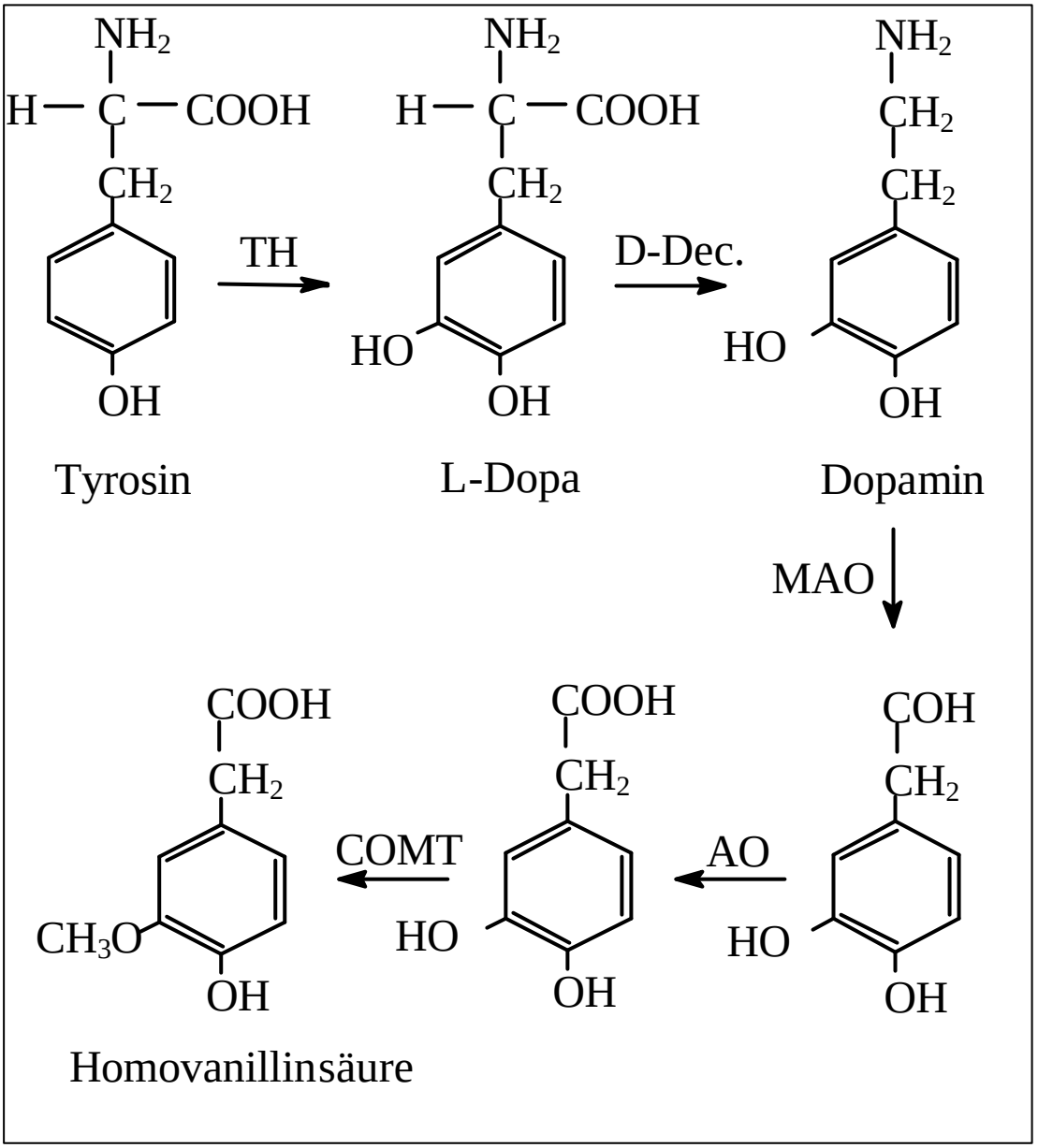
1.1.3 Dopamin

Die Biosynthese von Dopamin (DA) geht von der Aminosäure Tyrosin aus. Diese wird durch das Enzym Tyrosinhydroxylase zu L-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) hydroxyliert, welches seinerseits durch das Enzym Dopadecarboxylase zu Dopamin umgesetzt wird [61].

Der Abbau von DA erfolgt durch die Enzyme Monoaminooxidase- in erster Linie durch Typ B (MAO-B)-, Aldehyddehydrogenase und Catechol-O-methyltransferase (COMT) in die Hauptabbauprodukte 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure (engl. DOPAC) und 3-Methoxy-4-hydroxyphenylessigsäure = Homovanillinsäure (engl. Homovanillic Acid = HVA) umgewandelt [61, 71]. In Anlehnung an die internationale Nomenklatur wird im folgenden die englische Abkürzung HVA verwendet. Da in dieser Arbeit vorrangig die HVA betrachtet werden soll, ist in Abbildung 1 nur dieses Hauptabbauprodukt aufgeführt. Das Molekulargewicht von HVA beträgt 182,2 g/mol.

Eine indirekte Beurteilung des Gesamtumsatzes von Dopamin im ZNS (v.a. im Striatum) ist durch die Bestimmung von HVA im Liquor möglich [61].
Dabei ist ein Gradient der HVA zwischen Liquor der Seitenventrikel mit der höchsten Konzentration und aus dem Bereich der Lendenwirbelsäule mit niedrigerer Konzentration zu berücksichtigen. Die lumbale HVA spiegelt somit nur einen Teil des gesamten DA-Metabolismus dar [120].

Abbildung 1: Synthese und Abbau von Dopamin



Mit TH, D-Dec., MAO, AO und COMT sind die Enzyme Tyrosinhydroxylase, Dopa-Decarboxylase, Monoaminooxidase, Aldehydoxidase und Catechol-O-methyltransferase abgekürzt.

Ansammlungen dopaminerger Nervenzellen liegen im Mes-, Di- und Telenzephalon und werden in folgende Systeme unterteilt:
Das **mesostriatale System** entspringt v.a. in der Pars compacta der Substantia nigra und innerviert das Striatum [79]. Fast 80 Prozent des DA des Gehirns sind dort zu finden [61].
Ferner existieren ein **mesolimbokortikales System** (aus dem Mesenzephalon und Teilen der Substantia nigra ins limbische System und in die Großhirnrinde) [61, 79], ein **dienzephalospinales System** (vom Hypothalamus zu Hinterhorn, Ncl. intermediolateralis und Bereich um den Zentralkanal des Rückenmarks),

ein **tuberoinfundibuläres System** (von Ncl. infundibularis (arcuatus) zu Eminetia intermediana und Hinterlappen der Hypophyse) [79, 61] sowie ein **magnozelluläres System** (Bereich der Nuclei paraventricularis und supraopticus) [79].

Die Wirkung von DA an den Zielzellen hängt vom jeweiligen Rezeptor ab. Es sind die Rezeptortypen D_1 (in Striatum, Ncl. accumbens, (Hypo)thalamus, limbisches System, ...), D_2 (in Substantia nigra pars compacta, Striatum, Area tegmentalis anterior des Mittelhirns, Ncl. accumbens, ...), D_3 (in Ncl. accumbens, Tuberculum olfactorium, Substantia nigra pars compacta, Kleinhirn, Area tegmentalis anterior des Mittelhirns, ...), D_4 (in frontalem Cortex, Medulla oblongata, Amygdala, Hypothalamus und Mittelhirn, ...) und D_5 (in Hippocampus und Thalamus, ...) für DA bekannt. Die Ortsangaben beziehen sich sowohl auf Rezeptoren als auch deren mRNA und sind beim Menschen, jedoch vor allem bei Ratten festgestellt [50].

1.1.4 Noradrenalin

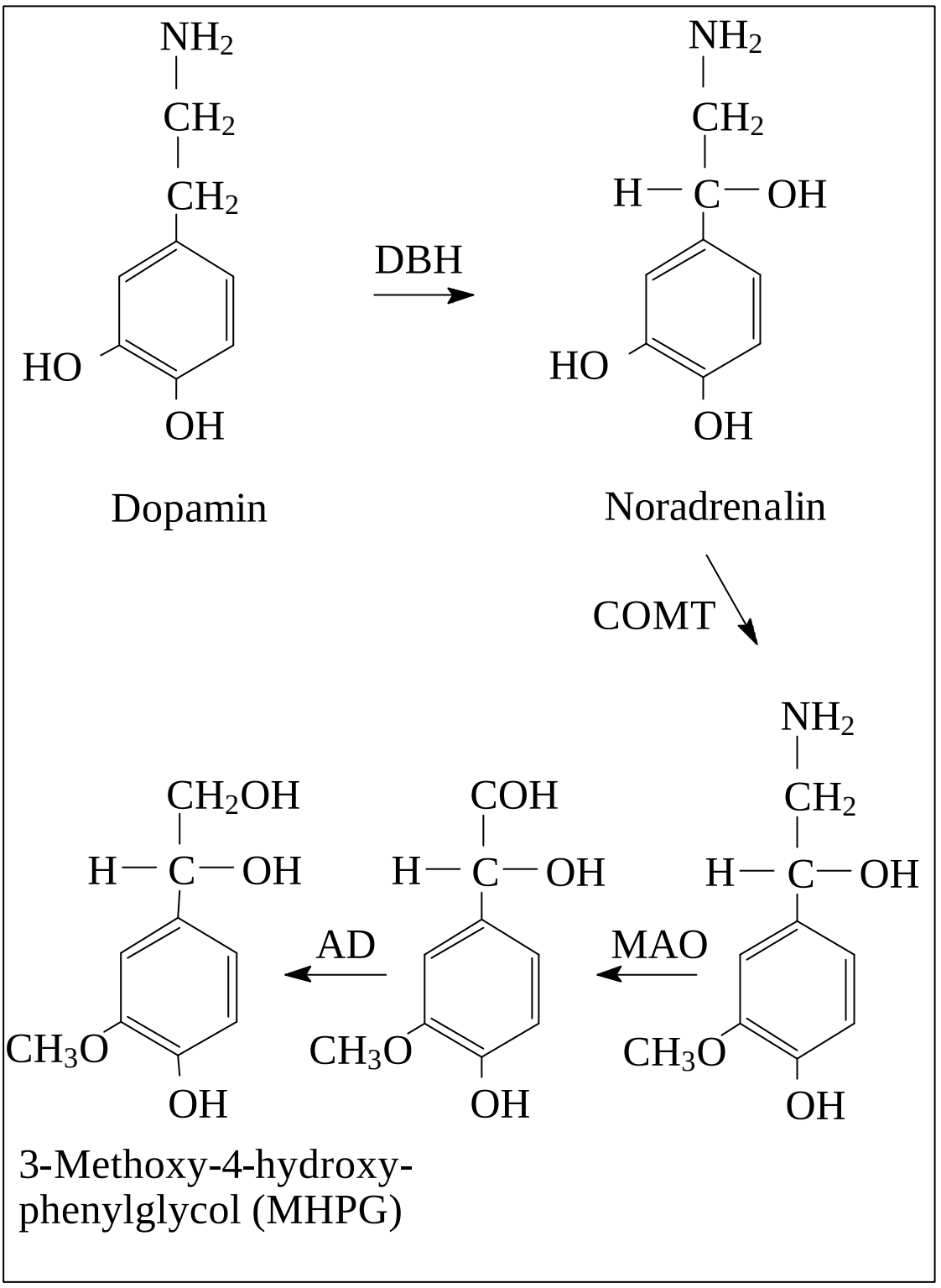
Noradrenalin (NA) wird in den Vesikeln noradrenerger Neurone durch das Enzym Dopamin-β-Hydroxylase aus Dopamin synthetisiert.
Im ZNS wird NA durch die Enzyme COMT, MAO (v.a.Typ A) und Aldehydreduktase zu 3-Methoxy-4-hydroxymandelessigsäure = Vanillinmandelsäure (VMA) und 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol (engl. 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol = MHPG, oft auch HMPG abgekürzt [68, 19]) abgebaut, welche wie HVA im Liquor bestimmt werden können [61, 68].

In Abbildung 2 ist nur MHPG = HMPG (Molekulargewicht 184,2 g/mol) als Abbauprodukt dargestellt.

Im Locus coeruleus, am Boden der rostralen Rautengrube, liegt das wichtigste noradrenerge System mit Efferenzen zu Kernen des Thalamus und Hypothalamus, aber auch zu Teilen des limbischen Systems (Cortex piriformis, Amygdala, Septum und Hippocampus) und zum gesamten Neocortex.

Neben diesen aufsteigenden Fasern existieren absteigende zu sensorischen Relais- und Assoziationskernen des Hirnstamms (z.B. Colliculi inferiores und superiores, Vestibularis- und Cochleariskerne, ...) und zum gesamten Rückenmark.

Abbildung 2: Synthese und Abbau von Noradrenalin



Die Abkürzungen DBH, COMT, MAO und AD stehen für die Enzyme Dopamin-b-Hydroxylase, Catechol-O-methyltransferase, Monoaminoxydase und Aldehydreduktase.

Afferenzen zum Locus coeruleus stammen v.a. aus somato- und viszerosensorischen Systemen über Kerngebiete der ventrolaterale Medulla oblongata und in der Umgebung des Ncl. praepositus.

Weitere Zellgruppen liegen u.a. im ventrolateralen Brückentegmentum um den Fazialiskern und die Olive sowie im Bereich des Ncl. subcoeruleus und der Parabrachialkerne, welche somato- und viszeromotorische Hirnstammkerne und das gesamte Rückenmark innervieren [79, 61].

NA interagiert mit α- und β-Rezeptoren, welche in α_{1-2} sowie β_{1-2} unterteilt sind [61].

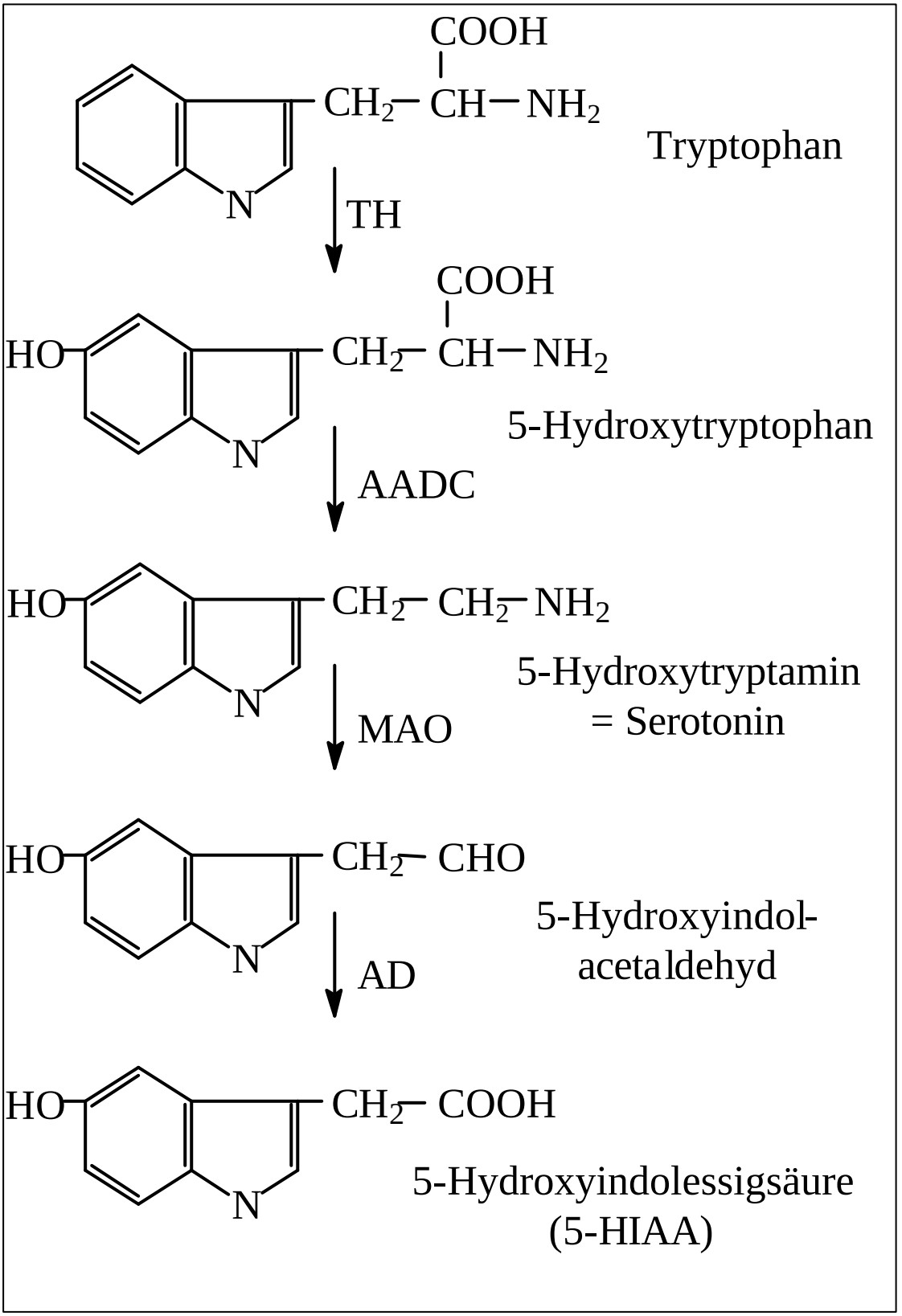
1.1.5 Serotonin

Der Hauptneurotransmitter dieser Systeme ist Serotonin oder 5-Hydroxytryptamin (5-HT). Es wird im Neuron aus der Aminosäure L-Tryptophan durch die Enzyme Tryptophanhydroxylase und aromatische Aminosäuredecarboxylase über das Zwischenprodukt 5-Hydroxytryptophan produziert. Der Abbau erfolgt über die Enzyme MAO, vorwiegend der A-Typ, und Aldehyddehydrogenase zu 5-Hydroxyindolessigsäure (engl. 5-Hydroxyindolacetic Acid = 5-HIAA) mit einem Molekulargewicht von 191,2 g/mol. Abbildung 3 zeigt den Synthese- und Abbauweg [33].

Serotonerge Neurone finden sich vor allem in Teilen der Raphekerne, aber auch außerhalb dorsal des Lemniscus medialis und lateral des Ncl. reticularis tegmenti pontis.
Aufsteigende Bahnen haben ihren Ursprung größtenteils aus den Nuclei raphe medianus und dorsalis und führen im zentralen Grau sowie im ventralen Tegmentum des Mittelhirns vor ihrer Vereinigung im medialen Vorderhirnbündel zu Vierhügelplatte, Ncl. interpeduncularis, Kernen des Hypothalamus und des dorsomedialen Thalamus, zu Ncl. subthalamicus und Striatum, Septum, Amygdala, Bulbus olfactorius und schließlich zum Neo- und Allokortex. Diese Bahnen zeigen unterschiedliche Vulnerabilität gegenüber stimmungsverändernden Substanzen, unterschiedliche Kaliber und verschiedene Verteilung in den Endigungsgebieten.

Absteigende Bahnen ziehen aus dem Ncl. raphe magnus im Hinterseitenstrang zu Hinterhorn und Zona intermedia sowie aus den Nuclei raphe pallidus und obscurus im Vorderseitenstrang zu Vorderhorn und Ncl. intermediolateralis.
Es bestehen ferner Verbindungen aus den Raphekernen zum Kleinhirn, somato- und viszeromotorischen und sensorischen Hirnstammkernen sowie unter den Raphekernen selbst [79].

Abbildung 3: Synthese und Abbau von Serotonin (5-Hydroxytryptamin)



Die Abkürzungen TH, AADC, MAO und AD stehen für die Enzyme Tryptophanhydroxylase, aromatische Aminosäurendecarboxylase, Monoaminoxydase und Aldehyddehydrogenase.

Das Spektrum der interzellulären Kommunikation wird durch das Vorkommen von verschiedenen Rezeptoren für 5-HT erweitert. Es wurden bisher drei Hauptklassen identifiziert: die 5-HT_1-Familie, die 5-HT_2-Familie und eine Familie, die 5-HT_4 und 5-HT_7 umfaßt.

Diese Familien werden weiter in Untergruppen unterteilt, die in verschiedenen Regionen und Zellen auftreten:

5-HT_{1A}: Hippocampus, Amygdala, Raphekerne, ... [67, 85, 33]
5-HT_{1D}: Substantia nigra, Basalganglien, ... [33]; Autorezeptor [85] an Soma und Terminalen [67];
5-HT_{1F}: cerebraler Cortex, Striatum, Hippocampus, ... [33]

5-HT_{2A}: Thrombozyten [67]; Claustrum, Striatum, ... [33]
5-HT_{2C}: Plexus choroideus, Substantia nigra, Rückenmark, ... [33]

5-HT_4: Hippocampus, Striatum, ... [33]
5-HT_7: cerebraler Cortex, Thalamus, Hypothalamus [33]

Der 5-HT_3-Rezeptor ist ein Liganden-gesteuerter Ionenkanal im Gegensatz zu den oben genannten. Er kommt in folgenden Regionen vor:

5-HT_3: peripheres Gewebe [67]; Hippocampus, Area postrema, Rükkenmark, ... [33]

Es existieren weitere Rezeptor(sub)typen, die hier nicht angeführt werden, da sie beim Menschen nicht nachgewiesen sind.

1.1.6 Funktionen und Pathologie des dopaminergen, noradrenergen und serotonergen Systems

Den Neurotransmittern Dopamin, Noradrenalin und Serotonin lassen sich bestimmte funktionelle Systeme im ZNS zuordnen. Bei Störung dieser Systeme sind Veränderungen im Transmitterstoffwechsel nachweisbar.

So wurden beispielsweise bei Liquoranalysen erniedrigte Konzentrationen von HVA bei Patienten mit Depression [90], seniler Demenz vom Alzheimer Typ [83, 17], Morbus Parkinson [71] und Fibromyalgiesyndrom [96] festgestellt, was auf eine Störung eines oder mehrerer dopaminerger Systeme hinweisen kann. Auch die sog. Dopamin-Hypothese der Schizophrenie geht von einer Störung im dopaminergen System des Gehirns aus,

wobei auch eine Mitbetroffenheit u.a. des serotonergen und noradrenergen Systems wahrscheinlich ist [24].

Der noradrenerge Locus coeruleus ist u.a. an der Regelung des Bewußtseinszustandes und des Wachheitsgrades, von Verhaltensmustern wie Lernen und Verstärkung sowie des cerebralen Blutflusses und der Permeabilität des cerebralen Mikrogefäßsystems beteiligt [120].
So ist es keine Überraschung, daß Störungen im noradrenergen System, die durch erhöhte oder erniedrigte Konzentrationen des Hauptmetaboliten MHPG im Liquor festgestellt werden, bei Patienten mit Krankheiten wie Manie, Depression, amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und Chorea Huntington festzustellen sind [123].

Die Möglichkeiten von Störungen in serotonergen Systemen sind mannigfaltig, zumal Serotonin neben der Funktion als Neurotransmitter auch als trophischer Faktor bei der Entwicklung des Nervensystems, als Homöostasefaktor für die Aufrechterhaltung der Funktion und Anpassungsfähigkeit des Nervengewebes an externe Stimuli erfüllt sowie an Regelkreisen wie z.B. der Stimulation der Ausschüttung von Corticotropin-releasing hormone (CRH) im Hypothalamus beteiligt ist [8, 67].
So wurden beispielsweise bei depressiven Patienten z.T. erniedrigte Werte des Serotoninabbauproduktes 5-HIAA festgestellt, woraus ein Mangel des Neurotransmitters abgeleitet wurde [82, 107]. Ein ähnlicher Mangel an 5-HIAA im Liquor wurde auch bei Patienten mit M. Alzheimer festgestellt [17]. Auch aggressives und suizidales Verhalten stehen in Zusammenhang mit Störungen im serotonergen System [67]. Bei der Pathogenese von schizophrenen Störungen scheint ebenfalls eine Imbalance in serotonergen Teilsystemen vorzuliegen [22].

1.1.7 Liquor cerebrospinalis

Der Liquor cerebrospinalis, kurz Liquor, ist eine klare Flüssigkeit, welche das Ventrikelsystem des Gehirns und den Subarachnoidalraum von Gehirn und Rückenmark ausfüllt. Er wird zu 70 % von den Plexus chorioidei in den Ventrikeln sezerniert. Der restliche Anteil entsteht durch Übertritt aus dem Kapillarbett des Gehirns und durch metabolische Wasserproduktion des Parenchyms. Das Gesamtvolumen beträgt beim Erwachsenen etwa 140 ml und wird im Laufe von 5-7 Stunden vollständig erneuert.
Durch den hydrostatischen Druck von ca. 15 cm Wassersäule bei der Produktion und durch den Zilienschlag des Ependyms der Ventrikelinnenwand entsteht ein Fluß vom inneren Liquorraum in den äußeren, d.h. von den Seitenventrikeln über den dritten in den vierten Ventrikel und

aus diesem durch den Canalis centralis des Rückenmarks nach kaudal oder durch die Aperturae laterales und Apertura media in die Cisterna cerebellomedullaris des Subarachnoidalraumes. Von hier aus fließt der Liquor einerseits weiter nach kranial zu den venösen Sinus, in welche er über Villi der Arachnoidea absorbiert wird, andererseits nach kaudal entlang des Rückenmarkkanals, wo er ebenfalls über arachnoidale Villi ins venöse System aufgenommen wird. Der absteigende Fluß ist dabei etwa um den Faktor 10 bis 20 schneller als der aufsteigende.
Der Liquor schützt das ZNS, indem durch den Dichteunterschied von beiden die effektive Masse des ZNS um etwa das 30fache reduziert wird und dadurch die Auswirkungen von Beschleunigungs- und Abbremsbewegungen bei plötzlichen Kopfbewegungen wesentlich verringert werden. Als weitere Funktion ist der direkte Austausch mit dem Extrazellulärraum des Nerven- und Bindegewebes (Glia) des Gehirns anzuführen, welcher die Versorgung mit Vitaminen, im wesentlichen jedoch die Entsorgung von Stoffwechselprodukten gewährleistet [119]. Neben diesen Endprodukten des zellulären Metabolismus gelangen über die Synapsen, d.h. den Extrazellulärraum, auch Neurotransmitter und deren Metaboliten in den Liquor. Durch Punktion des Liquorraums und Entnahme desselben ist deren Analyse möglich [75].

1.2 Das Fibromyalgiesyndrom (FMS)

Das Fibromyalgiesyndrom (FMS) ist seit Jahren das Thema zahlreicher Studien unterschiedlicher Fachbereiche, welche zu zum Teil kontroversen Ergebnissen über pathologische Veränderungen und Hinweisen für mögliche Pathogenesen kommen. Es wurde 1993 in die zehnte Revision der "International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems" (ICD-10) der WHO unter Punkt M79.0 "Rheumatismus, nicht näher bezeichnet: Fibromyalgie" aufgenommen [112].
Die Bezeichnung dieses klinischen Bildes änderte sich im Laufe der Zeit und mit jeweils neuen Erkenntnissen von "Neurasthenie" (1869) [11] über "Fibrositis" (1904) [38] zu "Fibromyalgie" [122] bzw. "Fibromyalgiesyndrom (FMS)" [69]. Synonym wurden auch Begriffe wie generalisierte Tendomyopathie, polytope (multilokuläre) Insertionstendopathie [70] und myofaszialer Schmerz [41] verwendet.

In dieser Arbeit wird der Terminus "Fibromyalgiesyndrom (FMS)" in Anlehnung an Masi vorgezogen, da es sich um kein Krankheitsbild im engeren Sinne handelt, sondern lediglich um die Beschreibung klinischer Symptome [69].

1.2.1 Klinik/Symptomatik

Namengebend für das Fibromyalgiesyndrom ist der chronische, generalisierte Schmerz im muskuloskelettalen Bereich ohne Vorliegen einer entzündlichen oder degenerativen Veränderung [36]. Hinzu kann eine Vielfalt an diversen Beschwerden kommen, z.B. Raynaud-Symptomatik, Bandscheibenprolaps, Nahrungsmittelunverträglichkeit, Thrombophlebitis, Reizdarmsyndrom, Depression, hormonelle Dysfunktionen, Dysmenorrhoe, Dysurie, Gesichtsfeldausfälle, usw., wobei Müdigkeit, Schlafstörungen und Kopfschmerzen am spezifischsten sind [15, 36].

1.2.2 Epidemiologie

Epidemiologischen Untersuchungen zufolge reicht die Prävalenz des FMS von 2,0% [116] über 3%, 6,2% (nur Kinder) und 10,5% (nur Frauen) [99] bis 17% [89] und steigt mit zunehmendem Alter an, wobei Frauen häufiger betroffen sind (bei einem Alter über 50 Jahren ca. sechsmal mehr Frauen als Männer) [116].

1.2.3 Diagnostik

Die Diagnose FMS wird anhand klinischer Untersuchungskriterien nach umfassender und kompetenter körperlicher Untersuchung gestellt [41]:

- chronischer, generalisierter Schmerz, dem keine inflammatorische oder degenerative Ursache zuzuordnen ist [36], d.h. andere Erkrankungen müssen ausgeschlossen sein wie z.B. Polymyalgia rheumatica, Morbus Sjögren, Bandscheibenprolaps, Enzephalitis disseminata oder auch eine larvierte Depression [15].

Um diese eher weit gefaßten Kriterien von generalisiertem, chronischem Schmerz zu standardisieren, wurden folgende 1990 vom American College of Rheumatology (ACR) zur Klassifikation empfohlen:

- Schmerz in beiden Körperhälften sowie über und unter der Gürtellinie, zusätzlich axialer Skelettschmerz (zervikale, thorakale oder lumbale Wirbelsäule bzw. vorderer Brustkorb) über mindestens drei Monate, wobei Lumbalgien in den Bereich unter der Gürtellinie gerechnet werden.

- mindestens 11 von 18 schmerzhaften Punkten (tender points) bei einer Palpation von ca. 4 kg/cm^2:
  1. Occiput: an den suboccipitalen Muskelansätzen bds.
  2. unterer Hals: vordere Anteile der Intertransversalräume C5-C7 bds.
  3. Trapezius: Mittelpunkt der oberen Begrenzung bds.
  4. Supraspinatus: am Ursprung über der Spina scapularis bds,
  5. zweite Rippe: oben lateral bis zur 2. costochondralen Verbindung bds.
  6. Epikondylus lateralis humeri: 2 cm distal der Epikondylen bds.
  7. Glutealbereich: oberer, äußerer Quadrant der anterioren Muskelfalte bds.
  8. Trochanter maior femoris: posterior des Trochanters bds.
  9. Knie: medialer Fettpolster proximal der Gelenkslinie bds. [117]

- zusätzlich sollten anhaltende Müdigkeit, nicht-erholsamer Schlaf und allgemeine Steifigkeit vorhanden sein [14].

In der Kopenhagener Erklärung werden die verschiedenen oben genannten Kriterien für den klinischen Gebrauch neu zusammengefaßt [14, 26].

Alle in dieser Dissertation zitierten Arbeiten richten sich nach den ACR-Kriterien. Sollten in einzelnen Fällen andere Leitlinien verwendet werden, wird auf den Vergleich der verschiedenen Kriterien im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität in der ACR-Klassifikation verwiesen [117].

1.2.4 Therapie

Eine effiziente Monotherapie gibt es derzeit nicht [36]. Versuche mit verschiedenen pharmakologischen und anderen Verfahren ergeben, daß eine Behandlung mit Antidepressiva noch den größten Erfolg verspricht.

Trizyklische Antidepressiva wie Amitryptilin bringen bei einem Teil der Patienten zumindest vorübergehend eine deutliche Besserung der Symptomatik [64]. Für die Wirkweise dieser Pharmaka wird eine Verstärkung von inhibitorischen, absteigenden kortikalen, supraspinalen und spinalen Bahnen vorgeschlagen, welche Noradrenalin und Serotonin als Mediatoren verwenden. Hinzu kommt eine mögliche Modulation der Effekte von Endorphinen durch serotonerge Bahnen [4].
Selektive Serotonin Wiederaufnahme Inhibitoren (SSRI) verbessern Depression und Schlafstörungen und lindern in Kombination mit trizyklischen Antidepressiva (wie Fluoxetin und Amitryptilin) die Symptome des FMS signifikant besser als ein Wirkstoff alleine [37, 4].
Nichtsteroidale antiinflammatorische Arzneien (NSAIDs) werden zwar von Patienten häufig in Eigenregie verwendet [114], haben jedoch laut Studien lediglich den gleichen Effekt wie Placebos [64].
Tramadol erwies sich als nützlich bei der Behandlung von FMS-Schmerz [93, 64]. Über Versuche mit weiteren Opioiden liegen derzeit noch keine Daten vor [64].
Aminosäurederivate wie S-adenosyl-L-methionin wurden z.T. mit Erfolg getestet [105].
Eine regionale sympathische Blockierung brachte nur geringe [36], Lidocaininjektionen in tender points [64] nur kurzfristige Besserung.
Von getesteten physikalischen Behandlungsansätzen brachten Leibesübungen/Gymnastik, Biofeedback und Akupunktur [80] teilweise Linderung, ebenso wie Verhaltenstherapie und Coping-Strategien [64].

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Symptome des FMS meist nur durch die Kombination pharmakologischer und nichtpharmakologischer Intervention gebessert werden können. Eine Heilung ist aufgrund der unbekannten Ätiologie derzeit nicht möglich [64].

1.2.5 Prognose

Aus diesem Grund ist auch die Prognose Erkrankter eher schlecht, da das FMS in den meisten schwereren Fällen persistiert oder nach kurzer Remission wieder auftritt. Dennoch kommt es -wenn auch selten- zur Spontanremission [15].
Langzeitstudien ergaben, daß bei Patienten mit starker Ausprägung des FMS auch nach einer Behandlung in einem spezialisierten Zentrum über 7 bzw. 10 Jahre deren Gesundheitszustand unverändert bleibt [115].

1.2.6 Ergebnisse von Studien über Veränderungen beim Fibromyalgiesyndrom (FMS)

In diesem Abschnitt wird ein kleiner Überblick über festgestellte Veränderungen im Rahmen des FMS gegeben, die zur Klärung einer möglichen Pathogenese beitragen können.

Histologie

Bartels berichtete 1986 über Einschnürungen von Muskelfaserbündeln, die wie durch Gummibänder verursacht aussehen ("rubber-band-like structures") und ein Netzwerk von reticulären oder elastischen Fasern, welche die Muskelfasern verbinden [10]. Die verwendeten Kriterien entsprechen nicht den ACR-Richtlinien.
Pongratz et al. stellten nur geringfügige Veränderungen fest, die "als unspezifisches Sekundärphänomen eingestuft werden" [86] müssen. Weiter wird ausgeführt, daß die "generalisierte Tendomyopathie ... sicher keine entzündliche oder degenerative Muskelerkrankung" [86] sei. Der Arbeit war nicht zu entnehmen, welche Klassifikationskriterien zugrunde lagen.

Immunologie

Als immunologische Auffälligkeit stellten Klein et al. Antikörper gegen Serotonin sowie gegen Ganglioside im Serum von Patienten mit FMS fest [51]. Es wurde nach Yunus et al. diagnostiziert [117].
Eine weitere mögliche Ursache des FMS vermuten Hey et al. in einer "im Darm stattfindenden Bakteriophagen-induzierte Lyse von E. coli, der daraus resultierenden Endotoxinfreisetzung im Darm und deren Resorption via Darmwand in den Blutkreislauf ..." [43] aufgrund signifikant

erhöhter Titer von Antikörpern gegen die Endotoxine Lipopolysaccharid-S und Lipid-A im Serum und dem Nachweis von spezifischen Coli-Phagen im Stuhl von FMS-Patienten [43].
Weitere Hinweise für eine Beteiligung des Immunsystems fand auch Nasralla, der multiple Infektionen mit verschiedenen Mykoplasmenarten im Blut einer Testgruppe von Patienten mit FMS und chronic fatigue syndrome (CFS) fand. Leider erfolgten keine Angaben über die genaue Zusammensetzung der Testgruppe [78].

Psychiatrie

Häufig werden Zusammenhänge zur Depression gefunden. Hudson stellt beispielsweise einen hohen Anteil an gegenwärtigen oder zurückliegenden affektiven Störungen, v.a. Depressionen und Angststörungen, sowie eine erhöhte familiäre Prävalenz dazu beim Vergleich von Patienten mit FMS (nach den Kriterien von Yunus [117]) und rheumatoider Arthritis fest und diskutiert eine affektive Störung als prädisponierenden Faktor für das FMS oder dieses als eine affektive Störung mit prominenten somatischen Symptomen [48].

Neurologie

Im Bereich des Nervensystems finden sich ebenfalls Auffälligkeiten. So stellen sich beim Vergleich von FMS-Patienten mit einer Kontrollgruppe aus Gesunden und an rheumatoider Arthritis Erkrankten signifikant erniedrigte Werte von MHPG, 5-HIAA und HVA im Liquor dar [96].
Auch werden erhöhte Werte an Substanz P (SP) im Liquor von FMS-Patienten festgestellt [109]. Die verwendeten Diagnostikkriterien sind von Yunus et al. und Smythe [117].
Auch andere Arbeiten zeigen diese erhöhten Spiegel von SP im Liquor [94, 32].
Schwarz et al. finden im Serum von Patienten mit FMS eine starke negative Korrelation zwischen Substanz P und 5-HIAA und verweisen auf einen möglichen Antagonismus von Substanz P und serotoninergem System [100]. Einen ähnlichen Regelmechanismus zwischen Serotonin und Substanz P schlägt auch Russell auf sowohl zerebraler als auch spinaler Ebene vor [95].

1.3 Ziel der Arbeit

Zwischen dem Fibromyalgiesyndrom (FMS) und Depression werden aufgrund von genetischen und biochemischen Untersuchungen Zusammenhänge in der Pathophysiologie vermutet.
So berichten zahlreiche Arbeiten über Störungen des Serotoninstoffwechsels mit erniedrigten Konzentrationen von Serotonin bzw. 5-HIAA bei Patienten mit Depression [5-7,107], welche auch beim FMS gefunden werden [96] (siehe auch 1.2.6).
Hinzu kommt das Ansprechen des FMS auf die Therapie mit Antidepressiva [64, 4, 37] (siehe auch 1.2.4), welche die Konzentrationen zentralnervöser Neurotransmitter (u.a. Noradrenalin, Dopamin und Serotonin) beeinflussen [33, 61].

Im Rahmen der Nozizeption werden ferner Zusammenhänge zwischen Substanz P und Serotonin vermutet [77, 76, 72]. Auch Schwarz et al. [100] und Russell [95] verweisen auf einen möglichen Regelmechanismus zwischen Serotonin und Substanz P.
Aufgrund der erhöhten Konzentrationen an Substanz P bei Patienten mit FMS liegt die Vermutung einer gestörten Schmerzverarbeitung nahe [92].

Aufgrund der oben genannten Fakten wird in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwiefern sich Patienten mit FMS und chronischen Schmerzzuständen im direkten Vergleich der Neurotransmitter Noradrenalin, Serotonin und Dopamin im ZNS unterscheiden, gemessen an deren Metaboliten MHPG, 5-HIAA und HVA.

Für die Durchführung dieses Vergleichs wird eine Methode für die High Performance Liquid Chromatography (HPLC) mit elektrochemischer Detektion (ECD) zur gleichzeitigen Messung von MHPG, 5-HIAA und HVA im Liquor cerebrospinalis etabliert und in einer ersten vorläufigen Untersuchung die Konzentration dieser Neurotransmittermetaboliten bei Patienten mit FMS im Vergleich zu neurologischen Erkrankungen wie Polyneuropathien (PNP) oder Rückenschmerzen (low back pain) bestimmt.

2. Etablierung einer Methode für die High Performance Liquid Chromatography (HPLC) mit elektrochemischer Detektion (ECD) zur gleichzeitigen Messung von MHPG, 5-HIAA und HVA im Liquor von Patienten mit Fibromyalgiesyndrom (FMS) und neurologischen Erkrankungen

2.1 Funktionsprinzip der HPLC

Das Trennprinzip der HPLC besteht darin, daß eine zu analysierend Probe in einen Flüssigkeitskreislauf injiziert und in dieser Flüssigkeit, der mobilen Phase, mittels einer Pumpe unter hohem Druck durch eine Trennsäule gepumpt wird, die mit einem sog. Packungsmaterial, der stationären Phase, gefüllt ist.
Bestandteile der Probe treten dabei mit der stationären Phase in unterschiedliche Wechselwirkungen und werden verzögert aus der Säule ausgeschwemmt.
Die Art und Kombination der beiden Phasen richtet sich nach den chemischen Eigenschaften der zu untersuchenden Substanzen.

Die so getrennten Anteile der Probe werden dann weiter in der mobilen Phase in die Meßzelle eines hinter die Säule geschalteten Detektors transportiert und fließen an einer Meßelektrode vorbei, der eine elektrische Spannung anliegt. Dabei werden die enthaltenen Substanzen teilweise oxidiert. Der dabei entstehende Elektronenfluß wird gegen eine Referenzelektrode gemessen und als (elektrisches) Signal an einen Integrator oder Computer weitergeleitet, der die Signale graphisch in Form von Ausschlägen, sog. Peaks, aufarbeitet.

Diese Form der elektrochemischen Detektion wird als amperometrisch bezeichnet [45]. Je größer die Menge der oxidierten Substanz und des daraus resultierenden Elektronenflusses, desto größer ist der Ausschlag bzw. Peak am Integrator/ Computer.

Die Identifizierung der enthaltenen Substanzen erfolgt durch den Vergleich mit isolierten Referenzsubstanzen in Reinform, welche separat injiziert und mit der gleichen zeitlichen Verzögerung, der sog. Retentionszeit, wieder aus der Säule ausgespült werden.

2.2 Verwendetes Material und statistische Methoden

Zur Methodenetablierung wurden folgende Substanzen und Materialien verwendet. Im Anhang findet sich eine tabellarische Zusammenfassung.

2.2.1 HPLC-Säule

Nach dem Test verschiedener Modelle wird eine analytische Säule vom Typ LiChroCART^{R} 250-4 HPLC Cartridge mit dem Packungsmaterial Superspher^{R} 60 RP-select B der Firma Merck verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Säule mit einem Metallgehäuse von 250 mm Länge und 4 mm Innendurchmesser gepackt mit einem Füllmaterial aus Partikeln von 4 µm Durchmesser mit einer lipophilen (reversed phase) C18 Oberfläche. Dieser Säulentyp wird häufig zur Bestimmung von Katecholaminen und deren Metaboliten eingesetzt [45, 98, 42, 34].
Zum Abhalten von Verunreinigungen wird eine Vorsäule, ebenfalls von Merck, mit gleichem Packungsmaterial vor die analytische Säule geschaltet [98, 42].
Vor Verwendung werden die Säulen mit Methanol und H_2O in gleichem Verhältnis 15 Minuten lang aktiviert und mit mobiler Phase gespült. Anschließend werden evtl. freie Bindungsstellen mit Standardlösungen in einer Konzentration von 10 ng/ml gesättigt.

2.2.2 mobile Phase

Eine mobile Phase aus Natriumacetat-Puffer wurde bereits mehrfach verwendet [90, 98, 34] und aufgrund der simplen Herstellung und guter Resultate auch hier eingesetzt: Eine 1 molare Stammlösung, bei 4 °C im Kühlschrank gelagert, wird vor jedem Analysenlauf mit entionisiertem Wasser auf 0,05 M verdünnt [42], mit Salzsäure (30%) auf pH 5,0 [34] eingestellt und gefiltert. Anschließend wird 1% Methanol beigefügt [42] und 5 Minuten lang im Ultraschallbad entgast.

2.2.3 Detektor

Der für diese Arbeit verwendete Detektor ist ein Typ M460 (Millipore^{R}) der Firma Waters mit einer Glassy Carbon Meßelektrode und Ag/AgCl-Referenzelektrode der Firma Chromsystems in einer Edelstahlmeßzelle, der wie folgt eingestellt ist:

Oxidation, Offset: on, Offset: oxidative setting mit einem Bereich von 0-15 nA, Empfindlichkeit: 2 nA, Filter/Zeit-konstante: 18 dB/Oktave bei 2 sec, Ausgangssignal: einem Meßsignal von max. 50 nA entsprechen max. 1 V Ausgangssignal.
Zur Optimierung der Analyse werden Arbeitspotentiale von 60, 65, 72, 75 und 80 mV miteinander verglichen, um dasjenige mit der besten Trennung der Substanz-Peaks zu ermitteln.

2.2.4 Computer und Software

Die vom Detektor eingehenden Signale werden mit dem Computerprogramm Millennium[32] (Version 3.05, Waters Co. 1998) auf einem Pentium 133 Personalcomputer verarbeitet und graphisch dargestellt.

2.2.5 Injektor

Ein automatischer Injektor Modell 717plus Autosampler der Firma Waters übernimmt das Einspritzen der Proben in einem Volumen von jeweils 100 µl.
Der Thermostat des Injektors wird auf 4 °C justiert.
Die Präzision des Injektors wird durch die mehrmalige Injektion von 100 µl mobiler Phase mit einem Zusatz von Iso-HVA in einer Konzentration von 500 ng/ml getestet.

2.2.6 Pumpe

Die mobile Phase wird durch eine pulsationsfreie Doppelkolbenpumpe Modell 300 der Firma Gynkotek bei einer Flußrate von 0,8 ml/min und einem daraus resultierenden Druck von etwa 143 bar durch das System transportiert.

2.2.7 Säulenthermostat

Um die Messung möglichst konstant zu halten, wird ein Peltier-Kolonnenthermostat eingesetzt, der die Temperatur der analytischen Säule stabil bei 30 °C hält.

2.2.8 Liquor cerebrospinalis

Zur Methodenentwicklung werden Reste an Liquor cerebrospinalis nach der Durchführung der Routinediagnostik in der Neurochemischen Abteilung gesammelt und ein "Pool" angelegt, welcher in Fraktionen zu 500 µl und 1000 µl aufgeteilt und bei -80 °C tiefgefroren wird.
Aus diesem Pool werden sämtliche Liquorproben zur Bestimmung der Validierungsparameter entnommen und jeweils nach dem gleichen Verfahren verarbeitet:

Nach dem Auftauen der Proben werden 400 µl Liquor abpipettiert, jeweils 15 µl Iso-HVA als interner Standard in einer Konzentration von 85,05 ng/ml (ergibt eine Endkonzentration von 20 ng/ml in der Probe) und 10 µl Perchlorsäure (70%) zur Deproteinisierung zugegeben, gemischt und 10 Minuten bei 20000 g und 4 °C zentrifugiert. Aus dem Überstand werden von zweimal 130 µl über den automatischen Injektor jeweils 100 µl zur Doppelbestimmung eingespritzt.

Das Ausfällen von Proteinen ist zum Schutz der Trennsäule vor Verunreinigung nötig, um Liquor ohne Extraktion direkt einspritzen zu können. Dieses Vorgehen wird von der Analyse von Gehirngewebe übernommen [42, 91].

2.2.9 Analyselauf

Zur Ermittlung der maximal erforderlichen Laufzeit einer Probe wird nach dem Verstreichen der längsten Retentionszeit (Iso-HVA) noch 60 Minuten lang weitergemessen, um verspätet aus der Säule ausgewaschene Substanzen identifizieren zu können, deren Signale möglicherweise mit der nachfolgenden Probe interferieren.
Diese Maßnahme ist notwendig, um den Zeitaufwand bei der Analyse möglichst kurz zu halten.

2.2.10 statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse der Methodenetablierung wurden Excel 97 von Microsoft und die Ausreißertests nach Dixon (bei max. 5 bis 8 Werten) bzw. nach Grubbs (bei über 8 Werten) verwendet [54].

2.3 HPLC-Methode zur gleichzeitigen Messung von MHPG, 5-HIAA und HVA im Liquor cerebrospinalis

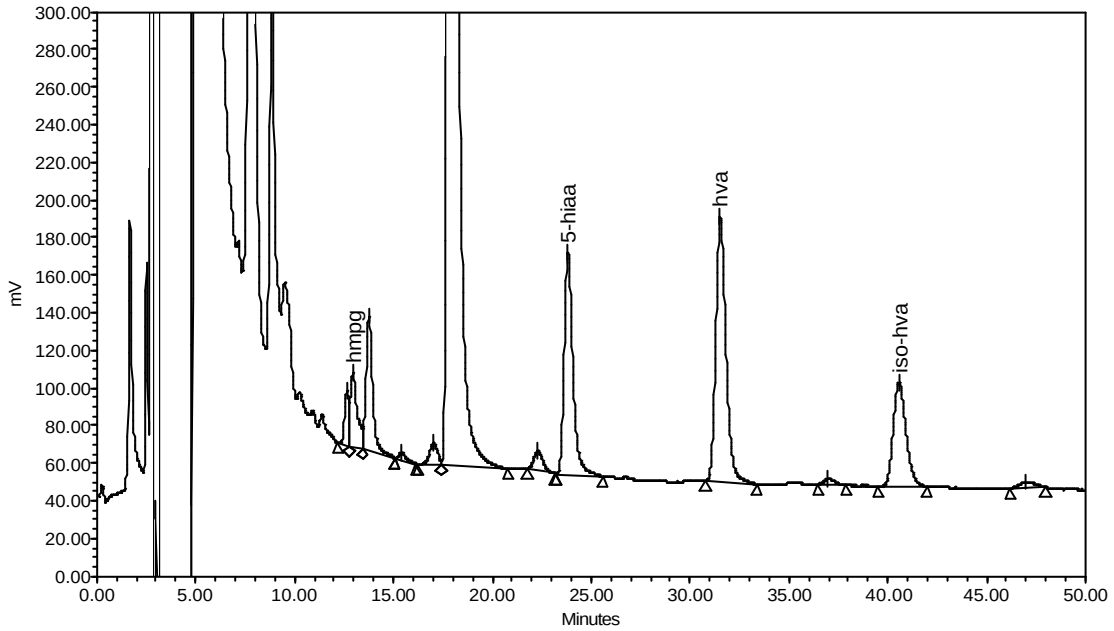
Die im Laufe der Etablierung der HPLC-Methode erhaltenen Ergebnisse werden, soweit möglich, in chronologischer und logischer Folge dargestellt.

2.3.1 physikalisch-chemische Parameter

2.3.1.1 Chromatogramm

Bei der oben beschriebenen Konfiguration der Meßgeräte und Verarbeitung des Liquors entstanden nach der graphischen Aufarbeitung der Meßsignale Chromatogramme wie in Abbildung 4.

Abbildung 4: Chromatogramm von Liquor aus dem Liquorpool



Die Peaks sind mit der Bezeichnung der jeweils zugeordneten Substanz benannt: hmpg=MHPG, 5-hiaa=5-HIAA, hva=HVA und iso-hva=Iso-HVA.

2.3.1.2 Modifikation der mobilen Phase

Bei einem pH-Wert der mobilen Phase von 4,5 zeigt sich eine bessere Trennung der Peaks der sauren Metaboliten 5-HIAA und HVA von störenden Substanzen als bei pH 5,0 und somit ein Optimum an Auflösung.

2.3.1.3 Arbeitspotential des Detektors

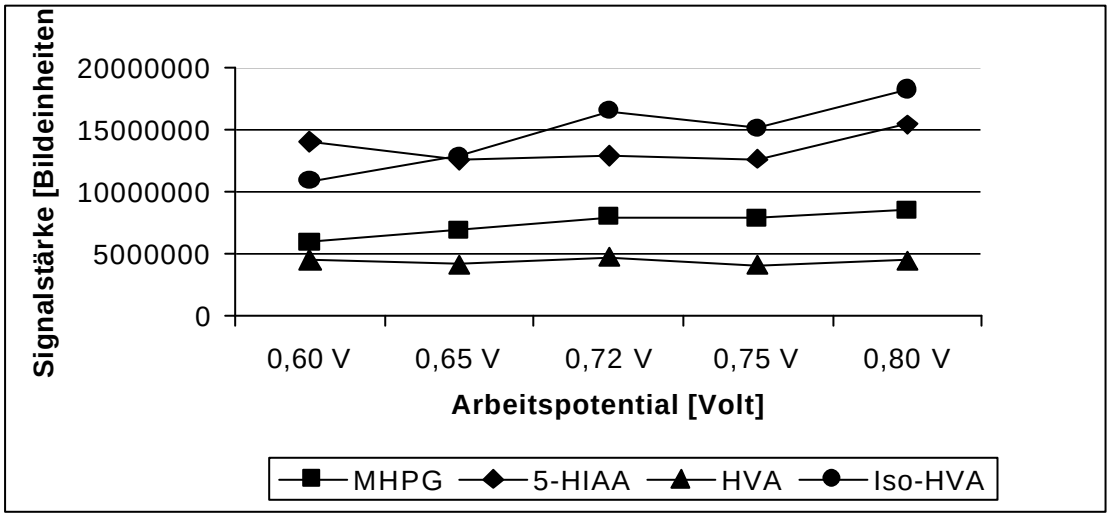
Beim Vergleich verschiedener Arbeitspotentiale zeigt sich eine Spannung von +0,72 V als am besten zur Bestimmung von MHPG, 5-HIAA, HVA und Iso-HVA geeignet.
Die Ergebnisse des Vergleichs sind in Tabelle 1 und Abbildung 5 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Daten für Voltammogramm

Potential	0,60 V	0,65 V	0,72 V	0,75 V	0,80 V
Signal von					
MHPG	5996810	6937769	**7999064**	7907711	8582959
5-HIAA	14053838	12609040	**12917817**	12695274	15452237
HVA	4599666	4194159	**4756703**	4133942	4536385
Iso-HVA	10893005	12853046	**16549842**	15157525	18294397

Unter dem jeweiligen Arbeitspotential ist die Höhe des entsprechenden Peaks in Bildeinheiten angegeben.

Abbildung 5:Voltammogramm



Aus der grafischen Darstellung ist der Verlauf der Peakhöhe bei jeweiligem Potential ersichtlich.

2.3.1.4 Test des Injektionsvolumens

Nach 18maliger Injektion von 100 µl Iso-HVA (500 ng/ml) in einer Serie ergibt sich ein Variationskoeffizient von 1,7 % (Tabelle 2).

Tabelle 2: Präzision des Injektors

Injektion	Iso-HVA [ng/ml]	Injektion	Iso-HVA[ng/ml]
1	499	**10**	510
2	480	**11**	510
3	501	**12**	510
4	507	**13**	510
5	513	**14**	509
6	515	**15**	509
7	512	**16**	501
8	513	**17**	495
9	512	**18**	494
	Mittelwert:	**506 ng/ml**	
	Standardabweichung:	**8,6 ng/ml**	
	Variationskoeffizient:	**1,7 %**	

Nach mehrfacher Injektion (1-18) wird aus den gemessenen Konzentrationen [ng/ml] Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient errechnet.

2.3.1.5 Verarbeitung des Liquors

Beim Vergleich von mit Perchlorsäure deproteiniertem und proteinhaltigem, nicht entproteiniertem Liquor zeigt sich eine Zunahme von 5-HIAA um 45 % und HVA um 33 %. Bei MHPG ist eine Abnahme um 18 % feststellbar. Beim internen Standard Iso-HVA ergibt sich ebenfalls eine Zunahme des Signals in Liquor mit Perchlorsäure gegenüber der Verdünnung in mobiler Phase (Tabelle 3).

Tabelle 3: Recovery bei Deproteinisierung des Liquors

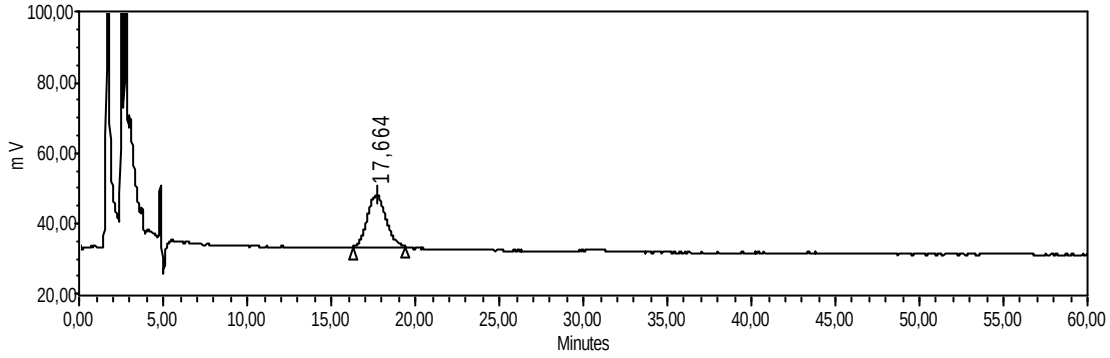
	Probenzusammensetzung	MHPG	5-HIAA	HVA	Iso-HVA
1	**P**	0	0	0	0
2	**P(512,5)+IS (20)**	0	0	0	59832
3	**L(500)+IS(20)+PCS(12,5)**	77288	138945	221278	63476
4	**L(500)+PCS(12,5)+IS(20)**	79988	140549	229948	63896
5	**L(500)+PCS(12,5)+P(20)**	81683	140936	232584	0
6	**L(500)+P(32,5)**	96705	96835	171333	0
7	**P**	0	0	11905	0
	Mittelwert 3-5	79653	140143	227936	
	Recovery	**82 %**	**145 %**	**133 %**	

Unter der Spalte Probenzusammensetzung sind die Bestandteile der Probenlösung mit Mengenangabe (in µl) aufgeführt: mobile Phase (P), Interner Standard Iso-HVA (IS), Liquor (L) und Perchlorsäure (PCS). Die Zahl in Klammern gibt das Volumen in µl an. Zur Berechnung der Recovery wird der Mittelwert der Proben 3 bis 5 ermittelt und gegen Probe 6 verrechnet. Die Meßsignale sind in Bildeinheiten angegeben.

2.3.1.6 Modifikation des Analyselaufs

Im Zuge einer Analysenreihe zeigt sich, daß Substanzen mit langer Retentionszeit Meßsignale der folgenden Probe stören (Abbildung 6).

Abbildung 6: Verschleppung



Durch Injektion von mobiler Phase nach einer Liquorprobe wird das Auswaschen einer Substanz mit einer Retentionszeit von 60 + 17,664 min sichtbar.

Aus diesem Grunde wird nach jeder Probenbestimmung ein kurzer Reinigungsschritt über 15 min mit einem Gemisch aus Acetonitril und H_2O im Verhältnis 1:1 durchgeführt.

Bei Doppelbestimmung ergibt sich eine Analysendauer von 90 min je Probe eines Patienten bei einer Analysendauer des Liquors von 30 min. Die Probenabfolge in einem Analysendurchlauf ist folgendermaßen:

1. Fraktion 1 des Gemisches aus Reinsubstanzen in mobiler Phase zur Kontrolle der Retentionszeiten, Dauer 30 min;
2. Fraktion 1 der Präzisionskontrolle aus dem Liquorpool, Dauer 30 min;
3. Reinigungsschritt mit Injektion von Acetonitril/H_2O, Dauer 15 min;
4. Fraktion 1 des Patientenliquors Nr.1, Dauer 30 min;
5. Reinigungsschritt mit Injektion von Acetonitril/H_2O, Dauer 15 min;
6. Fraktion 2 des Patientenliquors Nr.1, Dauer 30min;
7. Reinigungsschritt mit Injektion von Acetonitril/H_2O, Dauer 15 min;
8. Fraktion 1 des Patientenliquors Nr.2, Dauer 30 min;
9. Reinigungsschritt mit Injektion von Acetonitril/H_2O, Dauer 15 min;
10. Fraktion 2 des Patientenliquors Nr.2, Dauer 30 min;
11. Reinigungsschritt mit Injektion von Acetonitril/H_2O, Dauer 15 min; usw.
12. Fraktion 2 des Gemisches aus Reinsubstanzen in mobiler Phase zur Kontrolle der Retentionszeiten, Dauer 30 min;
13. Fraktion 2 der Präzisionskontrolle aus dem Liquorpool, Dauer 30 min;

2.3.2 Validierung der Methode

Zur Vergleichbarkeit mit anderen Methoden werden im folgenden Abschnitt wesentliche Validierungsparameter beschrieben. Da in der Literatur die Nomenklatur zum Teil uneinheitlich ist, erfolgt in jedem Punkt eine kurze Definition des jeweiligen Parameters.

2.3.2.1 Selektivität und Retentionszeiten

"Selektivität ist die Fähigkeit einer Methode, verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störung zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren." [56]

Zur Identifizierung der den einzelnen Substanzen zugehörigen Peaks und zur Bestimmung der Selektivität werden gekaufte Reinsubstanzen (siehe Anhang) in Konzentrationen von 240, 60, 15, 7,5 und 3,75 ng/ml erst in mobiler Phase und diese Mischung dann in einem Aliquot des Liquorpools gelöst. Zur Analyse wird die erforderliche Menge Liquor aufgetaut und entsprechend Punkt 2.2.8 verarbeitet. Zusätzlich wird ein Aliquot ohne Zusatz analysiert.

Durch den Vergleich der Retentionszeiten kann den einzelnen Peaks des Liquors die entsprechende Substanz zugeordnet werden.

Die Abstände der Spitzen und Basen der Peaks voneinander erlaubt eine Aussage über die Selektivität:

Die Peaks der Metaboliten sind sowohl im Bereich der Gipfel als auch der Basen in Konzentrationen von 240, 60, 15, 7,5, 3,75 und 0 ng/ml deutlich von benachbarten Peaks zu unterscheiden.

Dabei sind die Basen von 5-HIAA, HVA und Iso-HVA klar abgrenzbar, lediglich bei MHPG ist dies wegen des vorausgehenden Peaks nicht derartig eindeutig möglich.

Die Abbildungen 7 und 8 zeigen zwei Chromatogramme von Liquor des Pooles: einmal wurden 60 ng/ml jedes Metaboliten zugesetzt, die andere Fraktion wurde ohne Zusatz zum Vergleich analysiert.

Abbildung 7: Selektivität, Zusatz von jeweils 60 ng/ml Standardlösung

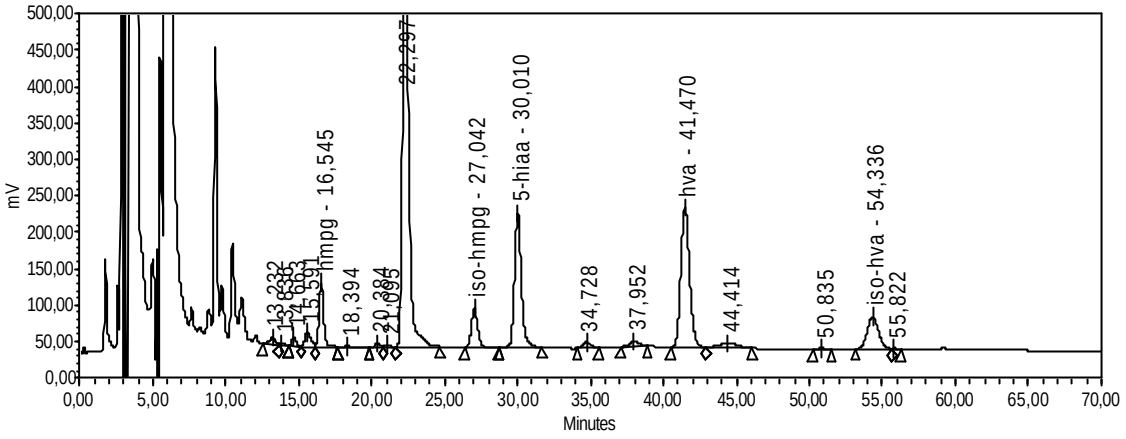


Abbildung 8: Selektivität ohne Zugabe von Standards

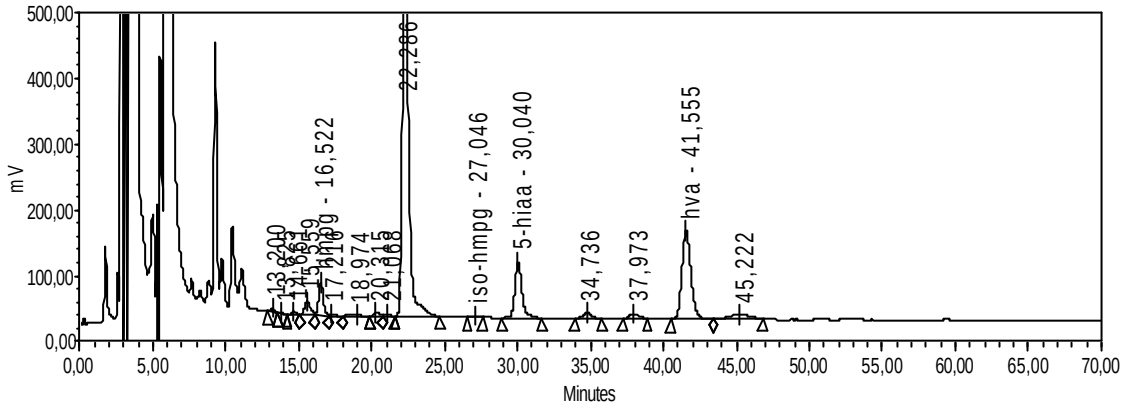


Abb. 7 und 8: Die Peaks sind mit der Bezeichnung der jeweils zugeordneten Substanz benannt: hmpg=MHPG, 5-hiaa=5-HIAA, hva=HVA und iso-hva=Iso-HVA.

Tabelle 4: Retentionszeiten in mobiler Phase und Liquor

mobile Phase	MHPG	5-HIAA	HVA	Iso-HVA
RT (MW)	13,4	25,4	34,0	43,8
STABW	0,2	0,6	1,0	1,3
Bereich	13,0-13,6	23,9-26,3	31,6-35,4	40,7-45,7
Liquor	**MHPG**	**5-HIAA**	**HVA**	**Iso-HVA**
RT (MW)	13,4	25,4	34,0	43,7
STABW	0,2	0,6	1,0	1,3
Bereich	13,0-13,6	23,9-26,4	31,6-35,5	40,7-45,7

Die Mittelwerte (MW) der Retentionszeiten (RT) sowie deren Standardabweichung (STABW) und Streuung (Bereich) in mobiler Phase und in Liquor sind dezimal in Minuten angegeben.

In Tabelle 4 sind die Mittelwerte der Retentionszeiten der Neurotransmittermetaboliten in mobiler Phase und Liquor aufgeführt, welche aus

den bei jedem Analyselauf zur Kontrolle der Retentionszeit mitgeführten Standardlösungen (in mobiler Phase) und Präzisionskontrollen (in Liquor) berechnet sind.

2.3.2.2 Wiederfindung (Recovery)

Die Wiederfindung gibt das Verhältnis von Mittelwert zum richtigen Wert eines Analyten in der Probe wieder [58].

Im Wiederfindungsversuch werden Standardlösungen in Konzentrationen von 7,5, 15, 60 und 240 ng/ml durch jeweiliges Verdünnen im Verhältnis 1 zu 1 Liquor aus dem Liquorpool zugegeben, viermal gemessen und daraus der Mittelwert errechnet (S1).
Als Nullwert dient eine Liquorprobe, der lediglich ein entsprechendes Volumen an mobiler Phase zugesetzt und zweimal bestimmt wird (S2). Die gleichen Standardkonzentrationen werden in mobiler Phase gelöst und zweimal gemessen (S3).
Die Wiederfindung (W) berechnet sich nach der Formel W= ((S1 - S2) / S3) x 100 und wird in Prozent angegeben [58].

Der Wiederfindungsversuch ergibt die in Tabelle 5 zusammengefaßten Ergebnisse.

Tabelle 5: Wiederfindung (Recovery) der Metaboliten

Konzentration [ng/ml]	MHPG	5-HIAA	HVA	Iso-HVA
7,5	105 %	102 %	98 %	102 %
15	107 %	100 %	101 %	103 %
60	116 %	104 %	105 %	102 %
240	120 %	106 %	104 %	100 %
Mittelwert	**112 %**	**103 %**	**102 %**	**102 %**
Standardabweichung	6 %	2 %	3 %	1 %

Die Tabelle führt die Wiederfindung in Prozent bei den jeweils gemessenen Konzentrationen (in ng/ml) an. Daraus werden Mittelwert und Standardabweichung errechnet.

2.3.2.3 Präzision

Präzision ist das Maß für die Streuung von Analysenergebnissen, angegeben u.a. in Standardabweichung (s) und Variationskoeffizient (VK) [54]. Für diese Methode werden zwei Präzisionsarten ermittelt:

Präzision in der Wiederholung

Als Maß für die Reproduzierbarkeit der Methode erfolgt die Bestimmung der Wiederholpräzision durch die Analyse von Portionen aus dem Liquorpool unter identischen Bedingungen [54] an insgesamt drei Tagen, woraus ein Mittelwert bestimmt wird.

Die Präzision in der Wiederholung ergibt die in Tabelle 6 aufgeführten Variationskoeffizienten. Unter den Werten von Tag 3 identifizierte der Dixon-Test bei der Bestimmung von MHPG einen Ausreißer, der in der Tabelle nicht gewertet wird. Ohne Korrektur beträgt an Tag 3 der VK 6,8 % und der Mittelwert der VK dadurch 4,5 %.

Tabelle 6: Präzision in der Wiederholung

Tag	n		MHPG	5-HIAA	HVA	Iso-HVA
1	3	**MW**	34,6	11,8	37,3	24,2
		STABW	0,7	0,1	0,3	0,1
		Bereich	33,9-35,6	11,6-11,9	36,9-37,6	24,0-24,3
		VK	2,1 %	1,1 %	0,8 %	0,5 %
2.1	3	**MW**	35,6	12,1	35,6	24,5
		STABW	1,4	0,2	0,5	0,4
		Bereich	34,2-37,5	11,8-12,2	35,1-36,2	24,1-25,0
		VK	3,9 %	1,4 %	1,3 %	1,5 %
2.2	3	**MW**	35,7	11,7	34,8	22,6
		STABW	0,6	0,2	0,2	0,3
		Bereich	35,0-36,5	11,5-11,8	34,5-35,0	22,3-22,9
		VK	1,8 %	1,4 %	0,6 %	1,1 %
3	5	**MW**	32,9	11,3	34,4	22,2
		STABW	2,0	0,4	0,5	0,3
		Bereich	29,0-34,9	10,9-11,9	33,8-35,2	21,8-22,7
		VK	6,2 %	3,1 %	1,3 %	1,2 %
Mittelwerte der VK			**3,5 %**	**1,7 %**	**1,0 %**	**1,1 %**

An drei Tagen werden Aliquots des gepoolten Liquors in bestimmten Wiederholungen (n) analysiert. Die Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (STABW), die Streuung (Bereich) und Variationskoeffizienten (VK) sowie die Mittelwerte der jeweiligen Variationskoeffizienten werden errechnet. Die Konzentrationen der Metaboliten sind in ng/ml angegeben. An Tag 2 werden zwei Fraktionen des Liquorpools nacheinander analysiert und sind deshalb separat aufgeführt (2.1 und 2.2).

Präzision von Tag zu Tag

Um die Qualität der Methode bestimmen und kontrollieren zu können, wird die Präzision von Tag zu Tag [54] in einem Vorlauf festgestellt, indem Proben aus dem Liquorpool über vier Tage analysiert werden.

Abbildung 9: Präzision von Tag zu Tag - MHPG

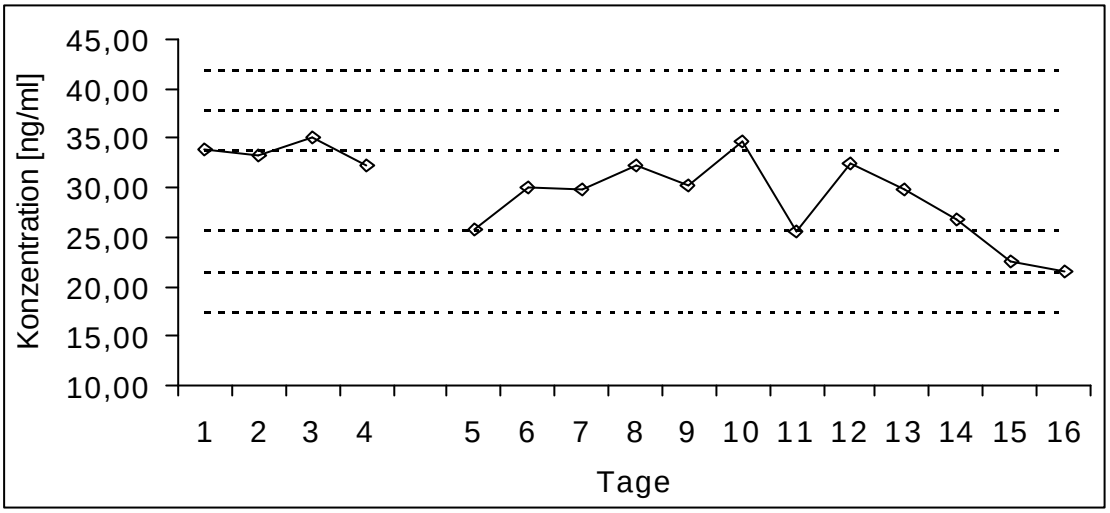


Abbildung 10: Präzision von Tag zu Tag - 5-HIAA

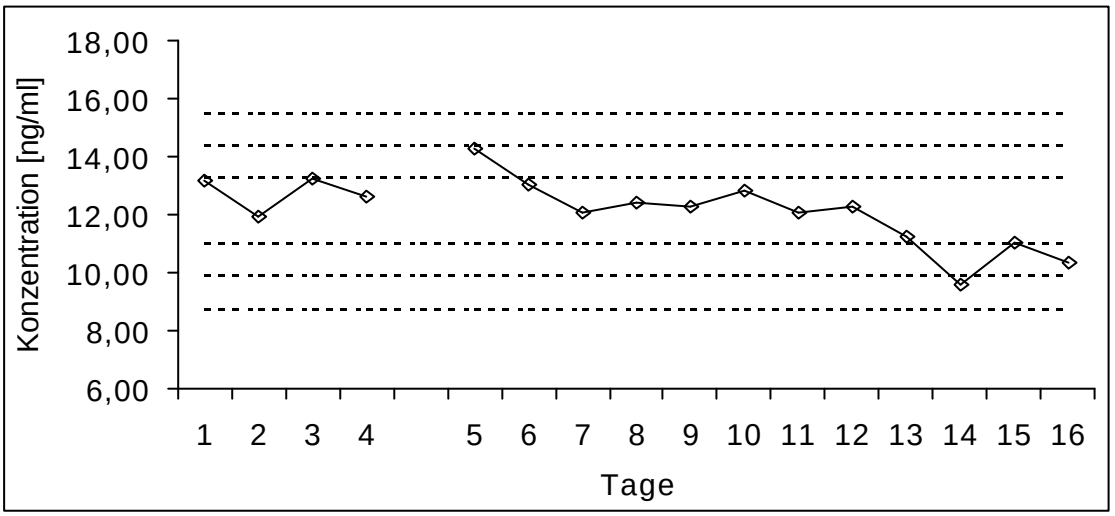


Abbildung 11: Präzision von Tag zu Tag - HVA

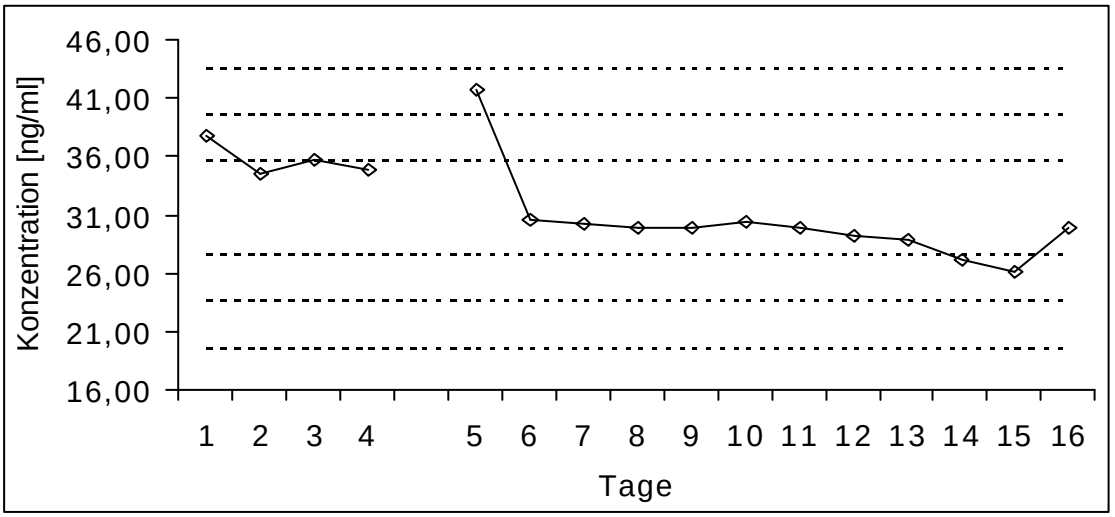


Abbildung 12: Präzision von Tag zu Tag - Iso-HVA

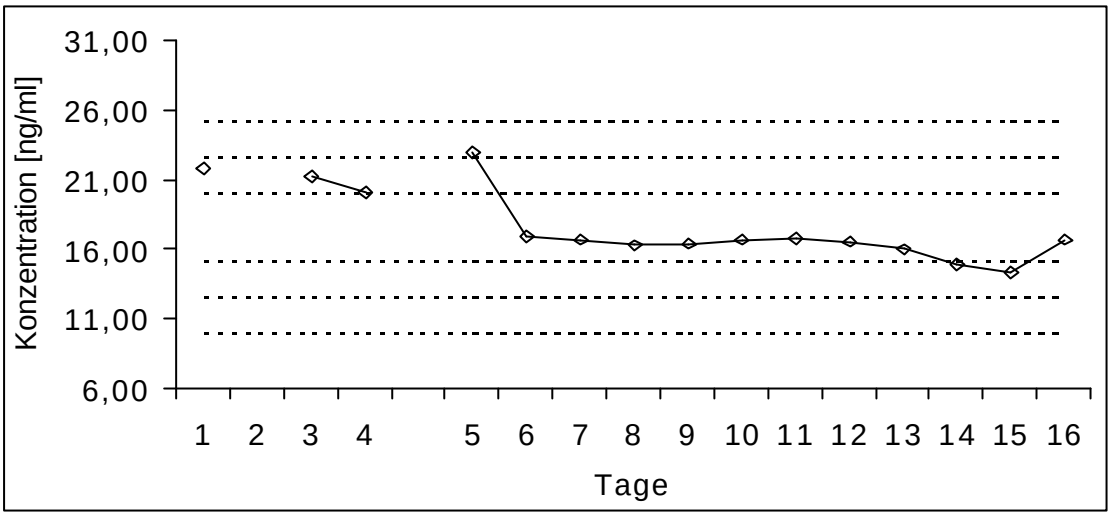


Abb. 9-12: Die Meßwerte der ersten vier Tage entstammen dem Vorlauf, die restlichen aus den Präzisionskontrollen der zwölf Analysenläufe.

Tabelle 7: Präzision von Tag zu Tag und Trendtest nach Neumann

Tag	n	MHPG	5-HIAA	HVA	Iso-HVA
1	3	34,0	13,2	37,8	21,9
2	3	33,3	11,9	34,5	
3	6	35,0	13,2	35,6	21,3
4	5	32,2	12,6	34,8	20,1
5	2	25,9	14,3	41,7	23,0
6	2	30,1	13,0	30,5	17,0
7	2	29,7	12,1	30,3	16,7
8	2	32,3	12,4	29,9	16,3
9	2	30,3	12,3	29,9	16,4
10	2	34,6	12,9	30,4	16,8
11	2	25,6	12,1	29,8	16,9
12	2	32,4	12,3	29,2	16,6
13	2	29,8	11,3	28,9	16,0
14	2	26,7	9,6	27,1	14,9
15	2	22,6	11,04	26,1	14,3
16	2	21,5	10,3	29,8	16,7
Mittelwert		29,8	12,2	31,6	17,7
Standardabweichung		4,1	1,1	4,0	2,5
Variationskoeffizient		**13,6 %**	**9,3 %**	**12,6 %**	**14,3 %**
Q (n=16, Q=1,2272)		1,01	1,21	1,25	1,76
Q (n=12, Q=1,1276)		0,85	1,73	1,12	1,12

An 16 Tagen (1-4: Vorlauf, 5-16 Präzisionskontrollen der Analyseläufe) werden die Mittelwerte der Bestimmungen (n= Anzahl je Tag) in ng/ml berechnet und aus diesen Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient.
Q gibt die Ergebnisse des Trendtests nach Neumann an. Bei einer Wahrscheinlichkeit (P) von 95 % liegt der Schwellenwert, über dem ein Trend vorliegt, für 16 Werte (n) bei 1,2272 und für 12 Werte bei 1,1276.

Die Abbildungen 9 bis 12 stellen den Verlauf der Präzision von Tag zu Tag als Kurve sowie die Bereiche der positiven wie negativen 1fachen (1s), 2fachen (2s) und 3fachen (3s) Standardabweichung dar.

Zusätzlich sind in die Kurven die Meßwerte der bei jedem Analysenlauf mitgeführten Präzisionskontrollen zur Darstellung des Verlaufs mit aufgenommen (Tag 5-16).

Die Meßwerte aller vier Substanzen liegen innerhalb der dreifachen (3s-Grenze), HMPG innerhalb der zweifachen Standardabweichung (2s-Grenze). Aus dem Verlauf der Kurven ist ersichtlich, daß während des Vorlaufs die Meßwerte der Metaboliten höher liegen als während der eigentlichen Analysenläufe.

Der Trendtest nach Neumann ergibt über 16 Tage bei HVA und Iso-HVA sowie über 12 Tage (ohne Berücksichtigung des Vorlaufs) bei 5-HIAA einen Trend. Ohne Trend ist die Bestimmung von MHPG (Tabelle 7).

2.3.2.4 Kalibrationskurven und Linearität

Kalibrierfunktion und Quantifizierung

Der Verlauf von Kalibrationskurven -deren Linearität- gibt die Fähigkeit einer Methode an, innerhalb eines gegebenen Konzentrationsbereiches Ergebnisse zu liefern, die der Konzentration des Analyten direkt proportional sind [57].

Die Linearität wird durch visuellen Test sowie Berechnung des Korrelationskoeffizienten r und des Bestimmtheitsmaßes r^2 geprüft.
Um den Verlauf der Kalibrationskurve in verschiedenen Konzentrationsbereichen und einen eventuell vorhandenen Einfluß der Matrix beurteilen zu können, werden Kalibrationsstandards einmal in Poolliquor und einmal in mobiler Phase bestimmt.

Hierzu werden Standards mit einer elektronischen Mikrowaage eingewogen und jeweils in gekühlter 0,1 molarer Salzsäure als Stabilisator in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Die einzelnen Stammlösungen werden in Fraktionen zu 100 µl bei -80 °C eingelagert.

Zum Erstellen von Kalibrationskurven werden die jeweiligen Standards auf Konzentrationen von 240, 60, 15, 7,5 und 3,75 ng/ml verdünnt und je zweimal bestimmt.

Die Quantifizierung der Metaboliten erfolgt durch das Erstellen einer Kalibrationskurve mittels Standards in mobiler Phase, da Liquor ohne die zu bestimmenden Metaboliten nicht verfügbar ist und eine Kalibration in Liquor keine Aussage über die Konzentrationsbereiche zwischen 0 ng/ml und der bereits im Liquorpool vorhandenen Konzentration erlaubt. Die Quantifizierung aller darauffolgenden Meßwerte geschieht dann durch den Vergleich der jeweiligen Höhe der Peaks mit denjenigen in den entsprechenden Standardkurven.
Aus dem Verlauf der Kurven lassen sich ferner Aussagen über die Empfindlichkeit und den Arbeitsbereich der Methode machen.

Aus den Meßsignalen der paarigen Kalibrationslösungen erstellt die Analysensoftware lineare Kalibrationskurven für jede Testsubstanz, indem von den Mittelwerten ausgehend eine Durchschnittsgerade durch diese Punkte errechnet wird.

Die verwendeten Daten der Kalibration in Liquor sind in Tabelle 8, die jeweiligen Kalibrationskurven in Abbildung 13 bis 16 aufgeführt.
Entsprechendes gilt für die Kalibration in mobiler Phase (Tabelle 9 und Abbildungen 17 bis 20).

Tabelle 8: Kalibrationsdaten bei Kalibration in Liquor

	MHPG	ng/ml	5-HIAA	ng/ml	HVA	ng/ml	Iso-HVA	ng/ml
0	51625	0,8	85008	0,2	133795	0,0		
	50955	0,6	85632	0,1	134144	0,0		
3,75	59868	3,9	109319	3,5	148850	3,3	11450	3,1
	59609	3,8	111000	3,7	149101	3,4	11156	3,0
7,50	68238	7,0	134606	7,2	163793	7,2	22268	6,8
	69504	7,5	136397	7,5	164030	7,2	22616	7,0
15	88424	14,5	184872	14,8	194906	15,2	45039	14,8
	89110	14,8	184386	14,7	192778	14,6	44694	14,7
60	209269	59,4	494221	61,1	375545	61,7	180853	62,1
	211093	60,1	491816	60,7	375923	61,8	180638	62,1
240	697249	240,6	1700906	241,8	1081984	243,8	703665	244,5
	694822	239,7	1673539	237,7	1048922	235,3	675367	234,6
R	0,99999		0,99994		0,99975		0,99963	
R^2	0,99997		0,99988		0,99949		0,99926	
m	**2693**		**6877**		**4099**		**3162**	

Tabelle 9: Kalibrationsdaten bei Kalibration in mobiler Phase

	MHPG	ng/ml	5-HIAA	ng/ml	HVA	ng/ml	Iso-HVA	ng/ml
5	9347	5,0	34257	5,1	18142	4,9	14235	5,0
	8846	4,7	33550	5,0	18048	4,9	14392	5,1
20	35621	20,5	132531	20,1	70340	20,2	55319	20,0
	34579	19,8	130763	19,9	69563	20,0	55077	19,9
160	274057	160,5	1046983	160,2	547346	160,3	438592	160,1
	272365	159,5	1044716	159,8	545407	159,7	438302	160,0
R	0,99997		0,99994		0,99975		0,99963	
R^2	0,99999		0,99988		0,99949		0,99926	
m	**1773**		**6628**		**3530**		**2784**	

Tabelle 8 und 9: Die Meßsignale bei Kalibrationskonzentrationen von 0, 3,75, 7,5, 15, 60 und 240 bzw. 5, 20 und 160 ng/ml sind in Höheneinheiten angegeben, die aus der Kalibrationskurve errechneten Konzentrationen in ng/ml. Desweiteren ist die Steigung der Kalibrationsgeraden (m) in Höheneinheiten/ 1 ng/ml Konzentration sowie der Korrelationskoeffizient (R) und R^2 angegeben.

Abbildung 13: Kalibrationskurve MHPG in Liquor

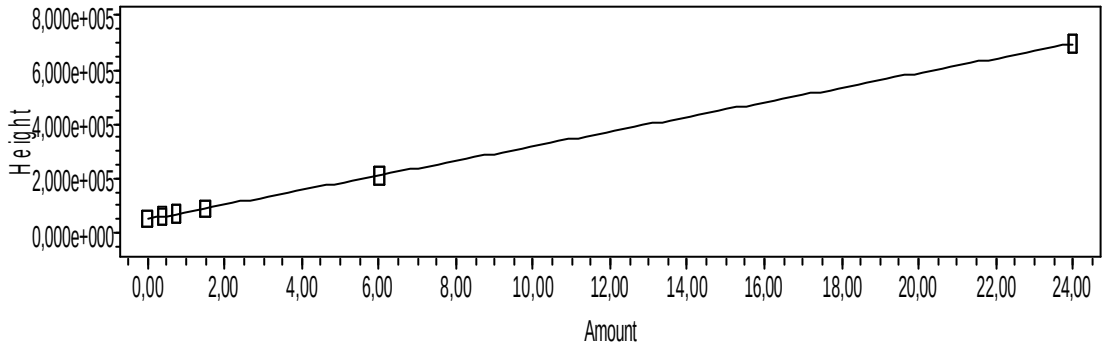


Abbildung 14: Kalibrationskurve 5-HIAA in Liquor

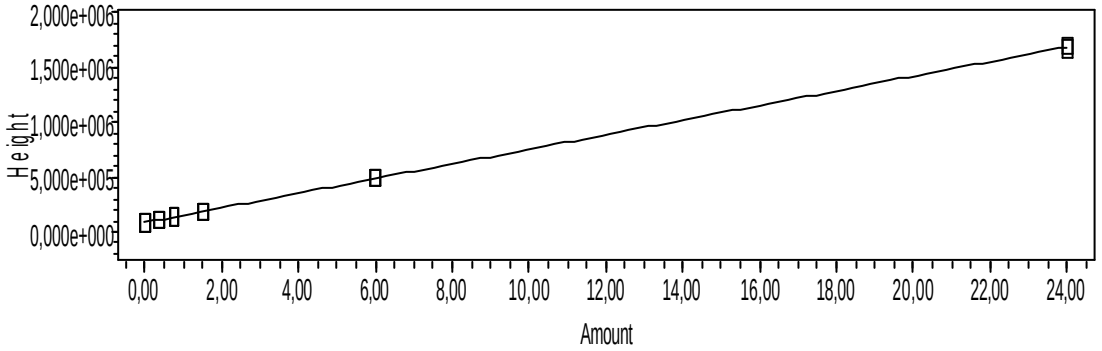


Abbildung 15: Kalibrationskurve HVA in Liquor

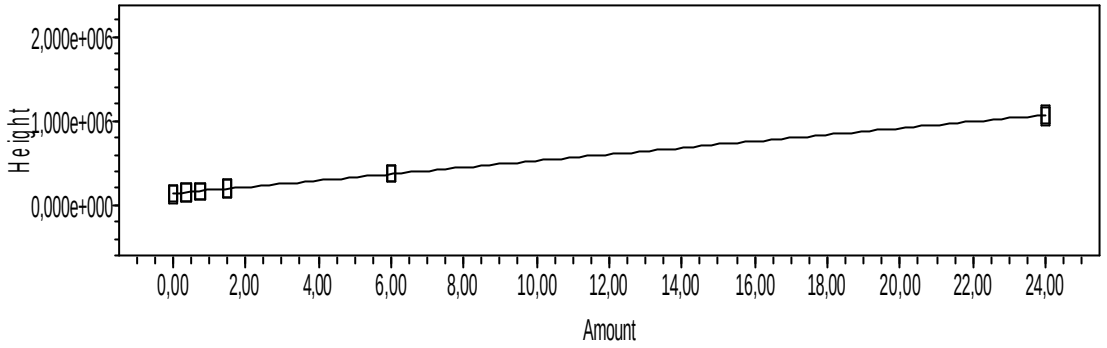
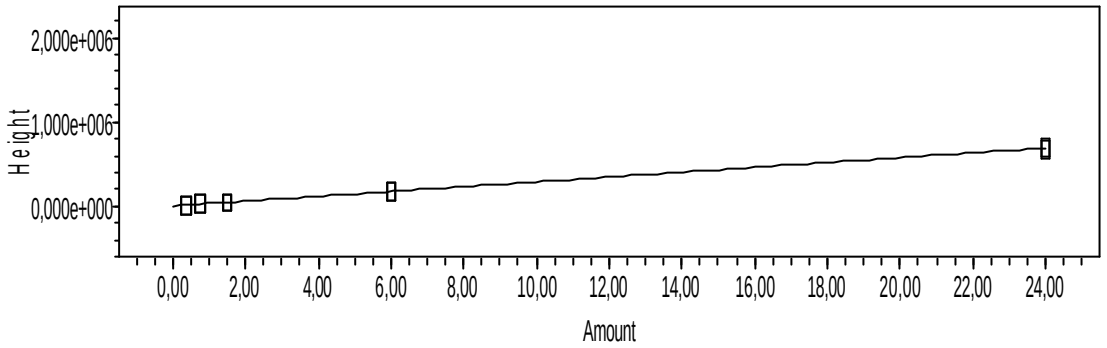


Abbildung 16: Kalibrationskurve Iso-HVA in Liquor



Für die Kalibration in mobiler Phase werden nur noch drei Konzentrationen verwendet: 160, 20 und 5 ng/ml.

Abbildung 17: Kalibrationskurve MHPG in mobiler Phase

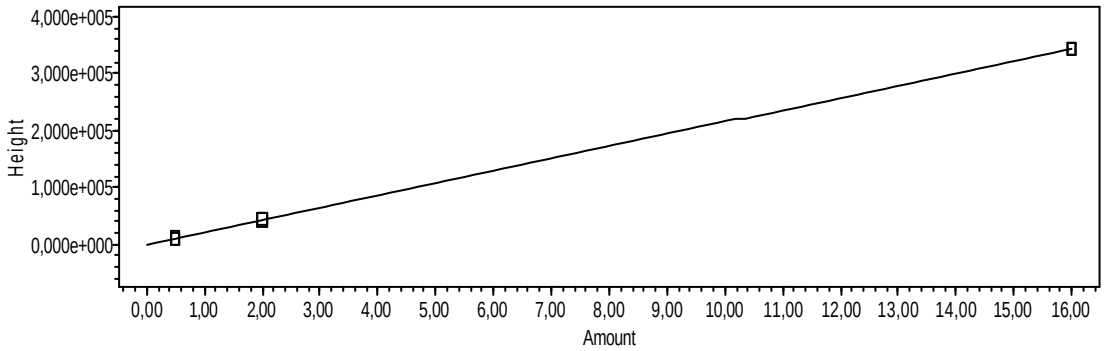


Abbildung 18: Kalibrationskurve 5-HIAA in mobiler Phase

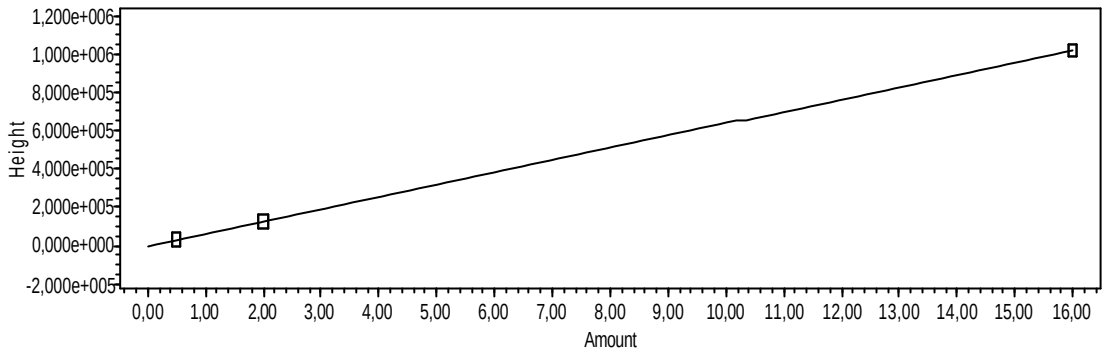


Abbildung 19: Kalibrationskurve HVA in mobiler Phase

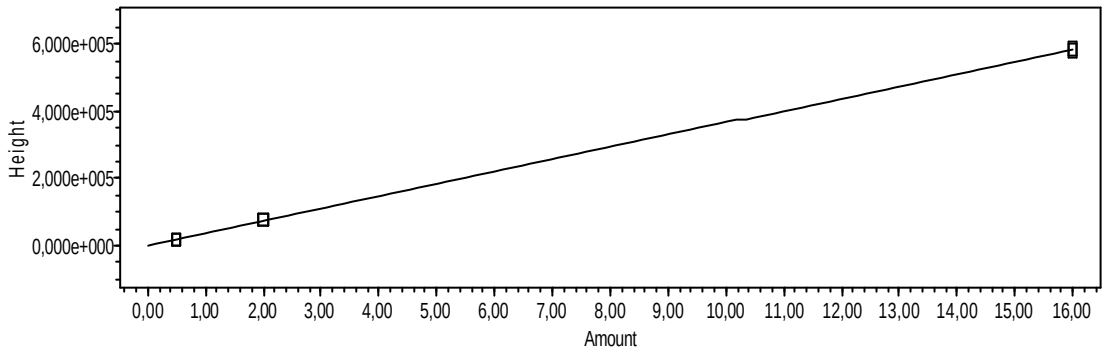


Abbildung 20: Kalibrationskurve Iso-HVA in mobiler Phase

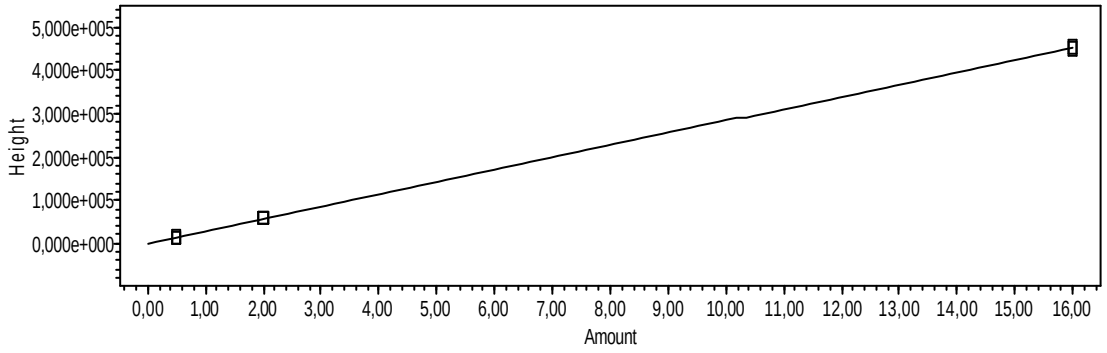


Abbildung 13-20: Die Einheiten der Achsen sind in Höheneinheiten (Height) und in ng/100µl (Amount) angegeben.

2.3.2.5 Richtigkeit

"Richtigkeit ist das Maß der Übereinstimmung zwischen dem ermittelten Wert und einem als richtig angesehenem Wert." [55]

Sie wird nach der Additionsmethode bestimmt, indem zu einer Liquorprobe aus dem Pool Standardlösung gegeben (=S1), zu einer Liquorprobe aus dem Pool die gleiche Menge an mobiler Phase wie in S1 an Standardlösung (=S2) und schließlich zu einem der Liquorprobe entsprechenden Volumen mobiler Phase die gleiche Menge Standardlösung wie in S1 gegeben wird.
Aus der Formel R= ((S1 - S2) / S3) x 100 läßt sich die Richtigkeit (R) in Prozent angegeben [55].
Die Standardlösung wird in Konzentrationen von 3,75, 7,5, 15, 60 und 240 ng/ml zugegeben.

Die Richtigkeit beträgt im Mittel bei Iso-HVA 103 %, bei HVA 105 %, bei 5-HIAA 106 % und bei MHPG 114 % (Tabelle 10).

Tabelle 10: Richtigkeit

Konzentration [ng/ml]	MHPG	5-HIAA	HVA	Iso-HVA
3,75	104 %	105 %	106 %	104 %
7,5	108 %	106 %	106 %	104 %
15	115 %	105 %	106 %	103 %
60	122 %	108 %	107 %	104 %
240	124 %	106 %	103 %	99 %
Mittelwert	**114 %**	**106 %**	**105 %**	**103 %**
Standardabweichung	8 %	1 %	1 %	2 %

Nach Bilden der Differenz aus dem Meßwert der angegeben Konzentrationen in Liquor und dem Leerwert (S1-S2) wird der Quotient mit dem Meßwert der gleichen Konzentration in mobiler Phase (S3) in Prozent ausgedrückt. Bei allen Messungen erfolgt Doppelbestimmung und die Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung.

2.3.2.6 Nachweisgrenzen

Die Nachweisgrenze ist die kleinste nachweisbare Menge eines Analyten in einer Probe [59].

Im Falle der HPLC ist dies diejenige Konzentration, bei welcher der Substanzpeak noch deutlich höher als das Hintergrundrauschen der Basislinie ist. Für diese Methode wird ein minimales Verhältnis von 3 zu 1 zwischen Peak und Grundrauschen postuliert [59]. Zur Ermittlung des

Grundrauschens wird mindestens die zehnfache Breite der Peakbasis beobachtet [59].
Zum Bestimmen der Nachweisgrenzen wird eine Verdünnungsreihe eines Aliquots des Liquorpools angelegt, indem das Aliquot in mehreren Schritten im Verhältnis 1:1 mit mobiler Phase verdünnt wird. Aus den jeweiligen Schritten werden die Konzentrationen von MHPG, 5-HIAA, HVA und Iso-HVA durch Doppelbestimmung ermittelt.

Durch die Verdünnung von externen Standards in Liquor ergeben sich die in Tabelle 11 gezeigten unteren Nachweisgrenzen, wobei ein Verhältnis von mindestens 3:1 zwischen Substanzpeak und Hintergrundrauschen für eine zuverlässige Bestimmung gefordert wird.

Tabelle 11: Nachweisgrenzen

Verdünnung	MHPG	5-HIAA	HVA	Iso-HVA
1 : 32	**1,1**	**0,8**	**1,3**	0,0
1: 16	2,1	1,4	3,0	**1,0**
1 : 8	4,0	2,6	6,4	2,4
1 : 4	7,0	5,1	13,0	4,8
1	27,2	19,7	54,0	20,7

Die Konzentrationen sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen und in ng/ml angegeben. Der Meßwert an der Nachweisgrenze ist fett hervorgehoben.

Abbildung 21 und 22 zeigen zur Ermittlung verwendete Chromatogramme.

Abbildung 21: untere Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Verdünnung 1:16

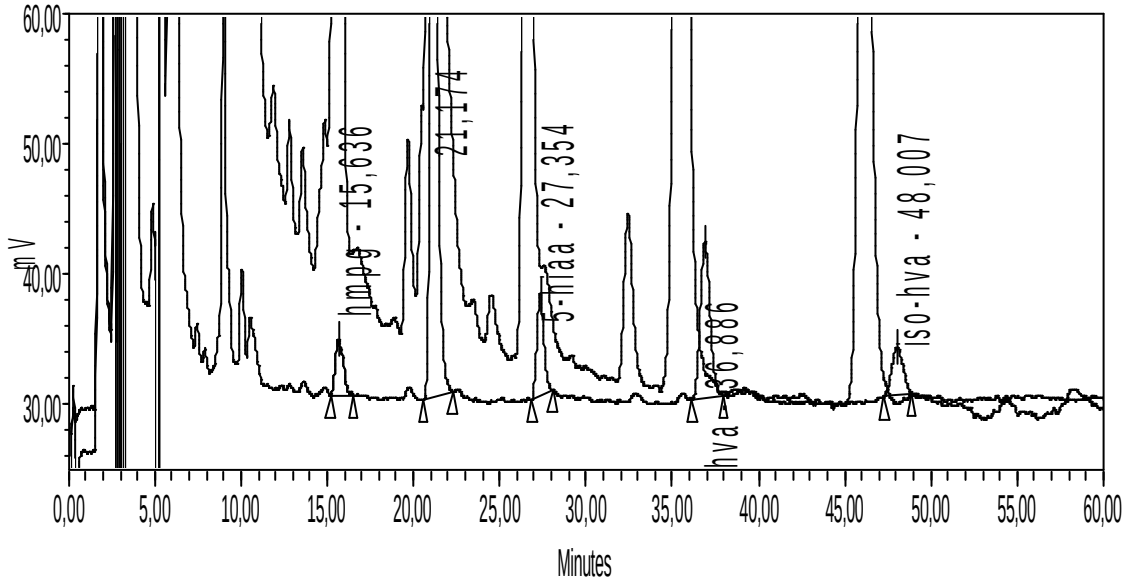


Abbildung 22: untere Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Verdünnung 1:32

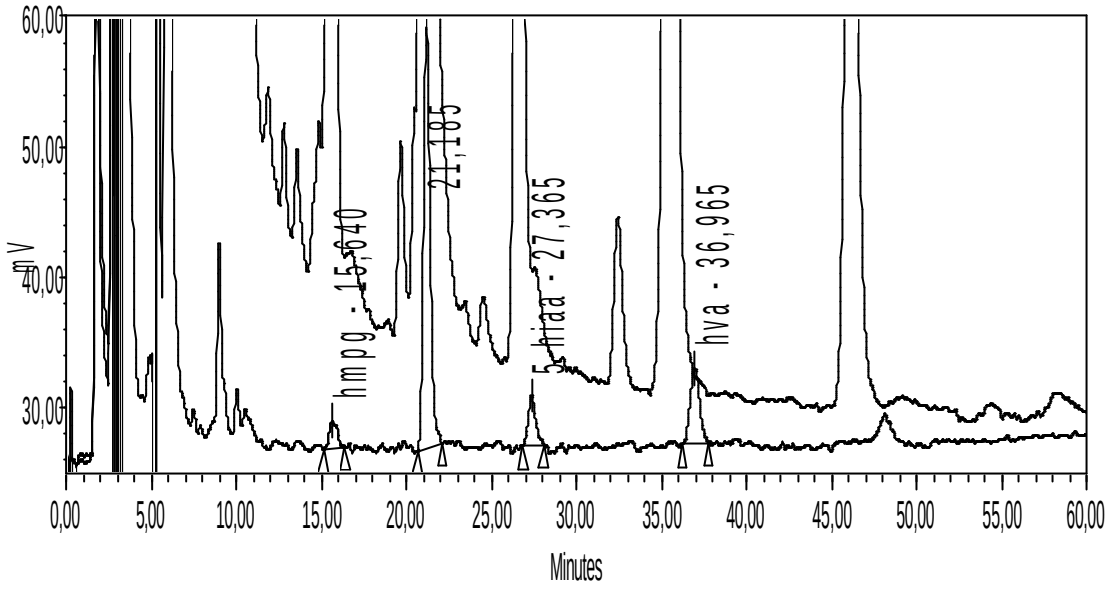


Abbildung 21 und 22 zeigen jeweils einen Verdünnungsschritt bei Feststellung der unteren Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze. Darüber ist zum Vergleich des Grundrauschens ein Chromatogramm von Liquor aus dem Pool mit zugesetzter Iso-HVA abgebildet.

Bei der Ermittlung der Nachweisgrenzen werden Standards in Liquor verdünnt verwendet. Um die dadurch beeinflußte Richtigkeit (siehe Tabelle 10) zu berücksichtigen, werden die Werte aus Tabelle 11 korrigiert (Tabelle 12).

Tabelle 12: Nachweisgrenzen unter Berücksichtigung der Richtigkeit

Verdünnung	MHPG	5-HIAA	HVA	Iso-HVA
1 : 32	**1,1**	**0,7**	**1,2**	0,0
1: 16	2,0	1,3	2,8	**1,0**
1 : 8	3,8	2,5	6,0	2,3
1 : 4	6,7	4,7	12,3	4,6
1	26,2	18,8	50,9	19,9

Die Konzentrationen sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen und in ng/ml angegeben. Der Meßwert an der Nachweisgrenze ist fett hervorgehoben.

2.3.2.7 Bestimmungsgrenzen

Die kleinste quantifizierbare Menge eines Analyten in einer Probe wird als Grenze der Bestimmbarkeit bezeichnet. Oft wird dazu die dreifache Nachweisgrenze verwendet [59].

Auch für diese Methode wird dieses Vorgehen gewählt und die Bestimmungsgrenze bei einem Verhältnis von 9 : 1 zwischen Peak und Grundrauschen festgesetzt [59]. Das Grundrauschen wird hier ebenfalls durch die Berücksichtigung mindestens der zehnfachen Breite der Peakbasis bestimmt.
Zur Ermittlung wird die gleich Verdünnungsreihe wie bei der Bestimmung der Nachweisgrenze (Tabelle 13) verwendet.

Tabelle 13: untere Bestimmungsgrenzen

Verdünnung	MHPG	5-HIAA	HVA	Iso-HVA
1 : 32	1,1	**0,8**	**1,3**	0,0
1: 16	**2,1**	1,4	3,0	**1,0**
1 : 8	4,0	2,6	6,4	2,4
1 : 4	7,0	5,1	13,0	4,8
1	27,2	19,7	54,0	20,7

Die Konzentrationen sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen und in ng/ml angegeben. Der Meßwert an der unteren Bestimmungsgrenze ist fett hervorgehoben.

Auch bei der Ermittlung der Nachweisgrenzen werden Standards in Liquor verdünnt verwendet. Um die dadurch beeinflußte Richtigkeit auch hier zu berücksichtigen, werden die Werte aus Tabelle 13 ebenfalls korrigiert (Tabelle 14).

Tabelle 14: untere Bestimmungsgrenzen in Berücksichtigung der Richtigkeit

Verdünnung	MHPG	5-HIAA	HVA	Iso-HVA
1 : 32	1,1	**0,7**	**1,2**	0,0
1: 16	**2,0**	1,3	2,8	**1,0**
1 : 8	3,8	2,5	6,0	2,3
1 : 4	6,7	4,9	12,3	4,6
1	26,2	18,8	50,9	19,9

Die Konzentrationen sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen und in ng/ml angegeben. Der Meßwert an der Nachweisgrenze ist fett hervorgehoben.

2.3.2.8 Arbeitsbereich

Der Arbeitsbereich einer Methode bezeichnet denjenigen Konzentrationsbereich eines Analyten in einer Probe, welcher mit einem akzeptablen Maß an Präzision, Richtigkeit und Linearität bestimmt werden kann. Empfohlen wird ein Bereich von 80 - 120 Prozent der Zielkonzentration [53].
Stamm, Büttner et al. beziehen noch die Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen mit ein [103].

In der Literatur wird über folgende Konzentrationen (Mittelwert ± Standardabweichung), z.T. von nmol/l in ng/ml umgerechnet, berichtet:

MHPG: 10 ± 2 ng/ml [34]
36 ± 5 ng/ml [71]
9 ± 2 ng/ml [16]
3,3 ± 0,3 - 10,7 ± 0,4 ng/ml [98]

5-HIAA: 36 ± 3 ng/ml [34]
29 ± 2 ng/ml [71]
24 ± 10 ng/ml [16]
22,2 ± 0,2 - 118,0 ± 3,1 ng/ml [98]

HVA: 35 ± 4 ng/ml [34]
47 ± 2 ng/ml [71]
46 ± 20 ng/ml [16]
37,5 ± 2,6 - 187,9 ± 7,4 ng/ml [98]

Aus diesen sehr breit gestreuten zu erwartenden Zielkonzentrationen ergeben sich bei jeweils vorgeschlagenen 80 bis 120 Prozent Arbeitsbereiche von etwa 2,4 - 49,2 ng/ml für MHPG, 17,6 - 145,3 ng/ml für 5-HIAA und 24,8 - 234,4 ng/ml für HVA.

Bei der Festlegung des Arbeits- oder Meßbereiches werden der Verlauf der Kalibrationskurve, die Präzision sowie die Richtigkeit und Nachweisgrenze bei verschiedenen Konzentrationen berücksichtigt:

Der Verlauf der Kalibrationskurven ist von 3,75 bis 240 ng/ml linear.

Zunächst wird in diesem Bereich die Richtigkeit in den jeweiligen Konzentrationen betrachtet. Sie beträgt für MHPG, 5-HIAA, HVA und Iso-HVA bei einer Konzentration von 3,75 ng/ml 104 %, 105%, 106% und 104% sowie bei 240 ng/ml 124 %, 106 %, 103 % und 99 %.

Anschließend werden die Variationskoeffizienten der Wiederholpräzision von 3,5 % (MHPG), 1,7 % (5-HIAA), 1,0 % (HVA) und 1,1 % (Iso-HVA) und der Präzision von Tag zu Tag von 13,6 % (MHPG), 9,3 % (5-HIAA), 12,6 % (HVA) und 14,3 % (Iso-HVA) angerechnet, welche sich bei Konzentrationen von 32 (MHPG), 12 (5-HIAA), 37 (HVA) und 24 ng/ml (Iso-HVA) sowie bei 30 (MHPG), 12 (5-HIAA), 32 (HVA) und 18 ng/ml (Iso-HVA) ergeben und auch für andere Konzentrationen angenommen werden.
Es ergeben sich daraus die in Tabelle 15 zusammengefaßten Arbeitsbereiche.

Tabelle 15: Arbeitsbereiche

	Arbeitsbereiche (in ng/ml)
MHPG	2,7 - 247,5
5-HIAA	3,2 - 251,7
HVA	3,1 - 259,9
Iso-HVA	3,1 - 269,3

Alle errechneten Arbeitsbereiche liegen über den jeweiligen unteren Bestimmungsgrenzen und decken die entsprechend der Literatur zu erwartenden Konzentrationsbereiche bei weitem ab. Lediglich bei MHPG wird die empfohlene 80-Prozentgrenze um 0,3 ng/ml nicht erreicht.

3 Diskussion der Ergebnisse der Methodenetablierung

Die Beurteilung der Methodik ist essentiell für die spätere Diskussion der durch diese erhaltenen Meßergebnisse, da methodische Fehler unter Umständen die Auswertung verfälschen oder gar unmöglich machen können. Aus diesem Grund wird zunächst auf physikalisch-chemische Parameter, anschließend auf die Validierung der Methode eingegangen.

3.1 Diskussion der physikalisch-chemischen Parameter

Während der Etablierung der Methode wurden verschiedene Änderungen und Anpassungen erforderlich.

Arbeitspotential

Die Wahl eines Arbeitspotentials von +0,72 V zur Bestimmung von MHPG, 5-HIAA, HVA und Iso-HVA erfolgt aufgrund zweier Gesichtspunkte. Einerseits ist die Spannung niedrig genug für eine gute Selektivität, ohne durch die Oxidation von anderen Substanzen Störungen zu verursachen, andererseits erlaubt die Stärke der durch dieses Potential gewonnenen Signale noch eine zuverlässige Messung [45].

pH-Wert der mobilen Phase

Die Anpassung der mobilen Phase durch Änderung des pH-Wertes von 5,0 auf 4,5 ist notwendig, um die Retentionszeit (RT) der sauren Metaboliten 5-HIAA und HVA zu ändern, dadurch den Abstand zu Peaks interferierender Substanzen zu vergrößern und somit ein Optimum an Auflösung zu schaffen. Die RT von MHPG ist durch diese Modifikation nicht betroffen.

Test des Injektionsvolumens

Der Variationskoeffizient von 1,7 % des Injektors für dieses System liegt im Rahmen des zu Erwartenden, da geringe Schwankungen technisch bedingt sind wie beispielsweise auch bei den in dieser Arbeit verwendeten Pipetten. Die Abweichungen liegen laut Hersteller [31] maximal bei wenigen Prozent.

Verarbeitung des Liquors

Durch Zugabe von Perchlorsäure wird die Richtigkeit der Methode z.T. stark beeinflußt. Eine mögliche Ursache für die geringe Recovery von MHPG ist die chemische Veränderung der Substanz. Perchlorsäure ist eine der stärksten Säuren und kann durch ihr hohes Oxidationspotential [46] funktionelle Gruppen verändern, die für die Identifikation mittels HPLC wesentlich sind, d.h. die Retentionszeit wird durch Änderungen am Molekül maßgeblich verändert und macht die Quantifizierung dadurch unmöglich. Diese Reaktion ist auch bei 5-HIAA und HVA möglich, würde jedoch die Signalstärke ebenfalls reduzieren. Der Zusatz von Perchlorsäure und das dadurch beabsichtigte Ausfällen von Proteinen kann allerdings auch zum Auseinanderbrechen der Proteinstruktur und zur Freisetzung von Aminosäuren und deren Derivaten führen. Wenn diese Bruchstücke sehr ähnliche molekulare Strukturen wie 5-HIAA und HVA besitzen und somit sehr ähnliche Retentionszeiten, kann es zur Überlagerung dieser Peaks und zur Verstärkung des Meßsignals kommen.
Da diese Umstände jedoch für alle verwendeten Proben durch die gleiche Verarbeitung zutreffen und dadurch ein Vergleich der gebildeten Gruppen möglich bleibt, wurde das Verfahren beibehalten.
Die Zunahme des internen Standards Iso-HVA hat insofern kein Gewicht, da Iso-HVA lediglich zur Kontrolle der Richtigkeit bei der Probenanalyse mitgeführt werden soll.
Eine Aussage über Absolutwerte kann bei diesen Gegebenheiten nicht mehr gemacht werden.

Modifikation des Analyselaufs

Im Zuge einer Analysenreihe zeigt sich, daß Substanzen mit langer Retentionszeit Meßsignale der folgenden Probe stören (Abbildung 6).
Aus diesem Grunde wird nach jeder Probenbestimmung ein kurzer Reinigungsschritt über 15 min mit einem Gemisch aus Acetonitril und H_2O im Verhältnis 1:1 durchgeführt, um unpolare und polare Substanzen aus der Trennsäule auszuwaschen.

3.2 Diskussion der Validierung

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse diskutiert, die im Rahmen der Validierung gewonnen wurden.

Selektivität und Retentionszeiten

Die Selektivität der Methode zur Bestimmung von 5-HIAA und HVA ist sehr gut. Bei MHPG ist sie nicht ganz so gut durch den geringeren Abstand zu benachbarten Peaks.
Die Retentionszeiten zeigen nur sehr kleine Schwankungen, wobei sie, bedingt durch die größere Verzögerung bei Substanzen mit längerer Retentionszeit, bei HVA und Iso-HVA am größten sind. Unterschiede zwischen mobiler Phase und Liquor sind so gut wie nicht vorhanden.
Die Selektivität der Methode und die unbedeutenden Schwankungen der Retentionszeiten genügen den Anforderungen dieser Arbeit.

Wiederfindung (Recovery)

Die bei der Berechnung der Wiederfindung erhaltenen Werte von über 100 Prozent sind auf einen systematischen Fehler zurückzuführen, der durch die unvermeidbare Verwendung unterschiedlicher Matrices- Liquor und mobile Phase- zustande kommt. Im Abschnitt "Richtigkeit" wird dieser sog. Matrixeffekt ausführlicher dargelegt.
Bei Bestimmung der Konzentration für S1 und S2 wird Liquor als Medium verwendet, bei S3 mobile Phase. Der durchschnittliche systematische Fehler der Wiederfindung bei MHPG (112 %), 5-HIAA (103 %), HVA (102 %) und Iso-HVA (102 %) liegt noch deutlich unter dem bei der Richtigkeit festgestellten mit 114 %, 106 %, 105 % bzw. 103 %.
Wird diese Tatsache und die unten diskutierte Präzision berücksichtigt, kann davon ausgegangen werden, daß sich die Wiederfindung um die 100 Prozent bewegt.
Der Anstieg der Wiederfindung bei MHPG im Bereich von 60 bis 240 ng/ml kann nicht erklärt werden. Für den folgenden Gruppenvergleich muß dies berücksichtigt werden.

Präzision in der Wiederholung

Die Variationskoeffizienten der Präzision in der Wiederholung (Intra-Assay-Precision) bei der Bestimmungen von HVA (1,0 %), Iso-HVA (1,1 %), 5-HIAA (1,7 %) und MHPG (3,5 %) sind im Vergleich mit anderen HPLC-Methoden durchaus vertretbar:
Goldberg berichtet bei der Bestimmung von Noradrenalin im Plasma in Konzentrationen von 0,248-0,495 ng/ml von einem VK von 6-14 % und bei Adrenalin im Bereich von 0,0183-0,0732 ng/ml von einem VK von 26-46 %.
Scheinin et al. analysierten parallel drei Liquorpools und erhielten bei MHPG in Konzentrationen von 17,9 nM, 58,1 nM und 18,9 nM Variati-

onskoeffizienten von 4,3 %, 1,8 % und 6,2 %, bei 5-HIAA in Konzentrationen von 617 nM, 343 nM und 116 nM 1,1%, 1,8 % und 2,3 % sowie bei HVA in Konzentrationen von 1031 nM, 578 nM und 206 nM 1,1 %, 1,8 % und 2,2 % [98].
Bei der Bestimmung von MHPG ermittelte Semba bei einer Konzentration von 4,12 ng/ml einen VK von 3,77 % [101].

Präzision von Tag zu Tag

Die Präzision von Tag zu Tag (Inter-Assay-Precision) liegt bei allen vier Substanzen bei Konzentrationen von 30 (MHPG), 12 (5-HIAA), 32 (HVA) und 18 ng/ml (Iso-HVA) mit Variationskoeffizienten von 9,3 bis 14,3 % ungefähr im Bereich der von der Bundesärztekammer geforderten Grenzwerten von 8 bis 15 % für die Bestimmung von Albumin bzw. Immunglobulin A (IgA) oder M (IgM) im Liquor [23].
Albumin und IgA bzw. IgM werden gewählt, da deren Konzentration zwar um den Faktor 1000 (Albumin) bzw. 100 (IgA/IgM) größer ist, aber dennoch am ehesten im Bereich der Konzentrationen der in dieser Arbeit bestimmten Substanzen liegen. Die maximal zulässige Standardabweichung bei Albumin beträgt 0,24 mg/dl und diejenige von IgA und IgM 0,09 mg/dl. Im Vergleich dazu liegen die Standardabweichungen von MHPG bei 0,0004 mg/dl, 5-HIAA bei 0,0001 mg/dl, HVA bei 0,0004 mg/dl und Iso-HVA bei 0,0018 mg/dl.

Zusätzlich liegen alle Meßwerte innerhalb der 3s-, MHPG sogar innerhalb der 2s-Grenzen.

Zusammenfassend kann über die Präzision gesagt werden, daß zwar bedingt durch die Streuung der Meßwerte Unterschiede der Konzentrationen erst bei größeren Differenzen festgestellt werden können, sie aber den Anforderungen dieser Arbeit sehr wohl genügt.

Kalibrationskurven und Linearität

Der lineare Verlauf der Kalibrationskurven aller vier Substanzen in Liquor im Konzentrationsbereich von 3,75 bis 240 ng/ml zeigt, daß Analytenkonzentration und Meßwerte direkt proportional sind und für die Bestimmung keine weiteren Kalibratorenzwischenschritte zwischen den verwendeten Konzentrationen notwendig sind.
Auch die Korrelationskoeffizienten R und das jeweilige Bestimmtheitsmaß R^2 von über 0,999 in allen Fällen bestätigen den linearen Verlauf.
Deshalb werden für die Kalibration in mobiler Phase auch nur noch drei Konzentrationen verwendet: 160, 20 und 5 ng/ml.

Empfindlichkeit

Die Kalibrationsgeraden der einzelnen Substanzen besitzen unterschiedliche Steigungen in Liquor und mobiler Phase, wobei die Steigung in Liquor in allen vier Fällen größer und die Bestimmung somit empfindlicher ist.
Dies bedeutet allerdings auch, daß bei der gleichen Substanzkonzentration bei einer Kalibration in mobiler Phase ein schwächeres Signal mit dieser Konzentration korreliert wird als bei einer Kalibration oder auch Analyse in Liquor.
Überspitzt formuliert heißt das: was in mobiler Phase als 5 ng/ml quantifiziert wird, ist in Liquor nur 2 ng/ml- es entsteht ein systematischer Fehler, indem höhere Konzentrationen gemessen werden als eigentlich vorhanden sind.

Eine Kalibration im "empfindlicheren" Medium Liquor ist zum Zeitpunkt dieser Arbeit jedoch nicht möglich, da kein "Leerliquor" beziehbar ist, d.h. Liquor ohne Gehalt an physiologisch vorkommenden Substanzen. Bei einer Eichung im Mischliquor des Pooles ist somit immer eine bestimmte Menge an MHPG, 5-HIAA und HVA vorhanden, so daß weder ein Nullwert noch der Abschnitt der Kalibrationsgeraden festgestellt werden kann, der unter dieser "natürlich" vorkommenden Konzentration liegt.

Richtigkeit

Die bestimmten Konzentrationen sind höher als tatsächlich in der Probe vorhanden.
Dieser Fehler ist gleichfalls auf die unterschiedlichen Matrixeffekte von mobiler Phase und Liquor zurückzuführen. In der Formel zur Berechnung der Richtigkeit (und auch der Wiederfindung) wird unter S3 der Standard in mobiler Phase gemessen und dabei ein schwächeres Signal erhalten als bei den beiden anderen Bestimmungen S1 und S2 in Liquor. Auf diese Weise kommen Werte an Richtigkeit über 100 % zustande. Gleichzeitig läßt sich aber auch die Größenordnung dieses systematischen Fehlers bestimmen: Er liegt bei MHPG etwa bei 14 %, bei HVA etwa bei 6 % sowie bei 5-HIAA 5 % und Iso-HVA bei etwa 3 %.

Bei verschiedenen Konzentrationen bleibt die Richtigkeit- von kleinen Schwankungen abgesehen- stabil. Eine Ausnahme bildet bei MHPG der Konzentrationsbereich zwischen 15 und 240 ng/ml, in welchem die Abweichung stärker ansteigt. Da ein Pipettierfehler im Laufe der Verdünnungsreihe des Standardgemisches konstant bliebe, ist eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen der bereits erwähnte Matrixeffekt: dieser

kommt bei MHPG aufgrund der anderen chemischen Struktur- 5-HIAA und HVA sind Säuren, MHPG dagegen ein Alkohol- bei steigender Konzentration vermehrt zum Tragen.
Alle statistisch auffälligen Unterschiede der MHPG-Konzentration beim unten folgenden Gruppenvergleich müssen genauer betrachtet werden, da mit steigender Konzentration auch die Abweichung nach oben hin zunimmt und dadurch Differenzen verstärkt werden.
Die Richtigkeit der Bestimmung von 5-HIAA, HVA und Iso-HVA dagegen ist sehr zufriedenstellend. Die maximal zulässige Abweichung der Richtigkeit für Albumin und IgA/IgM nach den Richtlinien der Bundesärztekammer liegt zum Vergleich bei 8 bzw. 15 %, wobei die Konzentrationen dieser Stoffe deutlich größer ist als die der hier bestimmten [23].

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Bei Anlegen der Verdünnungsreihe zur Bestimmung der unteren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen werden in Liquor gelöste Standards mit mobiler Phase verdünnt, wobei dadurch das Grundrauschen des Signals abgeschwächt wird.
Andererseits wird durch dieses Vorgehen die Differenz der Signalstärke durch den Matrixeffekt (s.o.) verkleinert und dadurch auch das Verhältnis von Meßsignal zu Grundrauschen, so daß die unteren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen früher erreicht werden.
Ein direkter Vergleich des Grundrauschens der Verdünnungsreihe mit dem eines "Leerliquors" ist aus bereits genannten Gründen nicht möglich.
Das in Abbildung 21 und 22 gezeigte Grundrauschen des Liquors aus dem Pool unterscheidet sich nicht wesentlich von dem aus der Verdünnungsreihe.

Zu Beginn der Auswaschphase aus der Säule finden sich eine Vielzahl sich überlagernder Peaks, die in nächster Nachbarschaft zum Peak des MHPG liegen. Die im Verdünnungsversuch festgestellte untere Nachweis- und Bestimmungsgrenze des MHPG trifft zwar zu, muß aber durch die Interferenz dieser frühen Signale höher gelegt werden, da auch sie durch Verdünnung verringert werden.

Die hier bestimmten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind für das Ziel dieser Arbeit weit ausreichend, da sie sowohl unter dem Arbeitsbereich der Methode (s.u.) als auch unter den gemäß anderer Veröffentlichungen zu erwartenden Meßwerten liegen.

Arbeitsbereich

Die aus der Literatur erstellten Vorschläge für die Arbeitsbereiche lassen sich bis auf MHPG vollständig umsetzen. Die Differenz von 0,3 ng/ml bei MHPG entspricht einer Abweichung von etwa 11 Prozent und fällt angesichts eines Variationskoeffizienten von 13,6 % der Präzision von Tag zu Tag nur unbedeutend ins Gewicht.

Allerdings macht die relativ große Unrichtigkeit von MHPG im Konzentrationsbereich von 60 bis 240 ng/ml (122 % bzw. 124 %) eine genaue Betrachtung von Meßergebnissen in dieser Größenordnung notwendig.

Die Annahme der Präzision für andere Konzentrationswerte läßt sich dadurch vertreten, daß die zur Errechnung verwendeten Konzentrationen von 32 (MHPG), 12 (5-HIAA) und 37 ng/ml (HVA) sowie 30 (MHPG), 12 (5-HIAA) und 32 ng/ml (HVA) innerhalb der zu erwartenden Arbeitsbereiche von 2,4 - 49,2 ng/ml für MHPG, 17,6 - 145,3 ng/ml für 5-HIAA und 24,8 - 234,4 ng/ml für HVA liegen, im Falle von 5-HIAA sogar noch tiefer.

Abschließende Beurteilung der Methode

Die hier vorgestellte Methode liefert aussagefähige Ergebnisse für einen Vergleich von 5-HIAA und HVA im Rahmen dieser Arbeit. D.h. trotz des festgestellten systematischen Fehlers bei Wiederfindung und Richtigkeit sowie der unterschiedlichen Empfindlichkeit in den Matrices Liquor und mobiler Phase, welche kalibrationsbedingt zu einheitlich höheren Konzentrationen führt, können die einzelnen Gruppen untereinander verglichen werden, da jeweils die gleichen Ausgangsbedingungen vorliegen.
Dasselbe gilt für die starke Schwankung der Recovery, welche durch die Deproteinisierung mittels Perchlorsäure verursacht wird.

Ein Gruppenvergleich von MHPG ist bei sorgfältiger Interpretation ebenfalls möglich, obwohl zu den oben genannten und auch hier zutreffenden Faktoren noch die relativ große Abweichung der Wiederfindung und der Richtigkeit in den Konzentrationsbereichen zwischen 60 und 240 ng/ml bzw. 15 und 240 ng/ml hinzukommen.

Die genannten Einschränkungen führen zwar dazu, daß ein Vergleich der hier gewonnenen Meßergebnisse mit Absolutwerten der Literatur nur eingeschränkt möglich ist, jedoch sehr wohl Aussagen über den Gruppenvergleich innerhalb dieser Arbeit gemacht werden können.

4 Bestimmung von MHPG, 5-HIAA und HVA in Liquores von Patienten mit FMS und neurologischen Erkrankungen

4.1 Verwendetes Material, beteiligte Patienten und statistische Methoden

4.1.1 Probenmaterial

Das verwendete Probenmaterial wurde teils während der neurologischen Routinediagnostik im Friedrich-Baur-Institut (FBI) im Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität (München) gewonnen teils von Prof. Müller aus dem Hochrhein-Institut für Rehabilitationsforschung in Bad Säckingen zur Verfügung gestellt. Durch Verwendung von routinemäßig im Rahmen der stationären Diagnostik entnommenem Liquor wurden die Patienten keinem zusätzlichen Risiko ausgesetzt. Aufgrund dieses ethischen Gesichtspunktes wurde die Patientenzahl der vorliegenden Studie begrenzt.
Die Proben aus dem FBI wurden durch Lumbalpunktion in sitzender Position im Zwischenwirbelbereich L3/4 oder L4/5 zumeist vormittags gewonnen. Die Patienten hielten dabei in der Regel eine vorherige Bettruhe von etwa 8 Stunden ein.
Für die Punktion wurden eine atraumatische Punktionskanüle 21G*3½`` (Sprotte Standard Needle 90 mm) mit einer Führungskanüle 1,1*30 mm Introducer Cannula) verwendet.
Nach der Entnahme wurde das Untersuchungsgut unbehandelt nach einem kurzen Transport in Eis und unter Lichtschutz bei -80 °C tiefgefroren.
Diese Bedingungen werden aufgrund folgender Arbeiten gewählt, um gerade die Haltbarkeit von MHPG aber auch von 5-HIAA und HVA bei einer Lagerdauer von bis zu 36 Monaten zu gewährleisten:
HVA ist bei -20 °C mindestens 60 Monate stabil [52] bzw. bei -60 °C 36 Monate [66]. 5-HIAA hält sich bei einer Lagerung bei -60 °C 36 Monate stabil [66] und MHPG bei -20 °C für 6 Monate [113].

Es wurde nur Liquor verwendet, der frei von Erythrozyten war, weniger als 5 Zellen/µl und weniger als 45 mg/dl Protein enthielt.

Das Probenmaterial aus dem Hochrhein-Institut wurde im Rahmen der dortigen neurologischen und neurochirurgischen Diagnostik entnommen.

4.1.2 Patientengruppierung

Das so gewonnene Material wird zunächst in drei Gruppen aufgeteilt:

Gruppe 1: Patienten mit der Diagnose FMS entsprechend den Richtlinien des ACR [117], Proben aus München, max. Probenalter 2 Jahre, mit und ohne Schmerzmedikation

Gruppe 2: Patienten mit Erkrankungen des Nervensystems wie Polyneuropathien (PNP) und Neuropathien, Proben aus München, max. Probenalter 2 Jahre, mit und ohne Schmerzmedikation

Die Patienten für diese Gruppe werden nach dem Lebensalter aus einer größeren Anzahl ausgewählt, um ein Gruppe 1 entsprechendes Altersprofil zu erhalten. Dabei wird nur die möglichst genaue Übereinstimmung des Lebensalters und des Geschlechts berücksichtigt.

Gruppe 3: Patienten mit Erkrankungen des peripheren Nervensystems wie Wurzelkompressionen oder -irritationen, LWS-Syndrom und "lower back pain"/Rückenschmerzen, Proben aus Bad Säckingen, Probenalter ca. 3 Jahre

Die Gruppen 1 und 2 werden weiter verkleinert, indem Patienten, die zum Zeitpunkt der Probengewinnung Antidepressiva wie Amitryptilin, Trimipramin oder Moclobemid sowie Analgetika wie Acetylsalicylsäure, Paracetamol oder Diclofenac eingenommen hatten, aus den Gruppen genommen werden, da diese Medikamente den Neurotransmitterstoffwechsel im ZNS z.T. nachhaltig beeinflussen:
Psychopharmaka wie trizyklische Antidepressiva (TCA) beeinflussen die Noradrenalin- und Serotoninspiegel [33], selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren (SSRI) den Serotoninspiegel [33], Neuroleptika den Dopaminspiegel [61] sowie MAO-Inhibitoren die Spiegel aller drei Transmitter im Liquor [33]. Analgetika reduzieren den durch Schmerz verursachten Dysstress, der seinerseits die Liquorkonzentrationen von MHPG [123], 5-HIAA und HVA [121] erhöht.
In Gruppe 1 sind dies fünf Patienten (vier Frauen und ein Mann) sowie in Gruppe 2 zwei Patienten (eine Frau und ein Mann). Um die angeglichene Altersstruktur in Gruppe 2 weiter beizubehalten, werden drei Frauen entsprechenden Alters aus dieser Gruppe genommen.

Diese beiden Gruppen werden als Gruppe 4 (Patienten mit FMS ohne Einnahme von interferierenden Pharmaka) und Gruppe 5 (Patienten mit neurologischen Erkrankungen ohne Einnahme von interferierenden Pharmaka) benannt.
In Gruppe 3 ist dieses Vorgehen nicht möglich, da entsprechende klinische Informationen nicht verfügbar sind.

Die demographischen Daten der fünf Patientengruppen sind in Tabelle 16 und 17 dargestellt.

Tabelle 16: Demographische Daten der Studiengruppen 1 bis 3

Gruppe	1	2	3
Patientenzahl	15	15	22
weibl./männl.	12/3	12/3	8/14
Alter:MW(STABW)	49,4 (9,5)	49,5 (10,3)	n.b.
Bereich	28-60	26-61	n.b.

Tabelle 17: Demographische Daten der Studiengruppen 4 und 5

Gruppe	4	5
Patientenzahl	10	10
weibl./männl.	9/1	9/1
Alter:MW(STABW)	51,5 (8,1)	49,7 (8,5)
Bereich	33-60	32-60

Die Altersverteilung in den Gruppen ist mit Mittelwert (MW), Standardabweichung (STABW) und der Spannbreite (Bereich) in Jahren angegeben. Die Altersverteilung in Gruppe 3 ist nicht bekannt (n.b.). Die Geschlechterverteilung ist unter "weibl./männl." aufgeführt.

In Punkt A des Anhangs finden sich Listen der verwendeten Patientendaten mit Diagnosen.

4.1.3 statistische Methoden

Zur Auswertung der Ergebnisse wurden das Statistikpaket SPSS, Version 9.0.1 und Excel 97 von Microsoft verwendet.

Es folgt eine Liste der verwendeten Tests:

Normalverteilung:	Schnelltest nach David
Varianzhomogenität:	F-Test
Ausreißertests:	nach Dixon (bei max. 5 bis 8 Werten) nach Grubbs (bei über 8 Werten) [54]
Vergleich der Mittelwerte:	t-Test für unverbundene Stichproben
Korrelation:	Test nach Pearson (zweiseitig)

Nullhypothese ist die Annahme, daß sich die Konzentrationen von MHPG, 5-HIAA und HVA zwischen den Patientengruppen nicht unterscheiden. Als signifikant werden Resultate mit der Wahrscheinlichkeit p des Fehlers α bis einschließlich $\leq 0{,}05$, als Trends Resultate bis einschließlich $p = 0{,}10$ bezeichnet.

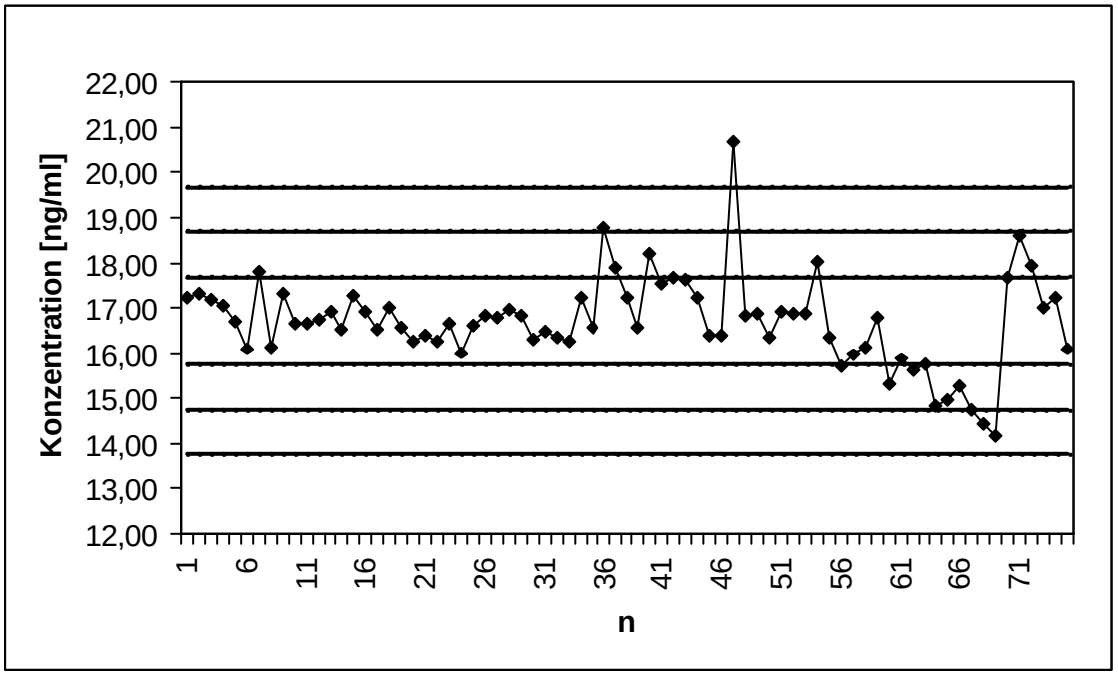
4.2 Qualitätskontrolle

Zur Qualitätssicherung während der insgesamt zwölf Analysenläufe werden mitgeführte Präzisionskontrollen [118] aus dem Liquorpool durch den Zusatz einer konstanten Menge Iso-HVA (20 ng/ml) zur Kontrolle der Richtigkeit verwendet. Sie werden jeweils zu Beginn und Ende eines Laufes gemessen (siehe auch 2.3.1.6).
Zusätzlich wird auch jeder Probe des Analysenlaufes Iso-HVA (20 ng/ml) zugesetzt (siehe 2.2.8).

Die mitgeführten Präzisionskontrollen zeigen die in Abbildung 9 bis 12 (siehe 2.3.2.3) gezeigten Verläufe, die sich in den Grenzen der dreifachen Standardabweichung (3s) bewegen.

Abbildung 23 stellt den Verlauf der zugesetzten Iso-HVA in den Proben und Präzisionskontrollen der 12 Analysenläufe innerhalb der 3s-Grenzen dar.

Abbildung 23: Iso-HVA



Verlauf der zugesetzten Iso-HVA in den Proben und Präzisionskontrollen der 12 Analysenläufe (n= 76) innerhalb der 3s-Grenzen

Der Ausreißertest nach Grubbs ergibt für Wert 47 (20,7 ng/ml) einen Ausreißer bei P=95 % und n=75. Nach Bereinigung des Ausreißers sind alle Iso-HVA-Bestimmungen nach dem Schnelltest von David um den

Mittelwert normalverteilt (P=99,9 %). Ohne diese Maßnahme liegt die Wahrscheinlichkeit der Normalverteilung bei P=95 %.

Abgesehen von diesem Ausreißer bewegen sich die Werte von Iso-HVA innerhalb der dreifachen Standardabweichung.
Dem Test nach Neumann zufolge liegt bei Iso-HVA im Verlauf kein Trend vor (P=99 %) (Tabelle 18).

Tabelle 18: Iso-HVA - deskriptive Statistik und Trendtest nach Neumann

	Iso-HVA
Mittelwert	16,7 ng/ml
Standardabweichung	1,0 ng/ml
Variationskoeffizient	5,9 %
Q (n=75, P=99 %, Q=2,00)	0,9005

Aus den Meßwerten der jeder Probe zugesetzten Iso-HVA (20 ng/ml) werden Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient berechnet. Q gibt die Ergebnisse des Trendtests nach Neumann an. Bei einer Wahrscheinlichkeit (P) von 99 % liegt der Schwellenwert, über dem ein Trend vorliegt, für 75 Werte (n) bei 2,00.

Im Rahmen der Qualitätskontrolle ergaben sich keine Auffälligkeiten, so daß nun ein Gruppenvergleich im Hinblick auf die Konzentrationen von MHPG, 5-HIAA und HVA stattfinden kann.

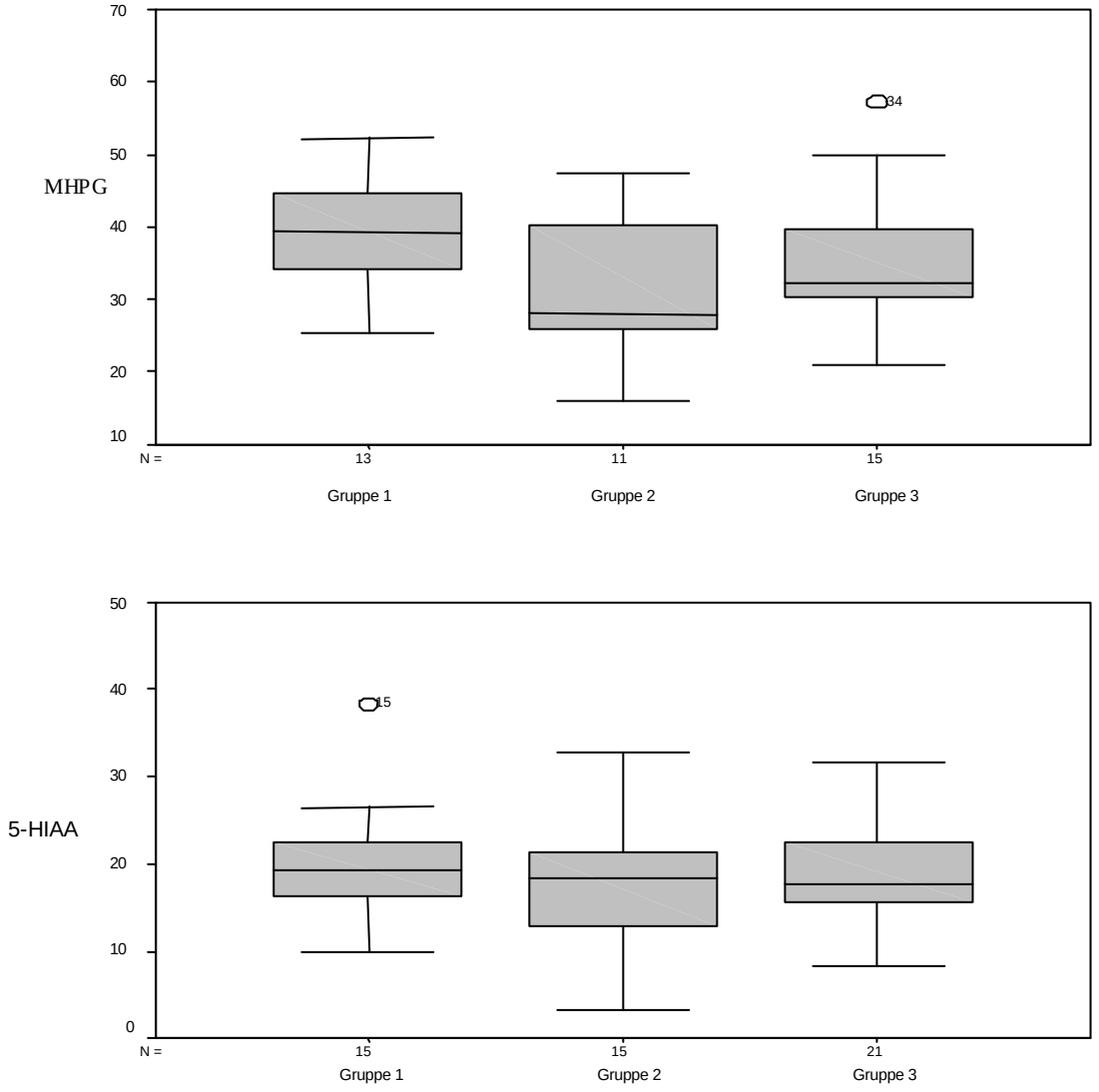
Zur Verarbeitung der gewonnenen Meßwerte ist zu sagen, daß bei der Doppelbestimmung der Probandenliquores (siehe auch 2.3.1.6) der Mittelwert der beiden Messungen errechnet und zur Auswertung herangezogen wird. Wenn in der Probe enthaltene, unbekannte Substanzen mit einzelnen Meßsignalen bei optischer Kontrolle des Chromatogramms interferieren, wird bei nur einem verwertbaren Meßergebnis dieses verwendet; sind beide nicht eindeutig, wird diese Bestimmung überhaupt nicht zur Auswertung herangezogen.

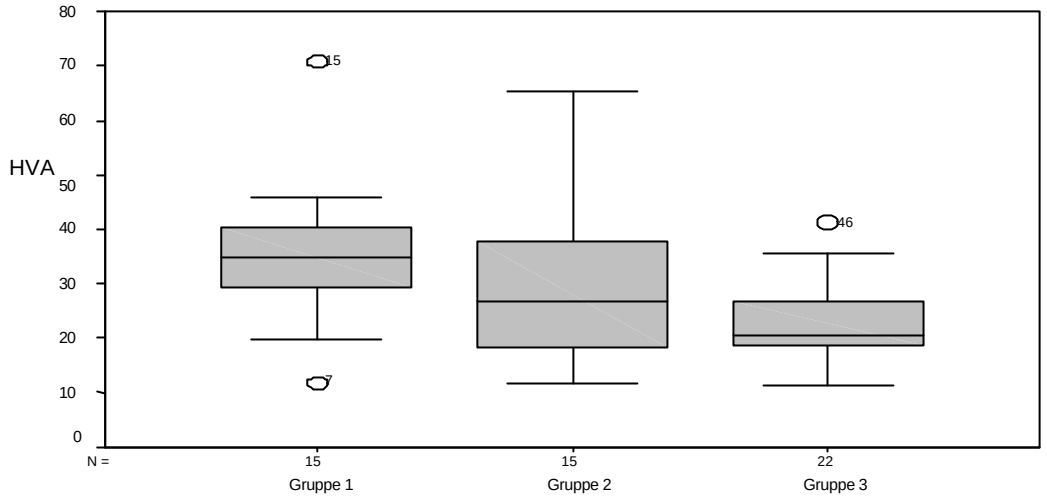
4.3 Vergleich von Patienten mit FMS, neurologischen Erkrankungen/PNP und neurologischen Erkrankungen/Rükkenschmerzen (Studiengruppen 1, 2 und 3)

4.3.1 Verteilung der Meßwerte

Die Meßwerte der einzelnen Substanzen in den Gruppen 1 (FMS), 2 (neurologische Erkrankungen/PNP) und 3 (neurologische Erkrankungen/ Rückenschmerzen) zeigen die in Abbildung 24 und Tabelle 19 dargestellte Verteilung.

Abbildung 24: Boxplots von MHPG, 5-HIAA und HVA





Die drei Gruppen sind mit ihrer jeweiligen Nummer (1= FMS, 2= neurolog. Erkrankungen/PNP, 3= neurolog. Erkrankungen/Rückenschmerzen) benannt. Konzentrationen sind in ng/ml angegeben. N gibt die Zahl der Werte je Gruppe an; stark abweichende Werte sind mit ihrer Nummer gekennzeichnet.

Tabelle 19: Datenverteilung der Gruppen 1 bis 3

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
MHPG			
MW (STABW)	38,5 (8,4)	32,0 (10,1)	35,6 (9,9)
Bereich	25,5 - 52,3	16,1 - 47,4	20,9 - 57,4
n	13	11	15
5-HIAA			
MW (STABW)	20,2 (6,6)	18,2 (8,0)	18,8 (6,3)
Bereich	10,0 - 38,4	3,1 - 32,8	8,1 - 31,7
n	15	15	21
HVA			
MW (STABW)	35,3 (13,3)	29,4 (15,1)	22,6 (7,5)
Bereich	11,8 - 70,7	11,7 - 65,3	11,5 - 41,1
n	15	15	22

Die drei Gruppen sind mit ihrer jeweiligen Nummer (1= FMS, 2= neurolog. Erkrankungen/PNP, 3= neurolog. Erkrankungen/Rückenschmerzen) benannt. Die Einheit der Werte ist ng/ml; der Mittelwert ist mit MW, die Standardabweichung mit STABW und die Anzahl der verwertbaren Meßwerte mit n abgekürzt.

4.3.2 t-Test

Vorraussetzung für die Anwendbarkeit des t-Tests ist die Normalverteilung der Werte und Varianzhomogenität.

Mittels des Schnelltests auf Normalverteilung von David zeigen sich für alle Substanzen in den Gruppen 1 bis 3 normalverteilte Werte (P= 99,9 %, f= 1, P: Signifikanzniveau, f: Freiheitsgrad). Lediglich in Gruppe 1 beträgt die Wahrscheinlichkeit für Normalverteilung für 5-HIAA und HVA nur 95 %.
Die Varianzen der Meßwerte in den Gruppen 1 bis 3 ergeben bei Anwendung des F-Tests Varianzgleichheit (P= 99 %) außer beim Vergleich von HVA in den Gruppen 1 und 3 sowie 2 und 3.

Anschließend werden jeweils mittels des t-Tests für unverbundene Stichproben die Mittelwerte von MHPG, 5-HIAA und HVA der Gruppen 1 und 2, 2 und 3 sowie der Gruppen 1 und 3 zweiseitig bei einem Konfidenzniveau von 99 % verglichen.

Die Mittelwerte von HVA werden zwischen den Gruppen 1 und 3 sowie 2 und 3 dagegen mittels Zweistichproben t-Test für unterschiedliche Varianzen verglichen (P= 99 %).

Tabelle 20: Ergebnisse der t-Tests

gleiche Varianz	**MHPG**	**5-HIAA**	**HVA**
Gruppe 1 und 2	0,100	0,483	0,272
Gruppe 2 und 3	0,375	0,820	-
Gruppe 1 und 3	0,414	0,534	-
ungleiche Varianz	**MHPG**	**5-HIAA**	**HVA**
Gruppe 1 und 2	-	-	-
Gruppe 2 und 3	-	-	0,123
Gruppe 1 und 3	-	-	0,003*

***signifikant bei P= 99 %**

Die drei Gruppen sind mit ihrer jeweiligen Nummer (1= FMS, 2= neurolog. Erkrankungen/PNP, 3= neurolog. Erkrankungen/Rückenschmerzen) benannt.

Hierbei fällt beim Gruppenpaar 1 und 3 (Patienten mit FMS bzw. neurolog. Erkrankungen/Rückenschmerzen) ein signifikanter Unterschied der mittleren Konzentrationen von HVA bei verschiedener Varianz (p=0,003) auf (Tabelle 20).

4.3.3 Korrelation

Weiterhin wurde innerhalb jeder Gruppe mit dem Verfahren von Pearson nach bivariaten, zweiseitigen Korrelationen zwischen den einzelnen Substanzen gesucht (Tabelle 21).

Es finden sich dabei in allen drei Gruppen signifikante, positive Korrelationen zwischen 5-HIAA und HVA (p = 0,000 bis 0,004).

Tabelle 21: Korrelationen in den Gruppen 1 bis 3

Korrelation	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
MHPG - 5-HIAA	0,173	0,426	0,255
5-HIAA - HVA	0,809*	0,854*	0,597*
MHPG - HVA	0,430	0,452	-0,034

***signifikant**

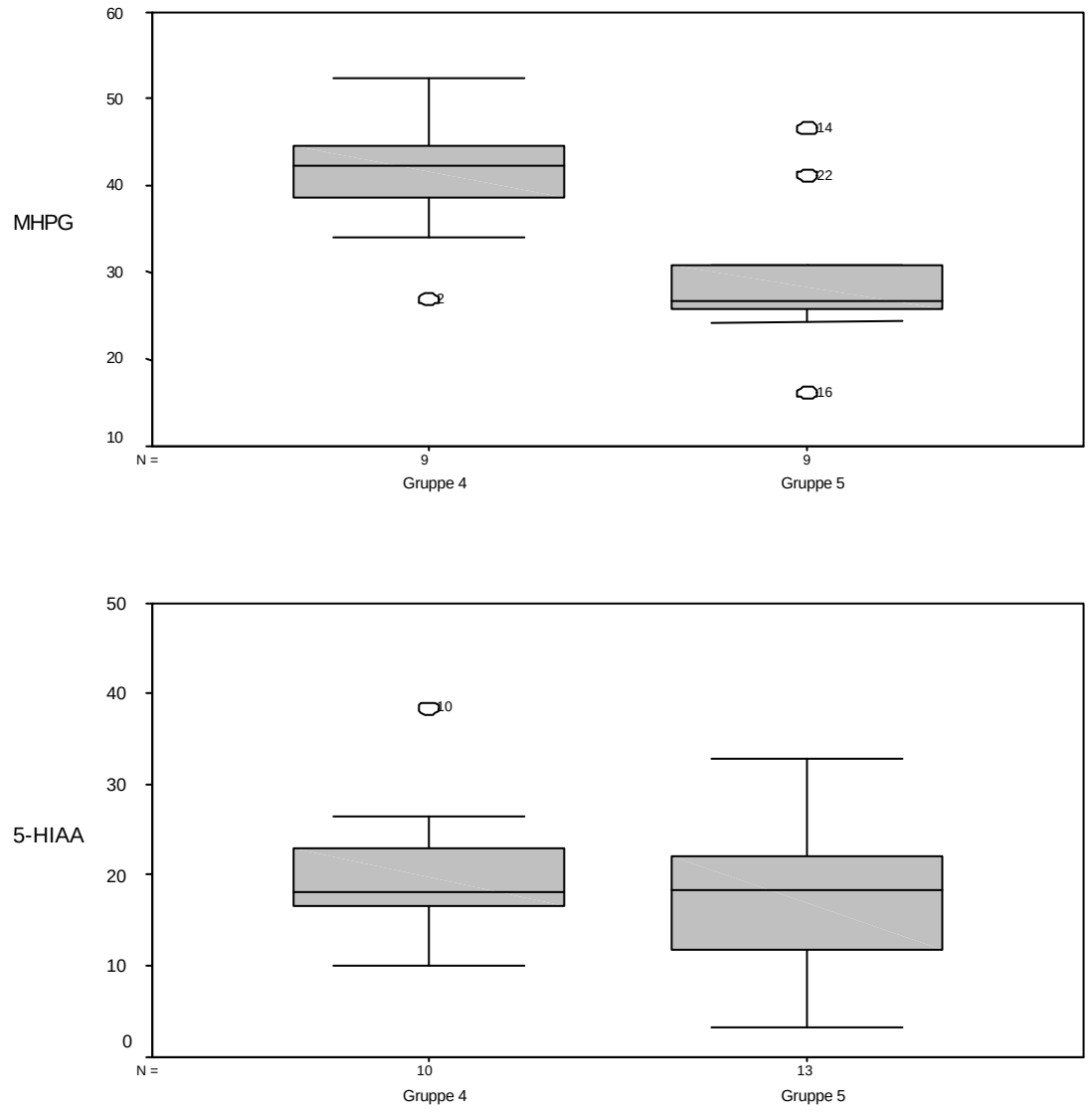
Die drei Gruppen sind mit ihrer jeweiligen Nummer (1= FMS, 2= neurolog. Erkrankungen/PNP, 3= neurolog. Erkrankungen/Rückenschmerzen) benannt.

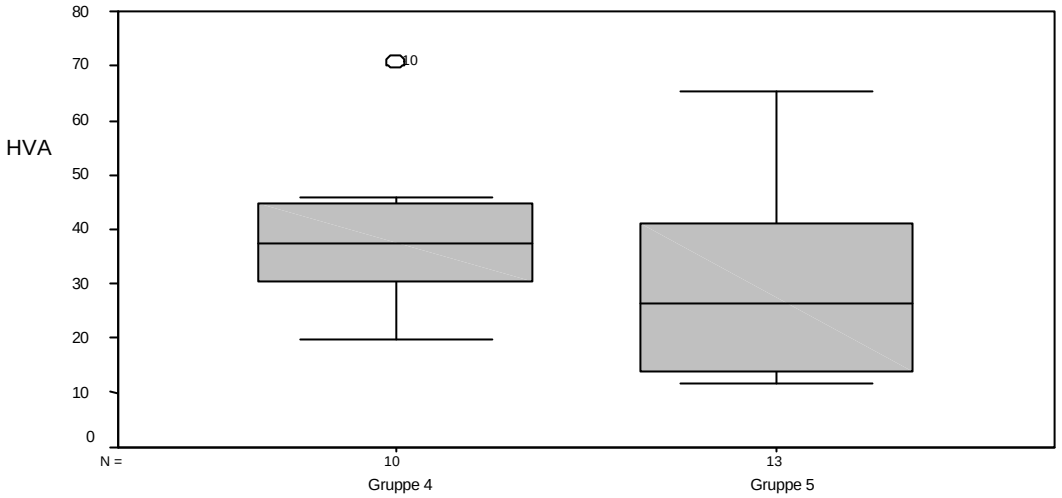
4.4 Vergleich von Patienten mit FMS und neurologischen Erkrankungen ohne Einnahme von interferierenden Pharmaka (Studiengruppen 4 und 5)

4.4.1 Verteilung der Meßwerte

Die Verteilung der Meßwerte der Gruppen 4 (FMS ohne Einnahme von interferierenden Substanzen) und 5 (neurologische Erkrankungen ohne Einnahme von interferierenden Substanzen/PNP) gibt Abbildung 25 und Tabelle 22 wieder.

Abbildung 25: Boxplots der Gruppen 4 und 5





Die beiden Gruppen sind mit ihrer jeweiligen Nummer (4= FMS ohne Einnahme interferierender Pharmaka, 5= neurolog. Erkrankungen/PNP ohne Einnahme interferierender Pharmaka) benannt. Konzentrationen sind in ng/ml angegeben. N gibt die Zahl der Werte je Gruppe an; stark abweichende Werte sind mit ihrer Nummer gekennzeichnet.

Tabelle 22: Datenverteilung der Gruppen 4 und 5

	Gruppe 4	**Gruppe 5**
MHPG		
MW (STABW)	40,9 (7,4)	30,5 (9,6)
Bereich	26,9 - 52,3	16,1 - 46,7
n	9	7
5-HIAA		
MW (STABW)	20,5 (7,4)	18,2 (8,3)
Bereich	10,0 - 38,4	3,1 - 32,8
n	10	10
HVA		
MW (STABW)	38,9 (13,0)	29,0 (15,6)
Bereich	19,8 - 70,7	11,7 - 65,3
n	10	10

Die beiden Gruppen sind mit ihrer jeweiligen Nummer (4= FMS ohne Einnahme interferierender Pharmaka, 5= neurolog. Erkrankungen/PNP ohne Einnahme interferierender Pharmaka) benannt. Die Einheit der Werte ist ng/ml; der Mittelwert ist mit MW, Die Standardabweichung mit STABW und die Anzahl der verwertbaren Meßwerte mit n abgekürzt.

4.4.2 t-Test

Der Schnelltest auf Normalverteilung von David ergibt für alle Substanzen der Gruppen 4 und 5 normalverteilte Werte (P= 99,9 %, f= 1, P: Signifikanzniveau, f: Freiheitsgrad).

Lediglich in Gruppe 4 beträgt die Wahrscheinlichkeit für Normalverteilung für HVA 99 %.
Der F-Test ergibt für die Gruppen 4 und 5 in den Meßwerten aller drei Neurotransmittermetaboliten Varianzhomogenität (P= 99 %).

Der zweiseitige t-Test für unverbundene Stichproben ergibt beim Vergleich der Mittelwerte der Gruppen 4 (FMS ohne Einnahme von interferierenden Substanzen) und 5 (neurologische Erkrankungen ohne Einnahme von interferierenden Substanzen) die in Tabelle 23 dargestellten Ergebnisse.

Tabelle 23: Ergebnisse der t-Tests

gleiche Varianz	MHPG	5-HIAA	HVA
Gruppe 4 und 5	0,010*	0,511	0,136

*** signifikant bei P= 99 %**

Die Gruppen sind mit ihrer Nummer (4= FMS ohne Einnahme interferierender Pharmaka, 5= neurolog. Erkrankungen/PNP ohne Einnahme interferierender Pharmaka) benannt.

4.4.3 Korrelation

Bei der Untersuchung auf Korrelationen ergeben sich signifikante positive Korrelationen zwischen 5-HIAA und HVA (p= 0,05) in beiden Gruppen (Tabelle 24).

Tabelle 24: Korrelationen in den Gruppen 4 und 5

Korrelation	Gruppe 4	Gruppe 5
MHPG - 5-HIAA	0,149	0,454
5-HIAA - HVA	0,936*	0,854*
MHPG - HVA	0,194	0,374

***signifikant**

Die Gruppen sind mit ihrer Nummer (4= FMS ohne Einnahme interferierender Pharmaka, 5= neurolog. Erkrankungen/PNP ohne Einnahme interferierender Pharmaka) benannt.

5 Diskussion des Vergleichs von MHPG, 5-HIAA und HVA in den Studiengruppen

Vor der Diskussion des Gruppenvergleichs wird noch auf allgemeine Gesichtspunkte der Bestimmung von Neurotransmittermetaboliten im Liquor cerebrospinalis eingegangen.

Die Bestimmung der Abbauprodukte soll einen Rückschluß auf den Gesamtumsatz der jeweiligen Neurotransmittern im ZNS erlauben, d.h. eine Beurteilung der Aktivität bestimmter Neuronensysteme oder funktioneller Bereiche. Aufgrund von Konzentrationsgradienten der zu untersuchenden Substanzen bei durch Lumbalpunktion gewonnenem Liquor ist zu berücksichtigen, daß ein Rückschluß auf den zerebralen Transmitterumsatz alleine nur bedingt gezogen werden kann:
Degrell et al. berichten von einem Gradienten zwischen lumbal und zysternal entnommenem Liquor bei HVA und 5-HIAA [27], wobei die zysternale Konzentration jeweils höher ist [9]. Auch die lumbale Konzentration von MHPG soll zu einem gewissen Grad durch absteigenden Bahnen des Rückenmarks erhöht werden [120].
Aufgrund dieser Tatsachen kann festgestellt werden, daß aus lumbal entnommenem Liquor gewonnene Neurotransmittermetaboliten lediglich den Gesamtumsatz im kompletten zentralen Nervensystem, d.h. Gehirn und Rückenmark, reflektieren können. Allerdings stellt die Untersuchung von Neurotransmittern und deren Metaboliten im Liquor die einzig verfügbare und nichtoperative Möglichkeit von In-vivo-Studien am Menschen dar [118].
Weitere Konzentrationsgradienten treten nicht nur kraniokaudal, sondern auch zwischen anfänglicher und nachfolgenden Liquorfraktionen aus einer Punktionsstelle auf, wobei dieser letztere Gradient durch den oben genannten kraniokaudalen bedingt ist [102]. Diese Konzentrationsgradienten zwischen erster und späterer Fraktion wurden für alle drei in dieser Arbeit bestimmten Metaboliten (MHPG, 5-HIAA und HVA) festgestellt [18, 30, 102]. Dabei korreliert die lumbale Konzentration von 5-HIAA signifikant mit der zerebralen [9] bzw. die Konzentration von 5-HIAA besser als die von HVA [27].
Es werden ferner noch eine Reihe zusätzlicher Einflußgrößen wie Körpergröße [16], Geschlecht [16, 20], zirkadiane [84] und jahreszeitliche [16] Schwankungen z.T. sehr widersprüchlich diskutiert, welche die Konzentration von Neurotransmittermetaboliten beeinflussen können.
Eine Beeinflussung durch Pharmaka dagegen wird einstimmig erörtert: beispielsweise beeinflussen trizyklische Antidepressiva (TCA) die Noradrenalin- und Serotoninspiegel [33], selektive Serotonin-Wiederaufnahme-

Inhibitoren (SSRI) den Serotoninspiegel [33], Neuroleptika den Dopaminspiegel [61] sowie MAO-Inhibitoren die Spiegel aller drei Transmitter im Liquor [33]. Analgetika reduzieren indirekt die Liquorkonzentrationen von MHPG [123], 5-HIAA und HVA [121] durch Beeinflussung des schmerzinduzierten Dysstresses.
Als Konsequenz der obigen Diskussion wird ein strenges Versuchsprotokoll mit einem festgelegten zu entnehmenden Liquorvolumen empfohlen [18]. Weiter sollen Schwankungen durch die Auswahl von alters- und geschlechtsentsprechenden Kontrollen, durch den Ausschluß von Probanden mit Erkrankungen des zentralen Nervensystems, welche z.B. mit einer Störung der Blut-Hirn-Schranke einhergehen, durch Reduzierung der körperlichen Aktivität und von Dysstress vor der Probenentnahme und durch Liquorpunktion zur jeweils gleichen Tageszeit verhindert werden. Pharmaka wie Antiemetika, Neuroleptika, Hypnotika, Antidepressiva und Analgetika sollen abgesetzt werden, sofern dies medizinisch und ethisch vertretbar ist. Das so gewonnene Probenmaterial soll anschließend so analysiert werden, daß zur Minimierung von Inter-Assay-Schwankungen Proben und Kontrollen gemischt bestimmt werden [118].

Bei der vorliegenden Untersuchung wurde den dargestellten Empfehlungen Rechnung getragen. Anzumerken ist, daß ein solches Protokoll dem klinischen Alltag nicht immer gerecht werden kann, wenn sich z.B. bei schwieriger Punktion der Streß für den Patienten nicht vermeiden läßt oder aufgrund des täglichen Stationsablaufs Zugeständnisse zu Lasten des Protokolls gemacht werden müssen.

Vor der Diskussion des Gruppenvergleichs dieser Studie folgt zunächst die Betrachtung der Qualität der gemessenen Werte.
Die Qualitätskontrolle mittels jeder einzelnen Probe zugesetzter Iso-HVA entspricht den geforderten Bedingungen der BÄK für Routineverfahren [23] : abgesehen von einem als Ausreißer identifizierten Wert bewegen sich die Meßwerte innerhalb der Grenzen der dreifachen positiven und negativen Standardabweichung während der Analysenläufe.
Nach dem Trendtest nach Neumann liegt bei den Einzelproben- gemessen an Iso-HVA- kein Trend vor.

Bei den Präzisionskontrollen zeigt sich im Gesamtverlauf der Kurve dagegen bei HVA und Iso-HVA ein Trend nach unten (siehe Abb. 11 und 12: Präzision von Tag zu Tag). Bei Betrachtung der Kurve ist festzustellen, daß deren Verlauf während der Zeit der Durchführung der Analysenläufe (Tag 5 bis 16) durchaus stabil ist und ein Absinken der Meßwerte durch die Differenz zu den (höheren) Bestimmungen während des Vorlaufs entsteht. Aus diesem Grunde ist auch ein Gruppenvergleich trotz dieser Differenz möglich, da alle Bestimmungen konstant niedriger sind.

Der Trendtest nach Neumann bestätigt dies (siehe auch Tabelle 9: Präzision von Tag zu Tag und Trendtest nach Neumann).

Die Verlaufskurve von 5-HIAA zeigt während der zwölf Tage der Analysenläufe einen leichten Trend nach unten, während über den ganzen Verlauf betrachtet kein solcher vorliegt.
Dieser Trend ist am ehesten auf die starke Beanspruchung des Säulenmaterials zurückzuführen, da die Analysenreihen fast ohne Pausen durchgeführt wurden. Da die Proben der drei Testgruppen jedoch gemischt analysiert wurden, sind sie in gleichem Ausmaß davon betroffen.
Die Bestimmung von MHPG hingegen unterliegt keinem feststellbaren Trend.
Weiterhin liegen alle Meßwerte im Arbeitsbereich dieser Methode.

Es kann somit gesagt werden, daß die Qualität der Bestimmung von MHPG, 5-HIAA und HVA trotz leicht abfallender Trends die weitere statistische Auswertung zuläßt.

5.1 Diskussion des Vergleichs von Patienten mit FMS, neurologischen Erkrankungen/PNP und neurologischen Erkrankungen/Rückenschmerzen (Studiengruppen 1, 2 und 3)

Die Gruppen 1 (Patienten mit FMS) und 3 (Patienten mit neurologischen Erkrankungen/Rückenschmerzen) unterscheiden sich beim Vergleich der Mittelwerte von HVA statistisch signifikant ($p=0,003$) von einander: in Gruppe 1 ist die mittlere HVA-Konzentration (35,3 ng/ml) höher als in Gruppe 3 (22,6 ng/ml).
Über erhöhte HVA-Werte bei Patienten mit FMS findet sich bisher kein Hinweis in der Literatur.
Lediglich über einen Anstieg der HVA-Konzentration mit zunehmendem Alter berichten Tohgi et al. [106]. Dieser Anstieg ist erst im Alter über 65 Jahren signifikant ($p<0,05$).
In Gruppe 1 ist jedoch keine Testperson über 65 Jahre alt. Hinzu kommt, daß die Meßwerte um den Mittelwert normalverteilt sind. Obwohl über die Alterszusammensetzung der Gruppe 3 nichts bekannt ist, ist es trotzdem eher unwahrscheinlich, daß der Unterschied der mittleren HVA-Konzentration auf eine Altersdifferenz zwischen den Testgruppen zurückzuführen ist, da für eine signifikante Differenz ein extrem niederes Durchschnittsalter in Gruppe 3 vorliegen müßte. Dagegen spricht auch die klinische Erfahrung hinsichtlich der Inzidenz der Erkrankungen von

Gruppe 3 (LWS-Syndrom, Nervenwurzelkompression und –irritation, „lower back-pain“).
Das unterschiedliche Alter des Probenmaterials kann ebenfalls keine Rolle spielen, da sich HVA unter den in 4.1.1 beschriebenen Lagerbedingungen als sehr stabil erweist.
Der festgestellte signifikante Unterschied der HVA-Konzentration ist daher letztlich nur als Hinweis auf eine mögliche erhöhte Aktivität des dopaminergen Systems bei Patienten mit FMS gegenüber Patienten mit neurologischen Erkrankungen (speziell: Rückenschmerzen) zu bewerten.

In allen drei Gruppen finden sich weiterhin signifikante, positive Korrelationen zwischen 5-HIAA und HVA ($p = 0{,}000$ bis $0{,}004$). Gleiches berichten auch Tohgi et al. [106], Aberg-Wistedt et al. [1], Agren [2, 49, 44] und Geracioti et al. [35].
Agren et al. befassen sich eingehender mit diesem möglichen Zusammenhang. Im Tierexperiment stellen sie beim Hund sowohl positive als auch negative Korrelationen zwischen HVA und 5-HIAA in verschiedenen Regionen des Gehirns fest, wobei die positiven deutlich überwiegen. Auch bei Patientengruppen mit verschiedenen depressiven Störungen findet sich die gleiche positive Korrelation. Als mögliche Erklärung schlagen Agren et al.- bei Betrachtung des Gesamtumsatzes- eine physiologische Beeinflussung der HVA durch 5-HIAA bzw. des Dopamin durch Serotonin vor [3].
Interessanterweise zeigt sich trotz der signifikanten, positiven Korrelation von 5-HIAA zu HVA und der signifikant erhöhten HVA beim Vergleich der Gruppen 1 und 3 keine ebenfalls signifikant erhöhte Konzentration an 5-HIAA.
Die hier dargestellten Ergebnisse lassen so einen Schluß auf die gegenseitige Beeinflussung des dopaminergen und serotonergen Transmitterumsatzes nicht ohne weiteres zu- zumindest nicht bezüglich einer direkt-proportionalen Beeinflussung.

Bei den Gruppen 1 bis 3 wird die Einnahme von Pharmaka nicht berücksichtigt. Womöglich zeigen sich deutlichere Unterschiede zwischen den Gruppen, wenn einer möglichen Einnahme Rechnung getragen wird.

5.2 Diskussion des Vergleichs von Patienten mit FMS und neurologischen Erkrankungen/PNP ohne Einnahme von interferierenden Pharmaka (Studiengruppen 4 und 5)

Nach Aussonderung von Patienten aus den Gruppen 1 und 2, die Analgetika oder Psychopharmaka einnehmen, finden sich in den Gruppen 4 (Patienten mit FMS ohne Einnahme interferierender Pharmaka) und 5 (Patienten mit neurologischen Erkrankungen/PNP ohne Einnahme interferierender Pharmaka) z.T. bereits bekannte, aber auch neue Ergebnisse:

Neben der auch in den Gruppen 1 bis 3 bereits gefundenen, statistisch signifikanten, positiven Korrelation von 5-HIAA und HVA zeigt sich beim Vergleich von MHPG der Gruppen 4 (Patienten mit FMS ohne Einnahme interferierender Pharmaka) und 5 (Patienten mit neurologischen Erkrankungen/PNP ohne Einnahme interferierender Pharmaka) ein deutlicher Unterschied, wobei die mittlere Konzentration in Gruppe 4 (40,9 ng/ml) signifikant höher ist als die der Gruppe 5 (30,5 ng/ml).

Vergleichbare Resultate finden sich in veröffentlichten Arbeiten nicht. Lediglich Russell et al. finden bei der Bestimmung von Noradrenalin von Patienten mit muskulo-skelettalem Schmerz (kein FMS nach ACR-Kriterien) beim Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe deutlich erhöhte Werte (p= 0,06) an Noradrenalin, wobei die Bestimmung im 24-Stunden-Urin erfolgte [97] und somit nur bedingt einen Rückschluß auf zentralnervöse Vorgänge liefern kann.
In einer anderen Arbeit finden sich entgegengesetzte Ergebnisse: MHPG, 5-HIAA und HVA von Patienten mit primärem FMS (n=17) haben geringere Konzentrationen im Liquor als eine Vergleichsgruppe zusammengesetzt aus Patienten mit rheumatoider Arthritis (n=5) und gesunden, schmerzfreien Kontrollen (n=7) [96]. Allerdings wurde die Diagnose FMS nicht nach den Kriterien des ACR [117] gestellt, so daß ein direkter Vergleich mit dieser Arbeit nicht möglich ist.

In der weiteren Diskussion der Ergebnisse sollte allerdings die Abweichung der Richtigkeit der Bestimmung von MHPG bedacht werden:
Im Bereich von 15 bis 60 ng/ml liegt die Abweichung bei 15 bis 22 %. Die Meßwerte der Gruppen 4 und 5 liegen beide in diesem Bereich (Gruppe 4: 26,9 - 52,3 ng/ml; Gruppe 5: 16,1 - 46,7 ng/ml), so daß das oben genannte Ergebnis sorgfältig beurteilt werden muß:
Der Mittelwert des MHPG der Patienten mit FMS ohne Einnahme von interferierenden Pharmaka (Gruppe 4) steigt um 2,4 ng/ml gegenüber dem Mittelwert von Gruppe 1 an, der von Patienten mit neurologischen Erkrankungen/PNP ohne Einnahme von interferierenden Pharmaka

(Gruppe 5) sinkt um 1,5 ng/ml gegenüber dem Mittelwert der Gruppe 2 ab.
Um die Richtigkeit der Methode zu berücksichtigen, wird folgende Berechnung angestellt: der Mittelwert von Gruppe 4 liegt eher im Bereich der Konzentration von 60 ng/ml mit einer Abweichung von 122 %, derjenige der Gruppe 5 im Bereich von 15 ng/ml mit 115 %. Somit ergibt sich eine Differenz von 7 %, was einer Konzentration von 2,9 ng/ml- auf den (größeren) Mittelwert der Gruppe 4 bezogen- entspricht. Die Dimension der Unrichtigkeit liegt somit etwa im gleichen Bereich wie die Verschiebung der Mittelwerte und könnte eine von mehreren möglichen Erklärungen für die festgestellte Differenz sein.

Eine weiter Möglichkeit, die oben genannten Resultate miteinander in Einklang zu bringen, wäre folgende Hypothese:
Durch absteigende serotonerge und noradrenerge, anti-nozeptive bulbospinale Bahnen wird bei Schmerz Serotonin und Noradrenalin verstärkt und in unterschiedlichem Maße ausgeschüttet [110, 28, 62, 81, 81]. Anzumerken ist hier, daß es sich in diesen Arbeiten um akuten Schmerz bei Tieren handelt.
Bei Patienten mit stärkerem Schmerz wären folglich die Konzentrationen dieser beiden Neurotransmitter bzw. deren Metaboliten höher, es sei denn, sie nähmen Analgetika ein. Dadurch werden sehr hohe Konzentrationen verhindert und so der Mittelwert nach unten beeinflußt. Dies erklärte die Zunahme der mittleren Konzentration des MHPG in Gruppe 4 (Patienten mit FMS ohne Einnahme von interferierenden Pharmaka) gegenüber Gruppe 1 (Patienten mit FMS).
Die Abnahme von Gruppe 2 (Patienten mit neurologischen Erkrankungen/PNP) nach 5 (Patienten mit neurologischen Erkrankungen/PNP ohne Einnahme von interferierenden Pharmaka) könnte dadurch bedingt sein, daß das Schmerzniveau insgesamt geringer ist.
Da keine Messungen über die Schmerzintensität der Patienten vorliegen, bleiben diese Annahmen spekulativ.

Ein weiterer Gesichtspunkt sind die geringen Fallzahlen, welche die statistische Bewertung erschweren und eine eindeutige Aussage über einen signifikanten Unterschied im Noradrenalinumsatz von Patienten mit FMS und neurologischen Erkrankungen im Rahmen dieser Untersuchung nicht zulassen.

Möglicherweise sind auch die untersuchten Gruppen nicht klar genug von einander abzugrenzen, ist ihnen doch chronischer Schmerz gemeinsam:
Patienten mit FMS haben zumeist eine über Jahre reichende "Patientenkarriere" hinter sich bis zur Diagnosestellung, d.h. teilweise seit Jahren Schmerzen [114, 96]. Zusätzlich ist anzumerken, daß Untergruppen inner-

halb des FMS [60, 74] vermutet werden, wodurch die Patientengruppe mit FMS in sich bereits inhomogen würde.
Polyneuropathien entwickeln sich ebenfalls meist chronisch progredient über Monate bis Jahre hin [65]. Bei Rückenschmerzen zeigt der klinische Alltag, daß auch diese sehr oft einen Verlauf über längere Zeit nehmen.
Es wird nun angenommen, daß länger bis lang anhaltender Schmerz zu anatomischen und physiologischen Veränderungen auf Ebene der peripheren Nozizeptoren, auf spinaler Ebene (u.a. zur Störung von deszendierenden anti-nozeptiven Systemen) [73] und zentraler Ebene [25] führt. Ähnliche Veränderungen wie eine qualitativ veränderte Schmerzwahrnehmung [12, 39] werden auch beim FMS beobachtet. Beim FMS zeigt sich ferner ein verringerter regionaler Blutfluß in Thalamus und Nucl. caudatus wie auch bei chronischem Schmerz [36].
Weitere Überschneidungspunkte zwischen den in dieser Arbeit verglichenen Patientengruppen machen Lapossy et al. deutlich, wenn sie vom Übergang von chronischem Rückenschmerz zu FMS berichten [63], wobei die Diagnose FMS nach den Kriterien von Yunus et Wulfe (modifiziert nach Müller und Lautenschläger) gestellt wurde. Auch ein Teil (15 von 135) der von Walter et al. untersuchten Patienten mit Rückenschmerzen erfüllen die Kriterien des ACR für FMS. Sie gelangen zu dem Schluß, daß Einschränkung der Lebensqualität, Schmerzverhalten, Behinderung und schmerzbezogene Wahrnehmung generell durch Zustände starken Schmerzes verursacht werden und nicht spezifisch für das FMS sind [111].
So findet auch die Klassifikation des American College of Rheumatology (ACR) an sich Kritiker. Quintner und Cohen bezeichnen das Konzept des ACR als Argumentation im Kreisschluß aufgrund der unzureichenden Trennung von Patienten mit FMS (mehr als 11 von 18 schmerzhafte tender points) und Gesunden (weniger als 11 schmerzhafte tender points) [87]. Ein weiterer Kritikpunkt ist die Diagnosestellung einzig aufgrund von klinischen Symptomen ohne Konzept von pathophysiologischen Hintergründen dieses chronischen Schmerzes und der Schmerzempfindlichkeit [88].
Trotz aller Kritik muß jedoch gesagt werden, daß die Klassifikation des ACR durch eine gewisse Standardisierung einen Vergleich der verschiedenen Studien zum FMS erst ermöglicht.

Die eben erwähnten Feststellungen zeigen, daß es anhand der Kriterien des ACR zwar nach Ausschluß anderer Erkrankungen möglich ist, die Diagnose FMS zu stellen, diese Kriterien allerdings auch auf Patienten mit anderen Erkrankungen wie beispielsweise chronischen Schmerzen zutreffen. Manche Kritiker des FMS wie Bennett gehen dann gar soweit, daß das FMS als einen "Zustand chronischen Schmerzes genannt Fibromyalgie" [13] bzw. als normale Erscheinung von chronisch-gesteigertem Mißbefinden in einer Gesamtbevölkerung [69] bezeichnet wird und als ei-

ner von mehreren möglichen Endpunkten in der Entwicklung von chronischem Schmerz gesehen wird [13].

Trotz der oben angeführten Argumente bleibt es dennoch weiterhin auffällig, daß die Differenz der Mittelwerte des MHPG erst nach Wegfall von durch Pharmaka beeinflußten Meßwerten zwischen den Gruppen 4 (Patienten mit FMS ohne interferierende Pharmaka) und 5 (Patienten mit neurologischen Erkrankungen/PNP ohne interferierende Pharmaka) zu Tage tritt.

6. Zusammenfassung

Beim Fibromyalgiesyndrom (FMS) wird über Veränderungen im Neurotransmitterstoffwechsel diskutiert. Auch eine Besserung der Symptome des FMS durch Antidepressiva, die über noradrenerge, serotonerge und dopaminerge Nervenzellsysteme wirken, weisen auf derartige Veränderungen hin.

Aus diesem Grunde werden die Abbauprodukte von Noradrenalin, Serotonin und Dopamin an insgesamt fünf Patientengruppen untersucht. Die Vergleichsgruppen setzen sich aus Patienten mit FMS, neurologischen Erkrankungen wie Polyneuropathien oder Rückenschmerzen (low back pain) zusammen, wobei die ersten beiden Patientengruppen nach Wegfall von Patienten unter Einnahme von Psychopharmaka oder Analgetika nochmals miteinander verglichen werden.

Für die Durchführung dieses Vergleichs wurde eine Methode für die High Performance Liquid Chromatography (HPLC) mit elektrochemischer Detektion (ECD) zur gleichzeitigen Messung der Metaboliten von Noradrenalin, Serotonin und Dopamin- 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol (engl. 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycole = MHPG), 5-Hydroxyindolessigsäure (engl. 5-Hdroxyindoleacetic acid = 5-HIAA) und 4-Hydroxy-3-methoxyphenylessigsäure = Homovanillinsäure (engl. Homovanillic acid = HVA)-, welche Rückschlüsse auf den Stoffwechsel im zentralen Nervensystem erlauben, im Liquor cerebrospinalis etabliert.

Die Selektivität der Methode ist hoch und läßt eine gute Auftrennung von MHPG, 5-HIAA und HVA zu. Die Präzision liegt bei Variationskoeffizienten von 3,5 % (MHPG), 1,7 % (5-HIAA) und 1,0 % (HVA) bei der Präzision in der Wiederholung (Intra-Assay-Precision) sowie von 13,6 % (MHPG), 9,3 % (5-HIAA) und 12,6 % (HVA) bei der Präzision von Tag zu Tag (Inter-Assay-Precision). Wiederfindung und Richtigkeit liegen durch die nicht zu vermeidende Verwendung von unterschiedlichen Matrices bei deren Bestimmung bei 112 % (MHPG), 103 % (5-HIAA) und 102 % (HVA) bzw. 114 % (MHPG), 106 % (5-HIAA) und 105 % (HVA). Mit einem Arbeitsbereich von 3,0 – 248 ng/ml (MHPG), 3,5 – 252 ng/ml (5-HIAA) und 3,5 -269 ng/ml (HVA) wird das zu erwartende Spektrum an möglichen Meßwerten gut abgedeckt.
Abschließend kann über die in dieser Arbeit etablierte Methode gesagt werden, daß sie eine einfache Untersuchung von MHPG, 5-HIAA und HVA erlaubt und aussagefähige Ergebnisse bei deren Bestimmung ermöglicht.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse beim Vergleich der fünf Patientengruppen sind mit denjenigen veröffentlichter Arbeiten teilweise konform:
In allen fünf Patientengruppen finden sich signifikante positive Korrelationen zwischen 5-HIAA und HVA ($p = 0{,}000$ bis $0{,}05$), welche sich auch in anderen Arbeiten finden.
Beim Vergleich der Mittelwerte von HVA von Patienten mit FMS (35,3 ng/ml) und von Patienten mit Rückenschmerzen (22,6 ng/ml) fällt eine statistisch signifikant ($p=0{,}003$) höhere Konzentration in der ersteren Gruppe auf. Dieser festgestellte Unterschied ist letztlich als Hinweis auf eine mögliche erhöhte Aktivität des dopaminergen Systems bei Patienten mit FMS gegenüber Patienten mit neurologischen Erkrankungen, speziell Rückenschmerzen, zu bewerten.
Weiterhin zeigt der Vergleich der Mittelwerte von MHPG zwischen Patienten mit FMS ohne Einnahme interferierender Pharmaka (40,9 ng/ml) und Patienten mit neurologischen Erkrankungen wie Polyneuropathien ohne Einnahme interferierender Pharmaka (30,5 ng/ml) eine signifikant höhere mittlere Konzentration in der ersten Gruppe.
Auch nach Diskussion verschiedener Ursachen bleibt es auffällig, daß dieser Unterschied erst nach dem Wegfall von Patienten unter Einnahme von Analgetika und Psychopharmaka zutage tritt.

Es zeigen sich in der vorliegenden Arbeit jedoch insgesamt Hinweise auf Störungen in zentralen Neurotransmittersystemen- insbesondere dem dopaminergen und noradrenergen.
Für weitere Studien erlaubt die hier etablierte Methode eine einfache Untersuchung an größeren Patientenkollektiven .

7. Literaturverzeichnis

1. Aberg-Wistedt A, Ross SB, Jostell KG, Sjoquist B. A double-blind study of zimelidine, a serotonin uptake inhibitor, and desipramine, a noradrenaline uptake inhibitor, in endogenous depression. II. Biochemical findings. *Acta Psychiatr Scand* 1982; 66(1):66-82.

2. Agren H. Depression and altered neurotransmission-states, traits and interactions. In: Angst J, editor. *The Origins of Depression, Current Concepts and Approaches*. Berlin: Springer, 1983:297-311.

3. Agren H, Mefford IN, Rudorfer MV, Linnoila M, Potter WZ. Interacting Neurotransmitter Systems. A Non-Experimental Approach to the 5HIAA-HVA Correlation in Human CSF. *J psychiat Res* 1986; 20(3):175-193.

4. Ansari A. The efficacy of newer antidepressants in the treatment of chronic pain: A review of current literature. *HARV REV PSYCHIATRY* 2000; 7/5(257-277):-277.

5. Asberg M, Bertilsson L, Martensson B, Scalia TG, Thoren P, Traskman BL. CSF monoamine metabolites in melancholia. *Acta Psychiatr Scand* 1984; 69(3):201-219.

6. Asberg M, Ringberger VA, Sjoqvist F, Thoren P, Traskman L, Tuck JR. Monoamine metabolites in cerebrospinal fluid and serotonin uptake inhibition during treatment with chlorimipramine. *Clin Pharmacol Ther* 1977; 21(2):201-207.

7. Asberg M, Traskman L. Studies of CSF 5-HIAA in depression and suicidal behaviour. *Adv Exp Med Biol* 1981; 133:739-752.

8. Azmitia EC. Serotonin Neurons, Neuroplasticity, and Homeostasis of Neural Tissue. *Neuropsychopharmacology* 1999; 21:33S-45S.

9. Banki CB, Molnar G. Cerebrospinal Fluid 5-Hydroxyindoleacetic Acid as an Index of Central Serotonergic Processes. *Psychiatry Research* 1981; 5:23-32.

10. Bartels EM. Histological abnormalities in muscle from patients with certain types of fibrositis. *LANCET* 1986;755-757.

11. Beard G. Neurasthenia, or nervous exhaustion. *Boston Med Surg J* 1869; 80:217-221.

12. Bendtsen L, Norregaard J, Jensen R, Olesen J. Evidence of qualitatively altered nociception in patients with fibromyalgia [see comments]. *ARTHRITIS RHEUM* 1997; 40(1):98-102.

13. Bennett RM. Emerging concepts in the neurobiology of chronic pain: Evidence of abnormal sensory processing in fibromyalgia. *MAYO CLIN PROC* 1999; 74/4:385-398.

14. Bennett RM, Bjelle A, Bengtsson M, Burckhardt CS, Goldenberg DL, Henriksson KG et al. *Consensus Document on Fibromyalgia*. Copenhagen: Danish Rheumatism Association, 1992.

15. Berg PA, Klein R. Fibromyalgie-Syndrom: Eine neuroendokrinologische Autoimmunerkrankung? *DTSCH MED WOCHENSCHR* 1994; 119:429-435.

16. Blennow K, Wallin A, Gottfries CG, Karlsson I, Mansson JE, Skoog I et al. Cerebrospinal fluid monoamine metabolites in 114 healthy individuals 18-88 years of age. *EUR NEUROPSYCHOPHARMACOL* 1993; 3/1:55-61.

17. Blennow K, Wallin A, Gottfries CG, Lekman A, Karlsson I, Skoog I et al. Significance of Decreased Lumbar CSF Levels of HVA and 5-HIAA in Alzheimer´s Disease. *Neurobiology of Aging* 1991; 13:107-113.

18. Blennow K, Wallin A, Gottfries CG, Mansson JE, Svennerholm L. Concentration gradients for monoamine metabolites in lumbar cerebrospinal fluid. *J NEURAL TRANSM PARKINSON 'S DIS DEMENTIA SECT* 1993; 5/1:5-15.

19. Boobis AR, Murray S, Jones DH, Reid JL, Davies DS. Urinary conjugates of 4-hydroxy-3-methoxyphenylethylene glycol do not provide an index of brain amine turnover in man. *Clin Sci* 1980; 58(4):311-316.

20. Bowers MB. Clinical measurements of central dopamine and 5-hydroxytryptamine metabolism: Reliability and interpretation of cerebrospinal fluid acid monoamine metabolite measures. *Neuropharmacology* 1972; 11:101-111.

21. Braitenberg V, Schütz A. Allgemeine Neuroanatomie. In: Schmidt RF, editor. *Neuro- und Sinnesphysiologie*, 3 edn. Berlin; Heidelberg; New York: Springer Verlag, 1998:1-30.

22. Breier A. Serotonin, schizophrenia and antipsychotic drug action. *Schizophrenia Research* 1995; 14:187-202.

23. Bundesärztekammer V. Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Deutsches Ärzteblatt* 2001; 42(98):A2747-A2759.

24. Carlsson A. A Paradigm Shift in Brain Research. *Science* 2001; 294(November):1021-1024.

25. Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL, Melzack R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: Review of clinical and experimental evidence. *PAIN* 1993; 52/3:259-285.

26. Csillag C. Fibromyalgia: the Copenhagen declaration. *LANCET* 1992; 340:663-664.

27. Degrell I, Nagy E. Concentration Gradients for HVA, 5-HIAA, Ascorbic Acid and Uric Acid in Cerebrospinal Fluid. *BIOL PSYCHIATRY* 1990; 27:891-896.

28. Dennis SG, Melzack R. Pain modulation by 5-hydroxytryptaminergic agents and morphine as measured by three pain tests. *Exp Neurol* 1980; 69:260-270.

29. Dudel J. Synaptische Übertragung. In: Schmidt RF, editor. *Neuro- und Sinnesphysiologie*, 3 edn. Berlin; Heidelberg; New York: Springer Verlag, 1998:59-84.

30. Eklundh T, Eriksson M, Sjoberg S, Nordin C. Monoamine precursors, transmitters and metabolites in cerebrospinal fluid: A prospective study in healthy male subjects. *J PSYCHIATR RES* 1996; 30/3:201-208.

31. Eppendorf AG. Eppendorf Reference. WorldWideWeb . 2001. 1605.

32. Fassbender K, Samborsky W, Kellner M, Muller W, Lautenbacher S. Tender points, depressive and functional symptoms: Comparison between fibromyalgia and major depression. *CLIN RHEUMATOL* 1997; 16/1(76-79):-79.

33. Frazer A, Hensler JG. Serotonin. In: Siegel GS, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, editors. *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects*, 6 edn. Philadelphia; New York: Lippincott - Raven, 1999:263-292.

34. Fröhler R, Rall G, Welter D, Ackenheil-M. Catecholamin-Bestimmung im Blut und Liquor mit Hochdruckflüssigkeitschroma-

tographie und elektrochemischem Detektor. *Waters Chromatographie*. Travemünde: 1982.

35. Geracioti-TD J, Keck-PE J, Ekhator NN, West SA, Baker DG, Hill KK et al. Continuous covariability of dopamine and serotonin metabolites in human cerebrospinal fluid. *BIOL PSYCHIATRY* 1998; 44(3):228-233.

36. Goldenberg DL. Fibromyalgia syndrome a decade later: What have we learned? *ARCH INTERN MED* 1999; 159/8:777-785.

37. Goldenberg DL, Mayski M, Mossey C, Ruthazer R, Schmid C. A randomized, double-blind crossover trial of fluoxetine and amitryptiline in the treatment of fibromyalgia. *ARTHRITIS RHEUM* 1996; 39:1852-1859.

38. Gowers WR. Lumbago- its lessons and analogues. *Br Med J* 1904; i:117-121.

39. Granges G, Littlejohn G. Pressure pain threshold in pain-free subjects, in patients with chronic regional pain syndromes, and in patients with fibromyalgia syndrome. *ARTHRITIS RHEUM* 1993; 36/5:642-646.

40. Greengard P. The Neurobiology of Slow Synaptic Transmission. *Science* 2001; 294(November):1024-1030.

41. Gunn CC. Fibromyalgia - "What have we created?" (Wolfe 1993). *PAIN* 1995; 60:349-350.

42. Hefti F. A simple, sensitive method for measuring 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid in rat brain tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *LIFE SCI* 1979; 25:775-782.

43. Hey T, Breull A, Fischer GC, Verhagen W. E. coli bacteriophages are associated with the primary fibromyalgia syndrome. Founded hypothesis for pathogenesis and course *FORTSCHR MED* 1998; 116/25:18-20.

44. Hill KK, West SA, Ekhator NN, Bruce AB, Wortman MD, Baker DG et al. The effect of lumbar puncture stress on dopamine and serotonin metabolites in human cerebrospinal fluid. *NEUROSCI LETT* 1999; 276/1:25-28.

45. Hjemdahl P. Catecholamine measurements by high-performance liquid chromatography. *Am J Physiol* 1984; 247(1 Pt 1):E13-E20.

46. Hollemann AF, Wiberg A. *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, 101. verbesserte und stark erweiterte Auflage ed. Berlin; New York: de Gruyter, 1995.

47. Holz RW, Fisher SK. Synaptic Transmission and Cellular Signaling: An Overview. In: Siegel GS, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, editors. *Basic Neurochemistry.Molecular, Cellular and Medical Aspects*, 6 edn. Philadelphia; New York: Lippincott - Raven, 1999:191-212.

48. Hudson JI, Hudson MS, Pliner LF, Goldenberg DL, Pope HGJ. Fibromyalgia and major affective disorder: a controlled phenomenology and family history study. *Am J Psychiatry* 1985; 142(4):441-446.

49. Hyland K, Surtees RH, Heales SR, Bowron A, Howells DW, Smith I. Cerebrospinal fluid concentrations of pterins and metabolites of serotonin and dopamine in a pediatric reference population. *PEDIATR RES* 1993; 34/1:10-14.

50. Jaber M, Robinson SW, Missale C, Caron MG. Dopamine Receptors and Brain Function. *Neuropharmacology* 1996; 35(11):1503-1519.

51. Klein R, Bänsch M, Berg PA. Clinical relevance of antibodies against serotonin and gangliosides in patients with primary fibromyalgia syndrome. *Psychoneuroendocrinology* 1992; 17(6):593-598.

52. Kobayashi K, Imazu Y, Kawabata M, Shohmori T. Effect of long-term storage on monoamine metabolite levels in human cerebrospinal fluid. *Acta Med Okayama* 1987; 41(4):179-181.

53. Kromidas S. 3.10 Arbeitsbereich. *Validierung in der Analytik*. Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-VCH, 1999:185-186.

54. Kromidas S. 3.3 Präzision. *Validierung in der Analytik*. Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-VCH, 1999:52-86.

55. Kromidas S. 3.4 Richtigkeit. *Validierung in der Analytik*. Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-VCH, 1999:87-109.

56. Kromidas S. 3.6 Selektivität und Spezifität. *Validierung in der Analytik*. Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-VCH, 1999:127-146.

57. Kromidas S. 3.7 Linearität. *Validierung in der Analytik*. Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-VCH, 1999:147-172.

58. Kromidas S. 3.8 Wiederfindung oder Wiederfindungsrate. *Validierung in der Analytik*. Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-VCH, 1999:172-176.

59. Kromidas S. 3.9 Nachweis-, Bestimmungs- und Erfassungsgrenze. *Validierung in der Analytik*. Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-VCH, 1999:176-185.

60. Kuebler-Nolde B, Gschneidinger E, John J, Zoeller B. Fibromyalgie- kein einheitliches Krankheitsbild. Z Rheumatol 53[2], 108. 1994.

61. Kuhar MJ, Couceyro PR, Lambert PD. Catecholamines. In: Siegel GS, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, editors. *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects*, 6 edn. Philadelphia; New York: Lippincott - Raven, 1999:243-261.

62. Kuraishi Y, Harada Y, Aratani S, Satoh M, Tagaki H. Separate involvement of the noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: The differences in mechanical and thermal algesic tests. *Brain Res* 1983; 274:245-252.

63. Lapossy E, Hrycai P, Mennet P, Mueller W, Maleitzke R. The transition of chronic low back pain to fibromyalgia. Z Rheumatol 53[2], 108. 1994.

64. Leventhal LJ. Management of fibromyalgia. *ANN INTERN MED* 1999; 131/11:850-858.

65. Liebsch R. *Intensivkurs: Neurologie*. München,Wien,Baltimore: Urban und Schwarzenberg, 1996.

66. Linnoila M, Ninan PT, Scheinin M, Waters RN, Chang W-H, Bartko J et al. Reliability of norepinephrine and major monoamine metabolite measurements in CSF of schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry* 1983; 40:1290-1294.

67. Mann JJ. Role of the Serotonergic System in the Pathogenesis of Major Depression and Suicidal Behavior. *Neuropsychopharmacology* 1999; 21(2S):99S-105S.

68. Mardh G, Anggard E. Norepinephrine metabolism in man using deuterium labelling: origin of 4-hydroxy-3-methoxymandelic acid. *J Neurochem* 1984; 42(1):43-46.

69. Masi AT. Concepts of illness in populations as applied to Fibromyalgia Syndromes: An updated perspective. Z Rheumatol 56[6], 357-359. 1997.

70. Mathies H. Psychosomatische Befunde bei der Fibromyalgie und verwandten Syndromen. Z Rheumatol 53[2], 110. 1994.

71. Mena MA, Aguado EG, Yebenes de JG. Monoamine metabolites in human cerebrospinal fluid. HPLC/ED method. *ACTA NEUROL SCAND* 1984; 69:218-225.

72. Mense S. Basic neurobiologic mechanisms of pain and analgesia. *Am J Med* 1983; 75(5A):4-14.

73. Mense S. Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. *PAIN* 1993; 54/3:241-289.

74. Meyer-Lindenberg A. Somatized depression as a subgroup of Fibromyalgia Syndrome. Z Rheumatol 56[6], 368. 1997.

75. Milhorat TH, Hammock MK. Cerebrospinal Fluid as Reflection of Internal Milieu of Brain. In: Wood JH, editor. *Neurobiology of Cerebrospinal Fluid* Vol. 2. New York; London: Plenum Press, 1983:1-23.

76. Murphy RM, Zemlan FP. Differential effects of substance P on serotonin-modulated spinal nociceptive reflexes. *Psychopharmacology* 1987; 93:118-121.

77. Naranjo JR, Arnedo A, Molinero MT, Rio dJ. Involvement of spinal monoaminergic pathways in antinociception produced by substance P and neurotensin in rodents. *Neuropharmacology* 1989; 28(3):291-298.

78. Nasralla M, Haier J, Nicolson GL. Multiple mycoplasmal infections detected in blood of patients with chronic fatigue syndrome and/or fibromyalgia syndrome. *EUR J CLIN MICROBIOL INFECT DIS* 1999; 18/12:859-865.

79. Neuhuber W. Innerer Aufbau und Leitungsbahnen des Hirnstamms. In: Drenckhahn D, Zenker W, editors. *Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen/ Benninghoff. Band 2. Niere, Reproduktionsorgane, endokrine Drüsen, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut*, 15 edn, Vol. 2. München;Wien;Baltimore; Urban und Schwarzenberg, 1993:471-519.

80. NIH Consensus Development Panel on Acupuncture. Acupuncture. JAMA 280[17], 1518-1524. 1998.

81. Omote K, Kawamata T, Kawamata M, Namiki A. Formalin-induced nociception activates a monoaminergic descending inhibitory system. *Brain Res* 1998; 814(1-2):194-198.

82. Owens MJ, Nemeroff CB. Role of serotonin in the pathophysiology of depression: Focus on the serotonin transporter. *CLIN CHEM* 1994; 40/2:288-295.

83. Parnetti L, Gottfries J, Karlsson I, Langstrom G, Gottfries CG, Svennerholm L. Monoamines and their metabolites in cerebrospinal fluid of patients with senile dementia of Alzheimer type using high performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Acta Psychiatr Scand* 1987; 75(5):542-548.

84. Perlow MJ, Lake CR. Daily Fluctuations in Catecholamines, Monoamine Metabolites, Cyclic AMP and γ-Aminobutyric Acid. In: Wood JH, editor. *Neurobiology of Cerebrospinal Fluid* Vol. 1. New York: Plenum Press, 1980:63-69.

85. Peroutka SJ, Schmidt AW. An overview of 5-hydroxytryptamine receptor families. In: Sandler M, Coppen A, Harnett S, editors. *5-Hydroxytryptamine in Psychiatry. A Spectrum of Ideas*, 2 edn. Oxford; New York; Tokyo: Oxford University Press, 1992:2-22.

86. Pongratz DE, Hübner G, Bigiel C. Zur Myopathologie der generalisierten Tendomyopathie. In: Müller W, editor. *Generalisierte Tendomyopathie (Fibromyalgie) Vorträge anläßich des Symposions über Generalisierte Tendomyopathie (Fibromyalgie) 27.-30.Juni 1990 in Bad Säckingen (D)/Rheinfelden (CH)*. Darmstadt: Steinkopff Verlag, 1990:145-152.

87. Quintner JL, Cohen ML. Fibromyalgia falls foul of a fallacy. *LANCET* 1999; 353/9158(1092-1094):-1094.

88. Quintner JL, Cohen ML. Fibromyalgia falls foul of a fallacy. *LANCET* 1999; 353/9158(1092-1094):-1094.

89. Raspe HH. Epidemiology of the Fibromyalgia Syndrome: definition, occurence, consequences, risk factors. Z Rheumatol 56[6], 359-360. 1997.

90. Reddy PL, Khanna S, Subhash MN, Channabasavanna SM, Rao BS. CSF amine metabolites in depression. *BIOL PSYCHIATRY* 1992; 31(2):112-118.

91. Reinhard JFJr, Moskowitz MA, Sved AF, Fernstrom JD. A simple, sensitve and reliable assay for serotonin and 5-HIAA in brain tissue using liquid chromatography with electrochemical detection. *LIFE SCI* 1980; 27:905-911.

92. Russell IJ. Neurochemical pathogenesis of fibromyalgia. *Z RHEUMATOL* 1998; 57/SUPPL. 2:63-66.

93. Russell IJ, Kamin M, Sager D, Bennett RM, Schnitzer T, Green JA. Efficacy of Ultram (tramadol HCl) treatment of fibromyalgia syndrome: preliminary analysis of a multi-center, randomized, placebo-controlled study. ARTHRITIS RHEUM. 40 (Suppl. 9), 117. 1997.

94. Russell IJ, Orr MD, Littman B, Viprajo GA, Alboukrek D, Michalek JE et al. Elevated cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with the fibromyalgia syndrome. *ARTHRITIS RHEUM* 1994; 37/11:1593-1601.

95. Russell IJ, Smythe, Sternberg, Straus, Yunus. Biochemical abnormalities in fibromyalgia syndrome. *J MUSCULOSKELET PAIN* 1994; 2/3:101-115.

96. Russell IJ, Vaeroy H, Javors M, Nyberg F. Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in fibromyalgia/fibrositis syndrome and rheumatoid arthritis. *ARTHRITIS RHEUM* 1992; 35/5:550-556.

97. Russell IJ, Vipraio G, Morgan WN, Bowden CL. Is there a metabolic basis for the fibrositis syndrome? *Am J Med* 1986; 29(81(3A)):50-54.

98. Scheinin M, Chang WH, Kirk KL, Linnoila M. Simultaneous determination of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol, 5-hydroxyindoleacetic acid, and homovanillic acid in cerebrospinal fluid with high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. *Anal Biochem* 1983; 131(1):246-253.

99. Schochat T, Croft P, Raspe H. The epidemiology of fibromyalgia. Workshop of the Standing Committee on Epidemiology European

League Against Rheumatism (EULAR), Bad Säckingen, 19-21 November 1992. *Br J Rheumatol* 1994; 33(8):783-786.

100. Schwarz MJ, Späth M, Müller-Bardow H, Pongratz DE, Ackenheil M. Substance P and Tryptophan in Serum of Fibromyalgia Patients. 1999.

101. Semba J, Watanabe A, Takahashi R. Determination of free and total 3-methoxy-4-hydroxyphenylethylene glycol in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *CLIN CHIM ACTA* 1985; 152(1-2):185-192.

102. Sjostrom R, Ekstedt J, Anggard E. Concentration gradients of monoamine metabolites in human cerebrospinal fluid. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1975; 38(7):666-668.

103. Stamm D, Büttner J, Wisser H. Allgemeine Klinische Chemie. In: Greiling H, Gressner AM, editors. *Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie*, 3. neubearbeitete edn. Stuttgart, New York: Schattauer, 1995:6-111.

104. Südhof TC. Intracellular Trafficking. In: Siegel GS, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, editors. *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects*, 6 edn. Philadelphia; New York: Lippincott - Raven, 1999:175-188.

105. Tavoni A, Vitali C, Bombardieri S, Pasero G. Evaluation of S-adenosyl-methionine in primary fibromyalgia. A double-blind crossover study. *Am J Med* 1987; 83:107-110.

106. Tohgi H, Takahashi S, Abe T. The effect of age on concentrations of monoamines, amino acids, and their related substances in the cerebrospinal fluid. *J NEURAL TRANSM PARKINSON 'S DIS DEMENTIA SECT* 1993; 5/3:215-226.

107. Träskman-Bendz L, Asberg M, Bertilsson L, Thoren P. CSF monoamine metabolites of depressed patients during illness and after recovery. *Acta Psychiatr Scand* 1984; 69(4):333-342.

108. Trepel M. *Neuroanatomie.Struktur und Funktion*. München; Wien; Baltimore: Urban und Schwarzenberg, 1995.

109. Vaeroy H, Helle R, Forre O, Kass E, Terenius L. Elevated CSF levels of substance P and high incidence of Raynaud phenomenon in patients with fibromyalgia: new features for diagnosis. *PAIN* 1988; 32(1):21-26.

110. Vasko MR, Pang IH, Vogt M. Involvement of 5-hydroxytryptamine-containing neurons in antinociception produced by injection of morphine into nucleus raphe magnus or into spinal chord. *Brain Res* 1984; 306:341-348.

111. Walter B, Vaitl D, Frank R. Comparison of low back pain patients with and without Fibromyalgia: quality of life and pain characteristics. Z Rheumatol 56[6], 370. 1997.

112. WHO. ICD-10. Universität München, editor. http://www.med.uni-muenchen.de/icd/ALL/M70-M79.htn . 2000.

113. Wode-Helgodt B, Fyrö B, Gullberg B, Sedvall G. Effect of chlorpromazine treatment on monoamine metabolite levels in cerebrospinal fluid of psychotic patients. *Acta Psychiatr Scand* 1977; 56:129-142.

114. Wolfe F, Anderson J, Harkness D, Bennett RM, Caro XJ, Goldenberg DL et al. A prospective, longitudinal, multicenter study of service utilization and costs in fibromyalgia. *ARTHRITIS RHEUM* 1997; 40/9:1560-1570.

115. Wolfe F, Anderson J, Harkness D, Bennett RM, Caro XJ, Goldenberg DL et al. Health status and disease severity in fibromyalgia: Results of a six- center longitudinal study. *ARTHRITIS RHEUM* 1997; 40/9:1571-1579.

116. Wolfe F, Ross K, Anderson J, Russell IJ, Hebert L. The prevalence and characteristics of fibromyalgia in the general population. *ARTHRITIS RHEUM* 1995; 38/1:19-28.

117. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classifcation of Fibromyalgia. *ARTHRITIS RHEUM* 1990; 33(2):160-172.

118. Wood JH. Neurochemical analysis of cerebrospinal fluid. *Neurology* 1980; 30(6):645-651.

119. Wood JH. Physiology, Pharmacology, and Dynamics of Cerebrospinal Fluid. In: Wood JH, editor. *Neurobiology of Cerebrospinal Fluid* Vol. 1. New York: Plenum Press, 1980:1-16.

120. Wood JH. Sites of Origin and Cerebrospinal Fluid Concentration Gradients. Neurotransmitters, Their Precursors and Metabolites, and Cyclic Nucleotides. In: Wood JH, editor. *Neurobiology of Cerebrospinal Fluid* Vol. 1. New York: Plenum Press, 1980:53-62.

121. Wood JH. Technical Aspects of Clinical and Experimental Cerebrospinal Fluid Investigations. In: Wood JH, editor. *Neurobiology of Cerebrospinal Fluid* Vol. 1. New York: Plenum Press, 1980:71-96.

122. Yunus MB, Masi AT, Calabro JJ, Miller KA, Feigenbaum SL. Primary fibromyalgia (fibrositis): clinical study of 50 patients with matched normal controls. *Sem Arthritis Rheum* 1981; 11:151-171.

123. Ziegler MG, Lake CR, Wood JH, Ebert MH. Norepinephrine in Cerebrospinal Fluid. In: Wood JH, editor. *Neurobiology of Cerebrospinal Fluid* Vol. 1. New York: Plenum Press, 1980:141-152.

8. Anhang

A Verwendete Patientendaten

Im Folgenden sind die verwendeten Meßwerte der Patienten sowie deren Medikamention und Diagnose gruppenweise aufgeführt.

Zusätzlich sind Geschlecht, Alter, der Zeitpunkt der Liquorpunktion und der Analyse erwähnt.

Das Probenalter ist in Monaten angegeben, die einzelnen Meßwerte in ng/ml.

Mit * gekennzeichnete Proben werden wegen Einnahme von interferierenden Pharmaka (unterstrichen), die Einfluß auf die untersuchten Neurotransmittersysteme nehmen, aus Gruppe 1 bzw. 2 herausgenommen; die verbleibenden Patienten bilden die Gruppen 4 bzw. 5.
Um die Altersstruktur von Gruppe 5 wieder an Gruppe 4 anzugleichen, wurden entsprechend weitere Patienten aus Gruppe 5 ausgeschlossen.

Gruppe 1 bzw. 4

Nr	G	Alter	Diagnose	Medikamente zum Zeitpunkt der Liquorpunktion	Punktion am	Probenalter	Analyse am	MHPG	5-HIAA	HVA	Iso-HVA
1*	1	46	FMS, Hypertriglyceridämie, Gastritis	Mydocalm, Stangyl, Decortin	27.08.98	12	18.08.99	34,15	22,05	26,83	16,54
3*	1	50	FMS	Sostril, Noctamid, Saroten	22.07.99	1	28.08.99	27,20	20,33	34,79	14,74
4	1	56	Arthralgien im Rahmen einer Lyme-Arthritis, sek FMS, BPH	MTX, Prostagutt, Decortin, Azulfidin	08.07.98	13	18.08.99	38,57	26,57	45,82	16,37
5*	2	28	FMS	Paracetamol	22.01.98	19	27.08.99	44,90	15,78	36,04	15,86
6	2	33	FMS		06.07.98	13	18.08.99	26,85	16,70	33,69	17,01
7	2	41	FMS, Hypothyreose	Jodid, L-Thyrox	27.05.98	15	28.08.99		15,82	30,52	15,24
8*	2	45	sek FMS, progred ext Ophthalmoplegie bei mitochondr Myopathie	Paracetamol, Aurorix	31.05.99	3	27.08.99	25,50	14,84	11,81	15,74
9	2	47	FMS	Jodid	24.11.98	9	18.08.99	39,29	9,99	19,81	17,30
10	2	53	FMS		24.08.98	12	24.08.99	44,15	21,83	44,51	16,37
11	2	55	FMS		19.02.98	18	18.08.99	46,04	22,93	39,43	16,40
12	2	56	FMS	Jarsin iv.	16.02.98	18	18.08.99	34,09	17,06	35,43	16,29
13	2	57	FMS, art. Hypertonie		10.03.98	17	18.08.99	52,31	16,47	41,29	16,29
14	2	57	FMS	Euthyrox	16.07.98	13	24.08.99	44,70	19,17	27,84	16,29
15*	2	57	FMS	Voltaren, Mydocalm	05.03.98	17	27.08.99		24,44	30,68	15,60
16	2	60	FMS		17.09.98	11	18.08.99	42,31	38,36	70,72	16,92

Gruppe 2 bzw. 5

Nr	G	Alter	Diagnose	Medikamente zum Zeitpunkt der Liquorpunktion	Punktion am	Proben-alter	Analyse am	MHPG	5-HIAA	HVA	Iso-HVA
17*	1	44	prim axon betonte Neuropathie unkl Gen		10.07.98	13	17.08.99	26,12	3,05	11,69	16,67
19	1	51	sensomot symm demyel PNP unkl Gen, M Bechterew		11.12.98	8	17.08.99	30,89	10,78	13,96	17,32
20*	1	55	schwere sensomotor NP	ASS, Metoprolol, Delix, Amaryl	30.09.98	11	16.08.99	39,01	20,39	34,84	17,35
21*	2	26	heredit. sensomotor Neuropathie	Contrazeptivum	05.10.98	10	16.08.99	25,62	25,74	40,88	17,25
22	2	32	PNP unkl Gen		30.07.98	13	16.08.99	46,67	18,25	23,79	17,19
23	2	41	Friedreichsche Ataxie (spinocerebelläre Heredoataxie)		27.03.98	17	17.08.99	24,20	18,20	26,43	16,69
24	2	46	chron entz ZNS-Erkr unkl Gen	Acimethin, Euthyrox, Jodid	27.01.99	7	08.09.99	16,08	11,73	12,76	17,02
25	2	47	PNP unkl Gen		03.07.98	13	24.08.99	26,68	9,06	11,79	17,90
26	2	52	dyst Parese li unkl Gen		20.07.98	13	16.08.99	27,92	13,68	26,84	17,05
27	2	56	rasch progr sensomot PNP bei Wegener Granulomatose	Decortin, Calcium, D-Vigantoletten, Sostril	04.11.98	9	24.08.99		18,72	22,30	18,76
28	2	56	Ataxie u. Parästhesie bei zerebraler Mikroangiopathie		22.06.98	14	08.09.99		31,56	65,32	18,63
29	2	57	unkl Myalgie/Arthralgie, sek Sjögren-Syndrom	Mydocalm, Jarsin, Spondivit, Vesdil, Gynkordin, Zocor	15.03.99	5	08.09.99		20,45	49,12	17,97
30*	2	58	dyst symm beinbet demyel sensomot PNP unkl Gen	Paracetamol	25.01.99	7	17.08.99	47,42	17,20	30,15	16,74
31	2	60	beinbet dyst-symm sensibel betonte PNP		19.02.98	18	16.08.99	41,16	32,77	40,96	16,10
32*	2	61	PNP unkl Gen	L-Thyroxin	18.05.98	15	16.08.99		22,12	30,90	16,71

Gruppe 3

Nr	G	Alter	Diagnose	Medikamente zum Zeitpunkt der Liquorpunktion	Punktion am	Proben-alter	Analyse am	MHPG	5-HIAA	HVA	Iso-HVA
33	1		Wurzelkompression bei Spinalstenose		13.09.96	35	25.08.99		16,05	20,40	16,85
34	1		Wurzelkompression L4		23.08.96	36	20.08.99	32,38	13,32	17,27	16,85
35	1		Wurzelkompression L5		23.08.96	36	25.08.99	40,17	25,26	19,60	17,63
36	1		Wurzelirritation S1		21.08.96	36	20.08.99	57,35	17,58	28,98	16,60
37	1		Wurzelkompression L5		21.08.96	36	25.08.99		15,54	20,74	16,41
38	1		Wurzelirritation S1		16.08.96	36	25.08.99	45,29	22,82	25,85	17,53
39	1		LWS-Syndrom		16.08.96	36	26.08.99	30,47	15,23	29,95	16,87
40	1		degenerat. LWS-Syndrom		14.08.96	36	26.08.99	36,64	10,95	14,74	16,94
49	1		Wurzelkompression S1		31.07.96	37	20.08.99	20,89	18,30	26,78	16,80
50	1		Wurzelkompression L5		26.07.96	37	20.08.99	23,23	9,80	13,20	16,96
51	1		Wurzelirritation S1		17.07.96	37	25.08.99	31,65	16,91	18,80	18,22
52	1		Wurzelkompression L5		31.07.96	37	25.08.99	38,17	31,06	20,68	17,22
53	1		Wurzelkompression S1		19.07.96	37	26.08.99	31,58	25,42	31,41	16,88
54	1		Wurzelkompression L5		02.08.96	36	26.08.99		15,63	20,71	15,68
41	2		Wurzelkompression L4		28.08.96	36	25.08.99	49,92	19,41	19,29	16,39
42	2		Wurzelirritation S1		28.08.96	36	25.08.99	26,35	22,18	41,14	20,66
43	2		Wurzelkompression L5		09.08.96	36	26.08.99			11,49	16,35
44	2		Wurzelkompression L5		07.08.96	36	26.08.99	39,39	22,42	26,83	18,02
45	2		Wurzelkompression L5		31.07.96	37	20.08.99	29,93	16,56	20,92	16,83
46	2		Wurzelirritation S1		26.07.96	37	25.08.99		31,68	35,77	17,66
47	2		Wurzelkompression S1		26.07.96	37	26.08.99		20,43	20,40	16,15
48	2		Wurzelkompression L5		24.07.96	37	26.08.99		8,14	12,55	15,95

B Verwendetes Material

Pumpe:	Gynkotek High Precision Pump Model 300
Injektor:	Waters 717plus Autosampler
Säule:	Merck LiChroCART^{R} 250-4 HPLC Cartridge, Lot. L 293786, No. 832827
Füllmaterial:	Superspher^{R} 60 RP-select B
Vorsäule:	Merck LiChroCART 4-4 Superspher^{R} 60 RP-select B
Säulenthermostat:	Peltier-Kolonnenthermostat
Detektor:	Waters M460 (Millipore^{R}) mit Glassy Carbon Working Electrode (Order No. 41.203) und Ag/AgCl-Referenzelektrode für Detektor No. 41.000 von Chromsystems in einer Edelstahlmeßzelle
Kapillaren:	PEEK- und Stahlkapillaren mit Durchmesser 0,17 und 0,25 mm der Firma ERC Gesellschaft für den Vertrieb von wissenschaftlichen Geräten
Software:	Millennium^{32} Version 3.05 (Waters Co. 1998); Statistical Package for the Sozial Sciences (SPSS) for Windows Release 9.0.1; ChemWindow3, Version 3.0 (Soft Shell Int. 1989-1993) für Graphiken der Strukturformeln
Computer:	Personalcomputer mit Pentium 166 Prozessor
Substanzen:	**4-Hydroxy-3-methoxyphenylglycol (MHPG):** Sigma, EEC No: 266-689-7, H-1377, Lot 47H2622 **3-Hydroxy-4-methoxyphenylglycol (Iso-MHPG):** aus Beständen der neurochemischen Abteilung **5-Hydroxyindol-3-essigsäure (5-HIAA):** Sigma, EEC No: 200-195-4, H-8876, Lot 65H1033 **4-Hydroxy-3-methoxyphenylessigsäure (HVA):** Sigma, EEC No: 306-08-1,H-1252, Lot 42H7706 **3-Hydroxy-4-methoxyphenylessigsäure (Iso-HVA):** Roche, 10-7666/000, F316b-11.89

Natriumacetat:	Merck KGaA, Suprapur^{R}, wasserfrei
Methanol:	pro analysi, Merck, 1.06009.2500
Salzsäure:	30%, Merck, Suprapur^{R}, 1.00318.0250
Perchlorsäure:	70%, Merck, Suprapur^{R}, 1.00517.0250
H_2O:	entionisiert mit einer Millipore Milli-Q Plus Anlage
Feinwaage:	Sartorius M2P elektronische Mikrowaage
Analysenwaage:	Mettler P160 Analysenwaage
Filter:	Schleicher und Schell, Membranfilter OE 66, 0,2 µm, 47mm Durchmesser, Ref-No: 404112
pH-Meter:	inoLab pH Level 1 mit WTW pH SenTix 81-Elektrode
Zentrifuge:	Hettich Mikro 22R
Eluent:	0,05 mol Natriumacetat-Puffer mit 1% Methanol auf pH 4,50 mit HCl (30%, Suprapur^{R}) eingestellt

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. M. Ackenheil für die Überlassung des Themas und die hilfreiche Unterstützung und Beratung.

Weiterer Dank gebührt Herrn Dr. med. M. Schwarz für die hilfsbereite Betreuung in wissenschaftlichen und theoretischen Belangen sowie Herrn L. Deuringer und Frau S. Sirch für die Hilfe und Beratung in technischen Fragen.

Ebenso danke ich meiner Frau Christina und Herrn Dipl.-Ing. (FH) F. Pollich, die durch ihre moralische und technische Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

12.11.1971	Geburt in Augsburg Vater Dr. med. Walter Bentele Mutter Annemarie Bentele, geb. Großhauser
1978	Einschulung in die Grundschule Kriegshaber, Augsburg
1982	Übertritt auf das Gymnasium bei St. Stephan, Augsburg
1991	Abschluß des Gymnasiums mit Abitur
1991 - 1994	Ausbildung zum Sparkassenkaufmann bei der Stadtsparkasse Augsburg
1993 - 1994	Freistellung zum Grundwehrdienst als Sanitäter bei der Luftwaffe
1995 - 2001	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
2000 - 2001	Praktisches Jahr: Innere Medizin in der III. Medizinischen Klinik, Klinikum Augsburg, Anästhesie in der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Klinikum Augsburg, Chirurgie in der I. und III. Chirurgischen Klinik, Klinikum Augsburg und in den Departments of Upper GI, Colorectal and Thoracic Surgery, Concord Repatriation General Hospital, Sydney, Australien
2002 - 2003	Arzt im Praktikum in der Gemeinschaftspraxis für Anästhesie an den Hessing-Kliniken, Augsburg
2002	Hochzeit mit Christina Paulus
2003 - 2004	Arzt in Weiterbildung in der Gemeinschaftspraxis für Anästhesie an den Hessing-Kliniken, Augsburg